

AISLAMIENTO DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EN ANIMALES DE LABORATORIO

I. LIMITACIONES DE LA INFORMACION DISPONIBLE

O.J. DEGREGORIO¹, V.M. VARELA-DIAZ²

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. El análisis de la bibliografía disponible sobre el aislamiento del virus de la fiebre aftosa reveló que la inoculación de animales de laboratorio con fines diagnósticos no ha sido uniformada. Los estudios realizados sobre la efectividad de las distintas especies difieren metodológicamente entre sí, en lo que respecta a varios parámetros que incluyen la especie, edad, sexo y cepa del huésped, así como la dosis, vía de inoculación y volumen del inóculo. El empleo de virus adaptados a cultivos o a diferentes especies animales representa otra variable, si se considera que su infectividad no sería comparable a la de las cepas de campo. Por ende, se desconoce la susceptibilidad comparativa de las distintas especies de animales de laboratorio para aislar el virus de la fiebre aftosa y consecuentemente, su efectividad diagnóstica en muestras de bovinos infectados naturalmente.

Considerando que la fiebre aftosa es la enfermedad de mayor importancia económica para la ganadería de los países de América del Sur, la disponibilidad de procedimientos para su diagnóstico rápido y certero en animales enfermos, así como en portadores del agente, adquiere un interés primordial. De ahí que, para aislar el Aphthovirus que la causa, se hayan empleado distintas especies de animales de laboratorio, de características diversas.

En general, los trabajos efectuados en animales de laboratorio tratan sobre la etiopatogenia (3, 8, 10, 18, 19, 26, 28, 30, 32, 33, 35, 38, 42, 43) e inmunidad (14, 16) de la fiebre aftosa, así como sobre la evaluación de métodos diagnósticos

(1, 2, 4, 5, 7, 12, 15, 17, 20, 23, 24, 27, 31, 34, 36, 37, 39, 45). A tal efecto, se han utilizado ratones (5, 7, 12-14, 21, 24, 36, 39-41, 43-45), ratas (13, 14, 39), cobayos (1, 2, 5, 7, 9, 23, 39-42), conejos (9, 15, 20), hamsters (27, 29, 37) y meriones (17). En otros estudios similares también se han empleado otras especies, como bovinos (7, 22, 23, 36), porcinos, caninos, felinos y equinos (15) y otros sistemas como cultivos celulares (4, 7, 23, 31, 36) y embriones de pollo (34).

La revisión de la bibliografía sobre el aislamiento de los Aphthovirus realizada en este trabajo sugiere que el criterio para la elección de distintas especies de animales de laboratorio para inocularlas con fines diagnósticos no se ha basado en estudios comparativos normalizados. Al respecto, se analizan las características de los animales, inóculos, virus, y diseños experimentales empleados, con el propósito de fundamentar la necesidad de efectuar otros estudios sobre el particular.

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

Características de los animales

El número de animales utilizado en estos estudios, dato esencial para poder evaluar sus implicancias, se indica en la mayoría de las publicaciones (1,2,5,7,9,12,17,22,23,27,36,40,43-45), pero no se menciona en muchas otras (4,13,15,20,21,31,34,37,39,41,42).

Por otra parte, la edad de los animales muestra una gran variabilidad en las diversas publicaciones, a pesar de las reconocidas diferencias en susceptibilidad al Aphthovirus que se han asociado con esta característica (43). Así, se ha señalado el empleo de ratones neonatos (16) o lactantes sin especificar su edad (14), o de 1-2 días (23), de 4-7 días (43), de 4-8 días (21), de 4-10 días (13), de 5-7 días (44), de 5-8 días (5), de 6-8 días (7,36) o de 7-10 días (40); ratones de 1 semana (41), de 3 semanas (40), de más de 5 semanas (39) o de 60-80 días (12); adultos gestantes (14), hembras de 90 días de edad (5), o de 3 a 9 meses (45). En lo que respecta a otras especies, su edad ha sido especificada para las ratas como de 10-20 horas (13) o lactantes (14,39); para los conejos, neonatos (15), o de 45 días de edad (20); y para los hamsters de 7 a 21 días (37) o de 7 a 60 días (35).

En el caso de los meriones, se han utilizado lactantes, de 1 a 4 meses y adultos (17) y, de los bovinos, novillos de 2 años (22). En los diversos trabajos, los cobayos inoculados eran de 3 semanas (7) de 3 a 10 semanas (41) ó 2 a 4 meses (42). No obstante, en la mayoría se opta por hacer referencia al peso de los mismos, que era 450-500 g (1), 450-550 g (24), $464,15 \pm 5,2$ g (2) ó 500-800 g (42).

En lo referente al sexo de los animales de experimentación, se han utilizado ratones hembra (5,12,14,39,44) o bien, novillos (7) y cobayos machos (18), mientras que en otras publicaciones no se hace mención a este dato (1,2,4,13,15,20-24,29-36,40,42,43,45).

Se ha demostrado la existencia de variaciones en susceptibilidad a la infección con el virus de la fiebre aftosa entre diferentes cepas de animales de laboratorio (44). No obstante, se han llevado a cabo aislamientos empleando más de 16 estirpes distintas de ratones (5,7,12,23,43-45). Por otra parte, el nombre de la línea no se mencionó en

un importante número de artículos (1,2,13-15,20-22,31,36,39,40), mientras que en otros, se utilizó la línea de cobayos denominada Duncan-Hartley (7,24).

Características del inóculo

Además de estas variaciones en las características de los distintos animales de laboratorio, tampoco se registra uniformidad en cuanto al inóculo empleado y las condiciones técnicas de su aplicación.

Así, se puede observar que para aislar el Aphthovirus, se han utilizado distintas vías de inoculación. Por ejemplo, los ratones se han inyectado por la vía intraperitoneal (5,7,12-14,21,23,36,37,39,42-45), subcutánea (13,21), intracerebral (21,40) e intramuscular (21,41,45); las ratas, por la vía intraperitoneal (13,14) mientras que para los cobayos, se ha optado por las vías intradermoplantar (1,2,39-42), intralingual (7,24), subcutánea (15), intraperitoneal, intramuscular o digestiva (15,42). Por otra parte, los conejos se inocularon por la vía intraperitoneal (15) o subcutánea (20); los hamsters por escarificación (27) o por vías subcutánea, intradérmica, intraperitoneal e intracraneal (35). Los meriones se inocularon por la vía intraperitoneal o intradermoplantar (17) y los bovinos por vía intradermolingual (7,22,23,36). En algunos trabajos no se cita la vía de inoculación (34,37).

La mayoría de los trabajos no indican la dosis de virus inoculada (2,4,5,7,9,12-15,17,20-24,27,31,36,37,40-45). En otros, su rango estaba comprendido dentro de un gran espectro: 10^4 - 10^6 DI₅₀ en ratones (39); o simplemente, una dilución 10^{-4} (1).

Aunque en la mayoría de las publicaciones no se cita el volumen inoculado por las distintas vías (1,2,14,20,34,37,39,41,42), en las restantes se registra una gran variabilidad en este parámetro. Así, en ratones inoculados por la vía intraperitoneal se utilizaron 0,001-0,27 ml (21), 0,03 ml (21,23,40,43), 0,04-0,3 ml (13), 0,05 ml (7), 0,1 ml (5,44,45), 0,5 ml (12). Sin embargo, por la vía subcutánea se administró 0,01-0,27 ml (21) ó 0,04-0,3 ml (13), mientras que por vía intramuscular, el volumen fue de 0,001-0,05 ml (21). En cobayos, el inóculo varió de 0,5-100 ml por vía intraperitoneal

(15,36) a 0,1 ml por vía intradermolingual (36) hasta 0,3 ml por vía intradermoplantar (7). En hamsters se inoculó 0,20 ml (32) ó 0,25 ml (29) por vía intramuscular y en conejos, de 0,25 a 1,0 ml (9) por vía intraperitoneal. En meriones 0,2 ml por vía intraperitoneal o intradermoplantar (17) y en bovinos entre 0,1 y 2 ml por vía intradermolingual (7,22,23).

Características del virus

Una de las principales limitaciones para interpretar la literatura en términos de la susceptibilidad comparativa de las distintas especies de animales de laboratorio, y por consiguiente de su efectividad diagnóstica, está asociada con el origen de la cepa de Aphthovirus utilizada.

En ciertos estudios, se utilizaron cepas modificadas (1,2,5,7,9,12,13,15,17,20,22,23,24,27,31,33,34,36,37,39,40-45) mediante pasajes en ratones (9,15,31,32,39-41,44,45), cobayos (1,2,13,17,24,27,33,34,41,42), hamsters (37), bovinos (1,2,7,12,13,22,33,36,39,41,44,45), conejos (20), lechones o en embriones de pollo (14). En otros, las cepas provenían de células del epitelio lingual bovino (7,23,36,45), de cultivos celulares de diversos orígenes (31,43), o células BHK21 (12), células renales de bovino (5,44), células renales de porcino (44,45). En todos estos trabajos, el número de pasajes del virus osciló en un rango entre 2 y 425.

Si se considera que la infectividad y la virulencia de los Aphthovirus para diferentes especies animales se modifica mediante pasajes repetidos *in vitro* e *in vivo* (6,11,25), resulta difícil de determinar si los hallazgos obtenidos a partir de virus que no provienen de infecciones naturales, son aplicables a situaciones de campo. A tal efecto, cabe señalar que solo en algunos trabajos se emplearon cepas de campo (4,14,15,21,35,45), aunque en la mayoría de estos, el virus de campo había sido mantenido a través de sucesivos pasajes en ratones (15,21,45) o alternativamente, en ratas y ratones (14).

En solo dos publicaciones (4,35) los resultados se basan en el uso de cepas de campo obtenidas directamente a partir de muestras de bovinos infectados, aunque en uno de ellos (35), los hallazgos no se diferenciaron de los obtenidos con cepas adaptadas. Esta escasez de información no

estaría en consonancia con la importancia del aislamiento del virus para los estudios epidemiológicos y el control de la fiebre aftosa.

Por otra parte, en los estudios realizados se han empleado diferentes virus, pertenecientes tanto al tipo O (1,2,7,9,12-15,22,23,27,34,36,37,40,43,44), tipo A (1,2,5,7,9,13-15,22-24,,27,34,36,40,41,44), tipo C (1,2,7,9,13-15,17,22,23,24,27,31,36,39,40,42-44), SAT1 y SAT2 (7,23,36,40,44), y SAT3 (7,22,23,36,44), como al tipo Asia 1 (7,23,36,44). En algunas publicaciones, no se citó el tipo de virus empleado (4,20,21,45).

Cabe señalar que la titulación de las distintas cepas de virus se ha llevado a cabo en ratones (7,9,12,21,27,43,45), cobayos (1,2,7,14,42), cultivos de tejidos (7), y en epitelio lingual bovino (7,9,22,23). En otros estudios no se proporcionó este dato (4,5,13,17,20,24,31,34,36,37,39-41,44). Además, el efecto del virus sobre los distintos animales se comprobó a través de diferentes técnicas. Estas incluyeron la observación de síntomas y lesiones clínicas (5,9,13,17,20,27,37,40-42); la titulación viral de órganos y/o tejidos (9,13,20,41); la cuantificación de anticuerpos (4,12,14); la determinación en ratones de la DI_{50} (1,2,7,22,36,39,40,43,44) o de la DL_{50} con la técnica de Reed y Muench (12,15,21,24,36,37).

CONCLUSIONES

Esta revisión revela limitaciones importantes sobre la utilidad de animales de laboratorio empleados actualmente para aislar el virus de la fiebre aftosa con fines diagnósticos. Resulta evidente la necesidad de diseñar y conducir estudios para determinar cuál especie es la más apropiada para trabajos futuros en este campo, a fin de incrementar la eficiencia y eficacia del diagnóstico. Los estudios deberán diseñarse para evaluar la respuesta de diferentes huéspedes a la infección, bajo idénticas condiciones fisiológicas y empleando inóculos estandarizados respecto de la dosis viral, volúmenes y vías de administración. Finalmente, se considera de particular importancia que el Aphthovirus empleado no haya sido adaptado a ningún sistema de laboratorio.

En general, y sobre la base de lo expuesto en este trabajo, se concluye que se desconoce la eficiencia

comparativa de las distintas especies de animales de laboratorio para el aislamiento del virus de la fiebre aftosa a partir de muestras de bovinos infectados naturalmente.

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. ARAMBURU, H.G. A comparison of different methods of inoculating guinea-pigs with the virus of foot-and-mouth disease. *J. Comp. Path.*, 59 (1): 43-47, 1949.
2. ARAMBURU, H.G. Inoculación de prueba en cobayos con virus aftoso: comparación de diferentes métodos. Inst.Nac.de Fiebre Aftosa. Minist. de Agric. de la Nación, 1949. (Pub. n° 9).
3. BROWN, C.C., OLANDER, H.J., MEYER, R.F. Pathogenesis of foot-and-mouth disease in guinea pigs using in situ hybridization. *Proc. Annual Mtg. US. Animal Hlth. Assoc.*, 93: 321-323, 1989.
4. BUCKLEY, L.S., OSBORNE, R.W., PEREIRA, H.G. Laboratory diagnosis of foot- and-mouth disease and swine vesicular disease. *Bull. Off. int. Epiz.*, 88 (1-2): 128-129, 1975.
5. CAMPBELL, C.H. The susceptibility of mother mice and pregnant mice to the virus of foot-and-mouth disease. *J. Immunol.*, 84: 469-474, 1960.
6. CARRILLO, C.E., RIEDER ROJAS, E., CAVALLARO, L., SCHIAPPACASSI, M., CAMPOS, R. Modification of foot-and-mouth disease virus after serial passages in the presence of antiviral polyclonal sera. *Virology*, 171: 599-601, 1989.
7. COTTRAL, G.E., PATTY, R.E., GAILJUNAS, P., SCOTT, F.W. Sensitivity of cell cultures, cattle, mice and guinea-pigs for detection of nineteen foot-and-mouth disease viruses. *Bull. Off. int. Epiz.*, 63 (9-10): 1607-1625, 1965.
8. 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.
9. 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.
10. DACORSO FILHO, P., CUNHA, R.G. Lesões observadas em coelho recém-nascidos inoculados com amostras de tres tipos de vírus de febre aftosa. *Bol. Soc. Bras. Med. Vet.*, 19: 91-102, 1951.
11. DIEZ, J., MATEU, M.G., DOMINGO, E. Selection of antigenic variants of foot-and-mouth disease virus in the absence of antibodies, as revealed by an in situ assay. *J. Gen. Virol.*, 70: 3281-3289, 1989.
12. FERNANDEZ, F.M., BORCA, M.V., SADIR, A.M., FONDEVILA, N., MAYO, J., SCHUDEL, A.A. Foot-and-mouth disease virus (FMDV) experimental infection: susceptibility and immune response of adult mice. *Vet. Microbiol.*, 12: 15-24, 1986.
13. GARCIA MATA, E., PIZZI, L., ARAMBURU, H. El cultivo del virus aftoso en el ratón y en la rata blanca: su aplicación en los problemas de virología. *Gaceta Veterinaria*, 13 (74): 1-8, 1951.
14. GARCIA MATA, E., PIZZI, L., ARAMBURU, H. Algunos aspectos de investigaciones con virus aftoso murinizado. *Gaceta Veterinaria*, 14 (79): 223, 1952.
15. 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.
16. GARCIA MATA, E., FEDERER, K.E., PIZZI, L., MARCOVECCHIO, F.E., ARAGONA, J. Vacuna antiaftosa con virus adaptado a neonatos. En: *Congreso Argentino de Fiebre Aftosa*, Buenos Aires, Argentina, 14 - 15 de mayo de 1957. p. 233 237.
17. GIROUD, P., CIACCIO, G. Adaptation au mériion du virus aphteux. *C.R. Soc. Biol., Paris.*, 148: 31-32, 1954.
18. GORHE, D.S. Inhibition of multiplication of foot-and-mouth disease virus in adult mice pretreated with Freund's complete adjuvant. *Nature*, 216: 1242-1244, 1967.
19. GRAVES, J.H., MCKERCHER, P.D., CALLIS, J.J. Foot-and-mouth disease vaccine. Influence of the vaccine virus subtype on neutralizing antibody and resistance to disease. *Am. J. Vet. Res.*, 33 (4): 765-768, 1972.
20. GRIBANOV, V. Résultats de l'épreuve du vaccin antiaphteux VIEV préparé avec un virus adapté au lapin. *Bull. Off. int. Epiz.*, 43 (1): 632 635, 1955.
21. HEATLEY, W., SKINNER, H.H., SUBAK-SHARPE, H. Influence of route of inoculation and strain of mouse on infectivity titrations of the virus of foot-and-mouth disease. *Nature*, 186 (4728): 99-911, 1960.

22. HENDERSON, W.M. A comparison of different routes of inoculation of cattle for detection of the virus of foot-and-mouth disease. *J. Hyg.*, 50 (2): 182-194, 1952.
23. HOUSE, C., HOUSE, J.A. Evaluation of techniques to demonstrate foot-and-mouth disease virus in bovine tongue epithelium: comparison of the sensitivity of cattle, mice, primary cell cultures, cryopreserved cell cultures and established cell lines. *Vet. Microbiol.*, 20: 99-109, 1989.
24. HYDE, J.L., GRAVES, J.H. The comparative titration of foot-and-mouth disease virus inoculated into the tongue and foot pads of guinea pigs. *Am. J. Vet. Res.*, 24: 99-100, 1963.
25. HYSLOP, N. St. G. Isolation of variant strains from foot-and-mouth disease virus in cell culture containing antiviral sera. *J. Hyg., Camb.*, 41: 135-142, 1965.
26. KNUDSEN, R.C., GROOCCOCK, C.M., ANDERSEN, A.A. Difference in protective immunity of the tongue and feet of guinea pigs vaccinated with foot-and-mouth disease virus type A12 following intradermolingual and footpad challenge. *Vet. Microbiol.*, 7: 97-107, 1982.
27. KORN, G. Die erkrankung des goldhamsters, *Mesocricetus auratus*, an maul- und klauen-seuche. *Arch. Exp. Vet. Med.*, 6 (Suppl.): 36-37, 1952.
28. KORN, G. Die pathogenese und histogenese der maul- und klauen-seuche des goldhamsters, *Mesocricetus auratus*. *Arch. Exp. Vet. Med.*, 7: 192-225, 1953.
29. LOMBARDO, H.J., MAYO, J., ABADIE, G., RIVENSON, S., SMOLKO, E.E. Adaptación del virus aftoso al hamster adulto. *Rev. Inv. Agrop. Ser. 4*, 6 (8): 87-94, 1969.
30. LORD, R.D. Experimental infection of vampire bats with foot-and-mouth disease virus. *J. Wild. Dis.*, 22 (3): 413-414, 1986.
31. MACKOWIAK, C., LANG, R. Emploi des cultures de tissu dans le titrage du virus aphteux et la recherche des anticorps. *Bull. Off. int. Epiz.*, 49: 99-105, 1958.
32. MAYO, J., LOMBARDO, J.H., SMOLKO, E.E., SEGURA, M., RIVENSON, S. Multiplicación del virus aftoso en roedores adultos previamente irradiados. *Rev. Inv. Agrop. Ser. 4*, 3 (6): 57-69, 1966.
33. NAGEL, H.G. El comportamiento del virus aftoso en animales lactantes de diferentes especies. *Gaceta Veterinaria*, 14 (76): 52-59, 1952.
34. NAGEL, H.C., PETERMANN, H.G. El comportamiento del virus aftoso en el embrión de pollo. *Gaceta Veterinaria*, 14 (76): 73-78, 1952.
35. PALMA, E.E. Acción del virus aftoso frente al *Cricetus cricetus* (Hamster). En: *Congreso Argentino de Fiebre Aftosa*, Buenos Aires, Argentina, 14-16 de mayo de 1957. p.131-142.
36. PATTY, R.E., COTTRAL, G.E., GAILUNAS, P. Comparative assay of foot-and-mouth disease virus in cattle, mice and cell cultures. *Bull. Off. int. Epiz.*, 63 (9-10): 1595-1606, 1965.
37. SCHMIDT FUNES, E. Receptivité du hamster au virus de la fièvre aphteuse. *Bull. Off. int. Epiz.*, 43: 756-760, 1955.
38. SCHUDEL, A.A., SADIR, A.M., ETCHEVERRIAGARAY, M.E., SAMUS, S., COLILA, O., RIVENSON, S. Susceptibility of South American non-primates to foot-and-mouth disease virus. *Bull. Off. int. Epiz.* 93 (11-12): 1345-1350, 1981.
39. 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.
40. SKINNER, H.H. Propagation of strains of foot-and-mouth disease virus in unweaned white mice. *Proc. Roy. Soc. Med.*, 44: 1041-1044, 1958.
41. SKINNER, H.H., SMITH, I.M., HOLLLOM, S.E., KNIGHT, E.H. Attenuated strains of the virus of foot-and-mouth disease. Studies in small animals with strains of common origin modified by different methods. *Arch. Ges. Virusforschung*, 12: 472-486, 1962.
42. SKINNER, H.H., KNIGHT, E.H. Environmental factors influencing the response of guinea-pigs to modified strains of foot-and-mouth disease virus. *Bull. Off. int. Epiz.*, 61 (9-10): 1-21, 1964.
43. SUBAK-SHARPE, H. The quantitative study of foot-and-mouth disease virus in unweaned mice. 1. Studies of various factors affecting quantitative analysis. *Arch. Ges. Virusforschung*, 11: 1-38, 1961.
44. SUBAK-SHARPE, H. The quantitative study of foot-and-mouth disease virus in unweaned mice. 2. Studies with additional mouse strains and comparison of some methods of titration. *Arch. Ges. Virusforschung*, 11: 39-63, 1961.
45. SUBAK-SHARPE, H. The effect of passage history, route of inoculation, virus strain and host strain on the susceptibility of adult mice to the virus of foot-and-mouth disease. *Arch. Ges. Virusforschung*, 11 (3): 373-399, 1961.