

METODOLOGIA DE LA CLASIFICACION Y CARACTERIZACION
DE LOS VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EN COLOMBIA-

Jairo R. Rocha R.
Astrid G. de Gerardino
Fernando Rueda A.**
César A. Lobo A.***
Jaime Estupiñán A.**

1. INTRODUCCION

Entre las actividades del Programa Nacional de Enfermedades Vesiculares del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), ocupa un lugar significativo la identificación y estudio de cepas del virus de la Fiebre Aftosa actuantes en el campo colombiano con el objeto de dar recomendaciones precisas sobre las cepas que se deben utilizar para la elaboración de vacunas.

La clasificación de los virus de Fiebre Aftosa requiere la aplicación de estudios serológicos e inmunológicos, los cuales consisten en el enfrentamiento de las nuevas cepas de campo con las cepas de referencia nacional y suramericanas y como un principio básico en la adecuada profilaxis, frente a las cepas de vacuna.

Los estudios aplicados comprenden los siguientes aspectos: 1. Clasificación de los virus dentro de los tipos y subtipos existentes o dentro de un nuevo subtipo de acuerdo a su importancia epidemiológica; 2. Caracterización del material genético en cuanto a la estabilidad y variabilidad de sus caracteres originales; 3. Conocimiento de la cobertura inmunológica como base funda-

* Laboratorio de Investigaciones Médicas Veterinarias (LIMV). Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). Apartado aéreo 29743, Bogotá.

** Programa Nacional de Enfermedades Vesiculares

*** Director División Ciencias Veterinarias.

mental en el estudio de caracterización de nuevas cepas vacunales.

De manera adicional, se caracterizan los virus en cuanto a su adaptación a los cultivos celulares, sensibilidad a temperatura y pH, curva de crecimiento, composición, distribución, forma y tamaño de placas y tiempo óptimo de inactivación.

En los estudios especiales se aplican técnicas de concentración, purificación y obtención de las distintas partículas antigénicas, principalmente la fracción 140S que permite cuantificar y relacionar los virus de una manera exacta (10). Hasta el presente, en diferentes laboratorios de investigación en Fiebre Aftosa se ha tratado de correlacionar los parámetros ya mencionados para estimar la inmunogenicidad de un virus sin lograr una respuesta definitiva; por lo tanto, ninguno de ellos provee por sí solo una indicación absoluta de la calidad inmunógena del antígeno vacunal.

En el presente trabajo se hace una descripción de la metodología del Programa Nacional de Enfermedades Vesiculares para el estudio de los virus de la Fiebre Aftosa y se incluyen ejemplos de resultados obtenidos con cepas de campo. Los procedimientos se describen detalladamente en el Manual de Técnicas del Programa de Enfermedades Vesiculares del ICA (9).

2. CLASIFICACION DE LAS CEPAS DE CAMPO

2.1 Estudios serológicos

Se siguen los lineamientos básicos de la técnica de fijación de complemento de Camargo y Col (3) empleada por el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. La figura 1 presenta el esquema de la metodología aplicada en los estudios serológicos para clasificar y determinar las relaciones antigénicas existentes entre las diferentes cepas virales.

A partir del epitelio de bovinos se identifica por prueba de tipificación, el virus dentro de los dos únicos tipos existentes en el país A y O y si corresponde a uno de éstos se somete a la prueba de subtipificación tratando de utilizar el material original de la muestra para obtener un conocimiento fiel del virus actuante en el campo. Si éste no posee una concentración óptima de antígeno se recurre a su adaptación en cultivo celular.

La figura 2 esquematiza a título de ejemplo, el estudio serológico para identificar y caracterizar dos cepas virales representativas del subtipo A-27 correspondientes a la cepa original A-27-1967 y a la cepa utilizada actualmente en vacuna, A-27-1975, comparativamente con una cepa representativa del nuevo virus identificado como A-Sabana-1974.

Cuando las cepas en estudio para los dos tipos (A y O) difieren considerablemente del subtipo dominante en el campo, se deberá realizar la prueba de relación unilateral (r_1), la cual consiste en enfrentar el antígeno en estudio a los sueros hiperinmunes del subtipo de referencia y al suero de la cepa vacunal. Un valor r_1 en fijación del complemento igual o mayor (\geq) a 0.40 da una suficiente confiabilidad en la capacidad protectora de la cepa vacunal; sin embargo, si las características epidemiológicas lo exigen, por constituir un problema significativo de campo, se deben realizar las pruebas inmunológicas para confirmar los resultados del valor r_1 . Los valores r_1 inferiores a 0.40 obligan a mayores estudios serológicos e inmunológicos para una clasificación definitiva (7).

La figura 3 presenta los valores de las relaciones unilaterales de tres cepas (A27-1967, A27-1975 y A Sabana-1974) de referencia y representativas de dos subtipos colombianos enfrentadas a sus virus homólogos y heterólogos. Las

dos cepas del subtipo A27 se relacionan antigénicamente con un valor mayor () a 0.40, mientras que el subtipo A Sabana-1974 muestra poca relación antigénica frente a los dos antisueros del subtipo A27.

La clasificación serológica definitiva de los virus en estudio, se basa en la prueba de relación bilateral (R) que permite establecer con precisión la identificación dentro de los subtipos existentes o su posible diferenciación como un nuevo subtipo.

La figura 4 contempla los valores obtenidos en la aplicación de la prueba bilateral de las cepas A27-1967 y 1975 y A Sabana 1974. De acuerdo a los términos de la tabla internacional para la clasificación de los virus de campo y los valores de 0.25 en ambas direcciones propuestos por Pereira (13), la cepa viral A Sabana-1974 se comporta como un subtipo diferente al virus A27 de referencia y vacunal. En este caso fue necesario incorporar la cepa de A Sabana a la vacuna para controlar los problemas de campo.

En la figura 5 se presentan los valores bilaterales obtenidos con las cepas O₁Colombia/74, O₁Tolima/77 y O₁Cundinamarca/77.

2.2 Estudios inmunológicos

Se realizan con el fin de establecer si las cepas vacunales confieren una adecuada protección inmunitaria, que elimine los riesgos de presentación de grandes epidemias cuando se presentan nuevos subtipos o cepas de alto significado epidemiológico.

La figura 6 esquematiza las pruebas utilizadas con mayor frecuencia en la clasificación inmunológica de los virus de la Fiebre Aftosa. La prueba de

neutralización se aplica usando sueros de bovinos vacunados y sangrados en fechas convenientes para establecer las relaciones unilaterales y bilaterales, utilizándose generalmente la prueba de microtécnica en cultivos celulares (12). Igualmente se aplica la prueba de seroprotección en ratones lactantes como un método sustitutivo de las técnicas antes mencionadas (6). La prueba de inmunidad es realizada en cobayos vacunados y descargados a los 21 días con las cepas de problemas significativos de campo según el método de Lucam (11).

3. ESTUDIOS ESPECIALES DE CARACTERIZACION DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA

Las cepas de campo que por su importancia epidemiológica requieren de estudios especiales como posibles cepas vacunales se someten al proceso de caracterización indicado en la figura 7.

La preparación de suspensiones del virus aftoso concentradas con polietilenglicol (PEG-PM 6.000) y la separación de las partículas antigénicas en gradientes de cloruro de cesio han sido descritas en varios trabajos, concluyéndose que su determinación por diversos métodos hace posible estimar el grado de antigenicidad de la suspensión cruda y lograr un ajuste respecto al contenido de dichas partículas (10, 14).

Se han realizado estudios de subtipificación de la fracción 140S de los virus representativos de subtipos actuantes y cepas vacunales los cuales indican exactamente el porcentaje de fijación del complemento con los distintos sueros internacionales de referencia y los nacionales representativos de los virus actuantes en el país (figura 8).

Los estudios de relación bilateral con la partícula 140S dan una idea más precisa del parentesco serológico de las cepas en estudio, teniendo en cuenta que esta fracción antigénica es específica de tipo y subtipo (5) (figura 9).

De manera adicional, a los virus adaptados al sistema de cultivos celulares se les establece la curva de crecimiento para obtener el tiempo óptimo de cultivo con base en los títulos de fijación del complemento, infecciosidad y concentración de proteína vírica, a diferentes horas según lo indica la figura 10.

Igualmente se realizan estudios de inactivación del virus con agentes alquilantes tales como la acetiletileneimina (AEI) por el método de inactivación de "cuatro puntos" (8), la cual mediante la línea de regresión indica la inactivación total del virus en un tiempo determinado (figura 11).

Finalmente se utilizan las técnicas de formación de placas y clonaje del virus en cultivos celulares para determinar la distribución y tamaño de las placas así como también sus características antigénicas y de selección de poblaciones (1, 4).

Es así como actualmente se está tratando de correlacionar la inmunidad conferida por el virus y el tamaño de sus placas (figura 12).

Finalmente, vale la pena anotar que para llegar a desarrollar y ejecutar el esquema de trabajo esbozado en la presente descripción se necesitaron muchos años de continuo esfuerzo para lograr preparar y entrenar al personal técnico que actualmente presta sus servicios en el Programa de Enfermedades Vesiculares en el LIMV, el cual ha aportado valiosas contribuciones en as-

pectos tales como un mejor conocimiento de la epidemiología de las enfermedades vesiculares en Colombia, mejoramiento de los sistemas de inmunización a través de la experimentación de nuevas vacunas evaluación de la efectividad de las medidas contempladas dentro de la campaña nacional de control de la fiebre aftosa por determinaciones masivas de niveles de anticuerpos protectivos frente a los diferentes subtipos actuantes en el campo vigilancia de áreas libres de infección aftosa mediante el reconocimiento de actividad viral y presencia de portadores sanos etc.

De singular importancia y directamente relacionado con la presente descripción constituye el estudio permanente y sistemático de los virus de campo con lo cual se logra seleccionar cepas adecuadas para ser utilizadas en la elaboración de vacunas antiaftosas.