

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO

Con base en la información obtenida para el brote de F. A. que se presentó en la Sabana de Bogotá y el Valle de Ubaté durante los años de 1974, 1975 y 1976 y que fue ocasionado por el subtipo A27 y por la aparición de un nuevo subtipo que se clasificó como A Sabana/74 (38), se realizó un análisis descriptivo del comportamiento de los dos subtipos en el campo calculándose la morbilidad mensual por tipo y subtipo en los predios comprometidos. Además, se calculó la morbilidad anual de los dos virus para las categorías de bovinos vacunados y no vacunados.

3.2. VIRUS

Para el desarrollo de este estudio se tomaron veinte cepas del virus tipo A representativas de las diferentes regiones ganaderas del país y causantes en algún tiempo de epide-

mias de mayor o menor intensidad. La mayoría de ellas fueron inicialmente identificadas y clasificadas en el Laboratorio de diagnóstico del Programa Nacional de Enfermedades Vesiculares.

La Tabla 1 presenta las características de identificación de las cepas considerando el número de registro, la clasificación, lugar y fecha de aislamiento y las observaciones más importantes de cada una de ellas.

3.2.1 Extracción de Antígenos.

Los materiales originales de epitelio bovino fueron macerados con ayuda de vidrio molido y suspendidos en solución Earle 1:5 (P/V) más cloroformo al 40%. Previa congelación y centrifugación a 10.000 r.p.m. se conservaron como stock viral a temperatura de -70°C .

Las carcasas de ratones lactantes muertos por acción del virus, fueron macerados en número de ocho y suspendidas en 10 ml de solución Earle más cloroformo al 50%. El sobrenadante obtenido después de centrifugar a 10.000 r.p.m. se uti-

TABLA 1 Identificación de las cepas estudiadas del virus de la fiebre aftosa tipo A

Número de Registro	Clasificación	Lugar de aislamiento	Fecha de aislamiento	Observaciones
--	A27	--	1967	Cepa de Referencia
5287	A31	Nemocón (Cundinamarca)	4-II-69	Cepa de Referencia Nuevo subtipo
6000	A24	Soatá (Boyacá)	29-I-71	Cepa de Referencia
6111	A18	Valledupar (Cesar)	12-VII-71	Cepa de Referencia
6304	A27	Riohecha (Guajira)	24-XI-71	Cepa vacunal 1972-a 1975
6336	A32	Villanueva (Guajira)	22-XII-71	Cepa de Referencia
6462	A	Málaga (Santander)	26-IV-72	Variante del subtipo A24
7510	ASabana/74	Cota (Cundinamarca)	28-X-74	Cepa Epizootica. Nuevo subtipo serológico
7915	A32	Túquerres (Nariño)	30-VII-75	Cepa Epizootica
8046	A27	Fontibón (Cundinamarca)	6-X-75	Cepa vacunal actual
8381	A	Arboletes (Antioquia)	21-VI-76	Cepa Epizootica
8480	A	Pueblo Nuevo (Córdoba)	2-VI-76	Cepa Epizootica
8517	A27	Rio de Oro (Cesar)	9-VIII-76	Cepa Epizootica
8914	A27	Aguadas (Caldas)	21-II-74	Cepa Epizootica
8947	A27	Mutató (Antioquia)	3-IV-77	Cepa Epizootica
9122	A	Chigorodó (Antioquia)	8-IX-77	Cepa Epizootica
9160	A	Arboletes (Antioquia)	11-X-77	Cepa Epizootica
9218	A	Rio de Oro (Cesar)	24-XI-77	Cepa Epizootica
8377	A27	Paletina (Caldas)	27-I-77	Cepa Epizootica
8954	A27	Dabelba (Antioquia)	14-IX-77	Cepa Epizootica

lizó como medio de suspensión para una nueva extracción de antígeno de ocho carcacas adicionales del mismo antígeno. Finalmente el material se conservó a temperatura de -70°C .

3.2.2. Refrescamiento de Cepas.

El material original de cuatro cepas virales (A6304, A7510, A8046 y A8480) se sometió a refrescamiento en bovinos jóvenes de dos años. Se realizó la inoculación de la suspensión viral por vía intradermolingual y se colectó el nuevo epitelio a las 36 horas post-inoculación.

3.2.3. Adaptación de Cepas.

A partir de los materiales originales de bovino, se realizó la adaptación de las veinte cepas en cultivos celulares de la línea BHK. Además, las seis cepas (A6000, A6304, A7510, A8046, A8381 y A8480) seleccionadas para el desarrollo básico de este estudio se adaptaron a camadas de ocho ratones lactantes de cinco días de edad.

3.2.3.1 Cultivos celulares.

Se utilizaron monocapas de células BHK₂₁ (15×10^6 células) en frascos de 75 cm^2 * para el cultivo sucesivo de cada una de las cepas. Las seis cepas seleccionadas se sometieron a 10 pasajes sucesivos y las demás de tres a cinco pasajes.

El quinto pasaje se realizó en botellas rotantes** (3×10^8 células) para obtener las semillas de virus con un tiempo de crecimiento viral de 18 a 24 horas. Los virus fueron ampollados en cantidades de 1 ml y conservados a -70°C hasta su uso.

3.2.3.2 Ratones lactantes.

Las seis cepas en estudio fueron inoculadas por vía intraperitoneal (I.P.) en cantidad de 0.1 ml por ratón de

* Tissue culture sterile, Corning. Cat. no. 366-310. Curtison Matheson Scientific.

** Roller bottle, 425 x 110 mm. Cat. no. 7730-51425. Bellco Glass, Inc.

una suspensión viral (5o. pasaje) procedente de cultivos celulares BHK. Las inoculaciones se hicieron hasta por tres pasajes sucesivos.

3.2.4. Concentración de Virus.

Los virus A6304, A7510 y A8046, se sometieron a dos ciclos de concentración por precipitación con polietilenglicol* (PEG) al 6% (P/V). En el primero se obtuvo un precipitado que se reconstituyó en un volumen de Tris NaCl pH 7,6 equivalente a la décima parte del volumen inicial de la suspensión viral cruda (concentrado 10X). El segundo precipitado obtenido después de un nuevo ciclo se reconstituyó en un volumen de Tris-NaCl equivalente a la centésima parte del volumen inicial de suspensión cruda. Se obtuvo finalmente una suspensión viral 100 veces concentrada que se conservó a -70°C hasta su uso.

* Carbowax (R) PEG 6000 Flakes; Fischer Scientific Company.

3.3 SUEROS INMUNES E HIPERINMUNES

Se utilizaron sueros inmunes de bovinos vacunados y sueros inmunes e hiperinmunes de cobayos.

Los sueros inmunes de bovinos se obtuvieron de dos lotes de animales primovacunados y sangrados a los 28 días. Las vacunas aplicadas correspondieron a lotes producidos en diferentes épocas con las cepas A6304 y A8046. Se tomó un total de nueve sueros de cada tipo de cepa vacunal y se conservaron a -20°C previa inactivación a 56°C por 30 minutos.

Para la producción de los sueros inmunes de cobayos se realizó previamente la adaptación de cuatro cepas a esta especie (A27/67, A24-6000, A Sabana/74-7510 y A32-6336) y se consideró el cuarto pasaje como fuente de virus cobayizado para realizar la inmunización de los animales. Se hicieron las sangrías a los siete días de la descarga viral y los sueros luego de la inactivación a 56°C por 30 minutos se conservaron a -20°C .

Los sueros hiperinmunes de los virus originales de epitelio bovino correspondientes a las cepas A6000, A6304, A7510, A8046, A8381 y A8480, se obtuvieron de cobayos previa inoculación intradermoplantar (I.D.P.). A los 50 días después de la inmunización, se realizaron como método inmunizante, tres inoculaciones con intervalos de cuatro días, utilizando saponina como adyuvante a una concentración de 10 mg por dosis de 0.20 ml. La sangría se hizo seis días después y los sueros luego de la inactivación a 56°C por 30 minutos se conservaron a -20°C.

Los sueros hiperinmunes internacionales de referencia, fueron suministrados por el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (CPFA).

3.4. METODOS DE CARACTERIZACION DE CEPAS

Los métodos aplicados en la caracterización de cepas comprende técnicas de carácter serológico (Fijación del Complemento) e inmunológico (Microneutralización e Índice C en cobayos).

3.4.1. Fijación del Complemento.

La técnica de fijación del complemento utilizada corresponde a la prueba en tubo, con la lectura al espectrofotómetro Coleman Jr.* del grado de densidad óptica a una longitud de onda de 545 nm. Los elementos empleados en las pruebas fueron ajustados sobre la lectura de densidad óptica del 50% de hemólisis (10) con 30 minutos de incubación de la mezcla suero-antígeno e igual tiempo en la fase de hemólisis. Las lecturas espectrofotométricas variaron de 0,00 (100% de F. del C.) a 0,66 (0% de F. del C.).

3.4.1.1. Prueba de tipificación.

Se aplicó con fines de identificación y control de los antígenos utilizados, enfrentándolos a los sueros hiperinmunes representativos de los tipos A, C y C de la Fiebre Aftosa.

* Espectrofotómetro Coleman Junior G.A. Perkin-Elmer, Illinois.

3.4.1.2. Prueba de subtipificación.

Se utilizó una gama de sueros hiperinmunes representativos de los diferentes subtipos nacionales e internacionales con importancia epidemiológica, como marcador serológico de las características antigénicas de las veinte cepas usadas en el presente trabajo.

Tanto los antígenos como los sueros se ajustaron a una concentración de 2 y 2.5 unidades fijadoras de complemento 50% (UFC 50%) respectivamente, aplicando cuatro unidades hemolíticas de complemento 50% (UHC 50%).

3.4.1.3. Prueba de relación unilateral.

Se enfrentaron los sueros hiperinmunes de los virus (A27/67, A6000, A6304, A7510, A8046, A8381 y A8480) en diluciones base dos, a los antígenos homólogos y los representativos de cinco subtipos identificados en el país. Se aplicó una concentración de 2.5 UFC 50% de cada uno de los virus obtenidos en cultivo celular BHK en quinto pasaje y cuatro UHC 50%. Para la obtención de los valores de rela-

ción unilateral (r_1) se aplicó la fórmula (7):

$$r_1 = \frac{\text{Intensidad de relación heteróloga}}{\text{Intensidad de relación homóloga}}$$

3.4.1.4. Prueba de relación bilateral.

Se enfrentaron los sueros hiperinmunes de las cepas A27/67, A6000, A6304, A7510, A8046, A8381 y A8480 a los respectivos antígenos de manera homóloga y heteróloga (cruzada), empleando diluciones de los sueros y concentraciones de los virus a 2.5 UFC 50% previa titulación con los sueros homólogos.

Para la obtención de los valores de relación bilateral (R) se aplicaron las fórmulas (7):

$$r_1 = \frac{\text{Intensidad de relación heteróloga}}{\text{Intensidad de relación homóloga}}$$

$$r_2 = \frac{\text{Intensidad de relación heteróloga}}{\text{Intensidad de relación homóloga}}$$