

## UTILIZACION DE MUESTRAS DE LIQUIDO ESOFAGOFARINGEO PARA EL DIAGNOSTICO DE FIEBRE AFTOSA\*

Guillermo Restrepo S.\*\*  
Jaime Estupiñán A.  
José del C. Barrera V.  
Jairo R. Rocha R.  
Fernando Rueda A.  
Myriam Q. de Bustos  
Manuel J. Valencia M.

### 1. RESUMEN

El diagnóstico etiológico de la Fiebre Aftosa (FA), se hace mediante la tipificación por la técnica de la fijación del complemento con muestras de epitelio obtenidas de animales enfermos.

En el Laboratorio Nacional de Investigaciones Médico Veterinarias-LIMV, del ICA se hizo una investigación con el fin de mostrar la utilidad de la técnica de aislamiento de virus a partir de líquido esofago-faríngeo (LEF) para la recuperación de virus de la Fiebre Aftosa (FA) en brotes de enfermedades vesiculares en los cuales no fue posible obtener muestras adecuadas de epitelios para las pruebas de diagnóstico por la fijación del complemento.

Las muestras de LEF se tomaron de animales que se encontraban en la fase de recuperación, después de sufrir la enfermedad vesicular y en lapsos de tiempo variables, hasta dos meses después de las manifestaciones clínicas.

Se obtuvo el aislamiento de virus de FA en las muestras correspondientes a 19 de 32 hatos estudiados. Los virus fueron clasificados como pertenecientes a los tipos A y O de FA.

Se investigó la presencia de anticuerpos séricos contra el antígeno asociado a la infección por virus de la FA (Virus infection associated antigen, VIAA), en los animales muestreados para aislamiento de virus.

Los resultados obtenidos señalan que la técnica empleada para el aislamiento de virus, es una prueba eficiente que podría reforzar la vigilancia epidemiológica de la FA basada en el diagnóstico etiológico.

### 2. INTRODUCCION

En Colombia el control de la Fiebre Aftosa (FA) está basado en la vigilancia epidemiológica, así como

la movilización y la vacunación de los animales susceptibles. El diagnóstico etiológico se realiza mediante la tipificación, por la técnica de la fijación del complemento, con muestras de epitelio obtenidas de animales enfermos, las cuales se enfrentan a los sueros hiperinmunes de referencia.

El diagnóstico etiológico permite determinar algunas características de los virus, cuyo conocimiento es aplicado en el seguimiento epidemiológico y es la base para el establecimiento de programas de control de la enfermedad.

Mediante técnicas de aislamiento de virus, se ha demostrado la persistencia del virus de FA hasta por varios meses, en la región faríngea de bovinos recuperados de la enfermedad clínica o que estuvieron en contacto con animales enfermos.

El objetivo de este trabajo fue mostrar la utilidad del empleo de la técnica para la recuperación e identificación de virus de la FA, a partir de líquido esofago-faríngeo de bovinos que sufren enfermedades vesiculares y de los cuales no es posible obtener muestras adecuadas de epitelio para las pruebas de diagnóstico por fijación del complemento.

Para establecer una relación de los resultados en casos de aislamiento de virus, se tomaron muestras de sangre de los mismos animales para la determinación de anticuerpos anti VIAA por la prueba de doble difusión en agar.

### 3. REVISION DE LITERATURA

La transmisión de la FA se hace principalmente por medio del contacto entre animales sanos con animales enfermos, especialmente durante la fase febril temprana cuando el virus está presente en la sangre, órganos y excreciones. Varios investigadores han demostrado la persistencia de la infección por virus de

\* Contribución del Programa Nacional de Enfermedades Vesiculares y Programa Cooperativo ICA-USDA. Instituto Colombiano Agropecuario, ICA. Este trabajo fue financiado por el Programa Cooperativo ICA-USDA.

\*\* Respectivamente: Médico Veterinario, Médico Veterinario Ph.D., Médico Veterinario, Médico Veterinario M.S., Director Programa Enfermedades Vesiculares, Médico Veterinario M.S., Microbióloga M.S. Laboratorio de Investigaciones Médicas Veterinarias, LIMV. Apartado Aéreo 29743, Bogotá y Médico Veterinario Arboletes, Antioquia.

la FA en bovinos que sufren la enfermedad, con o sin manifestaciones clínicas, constituyéndose en portadores sanos, los cuales alojan el virus a nivel de la mucosa de la faringe y de la porción proximal del esófago por tiempo variable (1, 7, 10, 11).

El efecto de los portadores como transmisores de virus, no ha sido definido. Experimentalmente, no se ha efectuado la transmisión de la FA a animales susceptibles en cohabitación con animales portadores de virus. Sin embargo, la iniciación de algunas epizootias de la enfermedad en condiciones de campo, sólo podría explicarse por la presencia de portadores sanos (1, 12, 14).

La existencia de los portadores sanos del virus afoso fue establecida definitivamente por Van Bekkum y colaboradores (14), quienes observaron que se podría detectar el virus durante largos períodos de tiempo, en muestras de secreciones de la región faríngea, obtenidas con un colector apropiado.

Otros autores señalaron que animales vacunados puestos en contacto con otros enfermos clínicamente, se podrían convertir en portadores sin mostrar signos clínicos de la enfermedad (11).

El Programa Nacional de Enfermedades Vesiculares del Instituto Colombiano Agropecuario ICA, ha empleado esta técnica para la detección de bovinos portadores de virus en el área libre de FA del Chocó, como parte de la vigilancia de la actividad del virus.

Igualmente, se ha utilizado en bovinos sometidos a cuarentena para detectar los animales portadores de virus y evitar la entrada de la FA a las regiones libres de la enfermedad, o evitar la introducción de cepas exóticas de virus de FA a nuestro medio.

Los animales en los cuales ocurre la multiplicación del virus de la FA, reaccionan al antígeno VIAA de manera positiva y esta condición la mantienen hasta por varios años (3).

## 4. MATERIALES Y METODOS

### 4.1. AISLAMIENTO DE VIRUS.

Las muestras para el aislamiento de virus, consistentes en líquido esofago-faríngeo, se obtuvieron de bovinos existentes en Urabá, en los límites de los departamentos de Antioquia y Córdoba, y con historia de haber sido afectados por una enfermedad vesicular compatible con la FA, durante los años 1977-1978. El material fue tomado utilizando el colector de Probang y depositado en un volumen aproximadamente igual de medio Hank's (Gibco) pH 7.6. Después de su homogenización se congeló en una mezcla de hielo seco y alcohol. Las muestras de LEF se conservaron en congelación durante el envío al laboratorio, utilizando termos con hielo seco.

Los sueros fueron colectados mediante sangrías realizadas simultáneamente con la toma de material esofago-faríngeo.

Las muestras de líquido esofago-faríngeo se descongelaron y se depositaron individualmente en vasos de un homogenizador adicionando tricloro-trifluore-

tano (TTE) en un 60% de su volumen (10). Después de homogenización a alta velocidad por tres minutos, se centrifugó a 7.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se utilizó para inoculación de cultivos celulares, línea BHK<sub>21</sub> (4), con 48 a 72 horas de crecimiento. Los cultivos inoculados se sometieron a incubación a 37°C durante 48 horas y se realizaron tres pasajes seriados. Los cultivos celulares inoculados se examinaron al microscopio para determinar la presencia de efecto citopático (ECP) causado por virus. Los cultivos que presentaron ECP se sometieron a la prueba de fijación del complemento.

### 4.2. IDENTIFICACION DE VIRUS DE FIEBRE AF-TOSA.

La identificación de los virus aislados que produjeron ECP en cultivos celulares, se realizó aplicando la prueba de tipificación por fijación del complemento al 50% (2) con 4 unidades hemolíticas 50% (UHC 50%). Los sueros hiperinmunes utilizados correspondieron a los representativos de los tipos A, O y C de la FA y los tipos New Jersey e Indiana de la estomatitis vesicular.

### 4.3. DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTI-VIAA.

Para la determinación de los anticuerpos anti-VIAA se utilizó la prueba de inmunodifusión doble de Ouchterlony (9), mediante el enfrentamiento de antígeno VIAA (6) y el suero en estudio, con el empleo de gel de agar al 1% en cajas de Petri y perforado con un molde de seis orificios periféricos y un orificio central. La lectura final de las líneas de precipitación se realizó a los cinco días posteriores al montaje (5).

## 5. RESULTADOS

Los resultados obtenidos de los ensayos de aislamiento del virus de FA a partir de muestras de líquido esofago-faríngeo y la detección de anticuerpos anti-VIAA en el suero de los bovinos estudiados, se presenta en la Tabla 1. Las muestras de suero fueron colectadas de los mismos animales de los cuales se tomó muestra de líquido esofago-faríngeo. En algunos casos se recibieron muestras de líquido esofago-faríngeo sin la correspondiente muestra de suero. Los hatos estudiados se agruparon en tres categorías según el número de muestras LEF recibidas, con 1, 2 y 3 o más muestras por hato.

Se procesaron 67 muestras de líquido esofago-faríngeo. Los virus aislados en 17 y 19 de las muestras fueron clasificados como pertenecientes a los tipos A y O de FA respectivamente. En 31 de las muestras no se aisló virus y se informó como prueba biológica negativa (PBN). Se detectó la presencia de virus mediante la observación del efecto citopático producido por virus en los cultivos celulares y se comprobó la ocurrencia de virus de la FA por fijación del complemento.

TABLA 1. Resultados de las pruebas de aislamiento de virus de Fiebre Aftosa de muestras de líquido esofago-faríngeo de bovinos que presentaron enfermedad vesicular. Muestras obtenidas en tiempo variable después de presentados los síntomas clínicos.

Hatos muestreados	Número muestras*/hato	Número de muestras	Aislamiento de Virus			VIAA	
			Tipo A	Tipo O	PBN	Número de muestras	Resultados positivos
8	3 o más	28	8	8	12	23	19
15	2	30	7	11	12	13	13
9	1	9	2	PBN	7	4	3
32		67	17	19	31	40	35

PBN: Prueba Biológica Negativa.

\* Número de muestras de líquido esofago-faríngeo (LEF) por ható.

De un total de 40 muestras recibidas se encontraron 35 sueros reactivos positivos al VIAA. Los sueros que contenían anticuerpos anti-VIAA presentaron líneas de precipitación bien definidas frente al antígeno VIAA utilizado.

## 6. DISCUSION

De 32 hatos en cuyos animales se había presentado una enfermedad vesicular se tomaron 19, en los cuales de un total de 67 muestras se aislaron 36 con virus de FA.

Al comparar el número de muestras de líquido esofago-faríngeo por ható, con el número de hatos con diagnóstico positivo de FA, se observó una relación directa. Cuando se tuvo una muestra por ható, 2 de 9 hatos fueron positivos por aislamiento de virus; en las otras dos categorías con 2 y 3 ó más muestras por ható, resultaron positivos 11 de 15 y 6 de 8, respectivamente. Se encontró que muestras de dos animales como mínimo por cada foco de la enfermedad permitiría determinar el diagnóstico positivo en proporción alta de los casos.

Los casos con diagnósticos positivos podrían aumentar si se repite el muestreo con distintos intervalos de tiempo, después de la presentación de la enfermedad. Es conveniente destacar que en este trabajo solamente se realizó un muestreo a uno o varios animales por ható después de haber presentado síntomas de una enfermedad vesicular.

El hallazgo de muestras de LEF que no permitieron aislamiento de virus, existiendo antecedentes de enfermedad vesicular, podría indicar que en el momento del muestreo el contenido de virus de FA en las secreciones de los animales era bajo; se ha descrito que la cantidad de virus de la FA presente en el líquido esofago-faríngeo es fluctuante y que puede llegar a niveles no detectables por los métodos de aislamiento empleados (13). Además, no se debe descartar la posible actividad de otros virus, para los cuales no se ha demostrado el estado de portador, o que el procedimiento que se utilizó para el aislamiento de virus de FA en el presente estudio, no es aplicable a otros virus.

Los animales de los cuales se recuperó virus de la FA fueron hallados reactivos positivos al VIAA en las pruebas de precipitación en agar realizadas con los sueros de esos animales. Estos resultados están de acuerdo con el concepto de que los animales que multiplican el virus de la FA, se vuelven VIAA positivos.

Se debe anotar que una limitante de este procedimiento es la necesidad de congelar las muestras a bajas temperaturas para garantizar la viabilidad del virus presente.

Este trabajo permitió acumular una serie de experiencias, tales como el procedimiento utilizado para la recuperación de virus de (FA) en muestras de líquido esofago-faríngeo, eficiente por el alto porcentaje de positividad obtenido y que apoyada con el diagnóstico etiológico podría constituirse en un método práctico que permita reforzar la actividad de vigilancia epidemiológica de la FA.

Este procedimiento podría contribuir en la detección e identificación de la presencia de virus de la FA en áreas en proceso de liberación de la enfermedad, como también para la realización de ensayos de caracterización de virus de FA presentes en portadores sanos.

## 7. CONCLUSIONES

Se obtuvo el aislamiento de virus de la FA, a partir de muestras de LEF de bovinos en la fase de convalescencia después de sufrir una enfermedad vesicular, en los cuales no fue posible conseguir muestras de epitelio para el diagnóstico etiológico por fijación del complemento.

El análisis de los resultados de las pruebas de aislamiento de virus FA, indica la necesidad de contar con varias muestras de LEF por ható para tener mayor posibilidad de conseguir el diagnóstico por este procedimiento.

Se debe advertir la posible actividad de otros virus causantes de enfermedades vesiculares, que pueden ser o no detectables por el procedimiento expuesto en

este trabajo, obteniéndose un resultado negativo al aislamiento.

El procedimiento seguido podría constituirse en un método práctico que permita reforzar la actividad de vigilancia epidemiológica de la FA.

## 8. SUMMARY

### Use of oesophago-pharyngeal liquid samples for diagnosis in foot and mouth disease.

The etiological diagnosis of foot-and-mouth disease (FMD) is made by serotype identification by the method of complement fixation on samples of epithelium obtained from sick animals.

In the Laboratorio Nacional de Investigaciones Médico Veterinarias-LIMV, of Instituto Colombiano Agropecuario it was conducted a research on the uti-

lity of the technique of virus isolation from oesophago-pharyngeal (OP) samples for the recovery of FMD virus in outbreaks of vesicular disease when the diagnostic test by complement fixation on epithelial samples was not made.

OP samples from convalescent bovines were taken up to two months after clinical symptoms of a vesicular disease were observed.

Foot-and-mouth disease virus was isolated in 19 of 32 herds studied. The viruses were classified as type A and O.

Antibodies against VIAA antigen (virus infection associated antigen) were determined in serum from bovines studied for virus isolation.

The results indicated that the procedure used for virus isolation is efficient and could reinforce the epidemiological surveillance of foot and mouth disease based on the diagnosis of the etiological agent.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. BURROWS, R. Studies on the carrier state of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus. *Journal of Hygiene (Inglaterra)* v. 64, p. 81-90. 1966.
2. CAMARGO, F.; EICHHORN, E. A.; LEVINE, J. M.; TELLES, A. A complement fixation technique for foot-and-mouth disease and vesicular stomatitis. *En: Annual Meeting of the American Veterinary Medical Association, 87th., Miami Beach, Florida, 1950. Proceedings. Chicago, American Veterinary Medical Association, 1950. p. 207-211.*
3. COWAN, K. M.; GRAVES, J. H. A third antigenic component associated with foot-and-mouth disease infection. *Virology (Estados Unidos)* v. 30, p. 528-540. 1966.
4. EUGENIO, B. C.; ROCHA, J.; CARDONA, U.; VELANDIA, J.; GUTIERREZ, A. Cultivos celulares en el aislamiento de virus de enfermedades vesiculares. *Revista ICA (Colombia)* v. 8, p. 31-36. 1973.
5. INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO. PROGRAMA ENFERMEDADES VESICULARES. BOGOTA (COLOMBIA). Manual de técnicas del Programa Nacional de Enfermedades Vesiculares. Bogotá, ICA, 1978. 251 p.
6. LOBO, C. A.; GUTIERREZ, A.; MARIÑO, O. C. Evaluation d'anticorps induits par infection par le virus de la Fievre Aphteuse. I. Preparation de l'antigene VIA et mise en oeuvre dans des épreuves sur le terrain. *Bulletin de l'office International des Epizooties (Francia)* v. 82 no. 3-4, p. 287-303.
7. -----; HANSON, R. P.; GUTIERREZ, A.; BELTRAN, L. E. Serological detection of natural foot-and-mouth disease infection in cattle and pigs. *Bulletin de l'office International des Epizooties (Francia)* v. 35, p. 1.075-1.104. 1976.
8. McVICAR, J. W.; SUTTMOLLER, P. Foot and mouth disease; the agar gel diffusion precipitin test for antibody to virus infection associated (VIA) antigen as a tool for epizootiologic surveys. *American Journal of Epidemiology (Estados Unidos)* v. 92, p. 273-278. 1970.
9. OUCHTERLONY, O. Handbook of immunodiffusion and immunoelectrophoresis. Michigan, Ann. Arbor, 1968. 215 p.
10. SUTTMOLLER, P.; COTTRAL, G. E. Improved techniques for the detection of foot-and-mouth disease virus in carrier cattle. *Archiv für die gesamte Virusforschung (Austria)* v. 21, p. 170-177. 1967.
11. -----; GAGGERO, G. A. Foot and mouth disease carriers. *Veterinary Record (Inglaterra)* p. 968-969. 1965.
12. -----; McVIGAR, J. W. The epizootiological importance of foot-and-mouth disease carriers. II. Exposure of pigs to bovine carriers. *Archiv für die gesamte virusforschung (Austria)* v. 37, p. 78-84. 1972.
13. -----; -----; COTTRAL, G. E. Foot-and-mouth disease carrier studies at the Plum Island Animal Disease Laboratory; report of the Meeting of the Research Group of the Standing Technical Committee, September 1967. Roma, FAO, 1968. p. 106-112.
14. VAN BEKKUM, J. C.; FRENKEL, H. S.; FREDERIKS, H. J.; FRANKEL, S. Observations on carrier state of cattle exposed to food-and-mouth disease virus. *Bulletin de l'office International des Epizooties (Francia)* v. 51, p. 930-934. 1959.