

TRABAJOS TRADUCIDOS

EL VIRUS AFTOSO. ESTUDIOS SOBRE LA VARIABILIDAD ANTIGÉNICA * **

E. MICHELSEN

Capítulo 1º—Entre los tres tipos de virus aftoso no han sido reveladas otras diferencias constantes que las que pueden atribuirse a sus propiedades antigénicas.

Los resultados de dos series de inoculaciones, ejecutadas con distintos intervalos en los locales de experiencias de la isla de Lindholm (de enero de 1940 a junio de 1947), muestran que 14.910 vacas inoculadas con el virus tipo O han dado un resultado medio de 57,6 gramos de trozos de aftas y de linfa virulenta por animal, mientras que 15.513 vacas inoculadas con el tipo A han dado, de la misma manera, 58,2 gramos por animal.

Las inoculaciones de pasaje con estos tipos han sido acompañadas, en grado equivalente, de oscilaciones en la virulencia cotidiana.

Como la actual ausencia de una terminología uniforme de los diferentes tipos de virus causa a menudo errores graves, proponemos que la Oficina Internacional de Epizootias, por ejemplo, someta este asunto a una discusión definitiva. Una manera cómoda de obviar las dificultades consistiría en designar los tipos por cifras.

Capítulo 2º—La inmunidad cruzada debida a un tipo heterólogo, no sólo se hace sentir en las experiencias de inmunidad sobre el ganado, sino que, contrariamente a lo que antes se admitía, puede ser igualmente comprobada en las experiencias sobre cobayos con un virus adaptado a este animal. Tres o cuatro semanas después de la inoculación de un virus adaptado a los cobayos, la inmunidad de los animales es, a menudo, de naturaleza tan polivalente, que puede ser difícil obtener resultados netos de diferenciación, luego de una reinfeción con los virus standard. Este fenómeno es, desde luego, muy molesto, cuando animales inmunizados deben servir para la determinación de los tipos.

El parentesco inmunológico entre los tipos parece ser íntimo. Resultados experimentales indican así que no sólo la acción del virus homólogo, sino también la acción de los virus heterólogos, puede aumentar, algunas veces, el título de anticuerpos de un organismo inmunizado.

* Comunicación de la Estación Nacional Experimental Veterinaria de las Enfermedades a Virus. Lindholm, 1949.

** Traducción del resumen del autor, por el Dr. Nelson Magallanes.

Está igualmente confirmado, por nuestras experiencias, que el tipo O domina en cierto grado, cuando es mezclado a los otros, para someterlo a pasajes inmediatos. Tal dominio parece, no obstante, menos categórico de lo que habitualmente se supone. En un solo caso al autor le ha sido posible inocular una mezcla de los tipos O y A durante unos 15 pasajes sobre cobayos, sin que el tipo A fuese eliminado.

Se han efectuado también algunas experiencias por medio de inoculaciones simultáneas, o espaciadas en 24 horas, a efecto de saber si los tipos de virus interfieren en un mismo organismo (cobayo). Los resultados de una experiencia ejecutada cuantitativamente han probado que la interferencia tenía lugar. En la interferencia OA, el tipo O parece dominar; en las interferencias OC y AC, el poder antigénico del tipo C era suprimido en los dos casos. Es de toda evidencia que este problema es del mayor interés para la preparación de vacunas polivalentes y de sueros inmunizantes.

Capítulo 3º— Como las experiencias de diferenciación de los tipos —efectuadas por inoculaciones sobre animales cuya inmunidad es conocida— son a menudo acompañadas de inexactitudes considerables (modo de reacción individual, efecto de inmunidad cruzada debida a un tipo heterólogo, etc.) y como son, además, muy costosas y exigen mucho tiempo, el autor ha procurado mejorar la técnica empleada hasta ahora.

En este trabajo él ha comprobado que la reacción de fijación de la alexina puede emplearse con gran seguridad, si el antígeno utilizado para la determinación de los tipos es tratado con tierra de infusorios. En el curso de este tratamiento, la acción de los antígenos de origen bovino, a menudo muy anti-complementarios, es eliminada. Mediante la aplicación de este método ha sido posible determinar todos los tipos de antígenos que en otras circunstancias no podían ser diferenciados por la desviación del complemento.

Experiencias comparativas para la diferenciación de los tipos, hechas por una parte utilizando el cobayo y por otra mediante la fijación de la alexina, han demostrado que los resultados provenientes de esta última técnica, contrariamente a los ensayos sobre los animales, se manifiestan siempre de manera neta y uniforme. A esto se agrega, todavía, que ciertos virus, caracterizados por una estructura antigénica compleja (virus denominados “variantes intermedias”), han podido siempre ser diferenciadas —tanto cuantitativa como cualitativamente— por el empleo de la fijación de la alexina, pero no en experiencias sobre los animales.

Hasta el momento no se ha logrado determinar el tipo de los sueros inmunes de bovinos en las experiencias en que se recurrió a la fijación de la alexina. El método ordinario de diferenciación, por inoculación del antisuero bovino, ha consistido en efectuar, sobre cobayos, inoculaciones simultáneas de suero y virus. Como consecuencia de una acción de proteína heteróloga, se observa con frecuencia, durante estas inoculaciones, una mortalidad del 15 al 20 % (a veces del 70 al 90 %), al mismo tiempo que los animales sobrevivientes reaccionan de una manera más o menos indolente a causa de su estado de intoxicación general. Obvio es decir que tales circunstancias son muy perturbadoras para la apreciación de la marcha de la experiencia y contribuyen a graves errores de observación.

Experiencias sobre la toxicidad propia de los sueros bovinos demostraron que ella era suprimida si se empleaban las globulinas a las que están ligadas los

anticuerpos; por el contrario, esta toxicidad existía si se utilizaba la fracción albúmina. Ensayos comparativos entre la fracción globulina y el suero total no precipitado, no han podido demostrar en los hechos ninguna diferencia de título. La precipitación produce, pues, el efecto de desintoxicación deseado, al tiempo que favorece la concentración de anticuerpos.

No obstante las mejoras ya obtenidas, no pudiendo llenar el método antes expuesto las condiciones exigidas, hemos ensayado utilizar suero inmunizante de ganado, en experiencias de hemoaglutinación. Ensayos concernientes a la facultad del virus aftoso de provocar la aglutinación de los glóbulos rojos de rata, han dado resultado utilizando el virus de pasaje de cobayo proveniente de aftas primarias de 24 horas. La aglutinación es "específica" a pH de alrededor de 6, y su tasa oscila entre 1:80 y 1:640. Como la mayor parte de los sueros ejercen cierto efecto aglutinante sobre los glóbulos de rata (título de 1:20 a 1:40) ha sido necesario tratar los sueros por contacto de unas 12 horas con glóbulos de rata. Con este procedimiento el efecto aglutinante del suero ha sido totalmente eliminado en todos los casos estudiados.

Ensayos de aglutinación con virus + suero, han dado varias veces los siguientes resultados: virus + suero homólogo, impiden completamente la aglutinación, mientras que la adición al virus de un suero heterólogo no inhibe sino las diluciones más extendidas de virus.

No ha sido probado, todavía, que el método pueda ser aplicado en la práctica a experiencias en serie con sueros. No obstante, la experiencia adquirida por el empleo de suero y de virus standards, permite esperar felices realizaciones en esta materia.

Luego del tratamiento con glóbulos rojos de rata, muchos sueros manifiestan propiedades inhibitoras no específicas. Con tales sueros, la diferenciación de tipos no ha sido lograda. Se han iniciado experiencias sobre este factor inhibitor.

Capítulo 4º—Según el autor, existe una diferencia fundamental, que no ha sido estudiada hasta ahora, entre dos grupos de virus aftosos, designados en conjunto en la literatura como "variantes". De un lado se encuentran las variantes que pueden ser relacionadas evidentemente a uno de los tipos principales, pero que están, sin embargo, en estado de romper la inmunidad determinada por el tipo standard en cuestión. Esta formación de variantes ha podido producirse según las modalidades descriptas en la literatura respecto del virus del mosaico del tabaco y del virus de la influenza, es decir, sobre la base de una modificación de la estructura del ácido aminado del virus. En el mismo grupo es posible comprender igualmente las variantes que no pueden ser relacionadas a uno solo de los tipos principales. Es posible que tales variantes se hayan producido como consecuencia de mutación.

Por otro lado, se agrupan todas las variantes llamadas "intermediarias", que, por oposición a las mencionadas precedentemente, pueden ser eliminadas por la aplicación de una vacuna preparada con los tres tipos standards. Si una vacuna preparada sobre la base de una mezcla de los virus standards O y A puede proteger contra una variante OA, por ejemplo, se puede lógicamente deducir que la variante OA debe ser considerada como un virus conteniendo dos antígenos standards.

Como estas variantes parecen producirse a menudo (y, con frecuencia también, disociarse de nuevo después de su formación) durante la inoculación

de pasaje sobre los cobayos, es preciso pensar en un fenómeno de modificación más bien que en un fenómeno de mutación. Todo virus parece, en efecto, contener por lo menos tres antígenos y la oscilación antigénica parece ser de un grado tal, que hace suponer que la tesis de tres tipos principales, netamente limitada desde el punto de vista teórico, es debida a una ficción, pese al valor atribuido a esta ficción y a su aplicación práctica.

La literatura sobre las variantes de los tipos de virus aftoso es estudiada y discutida. Basándose en los resultados existentes, se puede establecer que en el curso de cierto número de pasajes sobre el cobayo algunas variantes de virus bovino se identifican a menudo con uno de los tipos standard y que tipos "puros" parecen a veces cambiar de carácter durante los pasajes por cobayos. En el futuro, es necesario, pues, considerar como falla de carácter técnico la utilización de cobayos para las experiencias sobre variantes de virus.

Consideraciones teóricas sobre la estructura de las "variantes intermedias", teniendo por base los resultados obtenidos en la práctica de inoculación con tales variantes sobre vacas inmunizadas, han justificado la concepción siguiente: El virus, de estructura compleja, origina la formación de un anticuerpo de estructura compleja y puede reaccionar no sólo con el anticuerpo complejo, sino también con otros anticuerpos según leyes cuantitativas simples. Así un virus C^{oa} tiene la posibilidad de reaccionar no sólo con el anticuerpo C^{oa} sino también con el anticuerpo C, en razón de la masa C que predomina en el virus C^{oa} . El anticuerpo C^{oa} tiene posibilidades de reaccionar no sólo con el virus C^{oa} sino también con los virus C, O y A, pues le queda siempre un excedente de propiedades y continuamente —durante la reacción con estos virus— será influenciado por una gran masa de los virus A, C u O, respectivamente. Si se inocula un virus, por ejemplo el antes mencionado (C^{oa}) en organismos inmunizados, se producen a menudo fenómenos de interferencia. Animales no inmunizados tornanse frecuentemente, después de la inoculación del virus C^{oa} , refractarios a los COA; mientras que vacas inmunizadas contra el C, por ejemplo, no son, después de la inoculación del virus C^{oa} , refractarias más que al C, pues el anticuerpo C, presente en este organismo, neutraliza todo el complejo C^{oa} , no ocasionando así inmunidad continua más que contra el C.

Experiencias de inoculación y de fijación de la alexina con un virus francés, han demostrado que este es un virus C^o . Ensayos de neutralización "in vitro" con este virus parecen confirmar la teoría precitada. Parece muy interesante que la estructura antigénica de este virus pueda cambiar de un pasaje a otro. Debe pues sospecharse que la supresión de un virus semejante, podría ser realizada por el empleo de una vacuna O + C, en lugar de una vacuna C^o . Pasado por cobayos, el virus C^o en cuestión, ha cambiado siempre su carácter antigénico del tipo C^o al tipo O.

Entre todos los virus examinados en la práctica por el autor, uno solo ha demostrado ser una variante de tipo (variante A). Este virus procedía de un feto diagnosticado en enero de 1945 en O. Estrup (Distrito de Hjørring). Mientras que ha sido imposible demostrar las propiedades de variante del virus "O. Estrup" por experiencias de fijación de la alexina, experiencias con este virus sobre vacas inmunizadas contra el A, dieron resultados que revelan la existencia de una diferencia antigénica.

Consideraciones sobre las reacciones de inmunidad del virus C^o ya mencionado, conducen a suponer que el antígeno que neutraliza el anticuerpo "in vivo" y el antígeno de fijación de la alexina no son idénticos. El antígeno de

fijación de la alexina parece poder ser clasificado con la designación de "S. S. S".

De acuerdo con la teoría que considera el virus aftoso como una proteína muerta, debiendo ser sintetizada en el organismo, el autor emite la hipótesis siguiente: Es necesario suponer que es en un momento relativamente tardío que la partícula de virus origina la formación de anticuerpos, dado que sus anticuerpos están en estado de neutralizar la partícula de virus ya sintetizada. Durante el lapso que va del comienzo al fin de esta síntesis, hay, sin embargo, lugar a creer que se produce cierto efecto antigénico; y aun mismo sería justificado suponer que tal función antigénica precoz estaría en relación con detalles estructurales que en la partícula de virus sintetizada hacen cuerpo con el complejo entero. Suponiendo que una parte de la presencia y de la naturaleza de los antígenos "solubles" pueda ser explicada en base a tal "partus praematurus", no parece inverosímil que una estructura de virus CO, por ejemplo, pueda formar, en un periodo inicial, antígenos C y O "solubles", pero que, más tarde, no ocasione más que la formación de un anticuerpo complejo neutralizando el virus.

Capítulo 5° — Durante el trabajo continuado de inoculaciones de pasaje con los tipos standards, no se han evidenciado modificaciones antigénicas. En un caso en el que un virus A, en su 45° pasaje, parecía haber cambiado su carácter en tipo O, ha sido probado que la causa era una contaminación por el virus O en cuestión.

Se subraya que una disciplina rigurosa es indispensable, si se desea evitar la contaminación de los virus puros por tipos de virus heterólogos, durante las inoculaciones de pasaje. El modo de operación utilizado en la isla de Lindholm, en esas circunstancias, es descrito detalladamente.

Una contaminación bacteriana de los virus de pasaje, observada a menudo en la isla de Lindholm, ha podido ser eliminada siempre después de una hora de tratamiento del virus con la cloramina al 1%. Este tratamiento no provoca ningún efecto destructor sobre el virus, antes de las 72 horas.

Capítulo 6° — En base a la hipótesis según la cual de un organismo excretor de virus puede ser eliminado un virus diferente —del punto de vista antigénico— de aquel que infecta al animal en cuestión, se han efectuado las experiencias siguientes:

Se han extraído los órganos de 321 cobayos inoculados con el virus (de 7 a 102 días después de la infección) y el virus eventual ha sido concentrado según el método descrito por Pyl (precipitación por medio de la acetona). Solamente en dos casos ha sido comprobada la existencia de virus en el organismo. Los cobayos infectados habían recibido inoculaciones virulentas 22 y 30 días, respectivamente, antes de la experiencia. En ninguno de estos casos el virus tenía una estructura antigénica modificada.

Ciertas dudas en la apreciación de tales comprobaciones no puede, sin embargo, ser eliminada, dada la eventualidad —siempre presente en un laboratorio de investigaciones sobre fiebre aftosa— de una contaminación secundaria.

Un examen de 179 muestras de orina, recogidas a intervalos que variaban de 10 a 50 días después de la infección, sobre un total de 44 vacas, no ha revelado virus en ningún caso. Antes de la experiencia definitiva, la orina fué tratada con carbón, a fin de concentrar las pequeñas cantidades eventual-mente presentes.

Capítulo 7º— Con el fin de estudiar el efecto producido por los rayos X sobre la constancia del valor antigénico, se realizaron dos experiencias. Las dosis de rayos empleadas eran de 5.000 a 500.000 r. En numerosos casos, los virus sometidos a la radiación habían sido en parte despojados de las proteínas que contenían, por pasaje previo a través de un cambiador de iones en forma de columna o por precipitación con alcohol metílico.

En un solo caso ha podido comprobarse una modificación antigénica aparente de virus C (variante C1). La dosis de radiación era de 100.000 r. Después de tres pasajes sobre cobayos, el virus que había sido expuesto a los rayos X había vuelto a ser idéntico al virus standard C.

En tres casos, después de la irradiación fué demostrado un aumento neto de virulencia (aumento de título). Mismo en los casos en que el título se encontraba idéntico, antes y después de la irradiación, el virus irradiado parecía ocasionar enfermedades a curso más maligno que las provocadas por un virus no sometido a los rayos X.

Capítulo 8º— Con respecto a la desecación del virus, tres casos han relevado una modificación antigénica del virus A de cobayos. La desecación había sido operada mediante una mezcla frigorífica, compuesta de alcohol etílico y de nieve carbónica a $\div 80^{\circ}$ C. Los virus desecados se mostraban capaces de vencer la inmunidad determinada por el virus inicial no desecado (variante A).