

ENSAYOS SOBRE LA PATOGENIA DEL VIRUS DE LA ESTOMATITIS VESICULAR NEW JERSEY EN BOVINOS*

Gustavo Arbeláez R**.

1. RESUMEN

En este trabajo se emplearon cinco bovinos, machos, mestizos holstein de aproximadamente 18 meses de edad, libres de anticuerpos contra la EV. Se inocularon vía intradermolingual con la cepa NJ 7546. El período de incubación estuvo comprendido entre 24 y 36 horas post-infección, con respuesta febril desde las 24 horas, la cual presentó características de fluctuación. Los niveles de anticuerpos neutralizantes fueron detectados desde el tercer día de inoculación con títulos altos y persistentes. No se logró aislar el virus de saliva después de la cicatrización de las lesiones bucales, moco nasal, ni de materia fecal. A la necropsia de los bovinos, se tomaron muestras de tejidos para examen histopatológico. Los órganos más afectados fueron lengua, ganglios linfáticos, bazo y cerebro.

2. INTRODUCCION

La Estomatitis Vesicular (EV) pertenece al grupo de las enfermedades vesiculares del ganado, entre las cuales se incluyen la fiebre aftosa, el exantema vesicular y la enfermedad vesicular del cerdo. Esta enfermedad ocasiona cuantiosas pérdidas económicas en particular en ganado de leche, por la pérdida de peso y las frecuentes lesiones mamarias, generalmente severas, causantes de disminución temporal o total de la producción de leche (5).

Hasta el momento, no existe claridad completa en cuanto a la patogénesis de la enfermedad en las especies afectadas, razón por la cual se ha dificultado toda campaña tendiente a la prevención y control de la EV.

El presente estudio pretende analizar los mecanismos básicos de patogénesis asociados con la inoculación experimental del virus en bovinos libres de anticuerpos contra la EV.

3. REVISION DE LITERATURA

En la mayoría de las infecciones virales, el sitio primario de infección, está asociado con la puerta de entrada del virus. En el caso de las influencias, los síntomas son producidos por la multiplicación del virus en las células del tracto respiratorio (7, 16).

La propagación de los virus a los diferentes órganos y tejidos se hace por vía sanguínea y en el caso de transmisión de la enfermedad por artrópodos, la importancia de ésta es más obvia (4, 7).

El principal papel de los macrófagos es el de ingerir, digerir y desechar material extraño, como restos celulares, partículas inertes y microorganismos, así como procesar y presentar los antígenos respectivos a los linfocitos encargados de iniciar una respuesta específica inmune (16).

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece al doctor Fernando Villafañe del Programa Nacional de Patología, por su colaboración en la realización de los exámenes histopatológicos.

* Contribución del Programa Nacional de Enfermedades Vesiculares, División Ciencias Veterinarias. Instituto Colombiano Agropecuario, ICA.

** Médico Veterinario M.S. Laboratorio de Investigaciones Médicas Veterinarias LIMV. Apartado Aéreo 29743. Bogotá.

Los virus pueden producir tres clases de infecciones: locales, generalizadas e inaparentes. En las localizadas, los virus invaden solo células vecinas al punto de entrada y no hay viremias apreciables. En las infecciones generalizadas, actúan virus con una gran cantidad invasora. Las infecciones inaparentes son transitorias y no se manifiesta clínicamente la enfermedad (18).

Las células pueden responder de varias formas a las infecciones virales: con destrucción celular, ocasionadas por virus citocidales, sin ningún cambio aparente, como sucede en infecciones endosimbióticas; con transformación e hiperplasia celular, causada por ciertos virus oncogénicos, con hiperplasia seguida de muerte, como sucede con los poxvirus y con muerte celular debido a virus tóxicos (14).

En la recuperación de las infecciones virales, además de las respuestas humoral y celular específicas, intervienen factores inespecíficos como las hormonas, cambios de temperatura dentro del huésped, lipoproteínas presentes en el suero e interferón tipo A (no inmune) (7).

El período de incubación por inoculación experimental del virus de la EV suele ser de 2-5 días. Las lesiones aparecen en el bovino en el lugar de la inoculación, pero rara vez ocurre generalización con desarrollo de vesículas secundarias (15).

La mayoría de los animales susceptibles pueden ser infectados por la vía nasofaríngea, desarrollando sólo anticuerpos neutralizantes sin manifestación de síntomas y lesiones (9); igual ocurre cuando se inoculan vía intramuscular (1).

4. MATERIALES Y METODOS

4.1 BOVINOS DE EXPERIMENTACION

Se utilizaron cinco bovinos machos, mestizos holsteín libres de anticuerpos neutralizantes contra la EV. Se identificaron con los números 1, 2, 3, 4 y 5. Los cuatro primeros se inocularon vía intradermolingual con 2 ml. de una suspensión del virus NJ 7546 con un título infeccioso de $10^{6.8}$ DICT₅₀/ml. El número 5 se dejó como animal control aislado de los anteriores, el cual recibió un inóculo de 2 ml. de medio Earle 1 x (10) vía intradermolingual. Se realizaron las siguientes observaciones: período de incubación, características clínicas de la enfermedad, tiempo de aparición de las lesiones locales y de las lesiones de generalización y período de recuperación.

4.2 ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES

Se tomó suero el día de iniciación del experimento y luego diariamente hasta la terminación del ensayo de patogénesis. Los sueros fueron sometidos a la técnica de microneutralización en placa, según técnica

estandarizada en el Programa Nacional de Enfermedades Vesiculares del LIMV (10).

4.3 AISLAMIENTO DEL VIRUS

1. Cada dos días se tomaron muestras de sangre completa estéril, en volúmenes de 20 ml, en tubos con el anticoagulante heparina (100 UI/ml). Se inoculó 1 ml. de sangre en células BHK₂₁ Cl₁₃, después de ser sometidas a congelación a -20°C .
2. Previa desinfección local, se colectó moco nasal de todos los animales dos veces al día. Cada muestra se diluyó en 2 ml de medio Earle 1X (con antibiótico 10 X, penicilina y estreptomycin). Se centrifugaron a $20.000 \times g \times 15'$ y el sobrenadante inoculó en células BHK₂₁.
3. Muestra de dos gramos de materia fecal se tomó diariamente, de todos los animales, durante diez días. Cada muestra se diluyó en 8 ml de medio Earle 1 X con antibiótico 10 X (penicilina y estreptomycin). Se procesó en forma similar a las anteriores. El sobrenadante fue inoculado en células BHK₂₁.
4. Aislamiento de virus de tejido. Los bovinos inoculados se sacrificaron a intervalos de 48 horas y se colectaron muestras de tejidos linforreticular, corazón, pulmón, riñón y tejidos de todo el tracto digestivo. Dos gramos de cada uno de ellos se procesaron en forma similar a las muestras de epitelio lingual (10). El sobrenadante se inoculó en células BHK₂₁ para investigar la presencia del virus.

4.4 EXAMEN HISTOPATOLOGICO

Los tejidos fueron fijados en formalina bufferada al 10% durante 48 horas y se procesaron según técnica estandarizada en el Programa Nacional de Patología del LIMV (11).

5. RESULTADOS

5.1 MANIFESTACIONES CLINICAS

Los bovinos inoculados vía intradermolingual con la cepa NJ 7546 (Números 1, 2, 3 y 4) desarrollaron fiebre desde las 24 horas, con fluctuaciones a las 144 y 216 horas (Figura 1). Desde las 24 horas se observaron vesículas en el dorso de la lengua, con salivación incipiente, anorexia parcial, pulso débil y respiración normal (Figura 2).

A las 48 horas se desprendió el epitelio y se observó una superficie ulcerada, roja y sangrante, la cual se manifestó por chasquidos constantes y dolor intenso (Figuras 3 y 4). En los días siguientes se notó mal estado general, anorexia completa y salivación profusa. La cicatrización lingual fue completa a los diez días. El animal control permaneció normal durante los días del experimento.

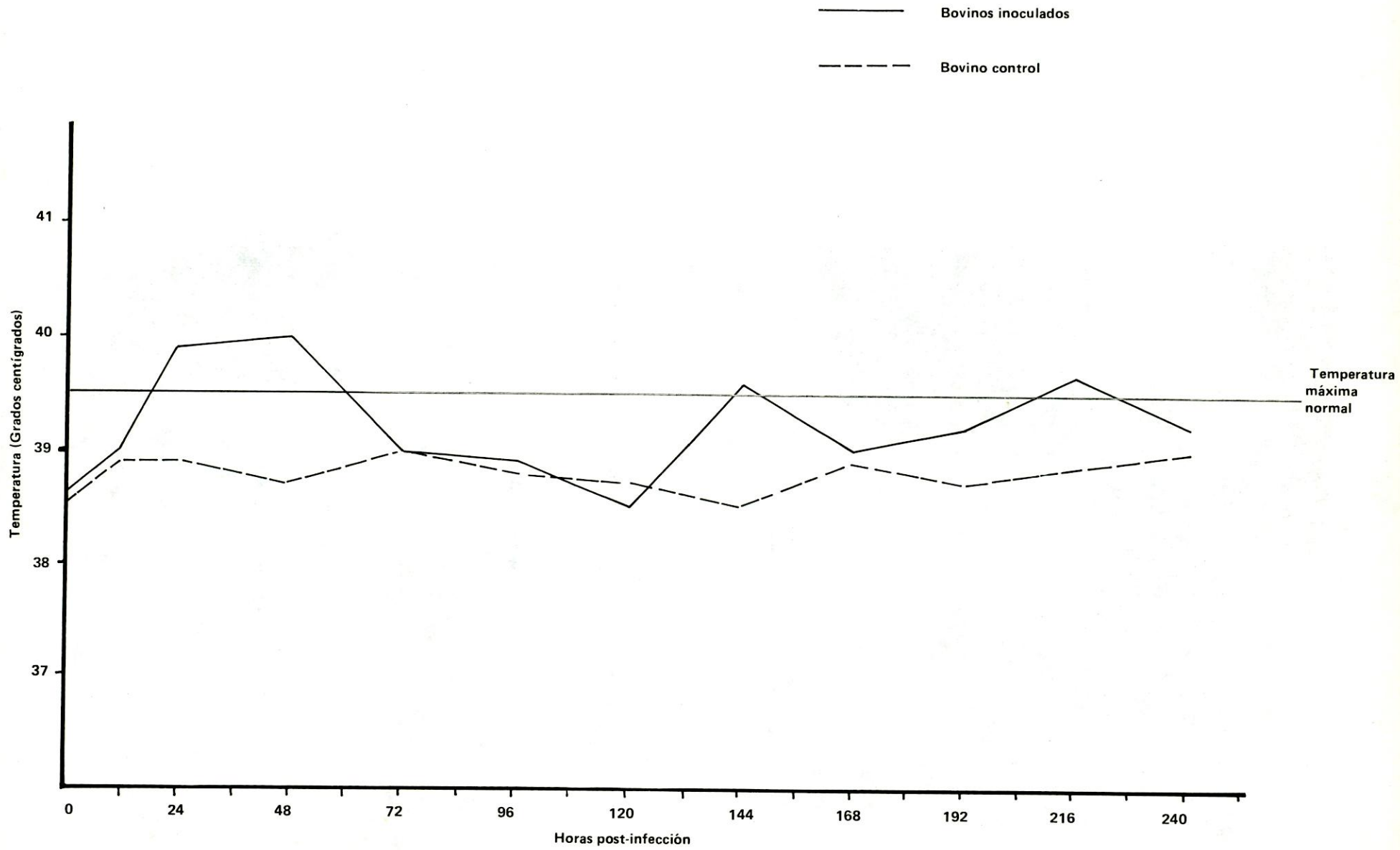
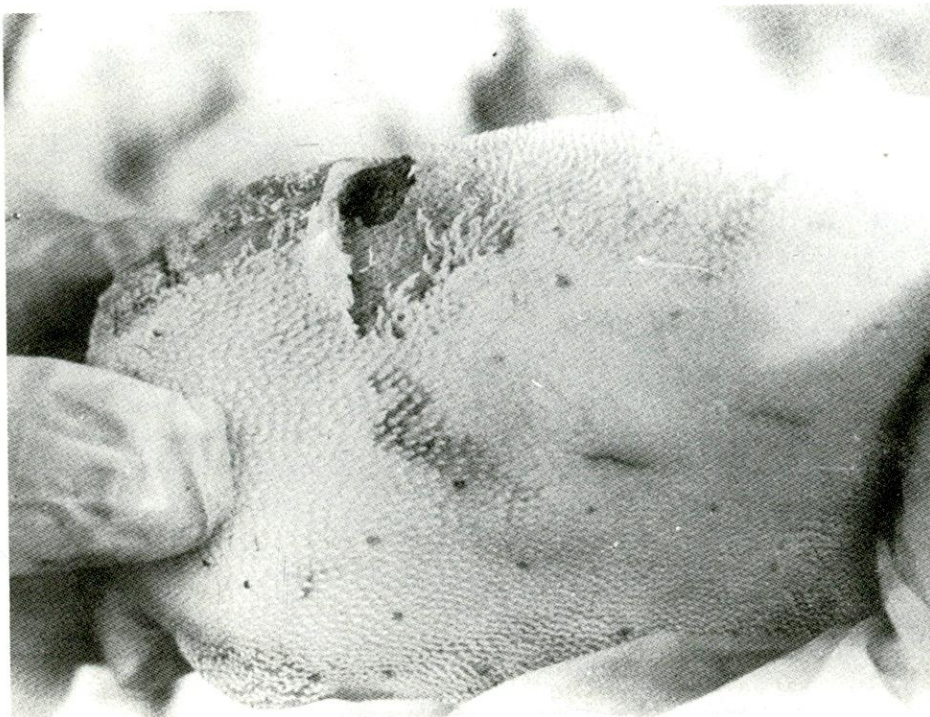


FIGURA 1. Registro de temperatura en el estudio de patogénesis en bovinos inoculados con el virus de Estomatitis Vesicular tipo New Jersey 7546.



FIGURA 2. Bovino inoculado con virus de EV NJ 7546 en el ensayo de patogénesis: vesículas linguales formadas a las 18 horas post-inoculación.

FIGURA 3. Bovino inoculado con la cepa NJ 7546 en el ensayo de patogénesis: erosiones en la punta y bordes de la lengua.



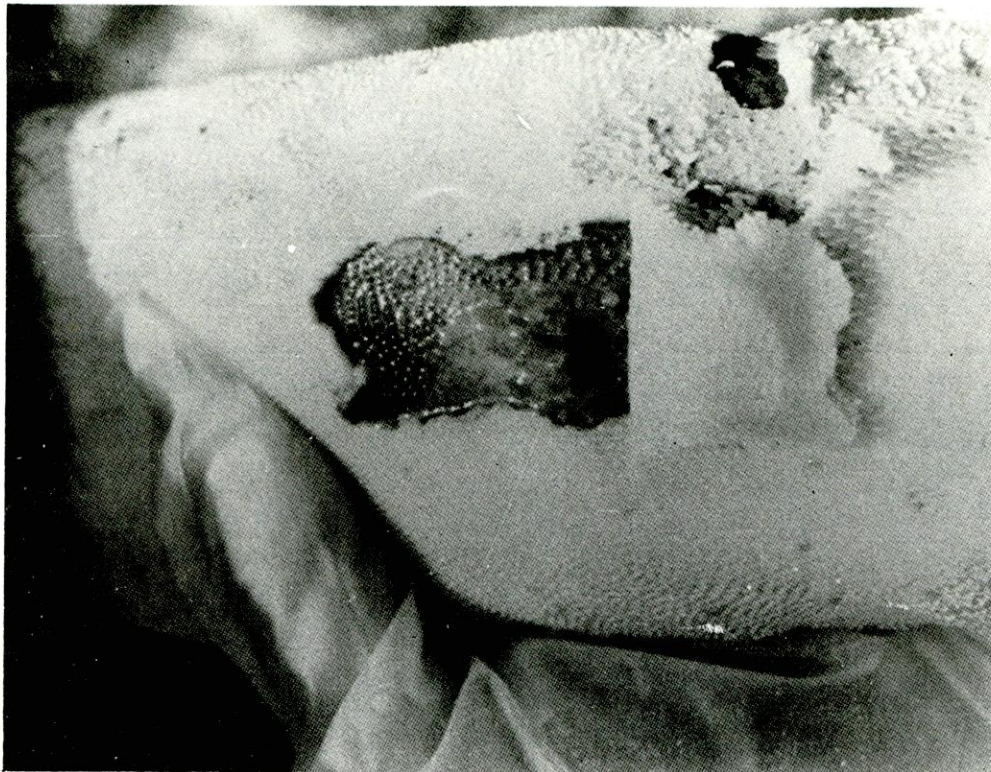


FIGURA 4. Bovino inoculado con la cepa NJ 7546 en el ensayo de patogenesis: vesículas y erosiones en el cuerpo y bordes de la lengua observados a las 36 horas post-inoculación.

5.2 AISLAMIENTO DEL VIRUS DE LA SANGRE

No fue posible aislar el virus de la EV de la sangre durante el tiempo que duró el experimento.

5.3 AISLAMIENTO DEL VIRUS DE SECRECIONES Y MATERIA FECAL

El virus de la EV no se aisló del moco nasal y saliva ni de materia fecal.

5.4 ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES

Los niveles de anticuerpos neutralizantes fueron detectados a los tres días post-infección. El título máximo se logró a los diez días (5.75 log). El animal control permaneció libre de anticuerpos (Tabla 1).

5.5 LESIONES

A la necropsia de los bovinos sacrificados entre los 2 y 4 días post-infección, se observó el bazo con puntos blanquecinos múltiples de unos 4 mm. de diámetro en la cápsula esplénica.

Los bovinos sacrificados entre los 6 y 10 días post-

inoculación presentaron degeneración mucoide de la grasa coronaria, ganglios linfáticos en general pálidos y aumentados de volumen y el bazo con características similares al de los anteriores.

Los animales sacrificados desde los cuatro días post-infección, presentaron lesiones detectadas por exámenes histopatológicos.

Los ganglios linfáticos aparecieron hiperplásicos con presencia de células inflamatorias a nivel medular. Invasión de linfocitos en los senos corticales y presencia de células de tipo histiocítico en la zona medular (Figura 5).

En el cerebro se observó gliosis focal, infiltración mononuclear en la pared de los vasos sanguíneos, congestión, satelitis y cambios anóxicos a nivel de neuronas así como meningoencefalitis no supurativa difusa (Figura 6).

Las lesiones en la lengua fueron glositis ulcerativa, erosiones múltiples (Figura 7).

En el miocardio se encontró infiltración inflamatoria mononuclear difusa (Figura 8).

TABLA 1. Niveles de anticuerpos neutralizantes de bovinos inoculados con la cepa New Jersey 7546 y bovino control en el estudio de patogenesis

Identificación	Días Post-inoculación										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0,45	0,45	0,45	0,45	1,05	3,45	3,75	4,25	4,5	*	
2	0,45	0,45	0,45	1,2	3,45	3,60	4,2	4,5	4,85	5,4	5,75*
3	0,45	0,45	0,45	1,2	1,5	*					
4	0,45	0,45	0,45	*							
5 (Control)	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	*			

* Tiempo respectivo de sacrificio

** Recíproca dilución logarítmica del suero que neutraliza 50 DICT₅₀

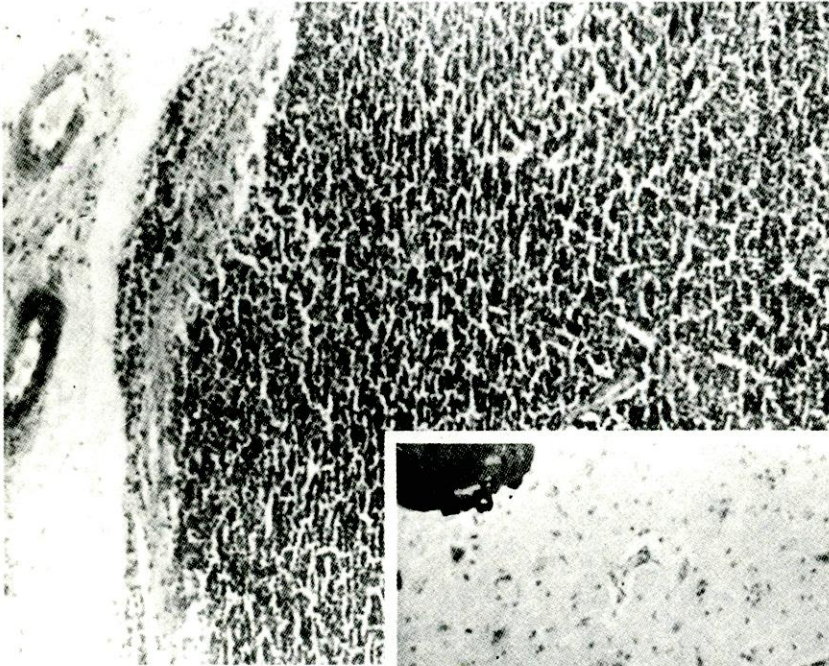


FIGURA 5. Ganglio linfático bovino inoculado con la cepa NJ 7546: hiperplasia linfoide e invasión de linfocitos en el seno subcortical (H.E. 100 X).

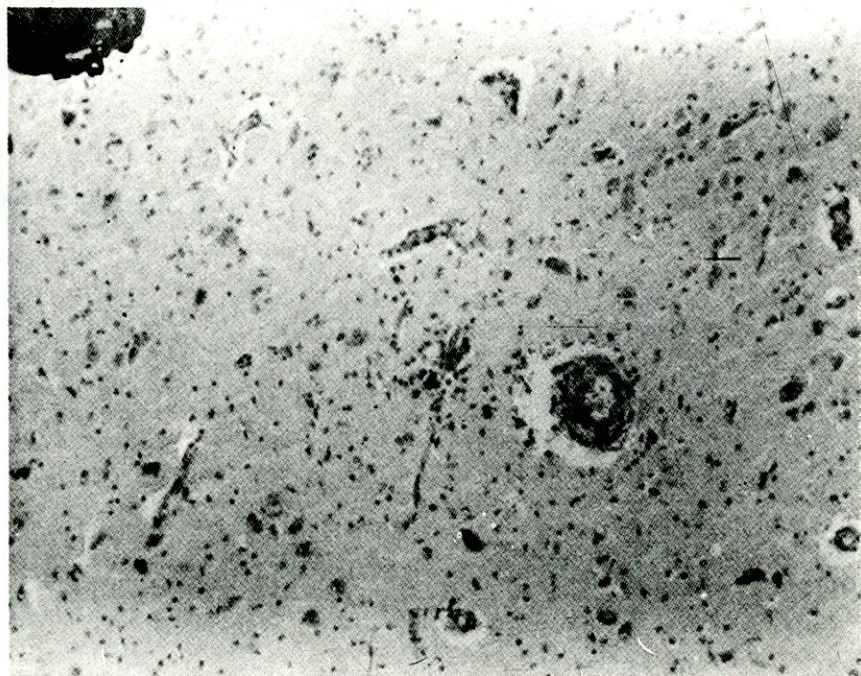


FIGURA 6. Cerebro de bovino inoculado con la cepa NJ 7546 en el ensayo de patogenesis: infiltración mononuclear en la pared vascular (H.E. 100 X)

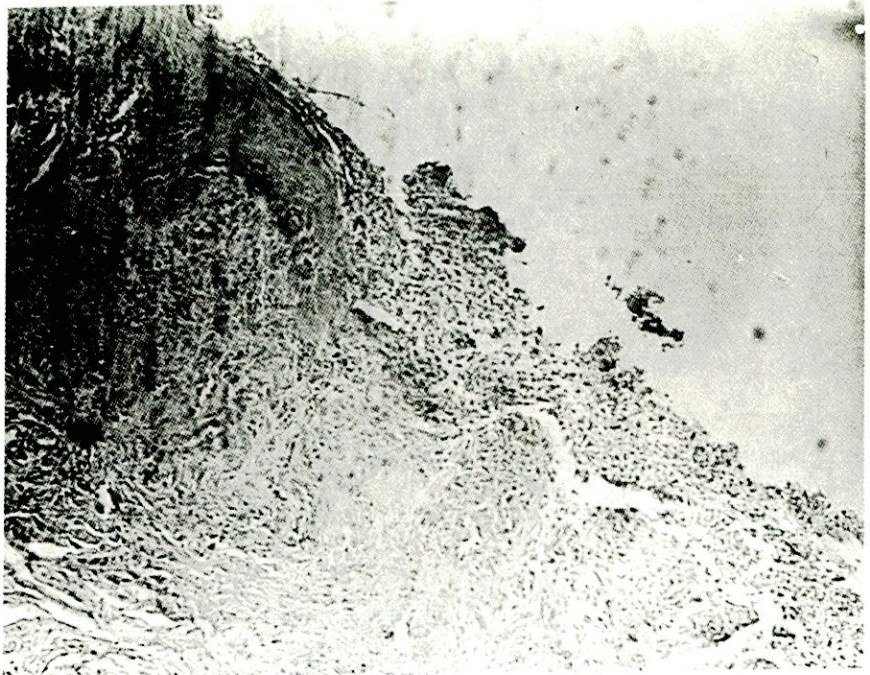
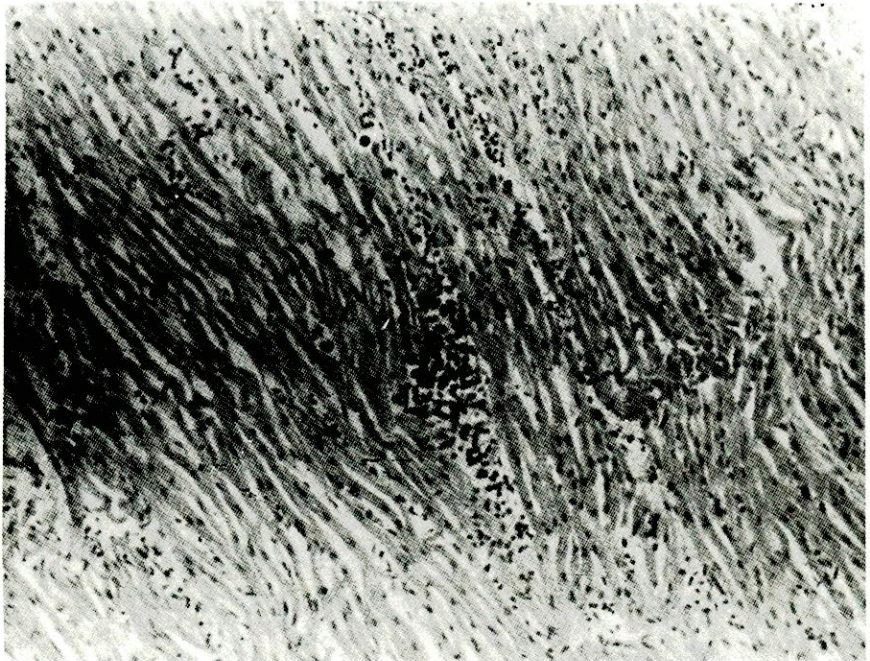


FIGURA 7. Lengua bovino inoculado con la cepa NJ 7546 en el ensayo de patogénesis: glossitis ulcerativa y erosiones múltiples.

FIGURA 8. Miocardio de bovino inoculado con la cepa NJ 7546 en el ensayo de patogénesis: infiltración inflamatoria mononuclear difusa (H.E. 100 X).



6. DISCUSION

El período de incubación de la enfermedad en los bovinos inoculados vía intradermolingual estuvo comprendida entre las 24 y 36 horas post-infección, como se observa experimentalmente con otras enfermedades vesiculares (13).

La viremia no se detectó en este grupo de animales, pero si se observó en otro experimento realizado con animales similares. La negatividad en los intentos de aislamiento del virus de la sangre posiblemente pueda deberse a la acción bloqueadora del interferón dado que el virus de la EV es altamente sensible al mismo (4, 8). Además el carácter epiteliotropo del vi-

rus puede explicar la ausencia de una viremia sostenida junto con los niveles de anticuerpos neutralizantes detectados desde el tercer día de experimentación (12).

La negatividad de las muestras analizadas al intento de aislamiento del virus, constituye un hecho experimental en contra de la existencia de portadores (15).

Sin embargo, el virus de la EV, se elimina en grandes cantidades de la saliva cuando se rompen las vesículas, la cual es infectiva para las especies susceptibles (15, 19).

Esa negatividad puede atribuirse a la poca sensibilidad del sistema in vitro, a muestras insuficientes y a la posibilidad de asociación del virus con anticuerpos, lo cual la torna no detectable.

Los niveles de anticuerpos neutralizantes, fueron detectados desde el tercer día con títulos superiores a 5.75 log. el día diez post-inoculación. Sorensen (18) argumenta que los niveles de anticuerpos neutralizantes producidos en animales susceptibles a la EV no los protege contra una descarga intradermolingual con la cepa homóloga a los 30 días siguientes, a pesar de que los títulos sean altos. Sin embargo, algunos autores demuestran que los anticuerpos circulantes proporcionan una protección escasa contra la EV y el huésped puede desarrollar resistencia a la infección por mecanismos diferentes a los mediados por anticuerpos neutralizantes (3, 18, 20).

Durante el sacrificio de los últimos animales del grupo inoculado, se observó aumento de tamaño de todo el sistema ganglionar, principalmente de los ganglios linfáticos mandibulares, lo cual, puede indicar la multiplicación del virus durante el estado inicial de la viremia y posterior propagación vía sanguínea o linfática a los diferentes órganos donde se detectaron lesiones histopatológicas (2, 6). Las lesiones microscópicas de importancia fueron observadas en la lengua, ganglios linfáticos, bazo y cerebro. Ribelin (17) y Lenghaus (14) encontraron lesiones similares en bovinos y cerdos inoculados con virus de estomatitis vesicular y virus de la enfermedad vesicular del cerdo respectivamente.

7. CONCLUSIONES

El período de incubación de la enfermedad en los bovinos inoculados estuvo comprendido entre 24 y 36 horas.

No fue posible aislar el virus de moco nasal, saliva (después de la cicatrización de las lesiones linguales) ni de materia fecal.

Los niveles de anticuerpos neutralizantes se detectaron a partir del tercer día post-inoculación con títulos altos y persistentes.

Las lesiones microscópicas de importancia fueron observadas en lengua, ganglios linfáticos y cerebro.

Es importante realizar estudios posteriores en bovinos, empleando diferentes rutas de inoculación para lograr una mejor comprensión de la patogénesis de la enfermedad.

8. SUMMARY

Pathogenesis Assay of vesicular stomatitis virus in cattle

The preliminary study of the pathogenesis was done in five animals half breed holstein 18 months old, inoculated with the strains NJ 7546. The virus incubation period ranged between 24 and 36 hours post inoculation with fluctuant fever. The neutralizing antibodies levels in the serum were detected 72 hours post inoculation obtaining high and persistent titers.

The attempt to isolate virus from saliva after healing of the lesions, nasal mucus and feces was negative.

The histopathological findings showed that tongue, lymphatic nodes, spleen and brain were the most affected organs.

It is suggested the importance of using in bovines, other inoculation routes to complete the pathogenesis studies of vesicular stomatitis virus.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ARANGO, S.; JONKERS, A.; DUEÑAS, A.; ESTUPIÑAN, J. Leucitos bovinos: cultivo y posible papel en la patogénesis de estomatitis vesicular bovina. *Revista ICA (Colombia)* v. 10 no. 2, p. 215-222. 1975
2. BRUNO-LOBO, M.; PERALTA, P.; BRUNO-LOBO, G.; DE PAOLA, D. Pathogenesis of vesicular stomatitis virus infection in the hamster and mouse. *Anais Microbiología (Brasil)* v. 15, p. 69-79. 1968
3. CASTAÑEDA, J.; LAWERMAN, L.; HANSON, R. Evaluation of virus, neutralization tests and association of indices to cattle resistente. *En: Annual Meeting of the American Veterinary Medical Association, 68 th, New York, 1963. Proceeding, 1964, p. 455-467.*

4. DAVIS, B.; DULBECCO, R.; EISEN, H.; GINSBERG, H.; WOOD, W. Patogenesis de las infecciones víricas. En: Tratado de Microbiología. Barcelona, Salvat, p. 1219-1233. 1972
5. ELLIS, E.; KENDALL, H. The public health and economic effects of vesicular stomatitis in a herd of dairy cattle. Journal American Veterinary Medical Association (Estados Unidos) v. 144 no. 4, p. 377-380. 1964.
6. FALKE, D.; ROWE, W. Die Erkrankung der Maus durch das Virus der stomatitis vesicularis II. Die pathologie organisasione under befall desz central en und peripheren nerven systems. Archiv fur die Gesamte Virusforshung (Estados Unidos) v. 17, p. 560-576. 1965
7. FENNER, F. The pathogenesis of viral infection. The Biology of Animal Viruses. New York Academic Press. p. 537-612. 1968
8. GROSSBERG, S. The interferon and their inducers molecular and therapeutic considerations. Microbiology and Medicine (Estados Unidos) v. 287 no. 1, p. 13-14. 1972
9. HANSON, R. The natural history of vesicular stomatitis. Bacteriology Review (Estados Unidos) v. 16 no. 3, p. 179-204. 1952.
10. INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO. Programa Enfermedades Vesiculares. Bogotá (Colombia). Manual de Técnicas del Programa de Enfermedades Vesiculares. Bogotá, ICA. 1978. p. 251
11. -----, Programa de Patología-Toxicología. Bogotá (Colombia). Manual de Técnicas en Patología y Toxicología Bogotá, ICA, 1978. p. 240
12. JONKERS, A.; SPENCE, L.; AITJEN, I. Cocal virus epizootiology in the bush forest and masive swamp. American Journal Veterinary Research (Estados Unidos) v. 26 no. 112, p. 758-763. 1965
13. LAI, S.; MCKERCHER, P.; MOORE, D.; GILLESPIE, J. Pathogenesis of swine vesicular disease in pigs. American Journal of Veterinary Research (Estados Unidos) v. 40 p. 463-468. 1978
14. LENGHAUS, C.; MANN, J. General pathology of experimental swine vesicular disease. Veterinary Pathology (Suiza) v. 13, p. 186-196. 1976
15. MASON, J. La epidemiología de la estomatitis vesicular. Boletín Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (Brasil) no. 29-30, p. 1-48. 1978
16. MIMS, C. Aspects of the pathogenesis of virus disease. Bacteriological Review (Estados Unidos) v. 28 no. 1, p. 30-71. 1964
17. RIBELIN, W. The cytophatogenesis of vesicular stomatitis virus infection in cattle. American Journal Veterinary Research (Estados Unidos). v. 19 no. 70, p. 66-73. 1958
18. SORENSEN, D. Virus infectivity transmission and immunity studies of vesicular stomatitis in cattle. Madison, University of Wisconsin. 1953 (Thesis Ph.D.). p. 120
19. SORENSEN, D.; CHAW, T.; KAWALCZIK, T.; HANSON, R.; BRANDLY, C. Persistence in cattle of serum neutralizing antibodies of vesicular stomatitis virus in cattle. American Journal of Veterinary Research (Estados Unidos) v 24 no. 2, p. 1060-1062. 1958
20. WAGNER, R. Pathogenecity and immunogenecity for mice of temperature sensitive mutants of vesicular stomatitis virus. Infection and Immunity (Estados Unidos) v. 10 no. 2, p. 309-315. 1974