

este valor es menor de 0.40, la cepa es usada como virus de descarga en la prueba de seroprotección con sueros de animales vacunados. Si los valores obtenidos en las pruebas inmunológicas con los virus de campo son iguales o superiores a 0.40 constituyen la existencia de un grado confiable de protección en el campo por parte de la cepa vacunal (2).

2.5 CULTIVOS CELULARES

Los virus de Fiebre Aftosa pueden ser aislados mediante su multiplicación en cultivos celulares dependiendo no solo del estado nutricional de las células, sino también en gran parte de la rata de infección. Las líneas celulares permanentes o en serie son células con un número de cromosomas anormal (heteroploides) y una morfología que las capacita para mantenerse indefinidamente in vitro por transferencia en serie (19).

Un estudio de sensibilidad en el aislamiento del virus de la Fiebre Aftosa tipos A y C sobre monocapas de cultivos celulares de la línea BHK y de cultivos primarios de riñón de feto porcino, riñón de feto bovino, fibroblastos de pollo y célu-

las de la cepa Vero, demostró en general la existencia de mayor sensibilidad por parte de la línea BHK. Los resultados de esta investigación determinaron la adopción en el Laboratorio de Enfermedades Vesiculares del ICA, de la línea BHK para el aislamiento y estudio de los virus causantes de las enfermedades vesiculares (20).

Las modificaciones inducidas por los cultivos celulares son de vigencia transitoria, puesto que el virus retorna a sus características de patogenicidad originales cuando se replica repetidas veces en los huéspedes naturales, mientras que las modificaciones de carácter genético poseen una alta estabilidad en sus propiedades, las que no se alteran aún sometidas a varias repeticiones en los huéspedes naturales (16, 42).

2.6 ESTUDIO DE PLACAS

La técnica de placas en cultivos celulares fué introducida por Dulbecco en 1952 y ha sido utilizada sobre un gran número de virus. Esta técnica usualmente se aplica por su gran precisión en la titulación de virus y en el aislamiento de clones virales que posean propiedades biológicas diferentes (18).

La titulación viral por esta técnica se basa en el principio según el cual una partícula viral (unidad formadora de placa o UFP) puede infectar una sola célula, multiplicarse y difundirse a las células contiguas. La localización de las zonas de necrosis celular en una monocapa da lugar a la presencia de lesiones circunscritas conocidas como una placa. Una capa de medio sólido (agar) o semi sólido (methylcellulosa) es usada para evitar la difusión de las partículas virales (13).

Los clones aislados pueden reproducirse para estudiar sus propiedades tanto en sus características fenotípicas como en las genotípicas. Con los ensayos en placa se pueden apreciar variaciones de patogenicidad, antigenicidad e inmunogenicidad de un virus, modificaciones que pueden ser inducidas por los cultivos celulares u otros factores aplicados en la prueba (42, 53).

En la modificación de un virus patógeno, del que se desee obtener un clon no patógeno, pero que conserva las propiedades inmunógenas de aquel, un marcador de gran utilidad lo constituye la observación realizada sobre el tamaño de las placas. Parece cierto que el tamaño de las placas posee relación directa con la virulencia e infecciosidad in vitro e in vivo (42).

La naturaleza de las placas producidas por el virus Asia 1 en cultivo celular BHK de dos líneas (Razi y Brescia 1) fueron sometidas a estudio, permitiendo observar la presencia de dos tipos de placas, una grande en Roller y una pequeña en suspensión. El virus obtenido de placa grande siempre dió placa grande, en el caso de placas pequeñas no se obtuvieron placas macroscópicas bajo el agar pero microscópicamente se observaron lesiones por el virus. Estudios de antigenicidad con la utilización de vacunas preparadas con cada una de estas placas, permitieron observar que las placas grandes poseen mayor antigenicidad que las placas pequeñas (16).

2.7. ESTUDIOS INMUNOLOGICOS

Los animales que han sufrido un ataque de Fiebre Aftosa con un tipo dado de virus son generalmente inmunes por un período de 1 a 3 años a la exposición natural con el mismo tipo de virus. Se pueden reinfectar experimentalmente con la misma cepa algunos meses subsiguientes a la recuperación, con la presencia en muchos de ellos de vesículas primarias en la boca pero sin llegar a un estado de infección generalizada. La tasa de pérdida de inmunidad depende de un número de

factores, incluyendo edad, nutrición, condición y raza (4,32).

La inmunidad activa es producida por la exposición a los propios agentes infecciosos o a sus antígenos, en general como resultado de las infecciones naturales o de la vacunación. Los anticuerpos que se detectan en primer lugar luego de un estímulo primario, corresponden en casi todas las especies animales a las inmunoglobulinas Ig M ó 19 S, seguidas por la aparición de las inmunoglobulinas Ig G ó 7 S. Los anticuerpos Ig M son detectables durante la primera semana después de la inoculación del antígeno. Los anticuerpos Ig G siguen entonces aumentando en concentración, en tanto que los anticuerpos Ig M se hacen difíciles de detectar después de la primera o segunda semana. Los anticuerpos que se forman en la respuesta secundaria y que neutralizan el virus son Ig G (15).

Los principales métodos para determinar niveles de anticuerpos en sueros de bovinos inmunizados corresponden a las pruebas de seroneutralización en cultivos celulares (IS) y seroprotección en ratones lactantes (SP) (17, 43). Para realizar los controles de eficacia en la vacuna terminada, además de los dos métodos anteriores, se aplican los métodos de la dosis protectora 50% en bovino (DPB 50%) (55), el Índice

de protección K modificado en bovinos (IKM) (1) y el Índice de protección en cobayos (IC) (39, 40).

La prueba de seroneutralización en cultivos celulares es un método indirecto utilizado para la evaluación de los anticuerpos neutralizantes en los animales vacunados, lo que permite medir la eficacia de las vacunas por la determinación de las tasas de anticuerpos. La correlación entre anticuerpos neutralizantes y los valores de índice de protección K es significativa, lográndose establecer en función de IS, la clasificación de la vacuna, es así, como las vacunas que en todas sus valencias proporcionen un índice de seroneutralización igual o superior a 1,5 son aceptadas (12,41, 59).

Con la realización de estudios de neutralización se observó que los anticuerpos para la Fiebre Aftosa 19 S de cobayos son capaces de diferenciar entre dos cepas antigénicas del virus, mientras que los anticuerpos 7 S de cobayos y 19 S ó 7 S de bovinos no lo fueron. Además se demostró que la actividad específica de los anticuerpos 19 S de cobayos no fué simplemente un reflejo de las cantidades diferentes de anticuerpos neutralizantes (63).

Otro de los métodos indirectos utilizados en la determinación de la capacidad protectora de la vacuna antiaftosa lo constituye el llamado índice "C" en cobayos desarrollado por Lucam y col. (39, 40). La aplicación de esta prueba permite además, realizar estudios de cobertura inmunológica en una cepa vacunal con el enfrentamiento de virus homólogo y heterólogo de campo (39).

Con una carente evidencia experimental, el virus de la Fiebre Aftosa ha demostrado poseer condiciones de susceptibilidad a cambios antigénicos por la constante aparición de nuevas cepas subtipos cuando el virus se difunde en presencia de poblaciones parcialmente inmunes. Además, se han demostrado cambios en cepas subtipos cuando el virus ha sido sometido a pasajes seriados en monocapas de cultivos celulares primarios de riñón bovino (BHK), de riñón de cobayo (PK) con un incremento en la adición al medio del suero específico (11, 28). Hyslop y Fagg (30) reportan pasajes seriados del virus de la Fiebre Aftosa tipo Sat 1 (cepa Turquía 323/62) en bovinos parcialmente inmunizados y el aislamiento de una variante inmunológicamente diferente después del 34º pasaje.

2.8 CARACTERIZACION GENETICA

La genética de los virus animales es mucho menos conocida que la de los bacteriófagos, debido a la falta de técnicas apropiadas para la selección e identificación de mutantes y recombinantes, especialmente por la baja frecuencia de recombinaciones (51).

El término mutación se aplica ampliamente a todos los cambios hereditarios en el genoma, excepto los que tienen lugar por incorporación del material genético procedente de otro organismo. Los varios eventos o mecanismos de mutación corresponden a modificaciones en la estructura de las bases del ADN o ARN (65).

Las mutaciones solo pueden reconocerse a través de las modificaciones del fenotipo, por este motivo quedan sin detectar numerosos cambios en las secuencias de los ácidos nucleicos, ya que una sustitución de bases, que produzca un efecto fenotípico manifiesto en una posición del cromosoma puede producir un efecto no detectable en otra posición. De aquí que existan muchas mutaciones silenciosas (65).

La recombinación es un fenómeno que consiste en el intercambio de material genético entre varios virus que se ponen en contacto. Mecanismo que se traduce en mutación y que trae como consecuencia cambios en las características de replicación y antigenicidad de los virus. Es un proceso extremadamente preciso, en el cual parte de la secuencia de nucleótidos de los elementos corresponden a un progenitor, siempre y cuando no haya adiciones, pérdidas o sustituciones de nucleótidos. Para los virus ARN como el de la Fiebre Aftosa le corresponde el tipo de recombinación intramolecular en la que una cadena recombinante de ARN sería sintetizada a partir de dos cadenas padres como resultado de un fenómeno de ruptura y unión en el mecanismo de replicación (65).

La evidencia cualitativa de la poca frecuencia de recombinación genética ha sido obtenida mezclando cepas virales distintas inmunológicamente en células de riñón de cobayo. Usando varios procedimientos selectivos, fué posible lograr el aislamiento del virus de la progenie en un número de dos cepas recombinantes en términos de sus marcadores no selectivos. La segregación ocasional de clones variados por aislamiento de placas sugiere un estado transitorio de heterocigosis asociada

con la formación de recombinantes (51, 52).

Los aislamientos subsecuentemente segregados en un número de clones de varios fenotipos incluyen tipos recombinantes y parentales. La interpretación de estos fenómenos es discutible y se sugiere que los aislamientos de la segregación puedan tener origen en los focos de infección inicial por agregados virales. Los datos serológicos sugieren que la frecuencia de recombinantes en la progenie puede ser más alta que la indicada por el uso de marcadores múltiples (51).

Los métodos usados con carácter de marcadores son de diferentes clases: a) resistencia de la temperatura; b) caracterización de placas; c) resistencia a ciertas sustancias químicas inhibidoras (Guanidina, glucosamina, etc.); d) resistencia a la acción del pH; e) antigenicidad de la cepa; f) patogenicidad. Estos métodos son de gran ayuda en la evaluación de la estabilidad genética de las cepas en estudio (16, 51).

Como un fenómeno distinto, la mezcla fenotípica ha sido reconocida primero en los bacteriófagos por Novick y Szilard

(47), considerada por algún tiempo de marginal importancia. Sin embargo, gradualmente se fué reconociendo que la mezcla fenotípica es el producto de infecciones celulares producidas con dos virus pertenecientes a un mismo grupo o grupos diferentes. La mezcla fenotípica no es un fenómeno hereditario. La progenie define solamente características por el ácido nucleico contenido en el virión mezclado (42, 36).

En esta interacción no genética los Picornavirus pueden presentar la característica de generar descendientes diferentes de los virus originales cuando el genoma de un virus se incorpora al azar con la capsida de un virus heterólogo, o una capsida consistente de componentes de ambos virus. No se trata de un cambio estable, porque después de la autoduplicación, el virus mezclado fenotípicamente producirá una progenie envuelta en capsides homólogas del genotipo (66).