

# TRABAJOS TRADUCIDOS

## PROPAGACIÓN DE CEPAS DE VIRUS AFTOSOS EN RATONES BLANCOS NO DESTETADOS \* \*\*

H. H. SKINNER, M. R. C. V. S.  
Instituto de Investigaciones Pirbright, Surrey

### INTRODUCCIÓN

Todos los intentos de los primeros investigadores en el campo de la aftosa, para producir evidentes signos clínicos de infección con el virus en ratones blancos, fueron infructuosos.

Más tarde, siguiendo el exitoso desarrollo en ratones blancos de cepas "neurotrópicas" de los virus de la fiebre amarilla y de la anemia infecciosa con propósitos inmunizantes, una intentona similar fué hecha por Nagel (1937) con el virus de la aftosa. Encontró que era posible mantener el virus en ratones blancos solamente si se le repicaba, utilizando el cerebro, dentro de las veinticuatro a las cuarenta y ocho horas de su inoculación. No habían signos clínicos después de haber realizado hasta 140 pasajes (Hofmann, 1941, 1944). Galloway (1939), Röhner (1944) y Hudson (1947) hicieron experimentos con otras siete cepas de virus. Con cinco de esas cepas no se observaron signos clínicos aunque se hicieron de 36 a 104 pasajes. Con dos cepas aparecieron signos clínicos después de 76 a 144 pasajes intracerebrales y fueron considerados como debidos a una encéfalomielitis. Muchos más pasajes se requirieron antes de que el virus perdiese su propiedad de producir lesiones vesiculosas en cobayos o bovinos, y estas cepas no tuvieron aplicación práctica alguna.

Los ratones utilizados en todos los trabajos arriba citados debían tener a lo sumo cuatro o cinco semanas de edad. Utilizando ratones no

---

\* Traducido de "Proceedings of the Royal Society of Medicine", vol. 44, Nº 12, págs. 1041-1044.

\*\* Este trabajo fué presentado por el doctor Skinner a la sesión efectuada el 18 de abril de 1951 por la Sección de Medicina Comparada.

destetados de una a dos semanas de edad, síntomas fatales asociados a grandes alteraciones en el miocardio y en los músculos esqueléticos, se observaron a partir de los primeros pasajes; tal ha sido la experiencia obtenida con nueve cepas bovinas y seis cepas de cobayos en el trabajo que ahora relatamos.

### EXPERIENCIA PRELIMINAR

La primer guía de este trabajo fué obtenida fortuitamente en un experimento realizado en febrero de 1950. La susceptibilidad de la rata blanca a la inoculación intracerebral de virus aftoso estaba siendo investigada. En el primer pasaje, a fin de mantener el pequeño número disponible de ratas blancas, un importante grupo de ratones blancos, de tres semanas de edad, fué inoculado intracerebralmente en forma simultánea con las ratas blancas. Estos ratones fueron sacrificados a intervalos después de la inoculación para poder seguir el título del virus en el cerebro. Se tenía la esperanza de que la información obtenida podía sugerir los lineamientos del futuro trabajo en la rata blanca si aquel animal demostrase ser resistente.

El virus inoculado era una mezcla de cepas bovinas de diferentes tipos inmunológicos, y sin entrar en detalles bastará decir que en este primer pasaje intracerebral 7 ratones, de 13, que quedaron después del primer día, desarrollaron síntomas del segundo al cuarto día. Se siguieron haciendo pasajes en grupos de diez o más ratones, de tres a cuatro semanas de edad, con suspensiones al 10 % de tejido cerebral inoculado intracerebralmente, y al quinto pasaje la proporción de infectados alcanzó al 100 %.

A cada pasaje por ratón se tomaban varios tejidos para inocular por vía intradérmica en la cara plantar del metatarso de cobayos, y estos animales reaccionaban con lesiones locales y secundarias idénticas a las producidas por el virus de la aftosa.

Material infectante fué recogido de esas lesiones para utilizar como antígeno en pruebas de fijación de complemento; los cobayos una vez recuperados fueron utilizados en pruebas de inmunidad con cepas tipo de cobayo; o bien fueron sacrificados para la producción de suero de convaleciente para ser utilizado en pruebas de fijación de complementos de suero-neutralización. Cada uno de estos métodos de determinación de la especificidad del agente infectante indicó que, después del segundo pasaje por ratón, aparentemente un solo tipo de virus aftoso había sobrevivido. Este era uno de los tres tipos recientemente reconocidos. S. A. T. 2 (Galloway, 1950; Galloway, Brooksby, Henderson, 1951). Dos cepas de Rodesia de este tipo habían sido incluídas en la mezcla original que también contenía dos cepas del tipo O de Vallée y una de las tipos A de Vallée, C de Waldmann y S. A. T. 1.

El repicado de esta cepa fué abandonado en el noveno pasaje con el fin de determinar si se obtenía igual éxito realizando pasajes con

cepas aisladas en lugar de una mezcla. En estas investigaciones preliminares tres observaciones habían sido repetidamente confirmadas:

- 1<sup>a</sup>) Las titulaciones intradérmicas en cobayos indicaban que en el momento de la infección máxima, la sangre, el bazo y el corazón y pulmones en conjunto contenían cada uno más de cien veces más virus que el cerebro inoculado recogido de los mismos ratones.
- 2<sup>a</sup>) Titulaciones comparativas de tejido cerebral en ratones por las vías intraperitoneal e intracerebral mostraron que eran igualmente sensibles para descubrir los virus.
- 3<sup>a</sup>) Cualquiera que fuese la que se utilizase de estas dos vías, los ratones de 2 a 2 ½ semanas de edad eran más sensibles que los ratones de tres a cuatro semanas, y con ambas vías el síndrome clínico era el mismo.

Cuando las cepas fueron examinadas individualmente, el corazón fué elegido como tejido para pasaje, la cavidad peritoneal como punto de inoculación y ratones no destetados como animales de experiencia. Adoptando esta técnica, cepas bovinas representando cada uno de los seis virus tipo fueron adaptadas al ratón, sin dificultad.

#### ESTABLECIMIENTO DE CEPAS RATÓN QUE REPRESENTAN LOS SEIS VIRUS TIPO

Al comienzo fueron utilizados ratones de 14 a 18 días, pero más tarde se encontró que ratones de siete a diez días eran más susceptibles y esenciales para realizar pasajes satisfactorios de algunas de las cepas. No se observó aumento de sensibilidad en ratones de menos de una semana de edad.

Con los ratones más jóvenes (7 a 10 días) el síntoma más evidente era una parálisis muscular espástica de los miembros posteriores que se extendía y abarcaba la totalidad del cuerpo, de no sobrevenir la muerte. La dificultad respiratoria se presentaba a menudo desde los primeros momentos. Después de un pasaje o dos los síntomas aparecían en 20 a 48 horas después de la inoculación, mismo con dosis infectantes mínimas, y los ratones rara vez sobrevivían más de 12 horas a la aparición de los síntomas. No se pudieron observar lesiones macroscópicas en los músculos esqueléticos afectados cuando el curso de la infección era tan corto, pero en ratones de más edad y más resistentes en los cuales la muerte tenía lugar más tarde, o en aquellos en que los síntomas persistían durante unos pocos días, algunas notables lesiones pudieron ser observadas alrededor del cuarto día después de la aparición de los síntomas. Todos los músculos de los miembros posteriores presentaban a veces más del 90 % de sus fibras en estado de degeneración y aparecían de color canela pálido. Las áreas interesadas eran difusas en los músculos más recientemente afectados, pero en las lesiones más viejas

eran veteadas y presentaban focos de activa regeneración de la fibra muscular. Estas lesiones predominaban en los miembros posteriores y en la región lumbar pero a menudo se extendían hasta los músculos del lomo. Los músculos abdominales, intercostales, escapulares, mandibulares y linguales se observaron también afectados.

En ratones de toda edad los primeros síntomas se observaban frecuentemente en un miembro posterior antes que en el otro y casi invariablemente el miembro afectado era el del lado en que se había practicado la inyección intraperitoneal.

Si los ratones no destetados eran sacrificados en el momento en que un solo miembro estaba paralizado, el título de éste, por titulación intraperitoneal en ratones, era de 10 a la menos cinco a 10 a la menos seis, o sea por lo menos cien veces más alto que el título del miembro no paralizado del mismo animal. La extracción de los huesos del miembro paralizado no redujo el título del virus.

Con la mayoría de las cepas se observaron lesiones cardíacas macroscópicas, similares en forma a las de los músculos esqueléticos, en el 40 al 50 % de los ratones de una a dos semanas de edad, en el momento de la muerte. Con estas cepas el tejido cardíaco tenía un título de 10 a la menos cinco a 10 a la menos siete en ratones. Títulos tan altos no han sido todavía demostrados en la sangre.

Con una cepa las lesiones cardíacas fueron raras y el títulos del miocardio no sobrepasó 10 a la menos tres, aun cuando los miembros paralizados de los mismos ratones tenían un título de 10 a la menos seis. Con esta cepa los miembros posteriores fueron finalmente elegidos como tejido de pasaje.

Se requieren nuevas observaciones sobre la evolución del síndrome y los cambios mórbidos en los diferentes tejidos, y un intento para relacionar aquéllos con las concentraciones del virus en esos tejidos. Los resultados permitirán formar una opinión más definitiva en relación con los sitios de multiplicación del virus. De cualquier modo en esta primera etapa debe ser considerada la posibilidad de que el virus puede multiplicarse en el tejido muscular esquelético y cardíaco.

Cinco cepas fueron llevadas hasta el vigésimo pasaje y una (R. V. 7) hasta el sexto pasaje por ratón. Virus de estos pasajes finales fué utilizado en pruebas extensivas para determinar la especificidad de tipo de las cepas. Fueron utilizados: 1º) para infectar cobayos que fueron más tarde controlados con las cepas standard de cobayos; 2º) para controlar la inmunidad de cobayos inmunes a las cepas standard de cobayo; y 3º) en pruebas de sueroneutralización en ratones, en las cuales el suero era el hiperinmune standard de cobayo para pruebas de fijación de complemento, preparado en Pirbright. Todas estas pruebas mostraron concluyentemente que cada cepa había mantenido su especificidad de tipo a través de los pasajes por ratón. El hecho de que la neutralización específica de las cepas pudiera fácilmente demostrarse en ratones, señalaba de que ningún virus distinto del de la fiebre aftosa estaba implicado.

Virus de los pasajes finales de cada cepa fueron titulados en grupos de ratones de toda edad, y los resultados esenciales, similares a aquellos observados en los primeros pasajes, están representados en la figura 1.

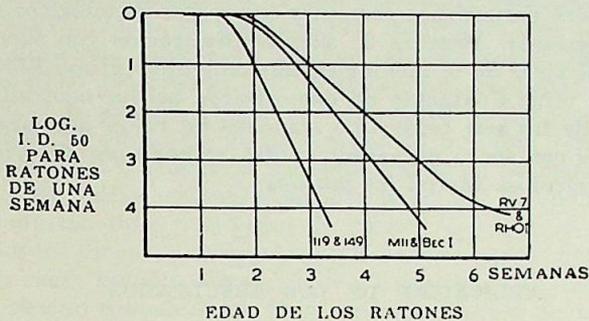


Fig. 1.— Dosis de virus requeridas para producir infección clínica en ratones de diferentes edades. El diagrama está realizado con los resultados obtenidos con seis cepas pasadas por ratón por inoculación intraperitoneal de serie de virus diluídas al décimo y realizadas simultáneamente en ratones de una semana y más viejos. Las cepas 119, 149, M. 11, Bec. 1, Rho. 1 y R. V. 7 son de los tipos Vallée A, Waldmann C, Vallée O y S. A. T. 1, 2 y 3 respectivamente.

#### OTRAS ESPECIES AFECTADAS EN FORMA SIMILAR POR EL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA

En varias epizootias de aftosa un rasgo común es la elevada proporción de muertes repentinas en jóvenes terneros y cerdos en los cuales el único trastorno patológico grave que se observa reside en el miocardio. Un síndrome similar ha sido realizado experimentalmente en muy jóvenes cachorros (Stockman y col., 1927; Giolitti, 1950) y en muy jóvenes cobayos (Schmidt, 1936).

Con ciertas cepas de campo del virus, asociadas a la aftosa maligna se desarrollan también lesiones en el miocardio y los músculos esqueléticos, en un porcentaje pequeño del ganado bovino adulto. (Trautwein, 1929; Pallaske, 1940, 1941).

#### OTROS VIRUS CAUSANTES DE UN SÍNDROME SIMILAR EN RATONES

Síntomas y lesiones que se asemejan estrechamente a los asociados con la infección por cepas de virus aftosos, se observan también en jóvenes ratones infectados con otros virus. Estos incluyen los virus de la encéfalomielitis del ratón (Rustigan y Pappenheimer, 1949) y de la

encéfalomiocarditis (Schmidt, 1948, 1948; Dick, 1948; Warren, Smadel y Russ, 1949) y cepas del virus de Coxsackie (Dalldorf, 1950; Melnick, 1950; Pappenheimer y col., 1950; Weller y col., 1950; Melnick y Godman, 1951).

Nuestros propios estudios no están todavía suficientemente avanzados como para permitirnos comentar los rasgos histológicos comparativos de las lesiones. Pruebas de sueroneutralización con suero preparado contra el virus de la meningoencéfalomiélitis (grupo EMC) y con ocho tipos de virus Coxsackie no demostraron acción neutralizante sobre ninguna de las seis cepas tipo standard de ratón del virus aftoso. Los resultados con suero preparado contra ambos tipos del virus de la estomatitis vesiculosa fueron los mismos.

#### APLICACIÓN DE LOS RESULTADOS

1) TITULACIÓN DEL VIRUS.— Durante todos los pasajes de las cepas no hubo pérdida de su capacidad para infectar al cobayo por inoculación intradérmica en los cojinetes metatarsianos. El título de las cepas ratón en cobayos inoculados intradérmicamente en los cojinetes metatarsianos (I. D.) era regularmente alrededor de cien veces más bajo que en ratones inoculados intraperitonealmente (I. P.) tanto en los primeros como en los últimos pasajes. Una cepa (M. 11) después de veinte pasajes por ratón fué titulada simultáneamente en ratones y en bovinos (inoculación intradérmica en la lengua). El título en bovinos era cien veces más bajo que en ratones, pero la enfermedad fué tan severa como la causada por la cepa bovina original.

Estos resultados corresponden con los ya conocidos respecto de las cepas adaptadas al bovino y al cobayo. Titulaciones comparativas llevadas a cabo en cobayos y bovinos mostraron que las cepas cobayo tenían el máximo título en cobayos y las cepas bovinas en bovinos (Henderson, 1949).

Fué sorprendente, por lo tanto, encontrar que cuando seis diferentes cepas cobayo —tres de las cuales habían recibido más de quinientos pasajes intradérmicos en cobayos— fueron tituladas en ratones (I. P.) y simultáneamente en cobayos (I. D.), el título en ratones era en cada caso alrededor de 10 a 50 veces mayor que en el cobayo. Con la cooperación del doctor Henderson, titulaciones simultáneas en bovinos (inoculación intradérmica en la lengua) y en ratones (I. P.) han sido realizadas hasta ahora en cuatro oportunidades con dos cepas bovinas, y en cada caso el título en ratones era por lo menos tan alto como en el bovino.

La dosis standard inoculada a los ratones no destetados, en estas experiencias, ha sido de 0,03 ml. Esta cantidad puede ser ligeramente superior al volumen total retenido en los puntos de inoculación en un cobayo, pero no es probablemente mayor que el retenido en cada punto inoculado en la lengua del bovino. Con estas cepas, por lo tanto, el

ratón no destetado, de alrededor de una semana de edad, ha demostrado ser un animal muy sensible para revelar la presencia del virus de la aftosa en elevadas diluciones y puede resultar ser un valioso animal de experiencia de uso general para este propósito.

2) **SUERONEUTRALIZACIÓN.**— Los resultados obtenidos en pruebas de sueroneutralización, ya mencionados, señalan un más amplio uso del ratón no destetado. Por estas pruebas ha sido posible demostrar que ratones adultos, que resisten una infección amplia, sufren sin embargo una infección subclínica, ya que el suero recogido tres semanas después puede presentar un índice de neutralización de hasta 1.000.

Ratones adultos infectados subclínicamente de esa manera han dado, también, crías varias semanas después que no han podido ser infectadas clínicamente con tipos homólogos de virus.

Es posible llevar a cabo pruebas de sueroneutralización con cepas bovinas y suero bovino, directamente en ratones, y en tales pruebas el suero de bovino convaleciente tiene, en una dilución de 1/50 un índice de neutralización de 10.000. Este es un valor más alto del que se podía esperar para suero no diluido si la prueba hubiera sido realizada en bovinos, único otro animal satisfactorio para estos propósitos (Brooksby, 1949). Tal prueba podrá ser de gran utilidad en estudios inmunológicos y en investigaciones epizootológicas.

Los ratones empleados en este trabajo provinieron de nuestra propia colonia, originada de la variedad Mill Hill Parkes. Más tarde una variedad "Suiza" de la "Agricultural Research Council's Field Station de Compton", fué utilizada también.

#### BIBLIOGRAFÍA

- BROOKSBY, J. B. (1949).—*Agric. Res. Council. Rep. Ser.*, N° 9, London (H. M. S. O.).
- DALLDORF, G. (1950).—*Bull. N. Y. Acad. Med.*, 26, 329.
- DICK, G. W. A. (1948).—*Brit. J. exp. Path.*, 29, 559.
- GALLOWAY, IAN A. (1939).—Unpublished report.
- (1950).—Paper presented to Joint F. A. O./O. I. E. meeting, May, 1950, Paris.
- , BROOKSBY, J. B. and HENDERSON, W. M. (1951).—Unpublished observations.
- GIOLITTI, G. (1950).—*Arch. vet. Ital.*, 1, 253.
- HENDERSON, W. M. (1949).—*Agric. Res. Council. Rep. Ser.*, N° 8, London (H. M. S. O.).
- HOFMANN, W. (1941).—*Zbl. Bakt.*, 1 (Orig.), 148, 69.
- (1944).—*Zbl. Bakt.*, 1 (Orig.), 151, 161.
- HUDSON, J. R. (1947).—Personal communication.
- MELNICK, J. L. (1950).—*Bull. N. Y. Acad. Med.*, 26, 342.
- and GODMAN, G. C. (1951).—*J. exp. Med.*, 93, 247.
- NAGEL, H. C. (1937).—*Dtsch. tierärztl. Wschr.*, 45, 625.

- PALLASKE, G. (1940).—*Tierärztl. Rdsch.*, 46, 165, 177, 189, 202.  
— (1941).—*Tierärztl. Rdsch.*, 47, 104.
- PAPPENHEIMER, A. M.; DANIELS, J. B.; CHEEVER, F. S. and WELLER, T. H. (1950).—*J. exp. Med.*, 92, 169.
- RÖHRER, H. (1944).—*InfektKr. Haustiere*, 60, 338.
- RUSTIGAN, R. and PAPPENHEIMER, A. M. (1949).—*J. exp. Med.*, 89, 69.
- SCHMIDT, E. C. H. (1948).—*Amer. J. Path.*, 24, 97.
- SCHMIDT, W. (1935).—*Z. InfektKr. Haustiere*, 49, 208.
- STOCKMAN, S.; MINETT, F. C.; DAVIES, G. O. and WATT, W. (1927).—2nd. *Rep. Foot-and-Mouth Dis. Comm.*, London (H. M. S. O.).
- TRAUTWEIN, K. (1929).—*Ergebn. Hyg. Bakt.*, 10, 561.
- WARREN, J.; SMADEL, J. E. and RUSS, S. B. (1949).—*J. Immunol.*, 62, 387.
- WELLER, T. H.; ENDERS, J. F.; BUCKINGHAM, M. and FINN, J. J., Jr. (1950).—*J. Immunol.*, 65, 337.