

## Tesis de Posgrado

# Purificación y caracterización del virus de la fiebre aftosa obtenido por el método Frenkel

Palma, Eduardo Lucio

1975

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Palma, Eduardo Lucio. (1975). Purificación y caracterización del virus de la fiebre aftosa obtenido por el método Frenkel. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1492\\_Palma.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1492_Palma.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Palma, Eduardo Lucio. "Purificación y caracterización del virus de la fiebre aftosa obtenido por el método Frenkel". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1975. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1492\\_Palma.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1492_Palma.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

---

PURIFICACION Y CARACTERIZACION DEL VIRUS  
DE LA FIEBRE AFTOSA  
OBTENIDO POR EL METODO FRENKEL

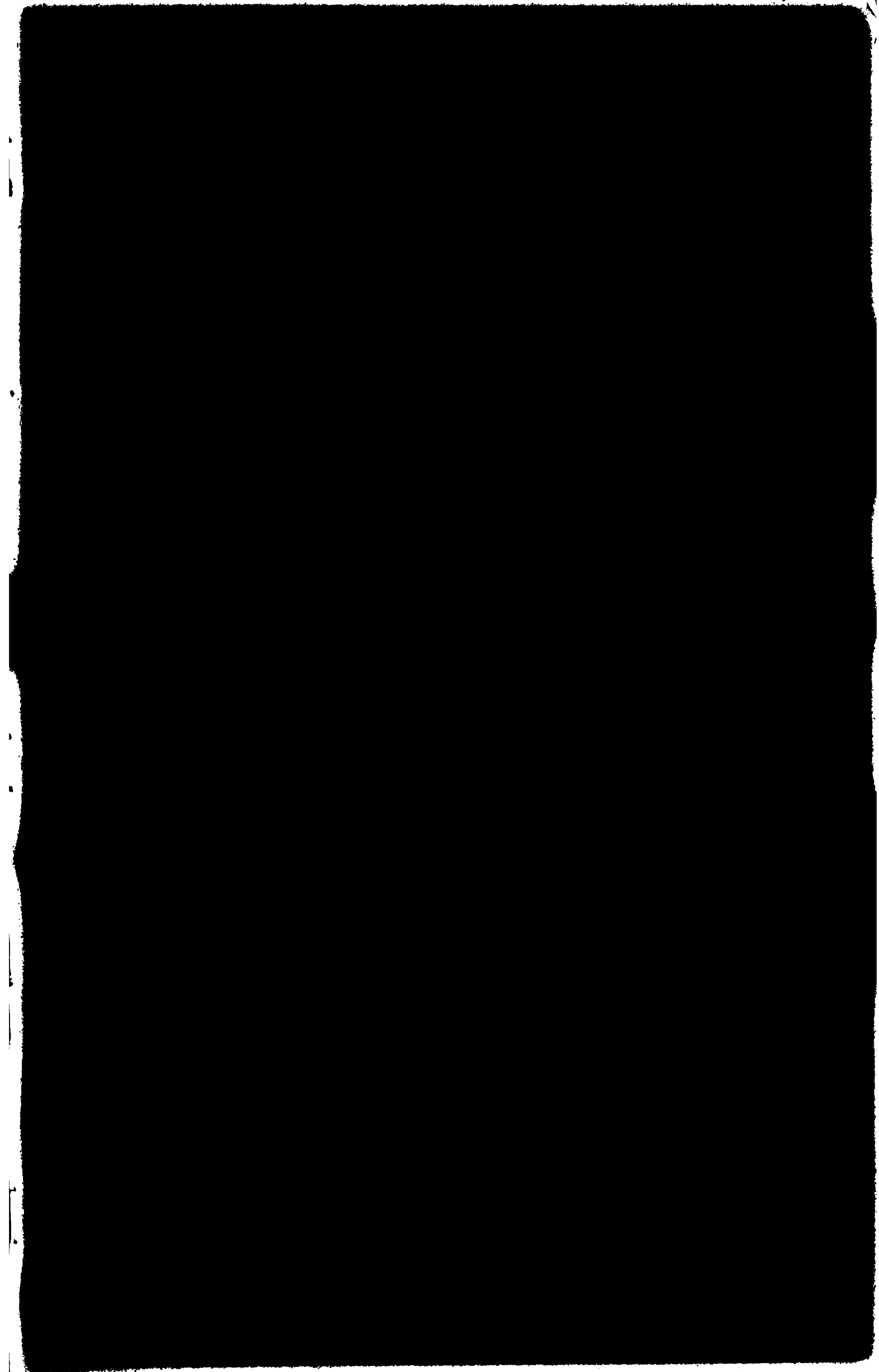
EDUARDO LUCIO PALMA

TESIS PARA OPTAR AL TITULO  
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

BUENOS AIRES

1975





## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Osvaldo A. Peso, por haberme sugerido el tema de este trabajo permitiendome iniciar en la investigación de los virus, por su dirección y consejos durante la realización del mismo.

A la Lic. Beatriz Gimenez, por su colaboración inapreciable durante su realización.

Al Dr. Cesar Vasquez, por su ayuda en la realización e interpretación de las micrografías electrónicas que se muestran en esta tesis.

A mis compañeros del Centro de Investigaciones Microbiológicas, quienes con su aliento y amistad han contribuido para el desarrollo de esta investigación.

A todos aquellos que de una u otra manera contribuyeron para que este trabajo pudiera llevarse a cabo.

INDICE

	pag.
Abreviaturas	4
 <u>CAPITULO I</u>	
<u>INTRODUCCION</u>	
Reseña histórica y generalidades sobre la Fiebre Aftosa	5
Taxonomía del virus aftoso	7
Métodos de producción del virus aftoso	8
a) Producción "in vivo"	8
b) Producción "in vitro"	8
Propiedades biológicas del virus aftoso	10
a) Infectividad	10
b) Ensayo de placas	10
c) Inmunología del virus aftoso	10
d) Antígenos del virus aftoso	10
Efecto de reactivos físicos y químicos sobre el virión	13
Propiedades fisicoquímicas del virus aftoso	15
a) Propiedades del virión	15
b) Propiedades del ácido nucleico	16
c) Propiedades de las proteínas	16
Morfología del virus aftoso	18
Replicación del virus aftoso	19
a) Ciclo de crecimiento	19
b) Síntesis de ARN viral	20
c) Síntesis de proteínas virales	21
 <u>CAPITULO II</u>	
<u>MATERIALES Y METODOS</u>	
1. Cepas de virus utilizadas	22
2. Adaptación y multiplicación del virus	22
3. Técnicas empleados para la purificación del virus aftoso	23
3.1. Concentración del virus aftoso	23
3.2. Tratamiento con solventes orgánicos	24
3.3 Fraccionamiento por columna de Sepharosa 2 B	25
3.4 Ultracentrifugación en cloruro de cesio	25

	pag.
3.5 Ultracentrifugación a través de solventes orgánicos	25
3.6 Flotación con cloruro de cesio	26
3.7 Ultracentrifugación en gradientes de sacarosa	27
4. Absorción en el ultravioleta	27
4.1 Curvas de absorción	27
4.2 Determinación de los coeficientes de absorción	28
4.3 Espectros de absorción	28
5. Ultracentrifugación analítica	29
6. Microscopía electrónica	29
7. Electroforesis en gel de poliacrilamida	29
8. Infeciosidad	30
9. Fijación de complemento	31
9.1 Inmunosucros usados	31
9.2 Técnica de fijación de complemento	31
10. Determinación de proteínas	37
11. Determinación de densidades	37

### CAPITULO III

#### RESULTADOS

A. Concentración por precipitación	38
a <sub>1</sub> Precipitación con metanol o con sulfato de amonio	38
a <sub>2</sub> Precipitación por polietilenglicol	42
B. Desproteínización y deslipidización	43
b <sub>1</sub> Tratamiento con solventes orgánicos	43
b <sub>2</sub> Concentración por precipitación con polietilenglicol previa desproteínización con cloroformo-butanol	44
C. Purificación por ultracentrifugación o filtración por gel	47
c <sub>1</sub> Centrifugación a alta velocidad	47
c <sub>2</sub> Fraccionamiento por filtración por gel de Sepharosa 2B	48
c <sub>3</sub> Centrifugación en gradiente de cloruro de cesio	55
D. Obtención de virus purificado	63
d <sub>1</sub> Purificación según el método de Bachrach	63
d <sub>2</sub> Purificación por centrifugación en gradientes lineales de sacarosa.	67

	pag.
E. Pureza y caracterización de las fracciones aisladas por los métodos desarrollados	77
e <sub>1</sub> Espectro de absorción en el ultravioleta del virus aftoso purificado	77
e <sub>2</sub> Ultracentrifugación analítica	79
e <sub>3</sub> Microscopía electrónica	82
e <sub>4</sub> Centrifugación isopícnica en gradientes de cloruro de cesio	85
e <sub>5</sub> Electroforesis en gel de poliacrilamida	97
e <sub>6</sub> Caracterización serológica de las diferentes fracciones purificadas por los dos métodos desarrollados	100
F. Heterogeneidad del virus aftoso purificado. Su caracterización	106
f <sub>1</sub> Fracciones que difieren del virus aftoso monodisperse en su coeficiente de sedimentación	106
f <sub>2</sub> Capacidad de infectar células por las fracciones de diferente S.	108
f <sub>3</sub> Coeficientes de extinción porcentual de las diferentes fracciones	108
f <sub>4</sub> Microscopía electrónica de las fracciones A' <sub>2</sub> y A' <sub>3</sub>	111
f <sub>5</sub> Coeficiente de sedimentación de la fracción A' <sub>3</sub>	111
f <sub>6</sub> Caracterización serológica de las fracciones purificadas de diferente coeficiente de sedimentación	114
 <u>CAPITULO IV</u>	
<u>CONCLUSION</u>	120
 <u>CAPITULO V</u>	
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	123



ABREVIATURAS

Ac: anticuerpo

ADN: ácido desoxiribonucleico

Ag: antígeno

ARN: ácido ribonucleico

BHK<sub>21</sub>: línea celular de riñón de hamster

C: complemento

D=d: densidad (g/ml)

D.C.: deoxicolato de sodio

D.O.: densidad óptica

D.S.S.: dodecil sulfato de sodio

E<sup>1%</sup>: coeficiente de extinción porcentual

EDTA: ácido etilendiaminotetracético (sal disódica)

g: aceleración de la gravedad =  $980 \frac{\text{cm}}{\text{seg.}^2}$

G.R.: glóbulos rojos

G.R.S.: glóbulos rojos sensibilizados

L.S.: "light scattering" = dispersión de la luz

M: molar

mu=nm:  $10^{-9}$  metros

u :  $10^{-6}$  metros

PEG: polietilenglicol

PM: peso molecular

rpm: revoluciones por minuto

S: unidad Svedberg = coeficiente de sedimentación de  $10^{-13}$  seg.

S.H.: suero hemolítico

T.E.: tampón tris-ClH 0,16 M EDTA 1% pH 7,5

Tris: Tris (hidroximetil) aminometano

U.H.: unidad hemolítica

UFP: unidad formadora de placas

## CAPITULO I

### RESEÑA HISTORICA Y GENERALIDADES SOBRE LA FIEBRE AFTOSA.

Esta enfermedad es conocida desde tiempos remotos. Varios siglos antes de Cristo el griego Hierocles, habla de un mal en el ganado que no es más que la Fiebre Aftosa. Siglo tras siglo grandes ondas infecciosas provenientes del Asia, siguen las rutas comerciales, e invaden el territorio Europeo produciendo fuertes pérdidas en el ganado. También Fraecasterius (1) habla de esta enfermedad por primera vez en el año 1514 Girolamo en Italia la describe con bastante precisión, y en el año 1897 se identifica la fiebre aftosa como causada por un virus (2).

La Fiebre Aftosa no cubre el mundo entero, sino que se halla concentrada en determinadas continentes y aún dentro de éstos se la encuentra en forma enzootica, en ciertas zonas de los mismos, mientras que otros se hallan libres de ella, o sólo se ven afectados en forma esporádica. Las medidas de lucha han logrado controlarla en algunos países mediante una severa metodología. Australia, Japón, Chile, se hallan libres de ella, hasta el presente. Las pérdidas económicas que esta enfermedad causa, en donde existe, y sobre todo para los países exportadores de carne, son cuantiosas; se la calcula que esta enfermedad puede disminuir en un 25% la producción de carne y leche, de los países donde es endémica (3).

La fiebre aftosa es una enfermedad que ataca a los biungulados o herbívoros de pezuña partida. Infecciosa, contagiosa en alto grado, aguda y febril, producida por un virus de gran capacidad de variación.

Clinicamente se caracteriza por la formación de vesículas o aftas, erosiones y úlceras superficiales en las mucosas bucales, o pacios interdigitales, redete coronario y epitelio de la piel de los pezones y de la ubre, aunque en animales enfermos el virus se puede detectar en todos los órganos (4).

En los animales adultos, es generalmente benigna, pero adopta a veces formas malignas, con muerte por síncope cardíaco, especialmente en los animales jóvenes. Normalmente es de baja mortalidad, en general en bovinos alcanza un 5%, pero de elevada morbilidad y capacidad de difusión.

Afecta especialmente a los bovinos, ovinos, porcinos y caprinos. Son

también sensibles numerosos herbívoros salvajes o domesticados (5). Diversas especies habitualmente no sensibles a la Fiebre Aftosa, pueden no obstante ser susceptibles en determinadas condiciones de inoculación, como es el caso del caballo, lechugas lactantes, gazapos, etc.

La transmisión del virus se produce principalmente por el animal enfermo, durante los primeros días de la infección, y su discriminación por medio de las secreciones o excreciones del mismo (6). A pesar de la fácil inactivación del virus aftoso debido a sus propiedades fisicoquímicas se ha observado en saliva de bovinos infectados mantenida a 4°C que luego de una inactivación del 99% durante los primeros 35 días, el virus nuevamente era más resistente a la inactivación (7). La discriminación se puede producir también por: la importación de animales en pie; los alimentos y ferrajes; la migración de aves y no deben descartarse los animales no domésticos en general, el movimiento de personas y vehículos, etc..

Otra posible vía de transmisión son los vacunos infectados, en los que luego de desaparecer los síntomas de la enfermedad se puede detectar virus aftoso durante varios meses, dependiendo la duración de la especie y de la localización del virus (ganglios-médula) (8,9). Estos vacunos son llamados carriers o transportadores.

A pesar de no haberse detectado infección de bovinos susceptibles por posibles transportadores (10,11), hay evidencias a favor (12,13) y en contra (14), de una mayor susceptibilidad a la infección en otras especies (por ejemplo porcinos). El hecho de que un animal pueda ser transportador no depende de su previa inmunización (15). La evolución de la persistencia de virus en animales transportadores durante 6 meses mostró un modelo oscilante en el título del virus, no explicable por la presencia de anticuerpos ni interferón (16). Este fenómeno es reminiscente del producido por las partículas defectivas interferentes del virus de la influenza "in vivo" (17) o del virus de la estomatitis vesicular "in vitro" (18) entre otros.

El virus detectado en transportadores presenta cambios en su virulencia y antigenicidad respecto del inicialmente infectante (19). Este hecho junto con la velocidad de mutación del virus aftoso (20) puede explicar en parte,

las continuas apariciones en el campo de nuevos subtipos del virus aftoso.

Las distintas etapas evolutivas de esta enfermedad de manera alguna están regidas por una cronometría exacta, siendo múltiples los factores que intervienen y las hacen variar.

La aftosa comienza con un período de incubación que dura entre 2 y 5 días, seguido de un aumento de la temperatura en el animal, aparición de ampollas, ruptura de las mismas luego de 24 a 72 horas de su aparición, y generalización pedal que puede producirse entre las 48 y 72 horas.

La evolución en los casos comunes, varía entre los 7 y 12 días después de la aparición de las ampollas (21).

#### TAXONOMIA DEL VIRUS AFTOSO

La ubicación taxonómica del virus aftoso según el Comité Previsorio para la Nomenclatura de los Virus (1966) reunido en Moscú en dicho año, es:

Subphylum	:	Ribovira
Clas.	:	Ribocúbica
Orden	:	Gymnovirales
Familia	:	Napviridae
Subfamilia	:	Picornaviridae
Gén. r. tipo	:	Picornavirus
Especie tipo	:	Aphthae

Una primera caracterización del virus aftoso lo definió como un virus conteniendo ácido ribonucleico, estable al tratamiento con éter, con un diámetro menor de 30 m $\mu$  y lábil a pH ácidos (menores de 5). Sin embargo, dentro de esta definición, habría que incluir otros miembros de los picornavirus, como ser el virus de la exantema vesicular (22), los rinovirus (23) y los

picornavirus felinos (24), por lo que fue necesario incluir características morfológicas y fisicoquímicas más precisas para su definición. Sin embargo, una posterior clasificación, por el Comité Internacional de Nomenclatura de los virus en 1971 reconoció tres géneros en la familia Picornaviridae: Calicivirus, Rinovirus y Enterovirus (25). Esta clasificación incluye dentro

del género Enterovirus a: polio virus, echo virus, coxsackie virus, orcefalomeningoencefalitis, mence virus, mense-Elberfeld virus; dentro de los calicivirus a: exantema vesicular y picornavirus felino, y dentro del género Rhinovirus a: virus aftoso, rinovirus equino y rinovirus humano.

Teniendo en cuenta algunas características fisicoquímicas como: densidad boyante en cloruro de cesio, estabilidad a diferentes pH, composición del A.F. viral, coeficientes de sedimentación de los viriones y sus A.F., y morfología al microscopio electrónico, se ha propuesto dividir la familia Picornaviridae en 6 diferentes grupos (26), basada en la subdivisión de los 3 rhinovirus y la división de los enterovirus en cardiovirus.

#### MÉTODOS DE PRODUCCIÓN DE VIRUS AFTOSO

##### a) Producción "in vivo"

De los distintos métodos de producción de virus in vivo, el que tuvo mayor aceptación por su aplicación industrial para la fabricación de vacunas fué el preventivo del epitelio lingual de bovinos previamente infectados (27).

Otros animales como ser ratones lactantes (28), pollos de un día e embrión de pollo (29,30), cabayos (31), conejos (32,33), etc., han sido usados como fuente de producción de virus, pero en la mayoría de los casos, con el objeto de obtener virus modificados para producir vacunas a virus vivo. La infección de animales irradiados permitió obtener buenos rendimientos de virus, ya que permitió la multiplicación en todos los órganos (34,35).

##### b) Producción "in vitro"

Los primeros cultivos in vitro utilizados para la producción de virus aftoso fueron hechos en piel de cabayo embrionario (36) y en suspensiones de piel, patas, labios y lengua de cabayo (37).

Una derivación del método de obtención de virus in vivo por extracción del epitelio lingual de bovinos infectados fue el método de Frenkel (38,39). Dicho método se basó en la multiplicación in vitro del virus en fragmentos de epitelio lingual bovino mantenidos en suspensión. Este método ha sido el más difundido para la producción de virus con fines industriales para la elaboración de vacunas. Esta técnica ha sido explicada en detalle en la sec-

ción Materiales y Métodos.

El cultivo en monocapa de tejido primario de células de riñón de bovino o de cerdo (40,41) fué utilizado fundamentalmente para la producción de virus en pequeña escala o con el objeto de determinar títulos infectantes. La necesidad del desarrollo de métodos de producción de mayores cantidades de virus, llevó a los cultivos en frascos de Roux (42) o en frascos rotatorios (43,44). Sin embargo, un aumento en la densidad celular por superficie del frasco de cultivo (45,46) y por ende en la producción de virus, se logró con la utilización de líneas celulares de riñón de hamster (DHK 21-elon 13) (47,48). Esta línea celular ha sido adaptada al cultivo en suspensión (49) y es actualmente una de las más difundidas para la producción de virus.

La facilidad de variación del virus aftoso en sus características antigénicas o inmunológicas se manifiesta en el cultivo de virus en distintos tipos de células provenientes de distintos órganos y/o especies animales, así como en el número de pasajes en un mismo sistema celular (50).

Virus modificados han sido obtenidos por multiplicación en ratón (51), conejo (32), embrión de pollo (52), o en cultivos celulares como: riñón de ternera (53), riñón de perro (54), riñón de hamster (55,56), etc., dependiendo en algunos casos del número de pasajes del virus en un determinado tipo de células.

Tales diferencias antigénicas o inmunológicas implican diferencias en sus características estructurales y fisicoquímicas de las proteínas del virus y/o de su ácido nucleico.

De los métodos de producción de virus mencionados, aquellos que mantienen más semejantes las características biológicas y estructurales del virus producido con el virus aislado en brotes infecciosos de vacunos en el campo son: a) el de infección de bovinos sanos y posterior recolección del epitelio lingual infectado, (aunque este método implica una posible vía de dispersión y contaminación con virus) y b) su equivalente in vitro, es decir, cultivo del virus en epitelio lingual bovino o en sobrevivencia (método de Frenkel).

## PROPIEDADES BIOLÓGICAS DEL VIRUS AFTOSO

### a) Infectividad

La relación entre partículas virales y unidades formadoras de placas (UFP), está comprendida entre 100 y 2500 para el virus aftoso purificado, determinado en células BHK 21; estos son valores mínimos debido a la pérdida de infectividad, de partículas aparentemente intactas al microscopio electrónico, por el tratamiento de purificación (57).

### b) Ensayo de placas

La característica de formar placas en cultivos celulares en monocapa, se ha usado fundamentalmente para la cuantificación y aislamiento de virus. Permite diferenciar a la vez, en un mismo sistema, distintas preparaciones víricas, basándose en la morfología de las placas, tiempo de aparición de las mismas, etc..

El método introducido por Dulbecco en 1952 (58), ha sido utilizado satisfactoriamente para distintos virus, sufriendo modificaciones según los diferentes sistemas utilizados (59).

En el caso del virus aftoso, los ensayos de placas más comúnmente usados se realizan en cultivos primarios de células de riñón de bovino o cerdo y en células BHK 21. La metodología en tales sistemas ha sido ampliamente estudiada ( 40,60,61,62,63,64 ) dándose una descripción detallada de la técnica en Materiales y Métodos.

Aparte de la modificación en la estructura de las placas formadas por las condiciones del ensayo ( temperatura de incubación, pH, composición del medio de cultivo, tiempo de absorción, inmovilización por el agregado de agar, etc.) se han detectado diferencias en la sensibilidad de las células por los distintos tipos y subtipos del virus en el mismo sistema celular. Algunas cepas del virus aftoso se han mostrado menos patogénicas al ser ensayadas en células de riñón de bovino que en riñón de cerdo (62). Por otra parte, diferentes tipos y subtipos del virus aftoso, mostraron placas de distinta morfología en células de riñón de bovino (65).

### c) Inmunología del virus aftoso

La diferenciación inmunológica del virus aftoso se llevó a cabo princi-

palmente por test serológicos de fijación de complemento y seroneutralización por test de inhibición de la hemoaglutinación pasiva (66). De ellos el más utilizado fué el de fijación de complemento, permitiendo identificar elemé tipos inmunológicos del virus aftoso: tipos A, O y C (67, 68) encontrados en América y Europa; los tipos SAT<sub>1</sub>, SAT<sub>2</sub>, SAT<sub>3</sub> en Africa (69) y el tipo Asia<sub>1</sub> (70, 71). Dentro de los tipos serológicos se han encontrado distintos subtipos, correspondiendo según el informe de diciembre de 1971 del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa: tipo O Vallée, 11 subtipos; tipo A Vallée, 32 subtipos; tipo C Waldmann, 5 subtipos; tipo SAT<sub>1</sub>, 7 subtipos; tipo SAT<sub>2</sub> 3 subtipos; tipo SAT<sub>3</sub>, 4 subtipos; tipo Asia<sub>1</sub>, 2 subtipos.

La reacción de fijación de complemento fué primeramente usada para tipificar antisueros y virus aftoso proveniente de cobayos (72). Dicha técnica ha sufrido distintas modificaciones, realizándose en ciertos casos la determinación en condiciones de exceso de antígeno de anticuerpos(73) o por las técnicas de titulación bidimensional que utiliza cantidades constantes de complemento (74). En Materiales y Métodos se da una descripción detallada de esta técnica.

#### d) Antígenos del virus aftoso

Los diferentes tipos u subtipos serológicos presentan diferencias fisicoquímicas y biológicas que los caracterizan. Entre las primeras, se detectaron diferencias en la movilidad electroforética entre los distintos tipos y subtipos del virus (75, 76). Se pudieron establecer relaciones entre la movilidad electroforética y el tipo inmunológico, aunque no esté intimamente relacionada con la especificidad serológica (77). Tanto esta propiedad, como el estudio de homologías en secuencias de polinucleótidos (78) y pruebas de hibridización entre distintos tipos y subtipos inmunológicos y serológicos del virus aftoso (79) permitieron establecer relaciones filogenéticas entre los mismos.

La identificación y caracterización de los distintos antígenos del virus aftoso se ha realizado por las técnicas de fijación de complemento utilizando sueros específicos para los distintos antígenos (80, 81, 82, 83). Sin embargo, los métodos utilizados más comúnmente para tal caracterización son los de



difusión en gel e inmunodifusión. Así han podido detectarse hasta el momento por lo menos 4 antígenos diferentes del virus aftoso. La partícula infecciosa completa de 23 nm y coeficiente de sedimentación 140 S (84), la unidad morfológica de 12 nm y coeficiente de sedimentación 12 S (85), el antígeno VIA (virus infection-associated) (85,86,87), las "partículas vacías" identificadas como cápsidas vacías de coeficiente de sedimentación 75 S (85,88,89) y por último una proteína estructural del virus aftoso llamada VP 4 (90)..

La partícula infecciosa completa de 140 S, así como las partículas vacías reaccionan específicamente contra el antisuero homólogo (91,92), teniendo ambas las mismas propiedades antigénicas.

Por medio de la observación en el microscopio electrónico del complejo virus-anticuerpo se han encontrado en principio, 3 sitios de combinación con anticuerpos en la superficie de la partícula completa (93). Posteriormente los mismos autores determinaron los sitios inmunogénicos diferentes en la superficie del virus, por medio del efecto de la tripsina sobre el virión (94). Uno de ellos estaría relacionado con el proceso de absorción celular y de producción de anticuerpos neutralizantes y el segundo sólo con la producción de anticuerpos neutralizantes.

La unidad morfológica de coeficiente de sedimentación 12 S (95,96) y 12 nm de diámetro (97), no posee especificidad de tipo serológico ya que reacciona con antisueros heterotípicos (84,98,99). La unidad morfológica puede obtenerse por diversos métodos, como ser ruptura del virión a pH 6,5 o calentamiento a 56°C (100), o por tratamiento con guanidina 1,5 M (99).

Algunos investigadores sostienen que el antígeno VIA no es un componente del virión sino una proteína sintetizada intracelularmente como resultado de la infección, teniendo probablemente actividad de ARN transcriptasa (101,102). Posee un coeficiente de sedimentación 4 S (87) y es lábil al calor y a pH menores de 5 (14). Sin embargo, actualmente hay evidencias para suponer que el antígeno VIA no sea una ARN transcriptasa sino una proteína estructural del virus aftoso, llamada VP 4 (98,90). Ambos grupos de investigadores coinciden en que el antígeno VIA y/o VP 4 da reacciones de fijación de complemento y de precipitación positivas, frente a antisueros heterotípicos (87,98) aunque en forma diferente a la unidad morfológica 12 S (90).

La presencia del antígeno VIA (VP4), produjo dos efectos contrarios, relacionados con la identificación y tipificación del virus aftoso. Una consecuencia positiva, fué el desarrollo de test de precipitación en agar para la detección de anticuerpos específicos contra el antígeno VIA (103) útil, para la identificación epizootiológica del virus. Por otra parte, la presencia de antígenos que reaccionan heterotípicamente (partículas 12 S, antígeno VIA y/o VP4) interfieren los test de tipificación. Sin embargo, debido a la diferente reactividad comparada con el virión, se puede disminuir este efecto usando altas diluciones de antisuero, o realizando los test de fijación de complemento a 37°C durante una hora (104, 74).

Los cápsides vacíos (sin ARN) de coeficiente de sedimentación 75S, poseen las mismas propiedades antigénicas del virion (91,92). Se caracterizan por ser permeables al colorante en la observación al microscopio electrónico (89), poseer una densidad de 1,31 g/ml y por ser estables en tampón fosfato 0,04M pH 6 (14). Además, en reacciones de precipitación en gel coloreadas con naranja de acridina, sólo el virión tomó el colorante, mientras que la partícula de 12S, el antígeno VIA (VP4) y los cápsides vacíos, no lo hicieron, indicando ausencia o un muy bajo contenido en ARN (105). Recientemente se ha identificado una fracción del mismo coeficiente de sedimentación, durante la purificación del virus aftoso conteniendo ARN (106).

La formación de cápsides vacíos, estaría íntimamente relacionada con el proceso de infección, posiblemente debido a una deficiencia en la producción de ARN (14). Depende además, del sistema celular utilizado y del tipo inmunológico del virus aftoso, ya que la frecuencia de aparición en células BHK 21 para el tipo A, es mayor que para el tipo O o el tipo C (14,89).

#### EFECTO DE REACTIVOS FISICOS Y QUIMICOS SOBRE EL VIRION.

Dentro de los Picornavirus, el virus aftoso es el más lábil a la acidez (26). En soluciones isotónicas es estable en el rango de pH 7,0-7,5, menos estable entre pH 8-9, e inestable a pH menores que 6,5 y mayores de 9 (14). La estabilidad a distintos pH depende de la fuerza iónica, habiendo una relación inversa entre ambos, ya que se puede lograr estabilizar el virus a pH

ácidos y baja fuerza iónica, dependiendo los valores del punto isoelectrico del virus (107).

La estabilidad al calor ha sido utilizada como criterio diferencial entre distintos tipos y subtipos serológicos del virus aftoso. Esta varía según el número de pasajes en cultivo de tejido (108). Curvas de inactivación a 55°C y 61°C para la cepa A119, muestran en rápida inactivación siguiendo una cinética de primer orden, quedando después una fracción de virus permanentemente más resistente a la inactivación (109, 110). Este mismo efecto se observó con la inactivación por la acidez. La estabilidad al calor por el ARN viral purificado, así como las curvas de estabilidad a la temperatura de mutantes sensibles y resistentes a la temperatura, indicaron que la estabilidad está relacionada con el cápside proteico (111, 112)

La estabilidad al congelamiento y descongelamiento se incrementa en soluciones de alta fuerza iónica, o en tampones de fosfato, tris, glicina, EDTA, o por el aumento de la viscosidad con sacarosa, glicerol, etc. (113).

En general, los distintos compuestos orgánicos que reaccionan con proteínas, afectan la estabilidad del virus. Muchos de estos reactivos se han utilizado con el objeto de inactivar el virus por la producción de vacunas. Los más comúnmente utilizados son: formaldehído (114, 115, 116), óxido de etileno (117, 118), gliceraldehído (119), propiolactona y luz ultravioleta (120), acetil-etilenimina (120, 121, 122), hidroxilamina (123), etc..

El virus aftoso, como otros Picornavirus, no es inactivado por éter, cloroformo, n-butanol, metanol o tolueno (121, 57, 124), ni por detergentes iónicos o no iónicos (125, 126), fluorocarbonos, etc..

Por otra parte, es sensible a enzimas proteolíticas, hecho que también se observa con algunos rinovirus (127). La acción de la tripsina ha sido una de las más estudiadas, y su efecto, estaría relacionado con la remoción de polipéptidos de características inmunogénicas, responsables además de la adsorción del virus a las células (128, 129). Una consecuencia del efecto de la tripsina sería también, la disminución en la densidad del virus.

Además de la acción del calor sobre el virus aftoso, otros agentes físicos tienen poder inactivante sobre el mismo. La inactivación por radiación  $X$  y  $\gamma$ , produce curvas de inactivación de primer orden (130, 131). Por otra parte, la fotoinactivación, es aumentada por la presencia de colorantes como rojo neutro, azul de toluidina, azul de metileno, etc. (132). La inactivación con luz ultravioleta, produce alteraciones en el A.N viral, sin alterar la antigenicidad ni la capacidad de observarse a células susceptibles (128).

#### PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL VIRUS AFTOSO

##### a) Propiedades del virión

El virus aftoso purificado, presenta al ser observado al microscopio electrónico por tinción negativa con acetato de uranilo o ácido fosfotúngstico, un diámetro de  $23 \pm 2$  nm (124, 133, 97). El peso molecular del virus aftoso fué determinado teniendo en cuenta el valor del coeficiente de sedimentación del virión, y la composición y pesos moleculares del ácido ribonucleico y proteínas que lo constituyen. Dió un valor promedio de  $6,9 \pm 0,6 \times 10^6$  daltons (134, 135).

El coeficiente de sedimentación del virus aftoso monodisperso, determinada por ultracentrifugación analítica es de  $141 \pm 7S$  y la densidad boyante promedio en cloruro de cesio es de  $1,43$  g/ml (14). Este valor corresponde a uno de los más altos dentro de los Picornavirus siendo sólo superado por rhinovirus equino  $d = 1,45$  g/ml (26).

Diferentes serotipos del virus aftoso difieren en su densidad, variando ésta entre  $1,42$  g/ml y  $1,44$  g/ml (26). Sin embargo, se han reportado valores de densidad para el virus entre  $1,42$  g/ml y  $1,51$  g/ml (135, 136, 137, 138), siendo explicables estas diferencias por el aumento de densidad producido por centrifugaciones en cloruro de cesio durante un largo período de tiempo (138).

La composición química del virus aftoso es de 31% de ARN y 69% de proteína. Su espectro de absorción en el ultravioleta presenta un máximo a 259 nm y un mínimo a 239 nm, siendo su coeficiente de extinción porcentual de  $76 \pm 7$  (57).

b) Propiedades del ácido nucleico

El ARN del virus aftoso tiene un coeficiente de sedimentación de 35S en condiciones nativas (139, 140, 26) y de 17 S cuando está desnaturalizado con formaldehído (141). La longitud de la cadena ha sido estimada en 2,2  $\mu$ m por observación al microscopio electrónico (142) y su peso molecular entre 2 y  $4 \times 10^6$  daltons. Su densidad buoyante en cloruro de cesio se estimó en 1,7 g/ml. La composición de bases para distintos tipos y subtipos inmunológicos del virus aftoso, dió un contenido en guanina-citosina de un 52%, siendo este valor el más alto entre los Picornavirus (139, 141, 143, 57, 26, 144).

El espectro de absorción en el ultravioleta del ARN extraído con fenol, presenta un máximo de absorción a 258 nm y un mínimo a 230 nm, siendo el valor de su coeficiente de extinción porcentual de 220 (57).

c) Propiedades de las proteínas

Las proteínas del virus aftoso en la forma de cápsides vacíos y unidades morfológicas 12 S, han sido descritas en la sección "Antígenos", por lo que aquí se indicarán las características aún no mencionadas.

La densidad buoyante en cloruro de cesio del cápsido vacío es de 1,31 g/ml (85). Su espectro de absorción al ultravioleta, presenta un máximo a 276 nm y un mínimo a 250 nm, mientras que el valor del coeficiente de extinción porcentual es de 11, 1 (145).

La determinación de la composición en aminoácidos para las cepas A<sub>119</sub> O<sub>9</sub> y C<sub>3</sub> permitió establecer diferencias significativas entre las mismas. De la misma manera, al comparar la cepa A<sub>119</sub> con diferente número de pasajes en células de riñón de bovino se obtuvieron diferencias en la proporción de glicina, triptófano y tirosina. Tales diferencias se pudieron relacionar con la distinta virulencia, movilidad electroforética y temperatura de degradación (146, 145).

El número de polipéptidos estructurales del virus aftoso ha sido tema de controversia entre distintos grupos de investigadores. Los distintos resultados obtenidos, se han debido principalmente a los diferentes métodos utilizados

para la obtención de las proteínas del virus, así como las diferentes condiciones en que se realizaron las electroferesis en gel de poliacrilamida para su resolución.

Inicialmente se reportó que el cápside del virus aftoso estaba constituido por un solo polipéptido. Este resultado se obtuvo por la utilización de gels de acrilamida 6% conteniendo 0,1% de DSS, o en presencia de urea 8 M en el gel y mercaptoetanol 4 M. La utilización de urea sin mercaptoetanol, o la mayor concentración de acrilamida en el gel, dió origen a varias bandas (147).

Sin embargo, otro grupo de investigadores reportaba 6 polipéptidos estructurales para el virus aftoso (148). Por la acción de tripsina sobre el virión, se removía uno de los seis polipéptidos. Experiencias realizadas con el virus tratado con la enzima, indicaron que ese polipéptido estaba relacionado con la actividad inmunizante y con el proceso de adsorción a las células.

El aislamiento de distintas fracciones proteicas por degradación parcial del virus por efecto del pH, temperatura y acción de urea 8 M; así como la determinación de los aminoácidos N-terminales de las mismas, indicó por lo menos, tres polipéptidos estructurales del virus aftoso (149).

Por otra parte, experiencias realizadas con cápsidos vacíos, así como con proteínas desnaturalizadas del virión, produjeron en algunos casos, al ser analizadas en gels de poliacrilamida, agregados moleculares (150) o desdoblamiento de polipéptidos en otros (114). Sin embargo, teniendo en cuenta todos estos factores se puede concluir que el virus aftoso, tiene en su estructura entre 4 y 6 polipéptidos (151, 152, 90, 153).

El modelo propuesto de 4 polipéptidos, coincide con el hallado en la mayoría de los picornavirus (116). La determinación de los pesos moleculares de los mismos, indicó: VP1= 34000, VP2= 30000; VP3= 26000 y VP4= 13500, hallándose en la relación 1:1:1:0,5 respectivamente (151). La función de todos los polipéptidos no se conoce, pero se determinó que VP2 es el polipéptido removido por tripsina y que VP4 da reacciones de fijación de complemento positivas con antisueros heterotípicos (90).

La determinación de los aminoácidos C-terminales de los polipéptidos mayores indicó para VP1: ser-glu; para VP2; leu-glu y para VP3 glu-ala-leu (16).

#### MORFOLOGIA DEL VIRUS AFTOSO

El virión de  $23 \pm 2$  nm de diámetro, está constituido por una cadena de ARN y el cápside proteico. Dicho cápside está formado por unidades morfológicas muy compactamente unidas, lo que ha hecho dificultosa la determinación por microscopía electrónica del número de unidades morfológicas que lo constituyen (97). No existe actualmente coincidencia acerca del tamaño y coeficiente de sedimentación de las unidades morfológicas. Inicialmente por observación al microscopio electrónico, se reportó su diámetro como de 7-8 nm (124, 133) y más recientemente como de 12 nm (97); y el valor del coeficiente de sedimentación como de 12S o 14S (96, 137). Por co-centrifugación de las unidades morfológicas del virus de la encefalomiocarditis (14S) y del virus aftoso, noto este último por tratamiento con tampón fosfato de sodio 0,05 M a pH 6,5; se observaron diferencias en las velocidades de sedimentación de ambas, correspondiéndole a la unidad morfológica del virus aftoso un valor de sedimentación de 12 S (152).

Se calculó el peso molecular de la unidad morfológica, por determinación de su coeficiente de sedimentación y constante de difusión, en 289000 o 282000 daltons (153a, 143), mientras que por electroforesis en gel de poliacrilamida en 265000 daltons (152).

Un primer intento en determinar la morfología del virus, indicó simetría icosaédrica y que estaba constituido por 32 unidades morfológicas (154).

Sin embargo, recientemente han sido propuestos dos modelos para el virus aftoso (152, 97).

El primero se basó en la determinación del número de polipéptidos estructurales y sus pesos moleculares, por electroforesis en poliacrilamida; la determinación del peso molecular del ARN y el efecto de la tripsina sobre los polipéptidos. Teniendo en cuenta estos datos, ~~se asignó~~ ~~el~~ ~~valor~~ ~~del~~ ~~PM~~ de la unidad morfológica, y la estructura del virus Maus-Elberfeld y de algunos rino-

virus (155, 156, 157), se propuso para el virus aftoso una estructura icosaédrica, compuesta por 20 unidades morfológicas de coeficiente de sedimentación 12S. Según este modelo, cada unidad estaría formada por cantidades equimoleculares de los polipéptidos VP1, VP2, VP3 y los vértices del icosaedro por el polipéptido VP4 (152).

El segundo modelo propuesto (97), se basó en la observación al microscopio electrónico por tinción negativa, del número de unidades morfológicas y morfología de las mismas. Por ruptura del virión se obtuvieron 12 unidades morfológicas de 12 nm cada una (12S-14S) de estructura pentagonal. Cada pentámero estaría ; constituido por 5 protómeros, teniéndose entonces el virus aftoso 60 protómeros que darían cuenta de su estructura icosaédrica. Este modelo es igual al propuesto para otros picornavirus (155, 156, 157).

#### REPLICACION DEL VIRUS AFTOSO

##### a) Ciclo de crecimiento:

El tiempo de replicación viral varía considerablemente dependiendo del tipo de virus, de la célula huésped, del estado nutricional de la célula, de la multiplicidad de la infección y de las condiciones de infección (pH, medio de cultivo, temperatura, etc. (158)).

El primer paso de la infección de células por el virus aftoso es la adsorción a receptores específicos a los que fueron determinados entre 30 y 100 por virus (14). El tratamiento del virus con tripsina afecta polipéptidos requeridos para la adsorción (129). La adsorción es favorecida por la presencia de cationes divalentes (159) y es dependiente de la temperatura (160). El tratamiento con EDTA del virus adsorbido a 4°C la libera de las células sin afectar a éstas últimas (159), no siendo liberado si la temperatura se eleva, ya que ocurre la penetración del mismo a la célula. Este fenómeno es fuertemente dependiente de la temperatura, siguiendo una cinética de primer orden, ya que se infectan más del 90% de las células en 3 minutos a 37°C, mientras que debajo de 15°C la penetración es nula (160).

Luego de la penetración, hay un período de latencia, estimado entre



100 y 110 minutos para células de riñón de bovino infectadas, hasta la detección de la progenie viral intracelularmente (161). La detección extracelular del virus comienza a los 150 minutos y coincide con la finalización de la fase logarítmica, a partir de entonces disminuye la velocidad de síntesis y se alcanza el máximo de producción viral entre 4,5 y 5 horas (162).

b) Síntesis de ARN viral

Estudios de las especies de ARN específicos de virus sintetizados intracelularmente, han indicado por lo menos 3 ó 4 especies diferentes de ácidos nucleicos (163, 140). Por utilización de actinomicina D en concentraciones no mayores de 10 ug/ml y de uridina radioactiva, se obtuvieron los ARN específicos del virus marcados los que se analizaron por centrifugación en gradientes de sacarosa o por electroforesis en geles de agarosa (163, 164). Así, se pudieron identificar una fracción de 37S, heterogénea, sensible a la ribonucleasa; una fracción 20S, resistente a la ribonucleasa; una fracción 20-37S, parcialmente resistente a la ribonucleasa y una fracción de coeficiente de sedimentación menor de 20 S. La heterogeneidad de la fracción 37S de ARN intracelular, comparada con el ARN 35S del virión, así como estudios de complementaridad de bases, permitió pensar en un modelo de ARN circular durante el proceso de replicación (14).

El aislamiento de la ARN polimerasa durante las primeras horas de infección (165) y la determinación de su actividad como un complejo soluble con el ácido nucleico permitió el estudio de la síntesis del ARN viral in vitro. Se identificaron las fracciones de 37S, 20S de doble cadena y las heterogéneas entre 20 y 37S. La fracción 20S consistiría en la forma replicativa, mientras que la fracción 20S-37S serían intermediarios de la replicación. Se identificó también una fracción heterogénea entre 100 S y 300 S, que serían intermediarios en la síntesis del ARN 37S y que consistiría en un complejo formado por la ARN polimerasa y el intermediario replicativo (166). Por pruebas de hibridización realizadas con los productos obtenidos in vitro, se concluyó que las especies de ARN sintetizadas eran del mismo signo del virión, comportándose como ARN mensajeros (167). Por otra parte, recientemente se reportó la existencia en el virión de una proteína con actividad de ADN polimerasa dependiente de ARN, que

sintetizaría ADN utilizando como molde el ARN del virión (168). Este resultado aún no ha sido confirmado por otros grupos de investigación.

c) Síntesis de proteínas virales

Durante el ciclo de infección, se detectaron tres picos de síntesis proteica. De ellos el primero ocurriría a los 60 minutos, sería inhibido por guanidina y estaría relacionado con la síntesis de la ARN polimerasa. El último de los picos de síntesis estaría relacionado con el período de maduración del virus (169).

Como consecuencia de la infección con el virus, se observó una rápida inhibición en la síntesis de proteínas de la célula huésped (169, 170). La inhibición por el virus en la síntesis del ARN celular parece ser más rápida que la proteica, y a nivel de la metilación del ARN nuclear. Esto produciría la inhibición de la formación de los precursores ribosómicos nucleares, consecuentemente de los ribosomas y de la síntesis proteica (171, 170). Las distintas especies proteicas identificadas hasta ahora, han sido descritas en detalle en la sección Morfología del virus.

## CAPITULO II

### MATERIALES Y METODOS

#### 1) VIRUS UTILIZADOS

Se emplearon indistintamente cepas pertenecientes a los tres tipos serológicos presentes en el país. Del tipo O, el subtipo O<sub>1</sub>, del tipo A el subtipo A<sub>25</sub> y del tipo C el subtipo C<sub>1</sub>. Todos ellos cedidos por Selsa (Servicio de Luchas Sanitarias, Rep. Argentina) en forma de epitelio lingual bovino infeccioso.

#### 2) ADAPTACION Y MULTIPLICACION DEL VIRUS

Previo clonado tres veces en cultivo de células BHK 21 en monocapa, mediante la técnica de Dulbeco (58) el virus multiplicado en las mismas células fué adaptado al cultivo en epitelio lingual bovino en sobrevivencia mediante la técnica de Petermann (172). Esto se logró en la mayor parte de los casos al cabo de 5 ó 6 pasajes. Los virus adaptados fueron cultivados en tanques (descritos por Frenkel (38)) empleando el medio de Baker (173) y epitelio lingual bovino en la relación 5/1 p/p. La esterilidad del cultivo fue mantenida por el agregado de penicilina, estreptomycin y cloramfenicol y controlada durante todo el proceso de la producción. La temperatura de incubación fue de 37°C y los tiempos variables para cada subtipo de virus pero nunca mayores a las 22 hs.. La oxigenación del cultivo fue mantenida por burbujeo de oxígeno medicinal durante todo el proceso (38). Cada lote de producción era de 30 litros y el número de pasajes de virus en cultivo se mantuvo entre 7 y 13 tratando de no sobrepasar este último valor para evitar que se establecieran mutantes serológicos distintos al virus bovino original.

Al final del tiempo de incubación, el tanque de producción fué rápidamente enfriado a 6°C, se suspendió la agitación del mismo, se separó el líquido sobrenadante que se centrifugó por una centrífuga Sharples a 25.000 RPMi y luego se filtró por placas Seitz EXS en un filtro de placas. Todas estas operaciones se realizaron en cámara fría a 4-6°C. Debemos aclarar que nuestros primeros intentos fueron realizados con un material distinto. En efecto, se trabajó con uno obtenido por extracción del epitelio cultivado con el sobrenadante del mismo cultivo y el material así obtenido luego de una centrifu-

gación, era sometido a las restantes operaciones descriptas. Sin embargo, el producto ~~logrado~~ era de tal complejidad, por la cantidad de protefna extraña incorporada, que la tarea se hacía ímproba, además de perder en algunas etapas de la purificación gran cantidad de virus. Esto nos llevó a trabajar sólo con el sobrenadante del cultivo Frenkel. No descartamos la posibilidad de estudiar en el futuro virus intracelular.

El material filtrado a través de las placas EKS constituyó el llamado virus crudo o de partida.

### 3) TECNICAS EMPLEADAS PARA LA PURIFICACION DEL VIRUS AFTOSO

1. Se emplearon fundamentalmente los métodos utilizados por Bachrach y col. (57) y Brown y col. (174), para la purificación del virus aftoso en cultivo de tejido, con las modificaciones necesarias para adaptarlo al material en estudio.

3.1. Concentración del virus aftoso (Todas las operaciones de concentración fueron realizadas a 4°C).

#### a) Precipitación con metanol

A 30 litros del virus crudo enfriado a 4°C se agregó lentamente y con agitación 7,5 litros de metanol a la misma temperatura. La suspensión alcohólica se dejó en reposo durante una noche a -12°C con el objeto de completar la precipitación.

El precipitado floculento, fué separado del sobrenadante por centrifugación en un centrífuga Sharples a 25.000 rpm. El flujo de pasaje a través de la centrífuga se mantuvo entre 6 y 8 litros/hora, obteniéndose en estas condiciones un sobrenadante límpido.

El sobrenadante fué resuspendido y disgregado en tampón TE ( el volúmen de resuspensión se indica en las diferentes experiencias realizadas) por medio de un homogeinizador Ultraturrax a 18000 rpm durante 2 minutos.

#### b) Precipitación con sulfato de amonio

A 30 litros de virus crudo se agregó lentamente y con agitación 30 litros

de solución saturada de sulfato de amonio en tampón fosfato de sodio 0,05 M pH 7,5. La precipitación se completó por estacionamiento durante una noche a 0°C.

Las condiciones de centrifugación y resuspensión son las mismas que en la precipitación con metanol.

### c) Precipitación con polietilenglicol

A 3 litros de virus crudo a 4°C se agregó lentamente y con agitación 560 ml de una solución de PEG 6000 al 50% en tampón TE. Luego de una noche a 0°C el precipitado se separó por centrifugación a 4000 g durante 60 min. a 0°C. El precipitado se resuspendió en las condiciones ya mencionadas.

### 3.2 Tratamientos con solventes orgánicos

Volúmenes iguales de suspensión de virus en TE y de la mezcla n butanol-cloroformo (1/1 v/v) fueron mezclados por medio de un homogeneizador Ultraturrax a 18000 rpm durante 1 min. Esto dió origen a una emulsión de aspecto blanco lechoso.

La centrifugación a 2000 rpm en el rotor de la centrífuga International PR-2 permitió la separación de tres fases. La inferior de butanol-cloroformo (en la cual están disueltos principalmente lípidos y lipoproteínas); la intermedia de material desnaturalizado por el tratamiento (principalmente proteínas) y la fase acuosa superior ligeramente opalescente que contenía el virus.

Se separó la fase acuosa y se repitió el tratamiento hasta que prácticamente no apareció material insoluble en la interfase que ocurrió generalmente luego de tres tratamientos sucesivos.

A la fase así obtenida se le agregó un volumen de arcton 113 (1,1 2-trifluor 1,2, 2-tricloro etano) y desproteinizó por agitación con un homogeneizador Ultraturrax durante 1 min. La centrifugación en las condiciones mencionadas antes, permitió la separación de la fase acuosa superior que contenía el virus. Este tratamiento se repitió hasta que no apareció material insoluble en la fase orgánica (comúnmente dos tratamientos).

El líquido infeccioso así obtenido presentaba un ligero color amarillento y era translúcido.

### 3.3 Fraccionamiento por columna de Sepharosa 2 B

La sepharosa 2 B permite el fraccionamiento de partículas en un rango de pesos moleculares entre  $1 \times 10^5$  y  $4 \times 10^7$ .

Previo a la preparación de la columna, la sepharosa 2 B fué lavada 2 veces con agua destilada y 5 veces con un volumen de tampón TE. Los sucesivos lavados se hicieron por decantación con el objeto de remover las partículas finas del gel. Se utilizó una columna de 80 cm de largo por 2,5 cm de diámetro. El empaquetamiento del gel en la columna se realizó en cámara fría a 4°C y por simple gravitación.

Se hizo pasar tampón a través de la columna durante una noche (4 ó 5 volúmenes) determinándose el equilibrio de la sepharosa con el mismo cuando el líquido eluido tenía el mismo pH y absorción a 260 nm que el tampón TE.

Se agregaron 4,5 ml de virus en TE y se mantuvo un flujo de 15 ml/hora. Se recogieron fracciones de aproximadamente 3 ml cada una.

### 3.4 Ultracentrifugación en cloruro de cesio

Este método permite la concentración y purificación de virus en función de la densidad de los distintos componentes de la muestra (57).

Se utilizó el rotor 30 de la ultracentrífuga Spinco L 2-50. Los tubos correspondientes contenían 5 ml de la solución de cloruro de cesio en TE a los que se agregó 30 ml de virus en TE.

Mediante diferentes ensayos en que se varió la densidad de la solución de cloruro de cesio y el tiempo de centrifugación a 29000 rpm, se determinó que las condiciones óptimas de centrifugación correspondían a una densidad de 1,44 g/ml de la solución de cloruro de cesio y 270 minutos de centrifugación.

Terminada la misma se recogieron fracciones de 0,5 ml cada una por goteo al pinchar el fondo del tubo.

### 3.5 Ultracentrifugación a través de solventes orgánicos

Este método utilizado para la purificación del virus aftoso (57), consiste en la ultracentrifugación del virus parcialmente purificado, a través de

una fase orgánica y su posterior fraccionamiento en una fase acuosa de cloruro de cesio en tampón TE.

Dos mezclas orgánicas fueron utilizadas, la de n-octanol-cloroformo y la de dibutilftalato. Los resultados obtenidos con ambas mezclas orgánicas fueron muy semejantes.

La densidad de la mezcla fué generalmente de 1,03 g/ml, la que se obtenía al mezclar n-octanol y cloroformo en las relaciones 68:32 v/v.

En un tubo del rotor SW<sub>39</sub> de 5 ml de capacidad, se agregaron consecutivamente 0,7 ml de solución de cloruro de cesio en tampón TE de densidad 1,43 g/ml, 1,1 ml de mezcla n-octanol-cloroformo (densidad: 1,03 g/ml) y 3,2 ml de suspensión de virus en tampón TE.

La centrifugación se realizó a 39000 rpm durante 210 minutos y a 4°C de temperatura. No se utilizó freno para detener la centrifugación.

La banda de menor densidad ubicada en la zona de cloruro de cesio en TE fué separada al terminar la centrifugación, pinchando el fondo del tubo.

### 3.6 Flotación en cloruro de cesio

Al material proveniente de la centrifugación a través de la fase orgánica, se aumentó la densidad con solución de cloruro de cesio en TE (densidad: 1,84 g/ml) hasta obtener la suspensión densidad: 1,6 g/ml.

Sobre el virus en cloruro de cesio a densidad 1,6 g/ml se agregaron lenta y consecutivamente con pipeta Pasteur y tocando la pared del tubo 1,5 ml de cloruro de cesio en tampón TE de densidad 1,53 g/ml, 1 ml de cloruro de cesio en TE densidad 1,35 g/ml y 0,5 ml de tampón TE.

La centrifugación se realizó a 37000 rpm en el rotor SW<sub>39</sub> durante 180 minutos y a 4° C.

Terminada la misma, se separaron las bandas de menor densidad pipeteando desde la parte superior del tubo.

El virus se dializó contra 200 volúmenes de tampón TE en cámara fría durante una noche y con agitación.

### 3.7 Ultracentrifugación en gradientes de sacarosa

a) Preparación del gradiente: En tubo del rotor 30 de la ultracentrífuga Spinco L 2-50, luego del agregado de 1,5 ml de sacarosa 60% p/v en TE, se pipetearon lentamente y por las paredes, consecutivamente 3,2 ml de sacarosa en TE: 45%; 41,25%; 37,5%; 33,75%; 30%; 26,25%; 22,5%; 18,75% y 15%.

La linealización del gradiente se logró o bien por simple difusión a 4°C dejando el gradiente en reposo durante una noche o por centrifugación a 30000 rpm durante una hora.

La linealidad del mismo se comprobó por determinación refractométrica de la densidad de diferentes fracciones.

Cuando se utilizó el rotor SW<sub>39</sub>, el gradiente se formó de la misma manera que antes, pero manteniendo las relaciones de volúmenes en función de la capacidad de los distintos tubos de centrifuga utilizados.

b) Centrifugación: El agregado de material a fraccionar se hizo por las paredes del tubo, muy lentamente de manera de no producir turbulencia.

Luego del agregado del mismo (generalmente 3 ml para el rotor 30) la centrifugación se efectuó a 29.000 rpm durante 180 minutos y a 4° C. Al finalizar la centrifugación se coleccionaron fracciones de 0,5 ml cada una pinchando el fondo del tubo.

Las fracciones reunidas fueron diluidas con un volumen de tampón TE y luego dializadas contra 200 volúmenes del mismo tampón con agitación en cámara fría durante una noche.

Cuando fué necesario el material dializado se concentró por diálisis contra REG20000 al 60% o por ultracentrifugación en el rotor 40 sobre una capa de 1 ml de solución de cloruro de cesio en TE (densidad: 1,6 g/ml) a 40000 rpm durante 120 minutos a 4° C. Esta última operación se realizó cuando las fracciones seleccionadas iban a ser posteriormente analizadas por ultracentrifugación isopícnica en gradientes lineales de cloruro de cesio.

## 4. ABSORCION EN EL ULTR VIOLETA

### 4.1 Curvas de absorción

Las diferentes curvas de absorción a 260 nm correspondientes a los dis-



tintos fraccionamientos realizados (cromatografía en gel de sepharosa, centrifugación en gradientes de cloruro de cesio o sacarosa, etc.) fueron realizadas en un espectrofotómetro Beckman, modelo DU-2.

Para ello alícuotas de las distintas fracciones (30 ul a 200 ul) dependiendo este volumen de la cantidad de material purificado ) se diluyeron con 0,8 ml de tampón fosfato 0,05 M, pH 7,5 y se determinó la absorción a 250 nm en microcubetas de cuarzo. Como referencia se utilizó agua destilada. Las lecturas , en todos los casos fueron corregidas por diferencia entre los respectivos valores de absorción a esa longitud de onda respecto de los de su blanco. Como ejemplo, en el caso de la centrifugación en gradientes de sacarosa, el blanco consistió en reemplazar los 3 ml de material infeccioso por 3 ml de tampón TE, el cual fué centrifugado y fraccionado simultáneamente con la muestra, determinándose la curva de absorción a 260 nm.

#### 4.2 Determinación de los coeficientes de extinción

El coeficiente de extinción porcentual se calculó según la ecuación:

$$E_{259}^{1\%} = \frac{DO}{C}$$

en donde  $E_{259}^{1\%}$  es el coeficiente de extinción porcentual a 259 nm, DO es la absorbancia del virus a 259 nm determinada en cubetas de 1 cm de lado y C la concentración del virus expresada en g/100 ml.

El virus originalmente en tampón TE fué dializado por una noche contra 200 volúmenes de tampón fosfato de sodio 0,05 M pH 7.5 con el objeto de eliminar el Tris y EDTA ya que interfieren en la medida de la absorción a 259 nm y en la determinación de la concentración proteica por el método de Lowry.

Las correcciones por "light scattering" fueron hechas por extrapolación de curvas (175).

#### 4.3 Espectros de absorción

Fueron determinados en un espectrofotómetro Shimatzu modelo MPS-50L.

Antes de la determinación del espectro de absorción en el ultravioleta, las muestras fueron dializadas durante una noche contra 200 volúmenes de

tampón fosfato de sodio 0,05 M pH 7,5 en cámara fría a 4°C.

En la cubeta de referencia se coloca el mismo tampón. Los valores fueron corregidos respecto a una curva de absorción base realizada con el tampón fosfato en que se encontraba disuelto el virus.

#### 5. ULTRACENTRIFUGACION ANALITICA

Fuó utilizada con el objeto de determinar la homogeneidad de las preparaciones y el valor de los coeficientes de sedimentación.

Para ello, se utilizó una ultracentrífuga analítica Spinco modelo E equipada con schlieren óptico.

La centrifugación se realizó a 25900 rpm en celdas de doble sector y a 20°C de temperatura.

La muestra analizada (1-3 mg de proteína/ml) estaba suspendida en tampón TE y en la cubeta de referencia se colocó el mismo tampón.

El cálculo y valor de los coeficientes de sedimentación, se indica en la sección "RESULTADOS".

#### 6. MICROSCOPIA ELECTRONICA

Fuó realizada por el Dr. César Vásquez en la Facultad de Ciencias Médicas. La técnica utilizada consistió en la tinción negativa de las diferentes muestras con acetato de uranilo al 1% (97). Previamente sobre las grillas con membrana de carbón se hizo un spray del virus en tampón TE y luego se lo fijó con tampón ácido acético-acetato de amonio pH 5. Las características de la microscopía se muestran al pie de las micrografías.

#### 7. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

El virus purificado ( $A'_3$ ) y suspendido en tampón TE fuó centrifugado en el rotor SW<sub>39</sub> a 39000 rpm durante 90 minutos.

El precipitado se resuspendió en tampón tris-glicina 0,023 M pH 8,6, urea 8 M y 2-mercaptoetanol 1% en un volumen tal que se tuviera una concentración proteica de 1 mg/ml.

Los geles de acrilamida fueron preparados de acuerdo al método de Davis (176) con algunas modificaciones (148).

Se utilizó gel de poliacrilamida al 7% y urea 8M en el gel. El mismo se paró disolviendo 7 g de acrilamida y 48 g de urea en agua destilada, hasta un volumen de 100 ml.

La solución de gelificación se obtuvo por agregado de 0,91 ml de una solución de persulfato de sodio al 5% y 0,028 ml de TEMED (dimetilaminopropionitrilo).

La mezcla se vertió sobre tubos de 0,8 cm por 12 cm hasta una altura de 8 cm e inmediatamente se agregó agua destilada, sin remover el gel, hasta que se formó una capa de 5 mm, para evitar la formación del menisco en el gel.

La gelificación se aceleró por medio de una lámpara de rayos infrarrojos y se completó al cabo de 30 minutos de permanecer el gel en reposo.

Luego de la eliminación del agua destilada se agregaron 0,2 ml de la muestra (no siendo necesario el agregado de sacarosa para aumentar la densidad, ya que ese efecto lo produjo la solución de urea 8 M en que estaba suspendido el virus).

La electroforesis se realizó en tampon tris-glicina 0,023 M pH 8,6 a 5 mA/gel durante 5 horas.

Finalizada la misma los geles fueron extraídos del tubo soporte y colocados con amido Schwartz 0,5% en ácido acético al 7% durante 40 minutos. Luego se hicieron sucesivos lavados con la solución de ácido acético al 7% para eliminar el exceso de colorante.

## 8. INFECCIOSIDAD

La determinación de título infectante fué realizada en células epiteliales primarias de riñón de cerdo, según el método de placa de Dulbecco al que introdujeron algunas modificaciones (53).

Las células fueron crecidas en monocapa en botellas de 90 ml de vidrio

nutro ~~ex medio Banks~~ suplementado con 0,5 % de hidrolizado de lactoalbúmina y 15% de suero equino. Una vez formada la monocapa, generalmente al cabo de 3 días de incubación a 37°C, se infectaron las células con 0,2 ml de la dilución de virus en medio Eagle sin suero, enfriado a 4°C.

La absorción se realizó a 37°C durante media hora. Al cabo de la misma se agregaron a cada frasco 5 ml de una suspensión de agarosa 0,9% en medio Eagle suplementado con suero fetal bovino al 2%.

Los frascos se incubaron durante 48 horas a 37°C. Al cabo de ese tiempo se fijaron las células durante 20 minutos con una solución de formol al 10%. Se sacó cuidadosamente el agar y se coloraron las células con soluciones de cristal violeta o rojo neutro al 0,2%.

## 9. FIJACION DE COMPLEMENTO

### 9.1 Inmunosucros usados

Los sueros utilizados fueron específicos para las copas: A<sub>24</sub>, A<sub>25</sub>, A<sub>26</sub>, C<sub>160</sub> y C<sub>Argentino</sub>. Los mismos, fueron gentilmente cedidos por C.E.L.S.A. Se trató de sueros hiperinmunes, obtenidos en cobayo, de acuerdo a las técnicas clásicas, con virus recibidos del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa.

### 9.2 Técnica de fijación de complemento

Se utilizó el método de Brooksby (73), según el cual, la titulación de los antígenos (Ag) se realizó, manteniendo constantes las cantidades de Ag y de anticuerpo (Ac), y variando la cantidad de complemento (C') agregado. Las reacciones se realizaron en condiciones de exceso de Ac, pudiéndose entonces mantener una relación lineal entre la concentración de A. y la fijación de complemento por el sistema Ag-ac.

### Glóbulos rojos

Se emplearon glóbulos rojos (GR) de carnero, los que fueron lavados 3 veces con 10 volúmenes de tampón veronal isotónico y centrifugados a 1800 rpm durante 5 minutos. Se utilizaron aquellos en los que el 2° y el 3er. lavado presentaban un sobrenadante incoloro. La suspensión de GR

se diluyó, hasta que 1 ml de la misma, adicionada de 14 ml de una solución 0,1% de bicarbonato de sodio dió un valor en el espectrofotómetro, de  $DO = 0,700$  a una longitud de onda de 540 nm.

Suero hemolítico

Fué obtenido en conejos adultos, por inoculación de GR de carnero.

Determinación del título del suero hemolítico

a) Sensibilización de los glóbulos rojos: se efectuaron las siguientes diluciones del suero hemolítico (SH): 1/200, 1/400, 1/800, 1/1.600. A 5 ml de la suspensión normalizada de GR, se agregaron 5 ml de cada dilución de SH. La sensibilización se realizó por incubación durante 30 min. en baño maría a 37°C.

b) Titulación del SH, en el cuadro N° 1 está esquematizada la titulación del SH.

Cuadro N° 1: Protocolo de la titulación del suero hemolítico

Tubo N°	1	2	3	4	5*	6**
Dilución del SH	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/200	1/200
Volumen de GRS en ml	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
Volumen de tampón veronal en ml	5	5	5	5	7,5	-
Volumen de C en ml	2,5	2,5	2,5	2,5	-	-
Volumen de carbonato de sodio en ml	-	-	-	-	-	7,5
Condiciones de incubación	30 minutos a 37°C					
D.O. a 540 nm***	0,732	0,685	0,655	0,499	0,021	0,795
D.O. corregida	0,711	0,664	0,634	0,478	-	-
Porcentaje de hemólisis	89,4	83,5	79,7	60,1	-	100

\* Blanco de 0% de hemólisis

\*\* Blanco de 100% de hemólisis

\*\*\* Se determinó la absorbancia a 540 nm del sobrenadante de los GR luego de centrifugar 5 min a 400 g.

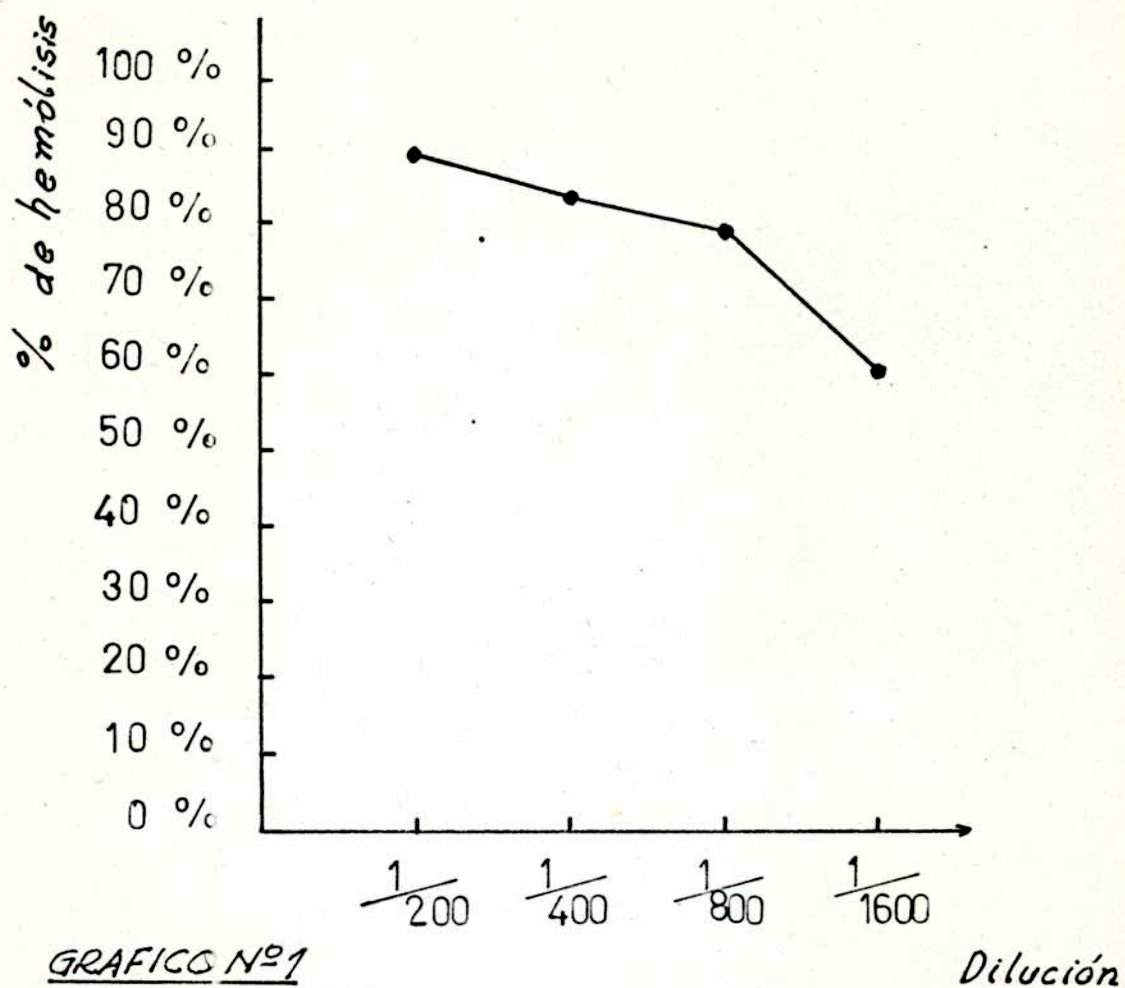


GRAFICO Nº1

Dilución

Titulación del suero hemolítico

En el gráfico n° 1 se muestran los resultados expresados como % de hemólisis vs dilución del SH. Se consideró 1 UH (unidad hemolítica), a la mayor dilución del SH a partir de la cual, por aumento de la concentración del mismo, se mantiene constante el porcentaje de hemólisis. En el ejemplo mostrado, se consideró como título del SH el valor de dilución 1/800.

c) Titulación del complemento

A volúmenes iguales (1,25 ml) de glóbulos rojos sensibilizados (GRS), es decir, volúmenes iguales de GR de D.O. = 0,700 y SH dilución 1/800, se agregaron cantidades variables de complemento (C'), de manera de obtener porcentajes de hemólisis comprendidos entre un 20% y un 80%. Los volúmenes de los distintos tubos se igualaron con tampón veronal. Los blancos correspondientes al 0% y 10% de hemólisis, la incubación a 37°C, centrifugación y determinación de DO, se efectuaron como en la determinación del SH.

En el cuadro n° 2 se resumen los resultados obtenidos de la titulación del complemento.

El cálculo del título fue determinado por utilización de la ecuación de von Krogh:

$$\log x = \log k + \frac{1}{n} \log \left( \frac{Y}{1-Y} \right) \quad (1)$$

en la que:

$x = \text{ml } C' \text{ } 1/50$

$100 Y = \% \text{ de hemólisis}$

Al graficar  $\log x$  vs  $\log Y/1-Y$  obtenemos una recta ( se cumple para valores comprendidos entre 20 y 80% de hemólisis) cuya pendiente  $1/n$  es función de la concentración de glóbulos rojos utilizados y su constancia durante el experimento indica que el sistema utilizado es correcto. (En nuestro experimento obtuvimos un valor de  $n = 0,33$ ). Para un valor de  $Y = 0,5$  se tiene que  $\log x = \log k$  representando entonces  $k$  los ml de  $C' \text{ } 1/50$  que producen el 50% de hemólisis en el sistema completo.

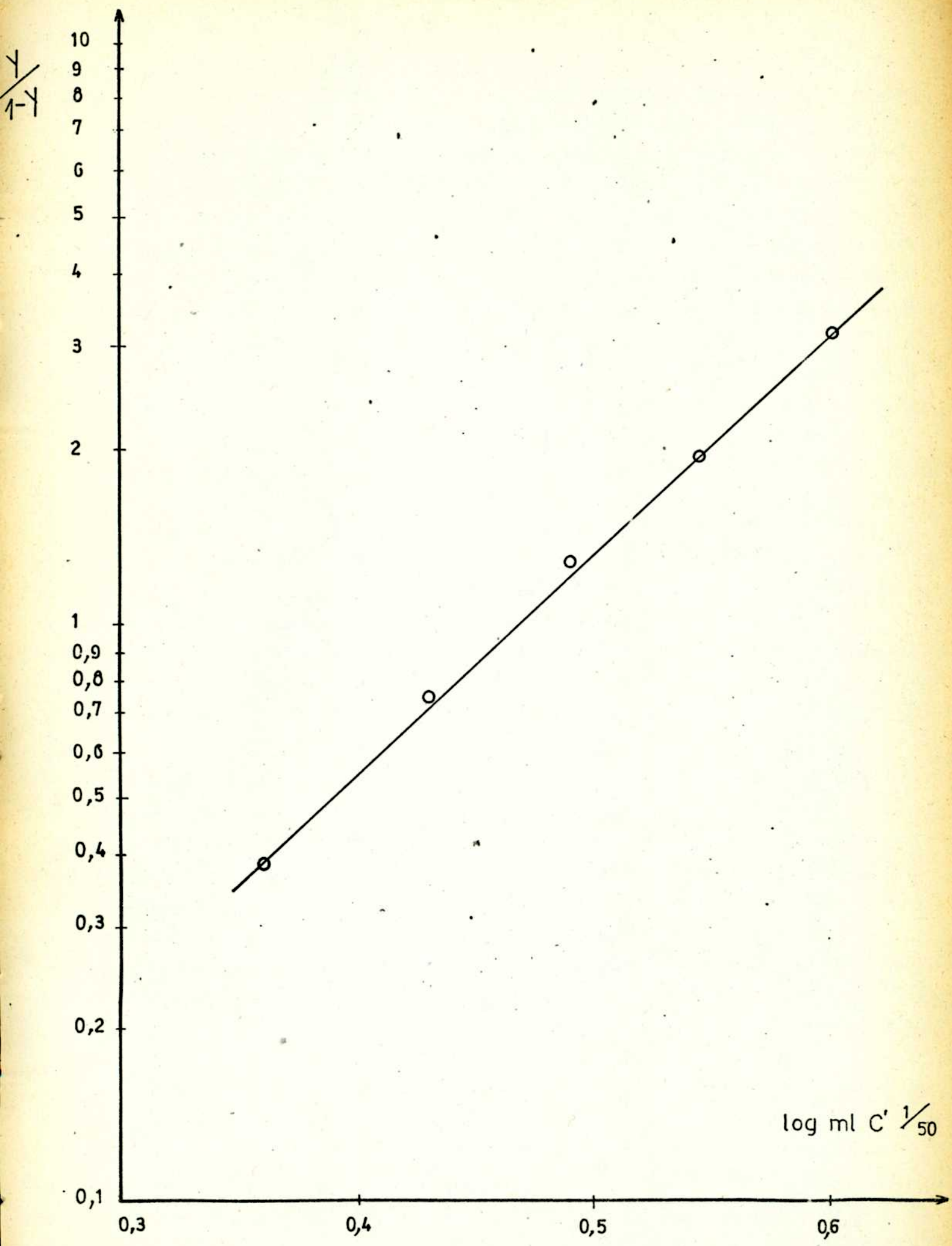
En el gráfico n° 2 se representó  $\log Y/1-Y$  vs  $\log \text{ml } C' \text{ } 1/350$  por lo cual se pueden obtener los ml de  $C' \text{ } 1/350$  que producen 50% de hemólisis.

El título del complemento obtenido indicó que  $2,94 \text{ ml } C' \text{ } 1/350 = 1 \text{ UH}$ .

El complemento fue titulado siempre antes de la determinación del título del antígeno en cada experimento.







Titulación del complemento  
GRAFICO N° 2

### Titulación del antígeno

En cada uno de los tubos se agregó un volumen tal de la dilución de C 1/50, que correspondió a 0,24; 0,3; 0,44; 0,53 y 0,7 unidades hemolíticas. Luego se igualaron los volúmenes a 1 ml con tampón veronal. El 100% de hemólisis se obtuvo por agregado de un exceso muy grande de complemento.

Se agregaron a cada tubo 0,4 ml del antisuero correspondiente (sueros hiperinmunes obtenidos de S.I.L.S.A) de dilución 1/30. Luego se agregó al sistema completo 0,2 ml de antígeno en tampón veronal. Para la determinación de la anticomplementaridad del anticuerpo, se reemplazó el Ag. por 0,2 ml de tampón veronal.

Luego de incubar 30 minutos a 37°C se agregó a cada tubo 1 ml de GRS preparados de la misma manera que en la titulación del complemento. Luego de una nueva incubación de 30 min a 37° se centrifugó la suspensión a 500g durante 5 min. y se determinó la absorción a 540 nm.

### 10. DETERMINACION DE PROTEINAS

La concentración proteica fue determinada por el método de Lowry (177). Las muestras inicialmente en tampón TE con o sin cloruro de cesio, fueron dializadas exhaustivamente durante una noche contra tampón fosfato de sodio 0,02 M pH 7,5 ya que el TE interfiere en la determinación. Se utilizó como patrón una solución al 0,2% de seroalbúmina bovina cristalizada (Sigma) disuelta en el mismo tampón.

### 11. DETERMINACION DE DENSIDADES

Las curvas de densidad de los gradientes de equilibrio de cloruro de cesio se determinaron por refractometría. Se utilizó para ello un refractómetro marca Zeitz termostatzado a 20°C.

La determinación se efectuó en una de cada cuatro fracciones del gradiente, que contenían tres gotas cada una, midiendo el valor del índice de refracción correspondiente a la segunda gota de dicha fracción. La conversión del valor del índice de refracción en densidad se efectuó utilizando una curva de índice de refracción vs densidad de soluciones patrón de cloruro de cesio en tampón TE. Los valores de densidad de las soluciones patrón de cloruro de cesio se determinaron por picnometría.

CAPITULO III

RESULTADOS

A. CONCENTRACION POR PRECIPITACION:

Debido a la relativamente baja concentración vírica obtenida en nuestro caso por el método de Frenkel (v.g.  $10^6 - 10^7$  UFP/ml), fué necesario partir de grandes volúmenes de cultivo infeccioso para disponer de cantidades apreciables de virus y poder continuar la purificación.

Los métodos de concentración de virus utilizados fueron tal como se indicó en Materiales y Métodos:

a<sub>1</sub>) Precipitación con metanol (1/4 v/v) o con solución saturada de sulfato de amonio en tampón TE (1 v/v).

a<sub>2</sub>) Precipitación con polietilenglicol 6.000 (PEG 8,5 p/v final).

Las precipitaciones donde intervino el metanol y el sulfato de amonio, fueron utilizadas para la concentración de grandes volúmenes de líquido infeccioso (10-50 ls), mientras que la precipitación con polietilenglicol se usó para volúmenes no mayores de 3 ls.

a<sub>1</sub>) Precipitación con metanol o con sulfato de amonio:

Luego de la precipitación a baja temperatura, las suspensiones fueron centrifugadas en las condiciones especificadas en Materiales y Métodos. Los precipitados se resuspendieron en TE en la relación 1/100 respecto del volumen original utilizada por Bachrach y Brown con el material proveniente de cultivos en líneas celulares (57, 174).

Los líquidos concentrados fueron clarificados por centrifugación a 8.000 g durante 20 minutos, determinándose la concentración proteica y el título infectante de los mismos.

En la Tabla I se muestran los resultados comparativos de la efectividad de precipitación con metanol y sulfato de amonio.

Tabla N° 1: Concentración por precipitación del líquido infeccioso de partida, con metanol y sulfato de amonio

Material	Tratamiento	Relac. de Concent.	Proteína total	Infectividad total	Infectividad específica	Rendimiento
N°			mg	UFPx10 <sup>6</sup>	UFP/mg de prot.x10 <sup>5</sup>	%
1	Suspensión vírica original	1/1	320	90	2,8	100
2	Material 1 Precipitado con CH <sub>3</sub> OH	100/1	10	15	15	17
3	Material 1 Precipitado con SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	100/1	42,5	17	4	19

En base a los datos de la Tabla n° 1 y considerando la efectividad de la concentración (rendimiento), es indistinto el uso de uno u otro agente precipitante. El rendimiento obtenido en ambos casos fué muy bajo. En las mismas condiciones de concentración con el material proveniente de cultivo de tejido el rendimiento es de aproximadamente el 50% (57,17%).

La gran disminución de la masa vírica recuperada, se podría deber a:

- 1) inactivación del virus por los agentes precipitantes,
- 2) inactivación o pérdida por la centrifugación,
- 3) pérdida de virus por falta de disolución.

Con el objeto de establecer la razón por la cual el rendimiento de este paso era tan bajo, así como las condiciones óptimas de precipitación, se realizaron las siguientes experiencias:

1°) Se precipitó el virus con metanol y sulfato de amonio en las condiciones anteriormente especificadas y se lo resuspendió en el mismo volumen de partida, de manera que no hubiera concentración.

Por titulación de la suspensión se determinó que en estas condiciones el porcentaje de virus recuperado osciló entre un 70-100%.

En función de este resultado, de las tres posibilidades citadas, la disminución en el rendimiento se debe fundamentalmente a la falta de disolución del virus, debido a la alta concentración proteica del líquido infeccioso de partida.

2°) Con el objeto de determinar la relación de concentración óptima para dicho material, se precipitó el virus en las condiciones ya descritas, con cada uno de los dos agentes precipitantes. Los dos precipitados fueron resuspendidos en 1/100 del volumen original.

A varias alícuotas iguales de la disolución, se le agregaron cantidades distintas y crecientes de tampón TE, y se determinó la infectividad y la concentración proteica previa una clarificación a 8.000 g durante 20 minutos.

Los resultados de esta experiencia se muestran en la Tabla n° 2.

Si comparamos para una misma concentración final los datos de rendimiento obtenido con sulfato de amonio y con metanol, llegamos a la conclusión de que los rendimientos son semejantes, a pesar de lograrse en todos los casos un mayor grado de purificación utilizando metanol como agente precipitante (los datos de Infectividad específica de la Tabla 1 confirman esto último). Esto se debe a la mayor precipitación de proteína contaminante por parte del sulfato de amonio.

En base a los datos presentados en la Tabla n° 2 vemos que una concentración de aproximadamente 10 veces con metanol, permite la recuperación de un 40-50% de la infectividad original.

TABLA N° 2: Eficacia de la precipitación con metanol y sulfato de amonio para diferentes grados de concentración

Materia	Tratamiento	Volumen	Infectividad total	Proteína total	Infectividad específica	Rendimiento
N°	-	ml	UFP $\times 10^6$	mg	UFP/mg prot $\times 10^6$	%
1	Suspensión vírica original	100	150	384	0,39	100
2	Mat. 1 concentrado 100 veces por precipión. con CH <sub>3</sub> OH	1	28,5	14,4	1,98	20
3	Idem anterior concentrado 33,3 veces	3	40,5	21	1,93	27
4	Idem anterior concentrado 16,6 veces	6	57	33	1,50	33
5	Idem anterior concentrado 6,6 veces	15	73,5	59	1,24	49
6	Mat. 1 concentrado 100 veces por precipión con SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	1	19,5	31,2	0,62	13
7	Idem anterior concentrado 33,3 veces	3	39	75	0,52	25
8	Idem anterior concentrado 16,6 veces	6	40,4	109	0,37	27
9	Idem anterior concentrado 6,6 veces	15	49,5	151	0,33	33

a<sub>2</sub>) Precipitación con polietilenglicol

Fué efectuada en las condiciones ya especificadas en Materiales y Métodos para volúmenes no mayores a 3 lts.

En la Tabla N° 3 se muestran los resultados obtenidos en una experiencia semejante a la mencionada para la precipitación con metanol y sulfato de amonio.

TABLA N° 3: Eficacia de la precipitación con polietilenglicol

Material	Tratamiento	Volumen	Infectivi- dad total	Prote- ina total	Infectivi- dad especí- fica	Rendi- miento
N°		ml	UFP x 10 <sup>6</sup>	mg	UFP/mg prot. x 10 <sup>6</sup>	%
1	Suspensión vírica original	100	150	384	0,39	100
2	Concentrado 33,3 veces por precipitación con PEG	3	57	62,4	0,91	38
3	Concentrado 6,6 veces por precipitación con PEG	15	63	79,5	0,79	42

En este caso por titulación del sobrenadante se determinó que precipitó un 99% del virus original.

Las diferencias entre este valor y los de la última columna de la Tabla N° 3, se deben fundamentalmente a la posible oclusión del virus por las proteínas y los ácidos nucleicos celulares precipitados. Se puede obtener un mayor rendimiento por este método cuando es utilizado luego de una desproteinización y deslipidización previa (ver inciso b<sub>2</sub>).

## B. DESPROTEINIZACION Y DESLIPIDIZACION

b<sub>1</sub>. Tratamiento con solventes orgánicos (20). Para virus obtenidos en líneas celulares, 20 l de material infeccioso fueron concentrados 100 veces por precipitación con metanol. Luego de clarificada la suspensión vírica, fué sometida a varios tratamientos sucesivos con la mezcla butanol-cloroformo y luego con arcton 113 según lo indicado en Materiales y Métodos. La suspensión de virus desproteïnizada y deslipidizada se concentró por diálisis contra PEG 20.000 al 50% en TE durante una noche a 4° C. Por último el concentrado fué clarificado por centrifugación a 10.000 g durante 30 minutos.

En la Tabla N° 4 se muestran los resultados obtenidos en una experiencia tipo.

TABLA N° 4: Eficacia de los tratamientos con mezcla cloroformo-butanol y arcton 113.

Material	Tratamiento	Volumen	Infecti- vidad total	Prote- ína total	Infecti- vidad específi- ca	Rendi- miento	Factor de purifi- cación
N°		ml	UFPx10 <sup>7</sup>	mg	UFP/mgpro- teína x10 <sup>7</sup>	%	
1	Virus concentrado 100 veces con CH <sub>3</sub> OH y clarificado	200	1260	6000	0,21	100	1
2	Material 1 tratado con butanol-cloro- formo	187	600	1490	0,4	48	1,9
3	Material 2 tratado con arcton 113 (b <sub>1</sub> )	170	540	410	1,33	43	6,3
4	Material 3 concen- trado con PEG y cla- rificado	90	450	350	1,28	36	6,1



En este último paso hay una pequeña disminución de la infectividad específica y del rendimiento. Esto se debe a la inactivación del virus por la concentración por diálisis durante una noche con PEG y su posterior centrifugación. Por las razones expuestas, este último paso de concentración no fué utilizado durante la purificación.

b<sub>2</sub>) Concentración por precipitación con polietilenglicol previa desproteización con cloroformo-butanol

Un litro de virus proveniente de cultivo Frenkel, de título  $1,7 \times 10^7$  UFP/ml y una concentración proteica de 11,3 mg/ml, fué precipitado con metanol y fue resuspendido en 1/10 del volumen original en tampón Tris ClH 0.02 M pH 7.5, EDTA 0.001 M y ClNa 0.15 M (TE ClNa) y clarificado por centrifugación a 10.000 g durante 30 minutos. La mitad del volumen de la suspensión vírica clarificado se precipitó con PEG 6.000 disuelto en el tampón TE ClNa (8% w/v final). Luego de 3 hs. a 0°C se centrifugó a 10.000 g durante 30 minutos resuspendiéndose el precipitado en 1/100 del volumen original en tampón TE.

El resto del clarificado se trató con un volumen de la mezcla de cloroformo-butanol (1/1 v/v) y previa eliminación del cloroformo disuelto, por vacío a 4°C, se precipitó con PEG en las mismas condiciones ya mencionadas. Fué necesario practicar la eliminación del solvente ya que el PEG es insoluble en soluciones diluidas del mismo.

TAJLA N° 5: Efecto de la desproteínización con mezcla cloroformo-butanol en la precipitación con PEG

Mate- rial	Tratamiento	Volúmen	Infecti- vidad	Prote- ína	Infecti- vidad específi- ca	Rendi- miento	Factor de purifica- ción
N°		ml	UFP x 10 <sup>7</sup>	mg	UFP/mg prot- x 10 <sup>7</sup>	%	
1	Virus concentrado 10 veces con CH <sub>3</sub> OH y clarificado	100	800	1.340	0.6	100	1
2	Material 1 pptdo. con PEG y clarifi- cado	10	370	217	1,7	46	2,85
3	Material 1 despro- teínizado, ppdo. con P.G y clarifi- cado	10	400	98	4,1	50	6,8

En los sobrenadantes correspondientes al material 2 y 3 de la Tabla N° 5, se determinó menos del 0,01% de la infectividad total antes de las precipitaciones.

El aumento del rendimiento del material 3 respecto del material 2, indicó que el tratamiento con la mezcla cloroformo-butanol eliminó gran cantidad de proteínas y lípidos celulares, que dificultaba la resuspensión del virus cuando se lo precipitó con PEG. El incremento en la purificación se explica como consecuencia de la acción de la mezcla orgánica.

Resumen de los métodos de concentración y purificación parcial utilizados.

En la Tabla N° 6 se muestra el resumen de los datos obtenidos siguiendo el método de Bachrach hasta la etapa previa a la centrifugación en cloruro de cesio.

TABLA N° 6: Eficacia de la concentración y purificación con solventes orgánicos según el método de Bachrach.

Materia N°	Tratamiento	Relac.de concent.	Rendimiento %	Factor de purificación
1	Suspensión ví- rica original	1/1	100	1
2	Material 1 pre- cipitado con me- tanol y clarifi- cado	1/100	17	5,3
3*	Material 2 des- proteinizado y clarificado (b <sub>1</sub> )	1/100	7,3	33,4

\* Comprende 3 tratamientos con cloroformo-butanol, 2 con acetón 113 y clarificación.

En la Tabla n° 7 se resumen los datos correspondientes a la eficacia de la purificación teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los incisos A y B.

TABLA N° 7: Eficacia de la purificación empleando PEG

Material N°	Tratamiento	Relación de concentración	Rendimiento %	Factor de purificación
1	Suspensión vírica original	1/1	100	1
2	Material 1 precipitado con metanol y clarificado	1/10	48	4
3	Material 2 concentrado y clarificado * (b <sub>2</sub> )	1/100	24	27,2

\* Comprende un tratamiento con cloroformo-butanol, precipitación con PEG 6.000 y clarificación.

C. PURIFICACION POR ULTRACENTRIFUGACION O FILTRACION POR GEL

Fueron usados diversos procedimientos para obtener un mayor grado de purificación:

- c<sub>1</sub>) centrifugación a alta velocidad;
- c<sub>2</sub>) filtración por gel de Sepharosa 2 B;
- c<sub>3</sub>) centrifugación en gradiente de cloruro de cesio.

c<sub>1</sub>) Centrifugación a alta velocidad:

El líquido infeccioso concentrado y clarificado como se indicó en el inciso b<sub>1</sub>, fué centrifugado en el rotor 30 de la ultracentrífuga Spinco L<sub>2</sub>- 50 a 30.000 rpm durante 120 minutos a 4°C. En estas condiciones se determinó, por titulación del sobrenadante, que precipitó más del 99,9% del total de las partículas víricas originales.

El precipitado fué resuspendido con la ayuda de un homogenizador de teflón, en 1.5 ml de tampón TE pH 7.5. Luego se clarificó por centrifugación a 10.000 g durante 30 minutos determinándose infecciosidad y con-

concentración proteica del sobrenadante.

En la Tabla N° 8 se resumen los resultados de este paso de purificación.

TABLA N° 8: Eficacia de la purificación por ultracentrifugación a 30.000 rpm.

Mate- rial	Tratamiento	Volumen	Infecti- vidad total	Prote- ína total	Infecti- vidad específi- ca	Factor de purifi- cación	Rendi- miento
N°		ml	UFPx10 <sup>7</sup>	mg	$\frac{\text{UFP}}{\text{mg Prot}} \times 10^7$		%
1	Virus concen- trado y clari- ficado (inciso b <sub>2</sub> )	150	6.700	1620	4,15	1	100
2	virus centrifuga- do a 30.000 rpm y clarificado	2	1.625	32,5	50	12	24

La diferencia entre los porcentajes de partículas víricas precipitadas y suspendidas en tampón TE, representa una pérdida del 76% del virus en el proceso de resuspensión.

Se demostró experimentalmente que este valor es función de la masa proteica contaminante en el precipitado, siendo aplicable este método en la concentración de preparaciones que posean un mayor grado de purificación.

c<sub>2</sub>) Fraccionamiento por filtración por gel de Sepharosa 2 B

El virus concentrado y purificado por ultracentrifugación como se indicó en c<sub>1</sub>, fué fraccionado por cromatografía a través de una columna de Sepharosa 2 B en las condiciones especificadas en Materiales y Métodos.

La evolución de la filtración por gel, fué seguida por determinación de infectividad y de la absorción a 260 nm en alícuotas de las distintas fracciones eluidas.

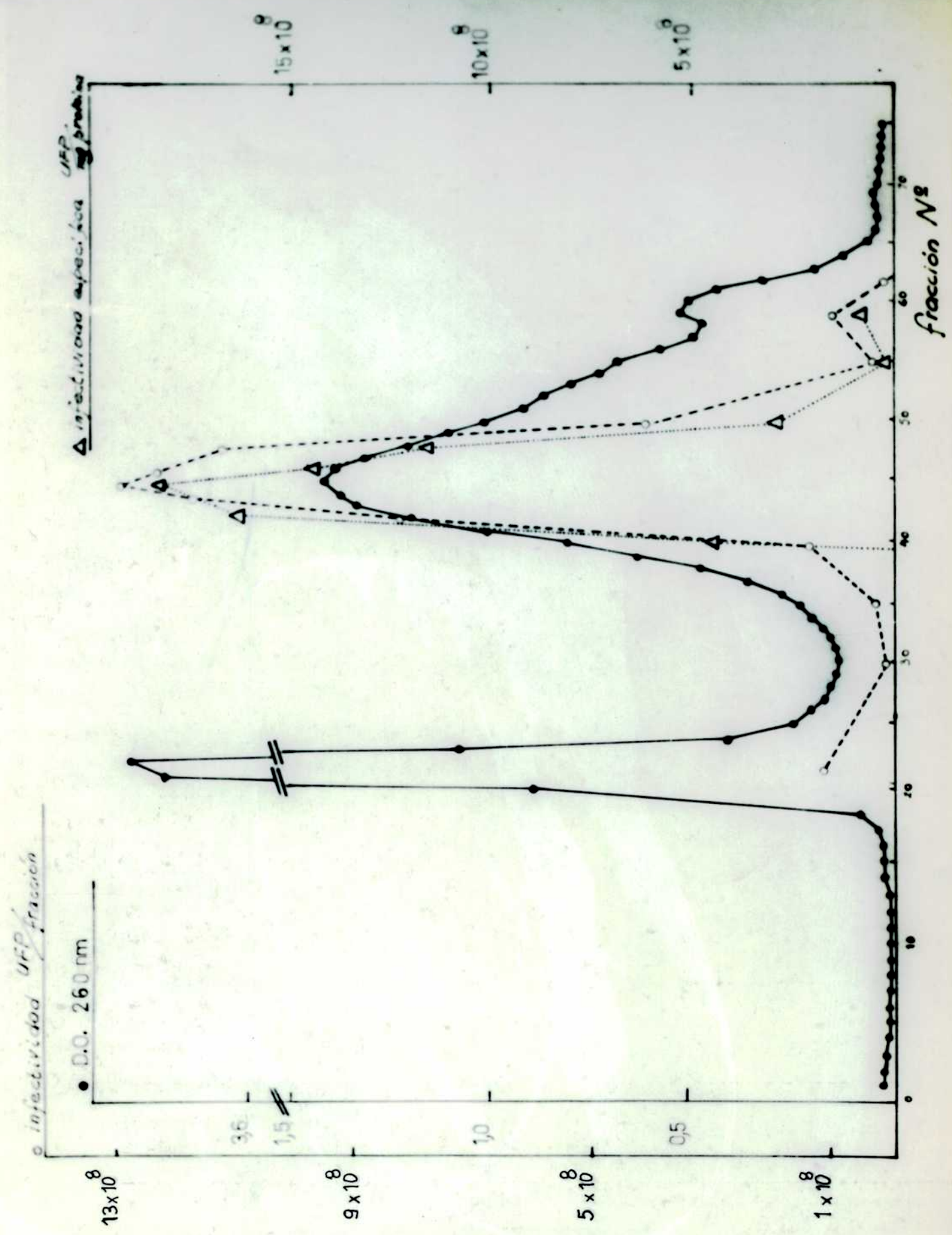
En la Figura 1 se indican los resultados correspondientes a un experimento, pudiéndose observar que no hay dispersión del virus, lo que aumenta el rendimiento del método.

El primer pico de absorción a 260 nm, de muy baja infectividad específica (menor de  $0.05 \times 10^7$  UFP/mg prot.) corresponde a la fracción excluida de la columna, la que contiene agregados moleculares de muy alto PM (mayor de  $40 \times 10^6$ ).

La zona de resolución de la columna presenta dos zonas de mayor infectividad específica. Las características de dichas fracciones, así como la eficiencia de este paso de purificación se presentan en la siguiente tabla:

TABLA N° 9: Eficacias de la purificación por cromatografía por gel de Sepharosa 2 B

Material	Volumen ml	Infectividad total UFPx10 <sup>7</sup>	Proteína ng	Infectividad específica $\frac{\text{UFP}}{\text{mg Prot.}} \times 10^7$	Factor de purifica- ción	Rendi- miento %
Virus cen- trifugado a 30.000 rpm	2	1625	32,5	50	1	100
Fracción 42-48	20,2	768	5.0	153	3,05	47,2
Fracción 49-56	21,3	194	8.30	23,4	0,47	12



Fraccionamiento por filtración por gel de Sepharosa 2B del virus aftoso concentrado

FIG. N° 1

Para emplear en otras etapas del proceso de purificación se eligió la fracción 42-48 ya que de las posibles fracciones a elegir, ésta posee la mayor infectividad específica y presenta el mayor rendimiento en virus.

Si se toma como centro el tubo de mayor infectividad específica, a medida que incluimos los tubos adyacentes, aumenta el n° de partículas infecciosas totales que se recuperan, a la vez que disminuye la eficacia de la purificación. Es decir, que existe una relación inversa entre la eficacia de la purificación y el rendimiento de la misma.

En la siguiente Tabla, se resumen los valores de unidades infecciosas totales e infectividad específica de las posibles fracciones a considerar.

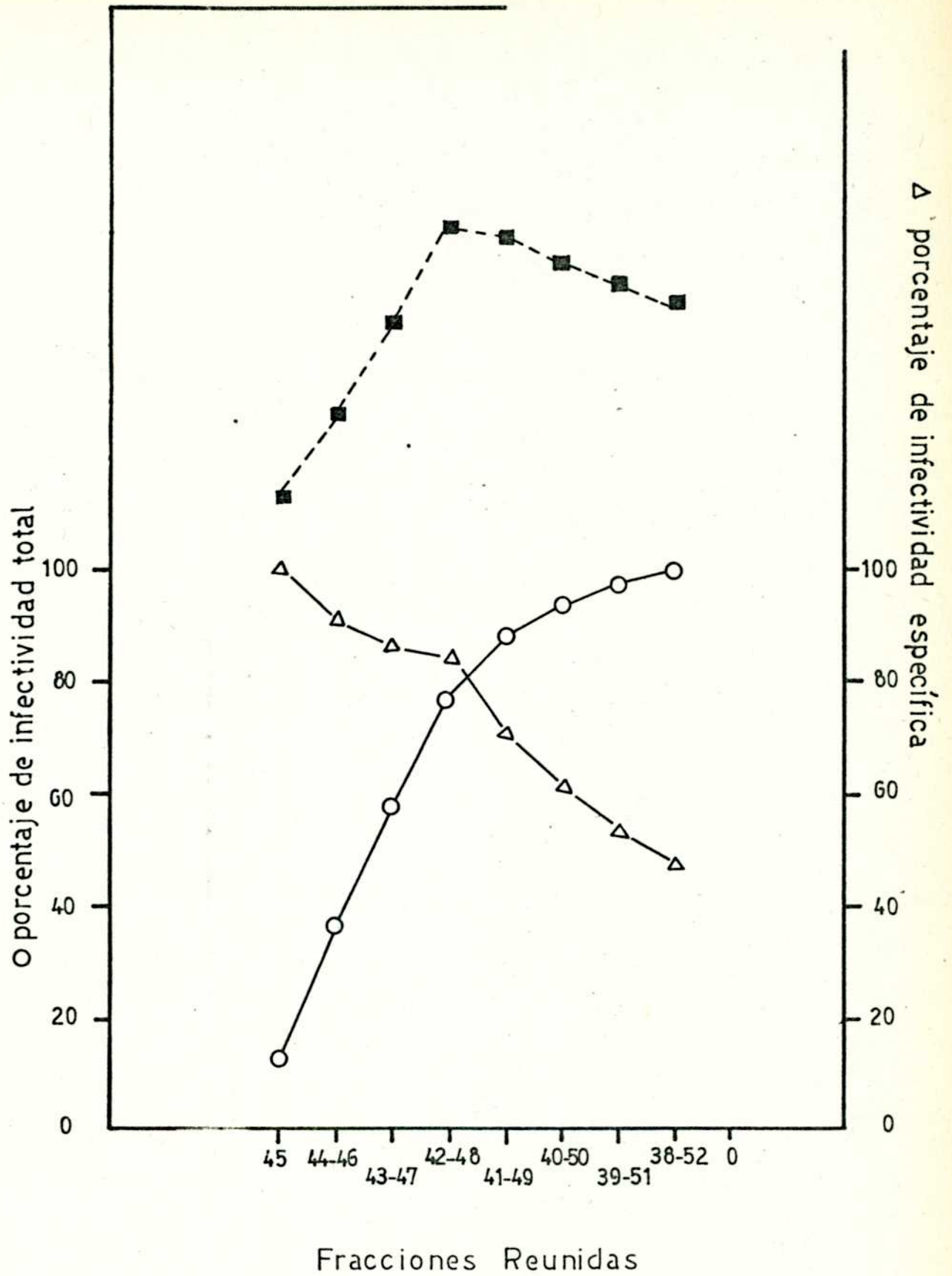
TABLA N° 10: Relación entre la eficacia de la purificación y rendimiento de la misma en la cromatografía por gel de Sepharosa 2 B.

Fracción considerada	Infectividad total UFP x 10 <sup>7</sup>	Proteína total mg	Infectividad específica UFP x 10 <sup>7</sup> mg Prot.	Porcentaje de Infectividad %	Porcentaje de Infectividad específica %
45	128	0,7	183	12,8	100
44-46	366	2,2	166	36,7	91
43-47	578	3,7	158	58	86.2
42-48	770	5,0	153	77	83.6
41-49	880	6,8	129	88,2	70.5
40-50	933	8,3	112	93,8	61
39-51	970	9,9	98	97.5	53.3
38-52	1000	11,4	87,5	100	47.7

En la Figura 2 se graficaron separadamente los porcentajes de unidades infecciosas totales, de infectividad específica y la suma de ambos valores, todos en función de las fracciones consideradas. El valor máximo del último nos permite calcular la fracción óptima en una etapa no final de cualquier purificación que corresponde al máximo en infectividad espe-



■ curva suma de %IE<sub>1</sub>+%I<sub>T</sub>



Relación entre la eficacia y rendimiento  
de la purificación por filtración por gel de  
Sepharosa 2B

FIG. N°2

eficacia con el máximo de rendimiento. En este caso dicha fracción corresponde a los tubos 42-48.

Considerando las fracciones a la izquierda del valor máximo de la curva suma, estamos frente al caso de mayor infectividad específica y menor cantidad de partículas víricas totales. Las fracciones a la derecha representan el caso inverso.

Para determinar la capacidad de fraccionamiento de la columna de Sepharosa, se tuvo en cuenta la cantidad de partículas infecciosas que se encuentran en la fracción elegida, respecto del total de partículas víricas (rendimiento). Se consideran "partículas infecciosas totales" únicamente las provenientes de la integración de toda la curva y no las que corresponden a lo que se agrega en la columna.

En la Tabla N° 11 se indican los valores de "unidades infecciosas totales" presentes en la muestra agregada a la columna, el número obtenido por integración de la curva y las presentes en la fracción 42-48.

TABLA 11: Eficacia del fraccionamiento por cromatografía por gel de Sepharosa 2 B

Materia	Infectividad total	Rendimiento <sub>(1)</sub>	Rendimiento <sub>(2)</sub>
	UFP x 10 <sup>7</sup>	%	%
N° de partículas presentes en la muestra centrifugada	1625	100	-
N° de partículas obtenidas por integración de la curva	1055	65	100
N° de partículas presentes en la fracción 42-48	770	47,2	73

(1.) Considerando como 100% de rendimiento lo agregado a la columna.

(2.) Considerando como 100% de rendimiento lo recuperado en la columna.

De los datos de la Tabla, se concluye que el 73% del virus recuperado en la columna se encuentra en la fracción 42-48. Este valor es representativo de la dispersión del virus en las distintas fracciones obtenidas de la columna. Un 35% se pierde por el proceso en sí (por ej. inactivación del virus por manipuleo, estados de agregación, etc.).

Los valores de rendimiento y purificación obtenidos por el proceso de centrifugación a 30.000 rpm son 24% y 12% respectivamente (Tabla 8); los que corresponden a filtración por gel de Sepharosa 2 B son 47,2% y 3,05% (Tabla 9), pero si consideramos ambos procesos, se obtendría un rendimiento del 11,4% y un aumento en la purificación de 36 veces.

Se han presentado aquí los resultados de una experiencia en la cual, la mayor concentración de virus se halla en la fracción que corresponde al pico de la curva de absorción ubicado en la zona de fraccionamiento de la columna.

Sin embargo, este caso no es el único y en la tabla presentamos datos de una experiencia en la que la curva de infectividad específica presenta dos picos bien definidos que por su ubicación corresponden a las fracciones: 42-48 y 49-57 de la Fig. 1.

TABLA N° 12: Eficacia de la purificación por cromatografía por gel de Sepharosa 2B

Material	Volumen	Infecti- vidad total	Proteína total	Infectivi- dad espe- cífica	Factor de purifica- ción	Rendimiento
	ml	UFPx10 <sup>7</sup>	mg	$\frac{\text{UFP} \times 10^7}{\text{mg Prot.}}$	-	%
Virus centrifugado a 30000 rpm	3	2400	82,2	29	1	100
Fracción A	9,4	315	4,7	67	2,41	13,1
Fracción B	9	240	6,2	39	1,34	10

En este caso, el virus se halla distribuido en dos fracciones de alta infectividad específica. El pico B podría tratarse de asociaciones definidas con material celular. Este mismo tipo de esquema, se repite más adelante con el gradiente en cloruro de cesio,

Comparando los datos de esta experiencia con los de la anterior, se observa un 23% de la infecciosidad entre el pico A y el B, valor que corresponde al 59% en la experiencia anterior (Tabla 9). Por otra parte, si consideramos el virus recuperado por integración de la curva, siendo las PFU tot. 1050, la pérdida debida al proceso en sí, representa un 56%, mientras que anteriormente sólo era 35%.

La eficiencia de la filtración por gel entre dos picos es del 53% mientras que representa un 73% en el caso anterior.

Teniendo en cuenta estos datos se puede llegar a la conclusión que en la segunda experiencia hay (quizás debido a asociaciones moleculares), una mayor concentración de la muestra agregada, y una mayor dispersión de partículas víricas en toda la columna de fraccionamiento.

### c<sub>3</sub>) Centrifugación en gradiente de cloruro de cesio:

Luego del tratamiento con solventes orgánicos, el virus puede ser purificado y concentrado por centrifugación en un gradiente en cloruro de cesio en tampón tris-EDTA (57), o en una mezcla de tartrato de potasio-cloruro de cesio en el mismo tampón.

Se hicieron pruebas de estabilidad del material infeccioso, manteniendo el mismo en contacto, durante 24 hs a 4°C, con soluciones de cloruro de cesio de densidad 1,43 g/ml y de tartrato de potasio-cloruro de cesio de densidad 1,43 g/ml. (Una solución saturada de tartrato de potasio más cloruro de cesio 5% en Tris-EDTA permite obtener dicha densidad).

Estas pruebas mostraron una recuperación del 100% de la infectividad en cloruro de cesio, mientras que hubo una inactivación del 90% en la mezcla de tartrato de potasio y cloruro de cesio.

La centrifugación en gradiente de cloruro de cesio se llevó a cabo en las condiciones especificadas en Materiales y Métodos.

Terminada la centrifugación se observaron 2 bandas de L. S. Las diferentes fracciones obtenidas fueron analizadas por determinación de infectividad, concentración proteica y absorbancia a 260 nm en alícuotas de las mismas.

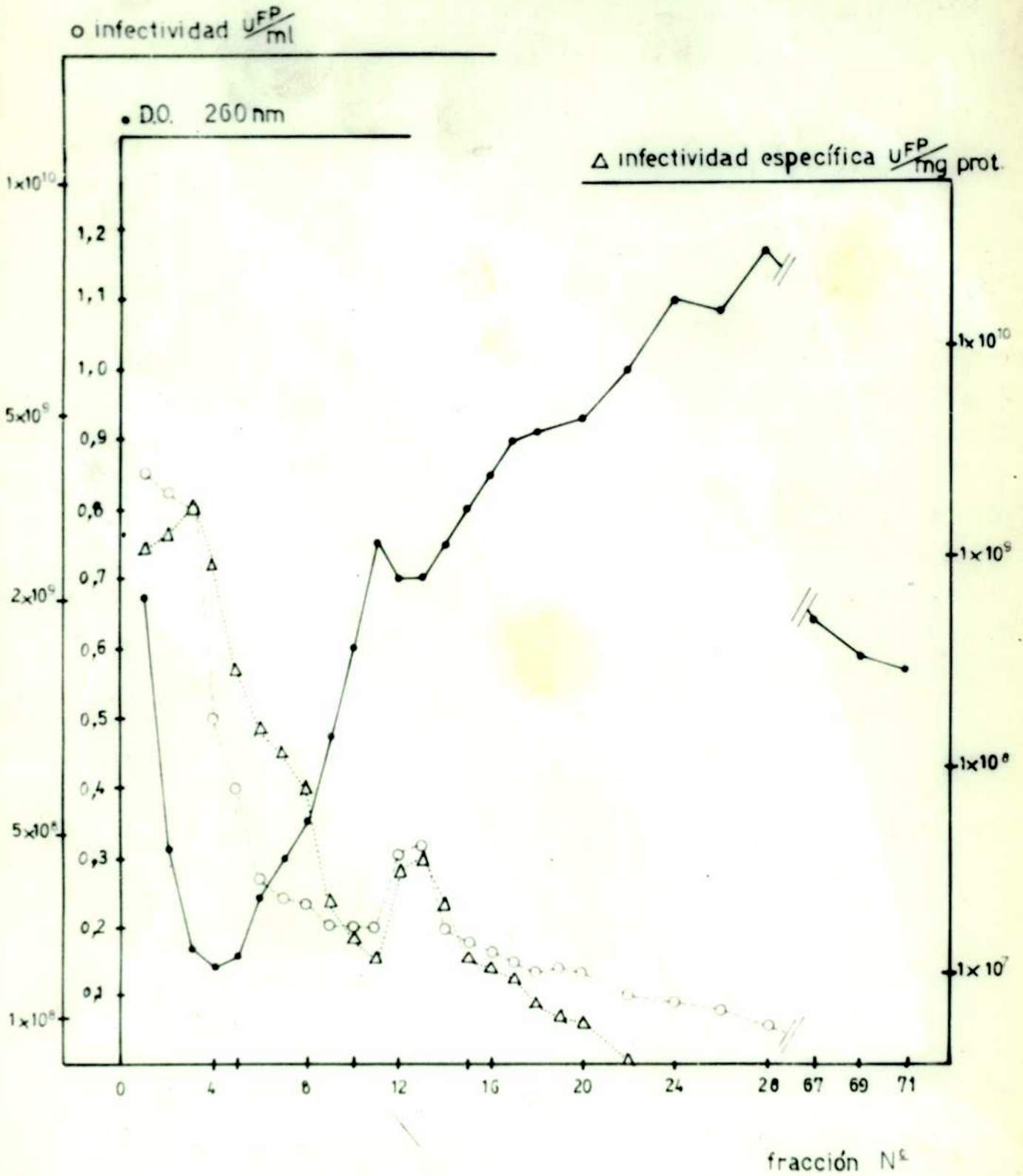
En la Figura 3 se muestra una curva tipo, correspondiente a dicha ultracentrifugación, la que se repitió en todas las pruebas.

Teniendo en cuenta las curvas de infectividad e infectividad específica, vemos que el virus se encuentra concentrado fundamentalmente en dos fracciones que coinciden por su ubicación con las dos bandas de L.S. observadas. Dicha concentración se debe a las características de sedimentación del virus aftoso así como a su ubicación en la zona del gradiente que corresponde a su densidad.

Un fraccionamiento semejante se observó cuando se ensayó la filtración por gel de Sepharosa 2B (figura 1).

Con el objeto de obtener resultados comparativos entre los distintos métodos utilizables en la etapa de purificación que se considera, se usó el mismo criterio de selección de fracciones que en el caso de la filtración por gel de Sepharosa 2B.

En la Tabla 13, se representan los porcentajes de infectividad e infectividad específica para las diferentes posibles fracciones a tomar según la curva de la Figura 3.



Purificación por centrifugación en gradiente de cloruro de cesio

FIG N° 3

Tabla No 13: Relación entre la eficacia de la purificación y rendimiento de la misma en la centrifugación en gradiente de cloruro de cesio

Fracción considerada	Infectividad total en la fracción	Proteína total en la fracción	Infectividad específica (1)	Densidad óptica de la fracción	Infectividad específica (2)	Porcentaje de infectividad específica (1)	Porcentaje de infectividad específica (2)
Nº	UFP x 10 <sup>7</sup>	mg	$\frac{\text{UFP}}{\text{mg Prot.}} \times 10^7$	U.D.O. a 260 nm	UFP / U.D.O.	%	%
3	300	1,08	279	0,17	1750	23,3	100
2-4	7710	3,16	2224	0,64	1110	55	80,1
1-5	1150	8,42	137	1,50	768	89	49
1-6	1190	10,1	118	1,75	680	92,2	42,2
1-7	1225	18,6	97	2,05	598	95	34,7
1-8	1260	16,4	77	2,41	522	98	27,5
1-9	1290	23,4	55	2,77	465	100	19,8
							26,5

La Fig. 4 corresponde a la representación gráfica de los porcentajes de infectividad específica y de unidades infecciosas totales en función de las distintas fracciones reunidas.

La fracción 1-5 elegida, es aquella que posee simultáneamente mayor infectividad específica y mayor cantidad de partículas virales. El resultado es independiente de considerar la infectividad específica como función de la concentración de proteína o de la de ácidos nucleicos (Fig. 4a y b respectivamente). Esta última determinada indirectamente por unidad de densidad óptica ya que el coeficiente de extinción molar a 260 nm es mucho mayor para los ácidos nucleicos que para las proteínas.

Comparando infectividad específica 1 y 2, así como las fig. 4a y 4b, se observa que la infectividad específica 1, presenta valores mayores que la infectividad específica 2. Esto indica que la relación ácidos nucleicos/proteínas, disminuye a medida que nos alejamos del fondo del tubo.

En la Tabla N° 14, se muestran los resultados correspondientes a este paso de la purificación para las fracciones 1-5 y 12-14.

TABLA N° 14 : Eficacia de la purificación por centrifugación en gradiente de cloruro de cesio

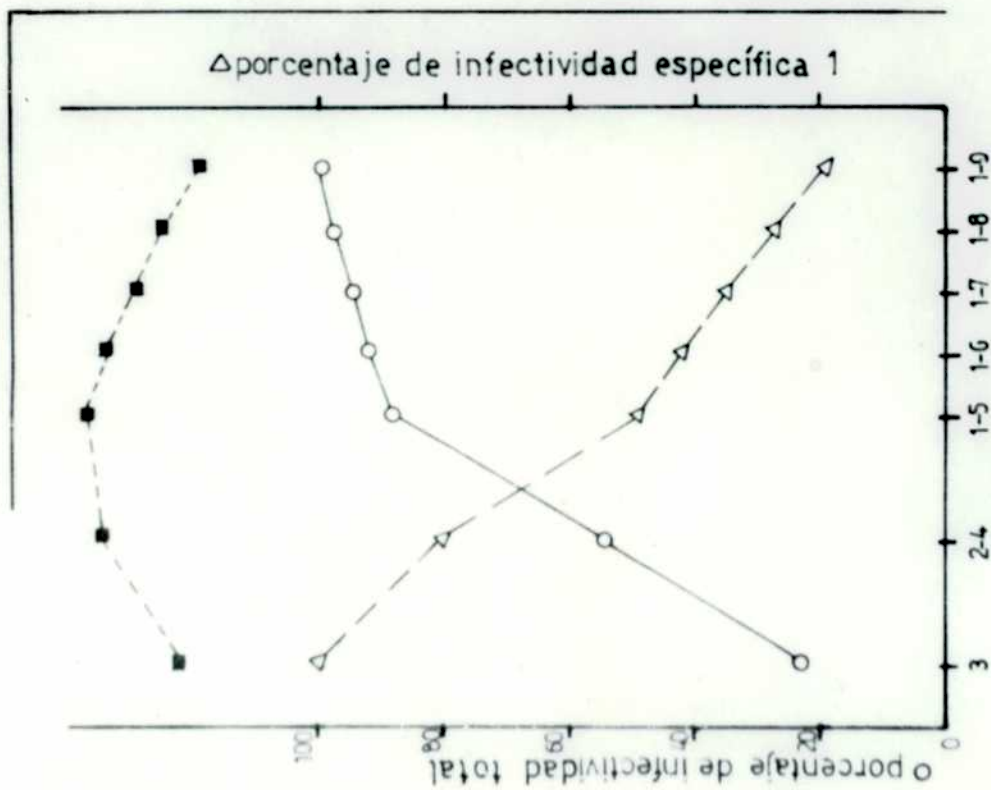
Material	Volumen ml	Infecti- vidad to- tal UFPx 10 <sup>7</sup>	Prote- ína to- tal mg	Infecti- vidad específica UFP x10 <sup>7</sup> mg Prot.	Factor de purifica- ción -	Rendimiento %
Virus concentra- do y clarificado (incis. b <sub>2</sub> )	116	12 800	3100	4,15	1	100
Fracción#1-5(A)	6,4	5 620	27,7	203.	49	44
Fracción#12-14 (B)	3,2	405	50,6	8	1,9	2

\* Luego de diálisis a 4°C durante 1 noche contra 200 volúmenes de tampón TE.



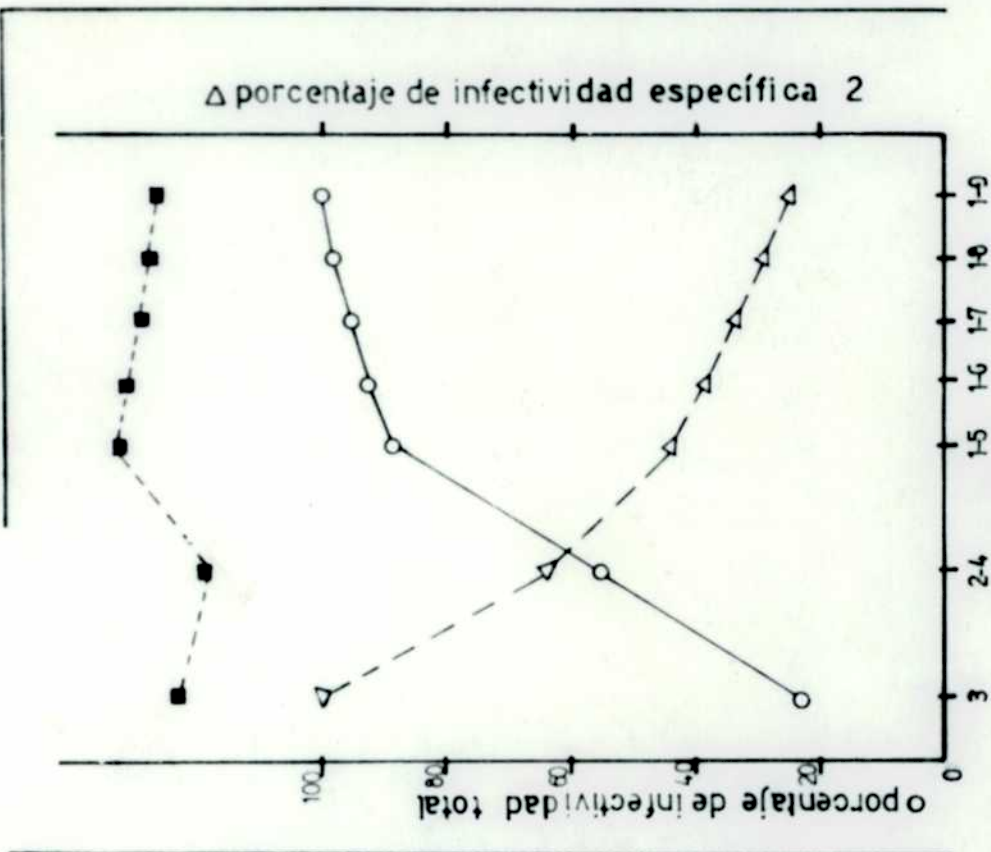
a

■ curva suma de % IE<sub>1</sub> + % I<sub>T</sub>



b

■ curva suma de % IE<sub>2</sub> + % I<sub>T</sub>



Relación entre la eficacia y rendimiento de la purificación por centrifugación en gradiente de cloruro de cesio:  
a) IE respecto de la concentración de proteínas  
b) IE respecto de la concentración de dudos nucleicas  
FIG N° 4

De la misma manera que en el fraccionamiento por columna de Sepharosa 2 B, para determinar la capacidad de purificación de la centrifugación en cloruro de cesio se ha considerado el total de partículas infecciosas obtenidas por integración de la curva de la fig.3, así como las correspondientes a la fracción 1-5.

Estos datos se resumen en la Tabla N° 15.

TABLA N° 15: Eficacia del fraccionamiento por centrifugación en gradiente de cloruro de cesio.

Material	Infectividad total	Rendimiento (1)	Rendimiento (2)
	PFUx 10 <sup>7</sup>	%	%
N° de partículas presentes en la muestra analizada	3 200	100	-
N° de partículas obtenidas por integración de la curva	2 290	71	100
N° de partículas presentes en la fracción 1-5	1 150	36	50

(1) Considerando como 100% de rendimiento lo agregado a la columna.

(2) Considerando como 100% de rendimiento lo recuperado en la columna.

Nota: Los datos que ilustran esta tabla han sido obtenidos de uno de los 4 tubos ultracentrifugados en la experiencia cuyos resultados figuran en la Tabla N° 13 .

Por ultracentrifugación del virus en gradiente de cloruro de cesio, la pérdida por inactivación alcanzó al 229%, mientras que la eficacia de purificación del método permitió obtener una concentración de partículas víricas del 50%. Datos adicionales de 6 pruebas mostraron que este porcentaje podía oscilar entre 30 y 80%.

TABLA N° 16: Comparación de los tres métodos de purificación parcial propuestos

Material	Factor de purificación	Rendimiento %
Ultracentrifugación	12	24
Ultracentrifugación 30.000 y pasaje por Sepherosa 2 B	36	11.4
Ultracentrifugación en gradiente de cloruro de cesio	49	44

En función de estos datos el método elegido en este paso de la purificación correspondió a la ultracentrifugación en gradiente de cloruro de cesio.

D. OBTENCION DE VIRUS PURIFICADO

d<sub>1</sub>) Purificación según el método de Bachrach y col.

Las

fracciones 1-5 (A) y 12-14 (B) provenientes de la ultracentrifugación en cloruro de cesio (tabla 14) fueron sometidos a una posterior ultracentrifugación a través de una doble fase orgánica y de cloruro de cesio (ver Materiales y Métodos).

El máximo de rendimiento se obtuvo cuando el peso específico de la fase orgánica fué lo más cercano a la unidad. El límite inferior está fijado por el peso específico de la suspensión vírica en tampón TE de manera que se mantenga la separación de ambas fases.

El aspecto de los tubos luego de la ultracentrifugación de las fracciones A y B se esquematiza a continuación (Fig. 5). De ellos las fracciones correspondientes a las zonas de L.S, previa separación, se sometieron a la técnica de flotación (ver Materiales y Métodos).

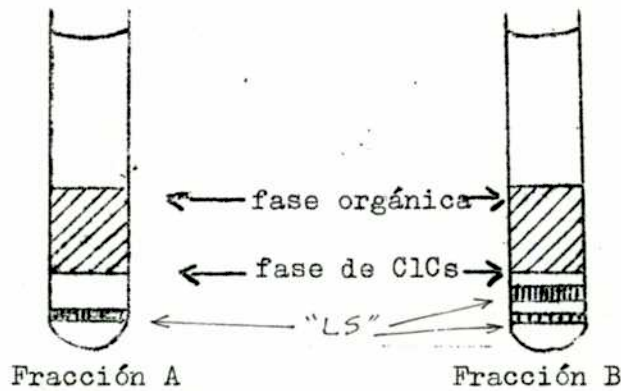


Figura 5

Debemos aclarar que en la etapa de flotación las fracciones A y B se comportan en forma distinta. La primera origina una sola banda que se ubica en la zona de densidad 1,42 g/ml, mientras que la B presenta dos bandas, una de ella muy débil ubicada en la zona de densidad 1,42 g/ml y la otra en la densidad 1,31 g/ml, (En algunos experimentos se visualizó una tercera banda de L S de densidad 1,370/ml. Debido a la baja frecuencia de aparición de la misma y el desconocer las condiciones que favorecerían su aparición, dicha fracción no fué estudiada).

Tal como se aclara al pié de la tabla se ha computado para la fracción A los valores de la mezcla de bandas de igual densidad y para la B la

ubicada en la zona de densidad 1,31 g/ml.

En la Tabla N° 17 se resumen los resultados obtenidos, con las fracciones A y B a ser sometidos al tratamiento anteriormente descrito y dializado contra 100 volúmenes de tampón TE a 4°C durante una noche.

TABLA N° 17: Eficacia de la purificación del virus aftoso mediante la técnica de Bachrach

Fracción	Tratamiento	Volumen	Infec- tividad total	Prote- ína total	Infec- tividad especí- fica	Factor de purifi- cación	Rendim- ien- to
		ml	UFPx10 <sup>7</sup>	mg	UFPx10 <sup>7</sup> mg Prot.		%
A 1° ClCs	Fracción A ultra- centrifugada en gradiente de ClCs (inciso C <sub>3</sub> )	6,4	5620	27,7	203	1	100
A 2° ClCs	Fracción A 1° ClCs luego de ultracen- trifugación en fase orgánica y de ClCs	2,3	2580	10,6	244	1,20	46
A 3° ClCs <sup>#</sup> d :1 42	Fracción A 2° de flotación	0,7	572	7,72	74	0,36	9
B 1° ClCs	Fracción B ultracen- trifugada en gradien- te de ClCs (inciso C <sub>3</sub> )	3,2	405	50,6	8	1	100
B 2° ClCs	Fracción B 1° ClCs luego de ultracentri- fugación en fase orgá- nica y de ClCs	2,3	217	3,13	69	8,7	54
B 3° ClCs <sup>##</sup> d :1,31	Fracción B 2° ClCs luego de flotación	0,6	3,8	1,74	2,17	0,27	0.94

<sup>#</sup> Fracciones de densidad 1,42 g/ml

<sup>##</sup> Fracciones de densidad 1,31 g/ml.

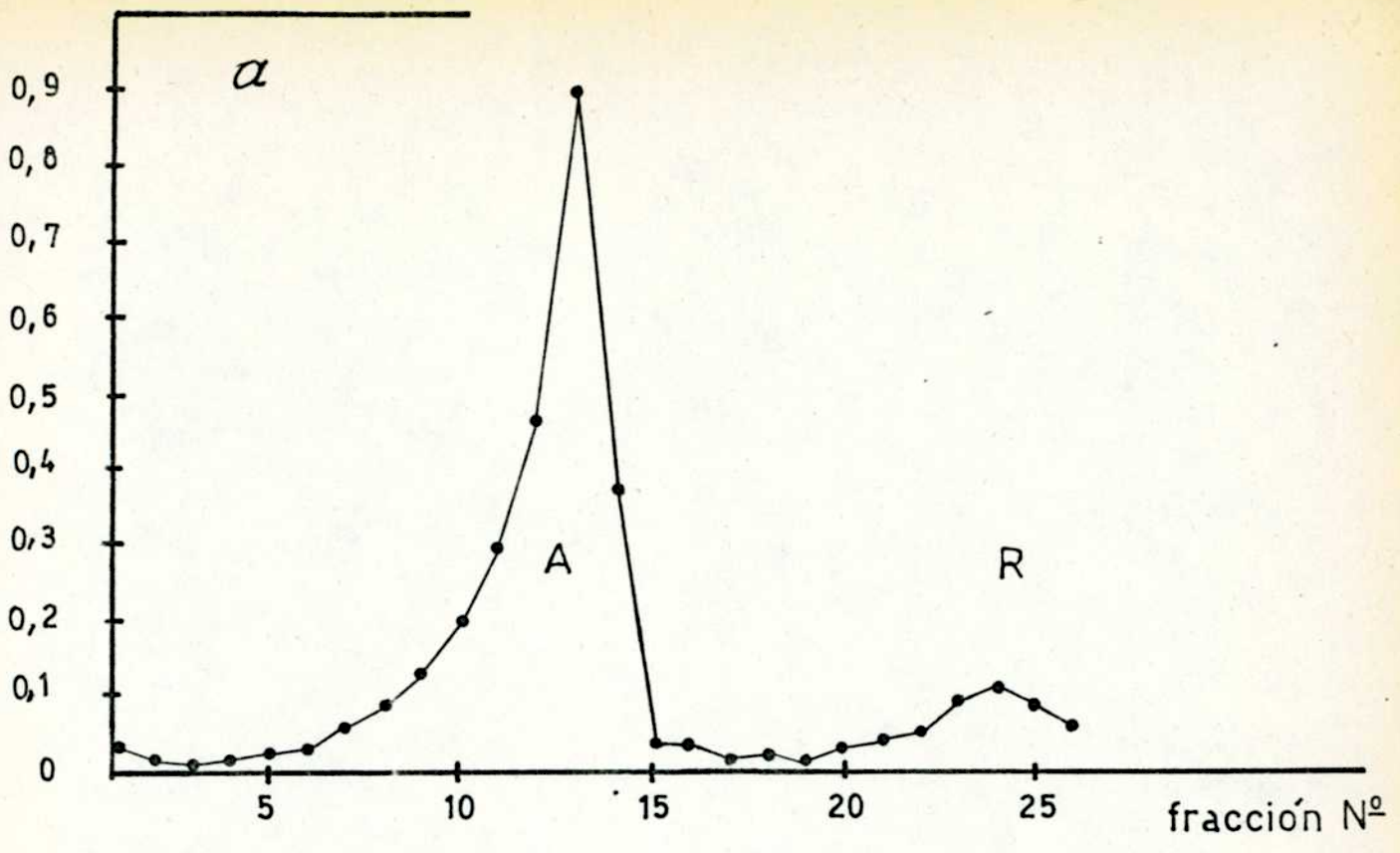
Al considerar los datos de la Tabla se vé que para ambas fracciones A y B, el último paso de la purificación origina la destrucción parcial y/o total del virus, lo que significa una disminución de la infectividad y por ende de la infectividad específica

Además, se comprobó experimentalmente que virus purificados conservan su poder infeccioso por más de 24 hs en soluciones de cloruro de cesio en TE de densidad 1,42 g/ml. El mismo disminuyó en más de 30% cuando se mantuvo el virus durante 5 hs. en una solución de cloruro de cesio en TE, densidad 1,6 g/ml, siendo la inactivación del 80% cuando fué centrifugado en las condiciones de la flotación. Estos datos corroboran la pérdida en infectividad antes mencionada.

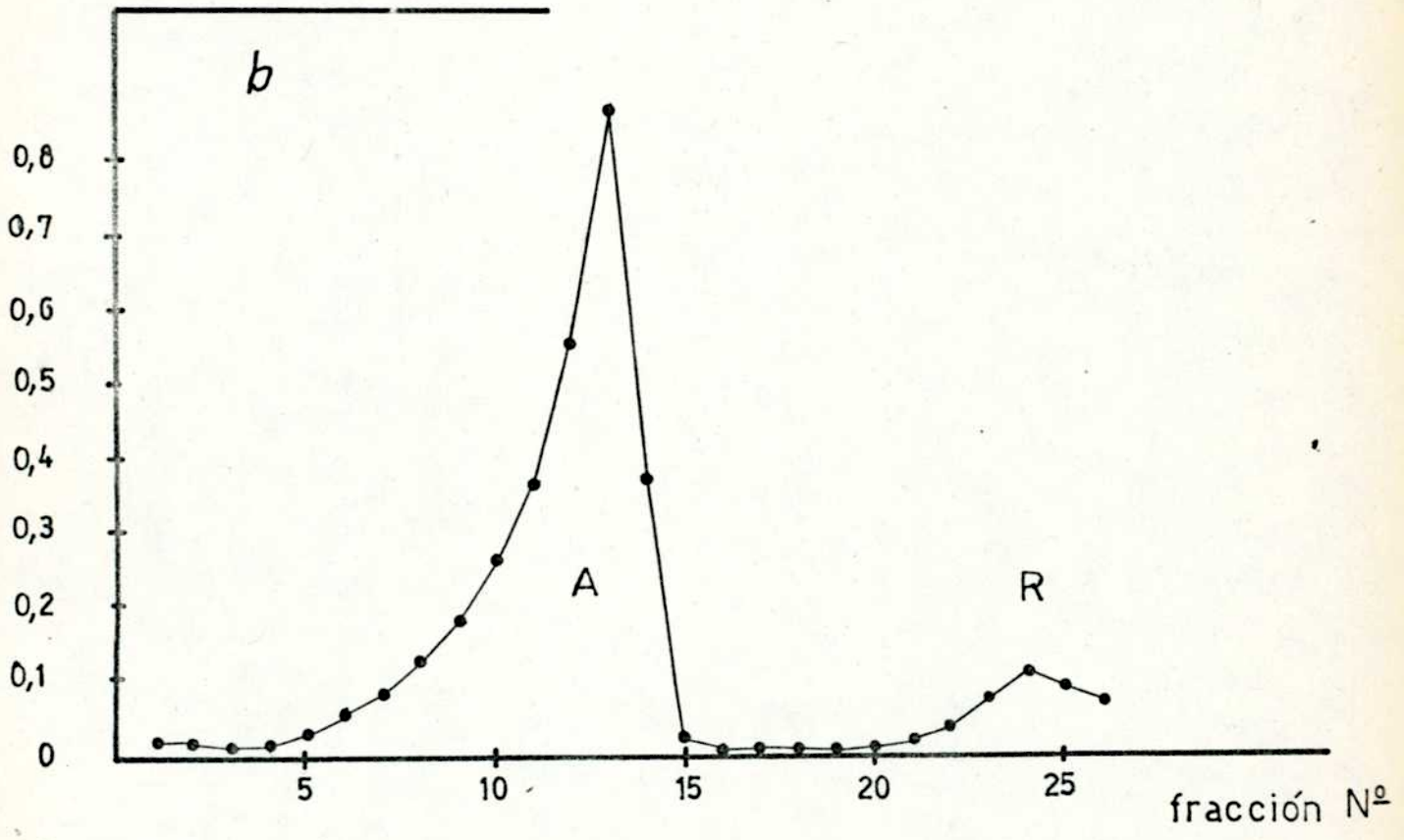
Con el objeto de determinar la necesidad de este último paso para la fracción A que afecta sin duda la estabilidad del virus, sometimos a una ultracentrifugación en gradiente lineal de sacarosa (15-45%), muestras de la fracción A antes y después de ser sometidas a la flotación. La experiencia se realizó sobre un volumen de 4,5 ml de solución de sacarosa en TE y 0,3 ml de muestra, en un rotor SW 39 a 35.000 rpm durante 90 minutos.

En las fig. 6a y 6b se muestran las curvas de absorción a 260 nm obtenidas en las condiciones mencionadas.

D.O. 260nm



D.O. 260 nm



Centrifugación en gradiente de sacarosa de la fracción A  
obtenida según el método de purificación de Bachrach:

- a) antes de la flotación
- b) después de la flotación

FIG. N° 6

Las curvas de absorción a 260 nm son muy semejantes, lo que indicaría que no hay una mayor purificación con la flotación, siendo innecesaria entonces la utilización de este paso de purificación para la fracción A. En cuanto a la fracción B, se hace imprescindible la flotación, ya que permitió la separación de las fracciones de diferente densidad.

Por último, si tenemos en cuenta la pérdida de infectividad que ocurre durante este paso y el no aumento de la zona R (ver fig. 6a y b) coincidiríamos con Bachrach<sup>(57)</sup> en que tal pérdida de infectividad no implica la destrucción total de las partículas víricas (no habría grandes cambios morfológicos) y por ende tampoco variación en las características de sedimentación de las mismas.

#### d<sub>2</sub>) Purificación por sedimentación en gradientes lineales de sacarosa

El fundamento de este paso de purificación se basa en el fraccionamiento en función de las diferentes velocidades de sedimentación de los componentes presentes en la fracción a centrifugar al ser sometida a una aceleración determinada, a la que se le opone un gradiente de viscosidad creciente. Estas diferencias se ven acentuadas en nuestro caso por el uso de detergentes como el dodecilsulfato o deoxicolato de sodio ((163), que por unión con las proteínas presentes disminuyen su velocidad de sedimentación, sin afectar las características del virus.

Con el objeto de confirmar la necesidad de la utilización de detergentes como el deoxicolato de sodio, se trataron 3 ml correspondientes a la fracción A.1° ClCs (tabla 17) con deoxicolato de sodio hasta 0.5% concentración final. Fueron clarificados por centrifugación a 8.000 g durante 20 minutos y ultracentrifugados sobre un gradiente lineal 15-45% de sacarosa en TE en el rotor Beckman 30 a 29.000 rpm durante 180 minutos.

Otros tres mililitros de la misma fracción fueron procesados en las mismas condiciones, excepto el tratamiento con deoxicolato de sodio.

El aspecto de los tubos luego de ser ultracentrifugados en las condiciones especificadas, era idéntico. Presentaban tres bandas de "light



scattering. Dichas bandas correspondían a las fracciones:  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$  y  $A'_1$ ,  $A'_2$  y  $A'_3$ , de las figuras 7a y 7b respectivamente, en las que se representaron los resultados de absorción a 260 nm, de infectividad e infectividad específica de las experiencias realizadas en ausencia y presencia de deoxicolato de sodio.

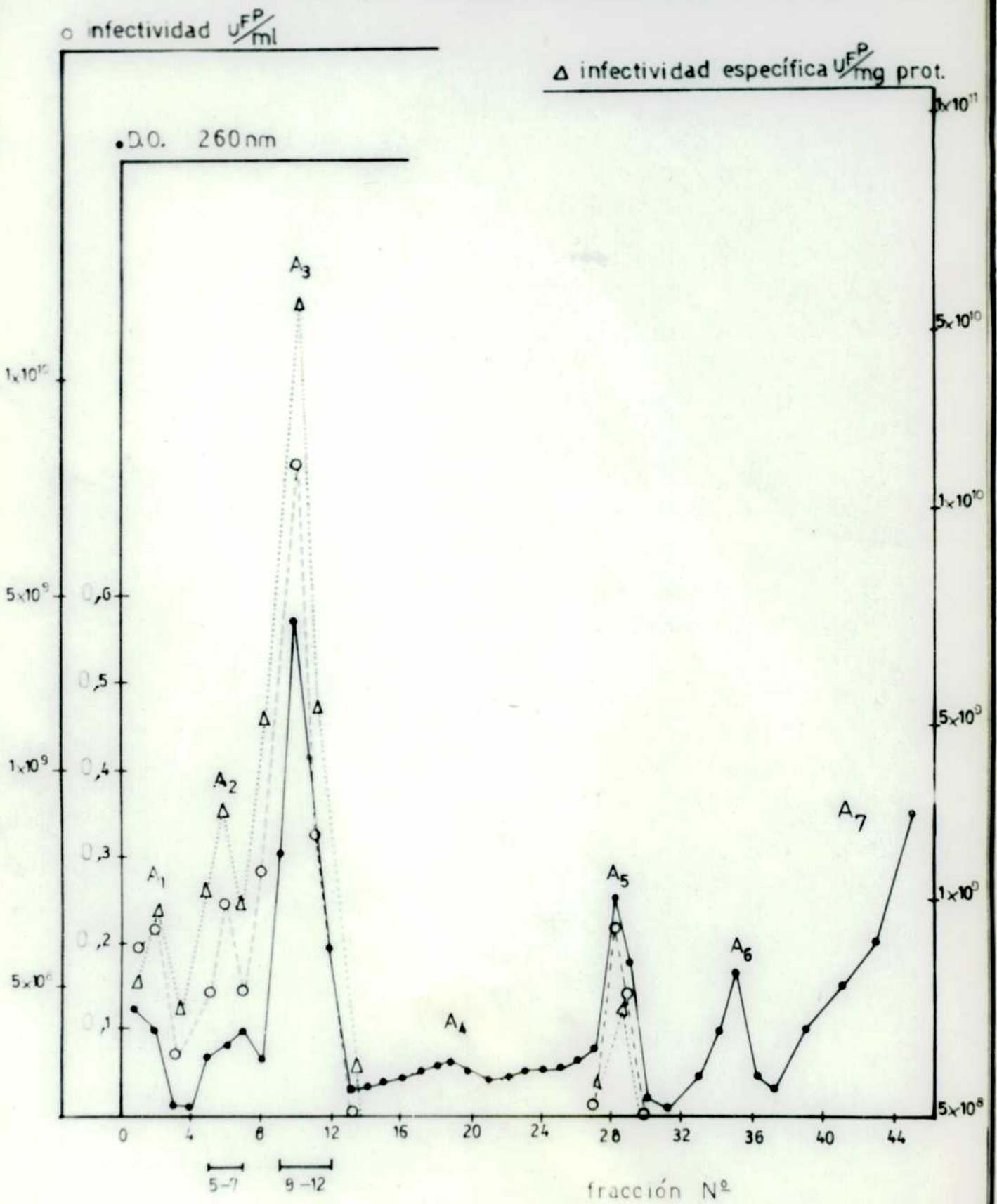
Sin embargo, la acción purificadora del deoxicolato de sodio al disminuir el coeficiente de sedimentación de las proteínas y no afectar el de las nucleoproteínas se puso de manifiesto al comparar distintas fracciones de las figuras 7a y 7b. Por integración de las curvas de absorción a 260 nm se obtuvieron las siguientes relaciones  $A_3/A_3 = 0,81$ , y  $A_6/A_7 = 1,43$  ó  $A_3/A_6 = 0,61$  y  $A_3/A_7 = 1,08$ ; estos valores indican que hubo una disminución en el contenido proteico de la fracción  $A_3$ , a expensas de un aumento del mismo en la fracción  $A_6$ .

Esto se traduce en un aumento de la infectividad específica de aquella (ver Tabla 18).

En la Tabla 18 se resumen las características de la fracción de mayor infectividad específica luego de la ultracentrifugación en gradiente de sacarosa de la fracción A con y sin deoxicolato de sodio.

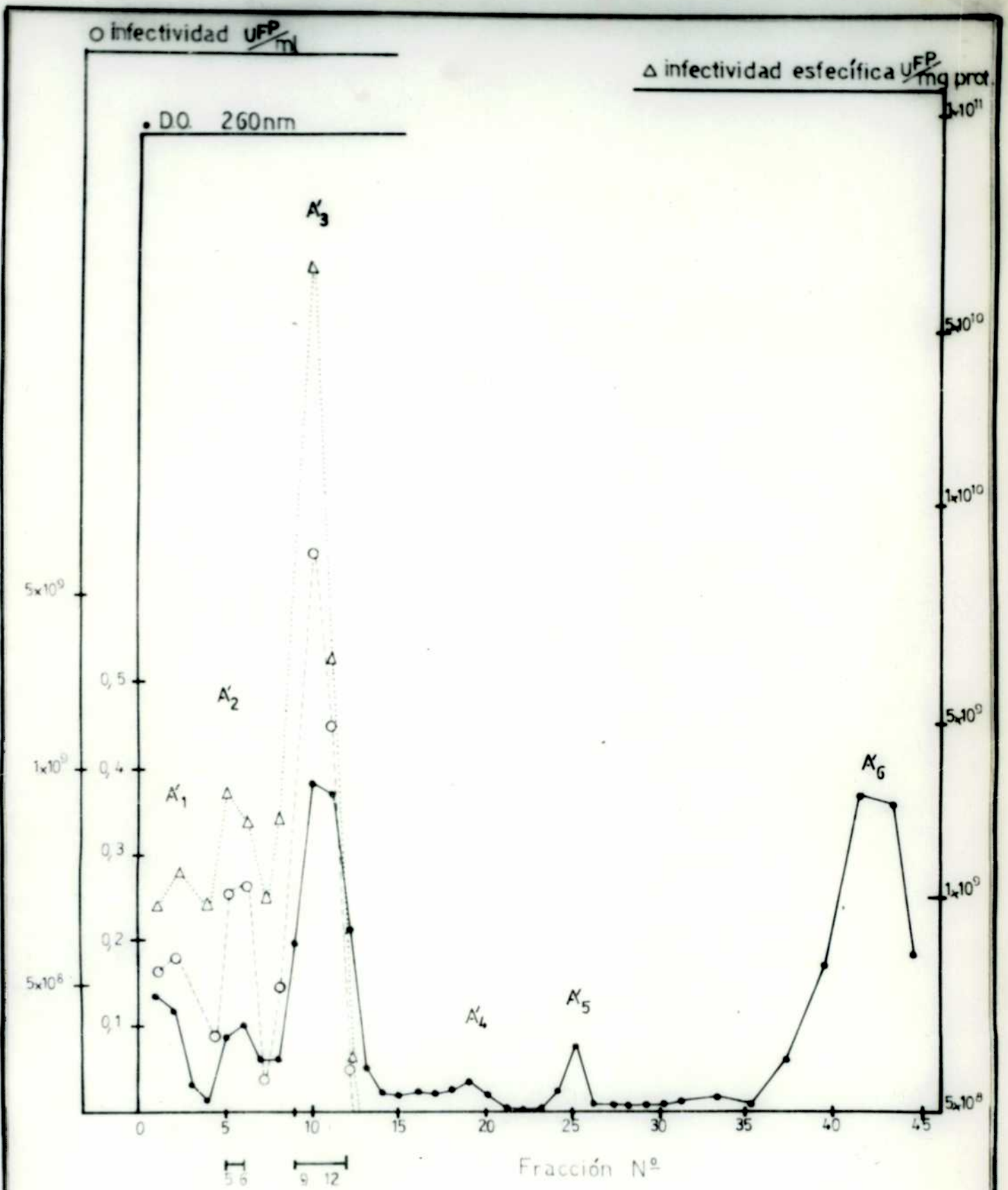
TABLA N° 18: Eficacia de la purificación de la fracción A en presencia y ausencia de deoxicolato de sodio

Fracción	Volúmen ml	Infectividad total UFPx10 <sup>7</sup>	Proteína total mg	Infectividad específica UFP x10 <sup>7</sup> mgProt.	Factor de purificación	Rendimiento %
A	3,1	980	3,96	247	1	100
<u>sin</u> $A_3$ DCS	2,4	670	1,17	570	2,30	68,5
<u>con</u> $A'_3$ DCS	2,4	480	0,58	825	3,35	49



Purificación de la fracción 1<sup>er</sup> G.C.s por centrifugación en gradiente de sacarosa

FIG. N° 7a



Purificación de la fracción 1<sup>ra</sup> G6s en presencia de deoxicriato de sodio por centrifugación en gradientes lineales 15-45% de sacarosa

FIG. Nº 7b

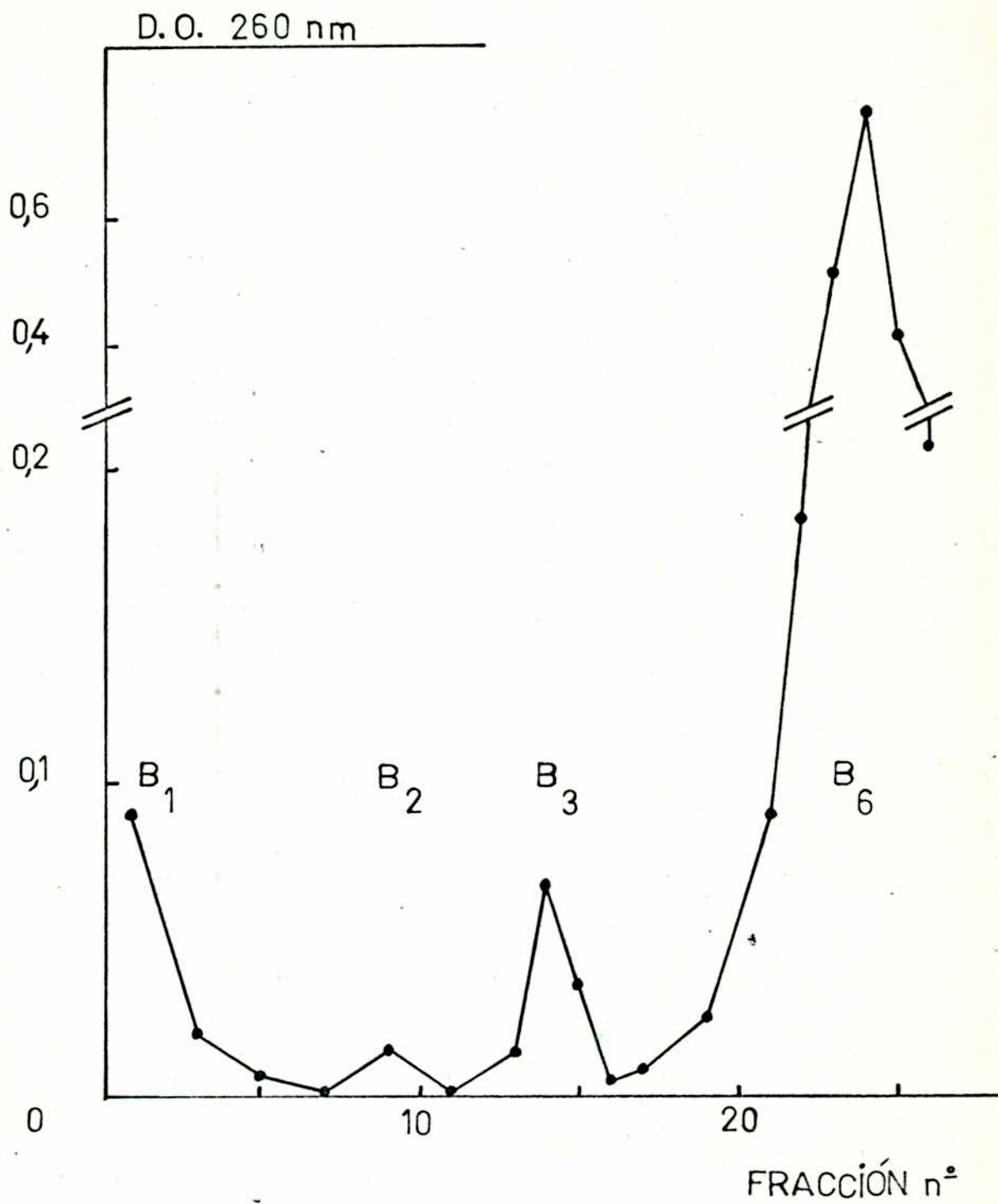
El aumento en la purificación (1,45 veces) a expensas de una disminución del 19,5% en el rendimiento, justifica la utilización del detergente ya que éste fué el último paso de la purificación.

El reemplazo del dodecil sulfato de sodio por dexicolato, arrojó resultados similares en cuanto a la capacidad de purificación, aunque los rendimientos eran un poco menores (35-45%). Una de las causas posibles era la mayor inactivación producida por la temperatura de trabajo con DSS (15°C).

Por lo que respecta a la fracción B, en la figura 8 se muestra la curva de absorción a 260 nm, obtenida al ultracentrifugar 0.3 ml de dicha fracción, en presencia de dexicolato de sodio en un gradiente lineal de sacarosa 15-45% en el rotor SW39 a 35000 rpm durante 90 minutos.

De la comparación de las figuras 7b y 8, se observa que por integración de las curvas de absorción a 260 nm la relación  $A_6/A_3 = 1,64$  es mucho menor que  $B_6/B_3 = 20$ , resultados que eran predecibles, debido a la muy baja infectividad específica de la fracción B respecto a la A.

En la Tabla 19 se muestra la eficiencia del paso de purificación para la fracción B.



Centrifugación en gradientes lineales de saca-  
rosa 15-45% de la fracción B en presencia de deoxicolato de sodio

FIG. N° 8

TABLA N° 19: Eficacia de la purificación de la fracción B en presencia de deoxicolato de sodio

fracción	Volumen	Infecti- vidad total	Prote- ína total	Infectivi- dad específica	Factor de purificación	Rendimiento
	ml	UFPx10 <sup>7</sup>	mg	$\frac{\text{UFP}}{\text{mg prot}} \times 10^7$	-	%
B	0,3	3,8	4,75	8	1	100
B <sub>3</sub>	0,32	8,1	0,1	81	10	21

El bajo rendimiento obtenido en la fracción B respecto de la A por la aplicación de un mismo proceso de purificación se puede explicar de dos maneras no excluyentes:

a) Debido a la mayor proporción de partículas virales en la fracción B<sub>2</sub> respecto de la A<sub>2</sub>, lo cual se confirma con los valores calculados por integración de las curvas de absorción a 260 nm de las figs. 7b y 8, según los cuales  $B_2/B_3 = 0,27$  mayor que  $A_2/A_3 = 0,16$ .

b) Debido a la mayor adsorción de partículas virales por la fracción de menor velocidad de sedimentación B<sub>6</sub>, lo que representaría en definitiva una mayor distribución de partículas virales en las distintas fracciones del gradiente.

Por otra parte, la baja infectividad específica de la fracción B<sub>3</sub> respecto de A<sub>3</sub> indicaría una mayor impurificación con proteína no viral y/o heterogeneidad en cuanto a la infecciosidad de las partículas virales presentes en dicha fracción, posiblemente de menor densidad que las normales (ver tabla 17), lo que sería posible debido a las características de este paso de la purificación (Fraccionamiento en función del coeficiente de sedimentación).

Con el objeto de determinar si las fracciones A<sub>3</sub> y B<sub>3</sub> pueden ser desdobladas en componentes de distinta densidad se realizó una flotación con

dichas fracciones en las mismas condiciones descritas en el método seguido por Bachrach (57).

La flotación de la fracción A<sub>3</sub> dió origen a una banda de LS que se ubicó en la zona de densidad 1,42 g/ml.

La flotación de la fracción B<sub>3</sub> dió origen a dos bandas muy tenues de LS ubicadas en la zona del gradiente de densidad 1,31 g/ml y 1,42 g/ml respectivamente.

En la tabla se resumen las características de las fracciones A<sub>3</sub> y B<sub>3</sub> antes y después de la flotación.

TABLA N° 20 : Comparación de las fracciones A<sub>3</sub> y B<sub>3</sub> por centrifugación en gradiente de densidad de cloruro de cesio

fracción	volumen ml	Infectividad total UFP x 10 <sup>7</sup>	Proteína total mg	Infectivi- dad especi- fica UFP x 10 <sup>7</sup> mg prot.	Factor de purifi- cación	Rendí- miento %
A <sub>3</sub>	4,9	392	0,495	790	1	100
A <sub>3</sub> d: 1,42g/ml	0,8	100	0,43	230	0,29	25,6
B <sub>3</sub>	3	130	0,69	188	1	100
B <sub>3</sub> d: 1,42g/ml	0,21	15	0,182	82	0,44	11,5
B <sub>3</sub> d: 1,31g/ml	0,25	0,6	0,120	5	0,027	0,46

Se repite también en este caso una inactivación del virus por acción del cloruro de cesio (solución de densidad = 1,60 g/ml).

Sin embargo este paso se hizo necesario en el caso de la fracción B<sub>3</sub>, ya que permitió la separación de otra fracción de diferentes características en cuanto a su composición química, ya sea a nivel de los viriones o por la presencia de proteínas extrañas asociadas a ella.

Método de Bachrach				Método propuesto			
Material	Tratamiento	Factor de purificación	Rendimiento	Material	Tratamiento	Factor de purificación	Rendimiento
Nº	-	-	%	Nº	-	-	%
1	Suspensión vírica original	1	100	1	Suspensión vírica original	1	100
2	Material 1 con centrado, desproteinizado y clarificado (ver inciso <sup>b</sup> <sub>1</sub> )	33,6	7,3	2	Material concentrado, desproteinizado y clarificado (ver inciso <sup>b</sup> <sub>2</sub> )	27,2	24
3	Material 2 luego de 1er. CICs (ver incisos <sup>c</sup> <sub>3</sub> )	1650	3,21	3	Material 2 luego de 1er. CICs (ver inciso <sup>c</sup> <sub>3</sub> )	1330	10,6
4	Material 3 luego de 2. CICs (ver inciso <sup>d</sup> <sub>1</sub> )	1980	1,48	4	Material 3 luego de gradiente en sacarosa DCS (ver incisos <sup>d</sup> <sub>2</sub> )	4550	5,2
5	Material 4 luego de 3er. CICs (ver incisos <sup>d</sup> <sub>1</sub> )	710	0,134				

De la comparación de los dos métodos se deduce la ventaja del propuesto respecto del de Bachrach, en la purificación de material infeccioso proveniente de cultivo *Frank 3*. Los valores tanto de purificación como de rendimiento son mayores en el método propuesto.

Esas diferencias están basadas fundamentalmente en la capacidad de infectar células por el virus aftoso, ya que para el cálculo de purificación y de rendimiento, se consideró la capacidad de formar placas.



Esto no implica, por los resultados mostrados hasta ahora, que el material obtenido por la técnica de Bachrach, esté impurificado (presencia de moléculas y/o restos celulares) ni que el número de partículas víricas obtenidas sea menor. En último caso, sólo dice que el número de partículas infecciosas recuperadas es mayor en el método propuesto respecto del de Bachrach.

E. Pureza y caracterización de las fracciones aisladas por los métodos desarrollados

e<sub>1</sub>. Espectro de absorción en UV del virus aftoso purificado

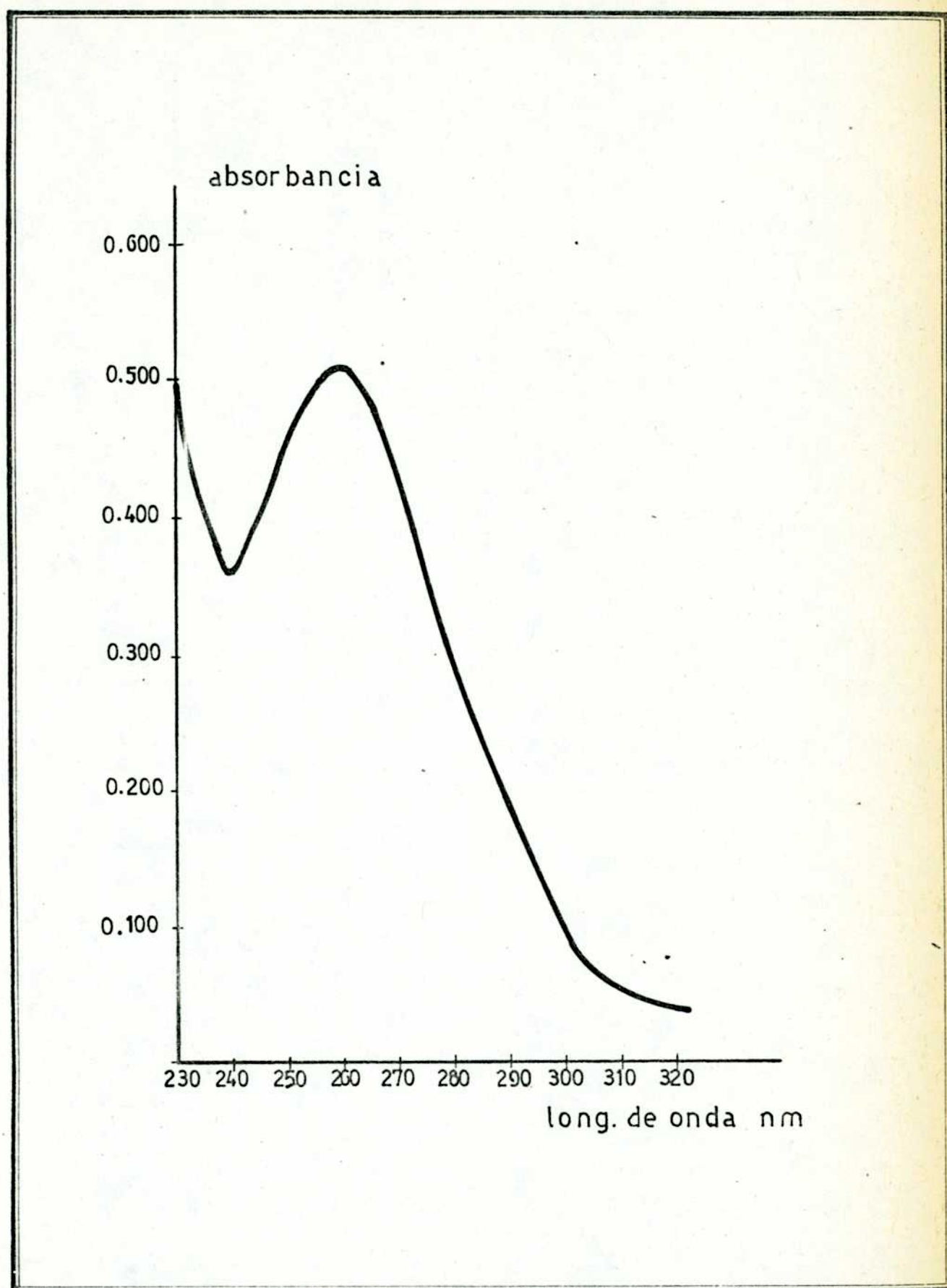
La curva de absorción que se muestra en la figura 9 corresponde a la fracción A'<sub>3</sub> de virus purificado por gradiente de sacarosa. Muestra un pico definido de absorción a 259 nm y un mínimo a 239 nm. La relación de absorción máximo/mínimo es de 1,39, mientras que la relación absorción a 260 nm/absorción a 280 nm es de 1,76 correspondiendo estos valores a los del virus aftoso purificado.

El coeficiente de extinción porcentual a 259 nm  $E_{259 \text{ nm}}^{1\%}$  donde  $DO_{259 \text{ nm}}$  es la absorción a 259 nm del virus determinado en cubetas de 1 cm de lado y C g/100 ml es la concentración del virus en g/100 ml.

La fracción A'<sub>3</sub> presenta una absorción a 259 nm de 0,510 (corregido por LS) y una concentración de proteínas expresada como albúmina de 45 ug/ml. Asumiendo que el virus aftoso posee un 70% de proteína, la concentración de virus en g/100 ml sería de 0,0064. El coeficiente de extinción calculado para la fracción A'<sub>3</sub> es  $E_{259 \text{ nm}}^{1\%} = 79,2$ .

El espectro de absorción de la fracción proveniente de la flotación en cloruro de cesio purificado según la técnica de Bachrach (3er. ClCs) presenta el mismo espectro de absorción que la fracción A'<sub>3</sub>. El coeficiente de extinción calculado es  $E_{259 \text{ nm}}^{1\%} = 73,8$  para una absorción a 259 nm de 0.450 y una concentración de proteína como albúmina de 42,5 ug/ml.

Las diferencias entre los valores de los coeficientes de extinción entre las dos preparaciones A'<sub>3</sub> y 3er. ClCs no son significativas, ya que distintas preparaciones correspondientes a un mismo método, presentaron coeficientes de extinción que variaron entre 69 y 88.



Espectro de absorción en el U.V. del virus aftoso purificado

FIG. Nº 9

\*2. Ultracentrifugación analítica

Las suspensiones de virus (A<sub>3</sub> y 3er. ClCs) en tampón TE fueron analizadas para determinar la homogeneidad de las mismas, en una centrifuga Spinoe modelo E.

El resultado de la ultracentrifugación analítica para el virus purificado según la técnica de Bechroch (3er. ClCs) se indica en la figura 10 (loc. cit.). Dicho material no es homogéneo en la ultracentrifugación analítica; presenta por lo menos 4 picos de diferentes velocidades de sedimentación.

En la Tabla 21 se resumen las características de la ultracentrifugación analítica para el pico de mayor intensidad de la figura 10, correspondiéndole un valor de la constante de sedimentación :  $S_{20}^{TE} = 123,96$  unidades Svedberg.

TABLA N° 21: Características de sedimentación para el pico de mayor intensidad (Fracción 3er. ClCs)

Virus 3er. ClCs

Foto N°	1	2	3	4	5
Angulo	50°	45°	45°	45°	45°
distancia en cm.	0,9324	1,4691	2,0046	2,4158	2,8300
tiempo en minutos	5	13	20	25	30

Figura 10 Schlieren óptico del virus aftoso purificado según el método de Sachrach.

Figura 11 Schlieren óptico del virus aftoso purificado según el método propuesto.

Teniendo en cuenta que la velocidad de sedimentación es función de la densidad y viscosidad del solvente (en nuestro caso TE), fué necesario estandarizar el valor obtenido de la constante de sedimentación.

Por aplicación de la fórmula de estandarización

$$(1) S_{20}^W = S_{20}^{TE} \cdot \frac{n_{20}^{TE}}{n_{20}^W} \left( \frac{1 - \bar{v} D_{20}^W}{1 - \bar{v} D_{20}^{TE}} \right) \quad \text{en la cual:}$$

$S_{20}^W$  = constante de sedimentación en agua a 20°C

$S_{20}^{TE}$  = constante de sedimentación en tampón TE a 20°C

$\bar{v}$  = volumen parcial específico del virus

$n_{20}^W$  = viscosidad del agua a 20°C

$n_{20}^{TE}$  = viscosidad del tampón a 20°C

$D_{20}^W$  = densidad del agua a 20°C

$D_{20}^{TE}$  = densidad del tampón TE a 20°C

Para el virus aftoso en tampón TE bajo las condiciones empleadas por nosotros en la ultracentrifugación analítica, tenemos que:

$S_{20}^{TE} = 123,96$  unidades Svedberg

$v = 0,7$  (por tratarse de un virus esférico: valor semejante al del poliovirus)

$n_{20}^W = 1,0050$  centipois

$n_{20}^{TE} = 1,0904$  centipois (para su determinación ver Materiales y Métodos)

$P_{20}^W = 0,9982$  g/ml

$D_{20}^{TE} = 1,0112$  g/ml (para su determinación ver Materiales y Métodos)

El valor corregido de la constante de sedimentación es:  $S_{20}^W = 138,7$  que coincide con el del virus aftoso (57).

El schlieren óptico para el virus A<sub>3</sub> (purificado por gradiente de sacarosa) se muestra en la figura 11. Se observa una sola banda, lo que indica la homogeneidad de la preparación cuyas características de sedimentación se resumen en la Tabla 22.

TABLA N° 22. Características de sedimentación de la fracción A'<sub>3</sub>

virus A' <sub>3</sub>					
foto N°	1	2	3	4	5
Angulo	40°	40°	30°	30°	30°
distancia en cm	1,3922	1,7802	2,0984	2,3406	2,5914
tiempo en minutos	3	8	12	15	18

El valor calculado de la constante de sedimentación es:  $S_{20}^{TE} = 124,34$  unidades Svedberg.

Utilizando la ecuación<sup>(1)</sup> se tiene un valor estandarizado de  $S_{20}^W = 139,1$  que corresponde al S del virus aftoso monodisperso.

La diferencia entre las constantes de sedimentación de las dos preparaciones está dentro del error del método, lo cual indicaría que se trata del mismo material según este criterio de pureza aquí utilizado.

### e<sub>3</sub>. Microscopía electrónica

La observación al microscopio electrónico de la fracción 3er. CICs (figura 1<sup>2</sup>) diluido 10 veces en TE y teñido con acetato de uranilo 1% muestra partículas virales de 24 mu, partículas virales vacías, capsómeros provenientes de partículas rotas y proteína de fondo contaminante.

La observación del virus A'<sub>3</sub> igualmente diluido (figura 1<sup>3</sup>) muestra partículas virales de 24 mu, muy pocas partículas vacías, así como capsómeros de 12 mu de diámetro provenientes de partículas virales (por ruptura espontánea en sus unidades morfológicas, RNA y capsómeros); no se observa proteína contaminante.

En ambos casos se observa deformación de las partículas virales comple-

Figura 12 Micrografía electrónica del virus aftoso purificado  
según el método de Bachrach.  
Tinción negativa con acetato de uranilo 3.  
Aumento 400.000 x



Figura 13 Micrografía electrónica del virus aftoso purificado según el método propuesto.  
Tinción negativa con acetato de uranilo.  
Aumento: 400.000 x

tas, lo que indicaría una estructura no compacta de las mismas.

e<sub>4</sub>. Centrifugación isopícnica en gradiente de cloruro de cesio

La purificación basándose en las diferencias de densidad de distintos componentes fué utilizada para la obtención de la fracción que llamamos 3er ClCs (flotación según el método de Bachrach (loc. cit.), pero no para la obtención del virus A'<sub>3</sub> (gradiente de sacarosa).

Sin embargo, la determinación por refractometría (ver Materiales y Métodos). de la curva de densidades de la flotación en cloruro de cesio utilizada por Bachrach, da como valores extremos de densidad 1,8 g/ml en el fondo del tubo y 1,0 g/ml en la parte superior.

La capacidad de fraccionamiento de este método es función de:

- a) la pendiente de la curva de densidad
- b) del número de fracciones recolectadas
- c) la cantidad de virus centrifugado (ancho de la banda de LS)

En nuestro caso, para una cantidad determinada de virus centrifugado, teniendo en cuenta, que el rango de densidades está comprendido entre 1,8 g/ml y 1,0 g/ml y que se recogen 3 gotas por fracción dando un promedio entre 25 y 30 fracciones, el límite de resolución entre dos fracciones consecutivas estaría entre 0,026 y 0,032 g/ml.

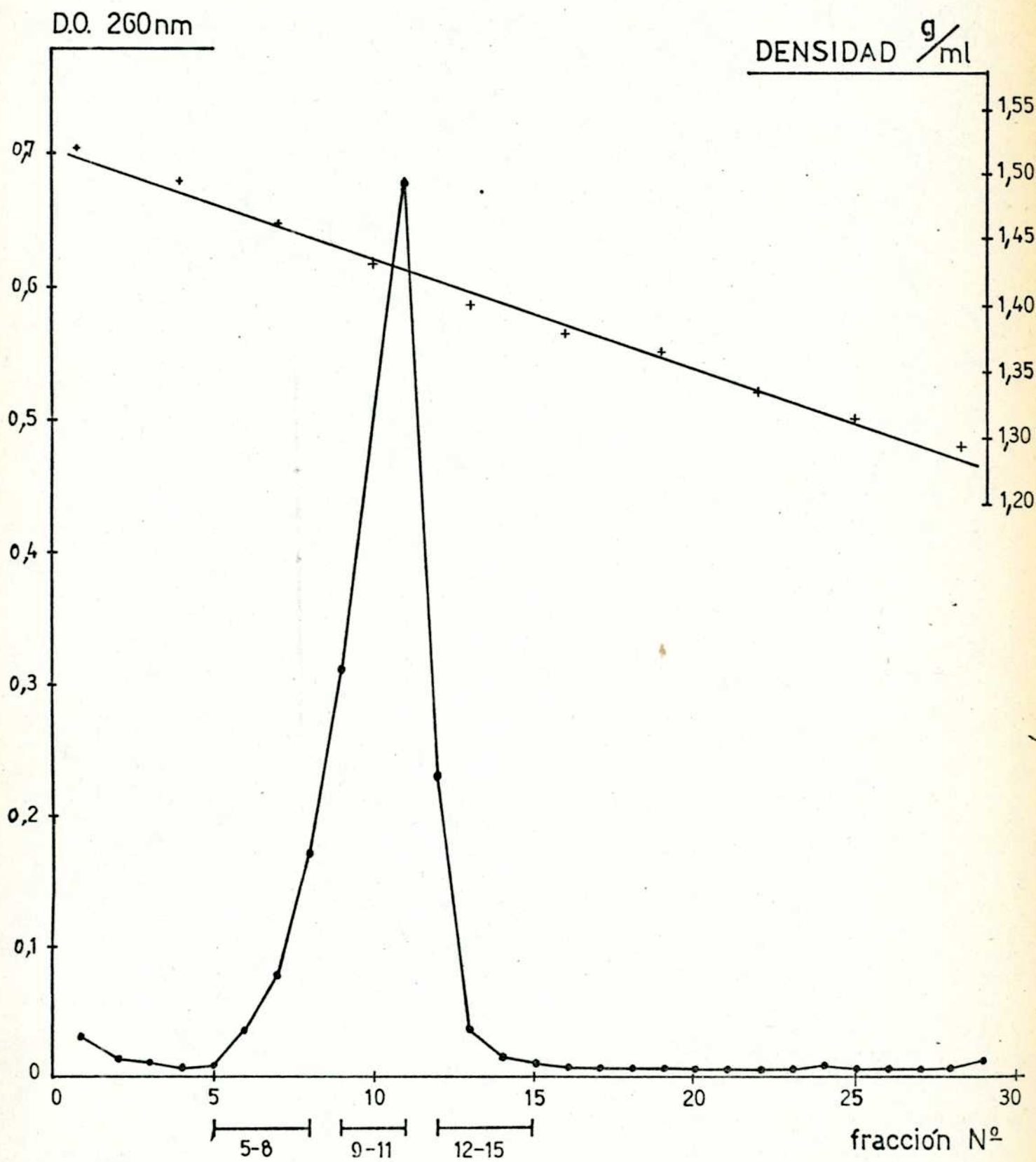
Experimentalmente se mostró que por centrifugación de 5 mg de proteína viral, el ancho de la banda de LS correspondía a 3 tubos con un rango de densidades entre 1,38 g/ml y 1,47 g/ml aproximadamente.

Asumiendo que la densidad del virus aftoso es de 1,42 - 1,43 g/ml vemos que por este método no podemos purificar el virus de aquellos componentes extraños con densidades entre 1,38 - 1,42 y 1,47 - 1,43 g/ml.

Con el objeto de aumentar el límite de resolución de la centrifugación de equilibrio en cloruro de cesio, se modificaron las condiciones de centrifugación de acuerdo a lo siguiente:

1) Centrifugación isopícnica en cloruro de cesio, de la fracción 3er. ClCs

El virus proveniente de la centrifugación en doble fase orgánica y de cloruro de cesio luego de ser flotado en las condiciones especificadas por



Centrifugación isopícnica en cloruro de cesio de la fracción 3<sup>4</sup> OIG

FIG. N° 14

Baohrach, se llevó a densidad 1,430 g/ml con tampón TE y solución de cloruro de cesio de densidad 1,86 g/ml en el mismo tampón. La centrifugación se realizó a 4°C en el rotor S W<sub>39</sub> de la ultracentrífuga Spinco L 2-50 a 39.000 rpm durante 13 hs.

Terminada la centrifugación se recogieron fracciones de 3 gotas cada una pinchando el fondo del tubo. Se determinó la absorción a 260 nm y la densidad de las distintas fracciones.

En la figura 14 se muestra el resultado de esta centrifugación.

El ancho del pico mostrado en la figura corresponde a un rango de densidades cuyos valores están comprendidos entre 1,48 g/ml y 1,40 g/ml.

Además la asimetría del pico indica posiblemente una mayor contaminación fundamentalmente en las fracciones de mayor densidad.

Con el objeto de confirmar la presencia de impurezas así como de poder aislar virus purificado, se sometieron las fracciones indicadas en la figura 14, a una nueva centrifugación. En un tubo del rotor S W<sub>39</sub> se mezclaron las fracciones 5-8 y 12-15 que corresponden a un rango de densidades comprendido entre 1,475- 1,45 g/ml y 1,420 a 1,395 g/ml respectivamente.

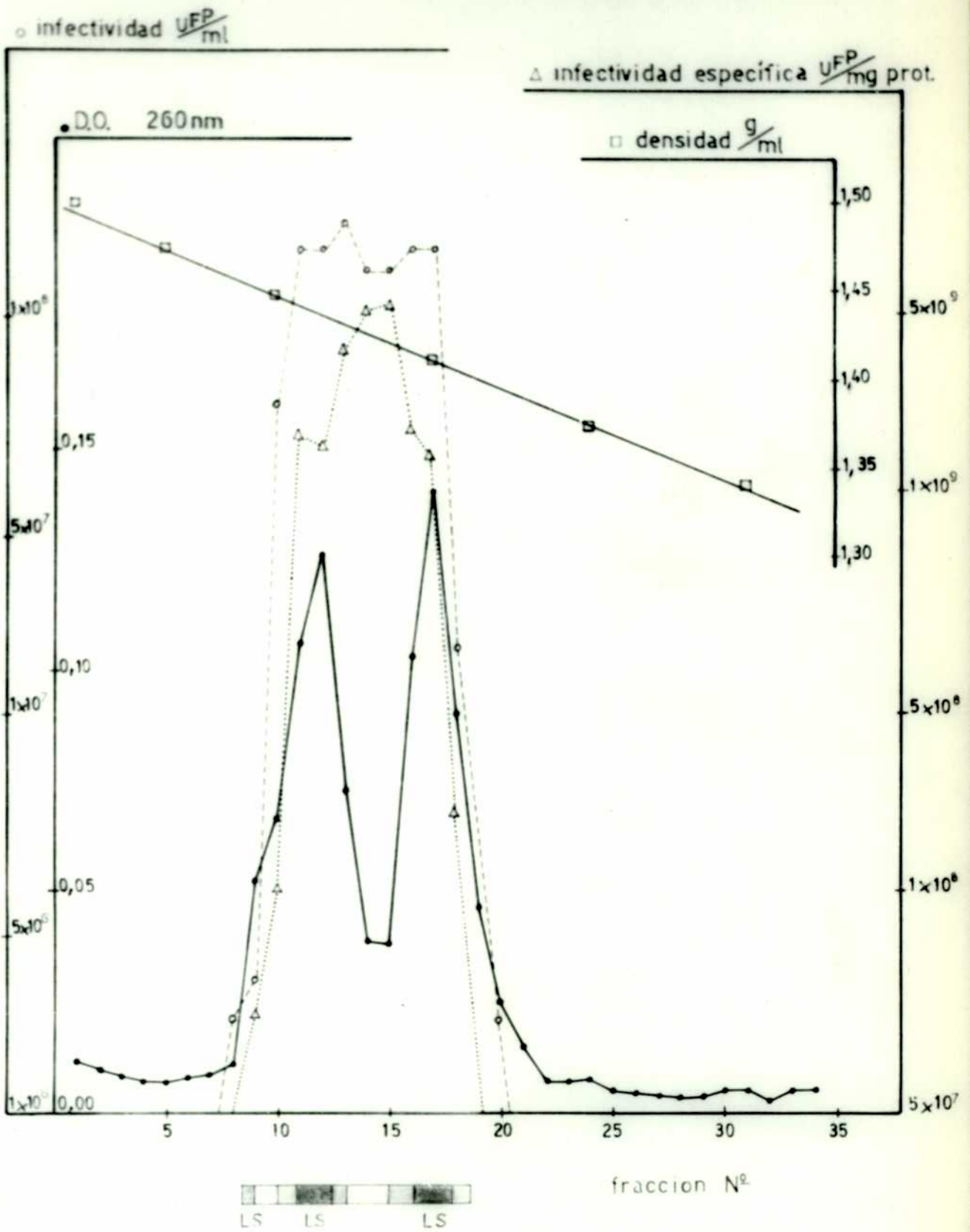
En otro tubo se centrifugó la parte central correspondiente al pico de la figura 14 fracción 9-11 con densidad entre 1,445-1,425 g/ml.

Las fracciones así separadas se llevaron a una densidad de 1,420 g/ml en cloruro de cesio antes de la centrifugación.

La misma se realizó a 35.000 rpm durante 16 hs en el rotor SW<sub>39</sub> y mostró en el tubo que contenía las fracciones 5-8 y 12-15 tres zonas de light scattering; mientras que el de la fracción 9-11 presentaba una sola banda muy intensa de LS.

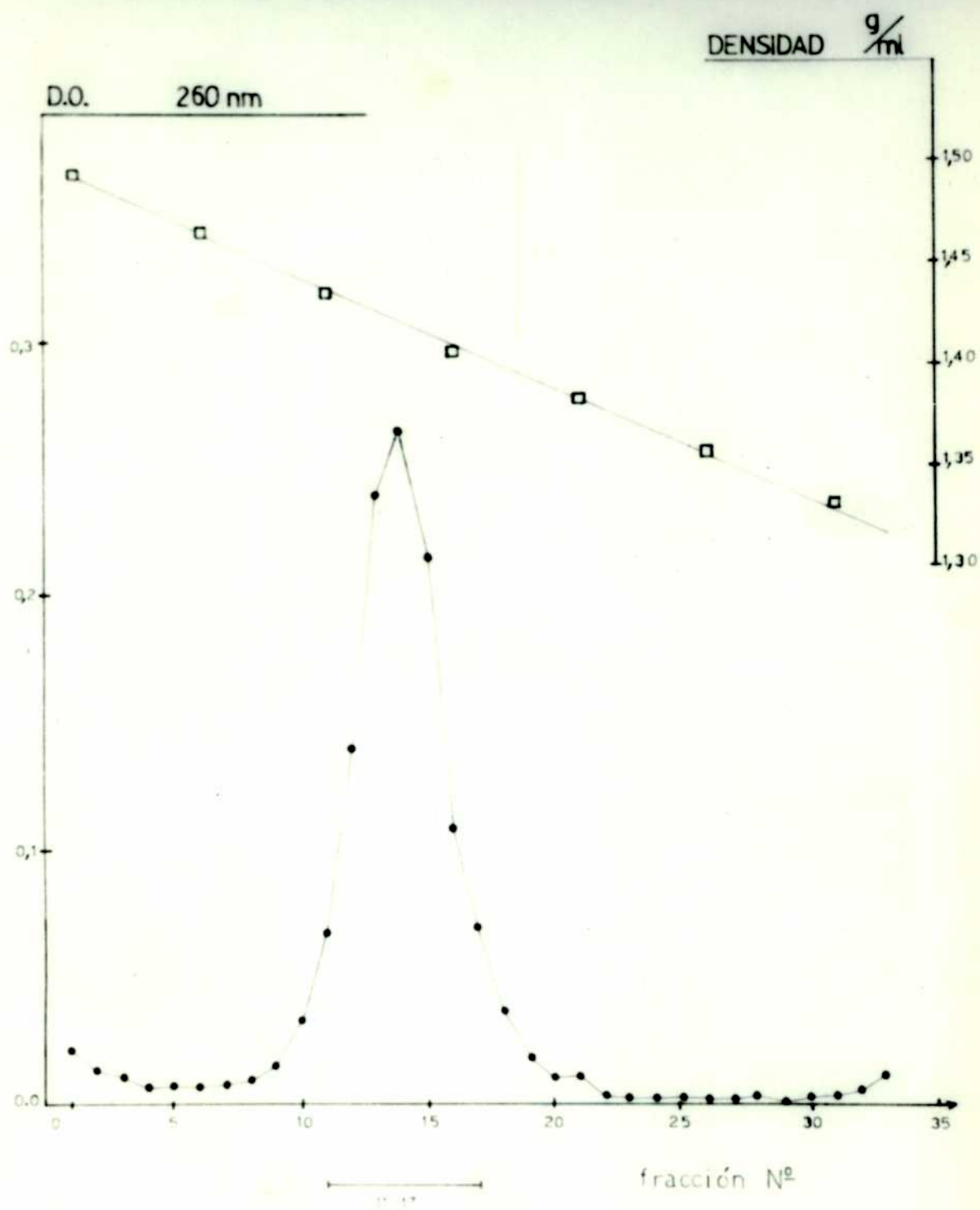
En la figura 15<sup>a y b</sup> se muestran las curvas de absorción a 260 nm y de densidad correspondientes a la centrifugación de las fracciones 5 a 8, 12 a 15 y 9 a 11 respectivamente.

En la figura 15<sup>c</sup> se observan tres picos de absorción a 260 nm los que



Recentrifugación isopícnica en cloruro de cesio de las fracciones  
5-8, 12-15 de la figura N° 14

FIG. 14-15a



Recentrifugación isopícnica en cloruro de cesio de la fracción 9-11

FIG. N° 15 b

corresponden por su ubicación a las tres bandas de "light scattering" observadas. La aparición de estos tres picos descartó la posibilidad de que el ancho del pico obtenido en la figura 14 se hubiese debido a la gran cantidad de partículas víricas.

La presencia de por lo menos tres fracciones de densidad definida puede responder a diferentes causas, entre otras:

- 1-1 Presencia de impurezas
- 1-2 Asociación de viriones o proteínas y/o ácidos nucleicos
- 1-3 Diferencias en las características estructurales de las partículas víricas
- 1-4 Diferencia de penetración del cloruro de cesio en las partículas víricas
- 1-5 Ruptura parcial o total de los viriones en sus componentes estructurales

La determinación de las curvas de infectividad e infectividad específica (UFP/unidad de DO 260 nm) nos muestra (Figura 15<sup>a</sup>) una muy baja infectividad específica en el pico de mayor densidad (fracción de densidad 1,45 g/ml).

Por otra parte, los valores de infectividad específica son semejantes para los otros picos (fracciones de densidades 1,44 y 1,41 g/ml) y muestran que el máximo de IE se obtiene en las fracciones de densidad 1,42-1,43 g/ml que corresponde a la depresión entre estos dos picos.

La figura 15<sup>b</sup> muestra un solo pico cuyo máximo se ubica en la zona de densidad 1,424 g/ml (la densidad del virus aftoso purificado es de 1,42-1,43 g/ml).

Con el objeto de determinar la pureza de las distintas fracciones aisladas, se observaron al microscopio electrónico las fracciones: 9, 12 y 17 de la figura 15<sup>a</sup> y 11-17 de la figura 15<sup>b</sup>.

Las micrografías correspondientes se muestran en las figuras 16a, b, c, y d.

De la observación de las mismas se concluye que en las fracciones 9 y 12 (fig.. 16a y b) hay pocas partículas virales y mucha proteína contaminante.

Figura 15a: Micrografía electrónica de la "fracción 9", obtenida por ultracentrifugación isopícnica del virus aftoso. Tinción negativa con acetato de uranilo 1 %. Aumento: 540.000 x .



Figura 16b. Micrografía electrónica de la "fracción 12" obtenida por ultracentrifugación isopícnica del virus aftoso. Tinción negativa con acetato de uranilo 1 %. Aumento: 600.000 x .

Figura 16c · Micrografía electrónica de la "fracción 17" obtenida por ultracentrifugación isopícnica del virus aftoso. Tinción negativa con acetato de uranilo 1 %. Aumento: 540.000 x .

Figura 16d: Micrografía electrónica de la "fracción" 11-17 obtenida por ultracentrifugación isopónica del virus aftoso, Tinción negativa con acetato de uranilo 1  $\mu$ , Aumento 540.000 x.

En la figura 16a se observa además la presencia de restos celulares particulados.

En las figuras 16 c y d, hay gran cantidad de partículas virales, algunos capsómeros de 12 nm y no hay proteína de fondo, ni restos celulares. Son por lo tanto fracciones puras.

Teniendo en cuenta los resultados mostrados en las figuras 16 a, b, c, y d, podemos decir que la fracción 17 se caracteriza por tener: a) baja infectividad; b) baja infectividad específica; c) ser pura a través de la microscopía electrónica y d) por el gran número de partículas víricas presentes en esa fracción.

En función de los resultados, se puede concluir que gran parte de las partículas víricas presentes en esta fracción no son infecciosas, aunque se muestren al microscopio electrónico con las mismas características que las partículas normales del virus aftoso.

Por otra parte, las fracciones 9 y 12 se muestran impuras al microscopio electrónico, con pocas partículas virales, las que probablemente se hallen asociadas a nucleoproteínas de alto contenido de ácidos nucleicos ( mayor de 35 % ) lo que justificaría la densidad de la misma.

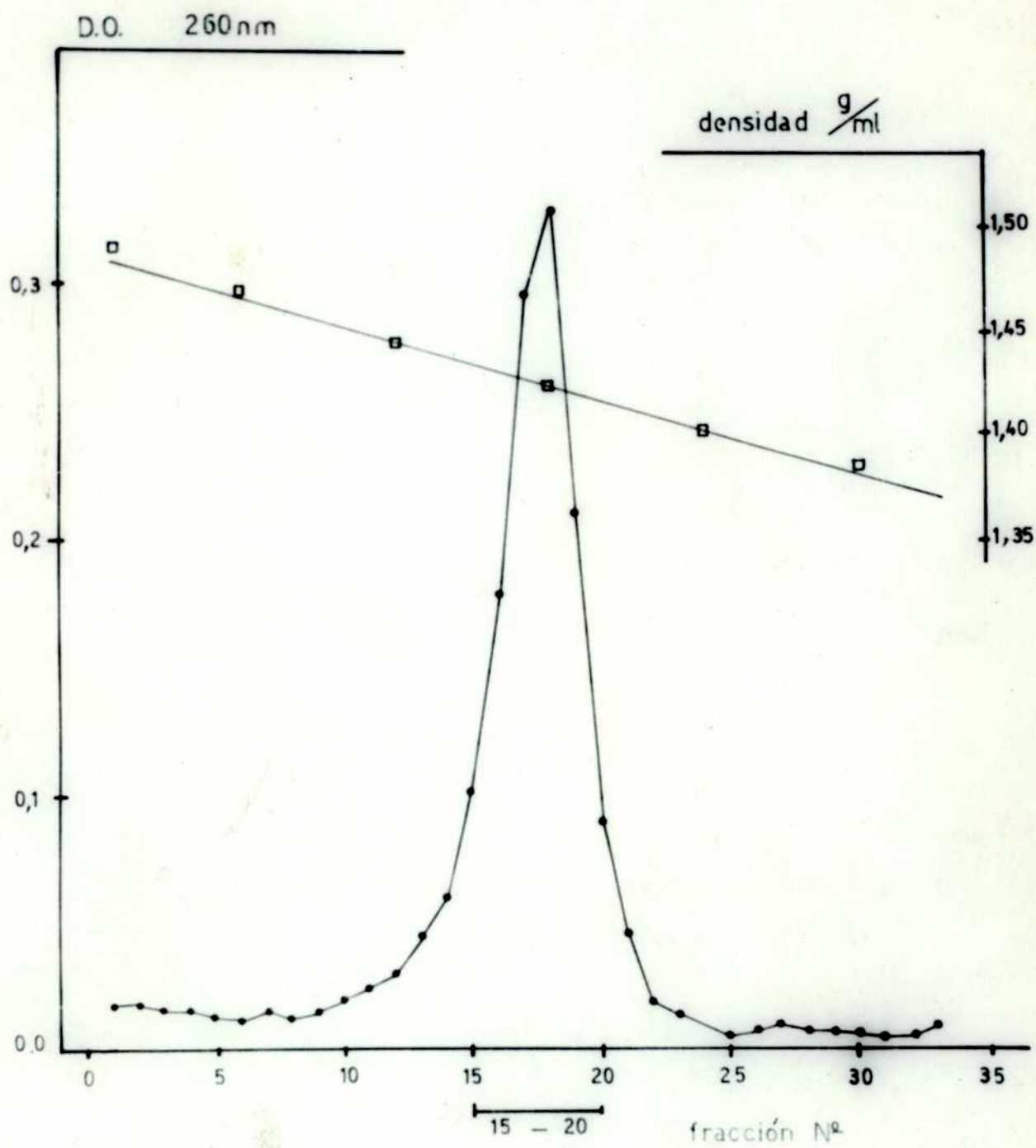
Por último, la fracción 11-17, muestra una alta infectividad específica  $5,5 \times 10^{10}$  UFP/unidad de DO ), es pura al microscopio electrónico y posee una densidad que coincide con la del virus aftoso puro.

## 2. Centrifugación isopícnica en cloruro de cesio de la fracción A<sub>5</sub>

El virus proveniente del gradiente de sacarosa (A<sub>5</sub>) se llevó a densidad 1,430 g/ml en las condiciones ya mencionadas, y se centrifugó a 32000 rpm durante 18 horas en el rotor SW<sub>39</sub> de la ultracentrífuga Spinco L2-50.

Luego de la centrifugación, se visualizó una sola zona de "light scattering" en el centro del tubo.

En la figura 17, se muestra la curva de absorbancia a 260 nm y de densidad de las distintas fracciones del gradiente.



Centrifugación isopícnica en cloruro de cesio de la fracción A<sub>3</sub>

FIG. N° 17

La curva de absorción a 260 nm muestra un pico simétrico con su mínimo ubicado en la zona de densidad 1,425 (ver semejanza con la figura 15b).

La observación al microscopio electrónico de la fracción 15-20 de dicho pico, diluida a la mitad con TE y ubicada en el rango de densidades 1,42-1,43 g/ml, muestra únicamente partículas virales de 24  $\mu$  y capsómeros de 12  $\mu$  (Fig. 18).

#### e.5 ) Electroforesis en gel de poliacrilamida

Fuó utilizada como criterio de pureza y de caracterización de la fracción vírica purificada A'<sub>3</sub>.

El fraccionamiento se basa en las diferencias de movilidad de los distintos componentes. Esta es función de sus pesos moleculares y de las cargas eléctricas netas en el tampón de corrida.

La utilización de este método con el virus entero (geles de 5% a 10% de poliacrilamida) mostró una banda de muy poca movilidad y otras de mayor movilidad que correspondían a productos de ruptura del virus.

Debido a la facilidad de ruptura del virus aftoso en sus componentes no se pudo utilizar este método como criterio de pureza.

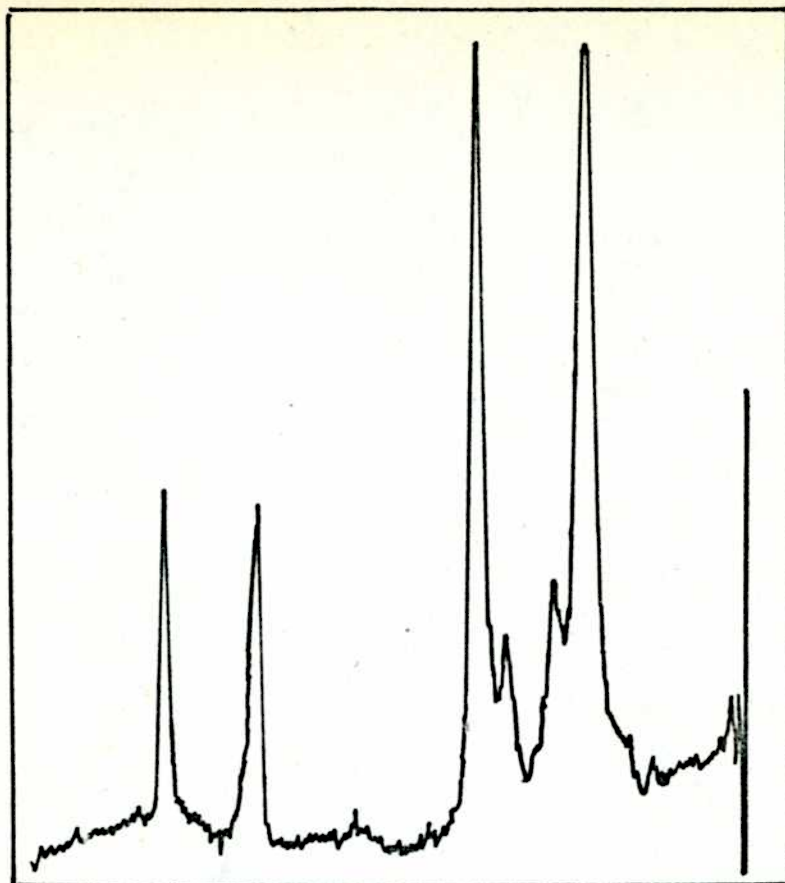
Sin embargo, la caracterización de las diferentes fracciones proteicas obtenidas por degradación del virus en presencia de mercaptoetanol y urea 8 M (148), permitió utilizar estos resultados como modelo de comparación para nuestra fracción purificada.

La fracción llamada A'<sub>3</sub> fuó sometida al tratamiento con mercaptoetanol y urea, y corrida en un gel 7% en acrilamida y urea 8 M en las condiciones especificadas en Materiales y Métodos.

En la figura 19 se muestra el aspecto del gel luego de la electroforesis y de la tinción con Amido Schwartz, con el densitograma correspondiente.

La obtención de 6 bandas proteicas coincidió con lo obtenido previamente (148) con virus purificados provenientes de cultivos en líneas celulares.

Figura 18 Micrografía electrónica correspondiente a la fracción  
15-20 de la Fig. 17.  
Tinción negativa con acetato de uranilo.  
Aumento: 960.000 X



← Dirección de migración

DENSITOGAMA

Electroforesis en gel de poliacrilamida de  
la fracción de virus A<sub>3</sub>.

FIG. N°19



6) Caracterización serológica de las diferentes fracciones purificadas por los dos métodos desarrollados.

La reacción de fijación de complemento según el método de ~~Bachrach~~ <sup>Bachrach</sup> (ver Materiales y Métodos) fué utilizado como criterio comparativo entre las fracciones purificadas 3°C1Cs y A'<sub>3</sub> (purificadas según el método de Bachrach y del gradiente de sacarosa). Para ello se determinó la relación de fijación de complemento cruzada de las diferentes preparaciones de virus frente a antisueros (Ac) correspondientes a distintos subtipos serológicos del virus aftoso. La titulación de los antígenos se realizó en las condiciones especificadas en Materiales y Métodos.

En una primera experiencia se realizó una reacción de fijación de complemento utilizando como antígenos: a) virus aftoso subtipo A<sub>25</sub> (Virus original), b) la fracción obtenida luego de una purificación parcial por centrifugación en gradiente de cloruro de cesio, c) la fracción purificada por el método de Bachrach (3er. ClCs) y d) la purificada por el método del gradiente de sacarosa (A'<sub>3</sub>) y como anticuerpos los antisueros obtenidos contra virus cuyos subtipos serológicos eran A<sub>24</sub>, A<sub>25</sub> y A<sub>26</sub>.

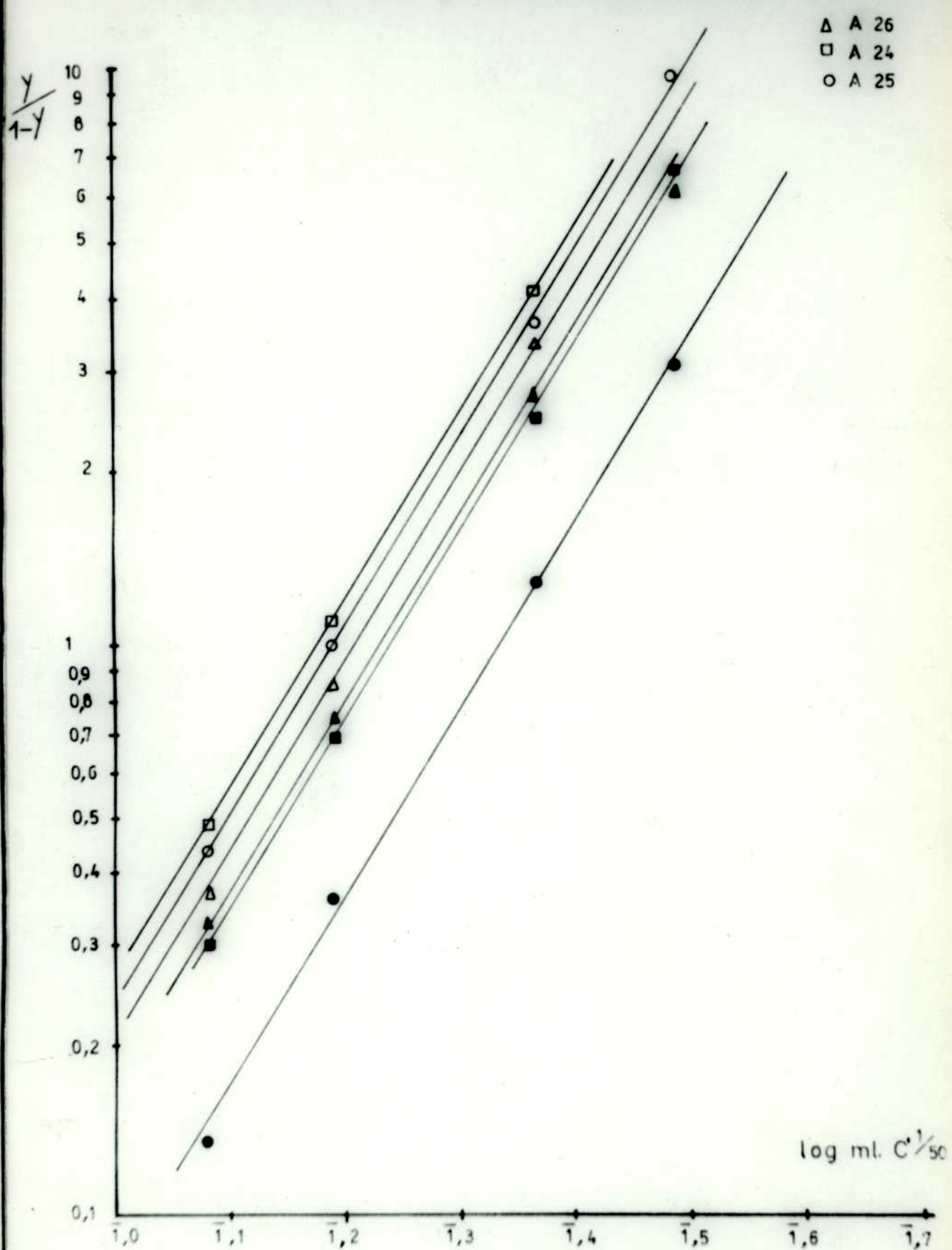
En la Tabla 23 y figura 20 se muestran como ejemplo los resultados obtenidos cuando se utilizó como antígeno el virus original, frente a los antisueros A<sub>25</sub>, A<sub>24</sub> y A<sub>26</sub>.

En todos los experimentos realizados se tuvo en cuenta la anticomplementaridad de los antígenos (usando sistema completo sin Ac) y de los antisueros (usando sistema completo sin Ag). Para los ug de proteína de Ag utilizados la anticomplementaridad del mismo era despreciable frente a la anticomplementaridad de los antisueros. Por ésto, en los cálculos se tuvo en cuenta sólo la anticomplementaridad de los antisueros.

La determinación de la fijación de complemento específico, es decir, ml de complemento fijado en la reacción Ag-Ac por mg de proteína (Tabla 24); permitió comparar las fijaciones de complemento de un antígeno frente a distintos antisueros (caracterización de las distintas fracciones) y de los diferentes antígenos entre sí (grado de purificación).

TABLA N° 23: Fijación de complemento entre el virus original subtipo A<sub>25</sub> y los antisueros A<sub>25</sub>, A<sub>24</sub> y A<sub>26</sub>

Tubo N°	log ml C <sup>1</sup> /50 agregados	Antisuero	Absorbancia a 540mμ Virus original	sin virus	% de hemólisis	y 1-y
1	1,080	A <sub>25</sub>	-	0,315	30,6	0,441
2	1,190		-	0,525	50	1
3	1,365		-	0,810	78,5	3,651
4	1,485		-	0,938	90,8	9,87
5 *	0		-	1,025	100	
6 *	0,3		-	1,035		
7	1,080	A <sub>24</sub>	-	0,327	32,7	0,486
8	1,190		-	0,522	52,2	1,092
9	1,365		-	0,804	80,4	4,102
10	1,485		-	0,935	93,5	-
11"*	0		-	1,003	100	
12 *	0,3		-	0,997		
13	1,080	A <sub>26</sub>	-	0,270	27	0,37
14	1,190		-	0,457	45,7	0,842
15	1,365		-	0,768	76,8	3,31
16	1,485		-	0,860	86	6,143
17 *	0		-	0,994	100	
18 *	0,3		-	1,006		
19	1,080	A <sub>25</sub>	0,123	-	11,9	0,135
20	1,190		0,277	-	26,9	0,360
21	1,365		0,578	-	56	1,273
22	1,485		0,778	-	75,3	3,049
23	1,080	A <sub>24</sub>	0,231	-	23,1	0,300
24	1,190		0,409	-	40,9	0,692
25	1,365		0,713	-	71,3	2,484
26	1,485		0,870	-	87	6,692
27	1,080	A <sub>26</sub>	0,248	-	24,8	0,330
28	1,190		0,426	-	42,6	0,742
29	1,365		0,730	-	73	2,714
30	1,485		0,859	-	85,9	6,092



Fijación de complementos del virus aftoso A 25 frente a los antisueros A 25, A 24 y A 26.

FIG N° 20

TABLA N° 24.-- Determinación de la eficiencia de la fijación de complemento durante distintos pasos del proceso de purificación.

Antígenos	ug de protefna Ag tubo	log. ml C 1/50		ml de C 1/50		ml C 1/50/mg prot.						
		fijados por el sistema	fijados por el sistema	fijados por la reacción Ag-Ac <sup>##</sup>	fijados por la reacción Ag-Ac							
		A 24	A 25	A 24	A 25	A 24	A 24					
		A 25	A 26	A 24	A 26	A 25	A 26					
Virus original	84	1,331	1,230	0,214	0,1728	0,1696	0,059	0,0228	0,0076	0,7	0,27	0,09
1er. CICs	7	1,700	1,450	-	0,500	0,282	-	0,345	0,132	-	49,1	18,8
3er. CICs	1,1	1,543	1,320	1,276	0,349	0,208	0,1885	0,194	0,058	0,0265	176	53
A <sub>3</sub>	0,6	1,580	1,353	1,270	0,389	0,225	0,186	0,234	0,075	0,024	390	125
Tarpón veronal	0	1,190	1,177	1,210	0,155	0,150	0,162	-	-	-	-	-

# Fijación de complemento en ausencia de antígeno ( anticomplementaridad del antisuero ).

## Diferencia entre los ml C<sup>1/50</sup> fijados por el sistema completo y los fijados por el sistema en ausencia de antígeno.

Este tipo de comparación es válida ya que los experimentos fueron hechos simultáneamente. No es posible comparar experiencias realizadas en diferentes días, a menos que los resultados sean expresados o bien como unidades hemolíticas 50%/mg proteína o como log dosis C 1/50 requerida para producir el 50% de hemólisis/mg proteína (log dosis C 1/50 fijado por el sistema-log dosis C 1/50 fijada por el antisuero).

De la Tabla 24 se deduce una relación de purificación respecto del material original de 70, 250 y 560 veces para las fracciones 1er. ClCs, 3er. ClCs y A'<sub>3</sub> respectivamente. Estos valores corresponden a la fijación obtenida frente al antisuero homólogo (anti A<sub>25</sub>).

La caracterización se visualiza mejor determinando el porcentaje de la relación de cruzamiento. Su determinación se realiza mediante la ecuación de Warner y ~~Ubertini~~, según la cual:

$$R = 100 \quad (r_1 \times r_2)^{\frac{1}{2}}$$

donde:

R= relación de fijación cruzada

$r_1 = \frac{\text{fijación del Ag}_1 \text{ frente al antisuero heterólogo}}{\text{fijación del Ag}_1 \text{ frente al antisuero homólogo}}$

$r_2 = \frac{\text{fijación del Ag}_2 \text{ frente al suero heterólogo}}{\text{fijación del Ag}_2 \text{ frente al suero homólogo}}$

Para diferentes valores de R corresponden distintas características serológicas de los antígenos en cuestión, es decir, para:

$R < 10$  diferencia de tipo serológico

$10 < R < 33,3$  subtipos muy diferentes

$33,3 < R < 70,7$  diferencia de subtipos

$70,7 < R < 100$  diferencias dentro del mismo subtipo

En la Tabla 25 se resumen los porcentajes de la relación de fijación cruzada del material original (considerado Ag homólogo) frente a las fracciones 1er ClCs, 3er ClCs y A'<sub>3</sub>.

TABLA N° 25: Relación de fijación de complemento cruzado para las distintas fracciones purificadas

Material N°	Tratamiento	ml C 1/50 mg prot. de Ag			$r_{1 \frac{24}{25}}$	$r_{1 \frac{26}{25}}$	$R_{11 \frac{24}{25}}$	$R_{11 \frac{26}{25}}$
1	Antisueros	$A_{25}$	$A_{24}$	$A_{26}$			$100(r_{1 \frac{24}{25}} - r_{1 \frac{24}{25}})$	$100(r_{1 \frac{26}{25}} - r_{1 \frac{26}{25}})$
1	Material original	0,7	0,27	0,09	0,385	0,128	38,5	12,8
2	1er CICs	49,4	18,8	-	0,380	-	38,1	-
3	3er CICs	176	53	24	0,301	0,136	34	13,2
4	$A'_3$	390	125	40	0,320	0,103	35,2	11,5

De la Tabla 25 se concluye que el comportamiento del antígeno  $A_{25}$  frente a los antisueros  $A_{24}$  y  $A_{26}$  guarda una relación de diferencias de subtipos muy grande con el  $A_{26}$  mientras que con el  $A_{24}$  la diferencia es mucho menor.

Por otra parte, la purificación por los métodos aquí descritos dio origen a fracciones víricas que mantienen la misma relación de fijación con los antisueros  $A_{24}$  y  $A_{26}$  que el material original de partida.

F. Heterogeneidad del virus aftoso purificado. Su caracterización

Durante la purificación del virus aftoso, proveniente de cultivo Frenkel, por los dos métodos aquí utilizados, se observó la presencia de fracciones que diferían en la velocidad de sedimentación y/o densidad.

Dichas fracciones fueron analizadas con el objeto de determinar su naturaleza fisicoquímica y biológica.

f<sub>1</sub> : Fracciones que difieren del virus aftoso monodisperso en su coeficiente de sedimentación.

De las diferentes fracciones obtenidas en el último paso de purificación, cuando se utilizó la centrifugación en gradiente de sacarosa (Fig. 7b) tres presentaron alta infectividad específica A'<sub>1</sub>, A'<sub>2</sub> y A'<sub>3</sub>.

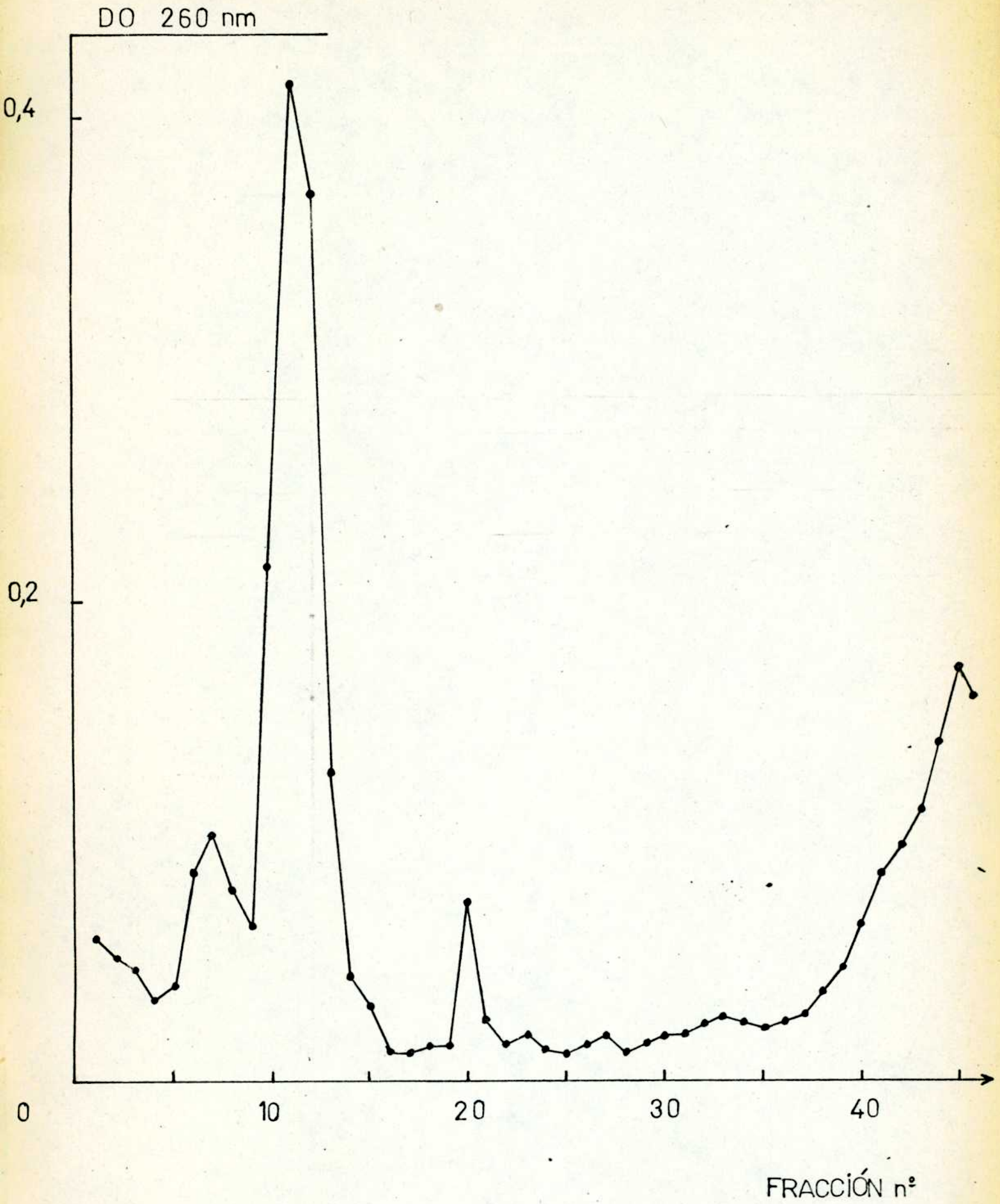
De ellos la fracción A'<sub>3</sub> corresponde por el valor de su coeficiente de sedimentación al virus aftoso monodisperso.

Las fracciones A'<sub>1</sub> y A'<sub>2</sub> por tener mayor coeficiente de sedimentación que A'<sub>3</sub> podrían tratarse de partículas víricas purificadas en diferentes estados de agregación o asociaciones de virus a proteínas y/o ácidos nucleicos. Por otra parte, cuando se utilizó la técnica de Bachrach se obtuvo una fracción llamada 3er ClCs que por ultracentrifugación analítica mostró que dicha fracción era heterogénea.

Con el objeto de determinar una posible correlación entre las fracciones obtenidas por ambos métodos, una alícuota de la fracción llamada 3er. ClCs fué centrifugada en un gradiente lineal de sacarosa 15-45% en tampón TE en las mismas condiciones descriptas para la obtención de la fracción A<sub>3</sub> (en ausencia de deoxicolato de sodio).

La curva de absorción a 260 nm correspondiente a esta centrifugación se muestra en la figura 24.

La presencia de por lo menos cuatro picos de absorción en el U.V. era predecible porque este mismo material, presentaba esa heterogeneidad cuando se centrifugó en la ultracentrífuga analítica.



Centrifugación en gradiente de sacarosa 15-45% de la fracción 3<sup>er</sup> C13

FIG. N° 21



Además, por su ubicación en el gradiente se identifican con las fracciones A'<sub>2</sub>, A'<sub>3</sub>, A'<sub>4</sub> y A'<sub>6</sub> de la figura 7b.

De ellas, la fracción A'<sub>4</sub> mostró al ser observada en el microscopio electrónico, muy pocas partículas virales completas y una gran proporción de partículas vacías en las que penetró el acetato de uranilo.

f<sub>2</sub>) Capacidad de infectar células de las fracciones de diferente S

En la tabla se muestran comparativamente los valores de infectividad e infectividad específica de las fracciones A'<sub>1</sub>, A'<sub>2</sub> y A'<sub>3</sub>

material	volumen	infectividad total	proteína total	infectividad específica	rendimiento <sup>4</sup> v
-	ml	UFP x 10 <sup>7</sup>	mg	UFP/mg prot. x 10 <sup>7</sup>	%
A' <sub>1</sub>	1,3	65	0,590	110	6,6
A' <sub>2</sub>	1,2	75	0,235	320	7,7
A' <sub>3</sub>	2,4	480	0,580	825	49

<sup>4</sup> Se considera 100% el virus antes de ser ultracentrifugado en el gradiente lineal de sacarosa-DOC.

De los datos de la tabla se deduce que las partículas virales con capacidad de infectar células están distribuidas en la relación 1:1,15:7,35 para las fracciones A'<sub>1</sub>, A'<sub>2</sub> y A'<sub>3</sub> respectivamente.

Por otra parte, las relaciones de infectividad específica son 1:2,9:7,5.

Estos valores indican que o bien las fracciones A'<sub>1</sub> y A'<sub>2</sub> están impurificadas con proteína o que la capacidad de infectar células varía en función del grado de agregación de los viriones.

f<sub>3</sub>) Coefficientes de extinción porcentual de las diferentes fracciones

En la tabla 26 se muestran los valores de absorción a 260 nm y concentración proteica de dos experiencias de purificación de las fracciones A'<sub>1</sub> y A'<sub>2</sub>.

Tabla N° 26: Coeficientes de extinción porcentual de las fracciones de mayor coeficiente de sedimentación que el virus aftoso monodisperso.

Experimento	Material	Absorción a 259 mμ	Concentración proteica	Coeficiente de extinción porcentual <sup>1</sup>
N°			g/ml x 10 <sup>-6</sup>	E <sup>1%</sup> <sub>259</sub>
1	A' <sub>1</sub>	0,232	31	52,5
	A' <sub>2</sub>	0,320	30	74,8
2	A' <sub>1</sub>	0,194	23	59
	A' <sub>2</sub>	0,210	18	82

Los coeficientes<sup>2</sup> de extinción fueron calculados teniendo en cuenta que la composición del virus es de un 30% de RNA y 70% de proteínas.

Teniendo en cuenta los valores de la tabla 26, vemos que el coeficiente de extinción promedio de las dos experiencias es  $E_{259}^{1\%} = 55,7$  para la fracción A' <sub>1</sub> y  $E_{259}^{1\%} = 78,4$  para A' <sub>2</sub>. Este último valor coincidió con el determinado para la fracción A' <sub>3</sub> y con el del virus aftoso purificado por otros investigadores (57), no siendo entonces diferente, según este criterio, la composición química del virus aftoso en las fracciones A' <sub>2</sub> y A' <sub>3</sub>. Por otra parte, el valor  $E_{259}^{1\%} = 55,7$  de la fracción A' <sub>1</sub> más bajo que el del virus aftoso purificado indicó una relación aproximada de proteínas a ácidos nucleicos de 79:21 (ver Materiales y Métodos).

La fracción A' <sub>1</sub> no estaría constituida sólo por viriones ya que por lo menos habría contaminación proteica. Su elevado coeficiente de sedimentación sería entonces explicado por la formación de agregados macromoleculares de proteína (virales o no) con partículas virales. Esta conclusión se confirmó por la observación al microscopio electrónico que permitió detectar proteínas como fondo de la preparación.

Figura 22 Micrografía electrónica de las fracciones purificadas del virus aftoso de diferente coeficiente de sedimentación. a) Fracción  $A_2$  · b) Fracción  $A_3$ . Tinción negativa con acetato de uranio.

f4. Microscopía electrónica de las fracciones A'<sub>2</sub> y A'<sub>3</sub>

En la figura 22 a y b se muestran las microfotografías electrónicas correspondientes a las fracciones A'<sub>2</sub> y A'<sub>3</sub> respectivamente.

En ambos casos se observan partículas intactas de 24 mu y capsómeros de 12 mu. No se observan partículas vacías ni proteína de fondo contaminante. No se pudieron determinar diferencias morfológicas entre ambas fracciones, ni la ultraestructura de las partículas por este método de tinción (característica del virus aftoso).

2.5. Coefficiente de sedimentación de la fracción A'<sub>2</sub>

Fig. 23: Schlieren Óptico de la fracción A'<sub>2</sub>

En la figura 23 se muestra el schlieren óptico correspondiente al material proveniente de gradiente de sacarosa, que permitió calcular el valor del coeficiente de sedimentación de la fracción A'<sub>2</sub>.

En la tabla 27 se resumen las características de sedimentación de dicha fracción.

TABLA N° 27: Caracterización de sedimentación de la fracción A'<sub>2</sub>

Foto N°	1	2	3	4	5
Angulo	25°	25°	25°	25°	25°
Distancia en cm	1,3208	1,6788	2,0587	2,2910	2,5514
Tiempo en minutos	5	8	11	13	15

El valor calculado de la constante de sedimentación es  $S_{20}^{TE} = 192,16$  unidades Svedberg, correspondiéndole una constante de sedimentación estandarizada de  $S_{20}^W = 215$  unidades Svedberg.

f 6) Densidad de las distintas fracciones

Con el objeto de determinar si las densidades de las fracciones A'<sub>2</sub> y A'<sub>3</sub> eran diferentes, se realizó una flotación en cloruro de cesio con las mismas (ver Materiales y Métodos).

En un tubo del rotor SW<sub>39</sub> se centrifugó la fracción A'<sub>2</sub>; en el segundo tubo la fracción A'<sub>3</sub> y en el tercero una mezcla de las fracciones A'<sub>2</sub> y A'<sub>3</sub> (200 ug de cada una).

Luego de la centrifugación, los tres tubos presentaban una sola zona de LS ubicada a la misma altura.

Las tres zonas de LS fueron separadas del resto del gradiente pipeteando desde la parte superior de los tubos. No se encontró virus por encima ni por debajo de las zonas de LS.

La densidad de las distintas zonas se determinó gravimétricamente utilizando una micropipeta de 100 ul.

Los valores determinados para las fracciones  $A'_2$ ,  $A'_3$  y  $A'_2-A'_3$  fueron de:  $1,423 \pm 0,007$  g/ml,  $1,421 \pm 0,005$  g/ml respectivamente (estos son los valores promedio de 5 determinaciones).

La no diferencia entre las densidades de las fracciones  $A'_2$  y  $A'_3$  coincide con los resultados obtenidos con la fracción 3er ClCs ya que por utilización del método de Bachrach se obtuvo una fracción de densidad 1,42 g/ml que por ultracentrifugación analítica (fig. 20) y por centrifugación en gradiente de sacarosa (fig. 21), dió origen a estas dos fracciones de diferente coeficiente de sedimentación.

f 7. Caracterización serológica de las fracciones purificadas de diferente coeficiente de sedimentación

La determinación de las relaciones de fijación de complemento cruzada para un antígeno frente a antisueros homólogos y heterólogos, según la técnica de Brodsky (ver Materiales y métodos, inciso 9) permitió comparar y caracterizar las fracciones que diferían en su coeficiente de sedimentación.

En un primer experimento se determinó la fijación de diferentes preparaciones víricas que correspondían originalmente a un virus aftoso subtipo serológico A<sub>25</sub> frente a los antisueros A<sub>24</sub>, A<sub>25</sub> y A<sub>26</sub>.

En la Tabla 28 se resumen los resultados obtenidos, los cuales que son semejantes a los obtenidos en otros experimentos y algunos de cuyos resultados se presentaron en el inciso 6.

La fijación de complemento específica de las diferentes fracciones consideradas permitió, por el mismo procedimiento mostrado en el inciso 26, la determinación de la relación de fijación cruzada respecto del virus original de partida para la purificación.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 29.

De la comparación de los resultados presentados en las tablas 25 y 29 podemos concluir que las fracciones que corresponden a virus aftoso nondisperso, ya sea purificado en presencia o ausencia de deoxicolato de sodio (A<sub>3</sub>' y A<sub>3</sub>), conserva las relaciones de fijación cruzada del material de partida y de algunas etapas intermedias (1er. CICs). Sin embargo, las fracciones de diferente coeficiente de sedimentación (A<sub>1</sub>' , A<sub>2</sub>' ó A<sub>2</sub>) presentan un comportamiento diferente frente a los antisueros heterólogos (fundamentalmente frente al antisuero A<sub>24</sub>).

Esta diferencia en el comportamiento de las fracciones, es debido al estado de agregación de los viriones. El resultado obtenido con la fracción A<sub>6</sub>' era previsible, ya que dicha fracción corresponde a viriones rotos (partículas de las que se vió poseían un comportamiento serológico inespecífico a nivel de subtipos (81).

TABLA N° 20: Protocolo de la reacción de fijación de complemento para fracciones de diferente coeficiente de sedimentación del virus aftoso frente a los antisueros A<sub>25</sub>, A<sub>24</sub> y A<sub>26</sub>

Antígenos	ug de prot.de Ag tubo	log ml C <sup>1/50</sup>		ml C <sup>1/50</sup> fijados		ml C <sup>1/50</sup> fijados		ml C <sup>1/50</sup> fijados				
		fijados por el sistema		por el sistema		por la reac.Ag-A <sub>25</sub>		por la reac.Ag-A <sub>26</sub>				
		A <sub>24</sub>	A <sub>25</sub>	A <sub>24</sub>	A <sub>25</sub>	A <sub>24</sub>	A <sub>25</sub>	A <sub>24</sub>	A <sub>25</sub>			
- Virus original	84	I,331	I,230	0,214	0,1728	0,1696	0,059	0,0228	0,0076	0,7	0,27	0,09
Fracción A' 1	1,15	I,565	-	0,368	0,334	-	0,213	0,134	-	185	160	-
Fracción A' 2	0,4	I,450	I,260	0,281	0,321	0,182	0,126	0,171	0,020	315	428	50
Fracción A' 3	0,6	I,510	I,310	0,323	0,292	0,203	0,168	0,142	0,041	280	237	68
Fracción A' 3	0,4	I,577	-	0,377	0,211	-	0,222	0,061	-	552	153	-
Fracción A' 3	0,6	I,580	I,270	0,389	0,225	0,186	0,234	0,075	0,024	390	125	40
Fracción A' 6	1,1	I,460	-	0,288	0,227	-	0,133	0,077	-	120	70	-
Fracción veronal	0	I,190	I,210	0,155	0,150	0,162	-	-	-	-	-	-



TABLA N° 29: Relación de fijación de complemento cruzada para las fracciones de diferente coeficiente de sedimentación del virus aftoso monodisperso.

Material	Antígenos	ml C 1/50 fijados			r <sub>1</sub>	24/25	r <sub>1</sub>	26/25	R <sub>11</sub>	24/25	R <sub>11</sub>	26/25
		A <sub>25</sub>	A <sub>24</sub>	A <sub>26</sub>								
<p>Antisucros</p> <p>100 (r<sub>1</sub> 24/25 r<sub>1</sub> 24/25) 100(r<sub>1</sub> 26/25 26/25)</p>												
1	Virus original	0,7	0,27	0,09	0,385	0,128	38,5	12,8				
2	Fracción A <sub>1</sub>	185	160	-	0,865	-	57,8	-				
3	Fracción A <sub>2</sub>	315	428	50	1,36	0,159	72,5	14,4				
4	Fracción A <sub>2</sub>	280	237	68	0,848	0,243	57,1	17,6				
5	Fracción A <sub>3</sub>	552	153	-	0,276	-	32,5	-				
6	Fracción A <sub>3</sub>	390	125	40	0,320	0,103	35,2	11,5				
7	Fracción A <sub>6</sub>	120	70	-	0,582	-	47,4	-				

TABLA N° 30: Protocolo de la reacción de la fijación de complemento para fracciones de diferente coeficiente de sedimentación del virus aftosa frente a los antisueros C<sub>160</sub> y C<sub>Argentino</sub>.

Purificación	Antígenos	ug de prot. Ag tubo	log ml C 1/50 fijados por el sistema	ml C 1/50 fijados por el sistema	ml C 1/50 fijados por la reacción AG-Ac	ml C 1/50 ng prot. Ag fijados por la reacción AG-Ac	Antisueros			
							C <sub>160</sub>	C <sub>Arg</sub>	C <sub>Arg</sub>	
1	Virus original	20	1,191	1,074	0,155	0,118	0,014	0,0042	0,6	0,21
	1er. CICs	3	1,339	167	0,218	0,147	0,075	0,033	25	11
	A' 1	0,5	1,300	258	0,1995	0,1815	0,0565	0,0675	113	135
	A' 2	0,5	1,385	898	0,243	0,199	0,100	0,085	280	170
	A' 3	0,5	1,482	276	0,303	0,189	0,160	0,075	320	150
2	Virus original	20	1,212	1,048	0,163	0,1196	0,020	0,0056	1	0,28
	1er. CICs	3	1,374	1,158	0,236	0,144	0,093	0,030	31	107
	A' 2	0,5	1,350	1,254	0,223	0,179	0,080	0,065	160	130
	A' 3	0,5	1,530	1,294	0,338	0,1965	0,195	0,0825	390	165
	Tampón veronal	0	1,155	1,057	0,143	0,114	-	-	-	-

TABLE No 31: Relación de fijación de complemento cruzada para las fracciones de diferente S del virus aftoso Europeo frente a los antisueros C<sub>160</sub> y C<sub>Argentino</sub>

Purificación	Materiales	Antígenos	ml C 1/50 fijados		R <sub>11</sub>	R <sub>61</sub>	C <sub>Arg</sub> /C <sub>160</sub>
			mg prot de Ag	r <sub>1</sub>			
Antisueros							
			C <sub>160</sub>	C <sub>Arg</sub>			
			$100(r_1 \frac{C_{Arg}}{C_{160}})^{\frac{1}{2}}$				
			$100(r_6 \frac{C_{Arg}}{C_{160}})^{\frac{1}{2}}$				
No	Fra						
1	Virus original	0,6	0,21	0,35	35	-	-
2	1er Clcs	25	11	0,44	39,2	-	-
3	A' <sub>1</sub>	113	135	1,19	64,2	-	-
4	A' <sub>2</sub>	200	170	0,85	54,2	-	-
5	A' <sub>3</sub>	320	150	0,47	40,5	-	-
6	Virus original	1	0,28	0,28	-	-	28
7	1er Clcs	31	10	0,323	-	-	30
8	A' <sub>2</sub>	160	130	0,812	-	-	47,5
9	A' <sub>3</sub>	390	165	0,423	-	-	34

Con el objeto de determinar si estos resultados son consecuencia de las características fisicoquímicas de las fracciones o si sólo son función del tipo serológico del virus purificado, se repitió la experiencia con virus oopa serológica C<sub>160</sub>.

Las características de la fijación frente a los antisueros C<sub>160</sub> y C<sub>Arg</sub> se muestran en la tabla 30 para dos purificaciones diferentes de virus aftoso subtipo C<sub>160</sub>.

La determinación de la fijación cruzada respecto del material de partida se muestra en la tabla 31 .

De los datos de la tabla 31 se concluye que hay una menor especificidad de subtipo serológico para las fracciones de mayor coeficiente de sedimentación que el virus aftoso monodisperso.

Esa diferencia se pone de manifiesto con mayor intensidad en el caso del virus aftoso tipo A que en el tipo C, aunque en ambos se manifieste.

Diferencias que dependen casi exclusivamente del estado de agregación de las partículas virales y no de sus características serológicas.

## CAPITULO IV

### CONCLUSION

La purificación del virus de la Fiebre Aftosa según los métodos convencionales utilizados con virus provenientes de cultivos de tejido, no es aplicable al virus obtenido por cultivo en epitelio lingual bovino en sobrevivencia. Esto se debe a la menor infectividad específica obtenida en dicho cultivo respecto del proveniente por cultivo de tejido.

El bajo rendimiento del virus purificado y en algunos casos la imposibilidad de purificación del virus por los métodos utilizados usualmente, llevó a la modificación y adaptación de los mismos al material en estudio. Los resultados mostrados indican que el método propuesto, permitió la obtención de virus aftoso monodisperse purificado (según los criterios de pureza utilizados (sección C).

Mediante el método propuesto en este trabajo, se logró una purificación de 4550 veces respecto del material original, que es aproximadamente el doble de la lograda por utilización del método Bachrach.

Por otra parte, el rendimiento obtenido fué del 5,2%, que es aproximadamente 40 veces mayor que el obtenido por el método de Bachrach (ver cuadro comparativo de los métodos utilizados (inciso d<sub>2</sub>).

Los valores mencionados anteriormente, tanto de purificación como de rendimiento, se fundamentan en la cuantificación del virus aftoso por la determinación de su capacidad de formar placas. Es sabido que durante los procesos de purificación, las partículas virales pierden en parte su poder infeccioso, por lo que los valores obtenidos son valores mínimos ya que hay partículas virales no infecciosas que a pesar de ello conservan sus propiedades físico-químicas.

La purificación determinada en función de los valores de fijación de complementos frente a distintas cepas del virus aftoso (Tabla 24), indicó un índice de purificación aproximadamente 8 veces menor que el obtenido al considerar infecciosidad.

Este resultado confirma observaciones anteriores, según las cuales en el material original hay gran cantidad de unidades morfológicas o partículas de 12 nm y proteínas intracelulares específicas del virus con capacidad de dar reacciones de fijación de complemento positivas aunque no sean infecciosas. Tales antígenos serían eliminados durante el proceso de purificación.

Por otra parte, se corroboró mediante las reacciones de fijación de complemento, que la purificación por el método propuesto era aproximadamente el doble de la obtenida por el método de Bachrach, lo que era previsible debido a que los procesos de desproteínización son los mismos en ambos métodos.

Durante el proceso de purificación se aislaron diversas fracciones de diferente coeficiente de sedimentación y/o densidad. De ellas, la fracción  $A'_2$  (fig. 7b) se mostró homogénea y sin impurezas al microscopio electrónico (fig. 22). El valor de su coeficiente de sedimentación (210S) indicaría de acuerdo con Markham (178), que dicha fracción está constituida por partículas virales agregadas en forma de dímeros. La posibilidad de ser un artefacto del método de purificación, debido al tratamiento con solventes orgánicos y/o centrifugación en gradientes de cloruro de cesio, se puede descartar ya que por el reemplazo del primer tratamiento, por precipitación con polietilenglicol (inciso  $a_2$ ), y el segundotratamiento, por cromatografía en gel de Sepharosa 2 B (inciso  $C_2$ ); el material así tratado, luego de centrifugado en un gradiente de sacarosa en las mismas condiciones que en el inciso  $d_2$ , mostró una curva de infecciosidad y D.O. semejante a la de la figura 7b.

La caracterización físicoquímica del dímero ( $A'_2$ ) en comparación con el monómero ( $A'_3$ ), mostró que ambos poseían la misma composición química y densidad, difiriendo solamente en su coeficiente de sedimentación (sección F).

Sin embargo, la caracterización biológica mostró que la infecciosidad, y las propiedades serológicas eran diferentes (incisos  $f_2$  y  $f_7$ ). La formación de agregados de partículas virales, produjo una disminución en la infectividad y modificó la estructura de las mismas de manera tal que el comportamiento frente a distintos subtipos del virus aftoso fuese diferente. Mientras que el virus purificado monodisperso, se comportaba en reacciones de fijación de complemento como subtipo  $A_{25}$  (igual que el virus original), el dímero lo hacía

inespecíficamente frente a los antisueros A<sub>24</sub> y A<sub>25</sub> (Tabla 29). Dicho comportamiento no fué específico del tipo A del virus aftoso, ya que resultados semejantes se obtuvieron con el tipo C (Tabla 31) y el tipo O (resultados no publicados).

Lo antedicho, implica que en preparaciones crudas de virus, hay que tener en cuenta que el estado de agregación, así como la proporción de partículas agregadas y no agregadas, influyen las determinaciones de infecciosidad y caracterización serológicas de tales preparaciones.

De la misma manera se ven afectadas las preparaciones de virus, en las que, por efecto de condiciones de mantenimiento inadecuadas o de conservación a baja temperatura durante períodos de tiempo prolongados, se altere la estabilidad del mismo, produciendo la ruptura parcial o total del virión en sus unidades morfológicas, ya que éstas no poseen especificidad de subtipo en las reacciones de fijación de complemento.

Se realizaron diversos ensayos con el objeto de analizar los posibles factores que pueden afectar el estado de agregación del virus.

Los factores relacionados con el tampón en que está disuelto el virus, que pueden aumentar el estado de agregación y a la vez la estabilidad del virus, son: la presencia de cationes bivalentes, alta fuerza iónica, alto pH, etc.; mientras que favorecen la desagregación: tampones de HEPES o citrato, baja fuerza iónica, bajo pH, etc. (resultados no publicados).

La obtención de virus aftoso purificado, cultivado según el método de Frenkel, permitió el estudio estructural (97) e inmunológico del mismo, así como el aislamiento de fracciones de virus purificadas, que difieren en su densidad y que poseen muy baja infectividad específica, las que actualmente se están estudiando en cuanto a su poder de interferencia con la multiplicación del virus normal.

CAPITULO VBIBLIOGRAFIA

1. Fracastorius, H.; Bl. 1, Cap. 12 (Venecia 1546).
2. Loeffler, F., Frosch, P.; Zentr. Bacteriol. Parasit. Abt. 1, Orig.: 22, 257-59 (1897)
3. Sci. Rev. U.S. Agricult. Dept.: 11, 3 (1971).
4. Shehan, M.S.; Ann. N.Y. Acad. Sci., 101, 444-54 (1962)
5. Hedger, R.S.; J. Comp. Pathol.; 82, 19-28 (1972)
6. Graves, J. M., Mc Vicar, J., Suttmöller, P., Trautman, R.; J. Infect. Dis.: 123, 336-91 (1971)
7. Scott, F.W., Cottral, G.E., Gallinas, P.; Ann. J. Vet. Res. 27, 1531-3 (1966).
8. van Bekkum, J.G. Frenkel, H.S., Fredericks, H.H.J., Frenkel, S.; Tijdschr. Diergeneesk., 84, 1159-64 (1959)
9. Burrows, R.; Rept. Mtg. Res. Group Standing Tech. Comm. European Commis. Control FMD, FAO, Roma, Italia, 143-54 (1966)
10. Burrows, R.; J. Hyg.: 64, 81-90 (1966)
11. van Bekkum, P., Mc Vicar, J., Cottral, G.; Arch. Ges. Virusforsch.: 23, 227-35 (1968).
12. Suttmöller, P., McVicar, J.W., Cottral, G.E.; Proc. U.S. Liverstock Sanit. Assoc. (Trabajo presentado en el Congreso de Phoenix, Arizona (1967))
13. Suttmöller, P., McVicar, J. W., Cottral, G.E.; Arch. ges. Virusforsch, 23 227-35 (1968)
14. Bachrach, H.L.,; Ann. Rev. Microbiol.; 22, 201-244 (1968)
15. McVicar, J. W., Suttmöller, P.; Arch. ges. Virusforsch. 26, 217-24 (1968)
16. "Conference on Foot-and Mouth Disease", Gustav Stern Foundation, Inc. 21-22 de mayo 1973, Nueva York, E.E.U.U.
17. von Magnus, P.; Adv. Virus Res.: 2, 59-79 (1954)
18. Palma, E.L., Huang, A.; J. Infect. Dis.: 129 (4), 402-10 (1974)
19. Fagg, R.H., Hiepp, N. St. G.; J. Hyg.: 64, 393-404 (1966)
20. Pringle, C.R.; Bull. Office Intern. Epizoot., 61,: 619-28. (1964)
21. Rottgardt, A.A., Ezerra, R., Inf. Dircc. Patol. Animal, M.A.G.F. 717-20 (1947)
22. Hawrzkiewicz, J., Sampaio, G.J., Brown, F.; Arch. ges. Virusforsch.: 25, 337-51 (1968)
23. Tyrrel, D.A.J., ~~Shope~~ R.E.; Science, 141, 152-3 (1963)



24. Burki, F.; Arch. ges. Virusforsch.: 15, 690-6 (1965)
25. Wildy, P.; Classification and Nomenclature of Viruses. Monographs in Virology. Karger:Basel.
26. Newman, J.F.E., Rowlands, D.J., Brown, F.; J. Gen. Virol.:18, 171-80 (1973)
27. Waldmann, O., Kober, K.; Berlin. tierarztl. Wochschr.: 22, 317-20 (1938)
28. Skinner, H.H.; Nature: 169, 794-5 (1952)
29. Guillopie, J. H.; Cornell Vet.: 44, 425-33 (1954).
30. Skinner, H.H.; Nature, 174, 1052-3 (1954)
31. Mackowiak, C., Fontaine, J., Ferré, J., Stellman, C., Roumiantzoff, M., Petermann, H.G.; Rept. Mtg. Res. Group Standing Tech. Comm., European Commis. control FMD, FAO, Roma, Italia 65-105 (1965)
32. Paraf, A., Asso, J., Verge, J.; Comp. R. Acad. Sci.: 246, 3698-3701 (1958)
33. Cunha, R.G., Eichhorn, E.A.; Am. J. Vet. Res.: 20, 133-7 (1959)
34. Mayo, J., Lombardo, J. H., Smolko, E.E., Segura, M., Rivenson, S; Rev. Invest. Agrop. INTA: 3 (6), 57-69 (1966)
35. Rivenson, S., Lombardo, J. H., Smolko, E.E., Mayo, J.; Rev. Invest. Agrop. INTA: 4 (10) 129-44 (1967)
36. Hecko, F.; Zentr. Bakteriolog. Parasitenk. Abt. 1, Orig.: 116, 384-414 (1930)
37. Maitland, M.C., Maitland, H.B.; J. Comp. Pathol. Therap.: 44, 106-13 (1931)
38. Frenkel, H.S.; Bull. Office Intern. Epizoot.: 28, 155-62 (1947)
39. Frenkel, H.S.; Am. J. Vet. Res.: 12 187-90 (1951)
40. Sollers, R.F.; Nature: 176, 547-49 (1955)
41. Bachrach, H.L., Hess, W.R., Callis, J.J.; Science: 122, 1269-70 (1955)
42. Ubertini, B., Nardelli, L., Panina, G.; J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng.: 2, 327-38 (1960)
43. Ubortini, B., Nardelli, L., Dal Patro, A., Panina, G., Santero, G.; Zent. Veterinärmed.: 10, 93-101 (1963)
44. Leunen, J., Strobbo, R., Mamerickx, M.; Bull. Office Int. Epizoot.:57, 615-17 (1962)

45. Rivenson, S., Segura, M.; *Rev. Invest. Ganad.*: 18, 293-9 (1963)
46. Polatnick, J., Bachrach, H. L.; *Appl. Microbiol.*: 12, 368-73 (1964)
47. MacPherson, I.A., Stoker, M.; *Virology*: 16, 147 (1962)
48. Mowat, G.F., Chapman, W.G.; *Nature*: 194, 253-5 (1962)
49. Capstick, P.B., Telling, R.C., Chapman, W.G., Stewart, D.L; *Nature*: 195, 1163-64 (1962)
50. Salajov, E.L.; *Bull. Off. Int. Epizoot.*: 77, 935-40 (1972)
51. Skinner, H.H.; *Bull. Off. Int. Epizoot.*: 53, 634-50 (1960)
52. Komarov, A.; *Bull. Res. Counc. Israel, Sect. E.*: 6E, 184-8 (1957)
53. Seibold, H.R., Cottrel, G.E., Patty, R.E., Gailunas, P.; *Am. J. Vet. Res.* 25, 806-14 (1964)
54. Seibold, H.R.; *Am. J. Vet. Res.*: 30, 591-603 (1969)
55. Diderholm, H., Dinter, Z., Philipson, L.; *Arch. Ges. Virusforsch.*: 20 246-50 (1967)
56. Mowat, G.N., Barr, D.A., Bennett, J.H.; *Archiv. Ges. Virusforsch.*: 26, 341-54 (1969)
57. Bachrach, H.L., Trautman, R., Broese, S.S., *Am. J. Vet. Res.*: 25, 333-42 (1964)
58. Dulbecco, R.; *Proc. Nat. Acad. Sci.*: 38, 747-52 (1952)
59. Cooper, P.D.; *Advan. Virus. Res.*: 8, 319 (1961)
60. Sellers, R.F.; *Proc. Roy. Soc. Med.*: 50, 915 (1957)
61. Sellers, R.F., Stewart, D.L.; *Arch. Ges. Virusforsch.*: 9, 594 (1959)
62. Sellers, R.F., Burt, L.M., uming, A., Stewart, D.L.; *Arch. Ges. Virusrosch*, 9, 637-46 (1959)
63. Bachrach, H.L., Callis, J.J., Hoss, .R., Patty, R.E.; *Virology*: 4, 224 (1957)
64. Khara, K.S., Maurin, J.; *Ann. Inst. Pasteur*: 95, 557 (1958)
65. Dinter, Z., Sibalín, M.; *Arch. Ges. Virusforsch.*: 8, 385-96 (1958)
66. Warrington, R.E.; *Appl. Microbiol.*: 23, 98-103 (1972)
67. Vallée, H., Carró, M.; *Compt. Rend. Acad. Sci.* 174, 1498-1500 (1922)
68. Waldmann, O., Traßwein, K; *Berlin. tierarztl. Wochschr.*: 42, 569-71(1926)
69. Research Institute, Pirbright, Surrey, Inglaterra; Report for the years 1937-1953 (W. Hoffer Sons Ltd., Cambridge, Inglaterra)•



70. Research Institute, Pirbright, Surrey, Inglaterra. Idem anterior, 1954-55.
71. Brooksby, J.B.; *Advanc. Virus Res.*: 5, 1-37 (1958)
72. Civea, A.; *J. Hyg.*: 28, 325-39 (1929)
73. Brooksby, J.B.; *Spec. Rep. Ser. Agric. Res. Coun. (Londres) No.12*, H.M. S.O. (1952)
74. Cowan, K.M., Trautman, R.; *J. Immun.*: 99, 729-36 (1967)
75. Hirtz, J.; *Arch. Ges. Virusforsch.*: 6, 124 (1955)
76. Mathoka, H.D., Geiss, E.; *Arch. Ges. Virusforsch.*: 15, 327 (1965)
77. Pringle, C.R.; *J. Gen. Virol.*: 4, 451-5 (1969)
78. Dietzschold, B., Kaaden, O.R., Tokui, T., Bohn, H.O.; *J. Gen. Virol.*: 13, 1 (1971)
79. Dietzschold, B., Kaaden, O.R., Ahl, R.; *J. Gen. Virol.*: 15, 171-4 (1972)
80. Bradish, C.J., Brooksby, J.B., Tsubahara, H.; *J. Gen. Microbiol.*: 22, 392-404 (1960)
81. Bradish, C.J., Brooksby, J.B.; *J. Gen. Microbiol.*: 22, 405-415 (1960)
82. Bradish, C. J., Jowett, R., Kirkham, J.B.; *J. Gen. Microbiol.*: 35, 27-51 (1964)
83. Roumiantzoff, M., Fayet, M.T.; *Ann. Inst. Pasteur*: 116, 833-851 (1969)
84. Brown, F., Erick, J.; *Virology*: 5, 133-44 (1958)
85. Graves, J. H., Cowan, K.M., Trautman, R.; *Virology*: 34, 269-274 (1968)
86. Cowan, K.M., Graves, J. H.; *Fed. Proc.*: 25, 615 (1966)
87. Cowan, K.M., Graves, J. H.; *Virology*: 30, 528-40 (1966)
88. Breese, S.S.; *J. Gen. Virol.*: 2, 465-8 (1968)
89. Breese, S.S.; *J. Gen. Virol.*: 4, 343-6 (1969)
90. Talbot, P., Rowlands, D.J., Burroughs, J.N., Sengar, D. V., Brown, F.; *J. Gen. Virol.*: 19, 369-80 (1973)
91. Planterose, D.N., Ryan, J.R.C.; *Virology*: 26, 372-4 (1965)
92. Cowan, K.M.; *J. Immunol.*: 97, 647-53 (1966)
93. Brown, F., Snale, G.J.; *J. Gen. Virol.*: 7, 115-127 (1970)
94. Rowlands, D.J., Sengar, D.V., Brown, F.; *J. Gen. Virol.*: 13, 85-93 (1971)
95. Polatnick, J.; *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*: 103, 27-31 (1960)
96. Trautman, R., Savan, M., Breese, S.S.; *J. Am. Chem. Soc.*: 81, 4040-4 (1959)
97. Vasquez, C., Palma, E.L., Barrantes, F.J.; *J. Microsc.*: 14, 147-54 (1972)

98. Rowlands, M.J., Cartwright, B., Brown, F.; J. Gen. Virol. : 4, 479-87 (1969).
99. Van Oss, C.J., Dhennin, L., Dhennin, L.; Virology: 22, 428-31 (1964).
100. Brown, F., Cartwright, B. ; Nature: 192, 1163 (1961).
101. Polatnick, J., Arlinghaus, R.B.; Virology: 31, 601-8 (1967).
102. Polatnick, J. , Arlinghaus, R.B., Graves, J. H., Cowan, K. M.; Virology: 31, 609-15 (1967).
103. Mc Vicar, J. , Sutmoller, P.; Am. J. Epidem. : 92, 273-8 (1970).
104. Traub, E., Shafy, A., Kesting, F., Ewaldsson, B.; Bull. Off. Int. Epizoot.: 65, 2035-50 (1966).
105. Cowan, K. M., Graves, J. H.; Virology: 34, 544-8 (1968).
106. Kaaden, O.R., Dietzschold, B., Matheka, H.D., Tokui, T.: Arch. Ges. Virusforsch.: 35, 104-13 (1971).
107. Vande Woude, G.F.; Virology: 31, 436-41 (1967).
108. Matheka, H.D., Bachrach, H.L., Trautman, R.; Z. Naturforsch.: 21b, 774-82 (1966).
109. Bachrach, H.L., Patty, R.E., Pledger, R.A.; Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 103, 540-3 (1960).
110. Bachrach, H. L., Breese, S.S., Callis, J.J., Hess, W.R., Patty, R.E.; Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.: 95, 147-52 (1957).
111. Ahl, R.; Arch. Ges. Virusforsch.: 21, 217-33 (1967).
112. Bachrach, H.L.; Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. : 107, 610-3 (1961).
113. Storz, H.; Zentr. Veterinaermed.: 5, 405-30 (1958).
114. Bachrach, H.L.; Progr. Med. Virol. : 8, 214-313 (1966).
115. Wesslein, T., Dinter, Z.; Arch. Ges. Virusforsch. : 7, 394-402 (1957).
116. Graves, J.H.; Am. J. Vet. Res.: 24, 1131-6 (1963).
117. Savan, M.; Am. J. Vet. Res. : 16, 158-9 (1955).
118. Tessler, J., Fellowes, O.N.; Am. J. Vet. Res.: 22, 779-82 (1961).
119. McKercher, P.D., Giordano, A.R.; Arch. Ges. Virusforsch.: 20, 39-53 (1967).
120. Fellowes, O.N.; J. Immunol. : 95, 1100-6 (1966).
121. Pyl, G.; Exptl. Veterinaermed.: 5, 1-5 (1951).
122. Brown, F., Hyslop, N., Crick, J., Morrow, A.; J. Hyg.: 61, 337-44 (1963).
123. Rivenson, S., Zuloaga, G.G.; Bull. Off. Int. Epizoot.: 61, 1123-42 (1964).
124. Bachrach, H.L., Breese, S.S.; Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.: 97, 659-65 (1958).

125. Cartwright, S.F., Thorne, H.V.; J. Gen. Microbiol.: 20, 61-77 (1959)
126. Fellowes, O.N.; Appl. Microbiol.: 13, 694-7 (1965)
127. Kisch, A.L., Webb, P.A., Johnson, K.M.; Am. J. Hyg.: 79, 125-33 (1964)
128. Brown, F., Cartwright, B., Stewart, D.L.; J. Gen. Microbiol.: 31, 179-86 (1963)
129. Wild, T.F., Brown, F.; J. Gen. Virol.: 1, 247-50 (1967)
130. Johnson, C.D.; Nature: 207, 37-9 (1965)
131. Polatnick, J., Bachrach, H.L.; Arch. Ges. Virusforsch.: 23, 96-104 (1968)
132. Fellowes, O.N.; Appl. Microbiol.: 14, 86-91 (1966)
133. Bradish, G.C., Henderson, W.M., Kirkham, J.B.; J. Gen. Microbiol.: 22, 379-91 (1960).
134. Breese, S.S., Trautman, R., Bachrach, H.L.; Analit. Biochem.: 1, 307-16 (1960)
135. Trautman, R., Breese, S.S.; J. Gen. Microbiol.: 27, 231-9 (1962)
136. Brown, F., Wild, T.F.; Biochem. Biophys. Acta: 119, 301-8 (1966)
137. Liebermann, H.T., Gralner, H.; Acta Virol.: 12, 181-2 (1968)
138. Rowlands, D. J., Sangar, D.V., Brown, F.; J. Gen. Virol.: 13, 141-52, (1971)
139. Strohmaier, K., Mussgay, M.; Z. Naturforsch.: 14b, 171-3 (1959)
140. Arlinghaus, H.B., Polatnick, J., Vande Woude, G.F.; Virology; 30, 541-50 (1966)
141. Wild, T.F., Brown, F.; J. Gen. Virol.: 7, 1-11 (1970)
142. Reczko, E., Strohmaier, K.; J. Gen. Virol.: 7, 65-70 (1970)
143. Liebermann, H.T., Schultze, P.; Arch. Exp. Veterinarmed.: 25, 171 (1971)
144. Ohlbaum, A., Figueroa, F., Grado, C., Contreras, G.; J. Gen. Virol.: 6, 429-31 (1970)
145. Bachrach, H.L., Vande Woude, G.F.; Virology: 34, 282-9 (1968)
146. Bachrach, H.L., Polatnick, J.; Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.: 124, 465-9 (1967)
147. Vande Woude, G.F., Bachrach, H.L.; Arch. Ges. Virusforsch.: 23, 353-61 (1968)
148. Wild, T.F., Burroughs, J.N., Brown, F.; J. Gen. Virol.: 4, 313-320 (1969)
149. Laporte, J.; Bull. Off. Int. Epizoot.: 71, 47-55 (1969)
150. Vande Woude, G.F., Bachrach, H.L.; J. Virol.: 7, 250-9 (1971)

151. Burroughs, J.N., Rowlands, D.J., Sangar, D.V., Talbot, P., Brown, F.  
J. Gen. Virol.: 13, 73-84 (1971)
152. Talbot, P., Brown, F.: J. Gen. Virol.: 15, 163-70 (1972)
153. Laporte, J., Lenoir, G.; J. Gen. Virol.: 20, 161-88 (1973)
- 153a. Strohmeier, K.; Proc. 2nd Int. Congress. Virol. 1971. Ed. J. Melnick, et al.  
Basel:Karger (1972).
154. Broese, S.S., Trautman, R., Bachrach, H.L.; Science: 150, 1303-5 (1965)
155. Ruckert, R.R., Dunkert, R.R., Stoltzfus, C.M.; Proc. Nat. Acad. Sci.:  
62, 912-9 (1969)
156. Meddaps, F.C., McLean, C., Ruckert, R.R.; Virology: 44, 259-70 (1971)
157. Dunker, A.K., Ruckert, R.R.; J. Mol. Biol.: 58, 217-35 (1971)
158. Baltimore, D., Girard, M., Darnell, J.E.; Virology: 29, 179 (1966)
159. Brown, F., Cartwright, B., Stewart, D.L.; Biochim. Biophys. Acta: 55,  
768-74 (1962)
160. Thorne, H.V.; J. Bacteriol.: 84, 929-42 (1962)
161. Polatnick, J., Bachrach, H.L.; Virology: 12, 450-62 (1960)
162. Pledger, R.A.; Virology: 13, 366-7 (1961)
163. Brown, F., Cartwright, B.; Nature: 204, 855-6 (1964)
164. Arlinghaus, R.B., Kaczmarezyk, W., Polatnick, J.; J. Virol.: 4, 712-8  
(1969)
165. Arlinghaus, R.B., Polatnick, J.; Science: 158, 1320-2 (1967)
166. Arlinghaus, R.B., Polatnick, J.; Virology: 37, 252-61 (1969)
167. Dietzschold, B., Ahl, R.; J. Gen. Virol.: 8, 73-6 (1970)
168. Sakaihi, M., Choay, J., Demain, L., Demain, L.; Comp. Rend. Acad. Sci.:  
275, 275-7 (1972)
169. Brown, F., Martin, S.J., Underwood, B.; Biochim. Biophys. Acta: 123,  
166-7 (1966)
170. Ascione, R., Vande Woude, G.F.; J. Virol.: 4, 727-37 (1969)
171. Vande Woude, G.F., Arlinghaus, R.B., Polatnick, J.; Biochim. Biophys.  
Res. Comm.: 29, 483-9 (1967)
172. Petermann, H.G.; Zbl. Bakt. I. Orig.: 153, 63-6 (1959)

173. Joubert, J., Mackowiak, C.; *Exp. Sci. Franc.*: 3, 380 (1968)
174. Brown, F., Cartwright, B.; *Nature*: 199, 1168-70 (1963)
175. Bonhoeffer, F., Schachman, H.K.; *Biochim. Biophys. Res. Comm.*: 2, 366-71 (1960)
176. Davis, B. J.; *Ann. Rev. Acad. Sci.*: 121, 404 (1964)
177. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.T.; *J. Biol. Chem.* 193, 265-75 (1951)
178. Markham, R.; *Adv. Virus Res.*: 2, 241 (1962)