

RESPUESTA DE DOS BOVINOS ADULTOS INOCULADOS CON DOS CEPAS DE VIRUS DE ESTOMATITIS VESICULAR NEW JERSEY*

Gustavo Arbeláez R **

1 RESUMEN

Debido a las cuantiosas pérdidas económicas que ocasiona la estomatitis vesicular, especialmente en la ganadería de leche y a la dificultad que esta misma enfermedad produce en las campañas de control de la fiebre aftosa es necesario aclarar algunos aspectos básicos de la presentación clínica de la estomatitis vesicular y desarrollo de la enfermedad en bovinos adultos

El ensayo se realizó in vitro e in vivo de dos cepas de campo de estomatitis vesicular tipo New Jersey, identificadas con los números 7486 y 7546. Se hallaron diferencias en el título fijador del complemento, tiempo de infectividad en células BHK₂₁ y diferencias marcadas en patogenicidad en bovinos adultos

La cepa de virus New Jersey 7546 después de ser inoculada vía intradérmolingual a un bovino adulto desencadenó lesiones locales severas viremia y lesiones de generalización podal. Fueron detectados niveles de anticuerpos neutralizantes a los seis días post inoculación, con títulos altos y persistentes hasta la finalización del experimento. Los niveles de anticuerpos locales fueron persistentes en el bovino inoculado con la cepa 7486

2 INTRODUCCION

La Estomatitis Vesicular (EV) es una enfermedad viral que afecta de preferencia a los bovinos, equinos y porcinos en los cuales produce una sintomatología similar a la Fiebre Aftosa (17). Debido a las cuantiosas pérdidas económicas que ocasiona especialmente en la ganadería de leche y a la dificultad que esta misma enfermedad produce en las campañas de control de la Fiebre Aftosa, es necesario aclarar algunos aspectos básicos de la presentación clínica de la EV y desarrollo de la enfermedad en bovinos adultos inoculados con cepas de campo de virus de estomatitis vesicular New Jersey vía intradérmolingual

A pesar de que el presente experimento se realizó únicamente en dos bovinos adultos, debido principalmente a la dificultad de alojamiento en condiciones aisladas, es biológicamente válido si se tiene en cuenta la alta sensibilidad de los mismos al virus de la Estomatitis Vesicular comparados con animales jóvenes y a las pruebas realizadas in vitro en el estudio de las propiedades físico químicas de las cepas. Se dio mayor importancia al desarrollo de viremia, lesiones de generalización y a la posibilidad de existencia de portadores

3 REVISION DE LITERATURA

El virus de la EV es inactivo a una temperatura de 58° C durante 30 minutos igualmente por luz visible y ultravioleta por solventes de lípidos, por ácido acético al 5% en 30 minutos y por el fenol al 0.5% (2)

La técnica de plaqueo de los virus ha sido utilizada para caracterizar y separar las diferentes cepas. Las características más importantes son tamaño (grande pequeña mediana o diminuta) forma (redondeada o irregular) y color (claro opaco o turbio) (4)

Se ha observado que algunas cepas del virus de la EV serotipo New Jersey productoras de placas pequeñas presentan resistencia para producir infección y efecto citopático en células L (cepa L 929) comparadas con cepas productoras de placas grandes (4, 23)

En un estudio previo partiendo de una cepa original de campo de virus de EV New Jersey se aislaron dos tipos de clones con morfología de placa grande y placa pequeña. Se trabajó con el virus productor de placa pequeña la cual conserva esta característica de morfología de placas en células BHK₂₁ Cl₁₃ hasta el pasaje 70 siendo la antigenicidad en bovinos igual a la del virus de campo (20)

En un ensayo anterior en bovinos inoculados por vía intradérmolingual y en las encías con virus de la EV serotipo New Jersey solo desarrollaron lesiones

* 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

típicas en la boca, con salivación y fiebre. Se detectó viremia entre las 24 y 66 horas post inoculación (17, 19)

De otro lado, bovinos inoculados por vía intramuscular con el virus de la EV New Jersey, escarificando previamente en la lengua y la ubre, no desarrollaron síntomas clínicos de la enfermedad (1)

Cuando los bovinos se infectan por primera vez con el virus de la EV, desarrollan niveles de anticuerpos neutralizantes, los cuales no protegen a los animales contra una descarga de virus intradermolingual con la cepa homóloga a los 30 días siguientes, a pesar de que los títulos sean altos (9, 21)

Algunos autores demuestran que los anticuerpos circulantes proporcionan una protección escasa de los animales contra los Rhabdovirus (Estomatitis Vesicular y Rabia) y el huésped puede desarrollar resistencia a la infección por mecanismos diferentes a los mediados por anticuerpos neutralizantes (3, 21, 23). La importancia de la inmunidad local ha sido claramente demostrada después de infecciones inducidas con rhinovirus, influenza y poliovirus. Existe fuerte evidencia de que la actividad antiviral en superficies mucosas externas es el resultado de la síntesis de anticuerpos locales, principalmente de inmunoglobulina A (9, 18)

4 MATERIALES Y METODOS

4.1 CEPAS

Se utilizaron las cepas New Jersey 7486 y 7546 de epitelio de campo, las cuales se procesaron según metodología empleada en el Programa de Enfermedades Vesiculares del Laboratorio de Investigaciones Médicas Veterinarias (LIMV) del ICA. Las cepas procedentes de epitelio lingual bovino se emplearon sin ningún tipo de modificación en la inoculación de los bovinos (12)

4.2 TITULACION Y CARACTERIZACION DE PLACAS

Las cepas seleccionadas se titularon en microplaca y mediante la técnica de fijación del complemento. Se utilizaron monocapas de cultivo celular de la línea BHK₂₁ en frascos plásticos de 75 cm² para la caracterización de placas. Se caracterizaron las placas formadas a partir del epitelio lingual de inoculación (Ep L 1) y epitelio lingual de refrescamiento (Ep L 2) así como las placas formadas procedentes de epitelio de lesiones de generalización (Ep G). Se determinó un pH de 7.3 en el medio de plaqueo, una temperatura de 37°C y un tiempo de incubación de 60 horas. Se empleó la técnica de Dulbecco (6, 12)

4.3 ENSAYO EXPERIMENTAL EN BOVINOS ADULTOS

Dos bovinos adultos, mestizos, Holstein, machos, libres de anticuerpos contra la EV, fueron examinados clínicamente durante 15 días antes de iniciar el

experimento, para descartar la presencia de cualquier enfermedad infecciosa contagiosa

El bovino identificado con el número 7603 se inoculó con 2 ml de la cepa NJ 7546 vía intradermolingual, con un título infeccioso de 10^{6.8} DICT 50/ml (dosis infectante cultivo de tejido 50 por ml). El bovino 7843 se inoculó en forma similar con la cepa NJ 7486 con título infeccioso de 10^{6.9} DICT 50/ml

Los animales fueron alojados durante cinco meses en unidades de aislamiento separadas

4.4 AISLAMIENTO DE VIRUS DE SANGRE

Se tomó sangre de la vena yugular, previa desinfección local cada doce horas durante quince días. Se dispuso de tubos estériles con heparina (1 000 UI/ml) y frascos plásticos de 25 cm² que contenían 4 x 10⁶ células de la línea BHK₂₁ en monocapa. La sangre se inoculó en volúmenes de 1 ml por frasco. Las muestras positivas se confirmaron por la prueba de fijación del complemento con el respectivo suero homólogo

4.5 NIVELES DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES

Fueron tomadas muestras de sangre cada tercer día en volúmenes de 5 ml durante el primer mes y luego cada quince días hasta finalizar el experimento. A partir de la sangre se obtuvo el suero en condiciones de esterilidad, mediante centrifugación a 1 500 g durante 10 minutos (12)

Fueron colectadas con la copa de probang muestras de líquido de la faringe y porción proximal del esófago cada ocho días durante el primer mes y luego cada treinta días hasta la finalización del experimento. Una parte de la muestra se utilizó para el intento de aislamiento del virus y otra parte para la investigación de anticuerpos locales. El líquido esofagofaríngeo se procesó según técnica estandarizada en el Programa Nacional de Enfermedades Vesiculares (LIMV), sin previo tratamiento con tricloro, trifluoroetano (TTE) (9, 12)

5 RESULTADOS

5.1 TITULACION Y CARACTERIZACION DE PLACAS

La Tabla 1 muestra los títulos infecciosos y fijadores del complemento de las dos cepas utilizadas

La morfología de placa fue muy similar en las dos cepas de Estomatitis seleccionadas para este estudio, con un diámetro aproximado de 2 mm

Se observó que las placas formadas a partir de epitelio podal (lesiones de generalización) y BHK₅ tuvieron un diámetro de 4 mm (Figuras 1 y 2)

5.2 EXAMEN CLINICO EN BOVINOS ADULTOS

La fiebre fue detectada desde las 12 y 24 horas post infección en los bovinos inoculados con las cepas

TABLA 1 Titulacion de las cepas de Estomatitis Vesicular tipo New Jersey a partir de epitelio lingual bovino

| No Registro | Titulo Infeccioso por ml * | Tiempo de infectividad en células BHK | UFC ₅₀ ** | UFP/ml *** |
|-------------|----------------------------|---------------------------------------|----------------------|------------|
| 7486 | $10^{6.9}$ | 20 horas | 1/8 | $10^{6.7}$ |
| 7546 | $10^{6.8}$ | 18 horas | 1/64 | $10^{6.5}$ |

- * Titulo infeccioso expresado en logaritmo base 10
- ** Unidades fijadoras de complemento 50
- *** Unidades formadoras de placa por ml

FIGURA 1 Caracterización de placas de la cepa NJ 7486 epitelio lingual BHK1 BHK5 y Epi L 2

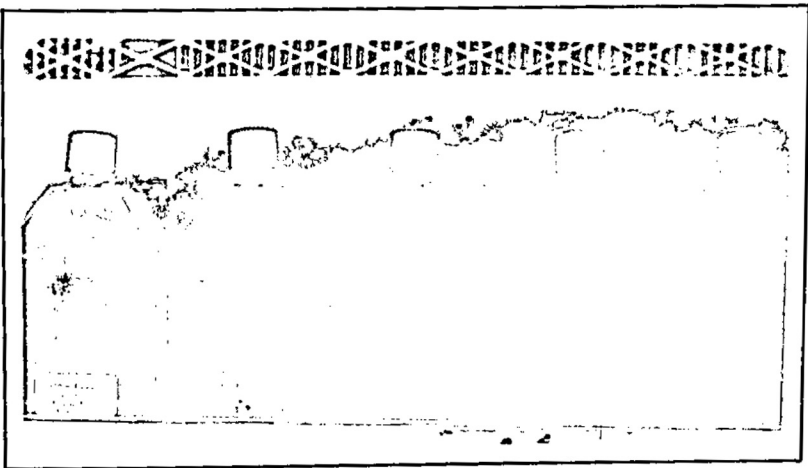
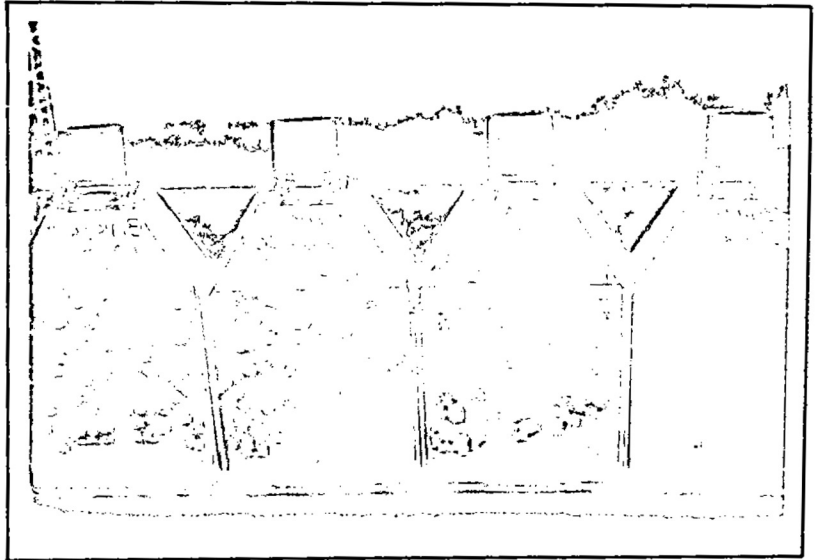


FIGURA 2 Caracterización de placas de la cepa NJ 7546 Ep L 1 BHK1 BHK5 Ep L 2 Ep generalización

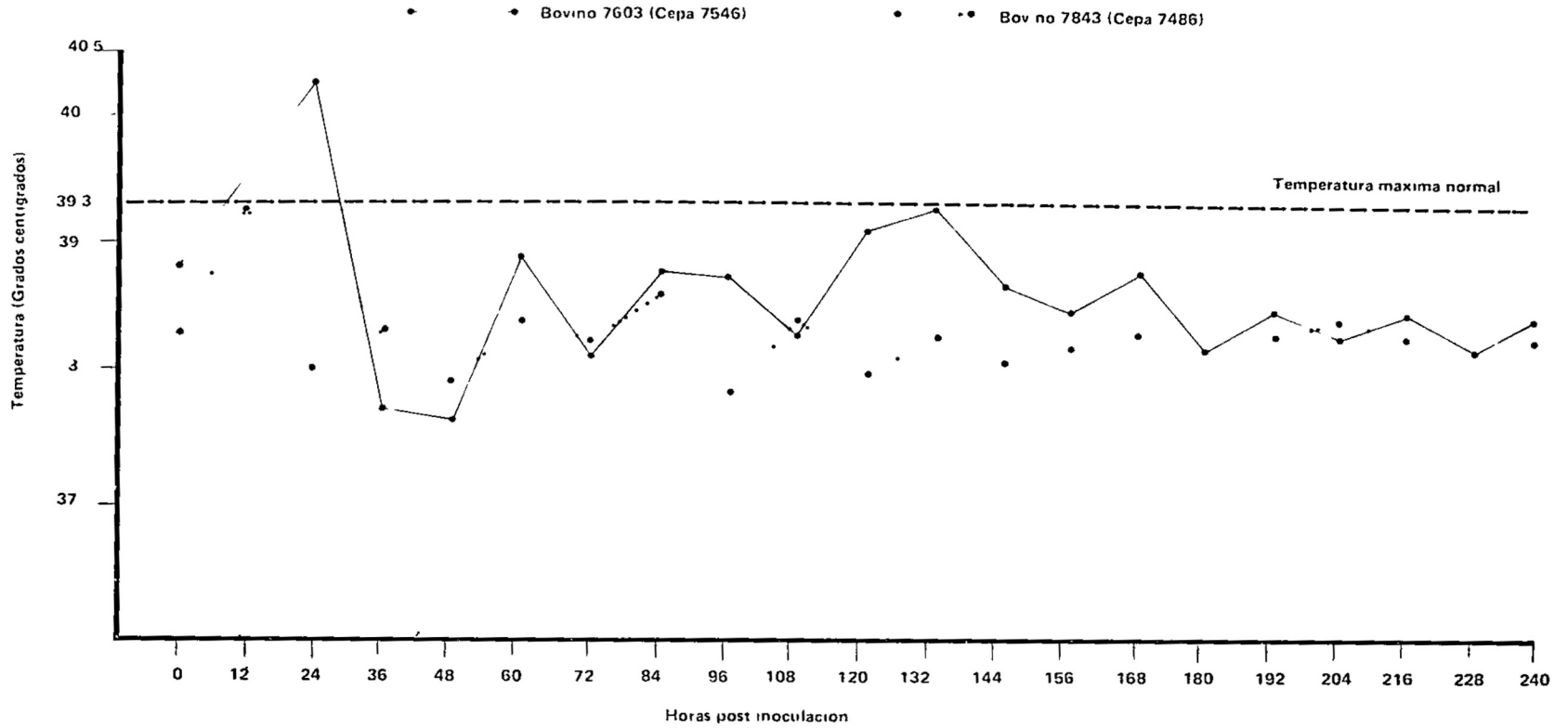


FIGURA 3 Registro de temperatura de animales inoculados con las Cepas 7546 y 7486 del virus de la Estomatitis Vesicular Tipo New Jersey

NJ 7546 y NJ 7486 respectivamente (Figura 3) Las vesículas linguales fueron evidentes a las 18 horas post-infección, las cuales confluyeron a las 36 horas para formar otras de mayor tamaño, al reventar éstas, drenaron un líquido claro, ligeramente viscoso. Después del desprendimiento del epitelio, los animales rechazaron el alimento y la salvación fue profusa. El bovino 7843 presentó cicatrización completa de la mucosa lingual a los doce días post-infección y a los quince días el bovino 7603

5.3 AISLAMIENTO DEL VIRUS DE LA SANGRE

La Tabla 2 muestra los resultados de aislamiento del virus de la sangre

TABLA 2 Aislamiento de virus de células BHK₁ a partir de muestras de sangre completa de bovinos inoculados con el virus de la Estomatitis Vesicular tipo New Jersey

| BOVINOS | | | | |
|-------------------------------|------|-----|------|----|
| Tiempo post infección (horas) | 7603 | | 7843 | |
| | ECP* | FC* | ECP | FC |
| 12 | - | - | - | - |
| 24 | + | + | - | - |
| 36 | - | - | - | - |
| 48 | + | + | - | - |
| 60 | - | - | + | + |
| 72 | - | - | - | - |
| 84 | - | - | - | - |
| 96 | - | - | - | - |
| 108 | - | - | + | + |
| 120 | - | - | - | - |
| = | - | - | - | - |
| 360 | - | - | - | - |

* Efecto citopático

** Fijación del complemento

5.4 LESIONES DE GENERALIZACION

A las 27 horas post-inoculación en el bovino inoculado con la cepa NJ 7546, se observó sensibilidad a la palpación en la región interdigital y parte posterior del menudillo del miembro anterior derecho, con aumento de la temperatura local. A las 24 horas siguientes se apreciaron vesículas en los sitios mencionados y a los 9 días post-infección, todos los miembros aparecieron afectados en forma similar con desprendimiento parcial de los cascos, lo cual ocasionó una cojera severa y postración del animal durante un mes (Figuras 4 y 5). A las siete semanas se notó recuperación completa de todos los miembros afectados.

El bovino inoculado con la cepa 7486 no exhibió lesiones podales.

FIGURA 4 Bovino inoculado con el virus de la Estomatitis Vesicular NJ 7546 miembro anterior izquierdo vesículas y erosiones en la región plantar observadas a los cinco días post inoculación



FIGURA 5 Bovino inoculado con el virus de Estomatitis Vesicular NJ 7546 Miembro posterior izquierdo desprendimiento del casco

5.5 NIVELES DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES

A partir del sexto día después de la inoculación, se

detectaron títulos de anticuerpos neutralizantes en el suero en los dos bovinos (Figuras 6 y 7). Los niveles de anticuerpos permanecieron estables hasta las siete semanas, con caídas menos apreciables en los meses siguientes

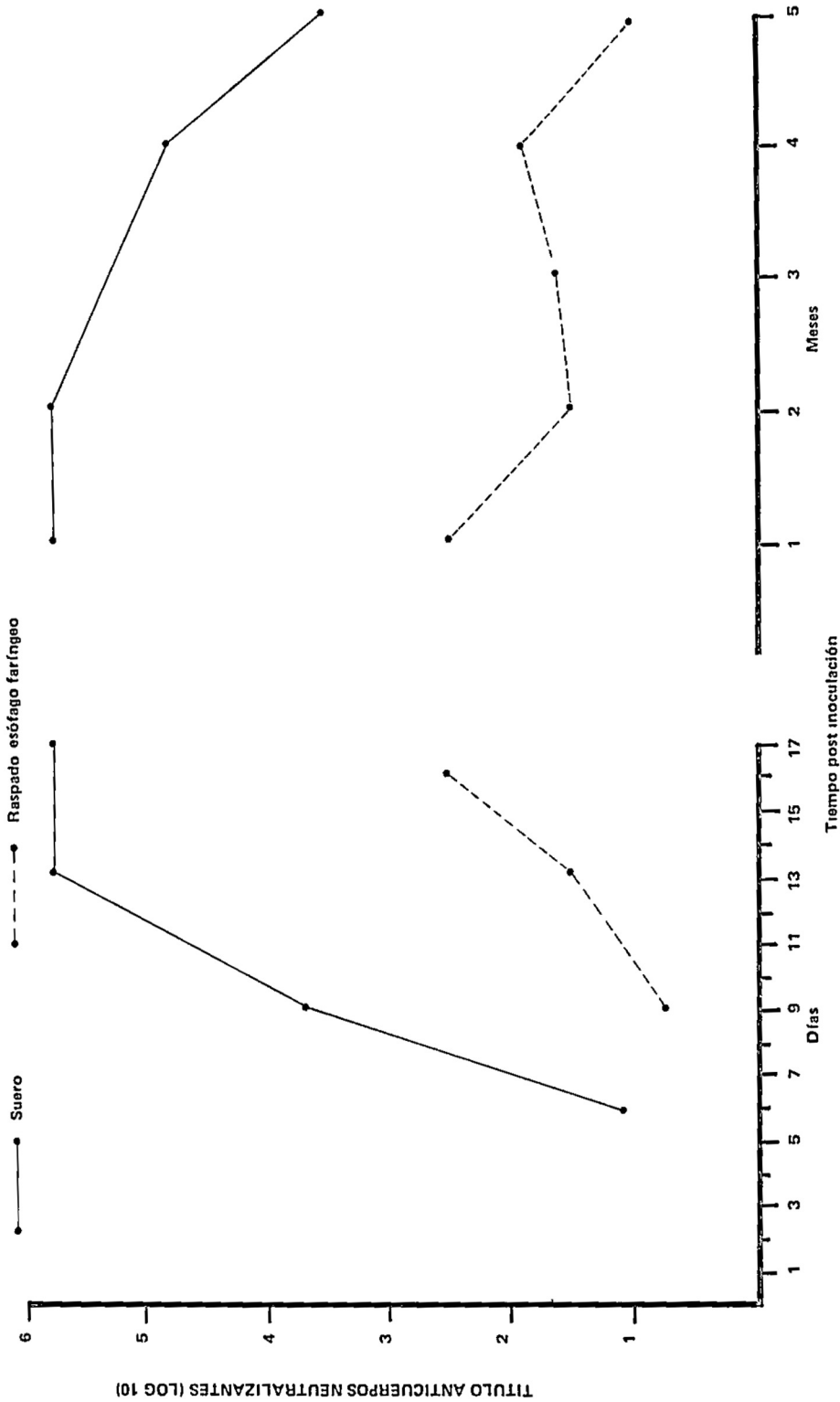


FIGURA 6. Anticuerpos neutralizantes séricos y locales detectados en el raspado esófago faríngeo del bovino inoculado con la Cepa 7546 del virus de la Estomatitis Vesicular tipo New Jersey

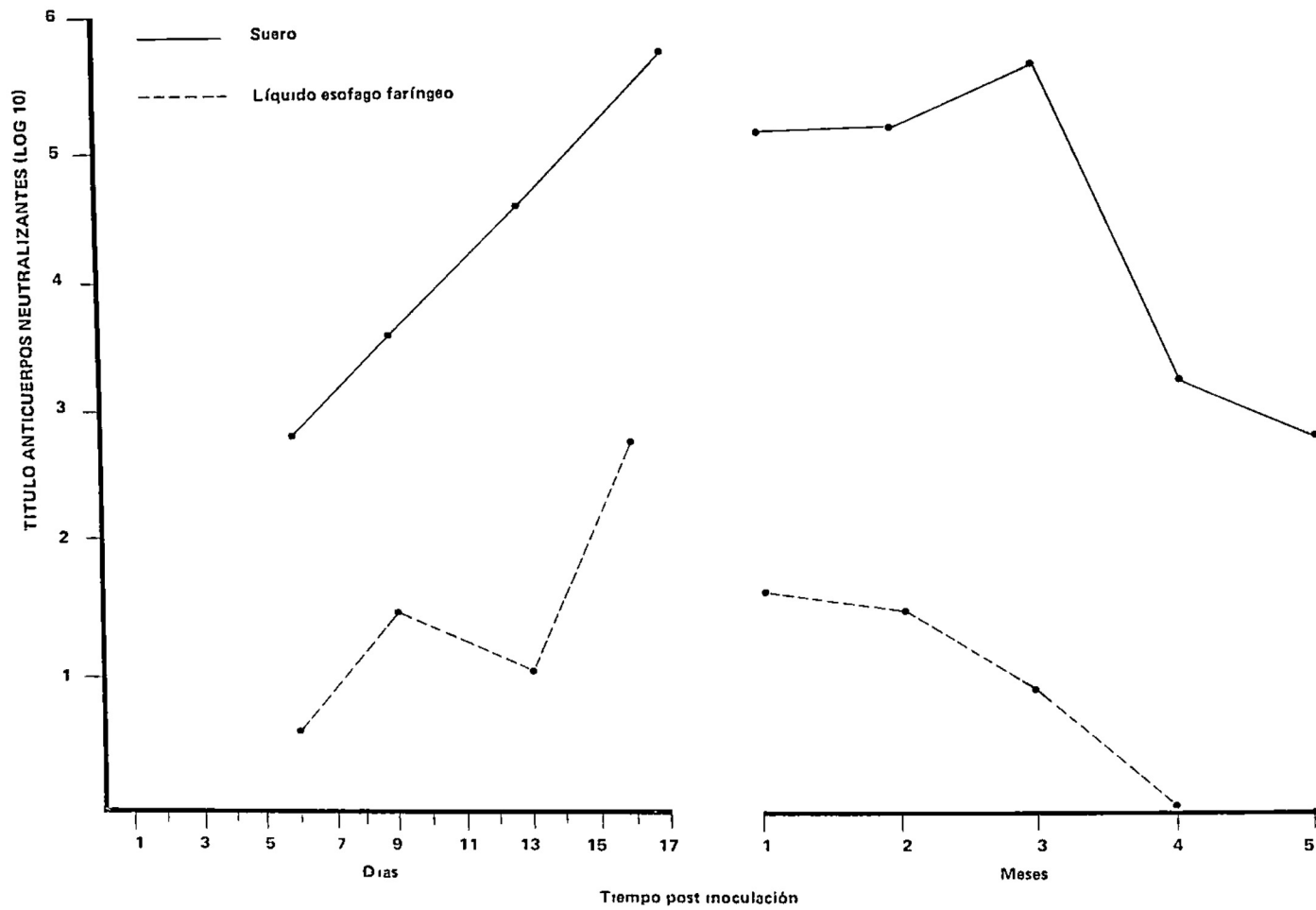


FIGURA 7 Anticuerpos neutralizantes séricos y locales de líquido esofago faríngeo del bovino 7843 inoculado con la Cepa 7486 del virus de la Estomatitis Vesicular tipo New Jersey

5 6 NIVELES DE ANTICUERPOS LOCALES

A los seis días post inoculación se detectaron niveles de anticuerpos locales a partir del líquido esofago faríngeo en el bovino 7843 y a los nueve días en el bovino 7603 (Figuras 6 y 7). El bovino 7603 presentó un título de $10 \log$ al final del experimento mientras que en el bovino 7843 los títulos de anticuerpos desaparecieron completamente hacia los cuatro meses.

5 7 ENSAYO DE PORTADORES

De ninguna de las muestras de líquido esofago faríngeo colectadas durante los cinco meses de experimentación, se logró aislar virus de Estomatitis en células BHK₂₁, confirmación hecha por la prueba de fijación del complemento.

6 DISCUSION

En los ensayos *in vitro* e *in vivo* de las dos cepas de Estomatitis Vesicular tipo New Jersey, la cepa 7546 mostró menor tiempo de infectividad en células BHK₂₁ y mayor título fijador del complemento correlacionadas con la severidad de las lesiones producidas en un bovino adulto inoculado vía intradérmolingual. Hasta el momento no se ha encontrado relación entre estas variables y la patogenicidad de las cepas de estomatitis vesicular en bovinos. La mayor virulencia y patogenicidad observadas con la cepa 7546 puede deberse a factores relacionados con el huésped ya que solo se inoculó un animal con cada uno de los virus (24).

El período de incubación de la enfermedad en los bovinos inoculados vía intradérmolingual fue de 24-36 horas post infección para los bovinos 7603 y 7843 respectivamente. La viremia detectada a las 24 horas post inoculación fue de corta duración en el bovino 7603 y apareció muy tardíamente en el bovino 7843 y constituye un aspecto muy importante si se tiene en cuenta la posibilidad de transmisión de la enfermedad por artrópodos y hematofagos (10-14). Sin embargo, esta posibilidad ha sido objetada por Jonkers (14) puesto que en la mayoría de los trabajos experimentales se ha comprobado que la viremia es efímera y débil. Además no se ha registrado el aislamiento del virus New Jersey de artrópodos hematofagos en áreas donde la enfermedad se presenta en forma enzootica y epizootica lo cual es común con el virus de Estomatitis tipo Indiana (17).

Las lesiones de generalización podal estuvieron asociadas con el aislamiento del virus de la sangre lo cual permite suponer que el virus se diseminó por vía sanguínea y posteriormente se localizó en el epitelio podal ocasionando las lesiones características propias de las enfermedades vesiculares (15-16). Este hecho reviste gran importancia pues no solo implica pérdidas económicas en la ganadería de carne y leche, sino también una lenta recuperación de los animales afectados (7).

En relación con la respuesta inmunológica humoral y local, los niveles de anticuerpos seroneutralizantes, se detectaron desde los seis días en los dos animales, siendo sostenidos los niveles en el bovino inoculado con la cepa 7546.

En cuanto a los anticuerpos locales, el comportamiento fue similar en los dos animales, pero en el bovino inoculado con la cepa 7486, desaparecieron a los cuatro meses mientras que en el animal inoculado con la cepa 7546, permanecieron hasta los cinco meses de experimentación. Se observó que los valores inmunitarios son persistentes en el animal severamente afectado. A pesar de que la literatura registra que los anticuerpos neutralizantes son poco protectivos contra el virus de la Estomatitis Vesicular, Castañeda y colaboradores (3) y Lobo y colaboradores (16) observaron relación entre los títulos de neutralización y la resistencia a la enfermedad natural.

La negatividad de las muestras de líquido esofago faríngeo al intento de aislamiento de virus de Estomatitis Vesicular constituye un hecho experimental en contra de la existencia de portadores. Aun que es probable que los anticuerpos locales neutralizaron al virus, este no fue posible aislarlo después de que dichos anticuerpos dejaron de ser detectados (9-8). El interferón pudo haber jugado un papel importante en la negatividad al intento de aislamiento del virus ya que el virus de EV es altamente sensible al interferón. La existencia de portadores del virus de la EV debería esclarecerse con estudios posteriores, involucrando un número mayor de bovinos.

7 CONCLUSIONES

Se reprodujo la enfermedad en dos bovinos adultos inoculados vía intradérmolingual con dos cepas de EV New Jersey.

Se comprobó la presentación de viremia en los bovinos inoculados, la cual estuvo relacionada con el desarrollo de lesiones podales generalizantes severas en todos los miembros en el bovino 7603.

La inmunidad humoral (anticuerpos neutralizantes) y local (anticuerpos neutralizantes detectados en el líquido esofago faríngeo) fue de larga duración pero más sostenida en el bovino severamente afectado.

No se demostró la existencia de portadores durante los cinco meses de experimentación.

8 SUMMARY

Response of adult cattle inoculated with two strains of vesicular stomatitis New Jersey Type

Due to the economic losses caused by the vesicular stomatitis virus mainly in dairy cattle and the difficulties that this disease produces in the campaign against foot and mouth disease virus, it is a purpose to clarify some basic aspects of the clinic presentation of vesicular stomatitis and the development of the disease in adult cattle.

Two strains of vesicular stomatitis virus identified as NJ 7546 and 7486 were used for *in vivo* and *in vitro* studies. The strains showed slight differences in complement fixation titer, infectivity in BHK₂₁ cells and remarkable differences in virulence and pathogenicity in adult cattle.

The bovine inoculated with the strain NJ 7546 developed severe local lesions, viremia and foot

lesions. High titer of neutralizing antibodies were detected six days post inoculation and the titers persisted up to the end of the experiment. The levels of local antibodies were persistent in the bovine inoculated with the strain NJ 7546 and they were not detected in the bovine inoculated with the NJ 7486 strains four months post inoculation.

9 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ARANGO S, JONKERS A, DUENAS A, ESTUPINAN 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. BUXTON A, FRASER G. *Animal microbiology*. London: Blackwell Scientific v 2 p 549-572 1959
3. CASTANEDA J, LAWERMAN L, HANSON R. Evaluation of virus neutralization tests and association of indices to cattle resistance. En: *Annual Meeting of the American Veterinary Medical Association 68th New York 1963 Proceedings* p 445-467 1964
4. COOPER R. The plaque assay of animal viruses. *Advances in Virus Research (Estados Unidos)* v 8 no 2 p 319-374 1969
5. COTTON W. Vesicular stomatitis. *Veterinary Medicine (Estados Unidos)* v 22 no 4 p 169-175 1927
6. DULBECCO R. Production of plaques in monolayer tissue cultures by single particles of an animal virus. *Proceedings of the Nature Academy of Science (Estados Unidos)* v 88 no 3 p 747-752 1952
7. 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 44 no 4 p 377-380 1964
8. FERREIRA M. Prueba de microneutralización para estudio de anticuerpos de la fiebre aftosa. *Boletín Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (Brasil)* no 21-22 p 17-20 1976
9. GERBER J, MARRON E, KUCERA C. Local and systemic cellular and antibody immune response of cattle to infections bovine rhinotracheitis virus vaccines administered intranasally and intramuscularly. *American Journal Veterinary Research (Estados Unidos)* v 39 no 5 p 753-760 1978
10. HANSON R. The natural history of vesicular stomatitis. *Bacteriology Review (Estados Unidos)* v 16 no 3 p 179-204 1952
11. ——— BRANDLY C. Epizootiology of vesicular stomatitis. *American Journal Health (Estados Unidos)* v 47 no 2 p 205-209 1957
12. INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO. Programa Enfermedades Vesiculares. Bogotá: Colombia. Manual de Técnicas del Programa de Enfermedades Vesiculares. Bogotá: ICA 1978. 251 p.
13. JOHNSON K, TESH R, PERALTA P. Epidemiology of vesicular stomatitis virus. *Journal of the American Veterinary Medical Association (Estados Unidos)* v 155 no 12 p 2133-2140 1969
14. JONKERS A. The epizootology of the vesicular stomatitis virus. *American Journal Epidemiology (Estados Unidos)* v 86 no 5 p 286-291 1967
15. 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
16. LOBO C, ARBELAEZ G, DE GERARDINO A, ESTUPINAN J, LOPEZ M. Ensayos de vacunas contra la estomatitis vesicular I. Preparación experimental. *Revista ACOVEZ (Colombia)* v 3 no 9 p 32-39 1979
17. MASON J. La epidemiología de la estomatitis vesicular. *Boletín Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (Brasil)* no 29-30 p 1-48 1978
18. MATSUMOTO M, McKERCHER P, WUSBAUM K. Secretory antibody response in cattle infected with foot and mouth disease virus. *American Journal Veterinary Research (Estados Unidos)* v 39 no 7 p 1081-1087 1978
19. REBELIN W. The cytopathogenesis of vesicular stomatitis virus infection in cattle. *American Journal Veterinary Research (Estados Unidos)* v 19 no 70 p 66-73 1958

- 20 RUEDA F Modificación de una cepa de estomatitis vesicular en célula BHK₂₁ Bogotá UN ICA 1974 65 p (Tesis Mag Sci)
- 21 SORENSEN D Virus infectivity transmission and immunity studies of vesicular stomatitis in cattle Madison, University of Wisconsin 1953 (Thesis Ph D) p 120
- 22 WAGNER R LEVY A Biologic properties of two plaque variants of vesicular stomatitis virus (Indiana serotype) The Journal of Immunology (Estados Unidos) v 91 no 4 p 12 18 1973
- 23 ----- Pathogenicity and immunogenicity for mice of temperature sensitive mutants of vesicular stomatitis virus Infection and Immunity (Estados Unidos) v 10 no 2 p 309 315 1974
- 24 YEDLOUTSCHNIG R DARDIRI A Susceptibility and serological response of cattle pigs horses and goats to Indiana 2 and Indiana 3 strains of vesicular stomatitis virus En Animal Meeting of the United States Animal Health Association 81 th New York 1977 Proceedings N Y 1978 p 276 283