

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

*Infección experimental con el virus APEU  
en ratones (Mus musculus albinus). Lesiones  
histopatológicas.*

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE**

**BIOLOGA**

**PRESENTA**

**MARIA EUGENIA OCHOA LARIOS**

**MEXICO, D. F.**



**1968**

**FACULTAD DE CIENCIAS**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mis queridos padres que con -  
su amor y abnegación me impul-  
saron a luchar por mis ideales.

A mis hermanos con cariño fraternal.

A mis profesores que tan acertadamen-  
te me inculcaron las bases de un estu-  
dio útil y productivo.

Fc.T-701

Deseo expresar mi mayor gratitud al Dr. Julio de Mucha Macías quien - con su incalculable sabiduría y experiencia, hizo posible la elaboración del presente estudio.

Asimismo, hago patente mi agradecimiento al Dr. Ignacio Avila Cisneros Director de Investigación en Salud Pública, por haberme dado todas las facilidades para llevar al cabo este trabajo.

Agradezco al Dr. Alfredo Dávalos Mata  
la valiosísima ayuda que amablemente  
me proporcionó.

De manera muy especial quiero agrade-  
cer al Dr. Alfredo Barrera Vázquez su  
apreciable colaboración y por haber a-  
ceptado tan gentilmente asesorar la pre-  
sente tesis.

Deseo agradecer a la Dra. Ma. Luisa Zárate Aquino todas las enseñanzas y sugerencias -- que tuvo a bien indicarme.

Mi profundo agradecimiento a todas y cada una de las personas que laboran en el Instituto Nacional de Virología por las atenciones y ayuda que inmerecidamente me han brindado.

# INDICE

INTRODUCCION

OBJETIVOS

MATERIAL Y METODOS

RESULTADOS

DISCUSION

RESUMEN

BIBLIOGRAFIA

\*

## INDICE DE ABREVIATURAS

1.- ag	antígeno
2.- CRL	cerebro de ratón lactante
3.- DICT <sub>50</sub>	dosis infectante media en cultivo de tejidos
4.- DL <sub>50</sub>	dosis letal media
5.- ECP	efecto citopatogénico
6.- FC	fijación del complemento
7.- HA	hemaglutinación
8.- IC	intracerebral
9.- IH	inhibición de la hemaglutinación
10.- INV	Instituto Nacional de Virología
11.- P-	pase
12.- RA	ratón adulto
13.- RL	ratón lactante



INFECCION EXPERIMENTAL CON EL VIRUS APEU EN RATONES  
(Mus musculus albinus). LESIONES HISTOPATOLOGICAS

INTRODUCCION

El virus Apeu pertenece al numeroso grupo de los arbovirus (arthropod borne-viruses, Andrewes, 1964) cuya principal característica es la de ser transmitidos por artrópodos hematófagos. Más de doscientos virus integran el grupo mencionado, que a su vez comprende varios subgrupos antigénicos, entre ellos el llamado grupo C (Causey, 1961), compuesto de más de nueve virus, uno de los cuales es el Apeu. Los virus de este grupo fueron aislados en su mayoría a partir de ratones y monos expuestos a la infección natural en el área de Belém, Brasil, pero se han obtenido también de mosquitos y del hombre (Andrewes, 1964).

Durante 1955, en la región selvática de Apeu fué expuesto a la infección un mono de la especie Cebus apella, del cual se aisló un virus designado como Apeu BE An 848 y que se considera como cepa prototipo (Causey, 1961). Como otros arbovirus, tiene la capacidad de aglutinar glóbulos rojos de ganso (Anser cinereus) siendo en este caso el pH óptimo de 6.0 y la temperatura de 27°C para que se realice dicha reacción. El virus puede ser filtrado utilizando filtros Seitz EK.

Al infectar al hombre, el virus Apeu provoca un síndrome febril (Causey, 1961); en otros vertebrados se han podido demostrar cuadros encefalíticos y de hepatitis consecutivos a la infección (De Paola, 1963).

En México se vienen realizando investigaciones sistemáticas sobre arbovirus a partir de 1962, (de Mucha, 1963) (a), habiéndose demostrado des-

de entonces la presencia de algunos de ellos, como el de la EEV (encefalitis equina de Venezuela), (de Mucha, 1963) (a), el virus Tlacotalpan (Scherer y col, 1967), el virus Nepuyo (Scherer y col, 1968), el virus Patois — (Zárate y col, 1968); también se conocía la existencia desde 1941 del virus de la EEE (encefalitis equina del Este) (Téllez Girón y Valdés O, 1941).

Asimismo por medio de encuestas serológicas se han encontrado infecciones, tanto en el hombre como en los animales, causadas por el virus de la ESL (encefalitis de San Luis), por Ilheus, (de Mucha, 1963) (b), por el de la EEO (encefalitis equina del Oeste), (de Mucha, 1963) (a), (Scherer y col, 1966) y por Dengue 1 y 2 (Campillo, 1966).

Hasta la fecha los estudios de arbovirus se han enfocado, en general, hacia su aislamiento e identificación, así como a la determinación de sus características físico-químicas y biológicas. Sin embargo, los conocimientos relativos a la patogenia e histopatología de las enfermedades causadas por ellos son, en proporción, muy limitados.

## OBJETIVOS

En el presente trabajo se pretende aportar datos que contribuyan a conocer con más amplitud la histopatología y patogenia de los arbovirus en general y la del virus Apeu en particular. Para ello se efectuaron infecciones experimentales en ratones blancos, inoculándolos con ese virus y examinando a distintos intervalos varios órganos para determinar las lesiones histológicas. Otro de los propósitos fué el asegurarse de que tales hallazgos pudieran ser atribuidos a la acción del virus, para lo cual fué necesaria la preparación de un plasma que contuviera anticuerpos antiApeu. Así se de -

mostró, por medio de las pruebas de neutralización y fijación del complemento, la existencia de anticuerpos específicos en los diferentes lotes de plasma que se utilizaron en la investigación.

## MATERIAL Y METODOS

### I. CEPA DE VIRUS

Se utilizó la cepa BE An 848 que fué obtenida por cortesía del Dr. Jordi Casals\*. Se recibió en el Instituto Nacional de Virología (INV) cuando había sido pasada nueve veces en cerebro de ratón lactante (CRL). Posteriormente se pasó una vez más en el mismo sistema.

También se utilizó la misma cepa cuando se encontraba en el pase-ocho (P-8), proporcionada gentilmente por el Dr. Sunthorn Srinhongse\*\* y en el INV se practicaron tres pases más en CRL. En ambas ocasiones el virus se recibió liofilizado, manteniéndose a temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$  el material procedente de los pases practicados en el INV.

### II. SUSPENSION PATRON DE VIRUS

A partir de los cerebros de los ratones que fueron inoculados con el P-2 INV se preparó una suspensión al 20% con solución salina de fosfatos -- albúmina de bovino al 0.75% (7.01 g de NaCl, 4.53 g. de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y 7.5 g de albúmina de bovino fracción V, aforados a 1 000 ml. con agua tridestilada); los cerebros se maceraron en un mortero colocado sobre hielo y-

\* Yale Arbovirus Research Unit Yale University, School of Medicine New Haven, Conn. U.S.A.

\*\* Gorgas Memorial Laboratory. Rep. Panamá, Centro América.

se centrifugó el macerado a 0°C durante 15 minutos a 400 g. El sobrenadante se distribuyó en volúmenes de 0.5 ml. en ampulas sumergidas en un recipiente conteniendo alcohol metílico - hielo seco. El producto se liofilizó - (Usifroid Procédés Rieutord) durante tres horas; las ampulas se cerraron a la flama de un mechero y se guardaron en hielo seco.

### III. TITULACIONES DEL VIRUS EN RATONES LACTANTES (RL) Y ADULTOS (RA).

Para determinar el título del virus Apeu tanto en RA como en RL, - el virus fué inculado por vía intracerebral (IC).

Es de hacerse notar que en cada experimento se abrió una nueva -- ampula del virus liofilizado a partir de la suspensión patrón (P-3, INV).

a) RL. Se inyectaron cincuenta y tres, de uno a tres días de nacidos, con diluciones del virus de  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$  en volumen de 0.02 ml. por cada ratón, utilizando una camada (seis a ocho ratones) por dilución. Los sobrevivientes se observaron durante catorce días.

b) RA. Grupos de cinco ratones de cuatro semanas de edad fueron -- inoculados usando diluciones de  $10^{-0.7}$ ,  $10^{-1.7}$ ,  $10^{-2.7}$  y  $10^{-3.7}$ . Después - de ser observados por un lapso de 21 días, cada uno de los sobrevivientes fué sangrado y los plasmas separados individualmente, se guardaron a -15°C.

El cálculo de la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) del virus, que indica la potencia o título de éste, fué hecho de acuerdo con el método Reed - Muench, (1938).

#### IV. SISTEMAS UTILIZADOS

1. Ratones
2. Cultivo de tejidos.

1. Los ratones (Mus musculus albinus) que se utilizaron en este trabajo se obtuvieron de una de las colonias existentes en el INV y que proceden de la cepa CFW. Las edades a las que fueron inoculados variaron de uno a cuatro días (RL) hasta cuatro ó cinco semanas de nacidos (RA).

2. La cepa del virus Apeu fué inoculada en dos diferentes clases - de células: renales de criceto (Mesocricetus auratus) en cultivo primario y - renales de mono (Cercopithecus aethiops) de la línea celular BS-C-1 (Hopps, 1962).

La preparación de las primeras se hizo por la técnica que habitualmente es seguida en la sección de arbovirus del INV (de Mucha y Morilla, 1967), las células se diluyeron finalmente 1:250, y después de ocho días de haber sido sembradas la capa celular estaba completa en todos los tubos.

Las células BS-C-1 fueron utilizadas a partir del P-241, y se cultivaron en tubos de 16 x 150 mm, los cuales fueron sembrados con células de una botella de cultivo de 120 ml, con el desarrollo celular completo. Las células fueron desprendidas de la botella, con tripsina Difco al 0.25%, añadiendo 2 ml de la enzima a la capa celular. Después de permanecer en contacto con las células durante un minuto en la estufa a 37°C, la tripsina siguió actuando otros diez minutos más, pero evitándose, en este último lapso una acción directa sobre las células; para ello se dió vuelta a la botella - con el fin de que la tripsina se depositara en la cara opuesta a la que sostiene la capa celular. Cuando las células empezaron a desprenderse se des-

cartó la tripsina por decantación y se añadieron 20.75 ml de medio 199 -- (Morgan y col, 1950), (100 ml de medio 199 10 X concentrado, Microbiological Associates Inc.,) antibióticos (solución con 1 000 UI de penicilina G potásica cristalina y 1 000 microgramos de sulfato de dihidro estreptomina por ml), 100 UI/ml de suspensión de Mycostatín y 166 microgramos/ml de sulfato de kanamicina, se aforan a 1 000 ml con solución salina balanceada de Hanks (Hanks y Wallace, 1949); 16% de suero de ternera previamente inactivado a 56°C durante 30 minutos, solución de antibióticos, así como NaHCO<sub>3</sub> al 4% en cantidad suficiente para ajustar el pH a 7.0. Las células se desprendieron totalmente con ayuda de una pipeta. De esta suspensión se sembraron 0.5 ml en cada tubo. Después de dos días se agregó 0.5 ml de medio 199, con suero de ternera al 5% y antibióticos al 1%, a cada tubo. A los cinco días de haberse sembrado estaban en condiciones de ser inoculadas.

#### V. PREPARACION DE PLASMA HIPERINMUNE

Para la obtención de un plasma que contuviera anticuerpos para el virus Apeu, se utilizó la siguiente técnica:

Quince RA fueron inculados por vía intraperitoneal con 0.1 ml de virus Apeu diluído 1:50 en solución de Hanks con antibióticos. A intervalos de siete días se efectuaron otras dos inoculaciones en la misma forma. Treinta días después de la primera inoculación se tomó una muestra de sangre de todos los ratones. La extracción fué practicada en los vasos sanguíneos periorbitales, utilizando una pipeta Pasteur humedecida con heparina diluída -- 1:5 000 en solución de Hanks. Después de separar el plasma centrifugando a 400 g durante 15 minutos, dicho plasma se guardó a -15°C. Ocho días --

más tarde se repitió la misma operación para obtener un volumen mayor de plasma. En esta ocasión se extrajo toda la sangre que fué posible, hasta ocasionar la muerte de los animales.

#### VI. ELABORACION DE ANTIGENO (ag) PARA PRUEBAS DE INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION (IH) Y FIJACION DEL COMPLEMENTO (FC)

Antígeno hemaglutinante. Trabajos efectuados en otros laboratorios (Yale University, Cornell University) (Zárate, comunicación personal) han demostrado que con los virus pertenecientes al grupo C se puede obtener un antígeno hemaglutinante a partir de hígado ó suero (Horsfall y Tamm, 1965) -- una vez que los virus han sido adaptados en RL a través de pases sucesivos y frecuentes y también que después de un número variable de pases se observa marcada elevación del título tanto en sangre como en ciertos órganos, especialmente el hígado. Considerando esas experiencias, en dos ocasiones se intentó preparar, con la suspensión patrón del virus Apeu, ag hemaglutinante a partir del suero sanguíneo de RL inoculado por vía IC con un volumen de 0.02 ml; en las dos ocasiones se procedió de la siguiente forma:

Una vez que los ratones presentaron síntomas de enfermedad (temblor generalizado, dificultad en la marcha, escaso contenido estomacal) (a partir de las 30 horas), su sangre fué obtenida de las venas yugulares seccionadas depositándola en tubos de Khan y centrifugándola a 400 g a 0°C por 30 minutos. El suero así obtenido se diluyó 1:10 en solución salina de borato - albúmina de bovino al 0.75% (7.5 g de albúmina de bovino fracción V llevados a 1 000 con solución salina de borato que se prepara con 80 ml de NaCl 1.5 M (87g/l) 100 ml de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> .5 M (31 g/l) y 24 ml de NaOH -

1.0 M (40 g/l) aforados a 1 000 ml con agua tridestilada), y fué guardado por no más de cuatro días en ampulas selladas a la flama las que se mantuvieron a  $-15^{\circ}\text{C}$  antes de inocularlo a nuevas camadas.

El primer intento comprendió ocho pases y en el sexto de ellos cosecharon suero e hígado para inóculos posteriores.

El segundo intento alcanzó cinco pases; del pase cuatro se cosechó además de suero e hígado, cerebro.

A partir de hígado (p-6) se intentó la preparación de Ag hemaglutinante siguiendo la técnica de sacarosa - acetona descrita por Clarke y Casals, (1958).

Antígeno para FC. Con los cerebros e hígados del P-4 se preparó ag "crudo" de la siguiente manera:

Los distintos órganos fueron triturados, por separado para obtener una suspensión al 20% en solución salina normal, de cada tejido, la cual fué mantenida durante 18 horas en refrigeración a  $5^{\circ}\text{C}$ . Después, esas suspensiones fueron centrifugadas a 10 000 g, 30 minutos a  $0^{\circ}\text{C}$  y el sobrenadante fué depositado en ampulas a razón de 0.5 ml por cada una, las que fueron selladas a la flama y se almacenaron a  $-15^{\circ}\text{C}$ . Usando la misma técnica, se prepararon ag de cerebro e hígado normales procedentes de animales sin inocular.

## VII. SEROLOGIA. PRUEBAS DE HEMAGLUTINACION Y FIJACION DEL COMPLEMENTO

Hemaglutinación (HA). Esta prueba se llevó al cabo siguiendo la -



técnica descrita por Clarke y Casals (1958), adaptada a microplaca (Shope, 1963).

Con el Ag de hígado fueron preparadas diluciones dobles (de 1:4 a 1:512) en dos microplacas, con volúmenes de 0.05 ml; a cada dilución fué agregado 0.05 ml de una suspensión de glóbulos rojos de ganso adulto previamente lavados en solución dextrosa-gelatina-veronal y ajustados a una densidad óptica de 0.45 (espectrofotómetro Coleman Junior) en solución salina amortiguadora de fosfatos a pH 6.0, utilizando una longitud de onda de 490 milimicras.

Una de las placas se incubó a 37°C y la otra a temperatura ambiente (27°C) durante 60 minutos.

Fijación del Complemento. Se hicieron pruebas de este tipo en microplaca de acuerdo con la técnica descrita por Zárate, (1968). En la primera fué probado el ag "crudo" preparado en CRL, utilizando glóbulos rojos de carnero lavados en solución de Kolmer (NaCl al 0.85% y MgSO<sub>4</sub> al 0.12%) y ajustados a una densidad óptica de .14 (espectrofotómetro Coleman Junior).

El plasma hiperinmune antiApeu fue inactivado durante 30 minutos a 60°C haciendo diluciones dobles de 1:4 a 1:512 y de 1:4, 1:16, 1:64, 1:256, 1:1024, 1:4096 para el ag.

En la segunda prueba, se utilizó el ag "crudo" de hígado de RL, siguiendo la metodología antes descrita y empleando las siguientes diluciones: 1:8, 1:32, 1:128, 1:512, 1:2048, 1:4096, 1:8192, 1:16384.

En la última prueba fueron incluidos los plasmas de los RA que se inocularon con el fin de titular el virus, así como los utilizados en la preparación de plasma hiperinmune, en diluciones de 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, contra 4 a 8 unidades de ag diluido 1:32.

En todas las pruebas quedaron incluidos los siguientes testigos:

- a) Plasma: La dilución más concentrada de éste, más complemento y glóbulos rojos.
- b) ag Apeu: Consistió en diluciones del complemento conteniendo de 1 a 4 unidades del mismo y la dilución más concentrada del ag contenida en la prueba, más glóbulos rojos.
- c) ag normal: Que es lo descrito en b) pero con ag normal.
- d) Titulación simultánea del complemento en solución de Kolmer, - igual que en b) pero sin ag.
- e) Titulación simultánea de las de las unidades de ag Apeu contenidas en la prueba y demostradas con un plasma positivo conocido.

#### VIII. PRUEBAS DE NEUTRALIZACION

Se realizaron en dos tipos de sistemas:

- a) Cultivo de tejidos: (renales de criceto y células BS-C-1)
  - b) Ratones lactantes.
- a) El virus fué inoculado en cultivos primarios de células renales de criceto cuando éstas tenían ocho días de haberse sembrado, diluyendo el virus en solución de Hanks de  $10^{-0.7}$  a  $10^{-4.7}$ ; inoculando en cada tubo un volumen de 0.1 ml e incluyendo tres tubos por cada dilución. Se observaron al microscopio diariamente y cuando acidificaron el medio, éste fué removi-

do sustituyéndolo por medio de mantenimiento (Melnick, 1955) con suero de ternera al 2% y solución de antibióticos.

En los cultivos de células BS-C-1, el virus se inoculó en diluciones de  $10^{-0.7}$  a  $10^{-5.7}$  las que fueron hechas en medio 199. El volumen fué el mismo que en el caso anterior y se usaron tres tubos por cada dilución. Al quinto día después de inoculados se hizo un nuevo pase con las células y el medio nutritivo provenientes de los tubos inoculados con la dilución  $10^{-1.7}$ , para lo cual se agregó 0.1 ml a tres nuevos tubos con células BS-C-1; posteriormente se repitió este mismo experimento en tubos de Leighton que tenían en su interior una laminilla cubreobjeto, y las células adheridas a ésta se tiñeron con hematoxilina - eosina, cuatro días después de inoculadas. Las células que crecieron en los tubos sin laminilla fueron desprendidas mecánicamente a los cuatro días de inoculadas mezclándolas con el medio que las nutría. Los 3 ml se distribuyeron en ampolletas que fueron guardadas en hielo-seco. Con el contenido de una de las ampolletas se inocularon cinco camadas de RL para corroborar la presencia del virus, usando diluciones con factor 1 log de  $10^{-0}$  a  $10^{-4}$ . Para estudio histopatológico se fijó en formalina al 10%, un ratón por cada dilución en el momento de presentar signos francos de enfermedad. La fijación se hizo como se indica en el punto X que se refiere a las técnicas histológicas seguidas en este trabajo.

También se hizo una prueba de neutralización en células BS-C-1 inoculando mezclas de virus Apeu ( $10^{-2.7}$  a  $10^{-4.7}$ ) mas plasma antiApeu a volúmenes iguales de 0.2 ml de cada uno. El testigo del virus consistió en la inoculación de éste, mezclado en partes iguales con solución salina de borato - albúmina de bovino y diluido de  $10^{-1.7}$  a  $10^{-6.7}$ . Todas las -

mezclas se incubaron antes de inocularse a 37°C durante 60 minutos.

b) Se hicieron dos pruebas de neutralización para asegurarse de la existencia de anticuerpos en el plasma hiperinmune antiApeu preparado en RA. Se inocularon cuatro camadas de RL con mezclas virus + plasma utilizando las diluciones  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  de aquél, previamente incubadas en baño maría a 37°C durante 60 minutos. Los ratones se observaron 14 días. Al mismo tiempo se inocularon como testigo del virus, cinco camadas por vía IC con un volumen de 0.02 ml empleando diluciones del virus de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$  también incubadas como se indicó anteriormente; cuando los ratones empezaron a mostrar signos de enfermedad se fijaron en fomalina al 10%.

La segunda prueba se hizo simultáneamente con la inoculación de RA, inoculando una camada de RL con mezcla virus (diluído  $10^{-2}$ ) + plasma antiApeu. A continuación dicha mezcla se incubó en la forma antes descrita. Se utilizó esa dilución por ser la inoculada en RA. El testigo de esta prueba consistió en la inoculación de camadas de RL con el virus diluido de  $10^{-0.7}$  a  $10^{-5.7}$ .

## IX. INOCULACION A RATONES ADULTOS

Durante el curso del trabajo fueron inoculados dos grupos de RA con diferentes  $DL_{50}RL$ , sacrificándolos (como se indica en el punto X) a diversos intervalos; en cada ocasión se incluyeron como testigos, ratones que fueron inoculados con el diluyente respectivo.

En la primera ocasión se inocularon 58 RA por vía IC con 160  $DL_{50}RL$  en volúmenes de 0.03 ml y 17 RA por la misma vía y con igual volumen con el diluyente del virus (solución salina de borato-albúmina de bovino al 0.75%). Se sacrificaron en grupos de seis diariamente a partir del-

cuarto día hasta el séptimo; después el décimo y a partir del duodécimo, cada tres días hasta el vigésimo primero y por último el trigésimo día; además se sacrificó un ratón en cada ocasión perteneciente al grupo testigo.

El segundo grupo consistió de ciento un ratones, de los cuáles, 30 recibieron 800 DL<sub>50</sub>RL; 41 se inocularon con la mezcla virus + plasma anti-Apeu con el fin de establecer el grado de neutralización del virus en RA. Para investigar la toxicidad del plasma, se inocularon quince RA por vía IC con 0.03 del plasma antiApeu sin diluir e incubado previamente una hora a 37°C. En igual forma se inocularon 15 RA con el diluyente del virus (solución salina de borato-albúmina de bovino al 0.75%) incubado tal como se ha mencionado. Este grupo representó el testigo del diluyente. En cada vez se sacrificaron cinco ratones de los dos primeros grupos y dos ratones de cada grupo testigo, en las siguientes fechas: a partir del tercer día con intervalos de tres días hasta el décimoquinto, después el vigésimo primero y el trigésimo días.

De manera simultánea a la inoculación de cada grupo de RA, fueron inoculados cuando menos dos camadas: Una con la dilución empleada para inocular a los RA y otra con el diluyente del virus (controles de viabilidad del virus y de inocuidad del diluyente).

También fueron sacrificados veinticuatro ratones (10 RA y 14 RL) no inoculados, para conservarlos como testigos de la colonia de ratones de la granja del INV. Diariamente se tomaba un RL y un RA y se fijaban en formalina al 10%.

## X. ESTUDIO HISTOPATOLOGICO

Para la observación de los daños causados por el virus Apeu, se sacrificaron los ratones sin emplear ningún anestésico; solamente eran descerebrados e inmediatamente se extraían, en el caso de los adultos, los siguientes órganos: hígado, bazo, riñones, pulmones, corazón y cerebro. Los RL eran cortados sagitalmente, quitando la piel de los costados para una mejor penetración del fijador (formalina al 10%), en el cuál permanecían un mínimo de veinticuatro horas. Los ratones del primer grupo que se encontraron muertos, fueron procesados de manera similar. En el caso de los RA, una vez que los órganos estuvieron bien fijados, se tomaron fragmentos representativos de éstos y se incluyeron en parafina; se procedió en igual forma con medio cuerpo de cada RL. Los cortes se hicieron a 7 micras de grosor. La técnica de tinción fué hematoxilina-eosina. Las preparaciones se observaron en un microscopio Carl Zeiss, con objetivos de 2.5, 6.3, 16 y 40 X y con oculares de 8X.

## RESULTADOS

### CEPA DE VIRUS Y TITULACION DEL MISMO EN RATONES LACTANTES -- (RL) Y RATONES ADULTOS (RA).

Los RL inoculados con la cepa BE An 848 P-9 fueron observados durante ocho días sin mostrar síntomas de enfermedad y por lo tanto se descartaron. Por el contrario, los RL que se inocularon con el P-8, murieron después de 63 horas y en el pase subsecuente, el período de sobrevivencia se redujo a treinta y nueve horas.

Los resultados obtenidos en la titulación del virus tanto en RL co-

mo en RA fueron los siguientes:  $10^{-4.7}$  DL<sub>50</sub>RL/0.02 ml y  $10^{-1.8}$  DL<sub>50</sub>RA/0.02 ml, respectivamente.

#### EFFECTO CITOPATOGENICO ( ECP ) DEL VIRUS EN CULTIVOS CELULARES

Se ha demostrado que los virus del grupo C no producen ECP, ni placas, en cultivos de embrión de pollo y células renales de pato. En células de mono (Macacus rhesus) el ECP es inconsistente y solo es posible obtener la formación de placas (Hsiung, 1964).

De los sistemas empleados en esta experiencia, únicamente las células BS-C-1 mostraron cambios al ser inoculadas con el virus. El ECP fué constante y se mostró sumamente claro a partir del quinto día después de la inoculación y entre el sexto y séptimo días, la destrucción de la capa celular fué total. Dicho efecto consistió en marcada picnosis de las células que tendían a alargarse y desprenderse de la pared del tubo dejando ver espacios desprovistos de ellas, mas evidentes a medida que transcurría el tiempo y adquiriendo un aspecto de malla; (Fig. 2) como consecuencia, hubo un notable incremento de la acidez del medio, manifestado como anteriormente señalaron Karabatsos y Buckley (1967), por la conversión a amarillo claro del indicador rojo de fenol del medio. Las células BS-C-1 sembradas en los tubos de Leighton que crecieron en las laminillas cubreobjetos se observaron al microscopio después de haber sido teñidas, notándose con mas claridad los daños antes descritos (Fig. 4). En cambio, no se observó ECP en las células de criceto, lo que vino a confirmar resultados previamente obtenidos (1965) en la sección de arbovirus del INV.



##



Fig. 1 Cultivo de células BS-C-1 normales, no coloreadas usando filtro (190 X)



Fig. 2 Cultivo de células BS-C-1 in vitro inoculado con virus Apeu (sin diluir) - P-6 (P-3 en cultivo de tejidos). Nótese degeneración nuclear y granulación del citoplasma. (400 X).



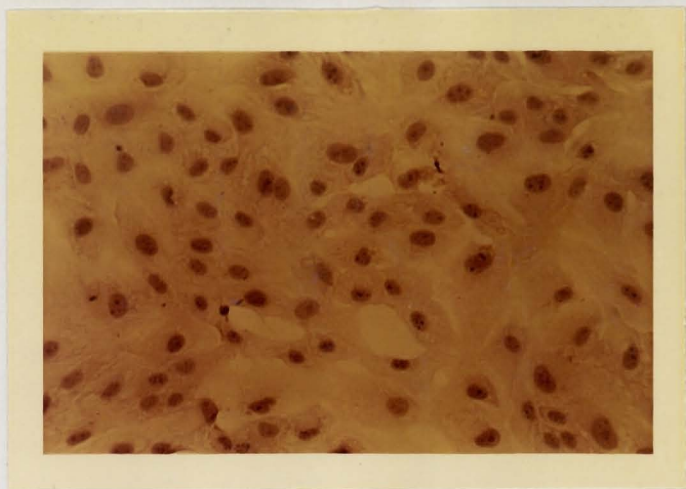


Fig. 3 Cultivo de células BS-C-1 a los cuatro días de haber sido sembradas. Nótese características normales tanto del citoplasma como de los núcleos. Coloración H-E (400 X).



Fig. 4 Cultivo de células BS-C-1 inoculado con virus Apeu sin diluir P-6 (P-3 en cultivo de tejidos) Véase la escasez y degeneración de las células con picnosis nuclear. Coloración H-E (400 X).

PREPARACION DE PLASMA INMUNE Y ANTIGENOS HEMAGLUTINANTE - (HA) Y DE FIJACION DEL COMPLEMENTO (FC). PRUEBA DE NEUTRALIZACION.

De los quince RA que se inyectaron para la producción de plasma hiperinmune antiApeu, solamente murió uno, dos días después de la segunda inoculación; en esa misma fecha, dos ratones presentaron síntomas de enfermedad pero dos días mas tarde se recuperaron; el resto de los ratones no -- mostró síntomas anormales.

El contenido de anticuerpos en el plasma, se investigó mediante las pruebas de FC y neutralización. No se llevó al cabo la prueba de inhibición de la hemaglutinación (IH) en virtud de que el antígeno (ag) HA -- preparado resultó incapaz de aglutinar los eritrocitos tanto a 37°C, como a temperatura ambiente, aún utilizándose a la dilución 1:4. En cambio, si se logró obtener un ag eficaz para la prueba de FC.

Los resultados en la primera prueba de FC fueron los siguientes: - Una unidad de Ag se encontró en la dilución 1:256 y una unidad de plasma en la dilución 1:8; se contó con 1.5 unidades exactas de complemento. En la segunda prueba los resultados con el ag de hígado, fueron exactamente -- iguales que en la prueba anterior, con la única diferencia de que se conta\_ ron con dos unidades exactas de complemento. Cuando se probaron los once plasmas empleados para la titulación del virus, fueron positivos de 1:4 a -- 1:16. De los ratones inmunizados, cuatro plasmas resultaron positivos en las diluciones 1:4 y 1:8, en dos no fué posible demostrar anticuerpos fijadores -- del complemento. De acuerdo con los testigos del plasma ninguno resultó ser anticomplementario (Cuadro 2).

Por lo que se refiere a los resultados de las pruebas de neutralización en cultivo de células BS-C-1, en primer término se obtuvo el título del virus en ese sistema celular que fué de  $10^{-5.4}/0.1$  ml DICT<sub>50</sub> (dosis infectante media en cultivo de tejidos).

Los tubos inoculados con las células y el medio nutritivo de la dilución  $10^{-1.7}$  mostraron ECP a partir del tercer día (P-2 en cultivo de tejidos, P-5 del virus).

Los RL que fueron inyectados con esta misma suspensión comenzaron a morir cuarenta y tres horas mas tarde. Cuando se inoculó la mezcla virus + plasma antiApeu, se encontró que el título fué de  $10^{-2.7}$  y en el testigo de  $10^{-4.1}$  de lo que se deriva que el log negativo del índice de neutralización fué de 1.4. En células inoculadas con virus + plasma se notó cierto efecto tóxico provocado muy probablemente por el plasma; no obstante, la capa celular permaneció íntegra durante los nueve días de observación.

En la primera prueba de neutralización que se llevó al cabo en RL, los que fueron inoculados con la mezcla virus + plasma antiApeu, no manifestaron ningún signo de enfermedad durante siete días; a partir del octavo, comenzaron a enfermar los ratones que fueron inoculados con la dilución  $10^{-1}$  y murieron entre el noveno y décimosegundo días. El título fué de  $10^{-1.4}/0.02$  ml y en el testigo de virus Apeu fué de  $10^{-4.5}/0.02$  ml, de manera que el log negativo del índice de neutralización fué equivalente a 3.1. En la segunda prueba, el título del plasma fué  $\leq 10^{-2}/0.02$  ml y en el testigo fué de  $10^{-5.3}/0.02$  ml, de lo que se dedujo que el log negativo del índice de neutralización fué  $\geq 3.3$ .

## ESTUDIO HISTOPATOLOGICO

Las observaciones y diagnósticos de este estudio fueron realizados en la sección de histopatología del INV.

Se estudiaron 118 casos, con un promedio de cuatro a cinco preparaciones por cada uno, que hicieron un total de quinientas cuarenta y una. Después de llevar al cabo una minuciosa observación de éstas, se estableció que las lesiones aparecieron principalmente en tres órganos: cerebro, hígado y pulmón. No se encontraron caracteres anormales en ninguno de los cortes de bazo; por lo que se refiere al corazón, en dos cortes se observó el pericardio engrosado, infiltrado con células plasmáticas y leucocitos. En uno de ellos, también se observaron focos de miocarditis, infiltrados con polinucleares.

Además de las lesiones que se citan en los cuadros, se observaron alteraciones no mencionadas en ellos, por no considerarse como lesiones específicas. Dichos hallazgos fueron: zonas de hemorragia reciente y congestión en cerebro, pulmón y riñón (principalmente al nivel de los glomérulos) debidas al traumatismo que provocó la muerte. También se encontraron focos de hematopoyesis en los RL.

A continuación se presenta un resumen de los datos obtenidos de este estudio:

En el cuadro No. 1 se especifican las lesiones histopatológicas que se observaron en el hígado y el cerebro de ratones de tres a cuatro días de edad que recibieron el virus Apeu por vía IC. Distintos grupos de ratones fueron inoculados con diluciones crecientes del virus de  $10^{-1}$  a --

$10^{-5}$ . Puede observarse en dicho cuadro que las lesiones se presentaron en el cerebro de los ratones inoculados con todas las diluciones ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ) en forma consistente. Se manifestaron esas lesiones por zonas de degeneración neuronal y edema. (Fig. 5) En el hígado se apreció necrosis sólo hasta la dilución  $10^{-3}$ , (Fig. 6) e infiltración inflamatoria hasta  $10^{-4}$ . El inóculo contenido en la dilución  $10^{-5}$  no produjo ninguna lesión apreciable en el hígado.

También en el cuadro 1 se ilustran los resultados histopatológicos relacionados con la prueba de neutralización. En este caso, el virus fué inoculado junto con un plasma hiperinmune antiApeu en diluciones de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  a RL los que sobrevivieron a la infección del virus, excepto en el caso de una camada en el cual, nueve días después de la inoculación, los animales presentaron síntomas de enfermedad y murieron; estos ratones recibieron el virus diluído  $10^{-1}$ . Las lesiones histopatológicas observadas en el grupo de ratones que fué inoculado con virus + plasma hiperinmune ocurrieron únicamente en el cerebro y consistieron en edema y necrosis, presentándose en las diluciones  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ ; en los ratones que recibieron la dilución  $10^{-4}$  no se observó necrosis y sí zonas de degeneración neuronal y edema. Los animales inyectados con el virus diluído  $10^{-3}$  no tuvieron lesiones histopatológicas demostrables. En el grupo de los ratones que estamos considerando, no se apreciaron imágenes patológicas en el hígado en ninguna de las diluciones del virus empleadas. Inclusive en aquéllos ratones inoculados con la dilución  $10^{-1}$  que enfermaron y murieron, tampoco presentaron daños en el hígado.

Los RL inoculados con células BS-C-1 infectadas con el virus Apeu, y suspendidas en el medio de cultivo celular, enfermaron dentro de las primeras cuarenta y ocho horas y murieron a consecuencia de la infección. El inóculo (células + medio) fué inyectado a los ratones, sin diluir y en las diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-3}$ , -

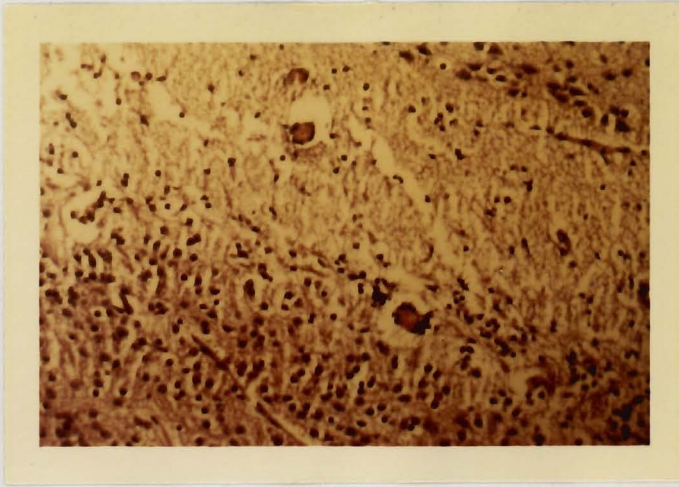


Fig. 5 Corte de cerebro de ratón lactante inoculado con virus Apeu diluído  $10^{-3}$  en el que se observa edema y dos venas con infiltrado perivascular coloración H-E (190 X).

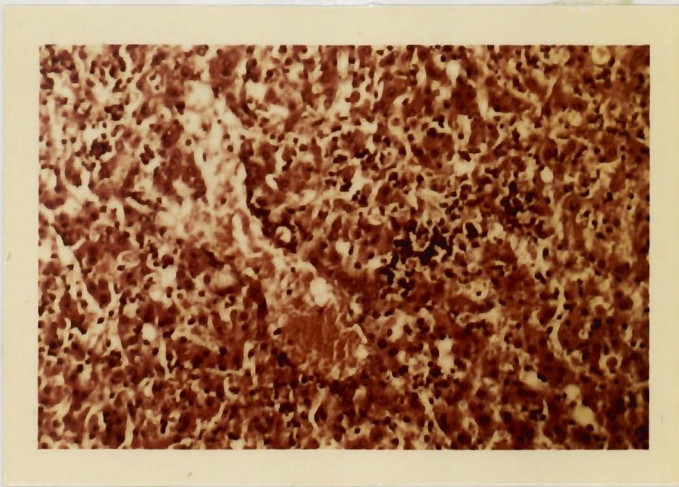


Fig. 6 Corte de hígado de ratón lactante inoculado con virus Apeu diluído  $10^{-3}$  en el que se nota necrosis difusa e infiltrado mononuclear. Coloración H-E (190 X).

$10^{-4}$ . El estudio histopatológico mostró que en estos animales se presentaron esencialmente las lesiones antes descritas, es decir, se observaron alteraciones en hígado y cerebro. El tamaño de las zonas de necrosis fué menor en los casos en que el virus estaba más diluído. Por otra parte el grado de degeneración neuronal fué constante en todos los ratones, independientemente de la concentración de virus que recibieron.

En el cuadro 2 se anotan los resultados de la titulación del virus Apeu -- en RA, desde el punto de vista histopatológico. Por otra parte, se intenta relacionar las lesiones histopatológicas encontradas según el número de partículas de virus que se inocularon, con el grado de respuesta inmunológica medida por la prueba de FC.

En el caso de los RA el virus produjo ocasionalmente síntomas de enfermedad y muerte. Los ratones de este grupo fueron sacrificados veintiún días después de la inoculación. La naturaleza de las lesiones es similar a las que se describieron a propósito de los RL y no guardan proporción directa entre su presencia y el número de partículas empleadas. Así por ejemplo, en el hígado se observaron zonas de necrosis en uno de tres ratones inoculados con el virus diluído 1:5; en los dos ratones inoculados con la dilución  $10^{-1.7}$  también se observaron dichas zonas; tal cosa no ocurrió en los tres animales inoculados con la dilución siguiente ( $10^{-2.7}$ ) volviendo a repetirse el fenómeno en uno de los cuatro ratones inoculados con la dilución  $10^{-3.7}$ . Otro tanto podía decirse de las lesiones observadas en los cerebros de estos ratones. Por lo que se refiere a la respuesta inmunológica, puede verse que se produjo en todos los ratones, existiendo variaciones en el título de anticuerpos que no son lo suficientemente significativas para ser tomadas en cuenta y tampoco es posible correlacionar la intensidad de la respuesta inmunológica con los daños histopatológicos encontrados. En el grupo de veinte RA que fueron inmunizados en tres ocasiones inoculando en cada una de ellas 0.1 ml de virus Apeu por vía intraperitoneal, fueron -

sacrificados cuatro para practicar estudio histopatológico, así como para determinar la presencia de anticuerpos FC. Uno de ellos tuvo lesiones del tipo antes descrito -- tanto en cerebro como en hígado y no reaccionó inmunológicamente pues el título de anticuerpos FC resultó menor de 1:4. En otro ratón tampoco hubo producción de anticuerpos y sí se presentaron lesiones en hígado y cerebro. Uno de los animales restantes presentó sólo infiltración perivascular en el cerebro y en su suero se encontró un título de anticuerpos de 1:4. El cuarto ratón también presentó zonas de degeneración neuronal en cerebro e infiltración inflamatoria en hígado, así como una respuesta inmunológica traducida por la presencia de anticuerpos en un título de 1:8.

La inoculación de diferentes  $DL_{50}$  RL a RA dió como resultado la aparición de lesiones en cerebro, hígado y pulmón; los datos correspondientes a la naturaleza de ellas, así como los relativos al número de días que transcurrieron entre la inoculación y la cosecha de los órganos, se encuentran anotados en los cuadros 3 y 4 -- que, por otra parte, contienen los hallazgos obtenidos en los órganos de los ratones que se incluyeron como testigos en las experiencias respectivas.

La naturaleza de las lesiones histopatológicas en cerebro e hígado corresponden a las descritas anteriormente en los cuadros 1 y 2. En el cerebro, tanto al inocular 160 como 800  $DL_{50}$ RL, tuvieron preponderancia las zonas de degeneración neuronal y la infiltración perivascular; (Fig. 7) en cambio, los ratones que recibieron -- 160  $DL_{50}$ RL (cuadro 3), mostraron zonas de necrosis cerebral, las que no se apreciaron en ninguno de los ratones inoculados con 800  $DL_{50}$ RL (cuadro 4). En el grupo que recibió esta última dosis, se observó degeneración vacuolar de los hepatocitos que no fué perceptible en los ratones inoculados con 160  $DL_{50}$ RL. En ambos grupos se apreciaron otras lesiones en el hígado representadas por zonas de necrosis e infiltración inflamatoria (Figs. 8 y 9). Respecto a los pulmones, en los dos grupos se encontraron zonas de bronconeumonía e infiltración intersticial, aunque dicho hallazgo fué constan



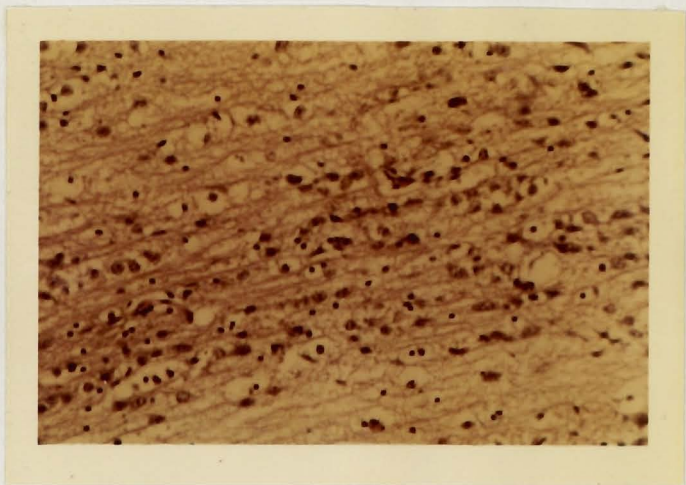


Fig. 7 Corte de cerebro de ratón adulto inoculado con 160 DL<sub>50</sub> RL de virus Apeu en el que se observa edema y degeneración neuronal. Coloración H-E -- (190 X).

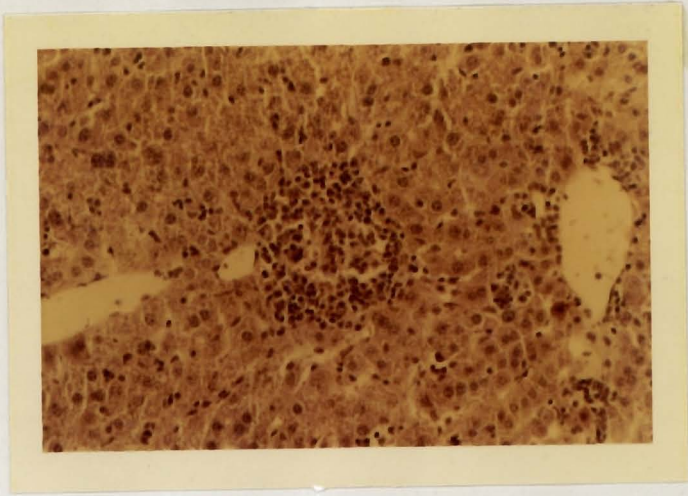


Fig. 8 Corte de hígado de ratón adulto inoculado con 160 DL<sub>50</sub>RL de virus Apeu en el que se observa un foco de necrosis bien limitado. Coloración H-E - (190 X).

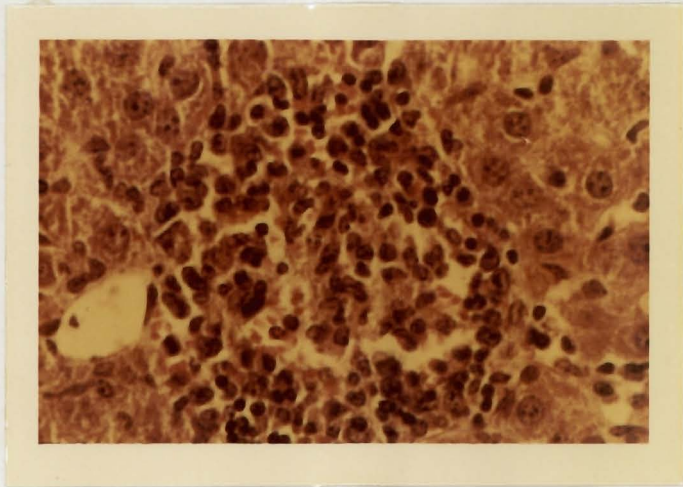


Fig. 9 El mismo foco de necrosis a mayor aumento (400 X). Nótese infiltrado - principalmente mononuclear. Coloración H-E.

te.

Las lesiones observadas en el grupo testigo de RA (cuadro 3) fueron de igual naturaleza que las que se encontraron en los inoculados con virus, pero se notó que en el cerebro hubo edema en igual proporción y la infiltración perivascular fué bastante menor. En el hígado, las zonas de necrosis se presentaron con menor frecuencia y la infiltración inflamatoria se apreció solamente en dos casos. En dos casos se observaron en el pulmón zonas de bronconeumonía, también la infiltración intersticial disminuyó. En el cuadro 4 se observa que la incidencia de edema fué similar en los ratones inoculados con el virus. En los ratones testigo la infiltración inflamatoria en tejido hepático fué mayor, y en pulmón se encontraron zonas de bronconeumonía exclusivamente en un caso, sin apreciarse infiltración intersticial.

En el cuadro 5 se presentan en forma comparativa, las alteraciones observadas en ratones adultos y lactantes que recibieron el virus y los que fueron sacrificados sin haber sido previamente inoculados. Los porcentajes anotados en el cuadro, revelan que en los grupos testigos también se observaron lesiones, especialmente en hígado y en menor proporción en cerebro. Sin embargo, la frecuencia de estas lesiones resultó menor que la encontrada en los grupos que recibieron el virus Apeu.

## DISCUSION

Los experimentos realizados en la presente investigación tuvieron como fin primordial conocer con más amplitud la histopatología y patogenia de la infección por el virus Apeu en el ratón de laboratorio (Mus musculus albinus). Para ello fué necesario, en primer lugar, estabilizar una cepa del virus, lo que se logró con el material procedente del pase ocho. Por otra parte era muy conveniente adaptar dicha cepa a un sistema de cultivos celulares, con el objeto de averiguar el efecto

de la infección viral a nivel celular y además tener un sistema de referencia in vitro que pudiera ser correlacionado con otro in vivo. En este sentido, los resultados que se obtuvieron confirman que el cultivo primario de células renales de criceto, no es un sistema propicio para la producción de efecto citopatogénico por el virus Apeu. En cambio en las células de la línea BS-C-1, dicho efecto si se produce y es demostrable fácilmente a partir del quinto día de la inoculación. Las alteraciones son más evidentes en las preparaciones teñidas con hamatoxilina - eosina (Fig. 4).

La inoculación del virus en los ratones produjo resultados similares tanto en los adultos como en los lactantes, sin embargo, se observaron algunas diferencias según la edad de los ratones. En los lactantes fué constante la aparición de enfermedad y muerte, no así en los adultos que en ocasiones presentaron síntomas, y todavía con menor frecuencia, defunciones. Este resultado confirma experiencias anteriores (Causey y col, 1961) y señala una vez más que el sistema óptimo para el manejo del virus Apeu es el ratón lactante.

De las lesiones histopatológicas que se observaron, parecen tener mayor validez desde el punto de vista de su especificidad, las encontradas en hígado que las demostradas en el cerebro. El motivo que lleva a este razonamiento se debe a que las segundas aparecen con bastante frecuencia en los diferentes testigos que no recibieron el virus Apeu. Probablemente el traumatismo ocasionado por la aguja al efectuar la inoculación intracerebral, sea responsable de algunas de las lesiones observadas. Esta situación no descarta, de ninguna manera, la posibilidad de que el virus tenga un primer ciclo de réplica en las células del tejido cerebral. Por otra parte, y en apoyo de lo anterior, los resultados expuestos en el cuadro No. 1 muestran como las lesiones hepáticas no

se presentan al inocular el virus mezclado con anticuerpos específicos. Quizá sea solo la degeneración neuronal, la lesión de mayor especificidad al inocular el virus Apeu, pues en el mismo cuadro No. 1 puede verse que la frecuencia de su aparición es menor que el edema y la necrosis, cuando el virus es neutralizado por los anticuerpos específicos.

En los ratones adultos, dada su mayor resistencia a la infección -- por el virus, se demostró que son capaces de soportar la réplica del mismo y responder inmunológicamente, al producir anticuerpos específicos (cuadro No. 2).

Por lo que toca a las lesiones observadas, en relación a la cantidad de virus que se inculó, no se encontraron grandes diferencias, excepto que -- en aquellos ratones que recibieron mayor cantidad de virus no se apreció necrosis cerebral en ningún caso. Este hecho, de difícil interpretación, quizá -- pueda ser explicado recordando mecanismos de autointerferencia (Mims, 1956). En cambio en el grupo que se inculó con la dosis mayor, la degeneración -- vacuolar de los hepatocitos fué perceptible, lo que no ocurrió en aquellos -- que recibieron menor cantidad de virus. Esa diferencia puede indicar que, -- dada la ruta de inoculación que se usó en el presente estudio, es necesario un primer ciclo de réplica viral en el cerebro y el paso subsecuente de las partículas de virus a través de la vía sanguínea, hasta el hígado.

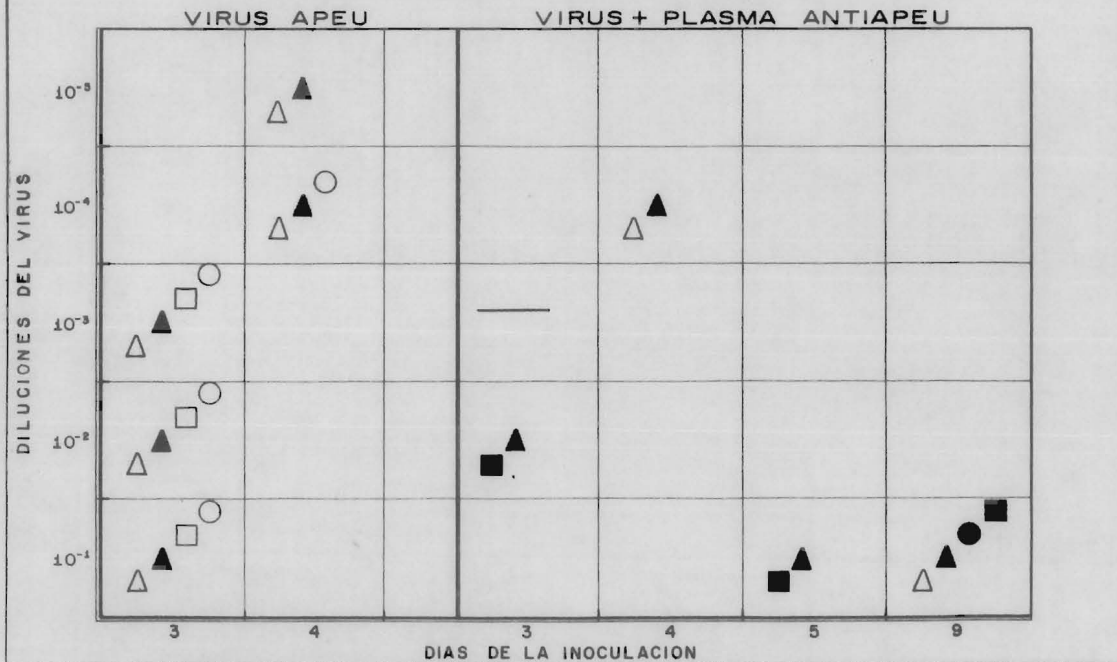
Por otra parte, las lesiones histopatológicas que se describen, se en -- contraron aún dieciocho días después de la inoculación del virus en los rato -- nes que recibieron 160 DL<sub>50</sub>RL, excepto la infiltración inflamatoria del híga -- do que pudo ser observada continuamente hasta los treinta días. Llama la -- atención que al aumentar la dosis del virus (800 DL<sub>50</sub>RL), los daños son de --  
##

mostrables por mas tiempo, hasta treinta y un días después de efectuada la inoculación. La interpretación de este fenómeno puede ser debida a que exista un determinado umbral de partículas contenidas en el inóculo, que determine un equilibrio entre la cantidad de virus y la respuesta inmunológica. En otras palabras, a mayor número de partículas inoculadas cabe esperar una menor eficacia de los mecanismos inmunológicos.

Es notoria la presencia de lesiones en el cerebro, hígado y especialmente el pulmón, que se observaron en ratones inoculados con otras sustancias que no contenían virus e inclusive en aquellos que no recibieron ninguna inyección (cuadro No. 5). Si bien la frecuencia de lesiones en los animales no inoculados es significativamente menor que en los grupos inyectados con el virus, no por ellos carecen de importancia, indicando posiblemente que algunos de los ratones utilizados en esta experiencia estaban contaminados por agentes murinos. En relación a las alteraciones pulmonares, se considera que son consecuencia de infecciones secundarias, pues solo uno de todos los ratones lactantes y varios de los adultos mostraron este tipo de lesión, lo que habla en favor de una infección adquirida en el transcurso de la vida de los ratones. Así se concluye, que para efectuar investigaciones como la presente, se deben utilizar animales totalmente libres de gérmenes para obtener resultados 100% significativos. Es necesario señalar que una colonia de ratones gnotobióticos (Luckey, 1963) representa cuidados muy laboriosos y requiere instalaciones de un costo elevado.

CUADRO N° 1

NATURALEZA DE LAS LESIONES HISTOPATOLÓGICAS ENCONTRADAS EN CEREBRO E HIGADO EN 10<sup>6</sup> DE 55 RATONES LACTANTES INOCULADOS POR VIA I.C. CON 0.02 ml. DE VIRUS APEU DILUIDO DE 10<sup>-1</sup> A 10<sup>-5</sup> Y CON MEZCLA DE VIRUS (10<sup>-2</sup> A 10<sup>-4</sup>) + PLASMA.



CLAVE	CEREBRO	HIGADO	
	△		□
▲			EDEMA
■			NECROSIS
●			INFILTRACION PERIVASCULAR
		○	INFILTRACION INFLAMATORIA
			SIN LESIONES

\* SE ESTUDIO UN RATON DE CADA CAMADA UTILIZANDOSE UNA CAMADA POR DILUCION.

CUADRO N.º 2

LESIONES HISTOPATOLÓGICAS ENCONTRADAS EN CEREBRO E HIGADO, EN 12 DE 20 RATONES ADULTOS INOCULADOS POR VÍA I.C CON 0.02 ml. DE VIRUS APEU DILUIDO DE 10-0.7 a 10-3.7 Y SU CORRELACION CON LA APARICION DE ANTICUERPOS FIJADORES DEL COMPLEMENTO.

		LESIONES OBSERVADAS EN:							TITULACION DE ANTICUERPOS		
DILUCION DEL VIRUS	CASO N.º	CEREBRO				HIGADO			POR LA PRUEBA DE F. C		
		ZONAS DE DEGENERACION NEURONAL.	EDEMA	INFILTRACION PERIVASCULAR	ZONAS DE NECROSIS	INFILTRACION INFLAMATORIA	ZONAS DE NECROSIS	1:4	1:8	1:16	
10-0.7	38	-	-	+	-	+	-		⊕		
	39	-	-	-	-	+	+		⊕		
	40	-	-	-	-	+	-		⊕		
10-1.7	41	+	+	+	-	+	+	⊕			
	42	+	-	+	-	+	+			⊕	
10-2.7	43	-	-	+	-	-	-			⊕	
	44	-	-	+	-	-	-		⊕		
	45	-	+	+	-	-	-			⊕	
10-3.7	46	-	+	-	+	+	-			⊕	
	47	+	-	+	-	+	+	⊕			
	48	-	-	+	-	+	-	⊕			
	49	+	-	+	-	+	-			⊕	

+ = PRESENCIA DE LA LESION.

CLAVE - = AUSENCIA DE LA LESION.

⊕ = PRESENCIA DE ANTICUERPOS.



CUADRO N° 3

NATURALEZA DE LAS LESIONES HISTOPATOLÓGICAS ENCONTRADAS EN CEREBRO, HIGADO Y PULMON EN 13 DE 57 RATONES ADULTOS INOCULADOS POR VIA I.C. CON 160 DL<sub>50</sub> RL/ 0.03ml. DE VIRUS Ap<sub>eu</sub> Y EN 8 DE 18 RATONES ADULTOS INOCULADOS POR VIA I.C. CON: 0.03 ml. DE BABS \* AL 0.75 %.

ORGANO	INOCULADOS CON VIRUS			INOCULADOS CON DILUYENTE (Testigos)	
	NATURALEZA DE LA LESION	RATONES CON LESIONES / RATONES ESTUDIADOS	DIAS POSTERIORES A LA INOCULACION EN QUE SE SACRIFICARON O MURIERON.	RATONES CON LESIONES / RATONES ESTUDIADOS	DIAS POSTERIORES A LA INOCULACION EN QUE SE SACRIFICARON O MURIERON.
CEREBRO	ZONAS DE DEGENERACION NEURONAL	6/13	5-10-10-12-15-18 4-4-6-7-21-30	0/8	4-6-10-12-15-18-21-30
	EDEMA	1/13	10 3-4-5-6-6-7-10-12-15-18-21-30	1/8	12 4-6-10-15-18-21-30
	INFILTRACION PERIVASCULAR	5/13	6-6-7-10-15 4-4-6-10-10-12-15-18	1/8	18 4-6-10-12-15-21-30
	ZONAS DE NECROSIS	3/13	6-6-7 4-4-5-10-10-12-15-18-21-30	0/8	4-6-10-12-15-18-21-30
HIGADO	ZONAS DE NECROSIS	5/13	4-5-6-7-10 4-6-10-12-15-18-21-30	3/8	4-10-15 6-12-18-21-30
	INFILTRACION INFLAMATORIA	10/13	4-4-5-6-7-10-12-15-18-30 6-10-21	2/8	15-18 4-6-10-12-21-30
PULMON	ZONAS DE BRONCONEUMONIA	1/13	10 4-4-5-6-6-7-10-12-15-18-21-31	2/8	6-30 4-10-12-15-18-21
	INFILTRACION INTERSTICIAL	4/13	6-7-10-12 4-4-5-6-10-15-18-21-30	3/8	10-15-30 4-6-12-18-21

\* SOLUCION SALINA BUFFER DE ALBUMINA DE BOVINO.

103

**CUADRO N.º 4**

NATURALEZA DE LAS LESIONES HISTOPATOLÓGICAS ENCONTRADAS EN CEREBRO HIGADO Y PULMON EN 7 DE 30 RATONES ADULTOS INOCULADOS POR VIA I.C. CON 800 DL<sub>50</sub> RL/0.03 ml. DE VIRUS APEU Y EN 7 DE 41 RATONES ADULTOS INOCULADOS POR VIA IC CON 0.03 ml. DE VIRUS APEU (10-1.7) + PLASMA ANTI APEU.

ORGANO	NATURALEZA DE LA LESION	RATONES CON LESIONES / RATONES ESTUDIADOS	DIAS POSTERIORES A LA INOCULACION EN QUE SE SACRIFICARON LOS RATONES	TESTIGOS			
				RATONES CON LESIONES / RATONES ESTUDIADOS	DIAS POSTERIORES A LA INOCULACION EN QUE SE SACRIFICARON LOS RATONES		
		VIRUS APEU	1	2	3	4	5
				BAB 0.79%	PLASMA*		
CEREBRO	ZONAS DE DEGENERACION NEURONAL	4/7	9-15-21-31 3-6-12	1/7	0/7	12 31	3-6-9-15-21-31 3-6-9-15-31
	EDEMA	3/7	3-6-9 12-15-21-31	3/7	2/7	3-6-12 9-12-15-21-31	3-6 9-12-15-21-31
	INFILTRACION PERIVASCULAR	6/7	3-6-9-12-15-31 21	2/7	0/7	3-12 6-9-15-21-31	3-6-9-12-15-31
HIGADO	ZONAS DE NECROSIS	5/7	3-6-15-21-31 9-12	1/7	0/7	12 3-6-9-15-21-31	3-6-9-12-15-31
	INFILTRACION INFLAMATORIA	2/7	6-21 3-9-12-15-31	3/7	3/7	3-6-31 9-12-15-21-31	3-6-15 9-12-21-31
	DEGENERACION VACUOLAR DE LOS HEPATOCITOS	2/7	6-9 3-12-15-21-31	1/7	1/7	9 3-6-15-15-21-31	31 3-6-9-15-15-21
PULMON	ZONAS DE BRONCONEUMONIA	1/7	31 3-6-9-12-15-21	1/7	1/7	3 6-9-12-15-21-31	9 3-6-12-15-21-31
	INFILTRACION INTERSTICIAL	1/7	31 3-6-9-12-15-21	0/7	1/7	12 3-6-9-12-15-21-31	12 3-6-9-15-21-31

\* SOLUCION SALINA BUFFER DE ALBUMINA DE BOVINO, 0.03 ml. POR VIA I.C.

\*\* SIN DILUIR, 0.03 ml. POR VIA I.C.

CUADRO Nº 5

RATONES ADULTOS Y LACTANTES INOCULADOS CON VIRUS Y NO INOCULADOS, QUE FUERON ESTUDIADOS PARA INVESTIGAR PRESENCIA DE LESIONES HISTOPATOLÓGICAS.

		Nº Y % CON LESIONES EN LOS ORGANOS QUE SE INDICAN.			
		NUMERO DE RATONES ESTUDIADOS	CEREBRO	HIGADO	PULMON
INOCULADOS CON VIRUS APEU	ADULTOS	36	30 = 83 %	27 = 75 %	11 = 30 %
	LACTANTES	10	10 = 100 %	9 = 90 %	0 = 0 %
SIN INOCULAR	ADULTOS	10	* 3 = 30 %	** 4 = 40 %	*** 1 = 10 %
	LACTANTES	14	* 5 = 35 %	** 3 = 21 %	*** 1 = 7 %

\* DEGENERACION NEURONAL EN RA = 3 RL = 5 EDEMA EN RA = 1 EDEMA EN RL = 3.

\*\* LAS LESIONES HISTOPATOLÓGICAS CONSISTIERON PRINCIPALMENTE EN DEGENERACION VACUOLAR DE HEPATOCITOS.

\*\*\* ESCASOS FOCOS DE BRONCONEUMONIA.

## RESUMEN

Se pretende aportar datos para conocer con más amplitud la histopatología y patogenia de los arbovirus en general y la del virus Apeu en particular.

Se estabilizó una cepa del virus que posteriormente fué inoculada en cultivos de células de riñón de mono (línea BS-C-1) y renales de criceto. - Sólo la primera de ellas demostró ser susceptible a la réplica del virus. El virus también fué inoculado a RA y RL, con el propósito de titularlo en ese sistema y para investigar las lesiones histopatológicas resultantes. La identidad del virus y la especificidad de dichas lesiones, fueron comprobadas mediante pruebas serológicas de neutralización y FC.

Se describen las alteraciones histológicas que se encontraron en los RA y RL, investigando por otra parte la relación entre el número de partículas inoculadas y los datos histopatológicos ocurridos en el RA. Se discute — mediante hipótesis ciertos aspectos de la patogenia de la enfermedad causada por el virus en los ratones.

También se sugiere para estudios posteriores de esta naturaleza, el empleo de animales totalmente libres de gérmenes para así obtener resultados 100% significativos.

## BIBLIOGRAFIA

- Allen, W. P., Belman, S. G., and Borman, E. R., 1967. Group C Arbovirus Infection in rhesus Monkeys. *The Amer. Jour. of Trop. Med. and Hyg.* 16: 106-110.
- Andrewes, C. 1964. *Viruses of Vertebrates*. Balliere, Tindall and Cox, Ltd. London, Great Britain. Capítulo III.
- Buckley, S. M., and Shope R. E., 1961. Comparative Assay of Arthropod-Borne Group C Virus Antibodies by Tissue Culture Neutralization and Hemagglutination-Inhibition Tests. *Amer. Jour. of Trop. Med. and Hyg.* 10: 53-61.
- Campillo, S. C., 1965. Incidencia de Infecciones por Arbovirus Encefalógenos en México. *Salud Pública Méx.* VII: 385-388.
- Casals, J., and Whitman L., Group C, a New Serological Group of Hitherto Undescribed Arthropod-Borne Viruses. *Immunological Studies*. *Amer. Jour. of Trop. Med. and Hyg.* 10: 250-258.
- Causey, O. R., Maroja, O. M. y Macedo, D. G., 1961. The Isolation of Arthropod-Borne Viruses, Including Members of Two Hitherto Undescribed Serologic Groups in the Amazon Region of Brazil. *Amer. Jour. of Trop. Med. and Hyg.* 10: 227-249.
- Clarke, D. H., and Casals, J., 1958. Techniques for Hemagglutination and Hemagglutination Inhibition with Arthropod-Borne Viruses. *Amer. Jour. of Trop. Med. and Hyg.* 7: 561-573.

- De Mucha, M. J., 1963 (a). Infecciones por Virus Arbor. Estudios realizados en -  
el INV de la S.S.A. Gac. Méd. Méx. XCIII 5:415-420.
- De Mucha, M. J., 1963 (b). Estudios Epidemiológicos sobre Virus Arbor en el Su-  
reste de México. Salud Pública Méx. V:523-527.
- De Mucha, M. J., Morilla G. A., 1967. Encefalitis Equina de Venezuela. Estu-  
dio de una Cepa Aislada en México. Salud Pública Méx. XXVII:85-110.
- De Paola, D., 1963 (a). Pathology of the Arboviruses. Anais de Microbiología. -  
XI: 187-208.
- De Paola, D. Duarte, F., Lobo M.B., 1963 (b). Histopatología da Infecção Na-  
tural por Arbovirus do Grupo C e Guama. Anais de Microbiología XI:211-  
216.
- De Paola, D., 1964. Contribuição ao Estudo da Patologia das Arboviroses. Tesis  
Universidad del Estado de Guanabara, Río de Janeiro.
- Hanks, J. H., and Wallace, R. E., 1949. Relation of Oxygen and Temperature -  
in the preservation of the Tissues by Refrigeration. Proc. Soc. Exper. Biol.  
and Med. 71:196-200.
- Hopps, H. E., Bernheim, B. C., Nisalak, A., and Smadel, J. E. 1962. Biologi-  
cal Characteristics of a Serially Cultivated Kidney Cell Derived from the -  
African Green Monkey, Cercopithecus aethiops. Fed. Proc. 21: 454.
- Horsfall y Tamm. 1959. Viral and Rickettsial Infections of Man. pág 299.
- Hsiung, G. D., Henderson, J. R., 1964. Diagnostic Virology. New Haven and -  
London, Yale University Press. págs. 41-49.

- Karabatsos, N., and Buckley, S. M. 1967. Suceptibility of the Baby Hamster - Kidney-Cell Line (BHK-21) To Infection with Arboviruses. The Amer. -- Jour. of Trop. Med. and Hyg. 16: 99-105.
- Lennette, E. H., and Schmidt, N. J., 1964. Diagnostic Procedures for Viral - and Rickettsial Diseases. American Public Health Association, Inc. New York. Capítulo VIII.
- Luckey, T. D. 1963. Germfree Life and Gnotobiology. Academic Press Inc. New York. Capítulo I.
- Melnick, J. H. 1955 Tissue Culture Techniques and their Application to Original Isolation, Growth and Assay of Poliomyelitis and Orphan Viruses. -- Ann. N. Y. Acad. Sci., 61: 754.
- Mims, C. A. 1956. Brit. J. Exptl. Pathol. 37: 129.
- Morgan, J. F., Morton, H. J. and Parker, R. C., 1950. Nutrition of animal -- cells in Tissue. I. Initial Studies on a Synthetic Medium. Proc. Soc. Ex- per. Biol. and Med., 73: 1.
- Reed, L. J. and Muench, H 1938. A simple Method of Estimating Fifty per Cent Endpoints. Amer. Jour. Hyg. 27: 493-497.
- Rooyen Van, C. E. and Rhodes A. J. 1948. Virus Diseases of Man. Thomas Nel- son and Sons New York. pág. 35.
- Salk, J. E., Youngner, J. S. and Ward, E. N. 1954. Use of Color Change of - Phenol Red as the Indicator in Titrating Poliomyelitis Virus or its Antibo- dy in a Tissue Culture System. Amer. Jour. Hyg. 60:214-230.

- Scherer, W. F., Campillo, S. C., De Mucha, M. J., Rubio, B. R., Miura, T. -  
Dickerman, R. W., Warner, D. W., and Dyer M. 1966. Serological Sur-  
vey for Neutralizing Antibodies to Eastern Equine and Western Equine Ence-  
falitis Viruses in Man, Wild Birds and Swine in Southern México During --  
1961. Amer. Jour. of Trop. Med. and Hyg. 15: 211-218.
- Scherer, W. F., Campillo, S. C., Dickerman, R. W., Díaz Nájera A., Madelen-  
goitia, J., 1967. Isolation of Tlacotalpan Virus, a New Bunyamwera Group  
Virus from Mexican Mosquitoes. Amer. Jour. Trop. Med. and Hyg. 16:79-  
91.
- Scherer, W. F., Zárate, M. L., Dickerman, R. W. 1968. Discovery and Identifi-  
cation of Group C, Nepuyo Arbovirus in México. (enviado para publica-  
ción).
- Shope, R. E. and Causey, O. R. 1962. Further Studies on the Serological Relation-  
ships to Rapid Identification of Types. Amer. Jour. of Trop. Med. and Hyg.  
11: 283-290.
- Shope, R. E. and Whitman, L. 1966. Nepuyo Virus a New Agent of Group C Isola-  
ted in Trinidad and Brazil. Amer. Jour. of Trop. Med. and Hyg. 15:772-  
774.
- Téllez Girón, A., y Valdés. O. O. 1941. La presencia de virus tipo Este de la En-  
cefalomielitis Equina, en la Epizootia ocurrida en el Estado de Tamaulipas,  
México, durante el año de 1941. Rev. Soc. Mex. Hist. Nat. 2:251-259.
- Zárate, M. L., Geiger, R. H., Shope, R. E., Scherer, W. F. 1968. The Isola-  
tion from Mexican Mosquitoes of a Remarkable Strain of Patois virus posse-  
sing Antigens in Common With Arboviruses of the Bunyamwera, C. Califor-



nia, Capim and Guama Groups. (enviado para publicación).

Zárate, M. L. Instituto Nacional de Virología Méx. D. F. comunicación personal, 1968.