

DIAGNOSTICO DE LA CEPA EVF. COMO VIRUS DE LA ESTOMATITIS VESICULOSA (1)

por H. ALMANZA REYES,
Médico Veterinario.

INTRODUCCION

El presente trabajo tiene como objetivo el de aclarar uno de los problemas que encierra en nuestro país la Estomatitis Vesiculosa; con él queda plenamente demostrado que la cepa sometida a estudio pertenece a la especie del virus filtrante de dicha entidad; además se hacen algunas anotaciones con respecto a la mutación que sufre de epiteliotropo a neurotropo, como también de la mutación inversa de neurotropo a epiteliotropo.

Se ha designado la fuente de virus usada con el nombre de cepa EVF., para aclarar que se trata de un material de estomatitis vesiculosa procedente de Florida, Valle.

En la presentación del trabajo se ha seguido una línea de exposición encaminada a cubrir los campos que limitan estrechamente con el diagnóstico diferencial, sin intervenir en nada con la prevención o el tratamiento; en cuanto a la sintomatología se anotan los datos observados por el doctor Rafael V. Reyes en la epizootia del Valle, en 1943, dándoles primacía por su exactitud como por la variación que ellos tienen en algunos puntos, con los que los autores extranjeros traen para esta enfermedad.

Aclaremos que este estudio sólo se trabajó con una fuente, y que para excluir totalmente las otras dos enfermedades que se tratan en el presente trabajo, serían necesarios posteriores esfuerzos en

el mismo sentido hasta cubrir todos los campos, de manera de poder hablar con entera seguridad.

HISTORIA

La enfermedad fue primero observada en 1884 en Suráfrica por Hutecheon y en 1898 en el mismo lugar por Theiler. Durante la primera guerra mundial fue llevada a Europa con los caballos de las fuerzas expedicionarias canadienses y americanas, siendo constatada en Francia por Jacoulet, en Italia por Mori y en Inglaterra por Gregg. Si existía o no en Europa antes de 1914 no se sabe bien; después de la conflagración desaparece la estomatitis vesiculosa de Europa. En los Estados Unidos, según J. R. Mohler, se la observó ocasionalmente antes de 1916 (2). En septiembre de este año se hizo prevalente en Nebraska, South Dakota, Colorado y Wyoming; presentándose primero en una estación de remonta entre caballos y mulas que habían sido concentrados para enviarlos a Europa con destino a los ejércitos francés e inglés durante el primer conflicto mundial. La enfermedad pronto estalló en Francia en estos mismos animales, que se suponen algunos fueron llevados estando en período de incubación (?). Posteriormente se han presentado epizootias en 1925 en New Jersey; en Virginia y West Virginia en 1934

(1) Tesis de grado.

y en 1935; en South Dakota y Minnesota y Wisconsin en 1937; estos brotes han desaparecido sin ninguna medida preventiva.

En Colombia la estomatitis vesiculosa hizo su aparición hace más de 25 años. De acuerdo con datos existentes en los archivos del Departamento de Ganadería y gentilmente suministrados por el doctor Rafael V. Reyes, antiguo jefe de la Sección de Sanidad, podríamos trazar la historia de la enfermedad, siguiendo una línea cronológica, en la siguiente forma:

- 1919: en bovinos, por J. Velásquez Q., en Antioquia.
- 1929: en equinos y bovinos, R. V. Reyes, en el Huila.
- 1930-1931: en equinos y bovinos, Arenas, en el Huila.
- 1930: en equinos y bovinos, informaciones de los ganaderos de Santander (C).
- 1931-1932: en equinos y bovinos, en forma epizootica en los Llanos orientales.
- 1932: en bovinos, por R. V. Reyes, en Cali.
- 1932: en bovinos, por H. Bonilla G., en Ibagué.
- 1933: en equinos, por R. V. Reyes, en El Banco.
- 1934: en equinos y bovinos, por R. V. Reyes, en el Magdalena y Atlántico.
- 1934: en equinos y bovinos en forma epizootica, por J. Albornoz, en La Mesa (Cund.).
- 1937: en bovinos, por Francisco Perlaza, en Buga.
- 1939: en equinos y bovinos, por Marulanda, en el Huila.
- 1939: en equinos y bovinos, por Perlaza, en el Valle y Norte del Cauca.
- 1940: en equinos y bovinos, por Moreno F., en el Valle de Tenza.
- 1940: en equinos y bovinos, por Zapata y Valenzuela, en Caldas (Antioquia).
- 1940: en cerdos, primer informe sobre

presentación en esta especie, por Perlaza, en Tuluá.

1941: en equinos y bovinos, por J. J. Cañón, Corozal.

1941: en equinos y bovinos, en forma epizootica, por R. Caicedo, en la Sabana de Bogotá, Sesquilé.

1941-1942: en equinos y bovinos, en forma epizootica, en el Magdalena, Santander, Antioquia, Tolima y Llanos orientales.

Por lo que antecede vemos perfectamente que la distribución de la estomatitis vesiculosa en el país es generalizada, ya que sólo en tres departamentos, Caldas, Santander del Norte y Nariño, no existiría tal entidad (el doctor Elberto Tovar, en informe personal, me dice haberla observado en el año de 1940 en las regiones de Manizales, Villa María, Risaralda y Anserma, Caldas, en equinos, bovinos y cerdos); debo aclarar que la salvedad hecha para las antes mencionadas secciones del país no se debe tomar como categórica, pues si bien es cierto que no hay datos sobre la existencia de estomatitis vesiculosa, bien puede deberse a fallas en los datos remitidos por los veterinarios seccionales.

Además se puede deducir que para los años de 1940 y 1941 la enfermedad se presentó con una incidencia y caracteres verdaderamente alarmantes. Siguiendo atentamente su presentación en relación con la fecha de aparición en los diferentes puntos del país, se ve cómo se presentaron dos focos primarios: uno en el Huila en el año de 1929, y otro en el Banco, en 1933; del primero, en el Huila, se propagó en dirección N. O. al Cauca y Valle; hacia el Norte pronto se comprobó en el Tolima en 1932, mientras que en dirección N. E. pasó a los Llanos orientales, de donde siguiendo al Norte pudo pasar a Boyacá y luego posiblemente a Santander y Antioquia. Desde el segundo foco primario, el de El Banco, 1933, podríamos seguir más fácilmente su propaga-

ción; así un año después es observada en el Atlántico a la vez que más generalizada más al Norte de El Banco; para el año de 1940 la vemos en forma peizoótica en toda la costa atlántica. Las anteriores consideraciones son desde luego puramente especulativas, pero bien podrían ajustarse a la realidad, dadas las condiciones de transmisibilidad y los caracteres de la enfermedad.

Es interesante el dato remitido en el año de 1940 por el doctor Francisco Perla S., referente a la presentación de la estomatitis vesiculosa en los cerdos, ya que, como veremos más adelante, la infección natural del cerdo por el virus es considerada como la excepción.

Interesantísimo es el observar cómo el investigar la etiología de una enfermedad infecto-contagiosa conduce a ciertos conceptos que posteriormente parecerán ridículos; la primera información sobre la existencia de la estomatitis vesiculosa en los Estados Unidos fue hecha en el número de diciembre 30 de 1915 del *Recueil de Médecine Veterinaire*, por Jacoulet, y la refería como *estomatitis erosiva* de los caballos procedentes de América y de causa indeterminada; decía también que los veterinarios americanos la conocían y la achacaban al hecho de que los caballos lamían el revestimiento de cal de las paredes. El Instituto Pasteur, llamado en ayuda, fracasó en demostrar la transmisibilidad de caballo a caballo. Achacose, pues, al hemo llevado desde América, el cual, se decía, estaba micótico. Tres bacteriólogos del ejército francés tomaron sangre y líquido de las vesículas del caballo enfermo con idénticos resultados negativos. En el número de febrero de 1916 de la revista antes mencionada, Vigel decía que la enfermedad era francamente contagiosa y poco después lo probaba categóricamente.

EPIZOOLOGIA

Se entiende por estomatitis vesiculosa una entidad patológica infecto-contagio-

sa, denominada comúnmente estomatitis pseudo-aftosa o *mal de tierra* y caracterizada por fiebre y la formación de elevaciones de la cepa epitelial con acumulación de fluido debajo de ella, en los labios, mucosa de los carrillos, superficie y bordes de la lengua, en el rodete coronario de los equinos y bovinos, como en el espacio interdigital de estos últimos; en las vacas hay presentación de las vesículas en los pezones de la ubre.

La afección es considerada por los autores extranjeros (Hutyra y Marek, Hagan) como prevalente en los equinos y en menor grado en vacunos; entre nosotros se la considera más prevalente entre los últimos. El cerdo es naturalmente resistente (3, 4, 5, 6, 7); lo mismo que las cabras. De los animales de laboratorio son susceptibles el cobayo, el conejo y el ratón; los dos últimos necesitan especialmente cepas adoptadas al cobayo para el conejo (8), y con cepas neurotóxicas para el ratón (6). Según informe verbal del doctor Tovar, en la epizootia del año 1942 en los Llanos orientales, los ganaderos de la región de Feliciano, al sur de la población de Arauca, observaron lesiones muy semejantes a las de la estomatitis vesiculosa en los venados que cazaban o encontraban muertos.

El contagio de la enfermedad se considera como directo de los animales enfermos a los sanos (4); hasta ahora no se ha designado ningún papel de importancia a agentes intermediarios. Su contagiosidad es mucho menor que la de la fiebre aftosa y se asemeja bastante a la del exantema del cerdo.

En cuanto a los datos existentes en nuestro país haré referencia a aquellos recogidos por el doctor Rafael V. Reyes en la última epizootia de 1943 en el valle del Cauca (1), que por su exactitud como por la gran personalidad científica de su autor los hace suficientemente completos para servir de base en la apreciación del estado de la enfermedad en Colombia: la infección parece verificarse por vía di-

gestiva, intradérmica o subcutánea: excoxiaciones en boca, mamas, pezones o pezuñas y cascos. Se presenta en tierras húmedas coincidiendo su incidencia con las primeras lluvias del invierno y la inundación de corrales y tierras bajas; es menos frecuente en el verano así como en sabanas de pastos naturales y regiones secas. Su difusión indirecta se verifica por las aguas estancadas, los utensilios, aperos, arneses, las manos de los ordeñadores, los transportes no controlados de animales enfermos, o de sanos en vehículos no desinfectados donde se hayan movilizado estos últimos.

Debido a presentaciones observadas en hatos y rebaños aislados de todo contagio directo y manejados por hombres que tampoco han estado en contacto con animales enfermos, se le ha imputado papel de significación a agentes intermediarios, tales como moscas, aves o animales salvajes; a la luz de los actuales conocimientos, tal papel sería esencialmente mecánico más que de agentes intermedia-

rios biológicos, como lo observado en otras enfermedades a virus; encefalomielitis equina, exantema varioloso del cerdo, etc.

La presentación de la enfermedad está en relación con los siguientes porcentajes: en vacunos, donde es más alta, con un promedio del 25%; en los equinos es variable, pues mientras en algunas regiones no se registran casos, en otras alcanzan aún 50% con un promedio del 10%; en porcinos, donde tiene la menor incidencia, llega al 5%. Con respecto a estos últimos falta saber si en realidad se trata de la estomatitis vesiculosa o de otra entidad patológica como el exantema vesiculoso del cerdo, lo que es muy probable, o la viruela porcina, ya que como vimos atrás esta especie no es susceptible naturalmente a la infección. Los porcentajes sacados de la presentación en el Valle, nos demuestran la importancia de las condiciones higiénicas en el ordeño para impedir el contagio de la estomatitis vesiculosa; así tenemos en el ganado bovino:

PRESENTACION EN % DE INCIDENCIA:

<i>Orden de infección</i>	<i>% Máximo</i>	<i>% Mínimo</i>	<i>Promedio</i>
1º Vacas en ordeño	100	10	60
2º Vacas paridas pero no en ordeño	75	6	20
3º Terneros mamonos	75	6	20
4º Ganado de engorde	50	—	5
5º Ganado de levante	20	—	5

El período de la incubación natural parece ser de 24 horas y se presenta brusca y simultáneamente en varios animales de la misma hacienda.

Las lesiones se localizan en la boca, ubre y extremidades de los bovinos, en boca y extremidades en los caballos, mulas y asnos dominando una u otra localización; en los cerdos (?), principalmente en las extremidades y también en el borde superior del hocico, alrededor de las narices y labios. Los ganaderos in-

forman sobre presencia de lesiones en el ano, vulva y ojos de los vacunos.

En los bovinos hay una elevación de la temperatura de medio a un grado centígrado, no constante en el período inicial; a veces no se la observa en animales con vesículas formadas, pero sí en otros con vesículas ya rotas. El enfermo se presenta triste, erizado, inapetente. Hay ptialismo acentuado, fluyendo la saliva de la boca en forma de hilos con consecuente chasquido y paladeo, sin mas-

tificación. En la boca aparecen las vesículas que varían en número y tamaño y que se pueden presentar aisladas, o confluyen para formar una sola que al exfoliarse da una úlcera de gran tamaño; estas lesiones se presentan principalmente en la cara dorsal de la lengua, en el paladar, en la cara interna de labios y carrillos, y a veces se extiende sobre el hocico. Las vesículas son de carácter rápido y transitorio, aparecen en las primeras 48 horas de la enfermedad, exfoliando inmediatamente, presentándose la cubierta en forma de colgajos que se desprenden y a las 24 horas sólo se advierten úlceras de bordes irregulares que se recubren con una pseudomembrana amarillenta de olor desagradable. Luego sobreviene el período de cicatrización que comprende unos diez días, siendo así de 12 a 15 el curso total de la afección bucal. Las lesiones de la ubre y las podales son consecutivas a las bucales, siendo las primeras posiblemente secundarias ya que ni los animales no ordeñados ni los horros las presentan. Hay vesículas en los pezones, formándose sobre la úlcera consecutiva a la exfoliación, una costra rojo-negruzca, dura y retraída que sangra con facilidad; la cicatrización toma unos 60 días, variando según el traumatismo infligido por el ordeño diario. En un 60% de los casos en que hay lesiones de la ubre, hay inflamación de las mamas correspondientes con la localización y extensión de las lesiones en los pezones respectivos y en un 10% se presenta mamitis franca, con un 8% en que se pierden uno o varios cuartos.

Las lesiones de las extremidades se presentan en el rodete coronario de equinos, bovinos y cerdos (?) y en el espacio interdígital de los últimos; se presentan congestionados, seguido de excoriación sin afección del *podófilo*; la tapa del casco se desprende parcialmente y en los cerdos las lesiones se propagan a veces a todo el pliegue de la cuartilla. La cojera es intensa, y la reposición demora de 15 días

a un mes, variando según las condiciones higiénicas existentes.

La mortalidad registrada por esta enfermedad es nula en todas las especies atacadas; se pueden presentar decesos debido a afecciones concomitantes, jugando en estos casos la estomatitis vesiculosa un papel predisponente o debilitante. En el laboratorio, con cepas ya pasadas varias veces por cobayo, se observa un aumento de virulencia, aceptándose como porcentaje de mortalidad en estos animales el de 1%; sin embargo, como veremos más adelante, con la cepa a que este trabajo se refiere se observó una mortalidad muy alta en cobayo.

AGENTE CAUSAL

El agente etiológico fue demostrado como perteneciente a la categoría de virus filtrante en 1926 por Olitsky, Traum y Schoening (9). Catalogado como un epiteliotropo, después se probó que podía mutarse a neurótropo. Se le encuentra presente en la linfa de las vesículas, en la cubierta epitelial que la recubre, en la saliva infectada con linfa de las vesículas rotas. En la inoculación experimental del cobayo se ha comprobado su presencia en el torrente circulatorio 20 a 24 horas después de la inoculación intradérmica en la superficie plantar.

Su tamaño varía entre 60 y 74 milimicras, cuando es medido por el método de centrifugación, habiendo sido calculada su densidad de 1.20 y 1.30 respectivamente. Galloway y Elford en 1933 calcularon por ultrafiltración su tamaño en 70 a 100 milimicras; en 1935 Bauer y Cox por el mismo método encontraron idénticos resultados; en 1936, Levaditi, Paie, Krassnoff y Voet, encontraron por ultrafiltración los valores de 60 a 90 milimicras. Finalmente en 1937 Galloway y Elford encontraron los tamaños y densidades dados en primer término y calcularon el tamaño medio en 85 milimicras.

Su pluralidad antigénica está de acuer-

do con lo que parece característico de los virus vesiculosos; así el de la fiebre aftosa presenta los tipos O, A y C; el del exantema vesicular del cerdo presenta hasta ahora cuatro tipos A, B, C y D. En la estomatitis vesiculosa se han demostrado dos tipos de virus diferentes antígenicamente: uno el tipo *Indiana*, aislado por Cotton en epizootia de mayo, 1925; el otro el tipo *New Jersey*, aislado en septiembre del mismo año de una epizootia en ese lugar. D. H. Undal, en su obra *The Practice of Veterinary Medicine*, 1943, trae un tercer tipo antigénico que denomina tipo *California*, aislado de una epizootia de estomatitis vesiculosa en el cerdo, bastante sospechosa de fiebre aftosa. Estudios posteriores de J. Trauum y H. W. Schoening (5) demuestran que en realidad se trata de una entidad absolutamente diferente: el exantema vesicular del cerdo. Anteriormente, en 1937, A. B. Crawford (10) había aclarado este hecho, y el doctor O. Waldmann, la más alta autoridad alemana en fiebre aftosa, en 1933 había diferenciado ampliamente la cepa *California* del virus de la fiebre aftosa y en cuanto a pruebas de inmunidad cruzada con los tipos de estomatitis vesiculosa encontró un resultado de 2/7 para el tipo *New Jersey*, y de 1/4 para el *Indiana*. Así, pues, en resumen sólo se aceptan dos tipos antigénicos del virus de la estomatitis vesiculosa.

De acuerdo con Olitsky, Trauum y Schoening, el virus es filtrable en discos Seitz, en bujías Berkefeld V., y N., y en bujías Chamberlan L3, y L7; con relación a la Chamberland L11, ellos encontraron que el virus electropositivo no atravesaba este tipo de bujía, pero que si se le cambiaba el electronegativo pasaba fácilmente; para esto, Olitsky (8) recomienda usar un pH de 8,5, con lo cual se consigue filtración en Chamberland L11.

Con material filtrado de las vesículas en la infección artificial del cobayo, linfa, se ha conseguido la D. M. I. (dosis mínima infectante), para cobayo a la di-

lución del 10-7. La sangre, 20 a 24 horas después de la inoculación intradérmica, ha dado títulos en el cobayo de 2.000 a 200.000 D. M. I.

La vitalidad del virus, en relación al pH del medio en que se encuentra, varía grandemente. Así, de acuerdo con Olitsky, se sabe que a una temperatura de 37° C. el virus permanece vivo por 52 horas a un pH de 7.2-7.5-7.6; pero es inactivo por un pH de 6.8 o de 8.0. Sólo aquellos que estuvieron en un pH de 7.5-7.6, estaban activos al final de un período de 100 horas.

Respecto a los agentes virucidas, el material infectante se comporta diferentemente según se trate con aquellos que coagulan la albúmina o con los que no la coagulan. En el caso de alcohol, éter, cloroformo, glicerol, bicloruro de mercurio o ácido fénico, coagulan las proteínas del medio en el cual el virus está suspendido y lo protegen de la acción directa del agente; pero si la coagulación se evita por medio de sustancias como hidróxido de soda al 1-2%, o hipoclorito de sodio (antiformina), al 1%, el virus se pone en contacto directo con el desinfectante, pereciendo rápidamente. Así, el virus permanece viable 24 horas en alcohol al 60%, pero si se añade hidróxido de sodio al 1:5.000 (a este título el virus resiste la base sódica por 24 horas), es destruido en un minuto.

El hidróxido de sodio al 2% destruye el virus en un minuto. El bicloruro de mercurio al 1:1.000, el ácido fénico al 1%, el cresol al 3%, no lo destruye en 6 horas. Una mezcla de cresol al 3% más 1% de hidróxido de sodio lo mata en un minuto.

En glicerina al 50%, con *buffer* y a un pH de 7.5 se conserva viable por lo menos por cuatro y medio meses cuando se le guarda a temperatura de 4 a 6 grados centígrados.

Experimentos han demostrado que la cubierta de las vesículas se ha conservado virulenta en suelos guardados por 31 días de 4 a 6 grados centígrados, o a 20 gra-

dos centígrados si se les conserva húmedas o desecadas.

Uno de los problemas que más se ha tratado de descifrar en las enfermedades a virus filtrantes, es el que concierne a la mutación de una especie determinada en un tipo especial, que sin variar en sus caracteres antigénicos, posee cualidades patogénicas diferentes de aquéllas del que le dio origen; este fenómeno, conocido también en relación con las bacterias en las cuales tenemos el ejemplo ampliamente conocido de la cepa número 19 de la *Br. abortus*, representa una nueva fase en la epidemiología de las enfermedades por virus y entraña, en el virus de la fiebre amarilla por ejemplo, una arma poderosísima para su prevención.

En 1930 M. Theiler (11) informaba que el virus de la fiebre amarilla, organotropo en esencia, podía ser alternado por el pase intracerebral de ratón; después el virus fue modificado por cultivo en tejido, y así se formó la nueva cepa 17D, que sin poseer el poder patógeno de la cepa que le había dado origen, en cambio conservaba sus caracteres antigénicos inmodificables, dando así inmunización cruzada. Posteriormente el mismo Theiler informaba que habían sido negativos los resultados en los esfuerzos por repetir la mutación aplicando los mismos principios que en la mutación de la 17D; así, pues, a pesar de haber sido obtenido un medio eficiente de vacunación contra una enfermedad infecciosa por virus, el mecanismo íntimo de la modificación sigue siendo absolutamente desconocido.

Ultimamente W. M. Stanley (12) ha venido estudiando el problema desde el punto de vista de la estructura química de los virus y sus variaciones con la mutación. Stanley concluye diciendo que hay una relación directa entre la estructura química y la mutación, la cual va acompañada por cambios en dicha estructura. El cambio se manifiesta por alteraciones en las cantidades relativas de determinado amino-ácido y otras veces por la pre-

sencia de un amino-ácido enteramente nuevo, deduciéndose que tales alteraciones van asociadas a la síntesis misma de la partícula virus en su multiplicación. Sin embargo, Stanley termina: la naturaleza de estos cambios no se conoce.

En 1934 Peter K. Olitsky, Herald Cox y J. T. Syverton (13) demostraron la mutación del virus de la estomatitis vesiculosa, dermatropo esencialmente, en un tipo neurotropo que producía síntomas nerviosos de encefalitis en cobayos, conejos, ratones y monos. Como agente de mutación se usó el cambio de vía de infección; así se demostró que las vías intracraneal, intranasal y subcutánea, fueron positivas en ratón; en el cobayo sólo la intracraneal fue efectiva y con la intradérmica en el cojinete plantar sólo se consiguieron síntomas locales sin manifestación nerviosa; el conejo y el mono se mostraron susceptibles a la inoeculación intracerebral, aunque el segundo tuvo un curso más lento. En el mismo trabajo se demostró que la mutación no alteraba los caracteres antigénicos del virus y por prueba de inmunidad con el virus de la encefalomielitis equina no se obtuvo protección cruzada. Como veremos en la parte experimental, hemos obtenido idénticos resultados con nuestra cepa, además de un ensayo por demostrar la mutación en especie de campo, caballo, que fue negativo, si bien puede deberse este resultado al hecho de sólo haber usado un solo animal.

El virus de la estomatitis vesiculosa, como todos los agentes pertenecientes al grupo filtrable, sólo se multiplican dentro de la célula viva, por lo cual su cultivo fué del organismo de las especies susceptibles se hace en cultivos de tejido vivo o en el embrión de pollo.

Los primeros esfuerzos para su cultivo los realizaron Carrel, Olitsky y Long en 1928 (14), utilizando médula ósea o embrión de cobayo puestos en suspensión en líquido Tyrode más plasma; la incubación fue a 37 grados centígrados por

7 a 10 horas. Después, en 1933, Cox, Syverton y Olitsky utilizaron tejido de embrión de pollo en líquido Tyrode, con pases cada tres horas, alcanzando actividad del cultivo para ratón hasta el dieciochoavo pase. En el mismo año Cox y Syverton lograron por el mismo método anterior 35 pases en una cepa y 58 en otra, siendo activa a las diluciones de 10-5 y 10-6, respectivamente. En el mismo año de 1933 Burnet y Galloway efectuaron el primer cultivo en la membrana corioalantoide del embrión de pollo, obteniendo hasta el quinceavo pase. En fecha más reciente aparece el trabajo de Ervin A. Elehorn y Chester A. Manthei (15), en el cual se analizaron varios de los puntos más destacados sobre el cultivo del virus en el embrión de pollo. La técnica usada fue la de *saco aéreo artificial*, con inoculación de 0,20 c. c. de la suspensión del virus en éste; sellado con cera e incubación de 40 a 48 horas a 26.4 grados centígrados. Las conclusiones a que llegaron estos investigadores son de interés práctico:

1º—El virus secado al vacío y guardado en refrigeradora es viable por lo menos por cinco meses;

2º—El virus de la estomatitis vesiculosa puede ser propagado en la membrana y en el embrión de pollo;

3º—Los embriones de once días son los mejores para su propagación, con 40 a 48 horas de incubación para la mejor producción del virus en el huevo;

4º—La virulencia aumenta con los pases sucesivos por embrión;

5º—El virus propagado por embrión es idéntico al de pases por animal.

Al mismo tiempo, parece que en este caso como en algunos otros de cultivo de virus en embrión de pollo, se necesita de un período de adaptación del virus al tejido del embrión, siendo en el caso de la estomatitis vesiculosa entre la cuarta y octava generación.

INMUNIDAD

Aunque todavía no tenemos conocimientos completos sobre la naturaleza y biología de las partículas virus, sí hay un hecho que la práctica y la experimentación enseñan, y es el de que los virus filtrables son antígenos, incitando la formación de anticuerpos específicos que neutralizan in vitro la acción patógena del virus que les dio origen. Hay, sin embargo, una diferencia entre estos anticuerpos y los incitados por la penetración parenteral de bacterias; los estudios verificados en poliomieltis por E. W. Schultz, en influenza de las aves por C. Todd, y en viruela por A. B. Sabin, demuestran que los cuerpos de protección o anticuerpos contra los virus filtrables no forman compuestos estables con los virus ni los destruyen; parece más bien que se interponen entre el virus y la célula susceptible. Estamos, pues, en presencia de un fenómeno inmunológico en el cual el agente atacante y la sustancia protectora coexisten en el mismo huésped variando el resultado final; infección o inmunidad, según la prioridad con que uno de los dos, partícula virus o anticuerpo, entren en contacto con la célula susceptible; si tenemos en cuenta el carácter patogénico de los virus filtrables, esencialmente intracelular, obtendremos como resultado que los antiseros tienen un valor esencialmente preventivo, y muy bajo curativo. Más aún, que una vez establecida la afección celular, el uso de tales antiseros es absolutamente negativo.

En la inmunidad activa en las enfermedades a virus, hay todavía mucho por conocer lo cual ha conducido lógicamente a polémicas en las que los diversos autores traen argumentos en pro o en contra de determinado principio; entre ellos el de mayor importancia concierne con el carácter que debe llenar el agente usado como antígeno inmunizante. Mientras que Hans Zinsser (16) establece el hecho de que "es ya imposible o extremadamente

difícil inmunizar contra cualquier infección con virus muertos", por otra parte podríamos citar las vacunas contra la rabia tratadas por el fenol, las vacunas contra la encefalomielitis equina tratadas por la formalina y la vacuna contra el hog-chollera, tratada por el cristal violeta, vacunas éstas que se suponen completamente a virus muerto. Lo que sí se acepta como hecho cierto en cuanto al comportamiento de este tipo de vacunas es el de que la concentración del virus en el material usado para la preparación tiene una marcada influencia sobre su carácter protector; también tiene influencia el método usado para matar el virus; hasta ahora el mejor producto usado para este fin es el formaldehído en solución acuosa el cual preserva casi invariable las propiedades antigénicas de los virus filtrables.

En el caso concreto de la estomatitis vesiculosa se observa una inmunidad activa adquirida aproximadamente de un año en los animales que recobran de la infección. Experimentalmente este hecho es evidente en animales de laboratorio y, más aún, los cobayos pueden ser inmunizados pasivamente con suero de animales convalecientes. Con respecto a inmunidad natural en las especies susceptibles, debida a los factores de edad, sexo, raza o estado fisiológico, no se conocen en la práctica hechos que demuestren su existencia, y los únicos datos experimentales se refieren a la resistencia que presentan ratones adultos a la infección nerviosa periférica con la variante neurótropa del virus, Sabin y Olitsky (17).

De acuerdo con el curso benigno de la infección por virus de la estomatitis vesiculosa, con las grandes pérdidas económicas que representa su presentación, derivadas de la baja producción lechera, inhabilidad para el trabajo e inutilización de algunos animales por secuelas, se deduce que la inmunización activa es la de mayor aceptación en la práctica. Esta se lleva a cabo con el uso de vacuna formalada, la cual es obtenida de cultivos

en embrión de pollo con la técnica descrita anteriormente. Como base de esta inoculación se deben emplear los tipos homólogos existentes (el Indiana, el New Jersey). En Colombia la vacunación se ha llevado a cabo con vacuna preparada por el Instituto Behring, de Bogotá, con cepas locales; de los datos que poseo al respecto se desprende que la vacunación ha dado excelentes resultados cuando es usada en la región de donde provenía la cepa usada para la manufactura.

DIAGNOSTICO DIFERENCIAL

Indudablemente, se debe establecer como sistema el hacer diagnóstico diferencial de todas las cepas que llegaren al laboratorio con el objeto de establecer de una vez por todas cuál o cuáles entidades patológicas existen en Colombia, que se manifiestan sintomatológicamente por exantema vesiculoso. Como es bien sabido, clínicamente el diagnóstico es un tanto difícil, y sólo hay datos que bien pudieran servir como pauta para un diagnóstico definitivo de laboratorio.

En mi concepto, las entidades que con más insistencia debieran diferenciarse en el país, dentro del concepto general de *estomatitis pseudo-afosa*, son: la fiebre aftosa, la estomatitis vesiculosa y el exantema vesiculoso del cerdo. De las lesiones encontradas en todas tres enfermedades, no hay un dato característico de diferenciación en ninguna de ellas; únicamente podrían citar algunos caracteres, un tanto atípicos, de su presentación, que pueden ayudar en la sospecha de una determinada entidad. Es así como el exantema vesicular del cerdo sólo se presenta en los cerdos y experimentalmente en los equinos que son un tanto resistentes. La estomatitis vesiculosa tendría como especies no susceptibles, de acuerdo con Crawford (1) a las ovejas y cabras, aunque Hagan, (4), admite que las ovejas son susceptibles experimentalmente; el

cerdo es susceptible a la estomatitis vesiculosa únicamente en inoculación experimental y se da como diferencial su resistencia a la enfermedad natural; sin embargo, Schoening (18) relata el caso de una observación en 1943 de unos cerdos en un laboratorio productor de suero anti-hog-collera, que presentaban una enfermedad vesiculosa; en la sospecha de que se trataba de fiebre aftosa hicieron inoculación diferencial, revelando que era estomatitis vesiculosa. En la fiebre aftosa se tiene como dato diferencial de presentación, la clásica resistencia natural del caballo a esta enfermedad. Estos datos de presentación, unidos a otros epidemiológicos como son los de intensidad, o virulencia de la afección pueden llevar

con más o menos fundamento a un diagnóstico clínico.

El diagnóstico diferencial se establece propiamente por inoculaciones de especies sí o no susceptibles, y por reacciones de inmunidad cruzada. Para las primeras se aprovecha la resistencia natural de algunas especies animales, como también el carácter de vía de inoculación, muy útil en la diferenciación de fiebre aftosa y estomatitis vesiculosa. Hasta la fecha no se conocen métodos diferenciales aceptables, serológicos o alérgicos.

Resumiendo en un cuadro la susceptibilidad de las diferentes especies a las tres enfermedades antes mencionadas tendremos lo siguiente (tomado de Crawford), (11).

Especies	Exantema vesic. del cerdo.	Estomatitis Vesiculosa	Fiebre Aftosa
Bovinos	—	+	+
Equinos	+ ó — (a)	+	—
Cerdo	+	+	+
Ovinos	—	+ ó —	+
Caprinos	—	—	+
Cobayo	—	+	+
Erizo	—	—	+

(a): artificial.

J. Traum (19) aconseja el método siguiente de inoculación experimental para el diagnóstico diferencial de las tres enfermedades:

“1º—Inocúense por lo menos dos bovinos. Uno debe ser inyectado con fluido vesicular fresco intravenoso o intramuscularmente; el otro debe ser inyectado en la mucosa de la lengua, labios, o cojinetes dental, o frotados en áreas escarificadas. Si el virus es de fiebre aftosa, ambos animales deben desarrollar la enfermedad, los inoculados intradérmicamente, y no los inoculados en la vena o en el músculo. Si es virus del exantema del cerdo, ninguno de los animales debe desarrollar síntomas.

2º—La inoculación al cerdo no tiene objeto, puesto que en este animal usualmente se desarrolla la enfermedad con cualquiera de los tres virus.

3º—La inoculación del caballo es de mucha ayuda para diferenciar entre fiebre aftosa y estomatitis vesiculosa, siendo absolutamente resistente a la primera y susceptible a la segunda; el virus del exantema del cerdo es medianamente patógeno para los equinos; algunos desarrollan pequeñas vesículas cerca del punto de inoculación, otros no.

4º—El cobayo es de grande ayuda en el diagnóstico del exantema vesicular del cerdo, ya que es resistente a esta entidad y muy susceptible a las otras dos.”

Experimentación

Los trabajos prácticos realizados han tenido por objeto obtener indicación de si la cepa usada pertenece a la especie del virus de la estomatitis vesiculosa (estomatitis pseudo-aftosa o *mal de tierra*), o si por el contrario pudiera ser del virus aftoso o del exantema vesicular del cerdo.

La cepa usada, denominada EVF (estomatitis vesiculosa Florida), fue tomada por el doctor Rafael Vicente Reyes en la última epizootia de esta enfermedad en el Valle del Cauca, región de Florida, y traía las siguientes indicaciones, de letra del doctor Reyes: "Tomado el 22 de marzo de 1943. Linfa y membranas de una vaca que el día anterior estaba sana. Fue positivo a la inoculación a cobayos, bovinos y equinos; negativo para cerdos, ovejas y cabras. Fdo. R. V. Reyes." De esta cepa, parte fue enviada a Bogotá, al Instituto de Investigación del Ministerio de la Economía Nacional, y otra trabajó el mismo doctor Reyes en el Valle. De estas inoculaciones se concluyen los resultados que anota el doctor Reyes en la nota remitida de la cepa EVF. La muestra enviada al Laboratorio de Bogotá fue pasada por cobayo con resultados positivos, pero luego fue abandonada por no haber tiempo disponible para la investigación. Para mayo del año de 1945 hice los primeros intentos de recuperar la cepa de la muestra inicial enviada por el doctor Reyes en el año de 1943; esta muestra me fue suministrada muy gentilmente por el Laboratorio Behring de Bogotá; los resultados de inoculación intradérmica en el cojinete plantar de cobayo fueran absolutamente negativos. Para octubre del año pasado el doctor Reinaldo Caicedo y el doctor Schultz, del mismo Instituto Behring, volvieron a su ministrarme nueva muestra de la cepa EVF; esta vez la muestra era cerebro de cobayo, que había sido inoculado intracerebralmente, o sea variante neurótrópica

de la cepa inicial Reyes EVF. A esta última muestra se refieren las experiencias descritas en esta sección del trabajo.

Técnica usada

En todos los trabajos que a continuación se explican se usó la misma técnica, y sólo en contadas excepciones varió, lo cual se encontrará anotado en los respectivos protocolos; los animales usados fueron suministrados por el Instituto de Investigación dependiente del Ministerio de la Economía Nacional, y por la Facultad de Medicina Veterinaria, por lo que debo presentar mis sinceros agradecimientos a los doctores Francisco Virviescas, José Velásquez Q., Schultz y Reinaldo Caicedo, por la valiosa cooperación y las facilidades que me suministraron.

Preparación del inoculum

Podemos dividirla en dos, según la naturaleza de la sustancia virulenta: cuando se trataba de linfa vesicular, se inoculó directamente en algunos casos, y en otros, cuando se supuso de alta virulencia, se diluyó en la proporción 1:10 en solución salina *buffer*, haciéndose siempre la dilución inmediatamente antes de la inoculación. En aquellos casos en que se usó material virulento en el cerebro de animales de laboratorio, se preparó el inoculum de la siguiente manera: un pedazo de corteza cerebral de aproximadamente un gramo; se trituraba en un mortero estéril hasta que adquiriera consistencia de papilla; luego se agregan 10 c. c. de caldo ordinario del usado en técnica corriente de laboratorio; la suspensión era luego pasada estérilmente a tubos de centrifuga y sometida a 1.500 revoluciones por 10 minutos, con lo cual se consigue que todas las partes groseramente trituradas formen un sedimento, dejando una suspensión que sobrenada de aspecto uniforme y muy manejable. De este líquido se partió para inoculaciones, diluciones o filtración, según el caso. Todas las suspensiones virulentas eran probadas para

esterilidad por cultivos en caldo ordinario, gelosa ordinaria y caldo Tarozzi.

Técnica de inoculación

Varió según la vía elegida; éstas fueron dos: intradérmica o intracerebral. En la primera, se preparaba previamente el campo, el cojinete plantar de los miembros posteriores del cobayo cortando los pelos largos que se encuentran en el borde de éste y que pudieran interferir la operación o contaminar la aguja en el momento de ejecutarla; luego se limpió con alcohol de 36° teniendo el cuidado siempre de esperar que éste se evaporara antes de iniciar la inoculación; no se empleó en ningún caso antisépticos fuertes, como tintura de yodo o soluciones de bicloruro, fenol o formalina por temor de afectar en alguna manera el inoculum o de ocasionar una acción irritante que pudiera dar resultados falsos. La inoculación se verificó con aguja gauge 26, de las usadas comúnmente en tuberculinización, teniendo el cuidado de que fuese estrictamente intradérmica; la aguja se introducía en sentido longitudinal al cojinete y se hacían dos inoculaciones paralelas en uno de los cojinetes, dejando el de la extremidad homóloga como testigo para la observación; se usó siempre el izquierdo. La cantidad de inoculum usada varió entre 0.02 y 0.04 c. c.

En la inoculación intracerebral en el cobayo se usó la técnica siguiente: se cortan los pelos en la región frontal con unas tijeras curvas; el ayudante sujeta la cabeza del animal lo más fijamente posible, tomándolo por las orejas y sosteniéndolo firmemente contra la mesa; se desinfecta la región con alcohol de 36°; con un bisturí pequeño se hace una incisión de la piel, de unos 3 o 4 milímetros en un punto por encima de la línea que una los ángulos internos del ojo y hacía un lado de la línea media, hasta encontrar el hueso; luego, desplazando unas pocas líneas hacia arriba la piel se hace

la perforación del hueso parietal con una aguja especialmente preparada para el objeto; ésta consiste en una aguja hipodérmica ordinaria gauge 22, que se recorta hasta unos 2 a 3 milímetros del empate (espesor del hueso parietal en estos animales), haciéndola terminar en un pequeño bisel; esta aguja empata en una jeringa ordinaria es un magnífico trépano para inoculaciones intracraneales en el cobayo; una vez obtenida la perforación y sin soltar la piel, se busca con la punta de la aguja de la jeringa de inoculación el sitio de ésta y se introduce suavemente la aguja unos 3 o 4 milímetros, procediendo a dejar 0.10 c. c. del inoculum dentro de la masa cerebral, muy lentamente y evitando todo movimiento brusco de la jeringa, especialmente en sentido lateral; luego se saca rápidamente la aguja y no hay necesidad de sutura posterior, si se ha tenido el cuidado de que la incisión sea apenas justa para el objeto de la operación. En el conejo se hizo la inoculación por la región escamosa del temporal, siendo la cantidad inyectada igual que en el cobayo. En los ratones se hizo uso de anestesia por éter y luego la inoculación por la misma técnica usada para rabia; la cantidad de inoculum fue de 0.03 c. c.

Los animales fueron puestos en observación y los datos anotados cuidadosamente. En algunos se tomaron temperaturas con el objeto de trazar la curva térmica. En las especies grandes se llevó un récord completo de la experimentación. Cuando los animales presentaron los síntomas, se destinaron a dos propósitos: primero como fuentes de virus, y segundo para observar curso y mortalidad; a todos aquellos que murieron de la enfermedad o que fueron sacrificados *in extremis*, se les practicó una necropsia completa. En todos los casos que fue necesario, el sacrificio se efectuó por intoxicación con éter.

Los animales del laboratorio inoculados fueron 27, distribuidos en la siguiente forma: 20 cobayos, de los cuales 15 por

vía intradérmica y 5 intracranalmente; 1 conejo intracranal; 2 ratones blancos intracranalmente, y 4 ratas blancas; 2 intradérmicas y 2 intracranalmente.

Inoculación de animales de laboratorio

A continuación veremos los resultados obtenidos de la experimentación en los animales antes nombrados.

Todos los cobayos usados en la experimentación presentaron los síntomas propios de la afección experimental, con excepción del número 102, inoculado intradérmicamente el X-15, que murió a las 72 horas a consecuencia de una perforación rectal por desuido en la toma de temperatura, y del número 22, inoculado intracranalmente el mismo día, que por una causa desconocida resistió perfectamente la inoculación y a la reinoculación, con material conocidamente virulento, no demostró síntoma de ninguna clase.

Primeramente describiremos las lesiones ocasionadas por la inoculación intradérmica: a las 24 horas subsiguientes a la inoculación, había rubefacción de la región, la que se mostraba caliente y al parecer dolorosa; a las 48 horas el cojinete plantar tomaba un aspecto rojo-morado, sureado por vetas blancas correspondientes a los trayectos de la aguja al verificar la inyección; entre las 72 y 96 horas aparecía la formación de las vesículas primarias, las que expoliaban en 24 horas, con salida de un líquido blanco opaco unas veces y en algunos incoloro transparente; la cubierta de la vesícula se desprendía casi siempre en forma de un solo colgajo, otras veces se partía en dos. Al desprenderse la cubierta dejaba una úlcera que ocupaba la mayor parte de la superficie del cojinete plantar, de una apariencia roja sangrante algunas veces, de bordes no bien precisos y de forma ovalar con eje mayor longitudinal. Todo este fenómeno se efectuó entre las 14 y las 48 horas subsiguientes a la aparición de

las vesículas. Después de la formación de la úlcera ésta tomaba un aspecto cada vez más negruzco y en otras 48 horas se había formado una costra que lentamente se retraía, verificando la cicatrización total en diez a quince días después de la formación de la costra. En unos pocos casos la exfoliación de la cubierta no se verificó en forma completa, quedando adherida más o menos fuertemente en los bordes con la formación consecuente de un absceso; pudo observarse que en estos la antigua vesícula sin infartación de los ganglios adyacentes (poplíteo o inguinal), ni influir en el estado general del animal. De los quince animales inoculados por vía intradérmica, seis (números 90, 96, 27; 29, 15 y 19) presentaron lesiones secundarias; la presentación de estas lesiones se efectuó entre el quinto y el séptimo días después de la inoculación, y se manifestaron por vesículas en la superficie de la lengua, en el cojinete plantar de los miembros anteriores y en dos casos (números 29 y 19, ambos eran hembras) en la región genito-anal, mostrándose la zona roja edematosa con vesículas numerosas rodeando las aberturas anal y vulvar; en los casos de lesiones bucales (números 90, 96, 29 y 19) hubo gran ptialismo e impedimento para la prensión y masticación del alimento. En los animales que se tomó temperatura no se observó un alza de significación, siendo la mayor obtenida en el número 102 de 39.5 grados centígrados.

La autopsia de los cobayos inoculados intradérmicamente que sucumbieron a la enfermedad o que fueron sacrificados *in extremis*, mostró tres lesiones características y casi siempre constantes; las glándulas adrenales se presentaron intensamente congestionadas y con focos hemorrágicos relativamente grandes para el tamaño de tales glándulas, los pulmones presentaron constantemente un enfisema generalizado bilateral, y los genitales se presentaron siempre congestionados en las hembras, abarcando totalmente

el útero y en los machos localizado al epididimo y conductos deferentes. De los siete cobayos muertos, con inoculación intradérmica, tres presentaron congestión del encéfalo aunque ninguno presentó síntomas nerviosos. Los otros hallazgos de necropsia, no tan frecuentes como los ya descritos, fueron enteritis del delgado, gastritis, congestión del hígado, líquido claro, transparente, incoloro en las cavidades pleural, peritoneal y en el pericardio; en un solo caso, el número 29, mostró una ligera hipertrofia del bazo.

La mortalidad entre este grupo fue de 5/15, sin contar aquellos dos, que fueron sacrificados *in extremis*.

Los cinco cobayos inoculados intra cranealmente mostraron los siguientes síntomas (a excepción del cobayo número 28 a que ya se hizo referencia): a las 48 horas se notó debilidad del tren posterior y comienzo de impedimento para la locomoción; en 24 a 48 horas más, se estableció una paraplegia posterior, permaneciendo el animal postrado debido a la parálisis flácida completa de ambos miembros inferiores. El único cobayo que tuvo lesión secundaria fue el número 101, que presentó una queratitis total del ojo derecho y gran salivación sin presentación de vesículas bucales; no fue posible aclarar si la lesión ocular fue debida al virus de la estomatitis vesiculosa, aunque no hubo ninguna causa concomitante aparente. A la necropsia el encéfalo se mostró muy congestionado y lo que es bastante significativo se presentaron las lesiones en el pulmón y los órganos genitales, como las observadas en los animales inoculados por vía intradérmica.

Las temperaturas registradas fueron mayores que las de los animales inoculados intradérmicamente, presentándose máxima de 41 grados centígrados. Los cuatro animales que presentaron síntomas murieron en tres días, los números 20 y 21, en seis días el número 22, y en ocho días el número 101.

Para demostrar la filtrabilidad del ma-

terial virulento que se estaba usando, fuente EVF., se inocularon dos cobayos, el número 23 intradérmicamente, y el 22 intra cranealmente, con los resultados anotados en el cuadro sumario de inoculaciones que acompaña este trabajo. El inoculum lo constituyó el encéfalo del cobayo número 101, que había muerto con síntomas clásicos de infección nerviosa con virus de la estomatitis vesiculosa; el material se preparó de acuerdo con la técnica descrita antes, y después de la centrifugación el material se pasó por bujías Berkefeld N, por presión negativa de unas cinco libras; ya filtrado el material fue sometido a las pruebas ordinarias de esterilidad con resultados de cultivo negativo.

El conejo inoculado intra cranealmente mostró los mismos síntomas nerviosos de los cobayos a las 24 horas, llegando la temperatura a 41.1 grados centígrados; murió a la 48 horas con parálisis completa del tren posterior. A la autopsia sólo presentó gran congestión del encéfalo, sin ninguna otra manifestación.

Los dos ratones blancos inoculados intra cranealmente, mostraron: el uno parálisis del tren posterior a las 48 horas y fue sacrificado a las 96 dando los siguientes datos a la necropsia: cerebro no muy congestionado, ganglios inguinales grandes, hemorragia en el mesenterio cerca de los testículos, bazo y riñones congestionados, adrenales normales, enfisema generalizado del pulmón. El otro no presentó parálisis de los miembros posteriores aunque sí se notaba impedido, estaba deprimido, recogido formando como una bola con el cuerpo; a la necropsia presentó cerebro no congestionado, con los vasos meníngeos ingurgitados, genitales no congestionados, adrenales normales, bazo grande, riñones congestionados y enfisema pulmonar.

De las cuatro ratas blancas inoculadas dos intradérmica y dos intra cranealmente, ninguna mostró síntomas apreciables durante 20 días de observación.

Las conclusiones que deducimos de la

inoculación de la fuente EVF en los animales de laboratorio son las siguientes:

1º—El material usado es filtrable por bujía Berkefeld, del tipo N.

2º—El período de incubación fue de 72 a 96 horas en los cobayos inoculados en la dermis, de 24 horas en los cobayos inoculados intracranalmente; en el conejo inoculado intracranalmente fue de 24 horas; en los ratones blancos fue de 48 horas.

3º—El curso de la enfermedad fue de 3 a 14 días en los cobayos inoculados intradérmicamente con un término medio de 8 días; en los cobayos inoculados en el encéfalo fue de 3 a 8 días. En el conejo inoculado intracranalmente fue de 48 horas; y en los ratones de 4 a 5 días.

4º—Se presentaron lesiones secundarias, (hablamos de lesiones secundarias en aquellos casos de generalización de la enfermedad demostrada por la aparición de vesículas en otros puntos que el de inoculación), en 6 de los 15 cobayos inoculados intradérmicamente y en uno de los 5 inoculados en el encéfalo. Las otras especies no presentaron tales lesiones.

5º—La mortalidad fue muy alta, 5/15 en los cobayos inoculados en la dermis, 4/5 de los inoculados intracranalmente; 1/1 conejo inoculado intracerebralmente; 2/2 ratones blancos inoculados por la misma vía.

6º—Las lesiones observadas en los animales de laboratorio, cobayos, conejo y ratones blancos corresponden a aquellas descritas para los virus de la estomatitis vesiculosa y la fiebre aftosa en la inoculación intradérmica; y en los inoculados intracerebralmente los síntomas corresponden a los de la variante neurótropa del virus de la estomatitis vesiculosa.

7º—La rata blanca no es especie susceptible para el virus de la fuente EVF.

Como datos interesantes obtenidos durante la experimentación anterior, debemos anotar los siguientes:

a) El uso de la variante neurótropa es aconsejable para los trabajos de inocula-

ción, ya que en esta forma se puede obtener una cantidad apreciable de inoculum muy fácilmente.

b) En la trituración del cerebro en mortero para la preparación del inoculum, es aconsejable triturar éste primero sin el diluyente, con lo cual se consigue una más fácil manipulación.

c) Para la inoculación intradérmica en cobayo deben escogerse con piel del cojinete plantar clara, ya que se pudo observar que aquellos que la tienen oscura o negra presentan resistencia a la aparición de las lesiones.

d) Es aconsejable, en la inoculación intracerebral de los ratones blancos, que una vez hecha ésta, se los tome por la punta de la cola y se les imprima movimiento rotatorio más o menos fuerte con el objeto de contrarrestar la anemia cerebral parcial, ocasionada con la introducción del inoculum; en ningún caso debe excederse la cantidad de éste de 0.03 c. c.

Los resultados salientes de la inoculación en animales de laboratorio se exponen en el cuadro adjunto a este trabajo.

Inoculación de especies grandes

En esta fase de la experimentación se usaron cuatro bovinos, tres equinos, cuatro ovinos y dos cerdos. Las vías de inoculación usadas se ajustaron a las indicaciones antes citadas, de J. Traum, en bovinos y ovinos; los equinos se usaron como especie diferencial para los virus de la estomatitis vesiculosa y de la fiebre aftosa. A este respecto debemos aclarar que, debido al hecho de encontrar en la literatura europea y suramericana datos sobre la presentación de fiebre aftosa en los equinos, Hutyra y Marck (1), Wildefour y Giovine, citados por (20) Bidart (21), resolvió consultar directamente a dos altas autoridades norteamericanas, los doctores H. W. Schoening y H. J. Stafseth, quienes estuvieron de acuerdo con los conceptos que antes teníamos sobre la susceptibilidad negativa de los

equinos al virus de la fiebre aftosa, y el doctor Schoening aclaró, además, que en el diagnóstico diferencial de las dos entidades no eran necesarias las pruebas de inmunidad cruzada; con esta base tan autorizada como respetable, nuestra experimentación para el diagnóstico diferencial se hizo exclusivamente sobre inoculación. De los tres equinos, dos fueron inyectados por vía intradérmica en la boca, y uno lo fue por vía intracranial con objeto de ver si se podían reproducir los síntomas nerviosos en esta especie. Los dos cerdos fueron inoculados en la dermis bucal.

El inoculum lo constituyó el cerebro del cobayo número 101, preparado de acuerdo con la técnica descrita anteriormente; la filtración se verificó con bujía Berkefeld N, a presión negativa de cinco libras, y el filtrado sufrió las pruebas de esterilidad. Luego, el material fue inoculado en cobayo: dos, los números 18 y 19, lo fueron intradérmicamente, y dos, los números 20 y 21, por vía intracerebral; los síntomas y lesiones desarrolladas correspondieron en un todo a los del virus de la fuente EVF. Probado en esta forma el inoculum, de ser libre de bacterias y virulento, se procedió a la inoculación de los animales ya previamente es cogidos.

La técnica de inoculación usada en éstos, no cambió de la ya anotada para animales de laboratorio, excepto en las cantidades; para la inoculación intracerebral del equino, se procedió con el método común de trepanación del parietal.

A los animales, una vez inoculados, se les sometió a una estricta observación por once días y todos los datos fueron cuidadosamente anotados. Se les había tomado temperaturas previas a la inoculación, y después de ésta se llevó un récord exacto de la curva térmica.

Grupo bovinos intradérmico-bucal.

Lo constituyeron los terneros números 23 y 25. Al hacer un recuento de las lesiones

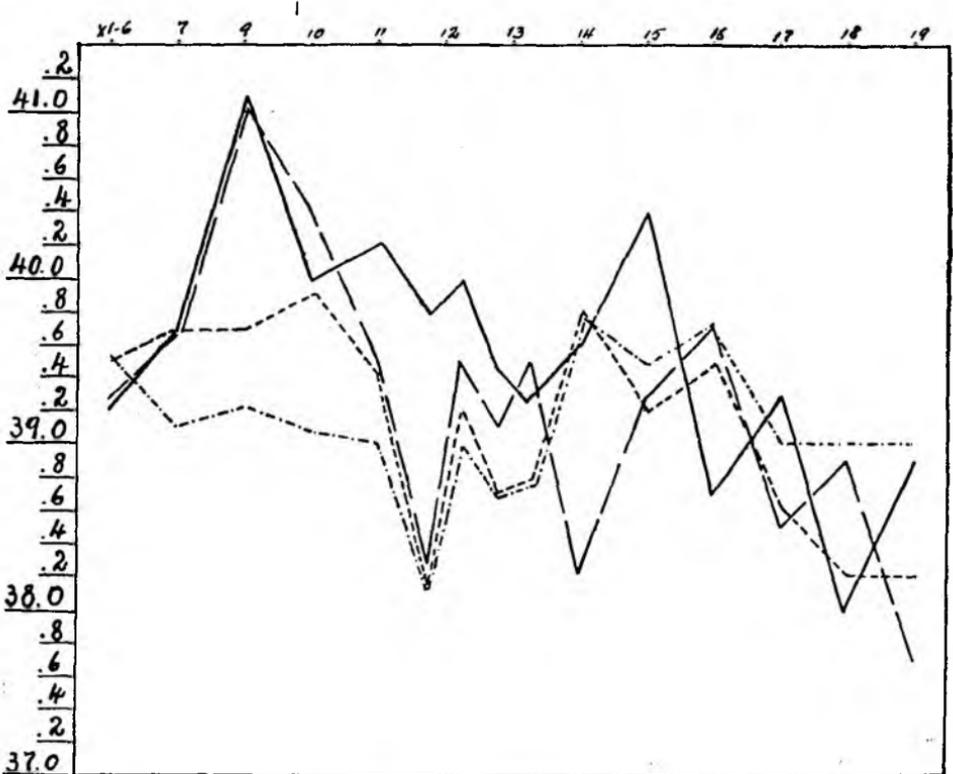
observadas notamos diferencia en los dos animales; mientras que el primero presentó un período de incubación de 36 horas, el segundo, número 25, a las 48 horas presentó las primeras vesículas, en número de dos en el borde de la lengua; simultáneamente con la aparición de las primeras lesiones hubo gran ptialismo, el cual, claro y filante al principio, se tornó en las siguientes 48 horas en una baba espesa; un síntoma al cual no le hemos hallado explicación clara, fue la presentación en ambos animales, a la vez que con el ptialismo, de un moco nasal más o menos abundante, seroso, con estrías blancas, el cual persistió durante toda la observación, sin que clínicamente tuvieran afección de las vías respiratorias. Las vesículas tuvieron una existencia fugaz, no controlable, con exfoliación subsiguiente y formación de úlcera; los detalles del proceso se asemejaron en un todo a los ya descritos en la primera parte, para la infección natural, y sólo nos bastaría anotar que en el número 25 la lesión fue tan extensa, que abarcó toda la superficie dorsal de la lengua; en cuanto a las vesículas de la mucosa de labios y carrillos no fueron tan extendidas como en este último órgano. En todas las vesículas habían exfoliado para la formación de úlcera a las 72 horas; al ser dados de baja estos animales en el onceavo día estas lesiones empezaban a cicatrizar, ninguno de estos dos animales presentó lesiones secundarias.

Bovinos intravenoso e intramuscular

El animal número 21 fue inoculado intramuscularmente con dos centímetros cúbicos y el número 26 por vía venosa con uno y medio centímetros cúbicos. Durante los once días de observación ninguno de estos dos animales mostró vesícula o síntoma alguno de los ya aceptados como característicos para la fuente EVF. Anotamos, eso sí, que a las 72 horas se inició en ambos ptialismo y la afluencia de moco nasal, tal como el observado en el grupo anterior.

Grupo bovino. XI-8/45

- #25 Intradérmico _____
- #23 Intradérmico - - - - -
- #26 Intravenoso - - - - -
- #21 Intramuscular - · - · - ·



GRAFICA NUMERO 1

Con el objeto de comprobar la presencia de virus en la saliva de estos animales, se tomaron muestras lo más asépticamente posible y se inocularon cobayos en la siguiente forma: el número 54 con material del bovino 25, cobayo número 25 con saliva del ternero número 23, y cobayo número 37 con del ternero número 21; de éstos sólo el material procedente del bovino número 23 dio resultados positivos, ha-

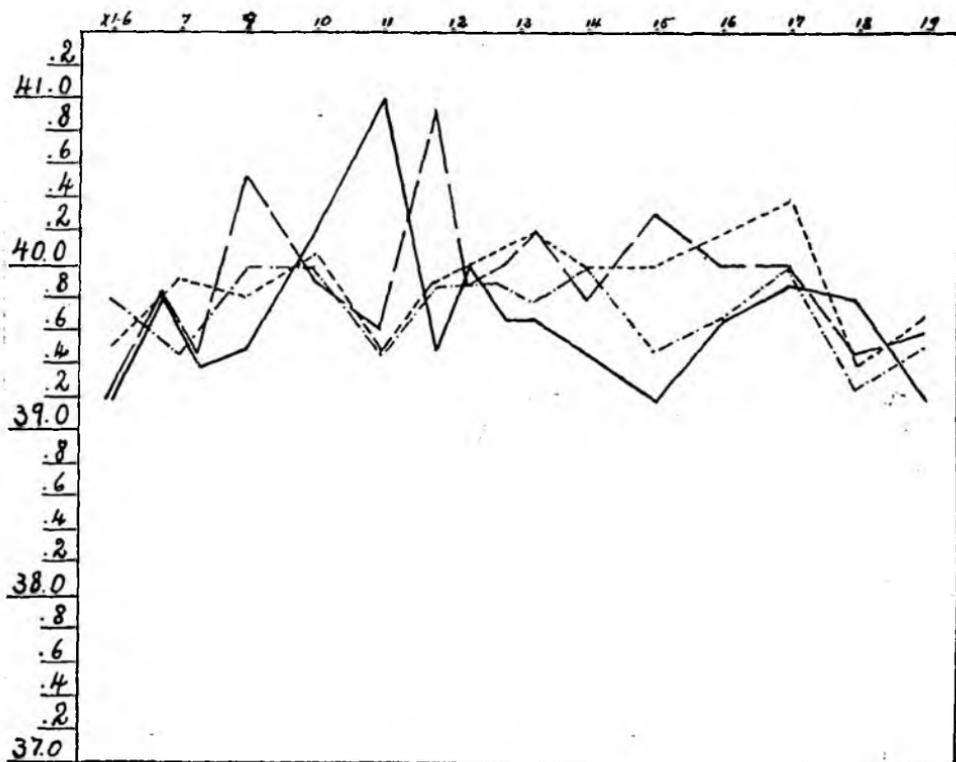
biendo muerto el cobayo a los catorce días con síntomas de estomatitis vesicular, y a la necropsia se le encontraron las lesiones que hemos descrito para los inoculados directamente con material virulento; no presentó lesiones secundarias.

Resultado comparativo de los dos grupos anteriores

Al observar los datos anotados ante-

Grupo ovino. 11-8/45

#11 Intradérmico _____
 #15 Intradérmico - - - - -
 #19 Intravenoso - - - - -
 #1 Intramuscular - · - · -



GRAFICA NUMERO 2

riormente y las curvas térmicas adjuntas de estos cuatro animales, tendremos los siguientes resultados:

1º—Los dos animales inoculados intradérmicamente presentaron síntomas vesiculosos con elevación de temperatura a las 24 horas de uno y medio grados centígrados; y tal elevación fue sostenida por 48 horas y a las 72 regresaron a la normal.

2º—Los dos animales inoculados por las

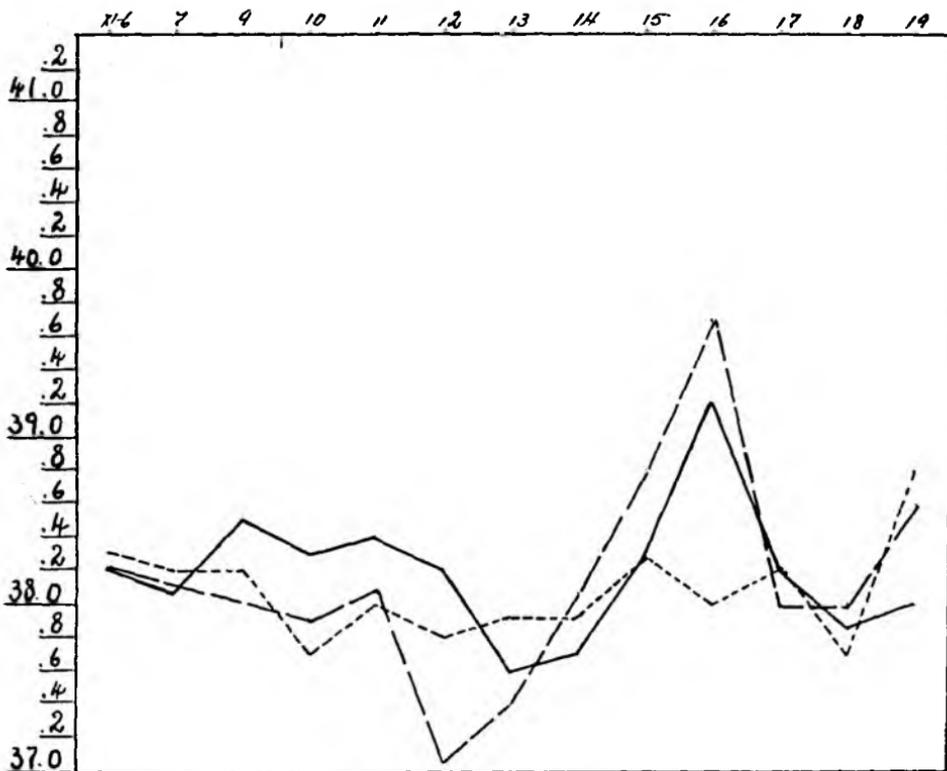
otras vías no presentaron síntomas ni alza de temperatura.

Grupo ovino intradérmico

Lo constituyeron los animales Nos. 11 y 15; ambos presentaron a las 48 horas vesículas en la superficie dorsal de la lengua; exactamente en los sitios de inoculación; éstas, a diferencia de las obser-

Grupo equino. XI-8/45

- #1 Intradérmico _____
- #2 Intradérmico - - - - -
- #3 Intracranéal - - - - -



GRAFICA NUMERO 3

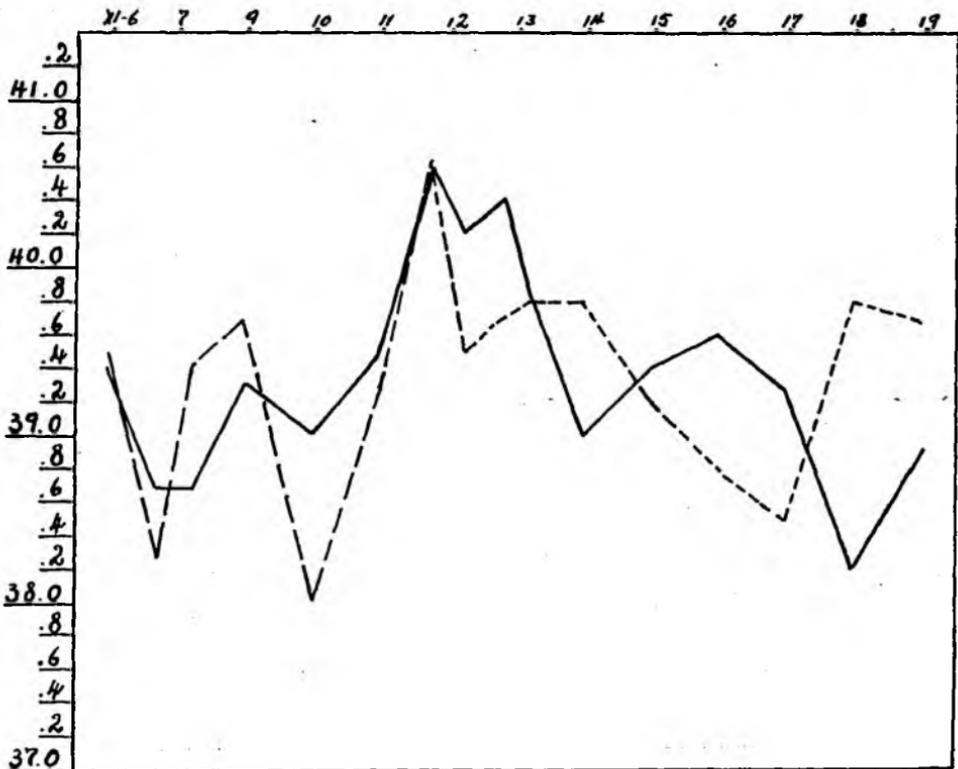
vadas en los bovinos, fueron pequeñas, de 3 a 4 milímetros, que exfoliaron conformación de úlcera, la cual era claramente perceptible a las 120 horas. El ptialismo en estos animales fue insignificante y no hubo lesiones secundarias. Tampoco se observó el moco descrito para los bovinos.

Grupo ovino intravenoso e intramuscular

La oveja número 1 fue inoculada intramuscularmente con uno y medio centímetros cúbicos, y la número 19 por vía venosa con un centímetro cúbico. Aquí tampoco se observó ningún síntoma.

Grupo suinos 11-8/45

#1 Intradérmico —————
 #2 Intradérmico - - - - -



GRAFICA NUMERO 4

Resultado comparativo entre los grupos anteriores

Al igual que en los bovinos podemos deducir dos hechos principales:

1º—Los dos animales del grupo intradérmico presentaron síntomas de estomatitis vesiculosa con alza de un grado centígrado a las 72 horas, continuando en un

animal a las 96 y regresando en ambos a las 120 a la normal.

2º—Los del segundo grupo no presentaron ninguna de las dos alteraciones.

Grupo equino

Los dos animales inoculados intradérmicamente fueron: caballo número 1 y

mulo número 2. A las 48 horas ambos mostraron vesículas en la mucosa del labio inferior; el número 1 a las 96 horas había desarrollado una gran vesícula en la parte anterior del borde derecho de la lengua, vesícula que alcanzaba un tamaño de más de 5 centímetros; ésta tenía una cubierta bastante gruesa, de color blanco amarillento y de superficie plana; fue muy resistente a la exfoliación y sólo lo hizo al décimo día, mientras que las de los labios tuvieron un curso semejante al descrito para los bovinos. No hubo ptialismo ni lesiones secundarias. El mulo número 2 demostró una mayor resistencia que el anterior a la acción del material virulento, pues si bien desarrolló vesículas, éstas fueron pequeñas y en número menor; las úlceras dejadas por éstas, como en el caso del caballo número 1, subsistían cuando se dieron de baja.

El equino inoculado intracerebralmente con uno y medio centímetros cúbicos, fue la yegua número 3, en vía de reproducir las lesiones nerviosas observadas en los animales de laboratorio cuando se usaba esta vía. Este animal, al igual que los otros, estuvo 11 días en observación sin demostrar síntoma ninguno aparente.

En resumen, de este grupo podemos deducir que el material usado produjo lesiones de estomatitis vesiculosa cuando fue inoculado intradérmicamente y que de acuerdo con los cuadros térmicos adjuntos no se observó ningún cambio en la temperatura de dichos animales. Además, en el equino inoculado en el encéfalo no se obtuvo ningún resultado.

Grupo suinos

Lo constituyó el cerdo número 1 y el número 2. De éstos sólo el número 1 presentó a las 96 horas una vesícula única pequeña, situada en el labio inferior un poco por debajo de la unión de la piel con la mucosa; su tamaño fue de unos 3 milímetros, de forma esférica, transparen-

te, que exfolió en las 12 horas siguientes, y de difícil cicatrización la úlcera subsiguiente; no hubo ptialismo demostrable ni lesiones secundarias.

De los cuadros térmicos deducimos que ambos tuvieron una alza de temperatura de 1 grado centígrado a las 120 horas.

DISCUSION

Haciendo un resumen de todos los datos expuestos encontramos diversos puntos que merecen tratarse con especialidad por la importancia que ellos tienen:

Entre éstos resaltan la información suministrada por el doctor Perlaza sobre la presentación natural de la afección en el cerdo; como bien hemos visto está ampliamente aceptado que esta especie es refractaria al virus de la estomatitis vesiculosa al contagio natural y en cambio susceptible a los de la fiebre aftosa, el exantema vesicular del cerdo o el exantema varioloso del mismo. No escapa, pues, la importancia que tienen informes como éste, con los cuales se podría demostrar la existencia de la estomatitis vesiculosa en forma natural en esta especie, previa identificación del virus, o en cambio comprobar la existencia de la nueva entidad, el exantema vesiculoso del cerdo, o el varioloso, ya que es improbable que exista la fiebre aftosa en el país.

Mientras que los autores extranjeros sólo aceptan la contagiosidad directa sin intervención de vectores, las observaciones del doctor Reyes de que ya hemos hecho mención nos indican claramente que bien pudiera existir; es indudable que éste es uno de los renglones más difícilmente controlables en la epizootología de una enfermedad infecto-contagiosa, pero, ¿cómo explicar los hechos enunciados de la presentación de la enfermedad en un punto determinado donde todo contagio directo ha sido por demás imposible? El mismo hecho lo observamos en otras enfermedades a virus donde los intermediarios juegan un papel preponderante. Claro está que en el presente caso, dados los

conceptos responsables expuestos en uno y otro sentido, sólo una experimentación metódica y muy bien controlada podría dar la última palabra, pero como hecho práctico, nosotros bien podríamos aceptar la existencia de tales agentes intermedios.

Como bien expusimos anteriormente, es poco lo que podríamos decir con respecto a la mutación de los virus en general y tratando del de la estomatitis vesiculosa adelantaremos conceptos basados en los resultados obtenidos en la parte experimental. Bien se ha demostrado la mutación del originalmente epiteliotropo o neurotropo con el consiguiente cambio de patogenicidad y de la facilidad con la cual se efectuó la mutación inversa, volviendo a recobrar totalmente su afinidad original y perdiendo casi completamente la propiedad neurotrópica adquirida; así vemos que habiendo usado para la inoculación intradérmica una fuente neurotrópica mutó nuevamente de primera intención y las lesiones obtenidas en nada diferían de una cepa enteramente epiteliotropa; sólo tres casos presentaron congestión cerebral sin que ninguno de ellos hubiese mostrado en vida síntomas nerviosos. De los datos de necropsia obtenidos, como en los síntomas anotados (secreción nasal en los bovinos), tendríamos una anotación interesante que hacer, para la comprobación de la cual se necesitarían estudios posteriores, y es de que hay hechos tan constantes como anormales, que llevarían a la conclusión de que se está efectuando una nueva mutación del virus a organotropo.

Uno de los hechos que a la experimentación nos dio resultados positivos, pero que aún no le hemos podido encontrar una explicación satisfactoria, fue el de la diferenciación entre los virus de la fiebre aftosa y estomatitis vesiculosa según la vía de inoculación ideada por Traun. Este punto sería materia de larga especulación, ya que, observadas las curvas térmicas nos conducirían a que en la estomatitis vesi-

culosa existe viremia, pero como no tenemos argumentos de valor nos limitamos a hacer la observación de que en la práctica es un método valioso, aunque no sepamos su verdadero mecanismo.

Observando el cuadro de resultado de inoculación, podemos verificar que parece existir una resistencia natural en los diferentes animales hacia el virus. Así, los cobayos números 29 y 15 fueron inoculados por la misma vía, con el mismo material, en igual cantidad, y mientras que ambos revelaron síntomas positivos de la enfermedad sólo el número 29 sucumbió a ella.

Uno de los datos en que nuestra experimentación difiere de los datos existentes, es en el porcentaje de mortalidad de los cobayos al virus de estomatitis vesiculosa; así, mientras está aceptado el 1%, en nuestra experimentación obtuvimos un 33.3%.

En cuanto a lesiones secundarias nuestros datos están más o menos acordes con los obtenidos por la Comisión de fiebre aftosa americana; así, mientras ellos obtuvieron un 50% de casos con lesiones secundarias en animales de laboratorio, nosotros obtuvimos un 40%. No guardan estos datos relación con el porcentaje de mortalidad obtenida, ya que aceptamos la presentación de lesiones secundarias o sea generalización de la enfermedad como virulencia.

Finalmente, quisiéramos hacer hincapié en que, según los datos obtenidos y agotando todos los recursos a nuestro alcance, damos por sentado que los equinos son absolutamente negativos al virus de la fiebre aftosa y que como tal lo hemos usado para el diagnóstico diferencial de la cepa EVF.

CONCLUSIONES

Primera

La fuente de virus vesiculoso EVF, no pertenece a la especie de la fiebre aftosa

porque los equinos inoculados intradérmicamente desarrollaron lesiones, y los bovinos inoculados intramuscular e intravenosamente no demostraron lesión alguna.

Segunda

La fuente de virus vesiculoso EVF. pertenece a la especie del exantema vesiculoso del cerdo porque los cobayos, bovinos y ovinos inoculados intradérmicamente desarrollaron lesión.

Tercera

La, fuente de virus vesiculoso EVF. pertenece a la especie de la estomatitis vesiculosa porque los equinos, bovinos, ovinos y cobayos inoculados intradérmicamente desarrollaron lesiones características de dicha enfermedad.

Estudios posteriores necesarios.

Debido a la complejidad del problema,

el anterior trabajo no ha hecho sino aclarar una de las incógnitas que encerraba el estudio de este virus. Quedan aún muchas más, las cuales deben ser objeto de insaciable búsqueda por parte de nuestro competente cuerpo profesional. Nos permitimos enumerar a continuación algunos de ellos como de alto interés tanto práctico como académico:

Diagnóstico y tipificación de las cepas en aquellos sitios donde se haya diagnosticado clínicamente la enfermedad.

Contagiosidad directa o biológica.

Demostración del virus en el torrente circulatorio de las especies de campo.

Comprobación del exantema vesicular del cerdo como nueva entidad patológica en el país.

Variación inmunígena entre variante neurotrópa y epiteliotrópa.

Comprobación de variación a organotropo.

BIBLIOGRAFIA

- 1º—Rafael V. Reyes. Informe al Departamento de Ganadería, Ministerio de la Economía Nacional, 1943.
- 2º—J. R. Mohler. Vesicular Stomatitis of horses and cattle. Revision of the Bulletin N° 662, march 1940. U. S. Department of Agriculture.
- 3º—Hytura, F., y Marek, J. Special Pathology and Therapeutics of the diseases of domestic animals.
- 4º—W. A. Hagan. The infectious diseases of domestic animals.
- 5º—H. W. Schoening y J. Traum. Vesicular exanthema of swine, J. A. V. M. A., CVI, 814, pp. 30-33.
- 6º—R. Kelser. Veterinary Bacteriology.
- 7º—S. H. Gaiger y G. O. Davies. Veterinary Pathology and Bacteriology.
- 8º—P. Olitsky. Physical, Chemical and Biochemical properties studies of vesicular stomatitis virus. J. Exp. Med. XLV, 969-1927.
- 9º—Olitsky, Traum y Schoening, J. A. V. M. A. 1926-70-147.
- 10.—A. B. Crawford. J. A. V. M. A., vol. 43, N° 3, pp. 380, marzo 1937.
- 11.—M. Theiler. Ann. Trop. Med., 1930, 24, 249.
- 12.—W. M. Stanley. Virus Diseases, Cornell University Press, 1943.
- 13.—P. Olitsky, H. Cox., J. T. Syverton, J. Exp. Med. 1934. LIX, 159.
- 14.—Levaditi C., y Lepin P. Les ultravirus des maladies humaines. Tomo II, pp. 1.147.
- 15.—E. A. Eichhorn y C. A. Manthei. Propagation of the virus of vesicular stomatitis in the chick embryo. J. A. V. M. A., 1939, june, pp. 609.
- 16.—Hans Zinsser. Immunity principles and application in medicine and public health., 5th. edition.
- 17.—Olitsky P., y Sabin A. B. Effect of age on the invasion of the brain by virus instilled in the nose, J. Exp. Med. 1937, 66, pp. 15.
- 18.—H. W. Schoening. J. A. V. M. A., CVI., 814, 1945.
- 19.—J. Traum. J. A. V. M. A., 88, 316, 1936.
- 20.—Report of the Foot and Mouth Disease Commission of the United States Department of Agriculture.
- 21.—R. Bidart. La fiebre aftosa, 1928. Buenos Aires.

RESULTADOS DE INOCULACION EN ANIMALES DE LABORATORIO

Especie	Nº	Inoculado	Via	Materia	Murió	Dado de baja	Sintomas de E. V.	Lesiones secundarias	Temperatura máxima	(Cerebral)	Lesiones en antiposte (Cerebral)	Subposte	Pericardio	Endocardio	mi.
Cobayo	90	X-1/45	I. D.	I	X-10 +	X-20	+	Bucles	37.7	-	+	+	+	+	+
"	96	X-1	"	I	X-23 E	X-20	+	Langun. A. D.	38.2	+	+	+	+	+	+
"	27	X-9	"	Nº s: 90-96			+	A. D. A. I.		+	+	+	+	+	+
"	31	X-14	"	Nº 27	X-22 +		+			+	+	+	+	+	+
"	24	X-14	"	Nº s: 27-96			+			+	+	+	+	+	+
"	33	X-15	"	I	X-18 +	XI-17	+		39.1	-	+	+	+	+	+
"	102	X-15	"	I	X-18 + (1)		+		39.5	-	+	+	+	+	+
"	29	X-22	"	Nº 31	X-39 E		+	Bocaño A. D.		+	+	+	+	+	+
"	15	X-22	"	Nº 31	XI-12	XI-12	+	A. D.		+	+	+	+	+	+
"	19	X-30	"	M.I. Nº 1	XI-21	XI-21	+	Bocaño A. D.		+	+	+	+	+	+
"	18	X-30	"	M.I. Nº 1	XI-5 +		+			-	+	+	+	+	+
"	23	XI-6	"	F. Nº 1		XI-25	+			-	+	+	+	+	+
"	54	XI-13	"	Tern. 25		XII-20	+			-	+	+	+	+	+
"	25	XI-14	"	Tern. 21		XII-20	+			-	+	+	+	+	+
"	37	XI-14	"				+			-	+	+	+	+	+
"	-101-	X-15	I. C.	Nº 27	X-23 +		+	Keratitis	41.0	+	+	+	+	+	+
"	101	X-15	I. C.	Nº 27	X-23 -		+	Keratitis	41.0	+	+	+	+	+	+
"	28	X-15	"	I	XI-5 (2)		+			+	+	+	+	+	+
"	20	X-30	"	M.I. Nº 1	XI-3 -		+			+	+	+	+	+	+
"	21	X-30	"	M.I. Nº 1	XI-3 -		+			+	+	+	+	+	+
"	22	XI-6	"	F. Nº 1	XI-12 +		+			+	+	+	+	+	+
"	5	XI-15	I. C.	I	X-17 -		+		41.1	+	+	+	+	+	+
Conejo		X-15	I. C.	Con. Nº 5	X-27 X-26 +		+			+	+	+	+	+	+
Raton blanco		X-22	I. C.	Con. Nº 5		X-12	+			+	+	+	+	+	+
Rata blanca		X-22	I. D.	Con. Nº 5		X-12	+			+	+	+	+	+	+
		X-22	I. C.	Con. Nº 5		X-12	+			+	+	+	+	+	+

I. D.: Intradérmico.
 I. C.: Intracranial.
 I.: Inicial.
 M.I. Nº 1: Material de Inoculación Nº 1.

Murió X-10 +: Sucumbió a la enfermedad.
 Murió X-23E: Sacrificado in extrem.
 (1): Accidente.
 (2): Accidente.

A.D.: Anterior derecha.
 A.I.: Anterior izquierda.
 E.V.: Estómago.
 F. Nº 1: Material de Inoculación Nº 1.