

Tesis de Posgrado

Respuesta inmune a antígenos no capsidales del virus de la fiebre aftosa

Massouh, Ernesto Jorge

1982

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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Massouh, Ernesto Jorge. (1982). Respuesta inmune a antígenos no capsidales del virus de la fiebre aftosa. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1697_Massouh.pdf

Cita tipo Chicago:

Massouh, Ernesto Jorge. "Respuesta inmune a antígenos no capsidales del virus de la fiebre aftosa". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1982. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1697_Massouh.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

RESPUESTA INMUNE A ANTIGENOS
NO CAPSIDALES DEL
VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA

AUTOR: Lic. ERNESTO JORGE MASSOUH.

DIRECTOR: Dra. ANA MARIA F. BRUNENGO.

LUGAR DE TRABAJO: CATEDRA DE INMUNOQUIMICA.

DEPARTAMENTO DE QUIMICA BIOLOGICA.

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO
DE DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

- A mi madre.

- A la memoria
de mi padre.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ana María F. Brunengo por haberme iniciado en la investigación científica y por su constante apoyo en la realización de éste trabajo.

A mis compañeros de laboratorio Dra. Ana María Díaz Primerano, Lidios. Graciela B. Rojas, Jorge L. Ubogui, Carlos A. Pujol, Analía Pérez y Juan M. Fló Díaz y Sr. Martín Rottenberg por su estímulo y colaboración.

Al Sr. Guillermo Assad Ferek por su apoyo y colaboración prestada.

Al personal de las Cátedras de Microbiología e Inmunología, Virología e Introducción a la Botánica por la colaboración prestada.

A la Dra. Celia E. Coto de Ravaschino y al Dr. Osvaldo A. Peso por su constante estímulo.

A los Laboratorios Estrella-Merieux, Paul S.A., Servicio Nacional de Laboratorios y Centro Panamericano de Fiebre Aftosa por la colaboración prestada.

La Sra. Lilibiana Inés Vázquez por la tarea dactilográfica prestada.

A mi madre y hermano por su colaboración, comprensión y estímulo.

INDICE

INTRODUCCION.

Reseña histórica.....	1.
Síntomas clínicos.....	2.
Distribución geográfica.....	2.
Perjuicio económico.....	3.
Transmisión.....	3.
Taxonomía.....	4.
Propiedades del virus de la fiebre aftosa.....	7.
Cultivos utilizados por aftovirus.....	11.
Sistemas de multiplicación utilizados por aftovirus.....	13.
Síntesis de proteínas en células infectadas.....	15.
Tipos serológicos, vacunas, variación antigénica.....	19.
Antígenos y anticuerpos.....	22.

<u>OBJETIVOS</u>	32.
------------------------	-----

MATERIALES Y METODOS.

Medios de cultivo.....	35.
Cultivos celulares.....	39.

Virus.....	39.
Obtención de antígenos a diferentes tiempos post infección en cultivos de células BHK ₂₁	44.
Obtención de antisueros.....	46.
Obtención de sueros bovinos.....	51.
Seroprotección en ratones lactantes.....	53.
Inmunodifusión.....	55.
Inmunofluorescencia.....	56.
Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	59.
Precipitación inmune.....	61.
Inmunoelectroforesis de precipitados inmunes.....	62.
Técnicas empleando isótopos radiactivos.....	63.
Determinación de proteínas.....	66.

RESULTADOS.

Preparación de stocks de virus y determinación de la infectividad.....	67.
Elección de la multiplicidad de infección.....	67.
Concentración de virus con P.E.G.....	70.
Estudios sobre los antígenos preparados en células BHK ₂₁ infectadas con aftovirus C ₂	72.

Estudio sobre los sueros hiperinmunes en cobayos anti aftovirus C ₂	116.
Estudio sobre los antisueros producidos en conejos contra células BHK ₂₁ cosechadas a diferentes tiempos post infección.....	123.
Estudio sobre los sueros de bovinos vacunados e infectados con aftovirus.....	128.
Electroforesis en gel de poliacrilamida de precipitados inmunes.....	166.
DISCUSION.....	205.
RESUMEN.....	228.
BIBLIOGRAFIA.....	236.

ABREVIATURAS

VP	: proteínas capsidales del virus.
NCVP	: proteínas no capsidales del virus.
VFA	: virus de la fiebre aftosa.
FMDV	: foot and mouth disease virus.
BHK	: riñón de hamster lactante.
VIA:	: antígeno asociado a la infección viral.
S	: Svedberg.
As	: antisuero.
Ac	: anticuerpo.
Ag	: antígeno.
IgG	: inmunoglobulina G.
IgM	: inmunoglobulina M.
Ig	: inmunoglobulina.
p.i.	: post infección.
p.v.	: post vacunación.
DICT ₅₀	: dosis infectiva 50% para cultivos de tejidos.
UFP	: unidades formadoras de placas.
PEG	: polietilenglicol.
PBS	: solución reguladora de fosfatos 0,01 M pH 7,0.

i.m. : inoculación intramuscular.
i.d.p. : inoculación intradermoplantal.
s.c. : inoculación subcutánea.
c.p.m. : cuentas por minuto.
D.O. : densidad óptica.
DI₅₀ : dosis infectiva 50%.
I.P.R. : índice de seroprotección.
IN₈₀ : índice de neutralización por reducción del 80%.
S.F. : solución fisiológica.
U.V. : ultravioleta.
S.D.S. : dodecilsulfato de sodio.
g. : aceleración de la gravedad.
cm. : centímetro.
col. : colaboradores.
H : cadena pesada de inmunoglobulina.
L : cadena liviana de inmunoglobulina.
°C : grados centígrados.
gr. : gramo.
hs. : horas.
kg. : kilogramo.

l. : litro.
ml. : mililitro.
uCi : microcurie.
ugr. : microgramo.
mg. : miligramo.
mm. : milímetro.
ngr. : nanogramo.
P.M. : peso molecular.
ARN : ácido ribonucleico.
ME : medio para repiques de células BHK.
MC : medio de congelamiento de células BHK.
MT : medio para titulación de virus.
T₀ : células BHK cosechadas a los 60 minutos p.i.
T₁ : células BHK cosechadas a los 65 minutos p.i.
T₂ : células BHK cosechadas a los 75 minutos p.i.
T₃ : células BHK cosechadas a los 90 minutos p.i.
T₄ : células BHK cosechadas a los 120 minutos p.i.
T₅ : células BHK cosechadas a los 210 minutos p.i.

INTRODUCCION.

1.- RESEÑA HISTORICA.

La enfermedad causada por el virus de la fiebre aftosa se conoce desde hace mucho tiempo. Ya en 1514 en Venecia, Fracastorius (62) describió el brote de una enfermedad por la cual los animales no se alimentaban y el interior de sus bocas se encontraba enrojecido y con pequeñas vesículas que luego descendían a las patas. La mayor parte de los animales se recuperaron. Esta descripción tiene gran semejanza con las características que hoy definen a la fiebre aftosa.

En 1897 Loeffler y Frosch demostraron la etiología viral de la enfermedad (86). La fiebre aftosa afecta a animales herbívoros biungulados (bovinos, ovinos, porcinos, etc) y es muy temida por su amplia distribución, gran contagiosidad y perjuicio económico al afectar al ganado doméstico. Los mayores daños son provocados en bovinos y porcinos y la mortalidad es baja, del orden del 5% en bovinos pero puede alcanzar el 50% cuando el virus invade el músculo cardíaco, hecho que ocurre frecuentemente en animales jóvenes (28).

2.- SINTOMAS CLINICOS.

La enfermedad se caracteriza por la formación de vesículas en las membranas mucosas de la boca, nariz y piel entre las pezuñas y en el borde superior de éstas (125,131).

En vacas lecheras, o que amamantan, las vesículas pueden aparecer también sobre las ubres y pezones y en las necropsias se observan lesiones en el rumen y en el corazón. El dolor en la boca impide la alimentación de los animales, y las lesiones en las patas, usualmente invadidas por bacterias, provocan cojera (9).

3.- DISTRIBUCIÓN GEOGRAFICA.

Casi todos los países del mundo, con excepción de Nueva Guinea y Nueva Zelandia poseen la enfermedad. Se produjo un solo brote en Australia y no se sabe de nuevos brotes en Japón desde 1908, ni en los últimos años en Escandinavia ó Finlandia (81).

La enfermedad es endémica en Europa Continental, Asia, Africa y América del Sur; actualmente Australia, Nueva Zelandia, U.S.A. y Canadá se encuentran libres de ella.

En nuestro país existen zonas libres de fiebre aftosa en la Patagonia.

4.- PERJUICIO ECONOMICO.

La enfermedad obstaculiza el comercio e influye en el precio de casi todos los productos de origen animal colocados en el mercado mundial. Los mayores trastornos económicos se deben al problema en el comercio normal de importación y exportación de animales, materias de origen animal y otros productos agrícolas ya que los países libres de la enfermedad imponen medidas restrictivas estrictas (11, 35).

5.- TRANSMISION.

Se realiza primariamente por virus diseminado de animales infectados. En la fase febril de la enfermedad, el virus se encuentra en sangre y en todos los órganos, además de secreciones y excreciones (9, 32). La diseminación ocurre principalmente por saliva (75) y por las lesiones en las patas de los animales. No se identificaron insectos vectores de la enfermedad. También se propaga la infección por el virus que permanece durante largo tiempo en sangre seca, reses

muestras y objetos diversos (tierra, madera, ropas, etc.) Es considerada de importancia la diseminación a través de barcos, pájaros, equipos agrícolas, etc. así como la transmisión aérea en zonas con animales infectados (129, 130).

6.- TAXONOMIA.

El virus de la fiebre aftosa pertenece a la familia Picornaviridae, que históricamente se refiere a virus pequeños conteniendo ARN. (45, 95). Componen la familia cuatro géneros: Enterovirus, Cardiovirus, Rinovirus, y Aftovirus cuyas diferencias fundamentales se deben a la sensibilidad a pH ácido, densidad de flotación en ClCs y manifestaciones clínicas de huéspedes infectados.

La descripción de la familia Picornaviridae incluye una cápside sin envoltura, de simetría icosaédrica, resistente al éter y de 22-30 nm de diámetro.

La cápside se compone de varios polipéptidos distintos de PM variable. La partícula viral tiene una sola molécula lineal de ARN cuyo peso molecular es de $2,5 \times 10^6$ y de características infecciosas, actuando como mensajero.

La multiplicación viral ocurre en el citoplasma de la célula huésped.

El siguiente cuadro, tomando de Cooper y col. (45) ilustra sobre las propiedades de los cuatro géneros que componen la familia:

<u>PROPIEDAD</u>	<u>ENTEROVIRUS</u>	<u>CARDIOVIRUS</u>	<u>RINOVIRUS</u>	<u>AFTOVIRUS</u>
Miembros principales	polio, echo y coxsackie virus	grupo de vi rus de encefalo miocarditis	rinovirus animales y humanos	virus de la fiebre aftosa
Serotipos	> 70	1	> 110	7
Huéspedes principales	humanos, vertebrados	humanos, roedores, vertebrados	humanos, vertebrados	animales de pezuña hundida
Organos afectados	intestino	sistema nerviosos central, corazón	tracto respiratorio superior	generalizado.
Temperatura óptima de crecimiento	36-37°C	36-37°C	33-34°C	36-37°C
Diámetro del virión, nm	22-28	24-30	24-30	23-25
Infectividad del virión a pH 3	estable	estable	lábil	lábil
Infectividad del virión a pH 5-6	estable	lábil en haluros 0,1 M	lábil	lábil a baja fuerza iónica; estable a alta fuerza iónica.
Densidad del virión, en CsCl gs/cm ³	1,33-1,35; también 1,44	1,34; también 1,44	1,38-1,41	1,43-1,45
% ARN	29	31	30	31,5

7.- PROPIEDADES DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA.

Refiriendonos específicamente al virus de la fiebre aftosa se vió que presentaba características de la familia Picornaviridae y otras que le son propias.

El virión es resistente al eter y relativamente resistente a detergentes. Se inactiva por radiaciones ionizantes y luz ultra violeta. Se observó pérdida de infectividad con luz visible, en presencia de acridina y colorantes relacionados. Es sensible a formaldehído, hidroxilamina, agentes alquilantes en general y fenol. Algunas cepas son sensibles a proteasas (45).

Las características fundamentales del virión, proteínas y ácido nucléico de aftovirus se resumen en el siguiente cuadro

(11) :

Virión:

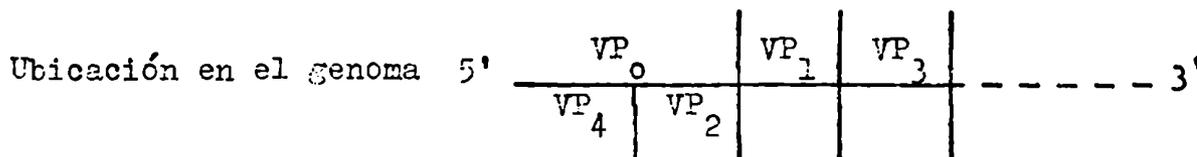
PM	$8,6 \times 10^6$ d
Coefficiente de sedimentación	140 S
Capsómeros	60
Forma	icosahédrica
Diámetro	23 nm
Densidad de flotación	$1,43 \text{ gs/cm}^3$

Composición ARN= 31%, Proteínas= 69%

Sensibilidad a pH < 6

Proteínas.

Cadenas	VP ₀	VP ₁	VP ₂	VP ₃	VP ₄	VP _g
Nº/virión	2	60	58	60	58	-
PM(x 10 ³ d)	40	34	30	26	8	5(según 121)
				14(según 27)		12(según 65)



ARN

PM/virión 2,6 x 10⁶ d

Cadenas/virión 1(simple)

Información mensajero.

Poli C interno 100 - 200 nucleótidos

Poli A en el extremo 3' 60 - 80 nucleótidos

Extremo 5' VPg (proteína unida covalentemente al ácido nucléico).

La información genética del virus es una pieza simple, lineal, de 8000 nucleótidos (69) que puede actuar como ARN mensajero, templado para su replicación ó encapsidarse en par-

tículas virales (122). Su extremo 3' es un fragmento de ácido poliadenílico (poli A), cuya longitud es aproximadamente de 40 a 100 nucleótidos (11, 65, 122) y cuya función es discutida respecto a su importancia en la infectividad del ácido nucléico (18, 122).

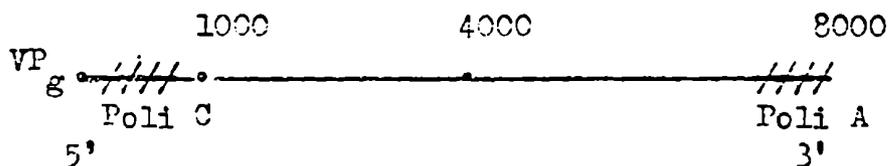
A una distancia aproximada de 400 nucleótidos del extremo 5', existe en aftovirus, virus de la encefalo miocarditis y mengo virus un fragmento policitidílico (poli C) de 100 a 200 nucleótidos de longitud (117) (65,122). Esta secuencia no se encontró en poliovirus (121). La función del poli C es aún desconocida, aunque se postuló que en su extremo 3' existiría el sitio principal de iniciación de síntesis proteica (69, 117, 123). También por estudios "in vitro", se piensa que la región poli C y el extremo 5' adyacente no se traduciría.

En contraste con la gran mayoría de los ARN mensajeros de células y virus, el extremo 5' del ARN de aftovirus, poliovirus y EMC, posee una pequeña proteína unida covalentemente al nucleótido terminal 5' denominada VP_G(121). La proteína tendría un peso molecular de 4000 (121), aunque por otras metodologías se indicó que sería de 12.000 (65). Se demostró que VP_G

poseía heterogeneidad, al resolverse en 2 componentes, ácido y básico (VPgA y VPgB), de igual peso molecular, sin dilucidarse aún si estas proteínas se codifican independientemente ó se generan por clivaje de un precursor comun (79).

La función de VPg en la replicación del virus se desconoce, pero se sugirió que no es necesaria para la transcripción (123, 66), aunque podría cumplir un rol en la morfogénesis viral (121,122)ó actuar como "primer" en la síntesis del ARN viral (66,121).

Un esquema del ARN de aftovirus sería:



El ARN del VFA, así como de otros picornavirus, replica por medio de una ARN polimerasa, ARN dependiente, encontrada en el citoplasma de células infectadas (5, 16, 111). La replicasa del VFA fue fraccionada en 2 complejos distintos de ácido nucléico y proteínas (6). Un componente, de 20-70 S sintetiza ARN doble cadena, mientras que el otro de 100 - 300 S sintetiza ARN viral cadena simple de 37 S. Se aisló una poli U polimerasa poli A dependiente, hábil para sintetizar la secuencia poli U de

la cadena complementaria del ARN viral (113).

Una actual revisión sobre estructura y genoma de picornavirus fué publicada por Kitamura y col. (80) y Putnak y Phillips (114).

8.- CULTIVOS UTILIZADOS POR AFTOVIRUS.

La infección de un cultivo celular con aftovirus se produce inicialmente en 2 fases diferenciadas que abarcan la adsorción y la penetración.

La adsorción requiere iones Ca^{++} y Mg^{++} (24), depende de la temperatura, necesitando una energía de activación de 6000 cal/mol (147,148), o sea que la unión está determinada por la frecuencia de colisión virus-células. A temperaturas entre 2°C y 4°C el virus permanece unido a los receptores celulares pero no penetra (24). A temperaturas más elevadas el virus fijado penetra en la célula mediante una reacción de primer orden, con una energía de activación de 24.000 cal/mol (9). A 37°C, en 3 minutos se infectan al 90% de las células y el tiempo de penetración es de 30 seg. A 20°C el tiempo medio es de 6 minutos y debajo de 15°C la penetración es casi nula (148). Se observó que el virus se une a células muertas (24). Estos hechos

indican que el proceso de penetración implica el englobamiento del virus adsorbido, seguido por su fragmentación en ARN y subunidades proteicas.

Se postuló un mecanismo de penetración por fagocitosis ya que se encontró virus penetrante asociado a membranas sedimentables a 15.000 g por 45' (37,40,105).

Cavanagh y colab. (43) indicaron que la secuencia de eventos que suceden a la infección celular sería en 3 etapas:

- 1) Unión irreversible del virus a la superficie celular sin aparente desestabilización de la cápside.
- 2) Espontánea elución de una pequeña proporción del virus asociado a un componente celular, sin aparente alteración de la composición polipeptídica de la partícula viral.
- 3) Rápida penetración en vacuolas y ruptura del virus en ácido nucléico y partícula 12 S.

En infecciones de alta multiplicidad, según Polatnick y Bachrach (109), el tiempo transcurrido entre adsorción y detección de progenie viral infectiva es de 100 a 110 minutos en cultivos de riñón bovino.

Luego de la penetración, el virus se encuentra asociado

a una fracción subcelular rica en lisosomas (37,105).

Según Barteling (17), la proteína capsidal por ellos denominada VP_1 jugaría un rol en la unión a células, hecho postulado por otros autores (45,114).

La síntesis de ARN viral ocurre en el citoplasma de la célula infectada (5). La liberación de virus se produce al cesar la fase logarítmica de producción de virus, siendo para algunos sistemas celulares de 150 minutos, aumentando hasta las 4,5 a 5 horas (9).

9.- SISTEMAS DE MULTIPLICACION UTILIZADOS PARA AFTOVIRUS.

El método de producción de virus "in vivo" más aceptado para la producción de vacunas fué el que utilizaba epitelio lingual bovino, previamente infectado (102,156).

El pasaje de virus a través de animales para producir vacunas a virus vivo atenuado, utilizó mayormente ratones lactantes, cobayos, embriones de pollo, etc (8).

El virus aftoso fué cultivado por primera vez "in vitro" en 1930 por Hecke (72) y en 1931 por Maitland y Maitland(91) utilizando embriones de cobayo.

El primero en producir virus "in vitro" en gran escala fué Frenkel (63), quien utilizó epitelio lingual bovino en sobrevivencia mantenido en suspensión. En 1955 Sellers (128) y Bachrach (7) demostraron que el virus producía efecto citopatogénico específico en monocapas de riñón bovino y porcino y utilizaron éste hecho para titular virus por formación de placas y diluciones límite. En 1960 Ubertini (150) utilizó cultivos primarios de riñón bovino para producir vacuna anti aftosa en escala industrial.

Se emplearon cultivos de riñón de hamster (99) y riñón de perro (126) para obtener virus atenuados.

En los últimos tiempos se desarrolló el cultivo de líneas estables de BHK₂₁^U₁₃ (98) en monocapas ó en suspensión (38) para producir virus en mayor escala. Estas células, junto con riñón bovino, porcino y cultivos primarios de células tiroideas bovinas (106) son las más utilizadas actualmente.

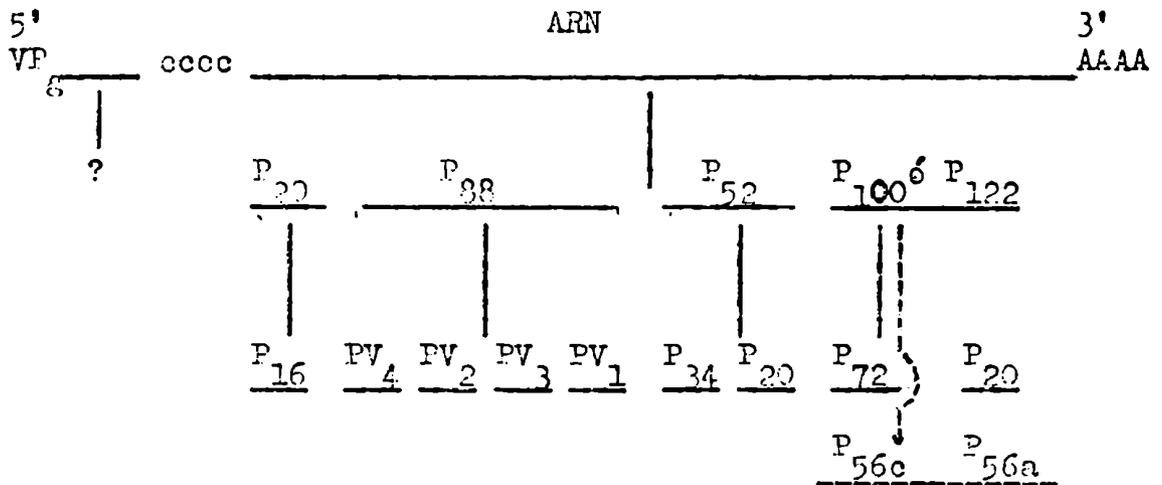
Los sistemas de cultivo de células BHK₂₁ se modificaron en el transcurso del tiempo para obtener mayor producción de virus utilizando frascos de Roux (150), frascos rotatorios (110) y ultimamente cultivos celulares en superficies de DEAE-Sepha-

x A₅₀ (140) ó esferas de vidrio (133).

10.- SINTESIS DE PROTEINAS EN CELULAS INFECTADAS.

El ARN de aftovirus posee sólo un sitio de iniciación de síntesis proteica que se localiza a unos cientos de nucleótidos del extremo 5' (122,123). Este hecho se comprobó usando metodologías de marcación con ³⁵S metionina del péptido iniciador y se encontró que el P₁₆ era el marcado en mayor proporción (122). Los ribosomas inician la síntesis proteica cerca del extremo 5' y atraviesan todo el genoma llegando al extremo 3'. Este mecanismo de síntesis proteica inicialmente produce una poliproteína de PM 240.000, lo cual está de acuerdo con la capacidad de codificación del genoma. Esta es usualmente clivada durante la traducción y es de difícil detección. Sin embargo se detectó la acumulación de tres ó cuatro polipéptidos que se producen por rupturas primarias y que se denominaron productos primarios (120,154). Estos son luego degradados, probablemente por proteasas codificadas por el virus, en proteínas capsidales (VP) y no capsidales (NCVP) que se encontraron en células infectadas (11).

La dilucidación de cuál parte del genoma codifica para determinados polipéptidos se realizó mediante el uso de la droga pactamicina, que inhibe la síntesis proteica sin afectar la elongación ni la terminación (85). Así, analizando por electroforesis en gel de poliacrilamida los polipéptidos que se producen, se determinó para algunos miembros de la familia Picornavirus el orden en el gen (34,120,137, 142) Un diagrama para V.F.A. sería: (122).



Los componentes precursores de las proteínas estructurales (PV₁₋₄) se sintetizan en la región del ARN cercana al extremo 5', aunque la primera región de éste final sintetiza un producto primario pequeño (P₂₀). El centro del genoma codifica

para una proteína de PM 52.000. La codificación de la región cercana a 3' no está muy bien definida y se evidenciaron rupturas alternativas (57). El polipéptido P₁₀₀ se cliva a una serie de intermediarios para producir P₇₂ ó P_{56a} y P_{56c} (71, 120). P_{56a} es un componente de la ARN polimerasa, ARN dependiente codificada por el virus en células infectadas, que resultó ser idéntica al antígeno VIA (asociado a la infección viral) descubierto por Cowan y Graves en 1966 (48). Polatnick y col. (112) y Newman y col. (100) determinaron ésta identidad.

Es probable que el polipéptido estable, producido por la región final 3' del genoma de todos los picornavirus tengan la misma función ya que el NCVP₄ encontrado en poliovirus también actúa como polimerasa (60,89,122).

Se encontraron aproximadamente 25 proteínas inducidas por virus en células infectadas y es probable que muchas de ellas posean roles vitales para la replicación viral. Podría correlacionarse determinadas proteínas con varias actividades que se describieron en células infectadas, hecho no logrado hasta el momento. (122).

La partícula viral está compuesta por las proteínas es-

estructurales VP_{1-4} , dos polipéptidos menores, encontrados por Sangar y col. (119) y denominados P_{40} y P_{52} y una ribonucleasa encontrada en viriones purificados, que actuaría como endonucleasa y se incorporaría al virión en el proceso de ensamble intracelular (53,54). Las partículas vacías naturales encontradas en aftovirus no poseen VP_2 y VP_4 aunque esto es discutido (118) y en cambio están constituidas por $VP_{0,1}$ y 3. Al incorporarse al ARN y clivarse VP_0 en VP_2 y VP_4 se completaría la estructura del virión (116).

El aftovirus es el único picornavirus en el cual el tratamiento con tripsina provoca la ruptura in situ de la proteína más expuesta (VP_3). Esta acción produce VP_{3a} y VP_{3b} (11), no altera la morfología pero si la antigenicidad (26,33). La infectividad del virus tratado con tripsina se pierde en un 99% para el tipo A pero en el tipo C no se ve alterada dicha propiedad (11).

Se encontró recientemente una actividad proteína kinasa en virus purificado, presente en una proteína localizada internamente cuyo origen podría ser viral ó del huésped. (67).

11.- TIPOS SEROLÓGICOS, VACUNAS, VARIACION ANTIGENICA.

La tipificación de virus aftoso se realiza principalmente por métodos serológicos, entre los cuales la fijación de complemento y la neutralización son los más utilizados (9).

El criterio de tipificación y subtipificación se basa en la detección por fijación de complemento de relaciones antigénicas recíprocas que se revelan por éste test; el cual posee buena correlación con otros ensayos serológicos y con reacciones cruzadas "in vivo". Para la comparación de cepas se utilizaron ultimamente ensayos nuevos como el radioinmunoanálisis y técnicas inmunoenzimáticas (50).

La clasificación y el criterio para diferenciaciones entre tipo y subtipo se puede encontrar en las revisiones realizadas por Brooksby en 1968 (29), Fontaine y col. en 1968 (61) y Pereira en 1977 (104).

Se conocen siete tipos serológicos del virus aftoso: los tipos clásicos A, O y C (Europeos), los tipos sudafricanos SAT₁, SAT₂ y SAT₃ y un tipo asiático denominado Asia₁; mientras que existen más de 60 subtipos, además de las cepas encontradas ultimamente (9).

La gran variabilidad antigénica hallada en aftovirus quedó evidenciada al encontrar los diferentes serotipos mencionados y aún se evidenció esa característica dentro de un mismo serotipo. La inmunidad contra un serotipo no confiere protección a la infección con otro serotipo de aftovirus. La preparación de vacunas tuvo en cuenta la variabilidad dentro de un mismo serotipo. El grado de diferenciación entre los distintos tipos es tal que, un animal recuperado de una infección con un serotipo es susceptible a los otros. Si el nivel de inmunización es bajo, lo que se observó en animales vacunados pero no en los recuperados de una infección, las diferencias entre virus de un mismo tipo serológico, hacen que no exista completa protección contra una cepa heteróloga.

La relación entre los ARN de los siete serotipos llevó a dividirlos en dos grupos: uno compuesto por los tipos europeos y asiático y el otro por los sudafricanos (27). Los test de hibridización de ARN mostraron homologías de 25-40% entre los 2 grupos y del 65% entre virus de un mismo grupo. La homología entre subtipos fué mayor del 75%.

Según Brown (27), los estudios sobre aftovirus respec-

to a variación antigénica revelaron que:

- 1) La mayor variación ocurría en la región estructural del genoma.
- 2) En el resto del genoma existe muy poca variación.
- 3) No existe variación en la región que codifica para la polimerasa.
- 4) La diferencia entre los dos grupos serotípicos mencionados debería tener significancia en la evolución.

Las vacunas a virus inactivado son las de mayor uso en diversos países. Se desarrollaron inicialmente por Schmidt-Waldman en 1936 y 1938 y posteriormente Frenkel (63) en 1947 reemplazó el uso de virus de lesiones de epitelio lingual bovino por cultivos "in vitro" de éste tejido. (9). Últimamente se utilizaron cultivos de diferentes tejidos (p. ej. BHK₂₁) para producción de virus.

La inactivación del virus se realizó con formol, pero la modificación antigénica que producía llevó a probar otras sustancias hoy en uso como acetyl etilén imina (AEI) ó etil etilónimina (EEI). Los adyuvantes más utilizados son el hidróxido de aluminio y saponina y últimamente los de tipo oleoso

como puede ser el adjuvante de Freund incompleto (108). En estudios realizados con adjuvante oleoso se comprobó la eficacia de éste método en bovinos en el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (Brasil) y en Senasa (Argentina) (1).

Las vacunas a virus vivo modificado no se utilizan en países exportadores de carne por los riesgos que podrían acarrear la presencia del agente causante de la enfermedad sin inactivar.

Ultimamente se han experimentado vacunas utilizando subunidades virales que protegieron los animales ensayados. Se utilizó principalmente el polipéptido VP₃ (sensible a tripsina) donde se encontraron dos regiones con actividad antigénica (12,14,68,141):una, la C terminal, entre los aminoácidos 201 y 213 y la otra entre las 138 y 154 de la secuencia proteínica.

Es de suponer que el uso de la ingeniería genética perfeccionará la producción de vacunas antiaftosa.

12.- ANTIGENOS Y ANTICUERPOS.

En células infectadas con aftovirus se producen tres partículas antigénicas específicas de tipo (9, 27), a saber:

- a) partícula infecciosa 140 S.
- b) partículas vacías 75 S, que tienen igual tamaño que la completa pero no poseen ácido nucleico.
- c) Subunidad proteica 12 S, que consiste en trímeros de VP₁₋₃.

Además se produce una gran cantidad de antígeno asociado a la infección viral (VIA), descrito por Cowan y Graves en 1966 (48), que reacciona igualmente con sueros homo y heterotípicos y es la polimerasa del ARN, dependiente de ARN(100, 112) ya que el antígeno obtenido de cultivos y de la polimerasa purificada del complejo replicativo tienen igual PM (56.000) y el mapa de peptidos trípticos del Ag VIA y P_{56a} son idénticos (27).

La revisión realizada por Keith M. Cowan en 1973 (49) condensó los progresos realizados en antígenos y su respuesta inmune para aftovirus. Por estudios de inmunodifusión de líquidos sobrenadantes concentrados de células BHK infectadas, enfrentados a sueros de animales convalescientes ó a fluidos del animal infectado, se producian tres bandas de precipitación, correspondientes al virión (140 S), a la subunidad 12 S obtenida también por tratamiento ácido del virus y al Ag VIA.

Las partículas 140 y 12 S poseen determinantes antigénicos comunes pero cada una tiene sitios antigénicos distintos.

En las partículas 12 S, los sitios expuestos de VP_3 son los más específicos de tipo, existiendo una dominancia inmunológica de ellos sobre los Acs de reacción cruzada (en VP_2 y VP_1) (97).

El modelo del virus propuesto por Talbot y Brown(138) en 1972, indicó que estaba compuesto por 60 subunidades, cada una conteniendo una molécula de $VP_{1, 2}$ y 3° . Trímeros de éstas subunidades formaban la partícula 12 S, las cuales representaban las veinte caras triangulares de la estructura icosaédrica del virus. El VP_4 se localizó en la unión de dichas caras, y VP_3 en los vértices del icosaedro, relacionándolo con la adsorción del virus a células susceptibles y como sitio primario de unión de Acs neutralizantes.

La existencia de sitios determinantes específicos en la partícula 12 S se comprobó por la producción de Ac por éste Ag que no reaccionan completamente con el 140 S. Dicho sitio no existiría en la superficie del virión intacto, sino enmascarado en él (criptotopo) ó se produciría como resultado del

cambio conformacional de la subunidad 12 S luego de la degradación de la partícula viral (neotope) (49). La conformación de VP_3 en la subunidad 12 S sería distinta que en el virión intacto, ya que la inmunización de animales con la partícula 12 S produce poco Ac reactivo con ella, habiéndose obtenido además con VP_3 buenos resultados en respuesta de Ac neutralizantes del virus (10,12,13, 78). Podría suceder que, el determinante en 140 S sería el resultado de un ordenamiento cuaternario de VP_3 en los vértices. La estructura terciaria y cuaternaria jugaría un rol vital en el establecimiento de determinantes antigénicos en aftovirus.

Las partículas antigénicas 75 S, son capsides vacías de mayor ocurrencia en determinados serotipos del virus, que poseen los polipéptidos del virión, pero con VP_0 como constituyente principal. Antigénicamente están estrechamente relacionadas con 140 y 12 S; en inmunodifusión se observaron bandas de precipitación comunes pero que no dan la impresión de identidad estricta (49). No se evidenció una disminución del contenido en VP_4 respecto al virión y se comprobó su inmunogenicidad en cobayos, obteniéndose antisueros específicos (118).

Los cuatro antígenos mencionados (140 S, 75 S, 12 S, VIA) son activos en reacciones de fijación de complemento y precipitación en gel, mientras que 140 y 12 S inducen formación de Acs específicos para cada uno de ellos con diferente movilidad electroforética. Los Acs contra 140 S son específicos de tipo. Las partículas 140 S y 75 S producen Acs neutralizantes mientras que no se comprobó esto con partículas 12 S en cobayos (9).

La respuesta anticuerpo inducida por virus se caracteriza por ser bifásica. El cambio secuencial en las propiedades fisicoquímicas de Ac anti aftovirus fué inicialmente demostrado por Brown y Graves (22) y Brown (23) con bovinos y cobayos infectados. El Ac presente 7 días p.i. tenía características de γ globulina (IgM) y el de 14 días p.i. movilidad y globulina (IgG) (25,46, 47, 64, 94, 136). Algunos estudios sobre cerdos infectados con aftovirus mostraron la presencia de IgM seis meses después. IgG se detectó uno ó dos días luego de la aparición de IgM y llegó a un pico 15 a 20 días p.i. (49).

Para analizar el estado inmune de animales infectados

ó vacunados con aftovirus se debe tener en cuenta la diferente avidéz de las distintas clases de Ac y su cambio en el transcurso del tiempo, lo cual puede influir en la naturaleza de la respuesta humoral (159). De allí que los ensayos de neutralización de virus no proveen un procedimiento seguro para medir concentraciones relativas de Ac en suero (21). Asimismo si los ensayos de neutralización de virus se realizan en animales susceptibles, tenemos que considerar factores del huésped como la activación de complemento y los procesos de fagocitosis, que pueden tener marcada influencia en la reacción de neutralización.

En numerosos casos se observó que animales inmunizados no resistían el desafío con virus virulento, a pesar de los altos títulos de Ac neutralizantes encontrados (92, 145). Dichos animales, en líneas generales, poseían bajos niveles de Ac protectores comparados con aquellos capaces de resistir el estímulo; en contraposición, animales con bajos niveles de Ac protectores y neutralizantes fueron capaces de resistir el desafío (30). Los sueros así estudiados pertenecían a etapas tardías de las inmunizaciones, cuando el Ac era IgG, aunque

no se conocía a que subclase pertenecía. O sea que para analizar el estado inmunológico de animales vacunados o infectados con aftovirus, el test de Ac protectores es un indicador más real que el de neutralización.

En bovinos infectados por inoculación introdermolingual de aftovirus, se detectaron por inmunodifusión radial Ac en el día 4, quienes disminuyen para luego aumentar desde el día 7 hasta un máximo 13 días p.i. El suero obtenido 7 días p.i., cruzaba fuertemente con tipos heterólogos del virus, mientras que el suero tardío (45 días p.i.) era más específico. Para explicar estos hechos, se analizó el suero temprano por adsorción e inmunodifusión; en el suero adsorbido con virus homólogo (tipo C) se inhibió la reacción homóloga y heteróloga, mientras que adsorbiendo con aftovirus A, se inhibió la reacción anti A pero no la anti C ó C. El suero temprano contendría Ac de alta especificidad para diferentes determinantes antigénicos del virus homólogo que estarían relacionados con otros sitios del aftovirus A u C (heterólogo). Esto sugeriría que la reactividad cruzada del suero temprano sería el resultado de la ocurrencia de Ac de alta especificidad capaces de

reaccionar con determinantes antigénicos menores (subdeterminantes), que no reaccionan ó no son reconocidos por Acs 7 S, quizá como consecuencia de factores conformacionales.(49)

Las investigaciones sobre la inmunogenicidad de los diferentes Ag de aftovirus indicaron que el virión (140 S) induce más Ac que cantidades equivalentes de capsides vacías (75 S) ó subunidades (12 S) (49). Los Ag purificados y tratados con AEI se utilizaron para inmunizar cobayos (5 µgs proteínas) que fueron sangrados 7, 14, 21, 28 y 35 días después y los Ac del suero se estudiaron frente a cada Ag por inmunodifusión radial y por actividad neutralizante. La estimulación con Ag 140 S indujo Ac contra 140 y 75 S, detectable en el día 7 pero contra 12 S no fueron evidentes hasta el día 21. La inoculación con Ag 75 S no produjo Ac anti 140 y 75 S hasta el día 21, aunque en el día 14 aparecen contra Ag 12 S.

La inmunización con Ag 12 S sólo produjo Ac contra el Ag homólogo, detectables recién 28 días después de la inoculación.

El Ac producido por inoculación con Ag 140 S a los 7 días fue IgM mientras que los obtenidos con Ag 75 y 12 S per-

tenecían a la clase IgG, y ninguna ó pequeñas cantidades de IgM se produjeron. Estas experiencias indicaron que el Ag 140 S indujo mayores niveles de Ac y más rápidamente que el Ag 75 S quien, a la vez, tuvo actividad superior al Ag 12 S (49). O sea que la presencia de ARN viral y el tamaño del Ag, juegan un rol en la respuesta de Ac hacia aftovirus.

Los estudios realizados sobre respuesta de Ac utilizando proteínas capsidales purificadas de aftovirus indicaron que porcinos vacunados con VP₃ estaban protegidos contra la enfermedad, mientras que utilizando VP₁ y VP₂ no se indujeron Ac antiviral. Al inocular con las 3 proteínas separadamente, en diferentes sitios del mismo animal, no hubo interferencia en la respuesta anti VP₃, siendo en cambio menor la obtenida con una mezcla de los tres polipéptidos. Los Ac anti virus producidos en cobayos con virus tripsinizado, fueron de magnitud semejante a los obtenidos con virus sin tratar, aunque la inmunización con una mezcla purificada de VP_{3a} y VP_{3b} no produjo respuesta (10).

El hecho de que una proteína capsidal del virus sea inmunogénica, abre nuevas posibilidades en vacunación con subuni-

lades ó preparaciones sintéticas de estructuras del virión
(11, 12, 13, 78).

OBJETIVOS.

El objetivo de éste trabajo fué encontrar diferencias a nivel de Ac circulantes en animales infectados y vacunados; para tal fin se utilizaron bovinos de zona libre de fiebre aftosa, que se utilizaron en las pruebas de efectividad de vacunas. Los grupos estudiados fueron sueros bovinos de animales infectados y vacunados e infectados. La inmunización se realizó con vacuna tipo Frenkel, trivalente, hidroxisaponinada. A los 21 días se desafiaron con 10^4 DI50 de virus bovinizado mono-específico. También se infectaron animales no vacunados (testigos). Se analizaron en éste trabajo diversas sangrías: prevacunación, post vacunación y post infección.

Para detectar dichas posibles diferencias, se estudió la replicación de aftovirus C_2 en células BHK₂₁ clon 13 a diferentes tiempos y los preparados antigénicos así obtenidos se analizaron por inmunodifusión, inmunofluorescencia y electroforesis en gel de poliacrilamida, para ver las bandas coloreadas y el perfil radioactivo. También se analiza-

ron los sobrenadantes de células a distintos tiempos post infección para cuantificar aftovirus.

Las características antigénicas de dichas preparaciones se estudiaron por inoculación en conejos, obteniéndose sueros anti células infectadas a diferentes tiempos, que se analizaron por ensayos de protección para deducir las diferencias antigénicas en inducción de Ac con distintas propiedades biológicas. También se realizó inmunoprecipitación de Ag radioactivos, con sueros de conejo homólogos y heterólogos que se corrieron en electroforesis en gel de poliacrilamida para confirmar los perfiles polipeptídicos encontrados en los Ag y su PM aproximado.

Se estudió el suero de cobayo hiperinmune anti virus para determinar las distintas fracciones cromatográficas con diferente actividad biológica (neutralización y protección) y su movilidad, para poder correlacionarlo con el comportamiento de sueros de bovinos infectados y vacunados.

De las diferentes sangrías de sueros bovinos testigos y de prueba de vacunas se estudió la composición proteica y los precipitados inmunes obtenidos con nuestras preparaciones

antigénicas, analizando por electroforesis en gel de poliacrilamida.

Se analizaron por inmunodifusión epitelio lingual bovino infectado a diferentes tiempos y sueros de conejo anti nuestros Ags para encontrar diferencias ó similitudes entre ellos.

Con todos los análisis indicados tratamos de establecer posibles diferencias existentes en sueros bovinos entre vacunación e infección y el poder de inducción de Ac protectores de los polipéptidos estudiados.

MATERIALES Y METODOS.

1.- MEDIOS DE CULTIVO.

1.1.- Medio de Eagle modificado por Mac Pherson y Stoker(90) y modificado en nuestros laboratorios.

Cloruro de sodio.	6,400 gr.
Cloruro de potasio.	0,400 gr.
Cloruro de calcio dihidratado.	0,200 gr.
Sulfato de magnesio heptahidratado.	0,200 gr.
Fosfato diácido de sodio monohidratado.	0,125 gr.
D-glucosa.	4,500 gr.
l-glutamina.	0,292 gr.
Solución de aminoácidos.	50,000 ml.
Solución de vitaminas.	4,000 ml.
Rojo fenol 1%	1,500 ml.
H ₂ O bidestilada c.s.p.	1000 ml.

1.2.- Solución de aminoácidos.

l-arginina clorhidrato.	0,840 gr.
l-cistina.	0,480 gr.

l-histidina clorhidrato.	0,384 gr.
l-isoleucina.	1,048 gr.
l-leucina.	1,048 gr.
l-lisina clorhidrato.	1,462 gr.
l-fenil alanina.	0,660 gr.
l- treonina.	0,952 gr.
l-triptofano.	0,160 gr.
l-tirosina.	0,727 gr.
l-valina.	0,936 gr.
l-metionina.	0,300 gr.
Inositol.	0,070 gr.
H ₂ O bidestilada c.s.p.	1000 ml.

1.3.- Solución de vitaminas.

Cloruro de colina.	0,05 gr.
Acido fólico.	0,05 gr.
Nicotinamida.	0,05 gr.
d-l pantotenato de calcio.	0,05 gr.
Piridoxal clorhidrato.	0,05 gr.
Tiamina clorhidrato.	0,05 gr.

Riboflavina.	0,05	gr.
H ₂ O bidestilada c.s.p.	100	ml.

1.4.- Medio para repiques de células BHK₂₁ (M.E.).

Medio de Eagle modificado.	800	ml.
Suero bovino inactivado 30' a 56°C.	100	ml.
Caldo triptosa fosfato 29,5 gr/l.	100	ml.
Penicilina 1,5% estreptomicina 0,5% y polimixina 0,15%.	2	ml.

Bicarbonato de sodio 7,5% c.s.p. obtener pH: 7,2.

Se esterilizó por filtración en placas de asbestos EKS.

1.5.- Medio de congelamiento de células BHK₂₁ (M.C.).

Se usó el M.E. pero con 20% de suero fetal bovino inactivado y adicionado con 10% de glicerina.

1.6.- Tripsina.

Cloruro de sodio.	8,000	gr.
Cloruro de potasio.	0,400	gr.
D-glucosa	1,000	gr.
Bicarbonato de sodio.	0,580	gr.

Tripsina.	0,500 gr.
Versene.	0,200 gr.
Rojo fenol 1%.	2 ml.
H ₂ O bidestilada c.s.p.	1000 ml.

Se esterilizó por filtración en placas EKS de asbestos.

1.7.- Medio para titulación de virus (M.T.).

Cloruro de sodio.	6,800 gr.
Cloruro de potasio.	0,400 gr.
Fosfato diácido de sodio.	0,125 gr.
Cloruro de calcio dihidratado.	0,200 gr.
D-glucosa.	1,000 gr.
Sulfato de magnesio heptahidratado.	0,200 gr.
Hidrolizado de lactoalbúmina 5%	41 ml.
Suero fetal bovino.	20 ml.
Penicilina 1,5%,estreptomicina 0,5% y polimixina 0,15%.	10 ml.
H ₂ O bidestilada c.s.p.	1000 ml.

Se llevó a pH 7,2 con bicarbonato de sodio 7,5% y se esterilizó por filtración en placas de asbestos EKS.

2.- CULTIVOS CELULARES.

2.1.- Células.

Se empleó la línea celular BHK₂₁ (riñón de hamster lactante) clón 13, trabajándolas en monocapas en frascos de vidrio tipo "cuzco", de 48 hs. de crecimiento. Se conservó esta línea celular en ampollas con MC a -270°C en tanques con nitrógeno líquido.

2.2.- Repiques celulares.

Los repiques de las células BHK₂₁ se realizaron tres veces por semana. Las monocapas de 48 hs. de crecimiento se lavaron con tripsina 1/250 Difco 0,05% en medio de sales-ver-sene y nuevamente se cubrieron las células con tripsina. Se dejó actuar dos minutos a T ambiente, se volcó el medio y se incubó a 37°C hasta desprendimiento de las células del vidrio. Estas se tomaron con ME y se sembraron en aproximadamente 200.000 cel/ml en botellas de vidrio con ME.

Se incubaron a 37°C por 48 hs donde se vió confluencia de las células en monocapa.

3.- VIRUS.

Se utilizó virus de la Fiebre aftosa tipo C, subtipo

2 cosechado de células BHK₂₁ clón 13, después de nueve pases, habiendo sido clonado en nuestro laboratorio cuatro veces.

Se obtuvieron aftovirus tipos A, O y C de Senasa y se pasaron varias veces en nuestros laboratorios. Para las pruebas de especificidad en los ensayos de seroprotección en ratón lactante se usó virus Sindbis.

3.1.- Elección de la multiplicidad de infección.

Con el objeto de elegir una relación virus/célula para todas las experiencias, se diseñó la siguiente prueba: frascos de Roux con monocapas de células BHK₂₁ ($4,1 \times 10^7$ células) se infectaron con cantidades diferentes de virus de título $10^{+8,4}$ UFP/ml para obtener multiplicidades de 0,6; 0,7; 13 y 67 UFP/célula. Se retiraron alícuotas de los frascos de Roux a diferentes tiempos post infección para cada multiplicidad elegida y posteriormente se determinó la infectividad de cada una por formación de placas bajo agar (según 3.3.2).

Tiempos elegidos: 1, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 y 25 horas post infección.

3.2.- Preparación de stocks.

Para preparar el stock de virus que se usó en las expe-

riencias se eligieron placas de medidas intermedias. Se utilizaron frascos tipo Roux en las primeras experiencias y posteriormente tipo roller de 1 l, con monocapas de células BHK₂₁ de 48 hs de crecimiento con ME que se lavaron dos veces con ME sin suero para eliminar los posibles Ac anti aftosa en el suero del medio. Cada frasco roller contenía $8,5 \times 10^7$ células.

Se infectaron las células con 11,7 UFP/célula, se dejó adsorber 1 h a 37°C, se volcó el virus y agregó a cada frasco 15 ml de ME sin suero. Se incubaron los frascos a 37°C y se cosechó el virus del sobrenadante luego de 6-8 hs post infección, cuando los cultivos mostraban una destrucción celular del 80-90%.

Previa centrifugación 2000 xg, 30 min a 2°C, para eliminar restos celulares, el virus se conservó congelado a -70°C.

3.3.- Determinación de la infectividad.

Todos los stocks de virus se titularon en células BHK₂₁ por observación de la acción citopatogénica ó por el método de formación de placas bajo agar.

3.3.1.- Titulación por producción de efecto citopático.

Células BHK₂₁, de 24 hs de crecimiento en tubos de en-

sayo de (15 x 150) mm se infectaron con diluciones decimales crecientes de virus de la fiebre aftosa y se incubaron por 1h a 37°C.

Al finalizar la adsorción se volcó el inóculo y se cubrieron las células con 1 ml de MT. Se realizó por quintuplicado para cada dilución y se hicieron controles de MT y de células. Se incubó 72 hs a 37°C, se observó microscópicamente (37,8x) el efecto citopático del virus en los cultivos diariamente. Se valoraron las acp cualitativamente en una escala preestablecida con datos de +4a +1. Se calculó la dosis infectante 50% para cultivos de tejidos (DICT 50) de acuerdo al método de Reed y Muench (115).

3.3.2.- Titulación por formación de placas bajo agar.

Se realizó por el método de Dulbecco y Vogt (59). Monocapas de células BHK₂₁ de 24hs de crecimiento en frascos tipo "cuzco" de 60 ml se lavaron con MT e infectaron con diluciones decimales crecientes de virus de fiebre aftosa. El inóculo se dejó adsorber por 1h a 37°C, agitando cada 10'. Luego de la adsorción las células se cubrieron con una capa de agar ID

(Oxoid) 0,85% en MT y solidificado éste se incubaron a 37°C invertidos. Transcurridas 72hs se cubrieron los frascos con una solución de formaldehído 10% por 20', retirandose la capa de agar. Las células se tiñeron con una solución de rojo neutro 1/2000. Se utilizaron 5 botellas por dilución y se contaron las placas; se calculó el título de acuerdo al inóculo, para cada dilución según la fórmula:

$$\text{TITULO (UFP/ml)} = \frac{n}{v \times d}$$

donde n= n° promedio de placas.v= volumen del inóculo.d= dilución.

3.4.- Concentración de virus.

Se empleó la técnica de precipitación con polietilenglicol (PEG) de Wagner(155), modificada en nuestro laboratorio. Se agregó PEG 6000 al 30% al stock de virus, para obtener una concentración final del mismo de 7,5%. Se dejó en contacto a 4°C durante 24 hs. Luego se centrifugó a 55000 xg a 0°C durante 60 minutos, resuspendiendo cuidadosamente el precipitado en buffer Tris-HCl 0,002 M, NaCl 0,15 M, pH 7,6 y se volvió a centrifugar a 150.000 xg a 0°C durante 150 minutos.

El precipitado obtenido se resuspendió en la mínima can-

tividad del buffer anterior con glicerina al 0,1%. Se tituló, fraccionó y mantuvo a -70°C .

Se realizaron experiencias para probar la calidad del PEG de 2 marcas distintas (Biochem y BDH). Se observó que la mayor cantidad de precipitado se obtuvo con el PEG Biochem, pero al realizar la titulación por formación de placas bajo agar se vió que el título del virus concentrado con PEG Biochem practicamente era similar al virus original, mientras que el virus concentrado con PEG BDH, tenía títulos, por lo menos, un log mayor que sin tratamiento previo. Con ésta última droga, se concentró el virus 87 veces. En las experiencias posteriores se usó PEG BDH.

4.- OBTENCION DE ANTIGENOS (Ag) A DIFERENTES TIEMPOS POST INFECCION EN CULTIVOS DE CELULAS BHK₂₁.

Se infectaron frascos tipo roller de 1 l con monocapas de células BHK₂₁ de 48 hs de crecimiento con stock de virus a una multiplicidad de 11,7 UFP/cel, previo lavado de las monocapas con ME sin suero. Se dejó adsorber el virus. Luego se volcó el inóculo y se lavaron las células con ME sin suero, agregando a cada frasco 15 ml de éste medio. Se incubaron a

37°C y a diferentes tiempos se descartaron los sobrenadantes, se lavaron las células con solución salina tamponada (PBS) a 0°C 2 veces, se cosecharon las mismas separandolas del vidrio, congelaron y descongelaron a -70°C. Estas suspensiones celulares sufrieron una disgregación por ultrasonido (Sonifer cell-disruptor, Heat-systems-ultrasonics, inc.) a 80 watts y se liofilizaron.

Los tiempos post infección elegidos para cosechar las células infectadas fueron: 60(T₀), 65(T₁), 75(T₂), 90(T₃), 120(T₄) y 210(T₅) minutos.

Los antígenos se separaron en alícuotas que sufrieron 2 procesos de inactivación diferentes con el objeto de obtener antisueros en conejos.

Inactivación con formol: se agregó formol a las células en una concentración de 0,015% y se agitó con magneto a T ambiente 3 hs y luego a 37°C toda la noche.

Inactivación con β propio lactona: se agregó β propio lactona a las células en una concentración de 0,2% y se agitó con magneto 8 hs a T ambiente.

Como control se cosecharon células BHK₂₁ de 48 hs de crecimiento en monocapa, no infectadas, sufriendo los procesos de inactivación antes indicados.

Antígeno VIA: fué cedido gentilmente por el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, Río de Janeiro, Brasil. Se obtuvo a partir de suspensiones virulentas (subtipo O₁, A₂₄ y C₃) en cultivos de células BHK₂₁ y había sido parcialmente purificado.

5.- OBTENCIÓN DE ANTISUEROS.

Los conejos utilizados fueron New Zealand White de 2.5kg de peso.

Los cobayos fueron de cepa Hartley de 500 gr. de peso.

5.1.- Suero de conejo anti virus de la fiebre aftosa subtipo C₂.

El virus aftoso obtenido del sobrenadante de células BHK₂₁ infectadas durante 6-8 hs se liofilizó y se determinó el contenido proteico (2,63 mg/ml). Sufrió el proceso de inactivación antes mencionado y se mezcló con adyuvante de Freund incompleto en partes iguales. Se inyectaron conejos con el virus una vez por semana durante 8 semanas por vía intramuscular (i.m.). Cada conejo recibió 5,26 mg de proteínas totales.

5.2.- Suero de conejo antivirüs de la fiebre aftosa subtipo C₂ concentrado.

El virus concentrado con PEG, resuspendido en buffer Tris HCl se inactivó con β propiolactona y formaldehído en alícuotas distintas y se inyectó en conejos con igual esquema que 5.1. Cada conejo recibió 4 mg de proteínas.

5.3.- Suero de conejo anti Ag de células BHK infectadas a distintos tiempos.

Los Ag mencionados en 4 se inyectaron en conejos. Cada conejo recibió 252 mg de proteínas.

El esquema utilizado fué el siguiente:

a) Una inyección por vía i.m. por semana, durante 4 semanas de las células BHK₂₁ infectadas, inactivadas con formaldehído y emulsionadas con adyuvante de Freund incompleto.

b) Luego de 15 días de descanso, 8 inyecciones por vía i.m., una cada 15 días, de cultivos inactivados con β propiolactona y emulsionados con adyuvante de Freund incompleto.

c) Luego de 15 días de descanso, tres inyecciones por vía i.m., una cada cuatro días, de células infectadas, mezcla-

das con saponina al 0,1%.

5.4.- Suero de conejo anticélulas BHK sin infectar.

Se inyectaron las células en conejos siguiendo el mismo esquema de inmunización que 5.3. Cada conejo recibió un total de 213 mg de proteínas.

Todos los conejos fueron sangrados a blanco por punción cardíaca 7 días después de la última inyección y la sangre se colocó 1 hs a 37°C y toda la noche a 4°C. Al día siguiente se separó el suero por centrifugación a 500 xg, 15 minutos a 0°C, se fraccionó y conservó a -70°C.

5.5.- Suero hiperinmune anti virus de la fiebre aftosa subtipo

C₂ en cobayos.

5.5.1.- Preparación del antígeno.

Se inocularon cobayos con 0,3 ml de virus intradermoplantat (i.d.p.) en una sola pata. A las 24 hs se observaron aftas en las otras tres patas y se cosecharon los epitelios. Se congelaron en la mínima cantidad de MT, se descongelaron y maceraron cada epitelio con 1 ml de stock de virus. Se centrifugó a 800 xg 15 minutos a 0°C, se separó el sobrenadante al que se agregó antibióticos. Se mezcló con saponina 0,1% como adyuvante.

Se tituló y mantuvo a -70°C .

5.5.2.- Obtención del antisuero.

Con el antígeno descrito se obtuvieron tres sueros hiperinmunes de acuerdo a los siguientes esquemas de inmunización.

Grupo 1: los animales se inocularon con 0,3 ml de antígeno por inyección, dos veces por semana durante tres semanas, las tres primeras subcutáneas (s.c.), las dos siguientes i.d.p. y la última nuevamente s.c.

Grupo 2: los animales se inocularon con 0,3 ml de antígeno por inyección, dos veces por semana durante siete semanas, tres s.c., dos i.d.p., una s.c., dos i.d.p., cuatro s.c., dos i.d.p. y la última s.c.

Grupo 3: los animales se inocularon con 0,3 ml de antígeno por inyección, dos veces por semana, durante nueve semanas; el esquema de inoculación fué el del grupo 1 repetido 3 veces.

Los animales de todos los grupos, luego de siete días de la última inyección, se sangraron y los sueros se mantuvieron a -70°C . Cada grupo consistió en una mezcla de sueros.

5.5.3.- Fraccionamiento de gamma globulina de los sueros hiperinmunes y cromatografía sobre DE celulosa.

Se empleó el método de precipitación con sulfato de amonio al 33% de saturación (55). Las gammas globulinas se cromatografiaron sobre D-E celulosa según el método de Yagi (160, 161); se utilizó DE celulosa (32-Whatman) sobre una columna de 2 x 30 cm en la relación de por lo menos 1 gr. de absorbente/ml de suero. La resina fué lavada y equilibrada con solución reguladora de partida de pH 8,5 que consistió de Tris 0,035 M (hidroxi metil amino metano) y ácido fosfórico 0,005 M. Las muestras de las gamma globulinas de cada grupo se llevaron con solución reguladora de partida a un volumen de 10 ml.

El pH y el gradiente salino fueron obtenidos con dos volúmenes de solución reguladora de partida, colocado en un frasco abierto con agitador magnético, conectado por un sifón a un recipiente cerrado con un volumen de solución reguladora final de pH 4,0, que consistió en Tris 0,5 M y ácido fosfórico 0,59 M. Se obtuvieron fracciones de 5 ml con un flujo de 10 a 15 minutos por tubo. Se leyó la densidad óptica (DO) a 280 m μ y el pH de los eluyentes.

Se hizo una mezcla con las fracciones que presentaron picos de DO y pH similares. Se dializaron contra solución fisiológica y liofilizaron. La pureza de las fracciones se comprobó por inmunoelectroforesis (124) y su actividad biológica por seroprotección en ratones lactantes.

5.6.- Suero de cobayo antiantígeno VIA.

Fue cedido gentilmente por el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, Río de Janeiro, Brasil y consistió en una mezcla de sueros hiperinmunes elaborados con varias cepas de los subtipos C₁, A₂₄ y C₃. Estos sueros se obtuvieron en cobayos inmunes y, después de inoculaciones por vía i.d.p. e i.d. recibieron tres veces cada cuatro días suspensiones virulentas conteniendo 0,07% de saponina.

5.7.- Sueros hiperinmunes anti virus de la fiebre aftosa en cobayos.

Fueron cedidos gentilmente por Laboratorios Estrella-Merieux y consistieron en sueros monoespecíficos anti los tres tipos de virus aftoso (A, O y C).

6.- RETENCION DE SUEROS BOVINOS.

Se obtuvieron muestras de sueros bovinos, gentilmente

extraídas por el Laboratorio Estrella-Merieux y el Servicio Nacional de Luchas Sanitarias de animales de prueba de vacunas anti aftosa.

Los esquemas de extracción de los 2 sitios antedichos consistieron en las siguientes sangrías:

6.1.- Laboratorio Estrella-Merieux.

Animales de prueba.

Sangría N° 1 - prevacunación.

Sangría N° 2 - día 7 post vacunación.

Sangría N° 3 - día 14 post vacunación.

Sangría N° 4 - día 21 post vacunación.

Desafío = 10.000 DI₅₀.

Sangría N° 5 - día 3 post infección.

Sangría N° 6 - día 5 post infección.

Sangría N° 7 - día 7 post infección.

Animales testigos.

Sangría N° 1 - preinfección.

Sangría N° 5 - día 3 post infección.

Sangría N° 6 - día 5 post infección.

Sangría N° 7 - día 7 post infección.

Se trabajó con 10 animales de prueba y 10 animales testigos con los 3 tipos de virus de la fiebre aftosa: A, O y C.

6.2.- Senasa (Selab).

Animales de prueba.

Sangría N° 1 - prevacunación.

Sangría N° 2 - día 21 post vacunación.

Desafío = 10.000 DI₅₀.

Sangría N° 3 - día 3 post infección.

Sangría N° 4 - día 5 post infección.

Sangría N° 5 - día 7 post infección.

Animales testigos.

Sangría N° 1 - preinfección.

Sangría N° 2 - día 3 post infección.

Sangría N° 3 - día 5 post infección.

Sangría N° 4 - día 7 post infección.

Se trabajó con 10 animales de prueba y 10 animales testigos con los 3 tipos de virus de la fiebre aftosa: A, O y C.

7.- SEROPROTECCION EN RATONES LACTANTES.

Se empleó la técnica de Cunha (51) para obtener los ín-

dices de seroprotección (IPR) y una modificación de la misma para determinar los tiempos de sobrevida, usando ratones de 3 a 5 días, que se observaron diariamente durante 7 días.

Se inocularon 6 ratones por cada dilución de virus, por vía intraperitoneal (i.p.), con 0,1 ml de antisuero inactivado a 56°C, sin diluir. Media hora después, se inyectó por la misma vía una dilución de virus en MT tal que matara al 100% de los animales en 48 hs. Se hicieron controles con MT y con suero solo, para determinar si tenían efecto tóxico.

Se determinaron los tiempos de sobrevida de cada antisuero, se calculó el IPR como el log. del título del virus menos el log. del título de virus mas suero y se estimaron las significaciones estadísticas de las diferencias.

Los antisueros analizados por éste método fueron:

Suero de conejo antivírus de la fiebre aftosa subtipo C₂.

Suero de conejo antivírus de la fiebre aftosa subtipo C₂ concentrado.

Suero de conejo anticélulas BHK no infectadas.

Suero de conejo inmunizado con células BHK a 60, 65, 75, 90, 120 y 210 minutos post infección con virus de la fiebre aftosa

subtipo C₂.

Con los antisueros obtenidos con células BHK a los 75, 120 y 210 minutos post infección, se hicieron experimentos de seroprotección en ratón lactante, con virus de la fiebre aftosa subtipo A₂₄ y O₁ y con virus Sindbis. Dichos virus se inocularon en diluciones que fueron letales para el 100% de los animales infectados y se utilizaron para estudiar la especificidad de subtipo y de virus.

8.- INMUNODIFUSION.

Se siguió la técnica de doble difusión de Ouchterlony(101) utilizando agar Oxoid ID al 1,5% en solución fisiológica con 0,01% de azida sódica. Se usaron placas de Petri de 6 cm de diámetro, donde previamente a la experiencia se probó la concentración proteica óptima de precipitación de los antígenos usados y la distancia correcta entre el orificio central donde se colocó el antisuero y los orificios periféricos donde se sembraron los Ag. Esta última fué de 7 mm y la concentración proteica de Ag usada de 50 mg/ml a 100 mg/ml. Las placas se incubaron en cámara húmeda a 4°C y se observaron diariamente durante una semana.

Al cabo de éste período las placas se lavaron con solución fisiológica durante 48 hs y con H₂O destilada por 24 hs, luego se secaron con papel de filtro a 37°C durante 48 hs y se tiñeron con colorante Amido Schwartz B 0,1% en ácido acético 1 M: acetato de sodio 0,1 M: glicerina (45: 45: 10) y posteriormente se decoloraron con ácido acético 7%. En los casos en que se consideró necesario, por no haberse observado las bandas de precipitación esperadas, la tinción se reemplazó por una fijación con ácido acético 2%.

9.- INMUNOFLUORESCENCIA.

9.1.- Antígenos. Se cultivaron células BHK₂₁ clon 13 en trozos de cubreobjetos dentro de tubos de Leighton. Se obtuvieron células infectadas a diferentes tiempos post infección según 4. Se estudiaron los tiempos 60(T₀), 65(T₁), 75(T₂), 90(T₃), 120(T₄), 210(T₅) y 270(T₆) minutos. Se utilizaron células BHK₂₁ sin infectar como controles.

9.2.- Antisueros.

9.2.1.- Suero de conejo anti virus de la fiebre aftosa sub-tipo C₂ concentrado. Descripto en 5.2.

9.2.2.- Suero de cobayo hiperinmune anti virus de la fiebre aftosa tipo C. Descripto en 5.7.

Se precipitaron las globulinas de los antisueros mencionados con sulfato de amonio al 50% de saturación y posteriormente se dializaron contra solución fisiológica y agua destilada.(73).

9.2.3.- Conjugación.

Se realizó con isotiocianato de fluoresceína según el método de Camargo (36).

9.2.4.- Adsorción.

Las globulinas conjugadas se adsorbieron con polvo de tejidos según Larghi (83). La preparación de este último se realizó separando células BHK₂₁ del frasco de crecimiento en PBS y liofilizándolas. La proporción de adsorción fué de 1 mg de polvo de tejido por ml de conjugado.

9.2.5.- Purificación del conjugado.

Se realizó por pasaje a traves de una columna de Sephadex G-25 superfino. Se removió así la fluoresceína no conjugada.

9.3.- Fijación.

Se retiraron los cubreobjetos de los tubos de Leighton

y se lavaron con PBS. Luego se fijaron con acetona a -20°C por 30 minutos.

9.4.- Coloración.

Se utilizó el método directo (83). Se diluyeron los antisueros de acuerdo a su título con virus de la fiebre aftosa y con solución fisiológica regulada a pH 7,2 con fosfato, separadamente. Se colocó una gota de cada uno de ellos sobre portaobjetos fijados. La dilución del suero con virus se utilizó para teñir controles negativos y la dilución con S.F. para muestras positivas. Se incubó a 37°C por 30', se lavaron con S.F. y se secaron al aire. Se tiñieron células BHK sin infectar que se utilizaron como blancos.

Se hicieron tinciones por ésta técnica con los antisueros adsorbidos y no adsorbidos.

9.5.- Observación microscópica.

Se utilizó un microscopio Leitz, modelo Ortholux con tubo binocular, oculares Leitz 10X, objetivos acromáticos 25X con apertura numérica igual ó menor a la del condensador, lámpara HB O 200 Osram, filtros anticalórico KG 1-2 mm, excitadores

UG 1-1mm (UV) y filtro barrera K 430 (UV).

9.6.- Fotografía.

Las fotografías fueron tomadas con 250 aumentos, con película Kodacolor 400 (CG 135) y cámara Leika.

Se probaron diferentes tiempos de exposición= 1,2,3,4, 5 y 6 minutos; se eligieron los tiempos de 4 y 5 minutos de acuerdo a los resultados obtenidos.

10.- ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.

10.1.- Se realizó de acuerdo a la técnica de Davis y Ornstein (52). Se utilizó gel de acrilamida 7% como gel separador y 1,25% como gel espaciador en buffer tris glicina pH 8,3. Se sembraron 250 µgr de proteína por gel. La electroforesis se llevó a cabo durante 2,5 a 3 horas; el voltaje varió de 140 V al comienzo de la corrida a 300 V al término de la misma y la intensidad de corriente fué de 3 mA por tubo hasta que el colorante indicador (azul de bromofenol 1 mg % en agua destilada) atravesó al gel espaciador y luego se aumentó a 5 mA por tubo.

Una vez finalizada la corrida electroforética se separó

el gel del tubo de corrida y se tiñó durante 18 hs con azul de Coomasie 10 mg % en metanol: ácido acético: agua destilada (4: 1: 5) y luego se destiñó con metanol: ácido acético: agua destilada (4: 1: 15). Una vez desteñidos los geles se determinó el perfil de densidad óptica a 590 nm en un espectrodensitógrafo Crudo Camaño.

10.2.- Se utilizó la técnica de Davis (52) modificada por Dimmock y Watson (56) para el uso de dodecilsulfato de sodio (SDS) y modificaciones de Studier(135) y Laemmli (82). Se utilizó un gel espaciador con acrilamida al 3% y un gel separador con acrilamida al 15%.

Todas las muestras sufrieron un tratamiento previo de calentamiento a 100°C por 10 minutos en una mezcla que contenía SDS 4%, sacarosa 20%, urea 5M y mercaptoetanol 200 ul/ml. Se sembraron 700 ugr de proteína de cada muestra por tubo y la corrida se realizó por duplicado. El buffer usado fue Tris-glicina 0,04 M pH 8,3 con SDS al 0,5%, aplicando 5 mA por tubo durante 3 hs.

Una vez finalizada la corrida electroforética se separó el gel del tubo y se fijó con ácido tricloroacético 15% y me-

tanol 40% durante 30 minutos. Luego se tiñó durante 18 hs con Azul de Coomasie 10 mg % en metanol: ácido acético: agua destilada (4: 1: 5) y se decoloró con metanol: ácido acético: agua destilada (4: 1: 15).

11.- PRECIPITACION INMUNE.

Se realizó de acuerdo a Honess y Watson (74). Para cada sistema antígeno-antisuero utilizado se estudió el rango óptimo de precipitación, incubando volúmenes fijos de antígeno con volúmenes variables de antisuero en tubos; se mantuvo el volumen total constante con PBS. Las mezclas se incubaron a 4°C por 72 hs y luego se centrifugaron 15 minutos a 3500 rpm. El pellet se lavó 6 veces con 10 ml de PBS por centrifugación.

Por otra parte se realizaron pruebas manteniendo fija la cantidad de antisuero (según experiencia anterior) y variando las concentraciones de Ag, corridas luego por electroforesis en gel de poliacrilamida. Se realizaron controles en paralelo donde se reemplazó el antisuero por PBS.

Habiendo fijado la relación Ag-antisuero óptima, se analizaron los diferentes sistemas por esta técnica. En general se usaron entre 1000-1500 µg/ml de Ag y los antisueros concen-

trados ó diluídos al medio en PBS. El precipitado inmune obtenido, luego de lavado se sometió a la mezcla de reacción previa a la corrida electroforética en gel de poliacrilamida y se sembraron en 2 tubos, según ya se describió (Materiales y Métodos 10.2.).

12.- INMUNOELECTROFORESIS DE PRECIPITADOS INMUNES.

Los precipitados inmunes, corridos en electroforesis en gel de poliacrilamida, se analizaron por inmunolectroforesis para ubicar a qué distancia del origen del gel se encontraron las IgG, IgM y sus respectivas cadenas H y L.

Se realizó la precipitación como se describió en 11, utilizando algunos Ags de células BHK infectadas a diferentes tiempos, explicados en 4. Como antisuero se emplearon determinadas sangrías de los sueros de bovinos vacunados e infectados cuya obtención se describió en 6. El precipitado inmune se analizó por electroforesis en gel según 10.2. Obtenido el cilindro de poliacrilamida se cortó en discos de 2 mm de espesor, se eluyeron las proteínas colocando cada uno en SST durante 48 hs y éstas se sembraron en placas de agar para inmunolectroforesis que se realizó según Scheidegger (124). Las

bandas proteínicas se revelaron con suero de conejo anti gamma globulinas bovinas totales extrapolando la distancia al origen en el gel donde se encontraron las inmunoglobulinas.

13.- TECNICAS EMPLEANDO ISOTOPOS RADIOACTIVOS.

Se marcaron virus y antígenos con $[^3\text{H}]$. Las técnicas empleadas fueron basicamente las ya descritas en 3.2. y 4. y los métodos radioactivos se realizaron según Dimmock-Watson(56) y Honess-Watson (74).

13.1.- Marcación de virus aftoso.

Se marcó virus de la fiebre aftosa subtipo C_2 . Se partió de frascos tipo roller de 1 l con monocapas de células BHK₂₁ de 48 hs de crecimiento, que se lavaron 3 veces con ME sin aminoácidos y sin suero. Luego se infectaron con virus de stock en una multiplicidad de 11,7 UFF/cel, se dejó adsorber 1 h a 37°C, se volcó al inóculo y se lavaron los frascos 3 veces con ME sin aminoácidos y sin suero. Se agregó a cada frasco 15 ml de éste medio, 0.2 ml de ^3H -metionina (New England Nuclear Corp., 1,0 mCi; 1,0 ml; Etanol/H₂O (7:3); 80,0 Ci/mmol) y 0,2 ml de ^3H -isoleucina (New England Nuclear Corp.; 1,0 mCi; 1,0 ml; 0,01 NCLH; 0,0013 mg) y 0,06 ml de Actinomicina D (de una solución de 0,5 mg/ml). Se incubó a 37°C y el virus del

sobrenadante marcado se cosechó luego de 6-8 hs post infección, cuando los cultivos mostraron una destrucción celular del 80-90%. Previa centrifugación para eliminar restos celulares, el virus se fraccionó y mantuvo a -70°C .

13.2.- Obtención de Ag marcados a diferentes tiempos post-infección en cultivos de células BHK₂₁.

Se realizó como se describió en 4; se reemplazó el inóculo de virus aftoso por el virus marcado obtenido en 13.1. Se cosecharon los Ag T₀, T₁, T₂, T₃, T₄ y T₅ marcados con aminoácidos tritiados, siguiendo igual tratamiento al explicado en 4.

Se realizaron como control células BHK marcadas sin infectar.

13.3.- Precipitación radioinmune.

Se realizó como se describió en 11, utilizando como Ags el virus marcado y las células BHK₂₁ cosechadas a distintos tiempos post infección marcadas y los antisueros que se indicaron. Como controles se utilizaron los Ags marcados y el antisuero fué reemplazado por PBS, sufriendo todos los procesos ya descriptos.

13.4.- Electroforesis en gel de poliacrilamida utilizando las muestras radioactivas.

Se realizó como se describió en 10.2. Se corrieron duplicados de virus, células BHK₂₁ cosechadas a distintos tiempos post infección, sus respectivos controles y los precipitados radicinmunes y sus controles. Uno de los geles se tiñó con azul de Coomasie y el otro se mantuvo a -70°C por 24 hs y posteriormente se cortó en discos de 1 mm de espesor y se midió la radioactividad de cada disco.

13.5.- Medidas de radioactividad.

Los discos mencionados en 13.4 se colocaron en viales con 200 µl de peróxido de hidrógeno y se incubaron a 37°C por 18 hs.

Luego de éste período se colocó 10 ml de líquido de centelleo con un solubilizador de geles y 24 hs después se contó la radioactividad en un espectrómetro de centelleo líquido.

13.6.- Líquido de centelleo.

Protozol	180	ml.
POPCP	0,04	gr.
PPO	4	g.
Tolueno	1000	ml.

13.7.- Condiciones de lectura.

Se usó un espectrómetro de centelleo líquido Packard modelo 527.

Ganancia: 60%

Ancho de ventana: 50 - 1000.

Tiempo: entre 1 y 5 minutos.

14.- DETERMINACION DE PROTEINAS.

Todas las determinaciones de proteínas se realizaron de acuerdo al método de Lowry (88), empleando albúmina sérica bovina como standard de calibración.

RESULTADOS

1.- PREPARACION DE STOCKS DE VIRUS Y DETERMINACION DE LA INFECTIVIDAD.

La preparación de stocks de aftovirus C₂ se realizó en diversas experiencias obteniéndose 10.160 ml de virus que se mezcló, tituló según el método de formación de placas bajo agar y se obtuvo un título promedio de $1,5 \times 10^7$ UFP/ml.

Los aftovirus A₂₄, C₃ y O₁ cedidos gentilmente por SELAB fueron titulados por el mismo método anterior y los títulos promedio obtenidos fueron para A₂₄ cruzeiro $3,17 \times 10^6$ UFP/ml, para C₃ Rezende $4,8 \times 10^7$ UFP/ml y para O₁ Caseros $2,5 \times 10^6$ UFP/ml.

2.- ELECCION DE LA MULTIPLICIDAD DE INFECCION.

En estas experiencias se utilizó originalmente un aftovirus C₂ de título $10^{8.4}$ DICT₅₀, obtenido en cultivos primarios de células de riñón de cerdo.

Se graficó UFP/ml en función de tiempo en horas para cada multiplicidad de infección usada (Gráfico 1). Como nos

GRAFICO 1.

Curva de crecimiento de aftovirus C_2 en función de la multiplicidad de infección.

Se infectaron monocapas de células BHK₂₁ en frascos de Roux de 48 hs de crecimiento con multiplicidades de:

- ▲ 66,6 UFP/célula.
- 13,0 UFP/célula.
- △ 0,7 UFP/célula.
- 0,6 UFP/célula.

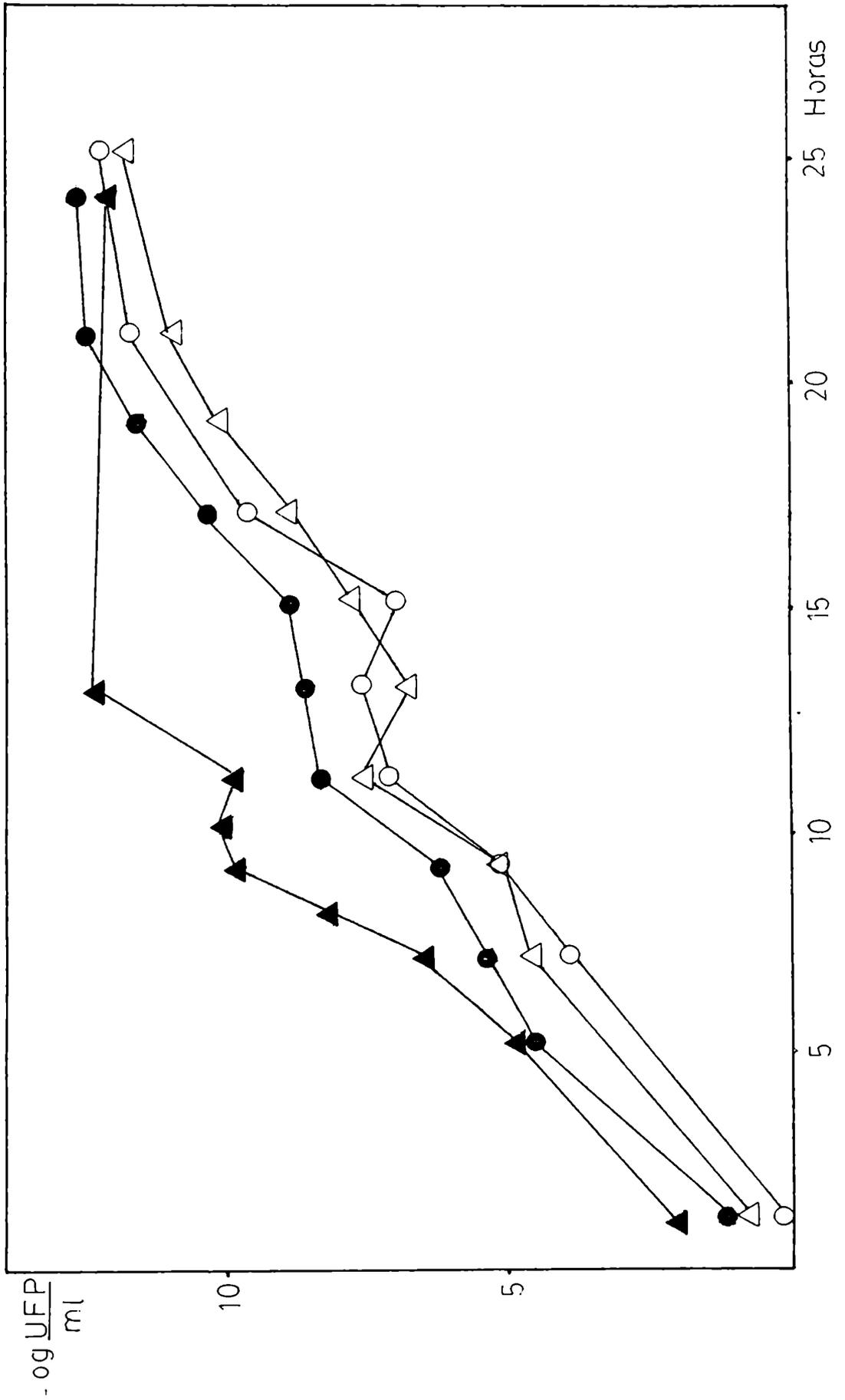


Grafico 1

interesaba estudiar tiempos tempranos de multiplicación viral (hasta 5 horas post infección), se eligió multiplicidad 11,7, ya que no se observaron diferencias notables entre los valores estudiados (0,6-0,7 y 13).

Con multiplicidad de infección 67 se obtuvieron títulos de virus más altos, pero no se pudo utilizar ya que hubiera sido necesario trabajar con volúmenes grandes de inóculo para llegar a esa multiplicidad, debido al título del virus C_2 ya expresado en l.

3.- CONCENTRACION DEL VIRUS CON POLIETILENGLICOL (PEG)6.000.

Se realizaron experiencias para probar la calidad de P.E.G. de dos marcas distintas (Biochem y BDH).

Se partió de un virus cuyo título original era de $1,84 \times 10^6$ UFP/ml. Se realizó la experiencia de concentración con las dos drogas obteniéndose mayor cantidad de precipitado con el P.E.G. Biochem; al realizar la titulación de los virus por formación de placas bajo agar se comprobó que el título del virus concentrado con P.E.G. Biochem era del mismo orden que el del virus sin concentrar, mientras que el

virus concentrado con P.E.G. BDH aumentó en su título.

Título del virus original: $1,84 \times 10^6$ UFP/ml.

Título del virus concentrado con P.E.G. Biochem: $3,5 \times 10^6$ UFP/ml

Título del virus concentrado con PEG BDH: $8,6 \times 10^7$ UFP/ml.

De acuerdo a éstos resultados en todas las experiencias se utilizó P.E.G. BDH.

Los títulos promedios de las experiencias realizadas fueron:

Virus original: $1,24 \times 10^8$ UFP/ml.

Virus concentrado: $2,03 \times 10^9$ UFP/ml.

4.- ESTUDIOS SOBRE LOS ANTIGENOS PREPARADOS EN CELULAS

BHK₂₁ INFECTADAS CON AFTOVIRUS C₂.

4.1.- Inmunodifusión.

Se diseñó un esquema de inmunodifusión para analizar la existencia de virus en nuestra preparación antigénica T₅ (células BHK₂₁ infectadas con aftovirus C₂ cosechadas a 210 minutos post infección) (Figura 1.a.).

Se observaron dos bandas de precipitación entre el antígeno (5,6 mg/ml) y el suero de conejo anti células BHK₂₁ sin diluir y diluido al medio y una banda de precipitación entre el Ag y el suero de cobayo anti virus aftoso tipo C diluido al medio. Además se revelaron dos bandas de precipitación entre el suero de cobayo anti virus y el suero de conejo anti células, lo cual llevó a diseñar el esquema de la Figura 1 b, observándose dos bandas de precipitación entre el suero de cobayo normal y el suero de conejo anti células BHK y ninguna entre el suero de conejo normal y el suero de cobayo anti virus. Estos resultados indicaron que existió reacción cruzada entre el riñón de hamster y el cobayo, por lo que se adsorbieron los sueros de cobayo anti virus con células BHK₂₁ para realizar los posteriores experimentos de inmunodifusión.

Con el objeto de analizar el número de bandas que se obtenían entre nuestras preparaciones de virus sobrenadante liofilizado (21,6 mg) y nuestro suero de cobayo hiperinmune anti aftovirus C₂ (Grupo I) se realizó el esquema de inmunodifusión que mostró la Figura 1 c obteniéndose dos bandas de precipitación. Al utilizar virus concentrado (Figura 1 d) se revelaron tres bandas de precipitación con el suero hiperinmune anti aftovirus C₂ en cobayo y dos del antígeno T₅ con el mismo suero. Con los antígenos diluídos al medio no se obtuvieron bandas.

Con el objeto de detectar la presencia de Ag VIA en nuestras preparaciones antigénicas se realizaron ensayos de inmunodifusión (Figura 2), utilizando Ag VIA y suero de cobayo anti VIA. Se nos indicó que éste último suero no poseía anticuerpos contra células BHK y fué obtenido en animales hiperinmunizados con virus cobayizado de los tres tipos en el C.P.F.A. (Brasil).

En la Figura 2 a se obtuvo una banda de precipitación entre el Ag y el As homólogos y una banda de precipitación del suero anti VIA sólo con los Ag T₃ y T₄, observándose de-

terminantes antigénicos del primero que el segundo no poseía. Los volúmenes antigénicos usados fueron 0,2 ml de una solución que contenía 20 mg/ml de proteínas.

Al repetir los esquemas con concentraciones antigénicas de 20 mg por orificio y de 40 mg por orificio para el virus sobrenadante se observó una banda de precipitación del suero anti VIA con éste último y sólo con el Ag T₄, desapareciendo la banda con el Ag T₃ antedicha (Figura 2 b).

En la Figura 2 c se utilizó suero anti VIA del mismo origen pero de otro lote (Cedido gentilmente por Selab) y la concentración de virus utilizada fué de 100 mg por orificio, manteniéndose la concentración antes indicada para los Ags, y se observó una banda más fuerte con el virus sobrenadante y una banda con el Ag T₅, no detectándose resultados positivos con los otros Ag, lo cual se atribuyó al cambio en el lote del suero anti VIA.

Los resultados observados en la Figura 2 indicaron, a pesar que en algunos casos se observaron bandas y en otros no, debido a cambios en el antisuero usado y en la concentración de los Ag utilizada, la existencia de Ag VIA en nuestros

preparados de células infectadas y cosechadas a los 90, 120 y 210 minutos post infección (T_3 , T_4 , T_5).

Nuestras preparaciones antigénicas y el Ag VIA fueron enfrentados a sueros hiperinmunes antiaftovirus de los tres tipos en cobayos. La Figura 3 mostró las bandas obtenidas al utilizar suero anti aftovirus C_2 , grupo I. Se obtuvieron varias bandas de precipitación con todos los Ag. Al adsorber éste inmunosuero dos veces con células BHK al 3%, se observó una disminución del número de bandas (Figura 4). Se conservaron bandas de precipitación con Ag VIA, virus C_2 sobrenadante y Ag T_3 , T_4 y T_5 ; las bandas observadas en la Figura 3 se atribuyeron a reacciones cruzadas con células BHK.

Al realizar la misma experiencia con suero hiperinmune anti aftovirus tipo C, pero de otro origen (Laboratorios Estrella-Merieux) (Figura 5) se obtuvieron diagramas de bandas de precipitación similares a los de la Figura 4.

En las Figuras 4 y 5 se obtuvieron bandas de precipitación de identidad entre los Ag T_4 y T_5 con el Ag VIA y virus sobrenadante. En cambio con el Ag T_3 no se pudo determinar la existencia de dicha identidad probablemente por va-

riaciones en la concentración utilizada del Ag.

Al emplear el suero de cobayo anti aftovirus tipo O (Figura 6) se observó una única banda de precipitación con los Ag VIA, T₀, T₁ y T₃.

Con el suero anti aftovirus tipo A (Figura 7) se revelaron bandas de precipitación con todos los componentes, salvo el virus sobrenadante.

Estos últimos resultados podrían explicarse debido a la presencia de proteínas tempranas en nuestras preparaciones antigénicas de reactividad cruzada entre los tres tipos de aftovirus, A, O y C. El hecho de haber observado sólo una banda entre el suero anti aftovirus tipo A y el virus sobrenadante tipo C₂ en la Figura 7, en el orificio vecino al Ag VIA podría deberse a la presencia de dicho Ag, a que nuestras preparaciones antigénicas poseían una variedad de polipéptidos, inducidos en células por el virus, de reacción cruzada, ó a un artefacto de técnica.

FIGURA 1.

Esquemas de Inmunodifusión utilizando los siguientes componentes:

- 1.- Células BHK₂₁ infectadas con aftovirus C₂ cosechadas a 210 minutos post infección (0,2ml de una solución 5,6 mg/ml) (T₅).
- 2.- Suero de cobayo anti aftovirus tipo C diluído al medio.
- 3.- Suero de conejo anti células BHK₂₁.
- 4.- Suero de cobayo anti aftovirus tipo C.
- 5.- Suero de conejo anti células BHK₂₁ diluído al medio.
- 6.- Suero de cobayo normal.
- 7.- Suero de conejo normal.
- 8.- Suero de cobayo anti aftovirus C₂ grupo I.
- 9.- Virus sobrenadante liofilizado (4,0 mg).
- 10.- Antígeno T₅ diluído al medio.
- 11.- Virus concentrado por P.E.G. (0,2 ml de una solución de 2.000 mg/ml).
- 12.- Virus concentrado diluído al medio.

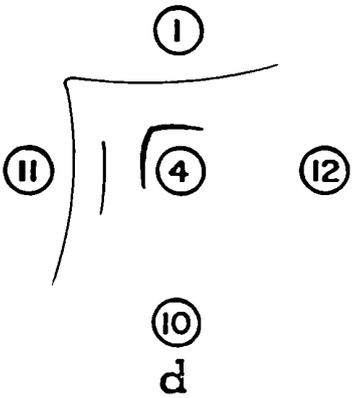
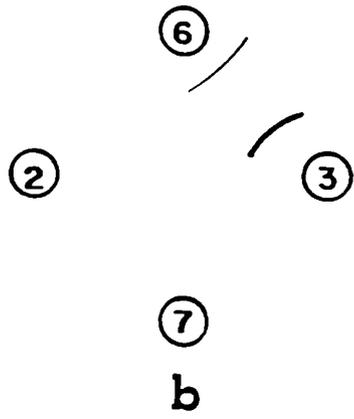
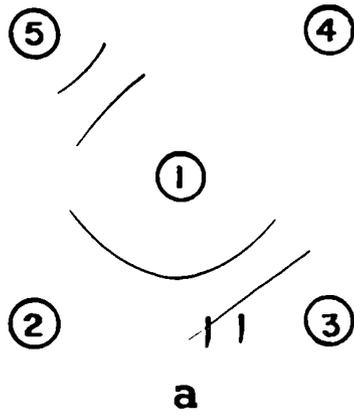
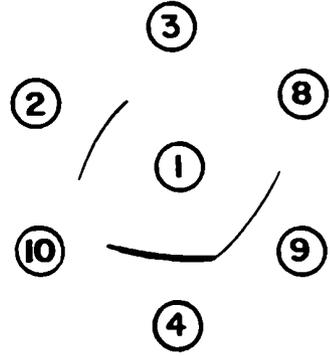
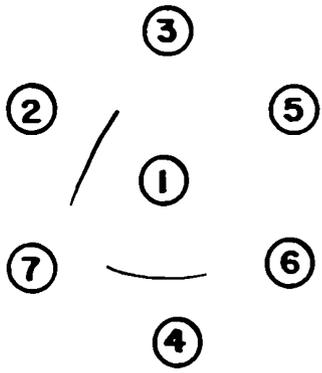
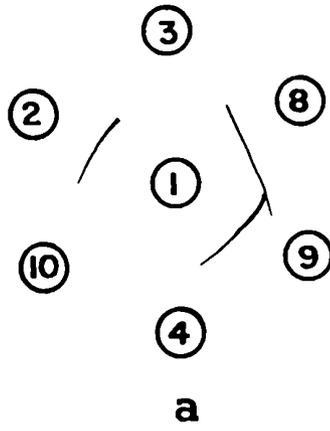
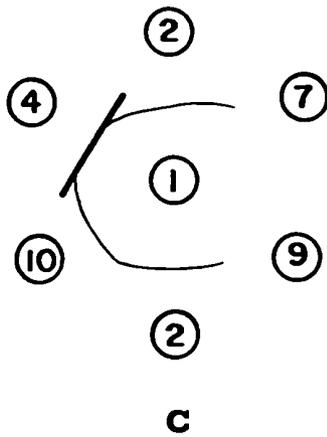


Figura 1



b



c

Figura 2

FIGURA 3.

Esquemas de inmunodifusión utilizando los siguientes componentes:

- 1.- Suero hiperinmune anti aftovirus C₂ en cobayo. Grupo 1.
- 2.- Antígeno VIA (Cedido gentilmente por el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. Río de Janeiro - Brasil).
- 3.- Virus sobrenadante liofilizado C₂ (4 mg de proteínas).
- 4.- Células BHK₂₁ clon 13 liofilizadas.
- 5.- Células BHK₂₁ infectadas con aftovirus C₂ cosechadas a los 60 minutos p.i. (T₀).
- 6.- Células BHK₂₁ infectadas con aftovirus C₂ cosechadas a los 65 minutos p.i. (T₁).
- 7.- Células BHK₂₁ infectadas con aftovirus C₂ cosechadas a los 75 minutos p.i. (T₂).
- 8.- Células BHK₂₁ infectadas con aftovirus C₂ cosechadas a los 90 minutos p.i. (T₃).
- 9.- Células BHK₂₁ infectadas con aftovirus C₂ cosechadas a los 120 minutos p.i. (T₄).

Se sembraron 20 mg de proteínas por orificio de los antígenos 4, 5, 6, 7, 8 y 9.

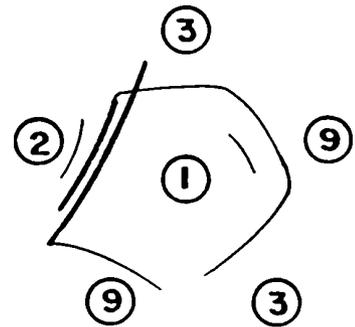
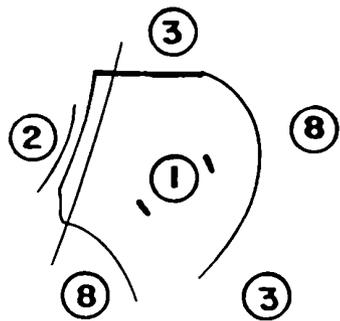
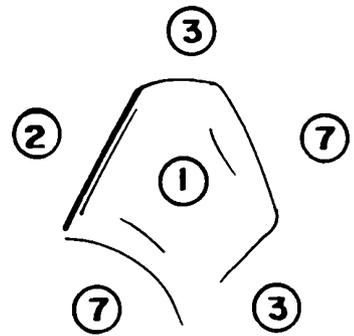
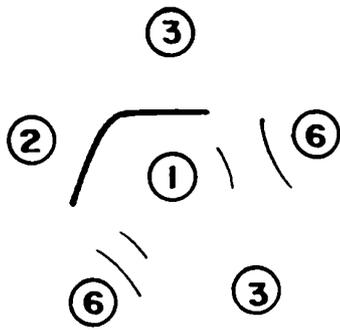
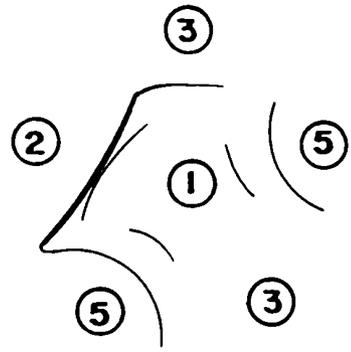
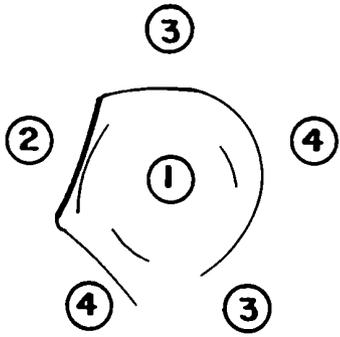


Figura 3

FIGURA 4.

Esquemas de inmunodifusión utilizando los siguientes componentes:

- 1.- Suero hiperinmune anti aftovirus C_2 en cobayo adsorbido 2 veces con células BHK₂₁ al 3%.
- 2.- Antígeno VIA (Cedido gentilmente por el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. Río de Janeiro - Brasil).
- 3.- Virus sobrenadante liofilizado C_2 (4 mg de proteínas).
- 4.- Células BHK₂₁ clon 13 liofilizadas.
- 5.- Células BHK₂₁ infectadas con aftovirus C_2 cosechadas a los 60 minutos p.i. (T_0).
- 6.- Células BHK₂₁ infectadas con aftovirus C_2 cosechadas a los 65 minutos p.i. (T_1).
- 7.- Células BHK₂₁ infectadas con aftovirus C_2 cosechadas a los 75 minutos p.i. (T_2).
- 8.- Células BHK₂₁ infectadas con aftovirus C_2 cosechadas a los 90 minutos p.i. (T_3).
- 9.- Células BHK₂₁ infectadas con aftovirus C_2 cosechadas a los 120 minutos p.i. (T_4).
- 10.- Células BHK₂₁ infectadas con aftovirus C_2 cosechadas a los 210 minutos p.i. (T_5).

Se sembraron 20 mg de proteínas por orificio de los antígenos 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10.

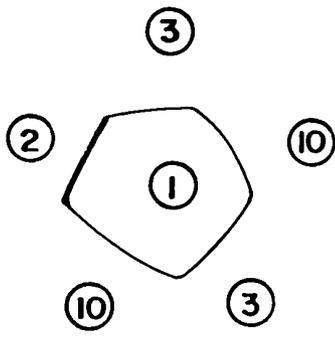
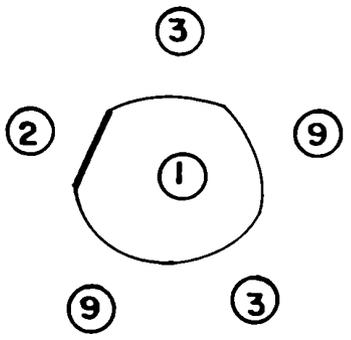
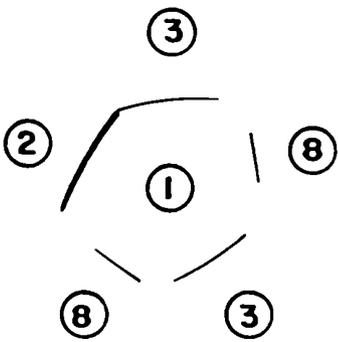
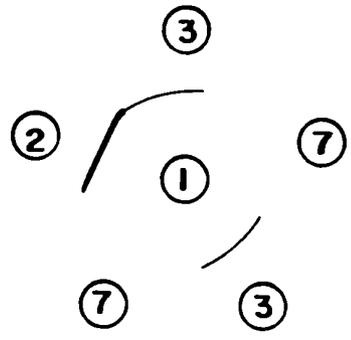
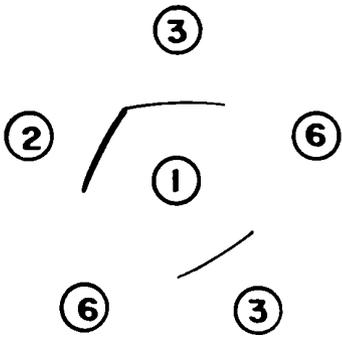
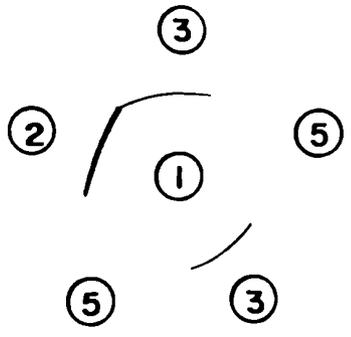
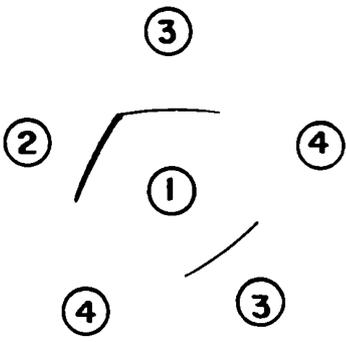


Figura 4

FIGURA 5.

Esquemas de inmunodifusión utilizando los siguientes componentes.

- 1.- Suero hiperinmune anti aftovirus tipo C en cobayo (Laboratorios Estrella - Merieux).
- 2.- Antígeno VIA (Cedido gentilmente por el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. Río de Janeiro - Brasil).
- 3.- Virus sobrenadante liofilizado C₂ (4 mg de proteínas).
- 4.- Células BHK₂₁ clon 13 liofilizadas.
- 5.- Células BHK₂₁ infectadas con aftovirus C₂ cosechadas a los 60 minutos p.i. (T₀).
- 6.- Células BHK₂₁ infectadas con aftovirus C₂ cosechadas a los 65 minutos p.i. (T₁).
- 7.- Células BHK₂₁ infectadas con aftovirus C₂ cosechadas a los 75 minutos p.i. (T₂).
- 8.- Células BHK₂₁ infectadas con aftovirus C₂ cosechadas a los 90 minutos p.i. (T₃).
- 9.- Células BHK₂₁ infectadas con aftovirus C₂ cosechadas a los 120 minutos p.i. (T₄).
- 10.- Células BHK₂₁ infectadas con aftovirus C₂ cosechadas a los 210 minutos p.i. (T₅).

Se sembraron 20 mg de proteínas por orificio de los antígenos 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10.

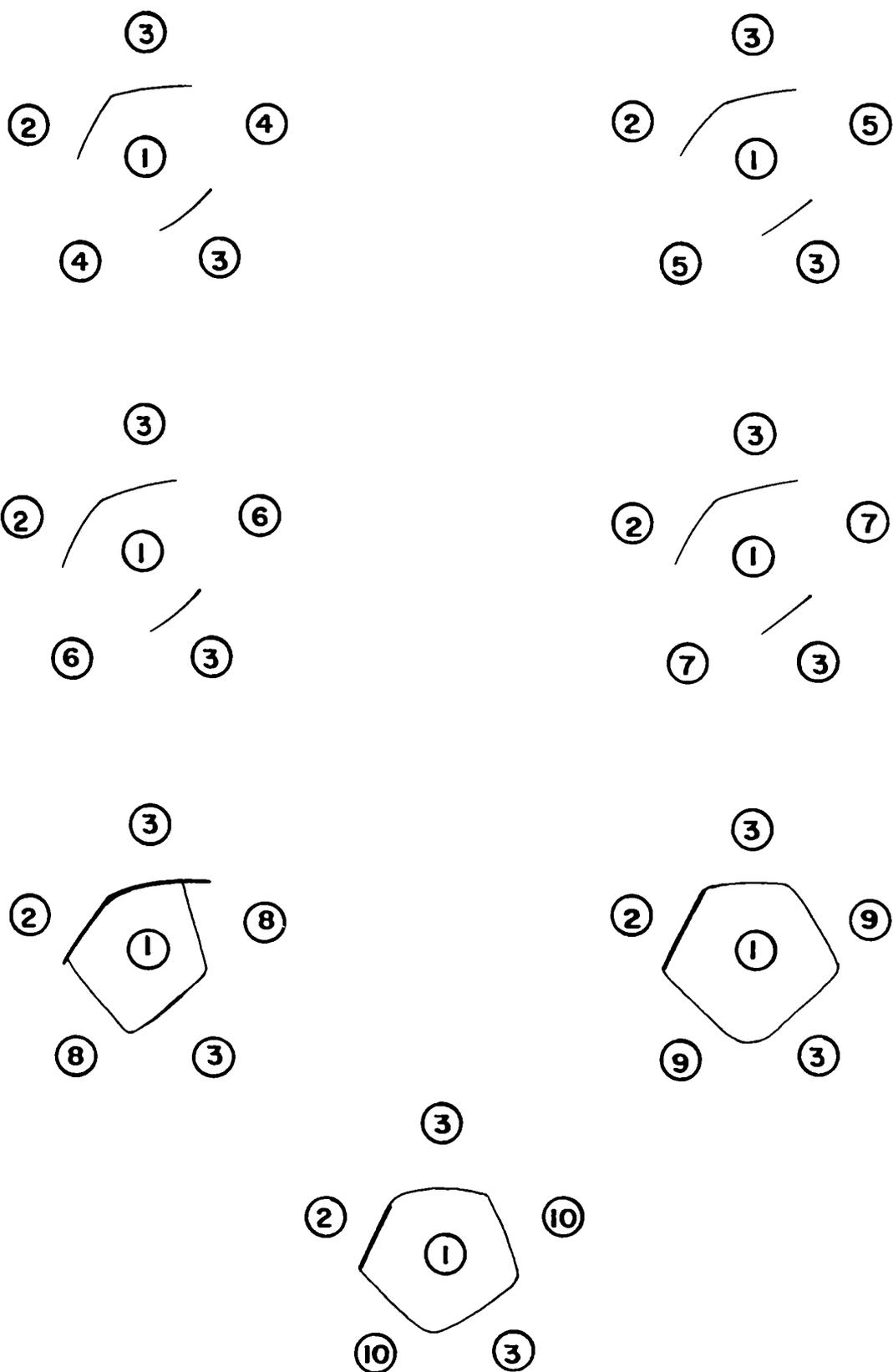


Figura 5

FIGURA 6.

Esquemas de inmunodifusión utilizando los siguientes componentes:

- 1.- Suero hiperinmune anti aftovirus tipo O de cobayo (Cedido gentilmente por Laboratorios Estrella-Merieux).
- 2.- Antígeno VIA (Cedido gentilmente por el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. Río de Janeiro - Brasil).
- 3.- Virus sobrenadante liofilizado C₂ (4 mg de proteínas).
- 4.- Células BHK₂₁ clon 13 liofilizadas.
- 5.- Células BHK₂₁ infectadas con aftovirus C₂ cosechadas a los 60 minutos p.i. (T₀).
- 6.- Células BHK₂₁ infectadas con aftovirus C₂ cosechadas a los 65 minutos p.i. (T₁).
- 7.- Células BHK₂₁ infectadas con aftovirus C₂ cosechadas a los 75 minutos p.i. (T₂).
- 8.- Células BHK₂₁ infectadas con aftovirus C₂ cosechadas a los 90 minutos p.i. (T₃).
- 9.- Células BHK₂₁ infectadas con aftovirus C₂ cosechadas a los 120 minutos p.i. (T₄).

Se sembraron 20 mg de proteínas de los antígenos 4,5,6,7,8 y 9.

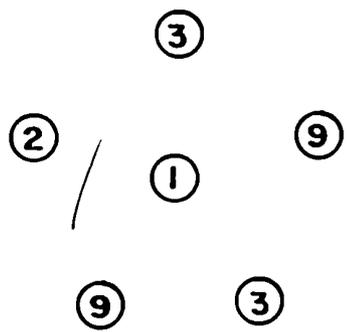
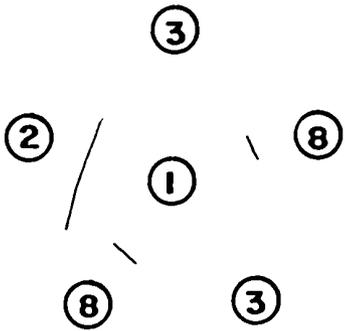
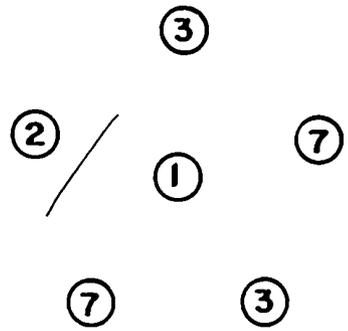
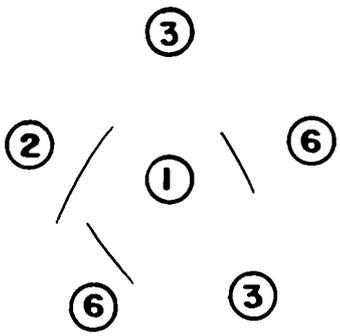
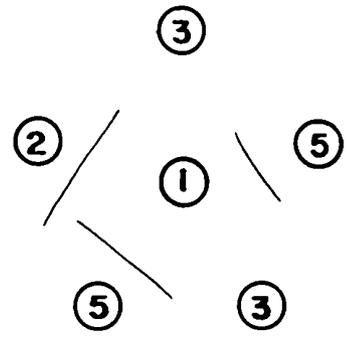
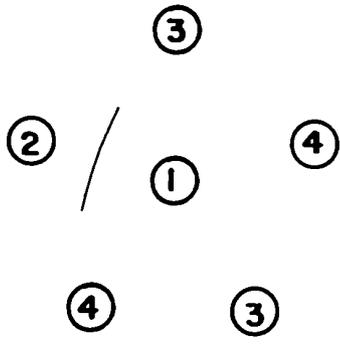


Figura 6

FIGURA 7.

Esquemas de inmunodifusión utilizando los siguientes componentes:

- 1.- Suero hiperinmune anti aftovirus tipo A de cobayo (Cedido gentilmente por Laboratorios Estrella - Merieux).
- 2.- Antígeno VIA (Cedido gentilmente por el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. Río de Janeiro - Brasil).
- 3.- Virus sobrenadante liofilizado C₂ (4 mg de proteínas).
- 4.- Células BHK₂₁ clon 13 liofilizadas.
- 5.- Células BHK₂₁ infectadas con aftovirus C₂ cosechadas a los 60 minutos p.i. (T₀).
- 6.- Células BHK₂₁ infectadas con aftovirus C₂ cosechadas a los 65 minutos p.i. (T₁).
- 7.- Células BHK₂₁ infectadas con aftovirus C₂ cosechadas a los 75 minutos p.i. (T₂).
- 8.- Células BHK₂₁ infectadas con aftovirus C₂ cosechadas a los 90 minutos p.i. (T₃).
- 9.- Células BHK₂₁ infectadas con aftovirus C₂ cosechadas a los 120 minutos p.i. (T₄).
- 10.- Células BHK₂₁ infectadas con aftovirus C₂ cosechadas a los 210 minutos p.i. (T₅).

Se sembraron 20 mg de proteínas por orificio de los antígenos 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10.

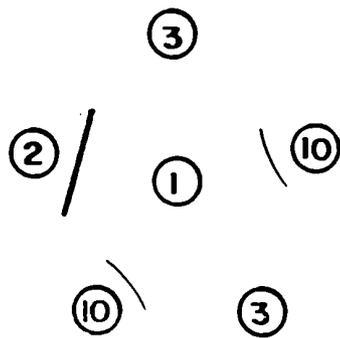
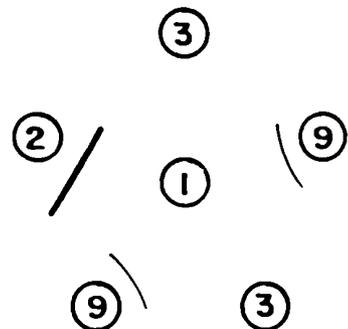
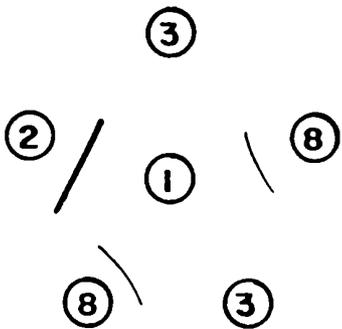
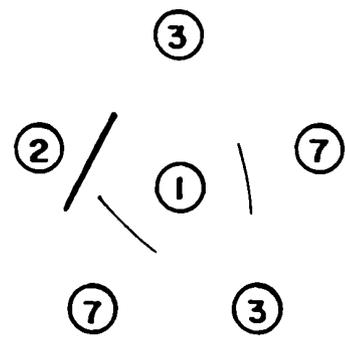
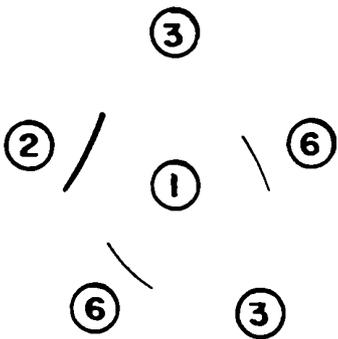
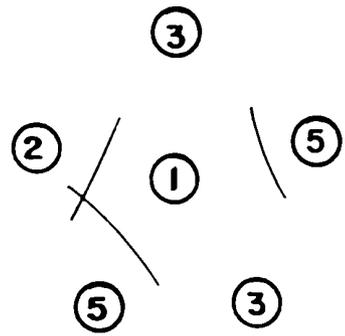
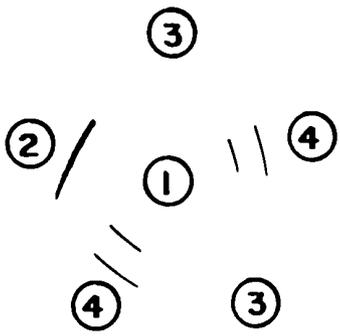


Figura 7

4.2.- Inmunofluorescencia.

Los ensayos de inmunofluorescencia realizados con sueros antivirales conjugados con isotiocianato de fluoresceína sobre monocapas de células infectadas a diferentes tiempos indicaron que al utilizar el suero de cobayo anti aftovirus tipo C se observó fluorescencia en todos los preparados antigénicos (T_0/T_6) e inclusive fluorescencia inespecífica sobre células BHK₂₁ sin infectar utilizadas como control.

Debido a éstos resultados se adsorbió el suero con células BHK₂₁ y se realizó inmunofluorescencia directa obteniéndose preparados positivos para los antígenos T_2 , T_3 , T_4 , T_5 y T_6 .

Se observó en ambos casos (suero adsorbido y no) resultados negativos en los preparados utilizados como controles negativos y la deformación del fibroblasto celular por efecto de la infección viral después de los 120' p.i. (Figuras 8 y 9).

Debido a que el inmunosuero utilizado se obtuvo por efecto de infección viral en cobayos, la fluorescencia obtenida sobre las monocapas celulares infectadas se debería a

una serie de partículas antigénicas virales producidas en el animal infectado.

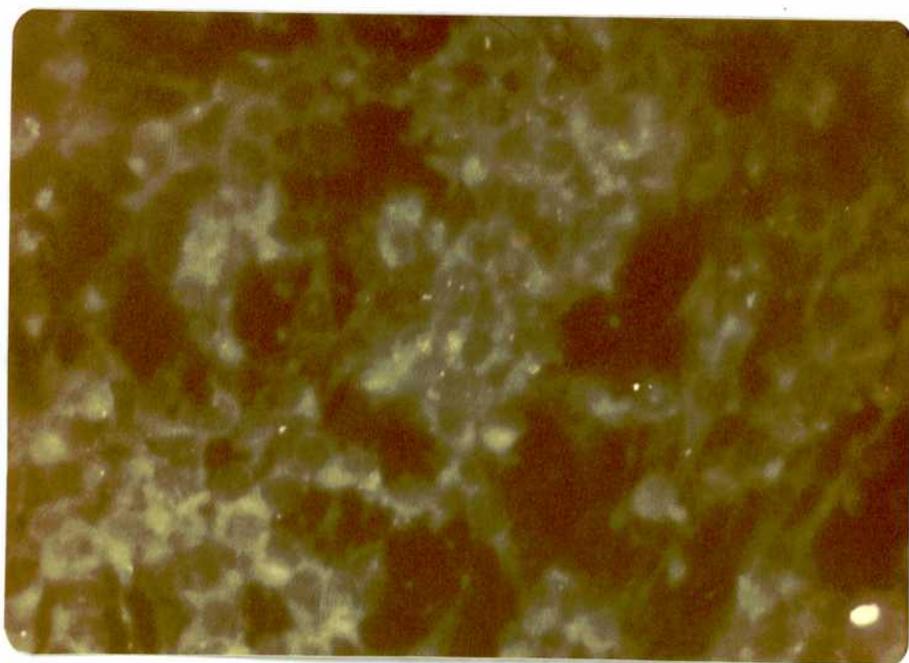
Al utilizar suero de conejo anti virus concentrado, conjugado con isotiocianato de fluoresceína y adsorbido con células BHK₂₁, para teñir las preparaciones antigénicas se observó fluorescencia en T₁, T₂, T₃, T₄, T₅ y T₆. Los controles negativos y las células BHK dieron resultados negativos (Figura 10).

Analizando los resultados obtenidos se pudo concluir que la fluorescencia observada hasta el T₄ podría deberse a virus no desadsorbido de la superficie celular, a virus residual no degradado, a la presencia de Ag VIA, a polipéptidos primarios e intermedios ó a virus formado tempranamente. En cambio la fluorescencia observada después de T₄, indicó además la salida de virus de la célula, notándose la deformación del fibroblasto y las brotaciones fluorescentes. Estos hechos indicados se obtuvieron con dos antisueros diferentes: en un caso realizado con virus inactivado en animal no susceptible a la enfermedad y en el otro en un animal que desarrolló la virosis.

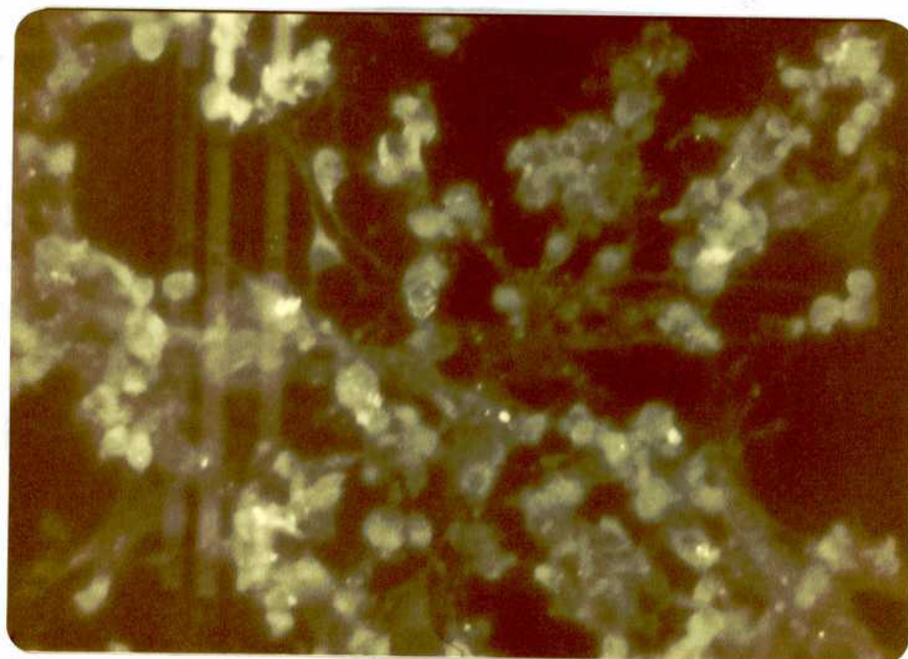
FIGURA 8.

Inmunofluorescencia directa utilizando suero de cobayo anti aftovirus tipo C conjugado con isotiocianato de fluoresceína de los antígenos:

- a) Células BHK₂₁ infectadas por 210 minutos (T₅).
- b) Células BHK₂₁ infectadas por 270 minutos (T₆).



a



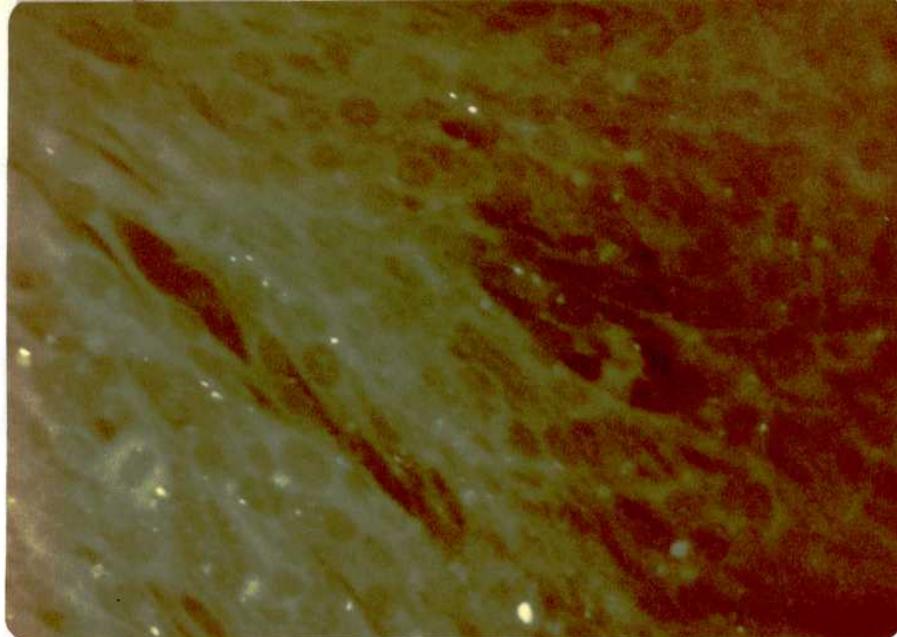
b

Figura 8

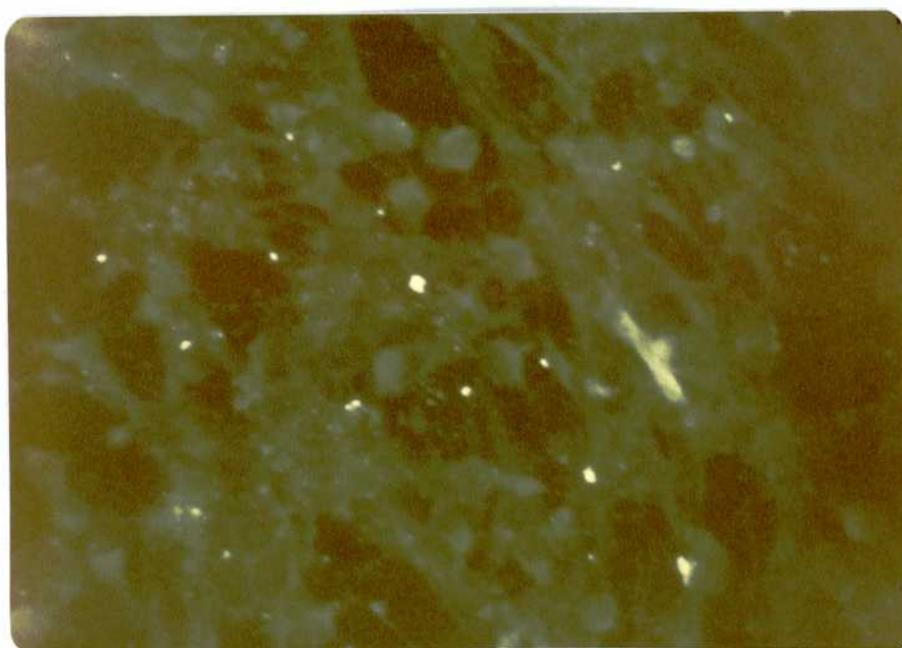
FIGURA 9.

Inmunofluorescencia directa utilizando suero de cobayo anti aftovirus tipo C conjugado con isotiocianato de fluoresceína, adsorbido con células BHK₂₁, de los antígenos:

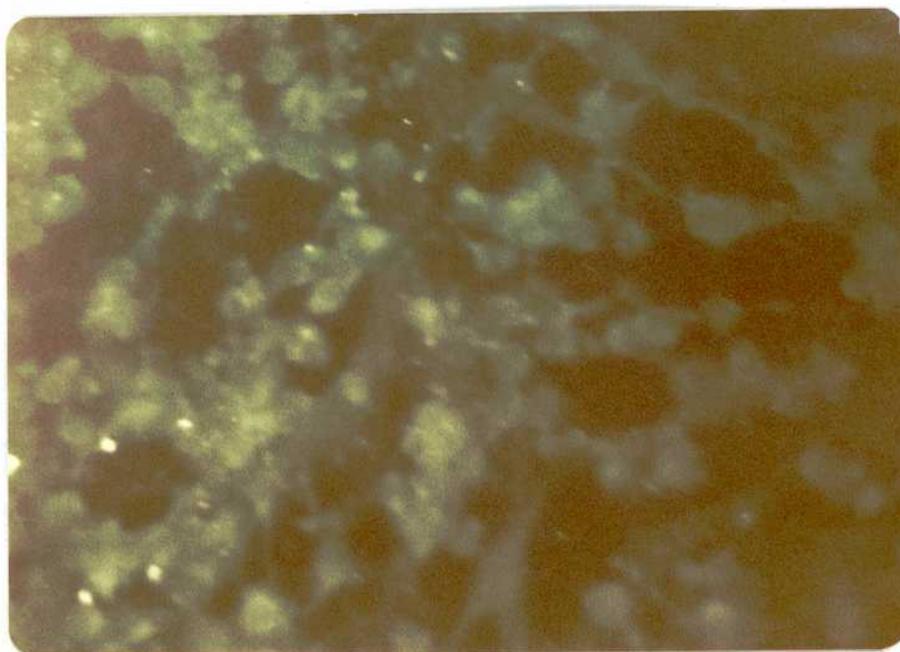
- a) Células BHK₂₁ infectadas por 90 minutos (T₃).
- b) Células BHK₂₁ infectadas por 210 minutos (T₅).
- c) Células BHK₂₁ infectadas por 270 minutos (T₆).



a



b



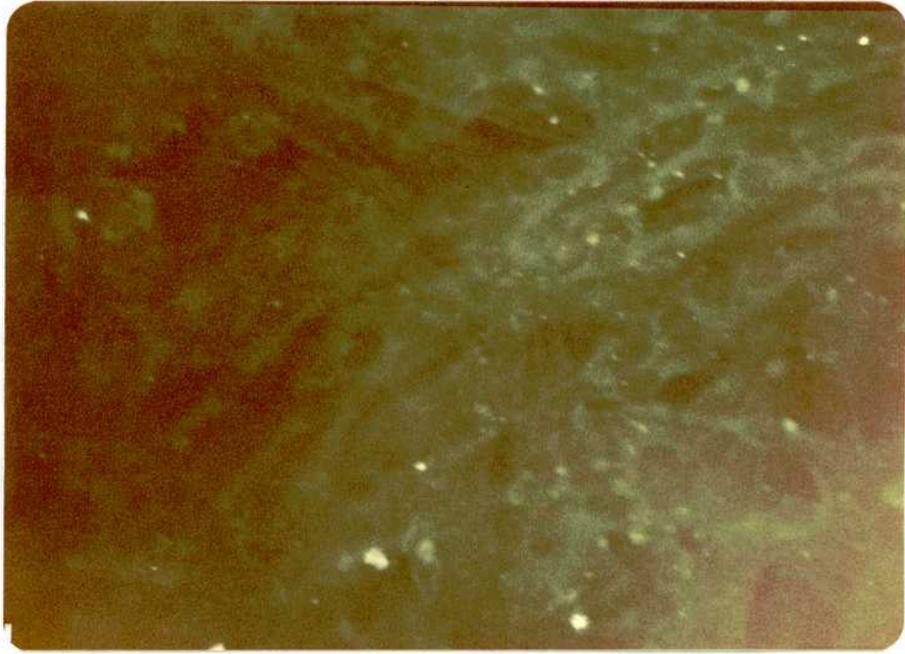
c

Figura 9

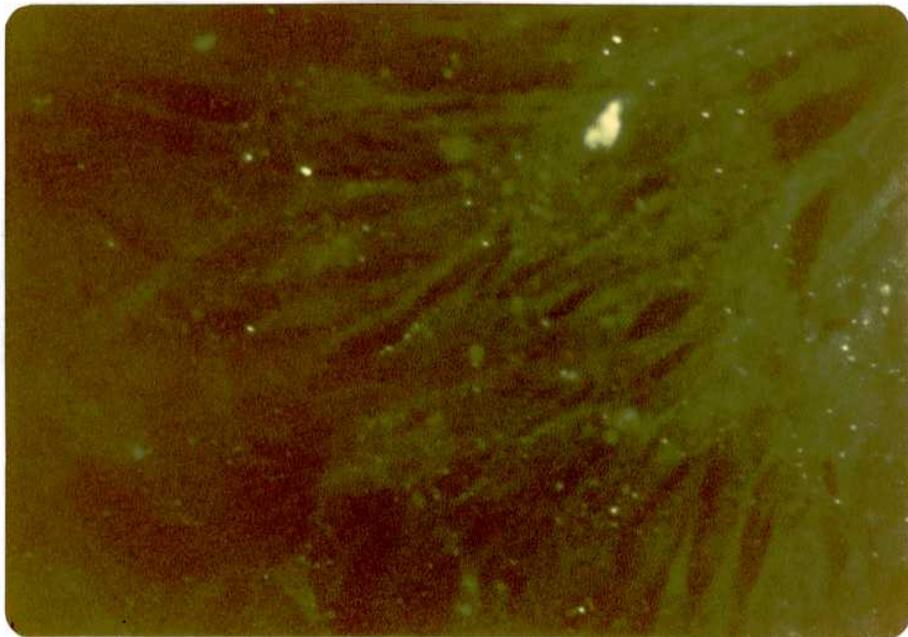
FIGURA 10.

Inmunofluorescencia directa utilizando suero de conejo anti aftovirus C₂ concentrado, conjugado con isotiocianato de fluoresceína y adsorbido con células BHK₂₁, de los antígenos:

- a) Células BHK₂₁ infectadas por 65 minutos (T₁).
- b) Células BHK₂₁ infectadas por 75 minutos (T₂).
- c) Células BHK₂₁ infectadas por 210 minutos (T₅).
- d) Células BHK₂₁ infectadas por 270 minutos (T₆).

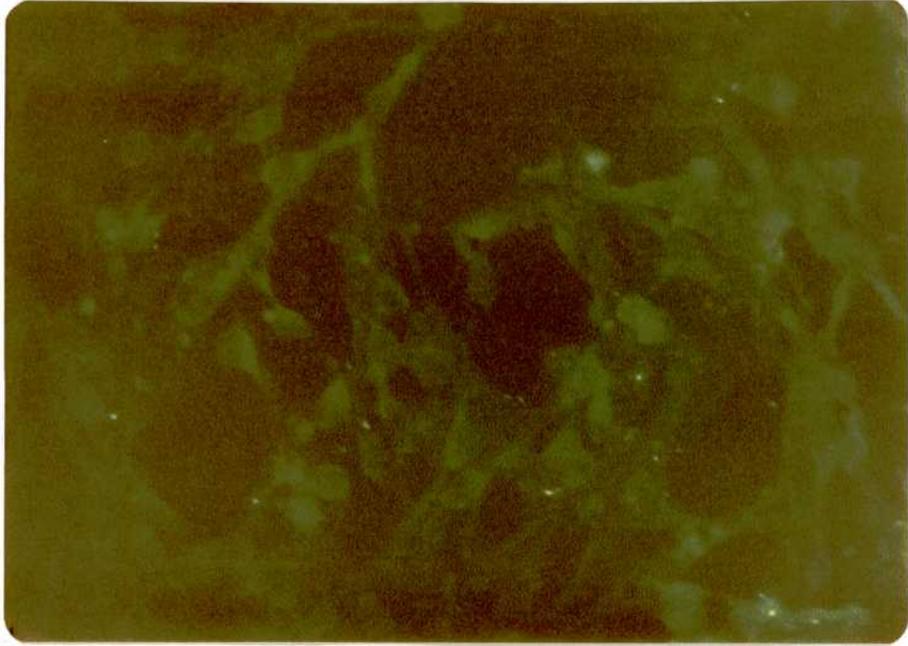


a

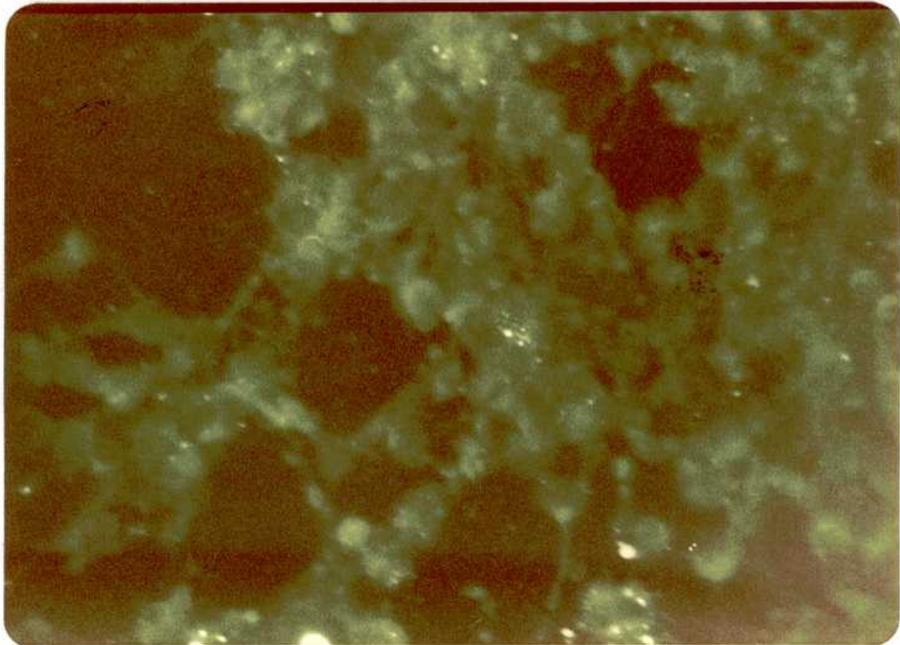


b

Figura 10



c



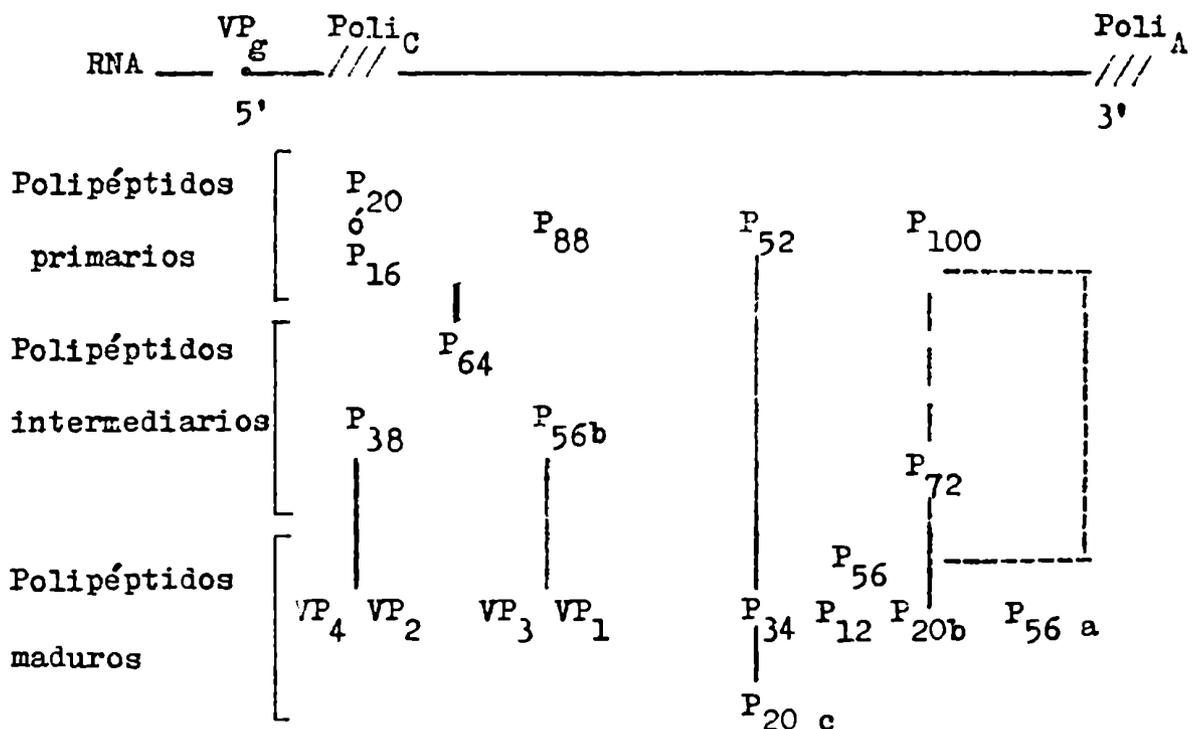
d

Figura 10

4.3.- Electroforesis en gel de poliacrilamida.

El análisis de los A_gs en electroforesis en gel de poliacrilamida, modificada por el uso de SDS (Materiales y Métodos 10.2.) se realizó comparando las bandas polipeptídicas teñidas en el gel (Figura 12) y el diagrama de picos radioactivos (Gráfico 2).

Los resultados obtenidos se interpretaron de acuerdo a los estudios de los polipéptidos inducidos por el virus en células infectadas realizados por Vande Woude y Ascione (154), Sangar (122) y Sangar y col.(123) (Figura 11) y teniendo en cuenta que según Mc Cahon (93) el mapa bioquímico del virus está formado por polipeptidos primarios, intermedarios y maduros.



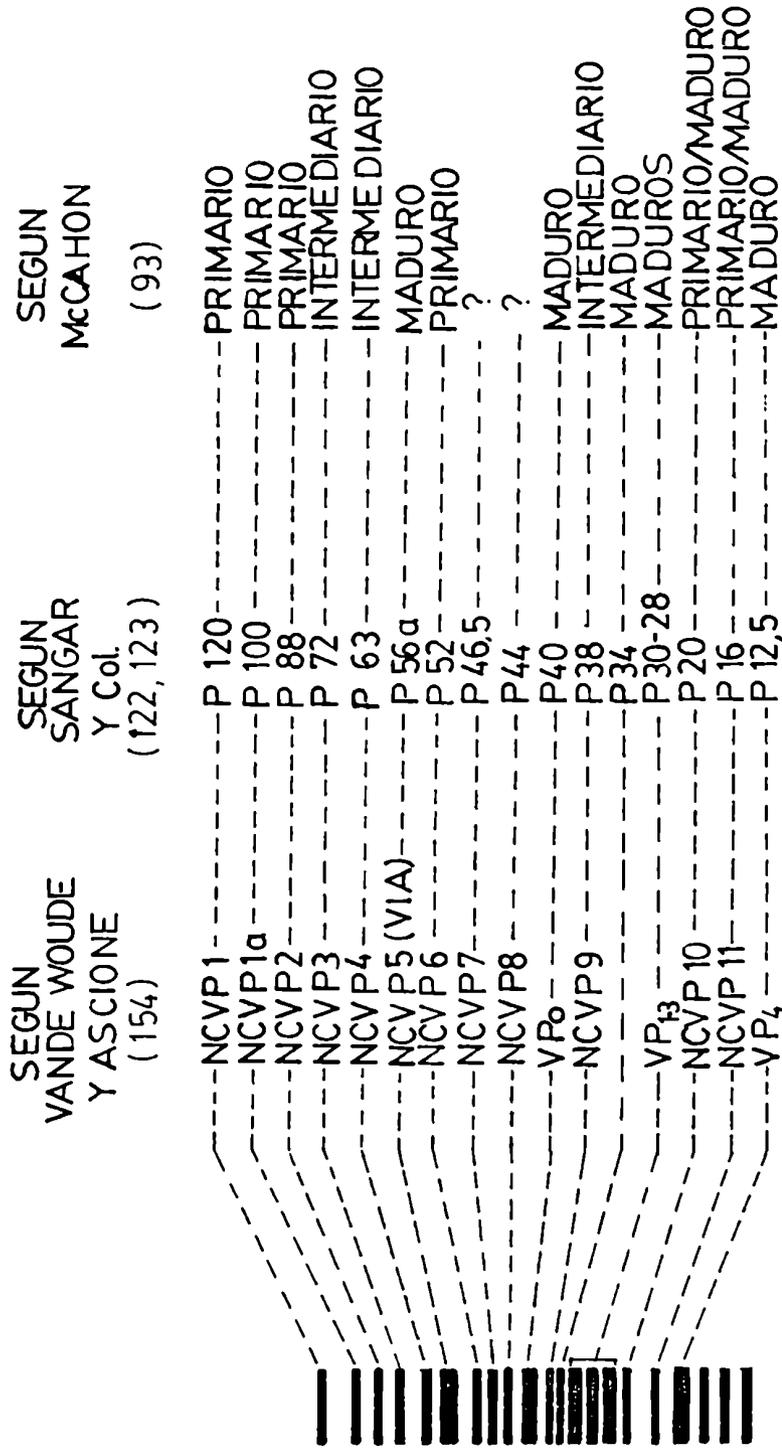


Figura 11

La representación de bandas coloreadas en el gel que se observaron (Figura 12) son solamente las originadas en células por la acción viral. Se analizaron también el virus sobrenadante de 8 y 11 hs p.i. (Figura 12 y Gráficos 2 b y c) y las células BHK₂₁ no infectadas (Figuras 12 y Gráfico 2 a).

Los estudios por análisis de bandas coloreadas y radioactivos mostraron, en general, buena correlación y los perfiles observados para los Ag T₀/T₅ fueron diferentes a los de virus sobrenadante de 8 y 11 hs p.i. y células no infectadas (Figura 12 y Gráfico 2).

Para el tiempo T₀ (60' p.i.) (Figura 12 y Gráfico 2 d) la mayor proporción de radioactividad se encontró en los polipéptidos de mayor PM (primarios), en P₂₀ y notoriamente una gran cantidad perteneciente a VP₁₋₃, lo cual podría indicar la presencia de virus adsorbido a las células ó de virus residual no degradado.

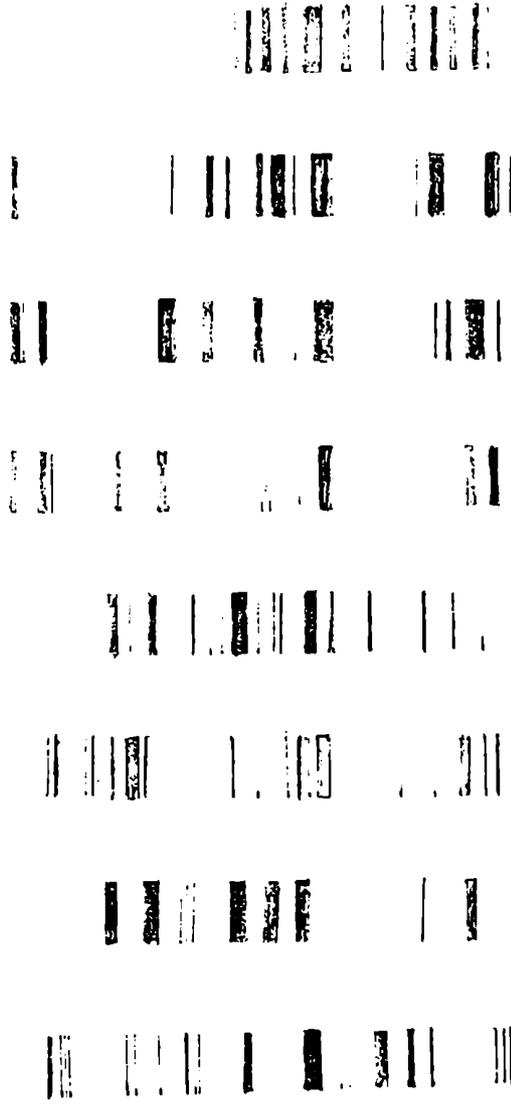
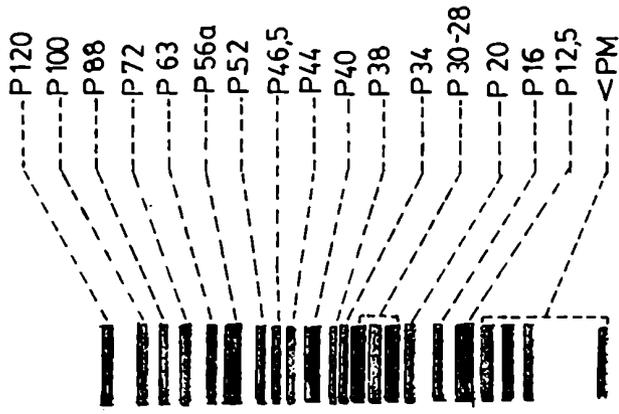
En el tiempo T₁ (65' p.i.) (Figura 12 y Gráfico 2 e) se notó un desplazamiento a polipéptidos de PM intermedio, sin disminución de los de alto PM. Se incrementaron igual-

FIGURA 12.

Esquema de las corridas de electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de diferentes antígenos. Tinción con azul de Coomasie.

- a) Células BHK₂₁ sin infectar.
- b) Virus C₂ sobrenadante de 8 hs p.i.
- c) Células BHK₂₁ infectadas por 60 minutos (T₀).
- d) Células BHK₂₁ infectadas por 65 minutos (T₁).
- e) Células BHK₂₁ infectadas por 75 minutos (T₂).
- f) Células BHK₂₁ infectadas por 90 minutos (T₃).
- g) Células BHK₂₁ infectadas por 120 minutos (T₄).
- h) Células BHK₂₁ infectadas por 210 minutos (T₅).

Se indicaron los PM de los polipéptidos x 10³. De los esquemas de Ags T₀/T₅ se eliminaron las bandas correspondientes a células BHK sin infectar.



a b c d e f g h

Figura 12

mente VIA y VP_0 en elevada proporción respecto a T_0 . Se observó aumento de proteínas de bajo PM (menor P_{16}).

A los 75' p.i. (T_2 , Figura 12 y Gráfico 2 f) se vió una proporción semejante entre polipéptidos primarios, VIA y P_{38} . El tiempo T_3 (90' p.i., Figura 12 y Gráfico 2 g) tuvo distribución similar a T_2 .

Se observó una inversión en la distribución de bandas polipeptídicas en T_4 (120' p.i., Figura 12 y Gráfico 2 h): aumento leve de las de alto PM, al doble de VP_{1-3} y tres veces de VP_4 , respecto a T_3 ; disminuyeron al 50% VIA y VP_0 .

El tiempo T_5 (210' p.i., Figura 12 y Gráfico 2 i) mostró, en líneas generales, una disminución de polipéptidos de alto PM, aunque P_{63} se mantuvo en un nivel similar que en T_4 , único hecho no concordante con las bandas coloreadas (Figura 12) que no se observaron en esa zona. Se mantuvo la cantidad de VIA y se incrementaron VP_{1-3} y VP_4 .

El análisis de todos los tiempos p.i. mostró la presencia de P_{20} y P_{16} , aunque T_0 , T_4 y T_5 los poseyeron en mayor cantidad. Así mismo todos los Ags estudiados contuvieron una proporción elevada de polipéptidos de bajo PM (menor P_{16}).

El análisis del virus sobrenadante de 8 y 11 hs p.i. (Gráfico 2 b y c) mostró diferencias: en el primero se encontraron polipéptidos de alto PM, no así en el segundo quien además tuvo disminuídos a VP_0 , VP_{1-3} y VP_4 . En consecuencia todos los análisis de éste trabajo se realizaron teniendo en cuenta el virus de 8 hs p.i. La infectividad de éstos virus fué:

Virus 8 hs p.i. = $3,6 \times 10^7$ UFP/ml.

Virus 11 hs p.i. = $10^{4.9}$ UFP/ml.

El estudio de los A_gs por electroforesis en gel de poliacrilamida clásica (Materiales y Métodos 10.1.) no mostró diferencias entre las bandas polipeptídicas de los diferentes tiempos p.i.

GRAFICO 2.

Perfil de radioactividad de electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de:

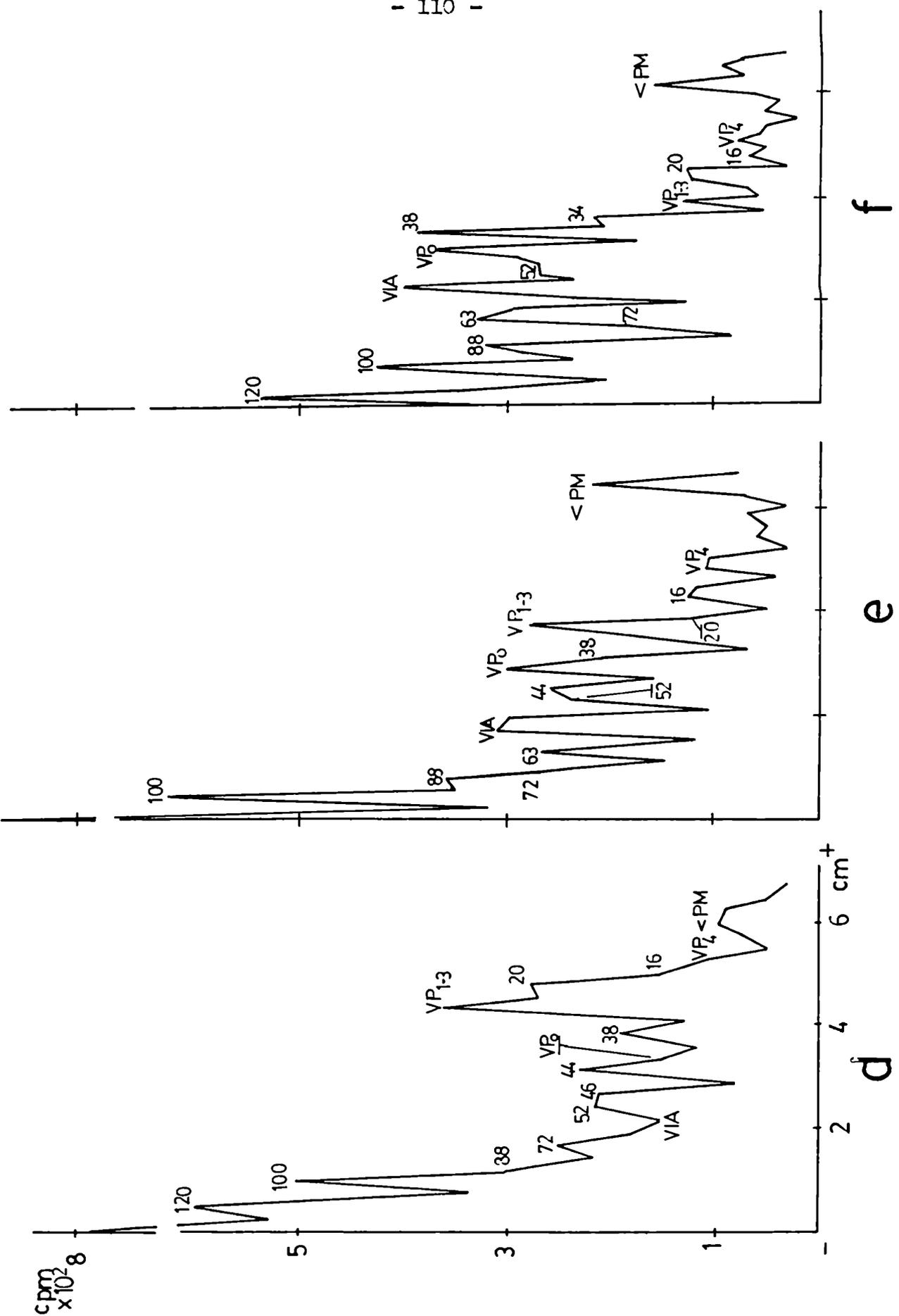
- a) Células BHK₂₁ no infectadas.
- b) Virus sobrenadante C₂ de 8 hs p.i.
- c) Virus sobrenadante C₂ de 11 hs p.i.
- d) Células BHK₂₁ infectadas con aftovirus C₂ por 60 minutos (T₀).
- e) Células BHK₂₁ infectadas con aftovirus C₂ por 65 minutos (T₁).
- f) Células BHK₂₁ infectadas con aftovirus C₂ por 75 minutos (T₂).
- g) Células BHK₂₁ infectadas con aftovirus C₂ por 90 minutos (T₃).
- h) Células BHK₂₁ infectadas con aftovirus C₂ por 120 minutos (T₄).
- i) Células BHK₂₁ infectadas con aftovirus C₂ por 210 minutos (T₅).

Los números sobre el perfil del gráfico indicaron el PM de los polipéptidos x 10³.

VP_{0,1,2,3} = polipéptidos estructurales del virus.

VIA = Ag asociado a la infección viral.

RF = Rojo fenol.

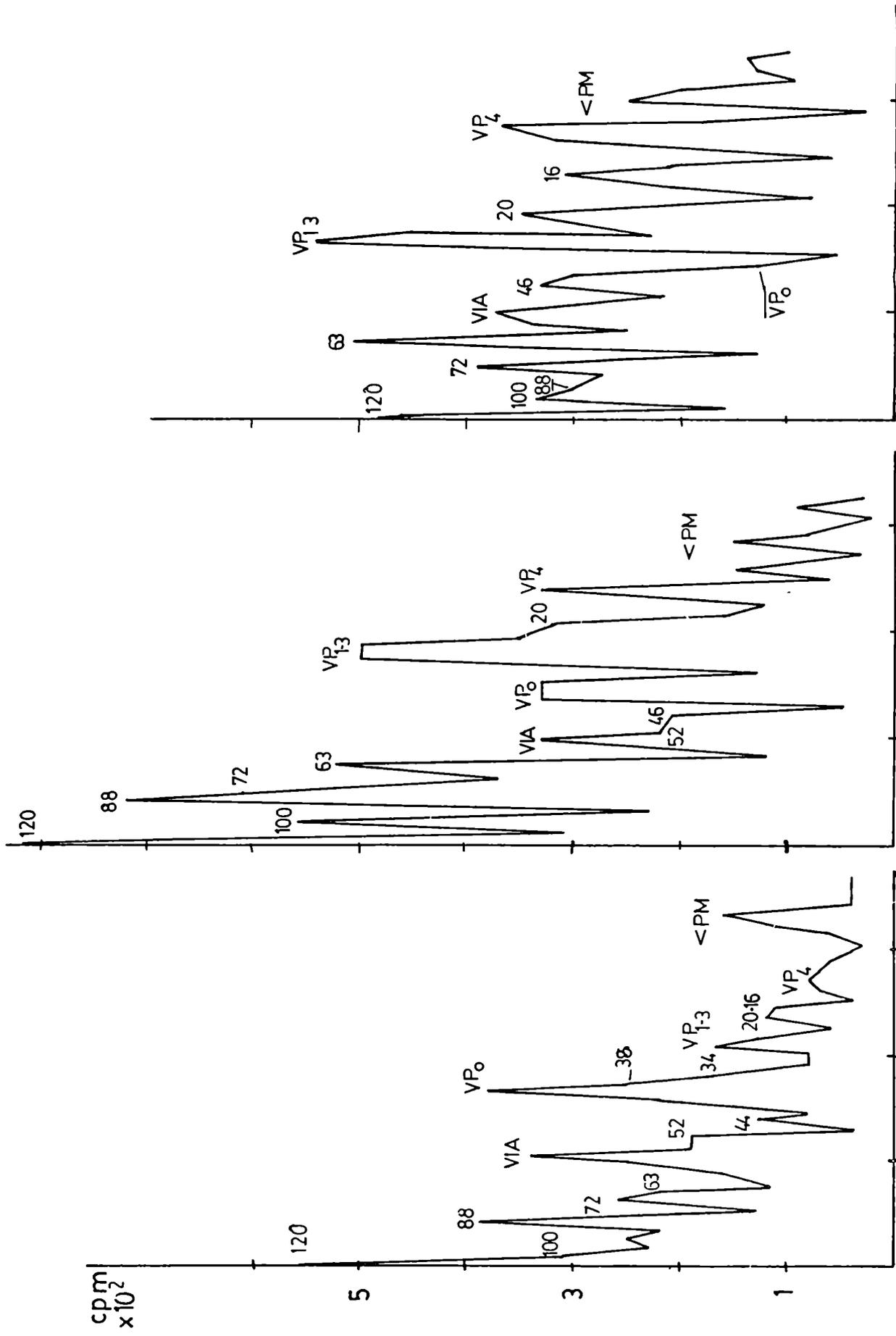


e

d

f

Gráfico 2



h
Gráfico 2

4.4.- Análisis de los sobrenadantes de células BHK₂₁ clon 13 infectadas.

Con el objeto de estudiar la aparición de aftovirus en sobrenadantes de células infectadas a diferentes tiempos, se analizaron los mismos por producción de efecto citopático.

Se infectaron las células por 60' (T₀), 65' (T₁), 75' (T₂), 90' (T₃), 120' (T₄), 210' (T₅) y 270' (T₆) minutos.

El sobrenadante del T₀ se obtuvo lavando la monocapa celular 2 veces (como en los demás tiempos) y 4 veces.

Los valores de DICT₅₀ obtenidos fueron:

Sobrenadante de tiempo	DICT ₅₀
T ₀ (lavado 2 veces)	10 ³
T ₀ (lavado 4 veces)	10 ^{4.2}
T ₁	10 ^{3.6}
T ₂	10 ⁴
T ₃	10 ⁴
T ₄	10 ^{4.4}
T ₅	10 ^{4.9}
T ₆	mayor de 10 ^{5.5}
Virus sobrenadante de 8 hs p.i.	10 ^{7.5}

Se dedujo que los datos de $DICT_{50}$ no mostraron diferencias significativas hasta el T_5 . Tampoco se observó, antes de éste tiempo una alta producción de virus. Los resultados obtenidos hasta 120 minutos p.i. podrían atribuirse a virus desadsorbido de la superficie celular o a la posible existencia de un mecanismo de liberación de virus preláptico.

4.5.- Estudio sobre la incorporación de aminoácidos tritiados a células infectadas.

Con el objeto de determinar la forma más conveniente de obtener los antígenos cosechados a diferentes tiempos post infección marcados con aminoácidos tritiados, se diseñaron tres experiencias diferentes.

Experiencia 1.

Se infectaron tubos de ensayo con monocapas de células BHK₂₁ de 48 hs de crecimiento con aftovirus C₂ marcado con aminoácidos tritiados. Luego de 1 hora de adsorción a 37°C se volcó el virus, se lavó con ME sin suero y sin aminoácidos y se agregó el mismo a los tubos; del T_0 se cosecharon las células. Los T_1/T_5 se incubaron a 37°C los tiempos indi-

cados. Un tubo se incubó por 18 hs. Se determinó cpm de células y sobrenadantes.

Paralelamente se realizaron dos experiencias con el agregado de Actinomicina D y sin ella.

Experiencia 2.

Se inocularon las células con aftovirus C₂ y aminoácidos tritiados en forma separada. El resto del tratamiento fué idéntico a la experiencia 1.

Experiencia 3.

Se infectaron las células con aftovirus C₂ y luego de la hora de adsorción se agregó junto con el medio utilizado los aminoácidos tritiados que permanecieron en contacto con las células hasta el tiempo indicado para su cosecha. El resto del tratamiento fué idéntico a la experiencia 1.

Analizando los resultados obtenidos en las tres experiencias no se observaron diferencias notorias en las cpm de células en todos los tiempos post infección estudiados. O sea que el hecho de haber colocado virus marcado, la marca separadamente del virus, o los aminoácidos tritiados luego de adsorber con virus, no condujo a resultados marcada-

mente diferentes.

Se compararon los valores con el control de virus de 18 hs de incubación, que poseyó altas cpm en el sobrenadante y bajas cpm en las células.

Los experimentos realizados con la incorporación de Actinomicina D no mostraron diferencias con aquellos donde dicha droga no se colocó.

Se seleccionó para el resto de los experimentos de marcación el primero, por la semejanza con lo que ocurriría con el ganado bovino el ser infectado, pensando que un objetivo del trabajo fué detectar en el suero de los mismos anticuerpos anti proteínas tempranas que se produjeron por efecto del virus.

5.- ESTUDIO SOBRE LOS SUEROS HIPERINMUNES EN COBAYOS

ANTI AFTOVIRUS C₂.

5.- Fraccionamiento cromatográfico.

Los sueros hiperinmunes anti aftovirus C₂ de cobayos producidos en nuestros laboratorios se analizaron para determinar cuál de los tres esquemas de inmunización se ajustaba mejor al hecho de producir una mayor síntesis de Ac protectores.

Como resultado de las cromatografías sobre DE celulosa de las gammas globulinas de sueros hiperinmunes de cobayo anti aftovirus de los tres grupos de animales, cuyo esquema de inmunización se mostró en el Cuadro 1, obtuvimos diferentes fracciones que se estudiaron por I.E.F. para determinar su movilidad electroforética y pureza y por seroprotección en ratón lactante y seroneutralización (31) para establecer la actividad biológica de los anticuerpos de las mismas.

Para analizar los índices de seroprotección en ratón lactante (IPR) y seroneutralización por reducción del 80% de UFP (IN 80) se tomó como valor 1 el de las gammas globulinas totales y se refirieron a éste los valores de cada fracción (actividad de Ac relativa) para cada grupo de in-

CUADRO 1.

Características de los esquemas de inmunización utilizados para obtener sueros hiperinmunes de cobayo contra aftovirus.

sc = subcutánea.

idp = intradermo plantal.

a = mezcla de 10 animales por cada grupo.

Esquema de Inmunización	Duración (semanas)	N° de inyecciones			Ag inyectado		
		Totales	Via sc	Via idp	Vol (ml)	Masa proteica (mg)	Infectividad UFP x 10 ⁸
Grupo 1 ^a	3	6	4	2	1,80	6,05	1,98
Grupo 2 ^a	7	15	9	6	4,50	15,12	4,95
Grupo 3 ^a	9	18	12	6	5,40	18,14	5,94

CUADRO 1.

munización (Cuadro 2).

Analizando el Cuadro 2 se vió que la recuperación mayor de actividad de Ac no coincidió con la mayor concentración proteica y que los mayores índices se localizaron, en general, en las fracciones γ_2 puras y fracciones mezcla.

Del análisis de los Cuadros 1 y 2 se observó que entre los tres grupos de inmunización no se encontraron diferencias destacables en sus valores de IPR a pesar del aumento creciente de inyecciones que recibieron los animales por vías s.c. e i.d.p. La conclusión fué que en nuestro caso, estimulaciones con virus vivo, utilizando saponina como adyuvante, dieron lugar a inmunosueros en los cuales un estímulo por mas tiempo con mayor cantidad de Ag no rindió en una mayor protección y neutralización y los mayores índices de éstas actividades se encontraron en fracciones γ_2 y mezcla, donde existieron proteínas de movilidad β .(31).

CUADRO 2.

Índice de actividad de anticuerpo relativa de las fracciones cromatográficas de los 3 grupos de inmunización relacionado con la concentración proteica y la movilidad electroforética.

IPR = Índice de seroprotección en ratón lactante; valor significativo $IPR \geq 2,0$.

IN80 = Seroneutralización por el método de reducción del 80% de UFP.

a Referido a índice = 1,00 para las *gamma* globulinas totales.

Valores de *gamma* globulinas totales para:

Grupo 1 = IPR mayor de 6,2 IN80 mayor de 3,1.

Grupo 2 = IPR mayor de 5,6 IN80 mayor de 3,1.

Grupo 3 = IPR mayor de 6,8 IN80 mayor de 3,1.

b Valores no significativos en IPR.

Grupo N°	Fracción	Concentración proteica (mg/ml)	Movilidad Electroforética	Indices ^a	
				IPR	IN80
1	Gamma glo bulinas	21,0	$\gamma_2 \quad \gamma_1 \quad \beta_2$	1,00	1,00
	A	15,4	γ_{2a}	0,55	1,00
	B	2,7	$\gamma_2 \quad \gamma_1 \quad \beta_2$	0,50	0,00
	C	0,9	γ_{2a}	0,35	0,00
	D	7,3	$\gamma_2 \quad \gamma_1 \quad \beta_2$	1,00	1,00
	E	2,1	γ_{2b}	1,00	0,52
	F	2,2	γ_{1a}	0,45	0,45
	G	1,2	γ_{1b}	0,00	0,00
2	Gamma glo bulinas	27,7	$\gamma_2 \quad \gamma_1 \quad \beta_2 \quad \beta_1$	1,00	1,00
	A	11,6	$\gamma_2 \quad \gamma_1$	1,00	0,74
	B	2,5	γ_2	1,00	0,48
	C	2,2	$\gamma_1 \quad \beta_1$	0,37	0,61
	D	1,0	$\gamma_1 \quad \beta_1$	0,35	0,45
	E	1,0	γ_{1a}	0,27 ^b	0,00
	F	1,0	γ_{1b}	0,21 ^b	0,00
3	Gamma glo bulinas	16,7	$\gamma_2 \quad \gamma_1 \quad \beta_2 \quad \beta_1$	1,00	1,00
	A	8,2	γ_2	1,00	0,39
	B	8,6	$\gamma_2 \quad \gamma_1 \quad \beta_1$	0,65	1,00
	C	3,6	$\gamma_1 \quad \beta_1$	0,29	0,71
	D	1,6	γ_1	0,16 ^b	0,00
	E	1,3	γ_1	0,15 ^b	0,35

CUADRO 2.

6.- ESTUDIO SOBRE LOS ANTISUEROS PRODUCIDOS EN CONEJOS
CONTRA CELULAS BHK₂₁ COSECHADAS A DIFERENTES TIEMPOS
POST-INFECCION.

6.- Seroprotección en ratones lactantes.

Los valores de los IPR en ratón lactante de los antisueros de conejo correspondientes a 75 (T_2), 120 (T_4) y 210 (T_5) minutos post infección fueron respectivamente 2,8; 1,4 y 1,9 (valor significativo mayor de 1,7).

Se comprobó que de los antisueros de conejos inmunizados con aftovirus subtipo C_2 , sólo tenían algún efecto protector los correspondientes a 75 (T_2), 120 (T_4) y 210 (T_5) minutos p.i. (Cuadro 3). Analizando los resultados de estos tres tiempos se vió que la diferencia entre el antisuero T_2 y los otros dos fué altamente significativa (p menor de 0,001 para T_2-T_4 y p menor de 0,01 para T_2-T_5). En cambio entre los T_4-T_5 fué significativa (p menor de 0,05). Por otra parte los sueros de conejos antivirius concentrado, antivirius sobrenadante y anticélulas BHK no infectadas no presentaron efecto protector. Tampoco el suero de conejo anti antígeno VIA presentó protección significativa. Como control de protección total se utilizó al suero hiperinmune de cobayo contra virus de la fiebre aftosa subtipo C_2 .

Para determinar la especificidad de los antisueros

contra virus y subtipo se hizo la prueba de seroprotección en ratón lactante con los sueros de conejo anti células BHK, T₂, T₄ y T₅ usando virus Sindbis y los subtipos de aftovirus A₂₄ y O₁ para el desafío. No se obtuvo protección contra el virus Sindbis, ni contra los subtipos A₂₄ y O₁; sólo presentó sobrevida el suero anti T₂ contra el virus O₁, aunque ella no fué significativa.

CUADRO 3.

Protección que confieren al ratón lactante los sueros de conejo inmunizados con células BHK₂₁ obtenidas a diferentes tiempos post-infección con aftovirus.

Diferencias estadísticas entre grupos:

T₂ y T₄, "t" = 5,05 ; p menor de 0,001

T₄ y T₅, "t" = 2,14 ; p menor de 0,05

T₂ y T₅, "t" = 3,26 ; p menor de 0,01

DIAS DE OBSERVACION DE LOS RATONES	S U P E R V I V A											
	VIRUS D11 10-3 (control sin suero)						TIEMPOS POST INFECCION DE LAS CELULAS EN MINUTOS					
	75 (T ₂)		120 (T ₄)		210 (T ₅)		75 (T ₂)		120 (T ₄)		210 (T ₅)	
	VIVOS	MUERTOS	VIVOS	MUERTOS	VIVOS	MUERTOS	VIVOS	MUERTOS	VIVOS	MUERTOS	VIVOS	MUERTOS
1	78	0	101	0	35	0	39	0	0	0	0	0
2	0	78	51	50	4	31	15	24	0	0	0	0
3			19	32	1	3	1	14	0	0	0	0
4			7	12	0	1	1	0	0	0	0	0
5			2	5			1	0	0	0	0	0
6			2	0			0	1	0	0	0	0
7			2	0								
TIEMPO PROMEDIO HASTA LA MUERTE	1		2,82		2,14		2,37		2,14		2,37	
DESVIACION ESTANDAR			1,13		0,43		0,49		0,43		0,49	

CUADRO 3.

7.- ESTUDIO SOBRE LOS SUEROS DE BOVINOS VACUNADOS
E INFECTADOS CON AFTOVIRUS.

7.- Análisis de sueros bovinos de animales infectados y vacunados con aftovirus por electroforesis en gel de poli-acrilamida y por densitografía.

Se utilizaron sueros bovinos de animales de prueba de vacunas cuyas sangrías se describieron en Materiales y Métodos, sección 6 que se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida clásica y analizaron sus proteínas por densitografía (Materiales y Métodos sección 10.1.).

Los sueros llamados testigos son de bovinos sin vacunar, a los cuales se les realizó la descarga de 10.000 DI50 de un tipo de virus determinado. Los sueros de animales de prueba son vacunados y luego infectados con igual dosis de virus.

Se analizaron sueros de animales de los Laboratorios Estrella-Merieux y de Senasa (Selab) desafiados con aftovirus tipo A, O y C separadamente. Las fotos y densitografías corresponden a sueros de bovinos de Estrella-Merieux desafiados con virus tipo C. Los resultados respecto a los animales de Selab y desafiados con virus A y O dieron resultados similares.

CUADRO 4.

Concentración de proteínas totales, en mg/100 ml según el método de Lowry de sueros de bovinos testigos y vacunados e infectados.

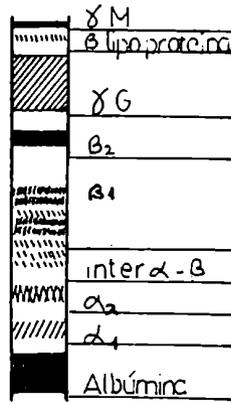
C O N C E N T R A C I O N P R O T E I

(mg / 100 ml)

SUERO N°	T E S T I G O S							V A C U N A D O S							E I N F E C T A D O S																				
	49-50	17-18	551-552	577-578	561-562	71-72	41-42	575-576	531-532	79-80	541-542	525-526	15,0	18,4	-	-	9,6	12,0	7,3	9,7	19,2	10,4	-	15,6	-	-	8,4	20,0	18,8	18,8	17,6	19,2	22,4		
SANGRIA 1																																			
SANGRIA 2																																			
SANGRIA 3																																			
SANGRIA 4																																			
SANGRIA 5																																			
SANGRIA 6																																			
SANGRIA 7																																			

El Cuadro 4 mostró los valores de proteínas totales de los sueros estudiados; se sembraron 250 γ de proteínas de cada suero en los geles. Analizando la cantidad proteica encontrada no se observaron diferencias significativas. A pesar de ésto, los datos de sueros de animales testigos variaron menos que los de animales vacunados, notándose en éstos que, aún con variaciones individuales, existió un aumento leve pero sostenido desde la 5a. hasta la 7a. sangría, o sea, luego de la descarga.

Se analizaron los sueros por electroforesis para observar que bandas sufrían variaciones en el curso de las sangrías a nivel de anticuerpos ó proteínas séricas, comparando los resultados en sueros pre y post infección en animales vacunados y no vacunados (Figuras 13 - 33). Se establecieron las diferentes zonas de migración de proteínas con distinta movilidad según el siguiente esquema: (15, 39, 77, 139)



Analizando los sueros de animales testigos se vió que el bovino 17-18 (Figuras 13 y 24) presentó en su sangría 5a. (3 días post descarga) respecto a la sangría previa (N° 1, 21 días predescarga) un aumento notorio en la zona de α_1 , γ e inter $\alpha - \beta$ globulinas. La sangría 6a. (7 días post infección) presentó respecto a la 5a. un mayor aumento en α_1 , leve aumento en α_2 y β_2 , disminuyendo la zona inter $\alpha - \beta$, mientras que las γ globulinas se notaron más amplias y difusas. La sangría 7a. disminuyó levemente la zona α_1 y β , aunque respecto al suero previo existió mayor concentración

en las bandas, notandose que algunas α_2 se mantienen y otras aumentan. La zona β_2 experimentó un leve aumento, observandose que en la zona inter $\alpha - \beta$ aumentaron bandas anteriormente débiles y disminuyeron otras mas fuertes (inversión en concentración). Analizando la IgM se vió que sólo la 5a. sangría mostró aumentada esta proteína.

El suero 49-50 (Figuras 14 y 25) presentó en su 5a. sangría un aumento muy notorio en la zona α_1 , α_2 y γ ; ésta última se tornó más difusa. La 6a. sangría, respecto de la 5a., mostró que se mantuvo el aumento de α_1 y α_2 y aparecieron aumentadas las zonas β_1 , β_2 e inter $\alpha - \beta$, mientras que la zona de γ globulinas aumentó en difusión y concentración. En la 7a. sangría se observó similitud con la 6a., invirtiendose el aumento en inter. $\alpha - \beta$. Se vió un aumento de IgM en 6a. y 7a. sangría. El suero 51-52 (Figuras 15 y 26), presentó en su 6a. sangría un aumento notorio en α_1 , α_2 e inter $\alpha - \beta$ y leve en β_1 , β_2 y γ respecto a la 5a.

El suero 77-78 (Figuras 16 y 26) presentó en la 6a. sangría una leve disminución en α_1 , α_2 e inter $\alpha - \beta$,

mientras que las γ y β globulinas se mantuvieron, respecto a la 5a. sangría.

De éstos 2 últimos sueros no se obtuvieron sangrías previas. Tampoco se observaron variaciones en la Igm.

Las conclusiones del análisis de los sueros testigos son que en líneas generales, se observó una similitud en el aumento de bandas proteicas respecto a la sangría previa, aunque existieron diferencias en algunos animales, que se manifestaron como una respuesta individual.

Los sueros de animales vacunados e infectados, se pueden agrupar, según la similitud en la respuesta observada en el análisis de sus proteínas séricas. Del estudio surgió que los sueros 525-526 (Figuras 17 y 27), 531-532 (Figuras 18 y 28) y 41-42 (Figuras 19 y 29) mostraron una respuesta similar a la vacunación (sangrías 1a. a 4a.) y a la descarga (sangrías 5a. en adelante), aunque con leves variaciones individuales.

En la sangría N° 2 presentaron aumento de todas las fracciones proteicas respecto a la 1a. En la sangría N° 3 disminuyen levemente las α_2 e inter $\alpha - \beta$ (suero 525-526) y las α_1 y α_2 (suero 531-532), mientras que las otras

fracciones se mantuvieron, pero en el suero 41-42 la disminución fué notoria en α_1 , α_2 , β_2 e inter $\alpha - \beta$. En el suero 531-532, la 4a. sangría mostró aumento de todas las fracciones respecto a la 3er. sangría, mientras que en el 41-42 aumentaron α_1 , α_2 e inter $\alpha - \beta$ y en el suero 525-526 disminuyeron levemente α_1 , α_2 y β_1 , manteniendose el resto de las fracciones proteicas en los mismos niveles.

La 5a. sangría presentó en los tres sueros un aumento notorio en α_2 e inter $\alpha - \beta$, mientras que las otras proteínas aumentaron, aunque en forma leve. La 6a. sangría mostró una leve disminución en las fracciones inter $\alpha - \beta$ globulinas. La 7a. sangría aumentó los niveles de inter $\alpha - \beta$ globulinas para los tres sueros, especialmente el 531-532 donde la banda aparecida a éste nivel es notoria.

Analizando la IgM se vió que el suero 41-42 presentó aumento de su nivel en la 6a. sangría mientras que en el suero 531-532 se mantuvo constante. El suero 525-526 presentó iguales niveles de IgM en todas las sangrías, observándose en la 3a. una banda adicional a ese nivel que podría ser β lipoproteína. O sea que los tres animales respondieron en

forma semejante a la vacunación, especialmente a los 21 días (4a. sangría) mostrando un incremento en todas las fracciones séricas proteicas, con leves diferencias, especialmente a nivel de inter $\alpha - \beta$ globulinas, hecho que también se manifestó en la respuesta a la descarga en los tres sueros (sangrías 5a. en adelante).

El segundo grupo de sueros cuyo análisis dió resultados semejantes fueron los número 575-576 (Figuras 20 y 30) y 71-72 (Figuras 21 y 31) que no respondieron a la vacunación hasta el día 21 (4a. sangría) ya que sus niveles de proteínas séricas no mostraron diferencias en las sangrías 1a., 2a. y 3a. Recién en la 4a. sangría se observó un incremento proteico en todas las fracciones.

La respuesta a la descarga con virus fué diferente en estos dos sueros. El suero 575-576 mantuvo iguales niveles de proteínas séricas en la 5a. sangría respecto a la 4a., mientras que en la 6a. el aumento fué notorio en α_1 , β_1 y β_2 . En cambio la 5a. sangría del suero 71-72 mostró aumento en todas las fracciones, especialmente en β_1 e inter $\alpha - \beta$ y una leve disminución en la 6a. sangría que

continua en la 7a. Analizando la IgM se observó un aumento en la 6a. sangría del suero 575-576 y en las sangrías 4a., 5a., 6a. y 7a. del suero 71-72. Un caso particular en la respuesta constituyó el suero 79-80 (Figuras 22 y 32), el cual respondió a la vacunación con aumento en la 2a. sangría de inter $\alpha - \beta$ y en la 3a. de α_1 , β_1 e inter $\alpha - \beta$. La 4a. sangría mostró incremento de todas las fracciones proteicas. En general, en el curso del tiempo, éste suero mostró un aumento de niveles de α_2 e inter $\alpha - \beta$ luego de la descarga (sangrías 6a. y 7a.). La IgM se observó aumentada en las sangrías 3a., 4a., 6a. y 7a.

El suero 561-562 (Figuras 23 y 33) mostró una respuesta individual a la vacunación y descarga, ya que su 2a. sangría aumentó todas las proteínas, mientras que las sangrías 3a. y 4a. son similares. La 5a. sangría mostró un leve aumento de α_1 y α_2 e inversiones en inter $\alpha - \beta$ y la 6a. una disminución de todas las bandas. La IgM se observó aumentada en 2a. sangría.

De todos los sueros analizados, sólo uno (541-542) no mostró diferencias en los análisis en geles de sus proteínas, ni a la

vacunación ni a la descarga, observándose sólo una leve inversión en inter $\alpha - \beta$. De éste suero no se recibieron sangrías previas.

Diferencias entre testigos sin vacuna y animales vacunados e infectados.

Comparando los sueros testigos y los sueros 525-526, 531-532 y 41-42, quienes respondieron igual a la vacunación, se observó que dichos sueros de animales vacunados e infectados, respondieron a la descarga en forma similar a los sueros testigos.

Los sueros 575-576 y 71-72 respondieron igual a la vacunación pero diferente a la descarga y relacionándolos con las respuestas de sueros testigos se observó que el suero 575-576 responde en 6a. sangría como los testigos en 5a., o sea, que existió en el suero un desplazamiento de 4 días en la respuesta respecto a los testigos, hecho que podría atribuirse a un enmascaramiento en la 5a. sangría debido a proteínas aumentadas por efecto de la vacunación.

El suero 71-72 respondió a la descarga en forma diferente a los testigos, desde el punto de vista de concentra-

ciones proteicas. Existieron en éste animal leves diferencias de inversión en concentraciones, respecto a los testigos.

En general, se pudo decir que la respuesta de los sueros de animales testigos a la infección fué similar, con algunos casos particulares. La respuesta de animales vacunados a la infección fué semejante a la de los testigos, con casos particulares cuya respuesta se asemeja a los casos particulares señalados en sueros testigos (P. ej. suero 561-562 y testigo 77-78).

FIGURAS 13 a 16.

Espectrodensitografías a 590 nm de geles de poliacrilamida clásica, teñidos con azul de Coomasie de sueros de animales testigos.

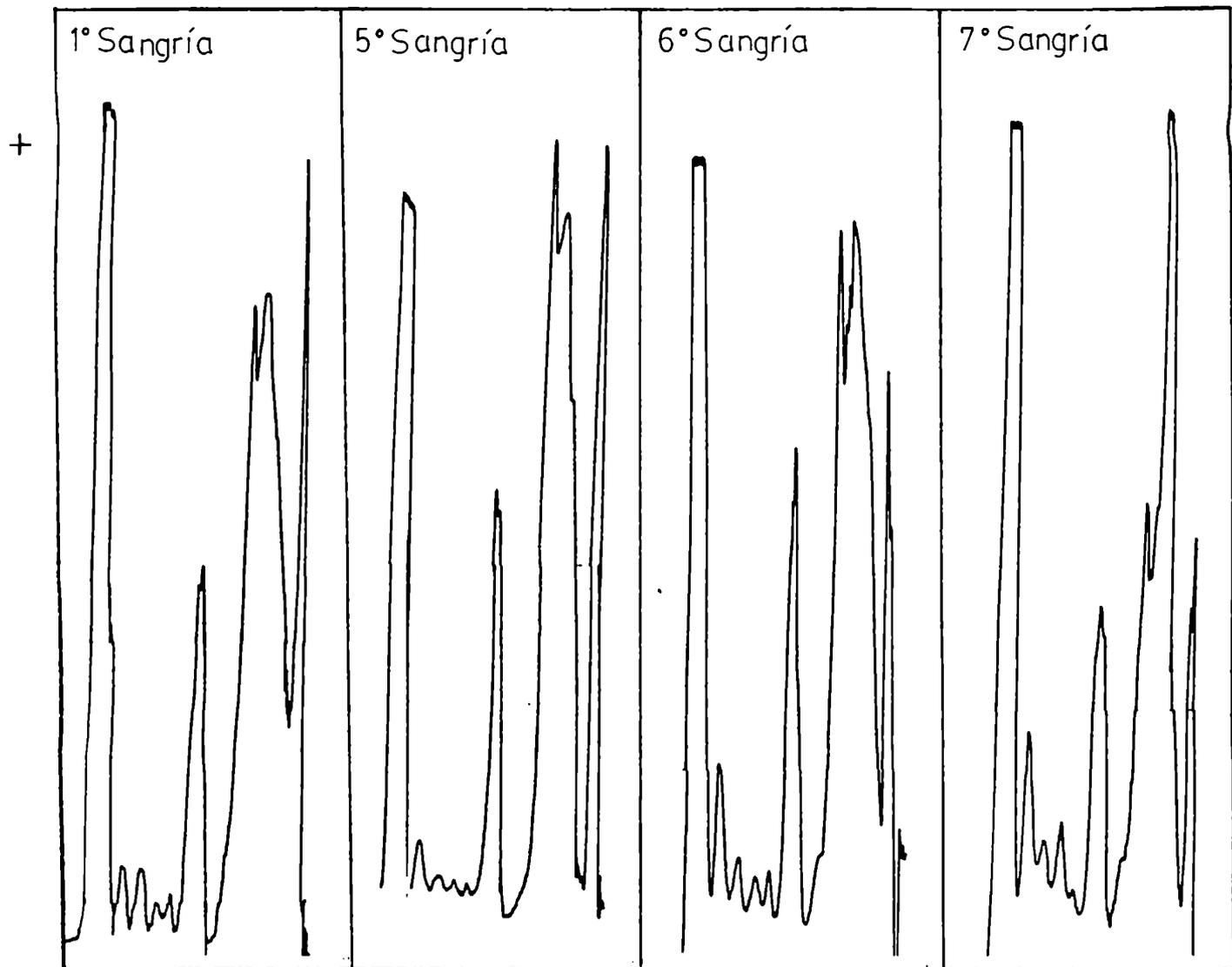
Figura 13 suero 17 - 18.

Figura 14 suero 49 - 50.

Figura 15 suero 51 - 52.

Figura 16 suero 77 - 78.

Suero 17-18



Suero 49-50

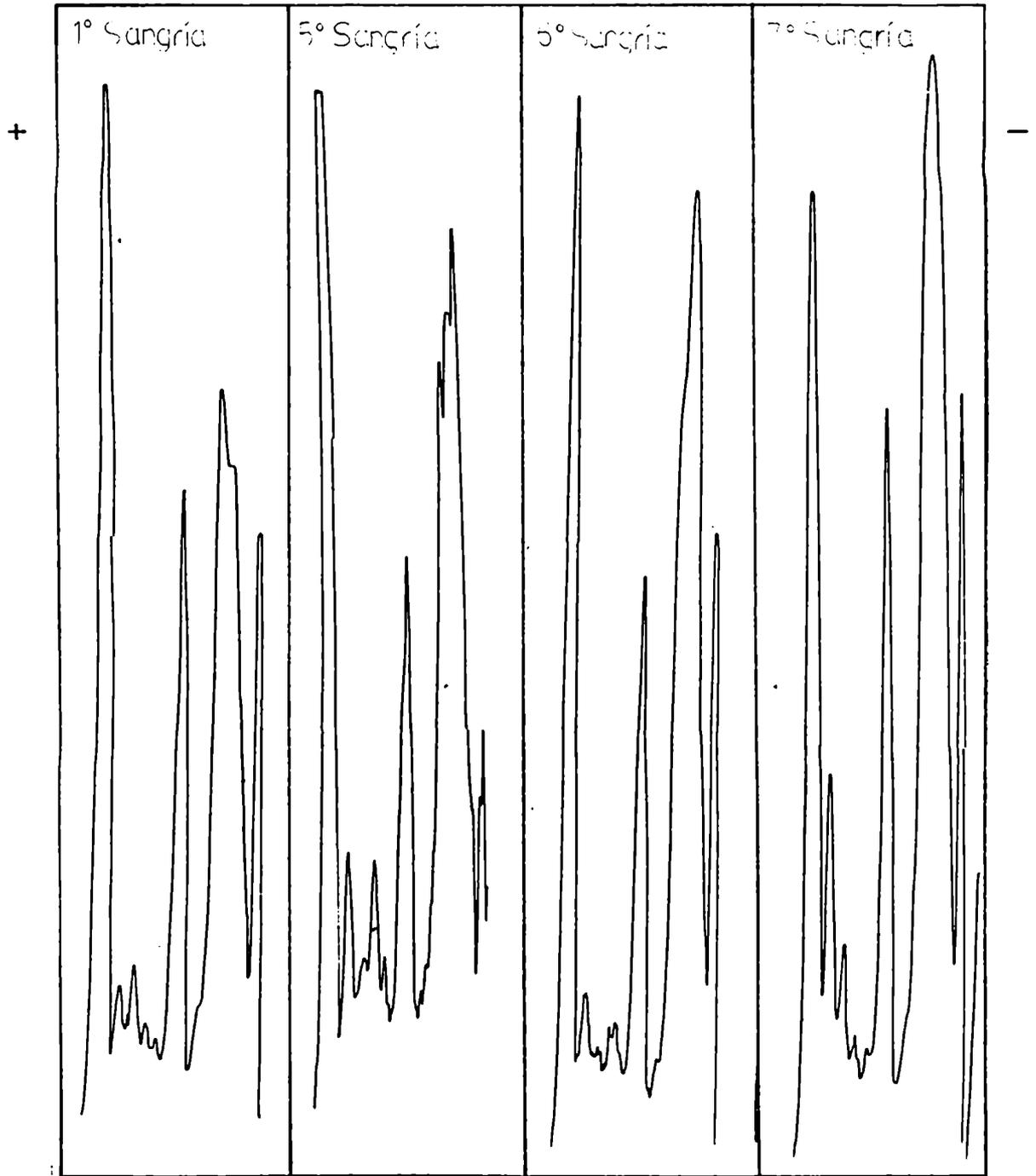


Figura 14

Suero 51-52

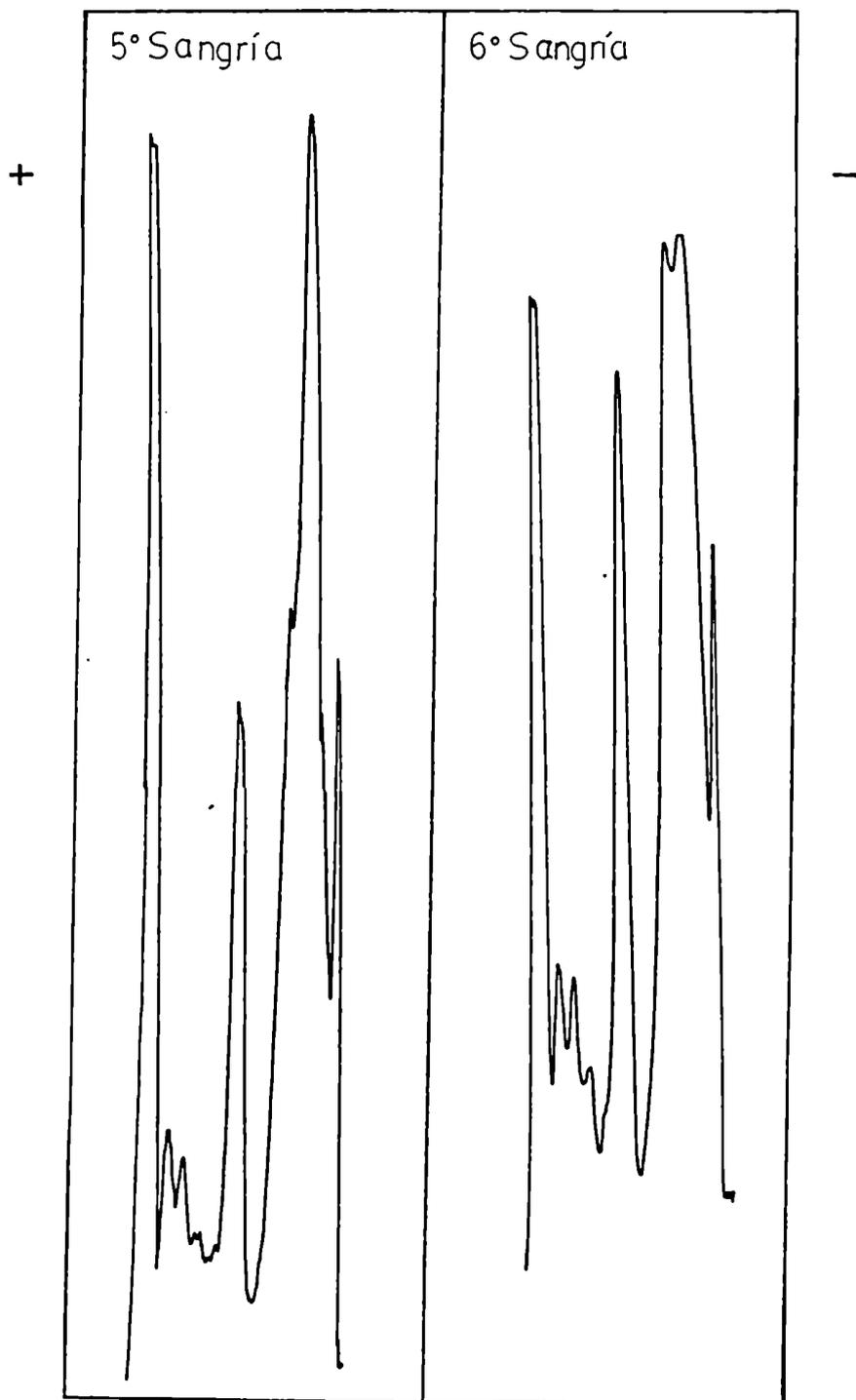


Figura 15

Suero 77-78

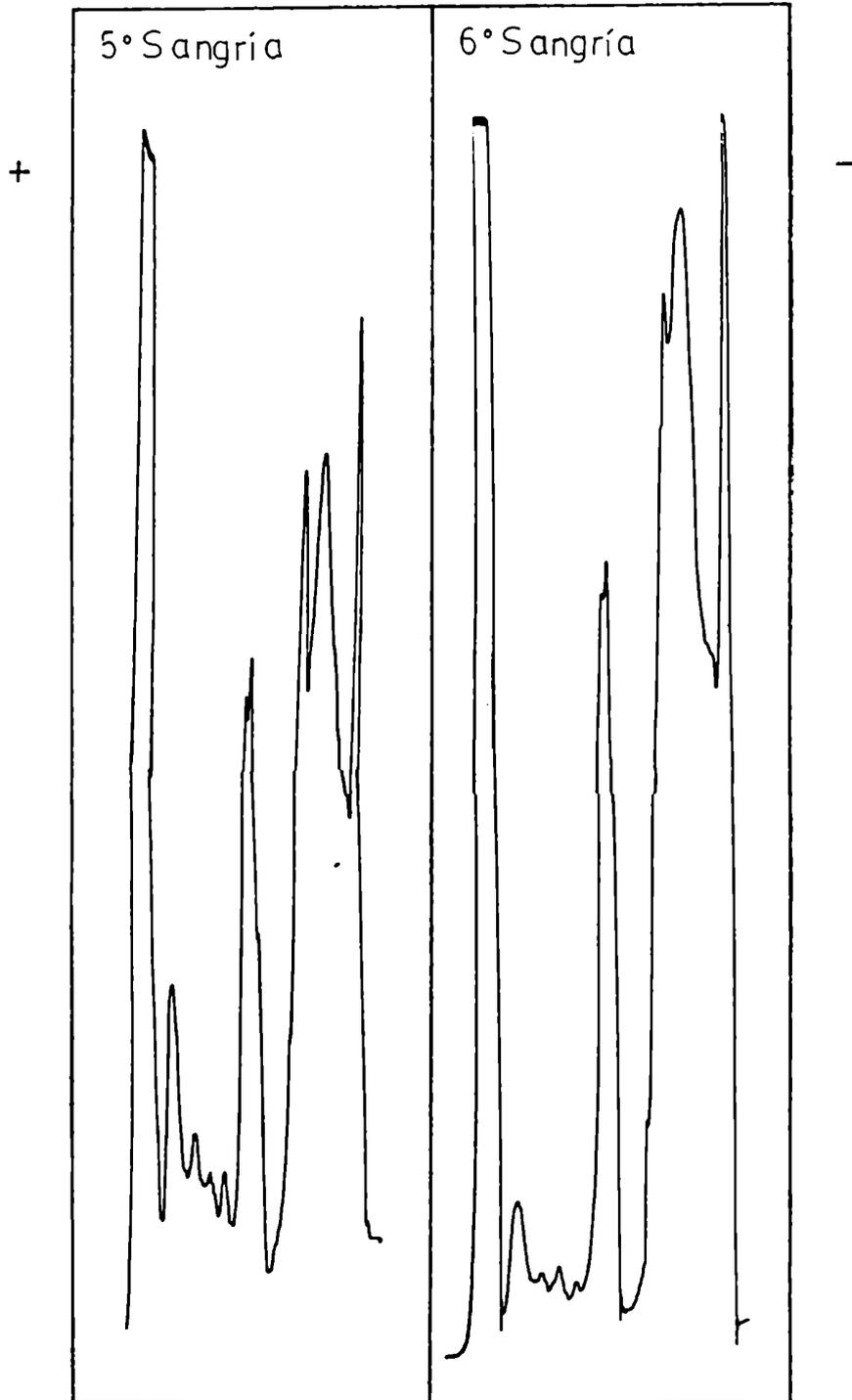


Figura 16

FIGURAS 17 a 23.

Espectrodensitografías a 590 nm de geles de poliacrilamida clásica, teñidos con azul de Coomasie de sueros de animales vacunados e infectados.

Figura 17 suero 525-526.

Figura 18 suero 531-532

Figura 19 suero 41-42

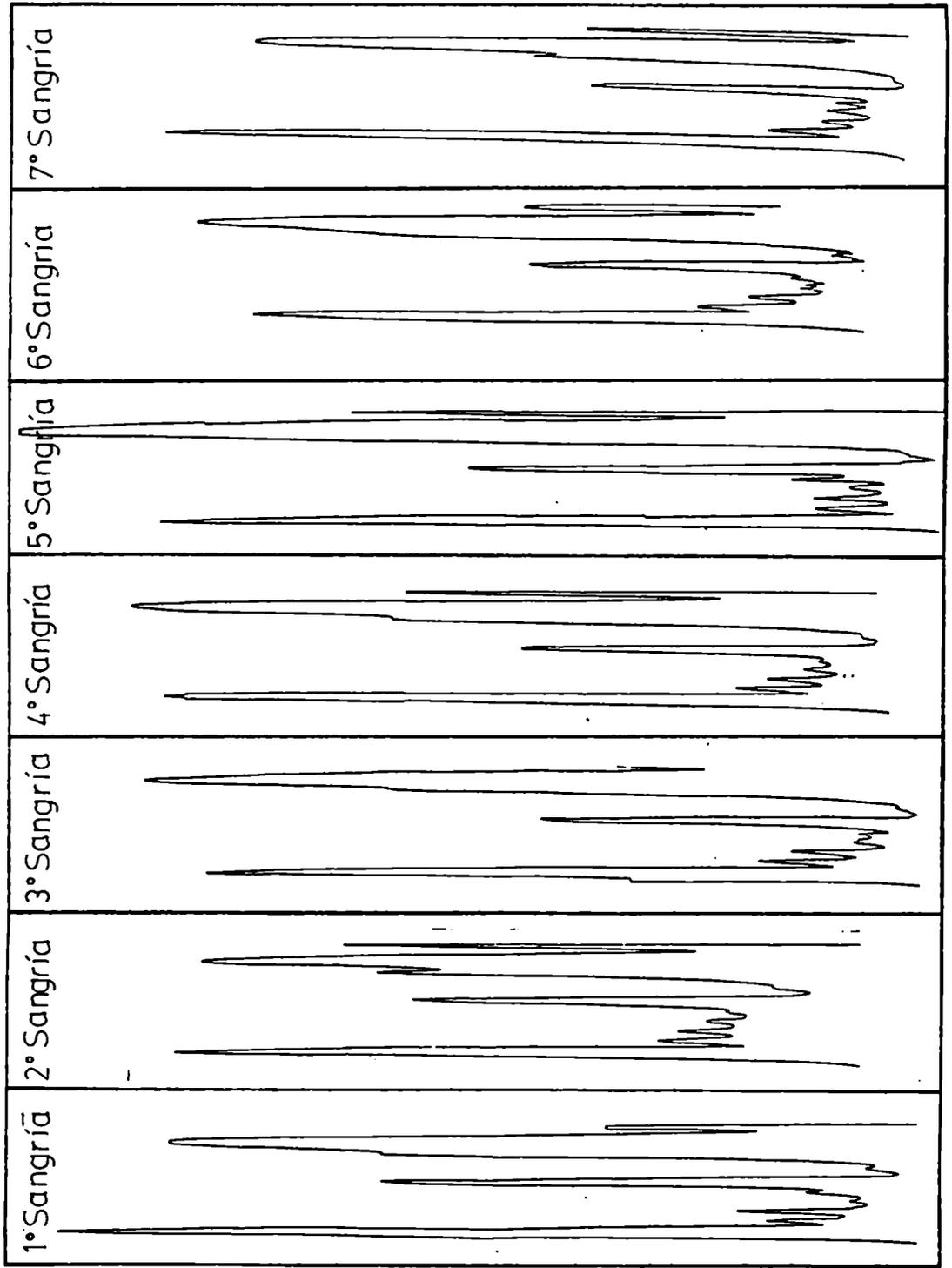
Figura 20 suero 575-576

Figura 21 suero 71-72

Figura 22 suero 79-80

Figura 23 suero 561-562

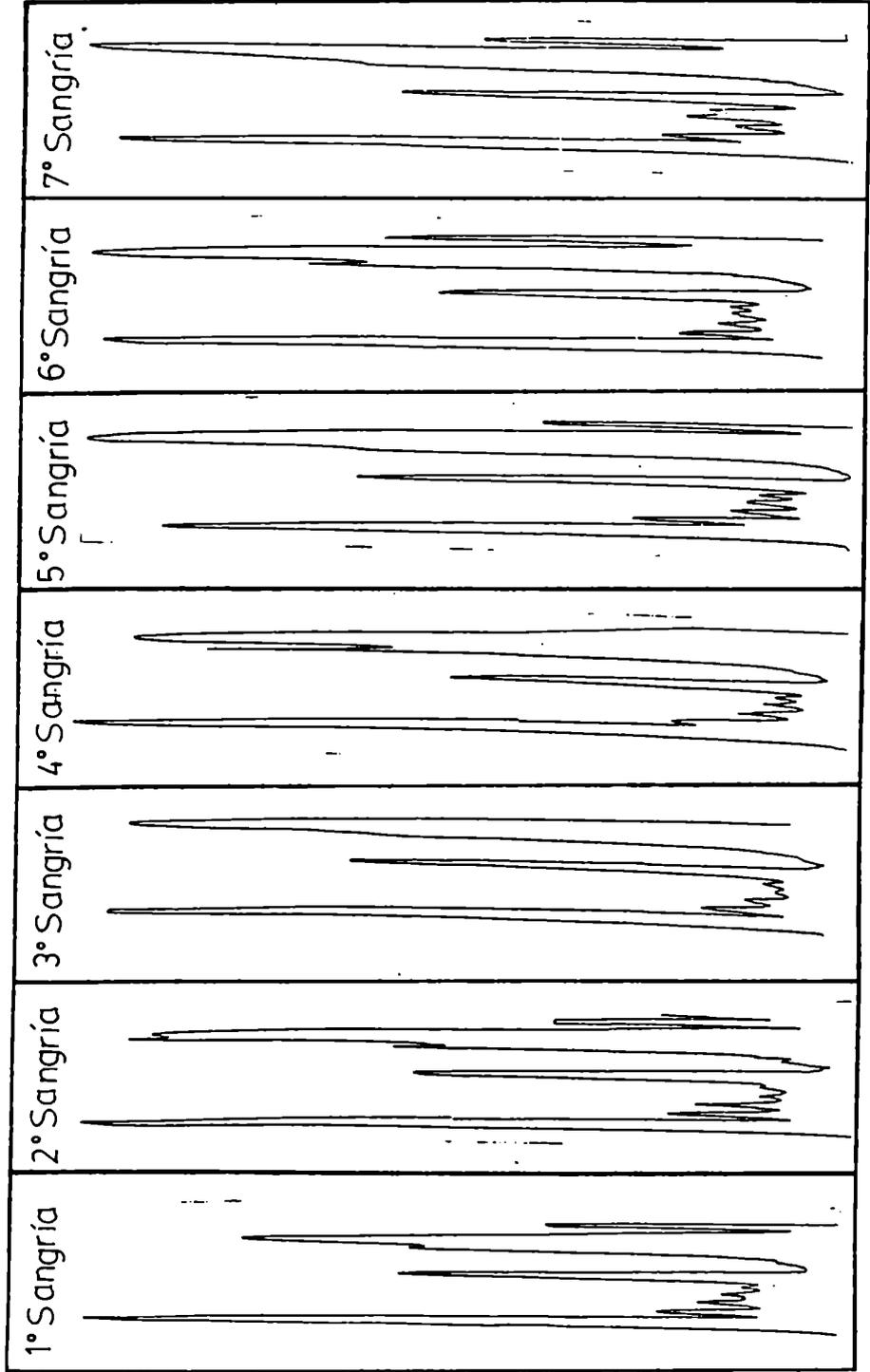
Suero 525-526



+

-

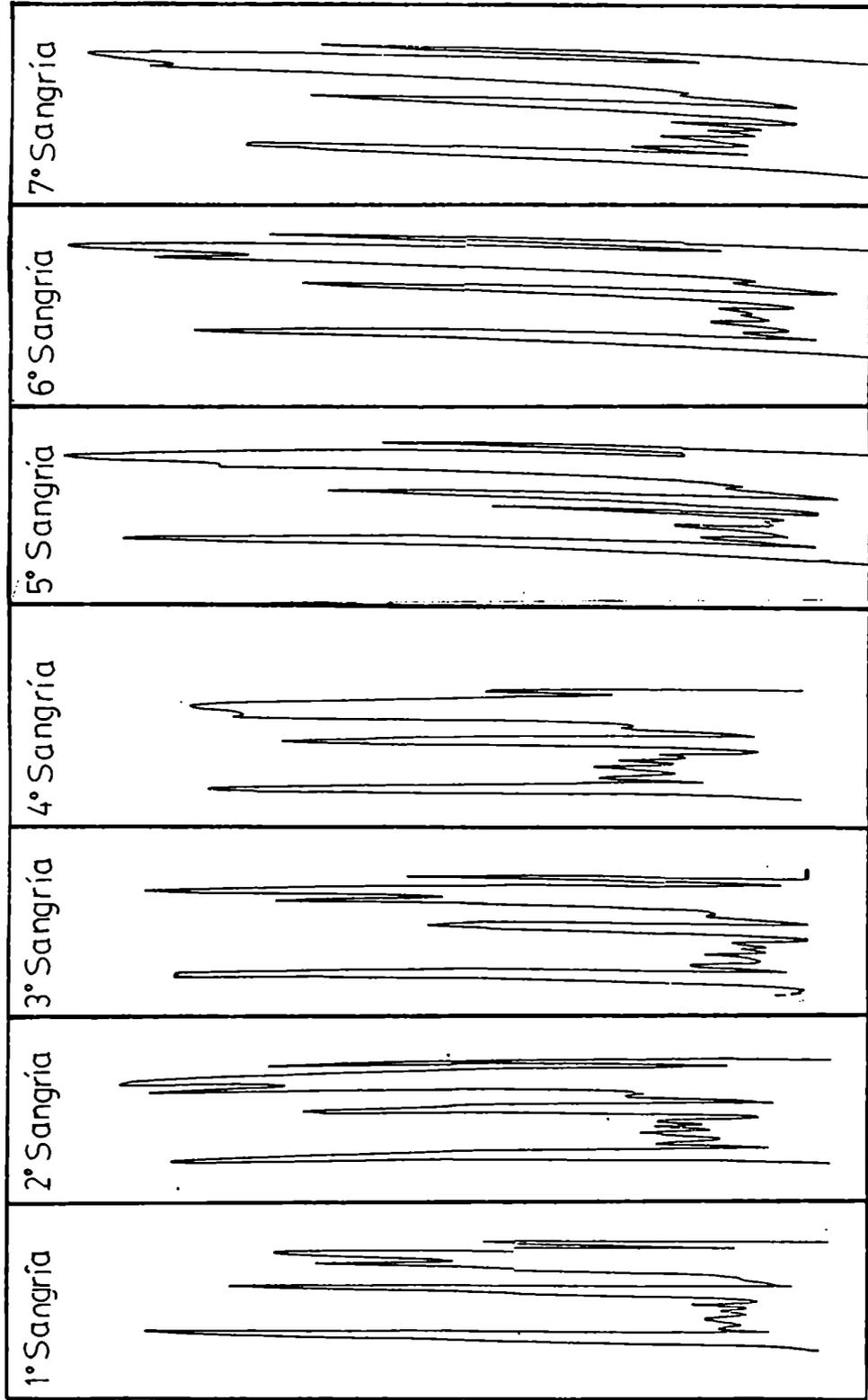
Suero 531-532



+

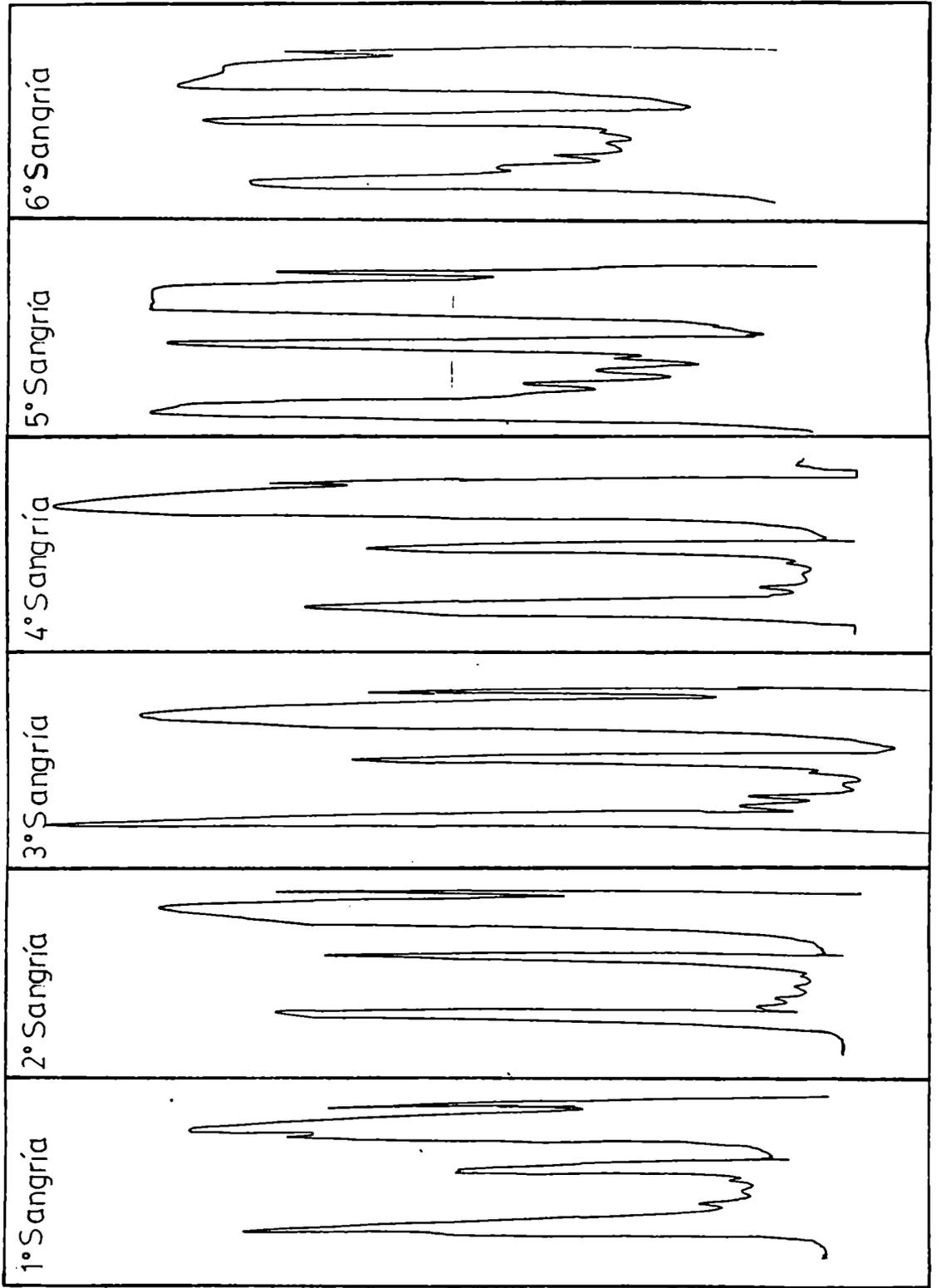
-

Suero 41-42



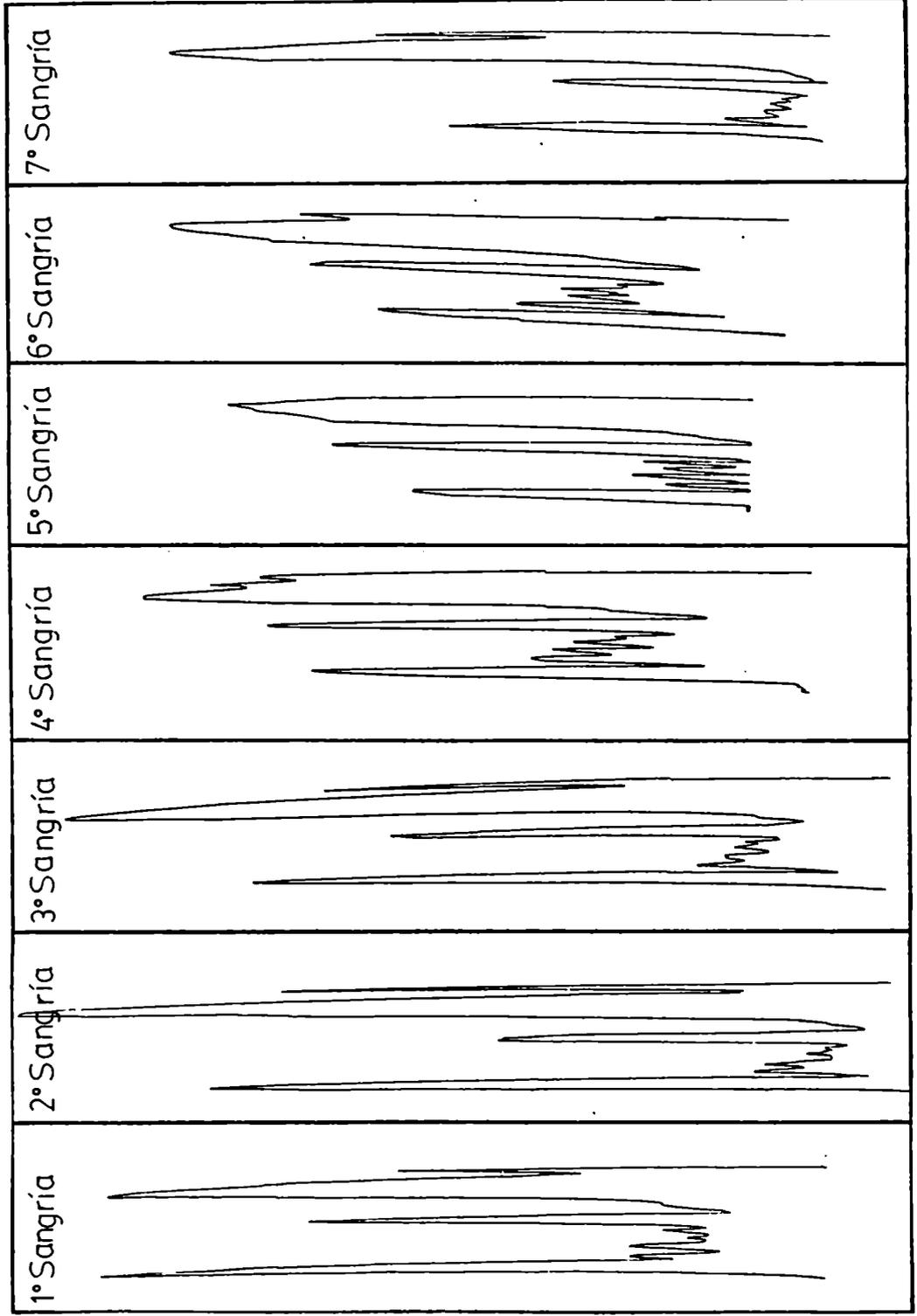
+

Suero 575-576



+

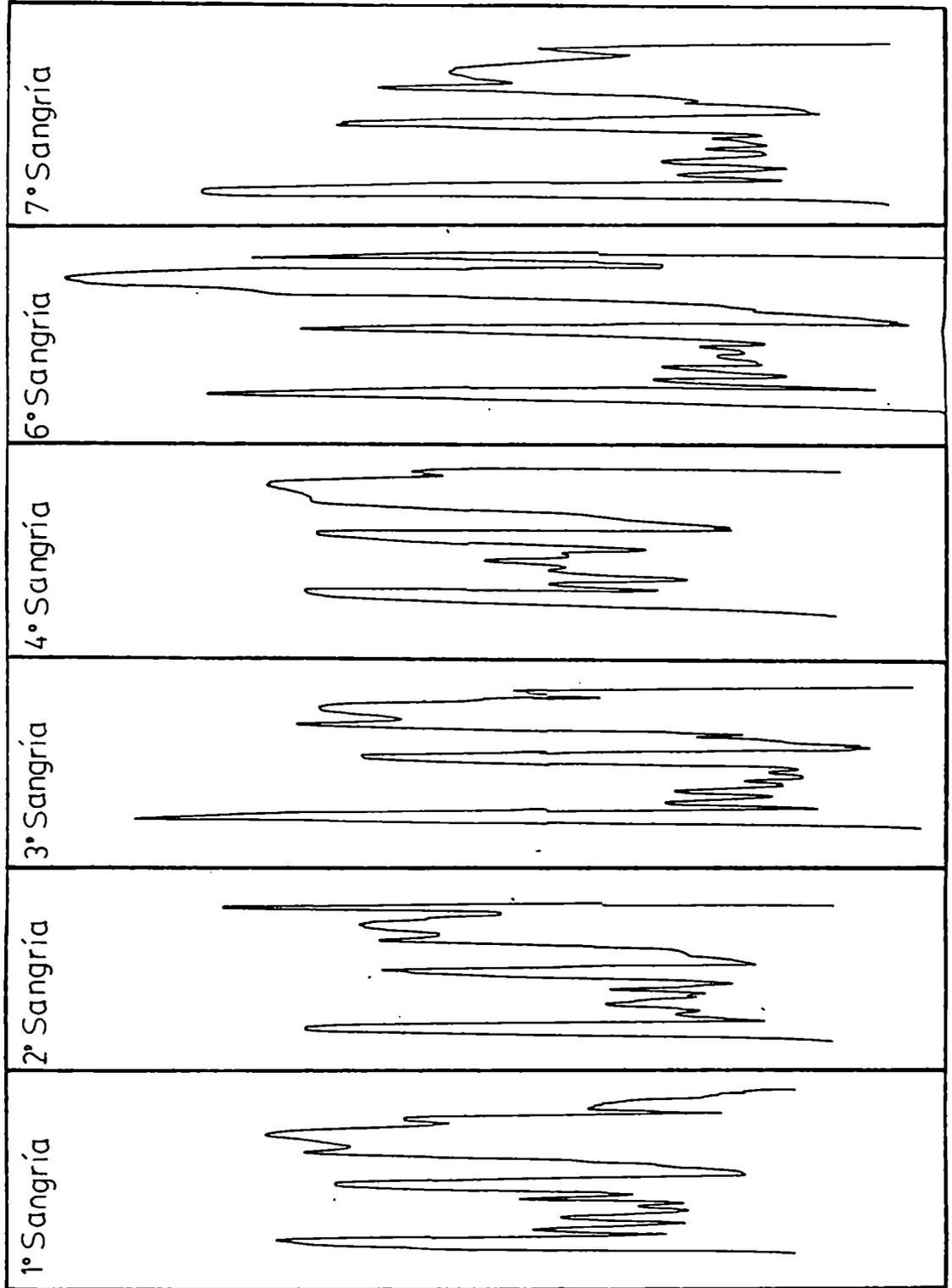
Suero 71-72



+

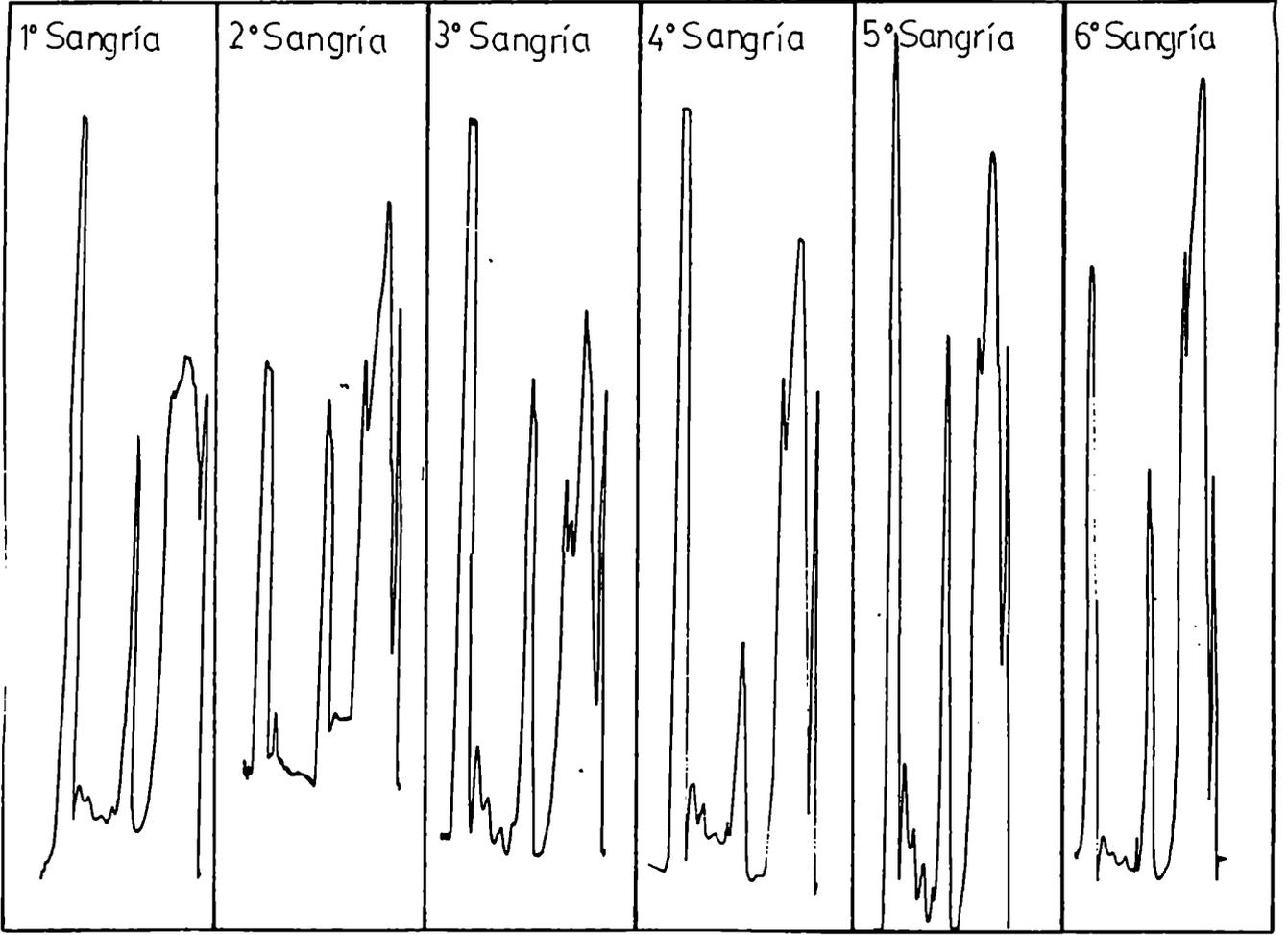
-

Suero 79-80



-

+



FIGURAS 24 a 26.

Electroforesis en gel de poliacrilamida clásica de sueros de bovinos testigos. Tinción con azul de Coomasie.

Figura 24 suero 17-18.

Figura 25 suero 49-50.

Figura 26 suero 51-52 y 77-78.

Suero 17-18

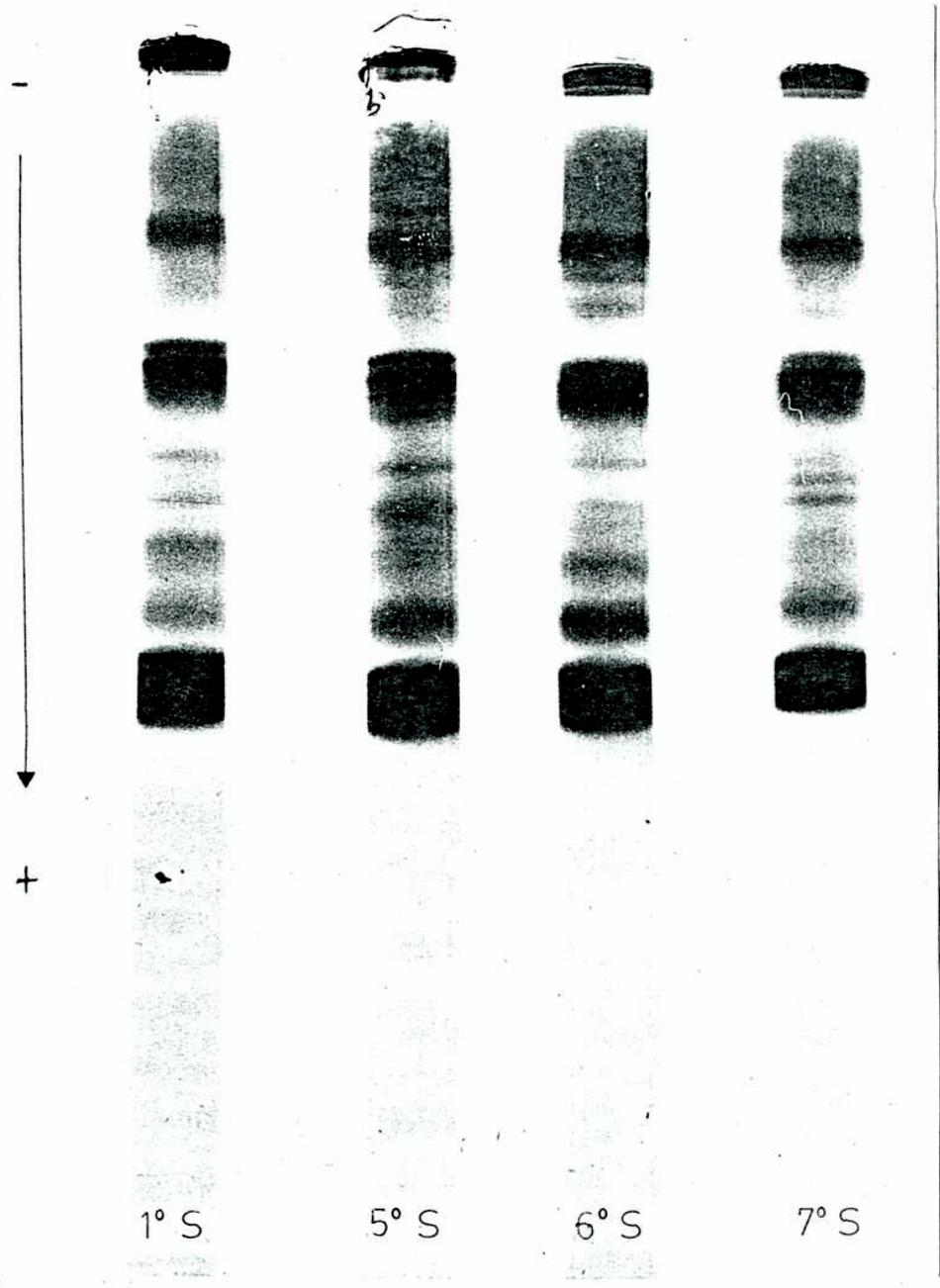


Figura 24

Suero 49-50

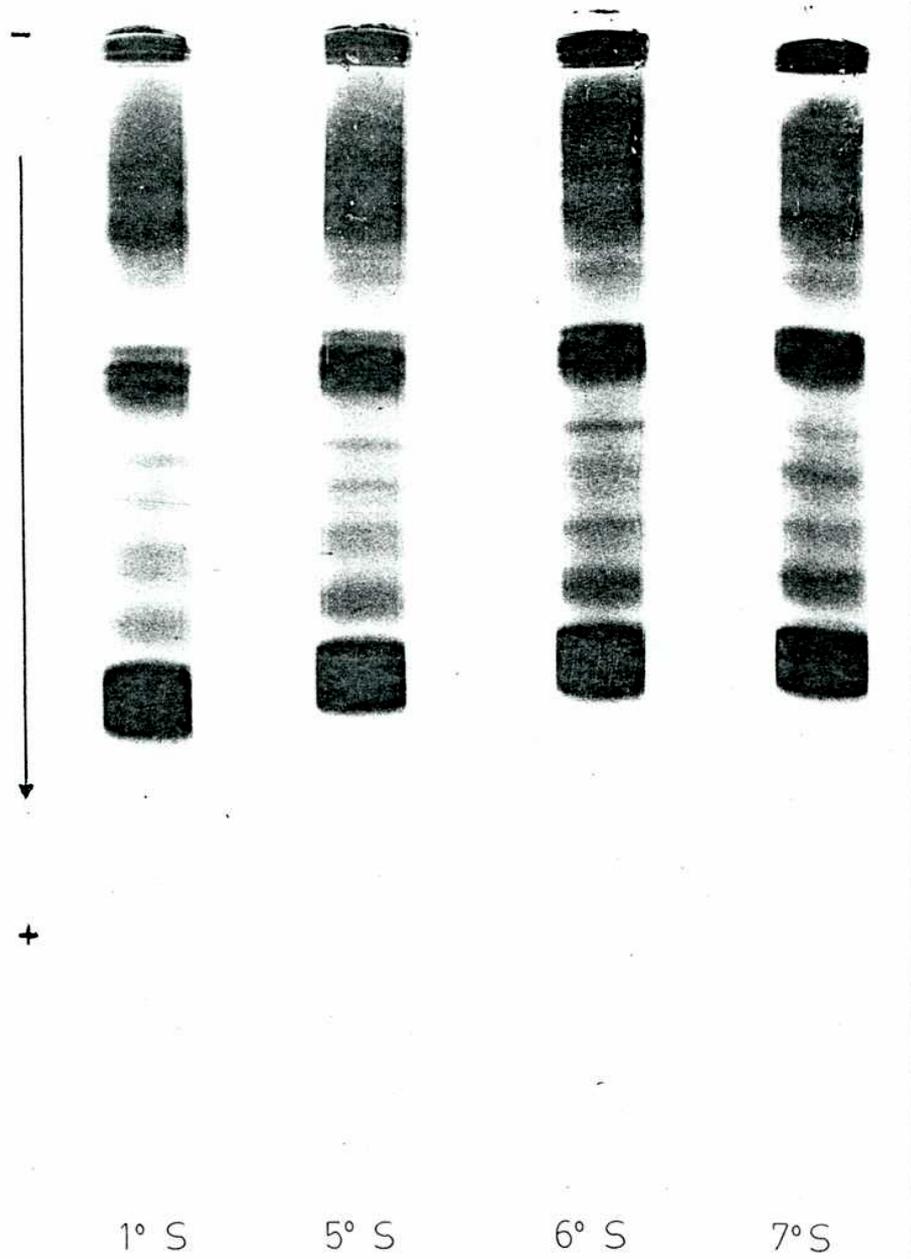


Figura 25

Suero
51-52

Suero
77-78

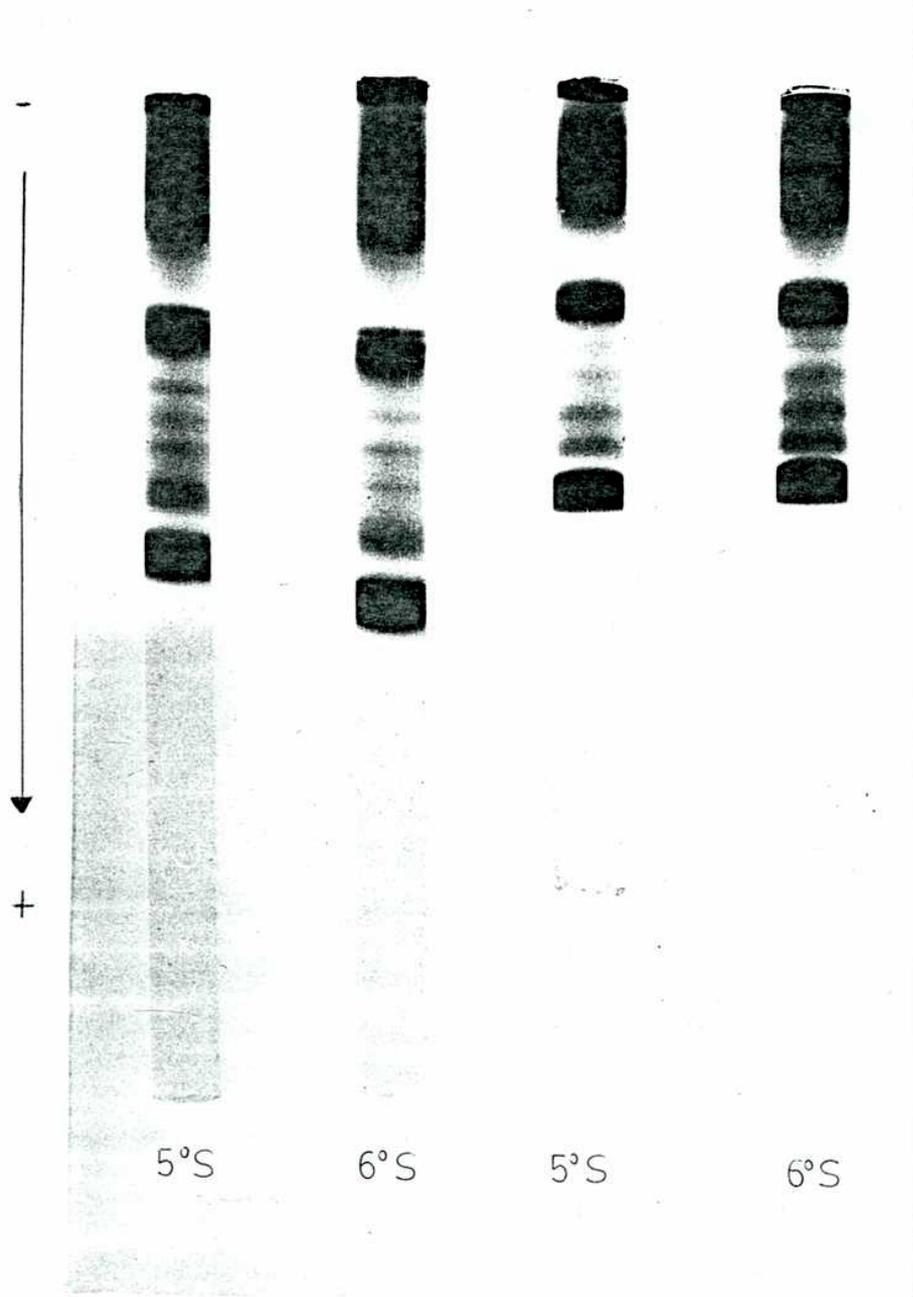


Figura 26

FIGURAS 27 a 33.

Electroforesis en gel de poliacrilamida clásica de sueros de bovinos vacunados e infectados. Tinción con azul de Coomasie.

- Figura 27 suero 525-526.
- Figura 28 suero 531-532.
- Figura 29 suero 41-42.
- Figura 30 suero 575-576.
- Figura 31 suero 71-72.
- Figura 32 suero 79-80.
- Figura 33 suero 561-562.

Suero 525-526

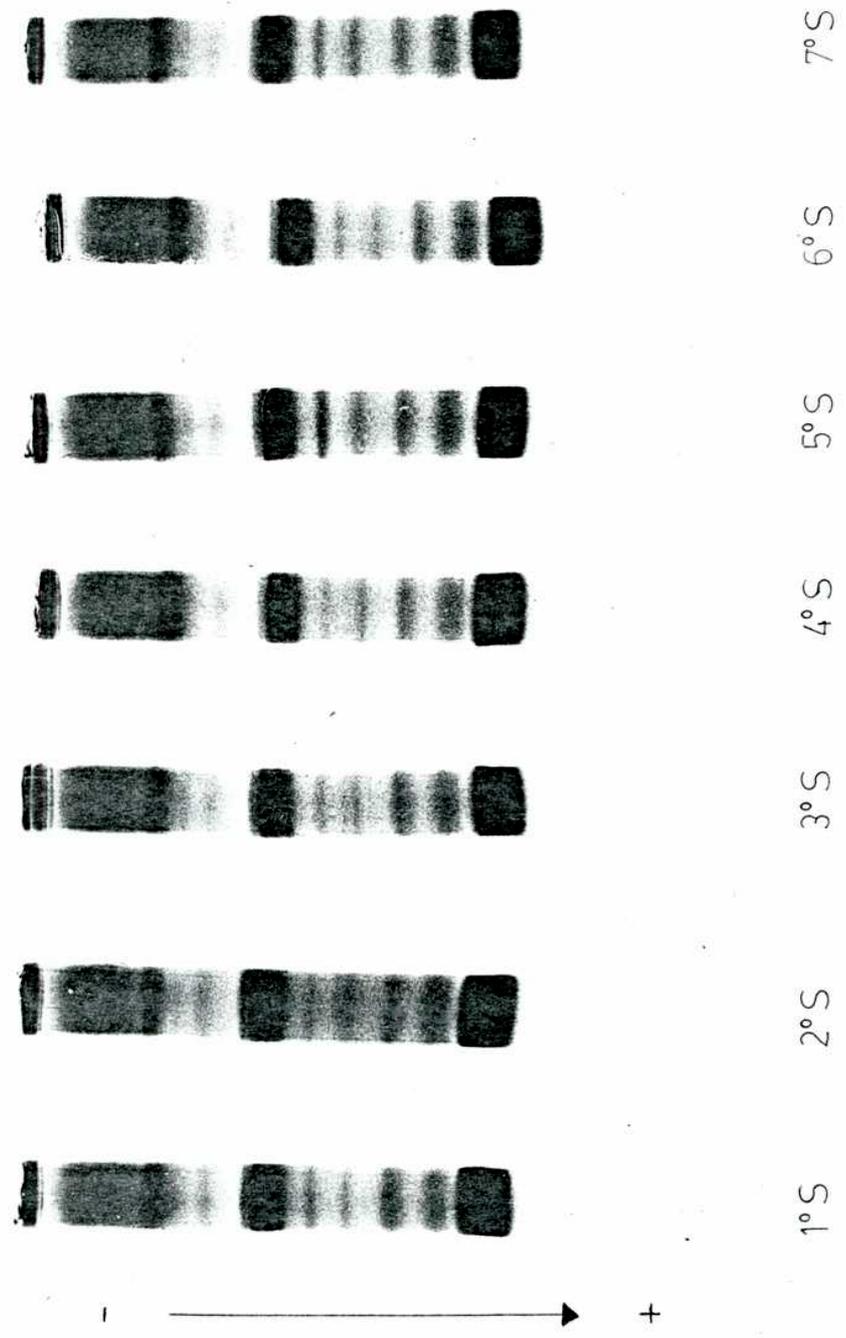


Figura 27

Suero 531-532

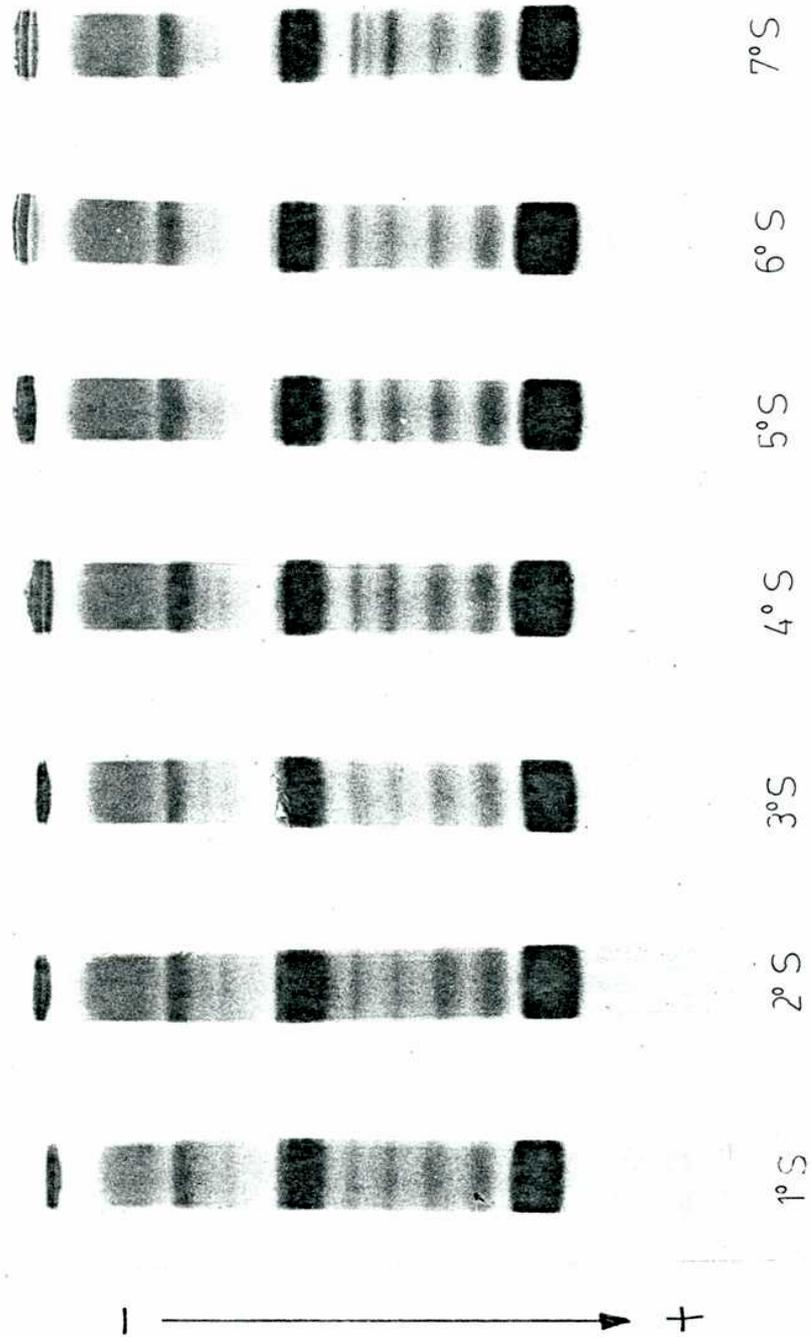


Figura 28

Suero 41-42

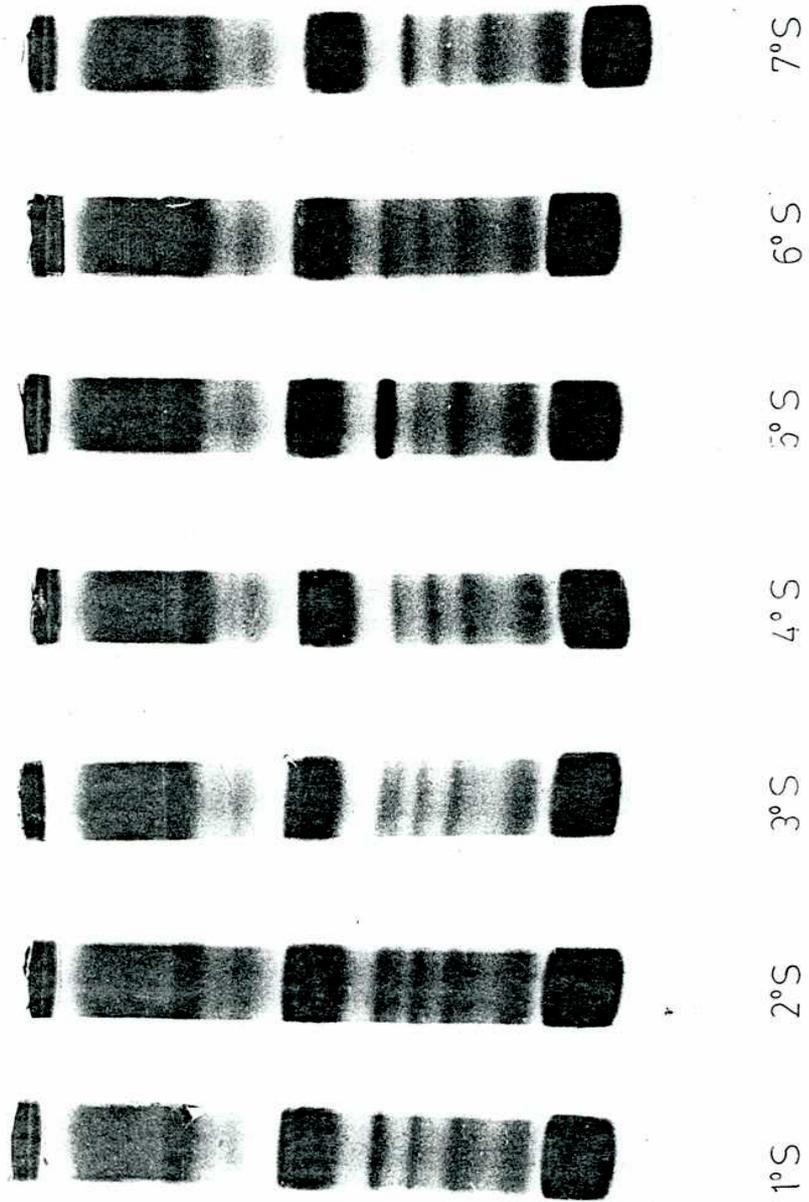


Figura 29

Suero 575-576

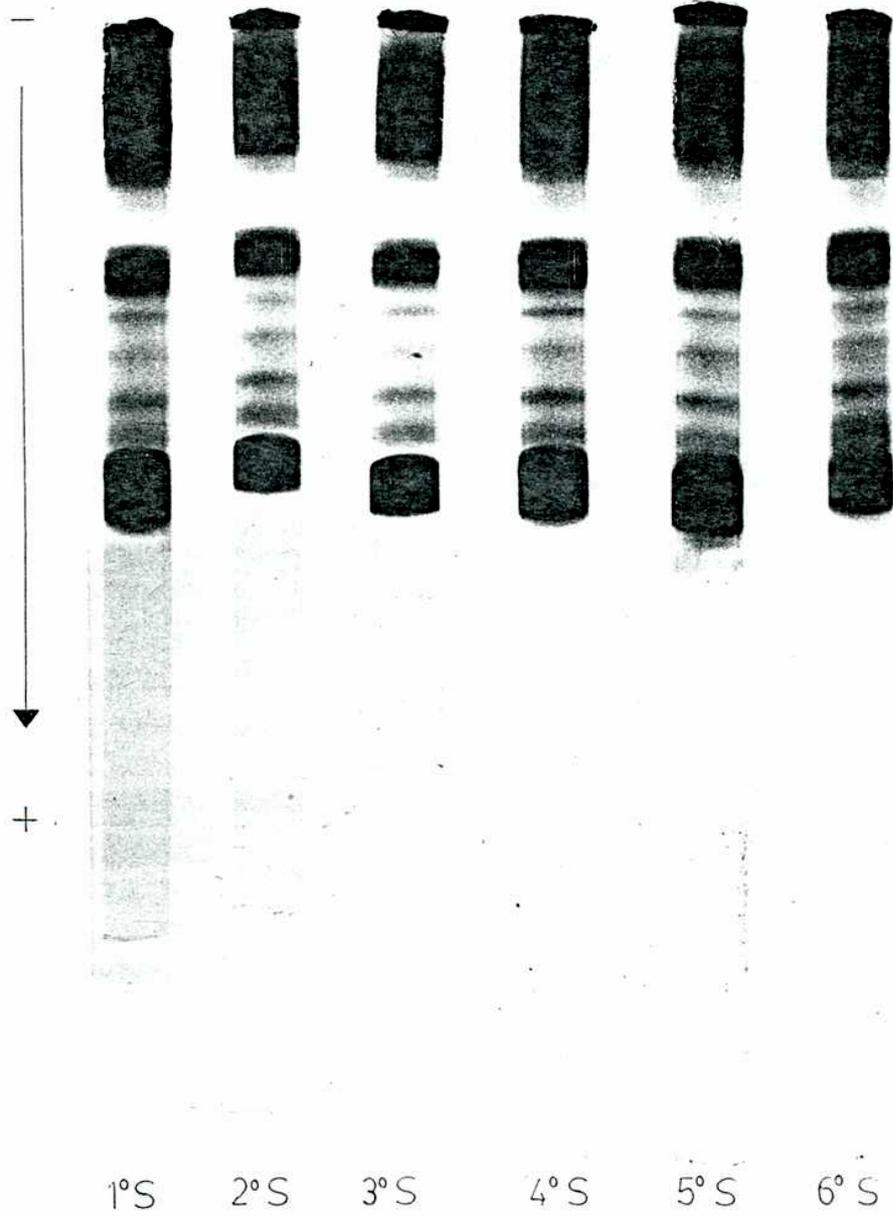


Figura 30

Suero 71-72

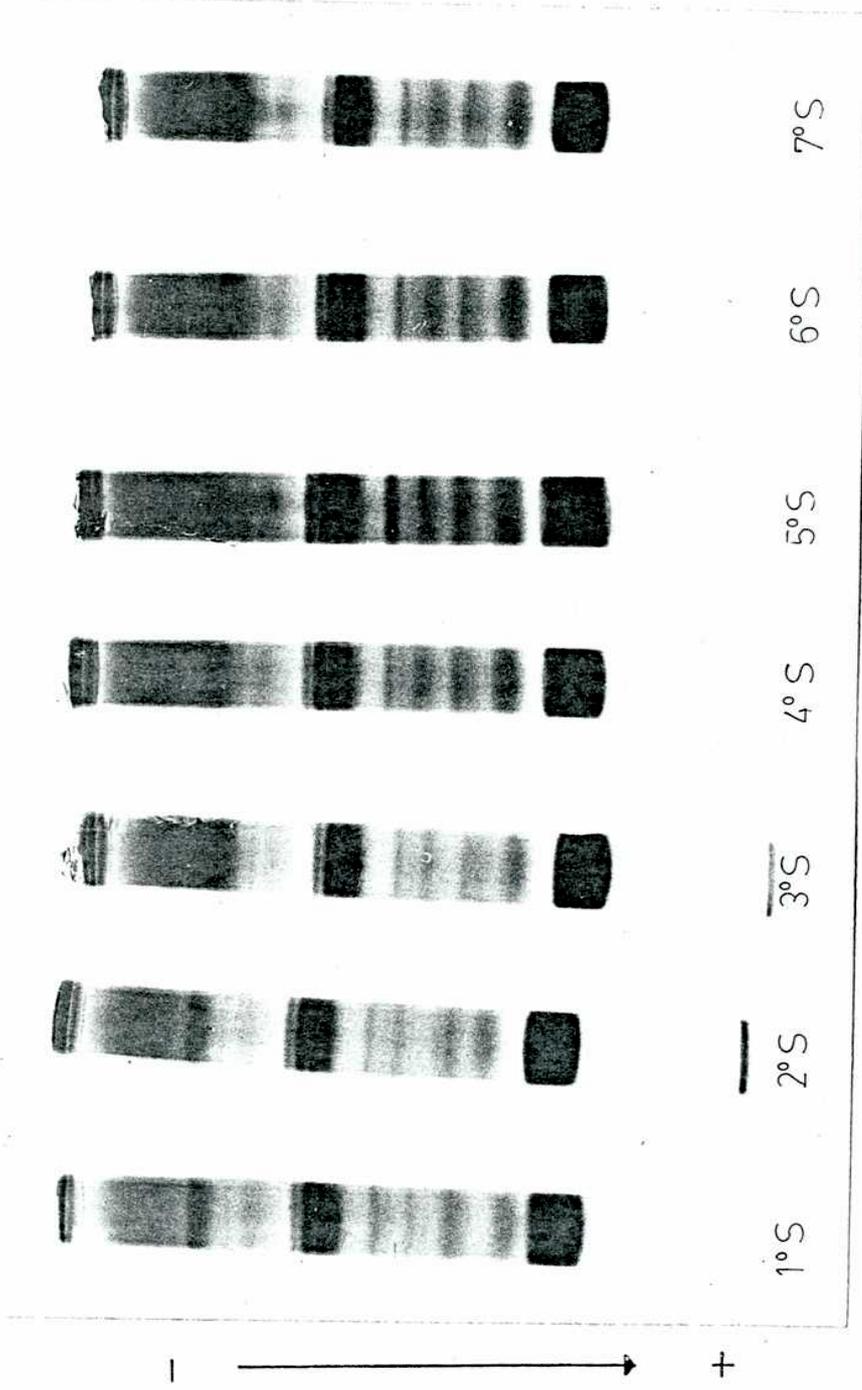


Figura 31

Suero 79-80

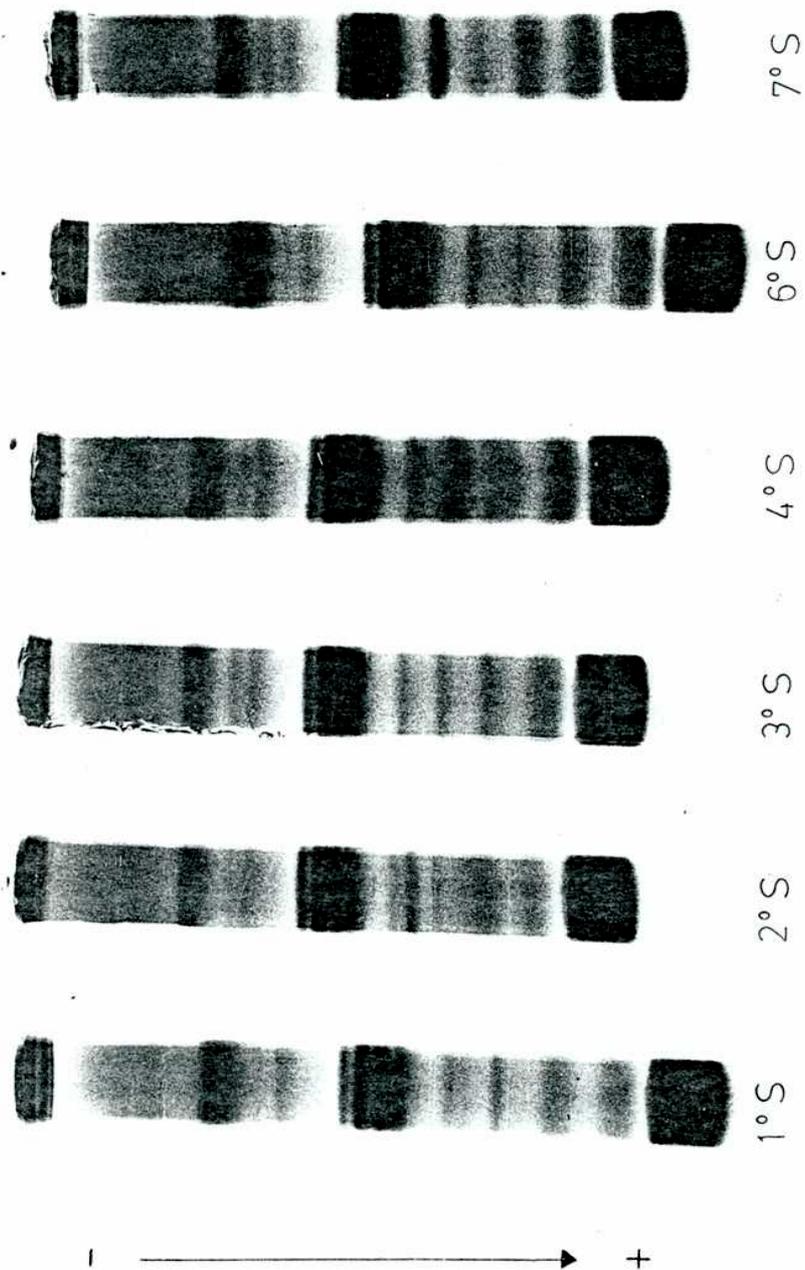


Figura 32

Suero 561-562

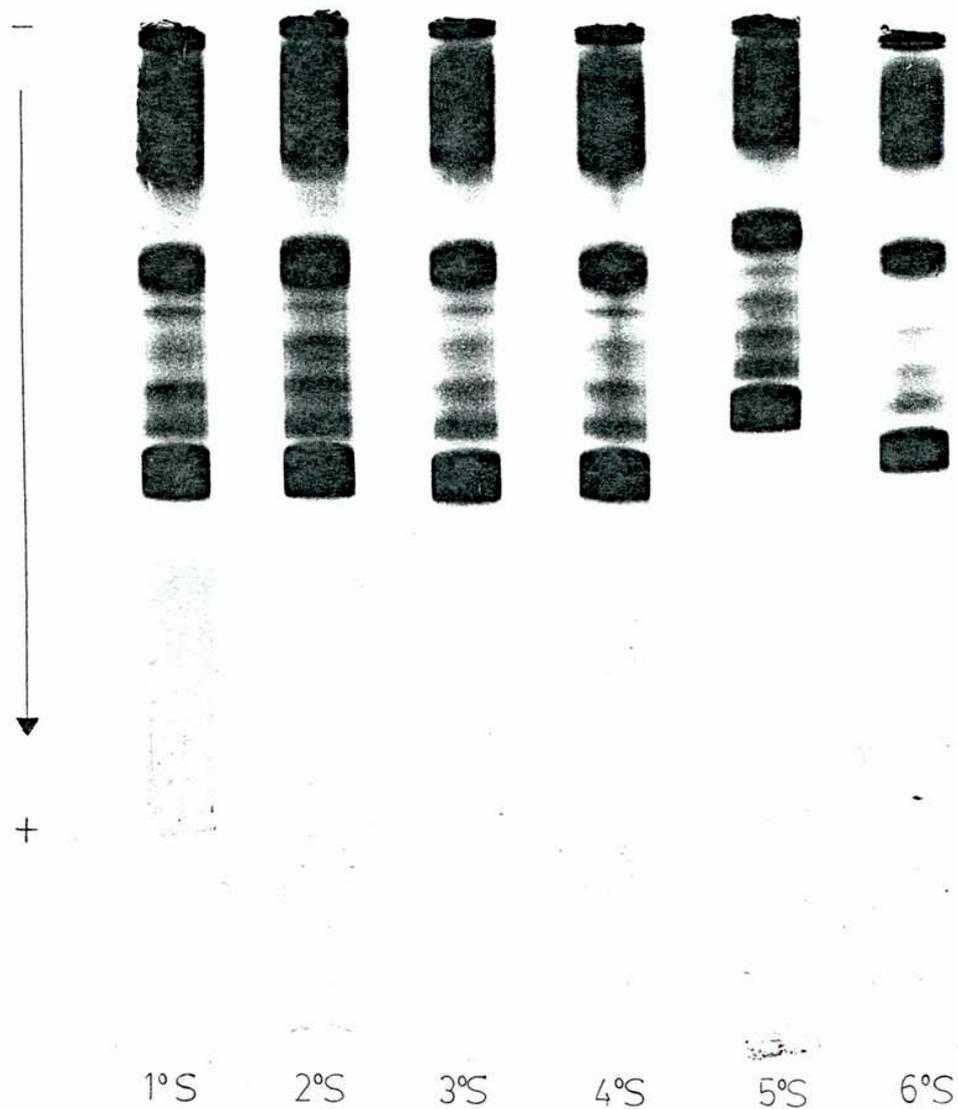


Figura 33

8.- ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA DE
PRECIPITADOS INMUNES.

Electroforesis en gel de poliacrilamida de inmunoprecipitados.

Los precipitados inmunes, obtenidos según Materiales y Métodos 11.- se procesaron para analizarlos por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS como se describió (Materiales y Métodos 10.2.), disociando el complejo en cadenas H y L de Igs y polipéptidos antigénicos (44,56,70,74)

Las bandas correspondientes a cadenas livianas y pesadas de IgG e IgM, así como la ubicación por PM de las proteínas en el gel se determinaron de acuerdo a Stanworth y Turner (134) (Figura 34) y a nuestra experiencia combinada de electroforesis en gel de poliacrilamida e inmuno electroforesis (Materiales y Métodos 12.) que indicaron las siguientes distancias desde el origen en el gel para las correspondientes proteínas:

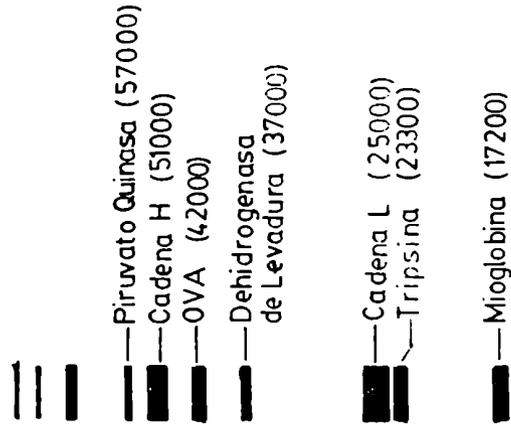
de 1 a 1,5 cm del origen: cadena H de IgM.

de 2,2 a 2,5 cm del origen: cadena H de IgG.

de 4,5 a 5,0 cm del origen: cadena L de Igs.

La ubicación de los polipéptidos correspondientes a aftovirus se realizó teniendo en cuenta lo indicado en el análisis en gel de poliacrilamida con SDS de los Ags T_0/T_5

Ig G



Ig M

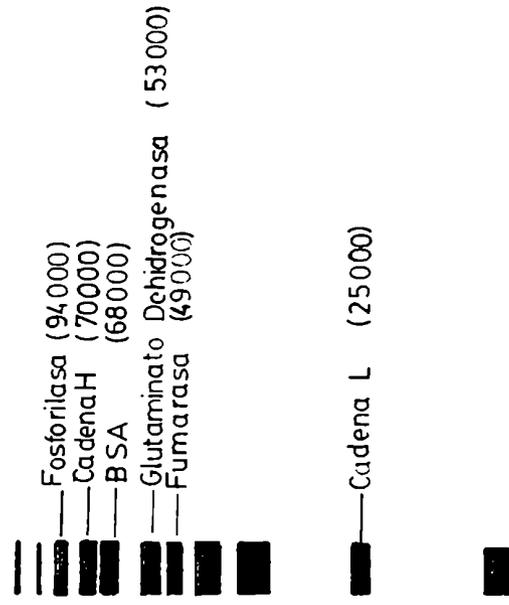


Figura 34

(Resultados 4-3). (Figura 11). Todos los estudios de los blancos de precipitación realizados no mostraron bandas polipeptídicas teñidas ni radioactivas, excepto las células BHK, que fueron eliminadas de los precipitados donde se usó éste Ag.

Se tuvo en cuenta que las cadenas H ó L de Igs pudieron coincidir con polipéptidos celulares u originados por el virus en la célula de su mismo PM y que algunos antisue- ros pudieron no contener IgM (especialmente los realizados en conejos, cuyo esquema de inmunización fué prolongado).

a) Análisis de precipitados radioinmunes.

a.1) Se analizaron los polipeptidos del inmunoprecipitado que se unieron a los Ac y fueron separados por el tratamien- to. Se estudiaron células BHK₂₁ sin infectar y los Ags T₀/T₅ enfrentados a sus correspondientes antisue- ros homólogos rea- lizados en conejo.

El análisis del precipitado BHK-suero anti BHK (Gráfi- co 3 f) mostró polipéptidos de PM entre 120.000-72.000, me- nor cantidad de 63.000-56.000 y 52.000-34.000 y entre PM 30.000-28.000. No se presentaron polipéptidos de PM menor

20.000 y de muy bajo PM que se hubieran unido a los anticuerpos.

Se correlacionaron los precipitados utilizando Acs de creciente tiempo p.i. y sus antisueros homólogos con el BHK-anti BHK obteniéndose los siguientes resultados.

T₀-suero anti T₀ (Gráfico 3 a): mostró un aumento en polipéptidos de alto PM y entre 52.000-34.000, 30.000-28.000 y la aparición de los de PM entre 20.000-12.500 y de menor PM en cantidad. El pico mostrado entre 52.000 y 34.000 fué el más notorio.

T₁-suero anti T₁ (Gráfico 3 b): aumentaron los polipéptidos, que se unieron a Acs, de PM entre 63.000-56.000; aunque en menor proporción que en el anterior también se incrementaron los polipéptidos de PM entre 52.000-34.000 y 30.000-28.000.

T₂-suero anti T₂ (Gráfico 3 c): mostró un aumento en todos los polipéptidos: de PM entre 120.000-72.000, 63.000-56.000, 52.000-34.000 (notoriamente) y 30.000-28.000. Se evidenciaron varios picos polipeptídicos de bajo PM en cantidad.

T₄-suero anti T₄ (Gráfico 3 d): mostró levísimos aumentos en los polipéptidos respecto al precipitado de células sin in-

fectar.

T₅-suero anti T₅ (Gráfico 3 e): Se observó un fuerte incremento en polipéptidos de alto PM y aumento en los comprendidos entre PM 53.000-56.000, 52.000-34.000 y 30.000 a 28.000.

Del precipitado T₃-suero anti T₃ se perdió la muestra.

Todos los precipitados Ag-As homólogos mostraron, a diferencia de BHK-suero anti BHK, polipéptidos de PM menor que 22.500, los cuales entre 20.000 y 12.500 se consideraron productos maduros del virus y los de menor PM no poseen aún función biológica conocida (93, 122, 123). El hecho coincidió con el análisis de los Ags separadamente (Resultados 4-3) que mostraron la existencia de éstos polipéptidos a diferencia de las células BHK₂₁ sin infectar.

El análisis de los precipitados Ag-As homólogo mostró, en general, que los Ac producidos en los conejos se unieron a polipéptidos del virus multiplicando en células infectadas, los cuales también se observaron en los estudios de coloración y radioactividad de las preparaciones antigénicas individuales (Resultados 4-3).

Debemos aclarar que en todos nuestros estudios nunca

GRAFICO 3.

Perfil de radioactividad de electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de precipitados inmunes.

- a) Ag: células BHK₂₁ infectadas por 60 minutos (T₀).
Suero: de conejo anti T₀.
- b) Ag: células BHK₂₁ infectadas por 65 minutos (T₁).
Suero: de conejo anti T₁.
- c) Ag: células BHK₂₁ infectadas por 75 minutos (T₂).
Suero: de conejo anti T₂.
- d) Ag: células BHK₂₁ infectadas por 120 minutos (T₄).
Suero: de conejo anti T₄.
- e) Ag: células BHK₂₁ infectadas por 210 minutos (T₅).
Suero: de conejo anti T₅.
- f) Ag: células BHK₂₁ sin infectar.
Suero: de conejo anti BHK₂₁.
- g) Ag: células BHK₂₁ infectadas por 60 minutos (T₀).
Suero: de conejo anti virus sobrenadante de 8 hs p.i.

1: cadena H de IgM.

2: cadena H de IgG.

3: cadena L de Igs.

Los números sobre el perfil del gráfico indicaron el PM de los polipéptidos x 10³.

VP_{0,1,2,3}: polipéptidos estructurales del virus.

VIA: Ag asociado a la infección viral.

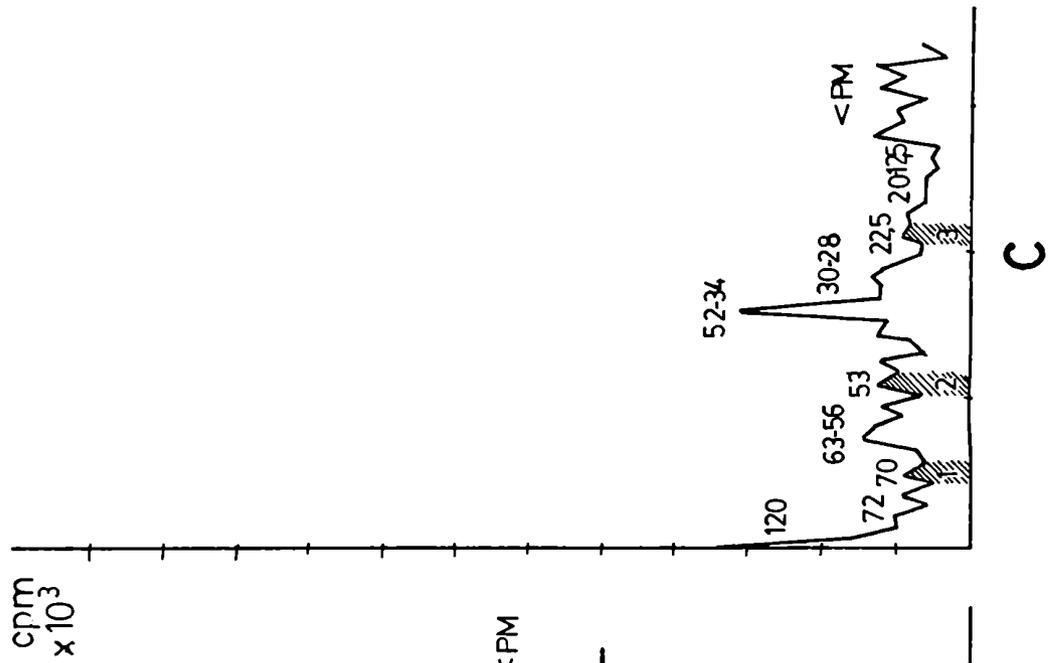
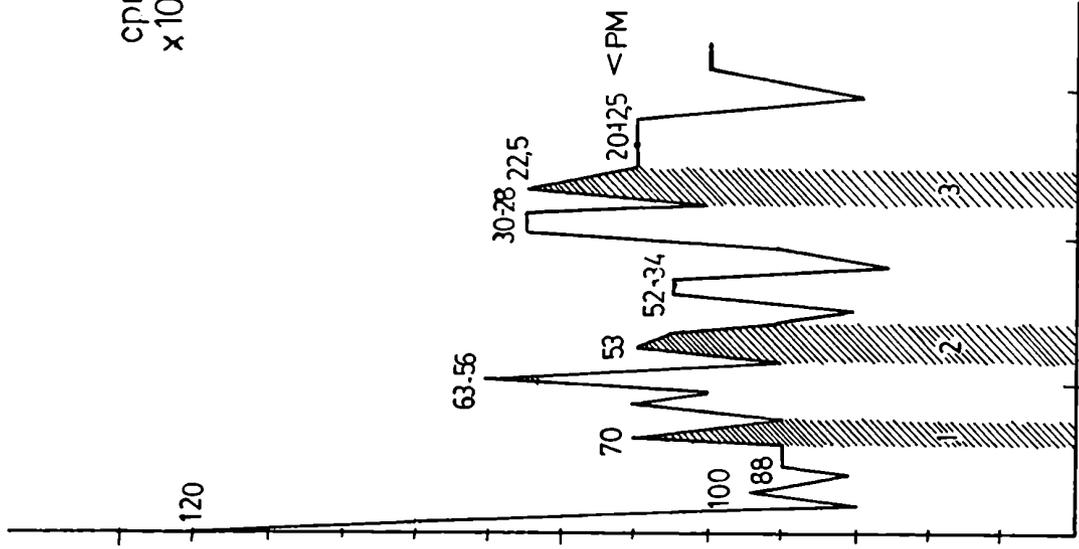
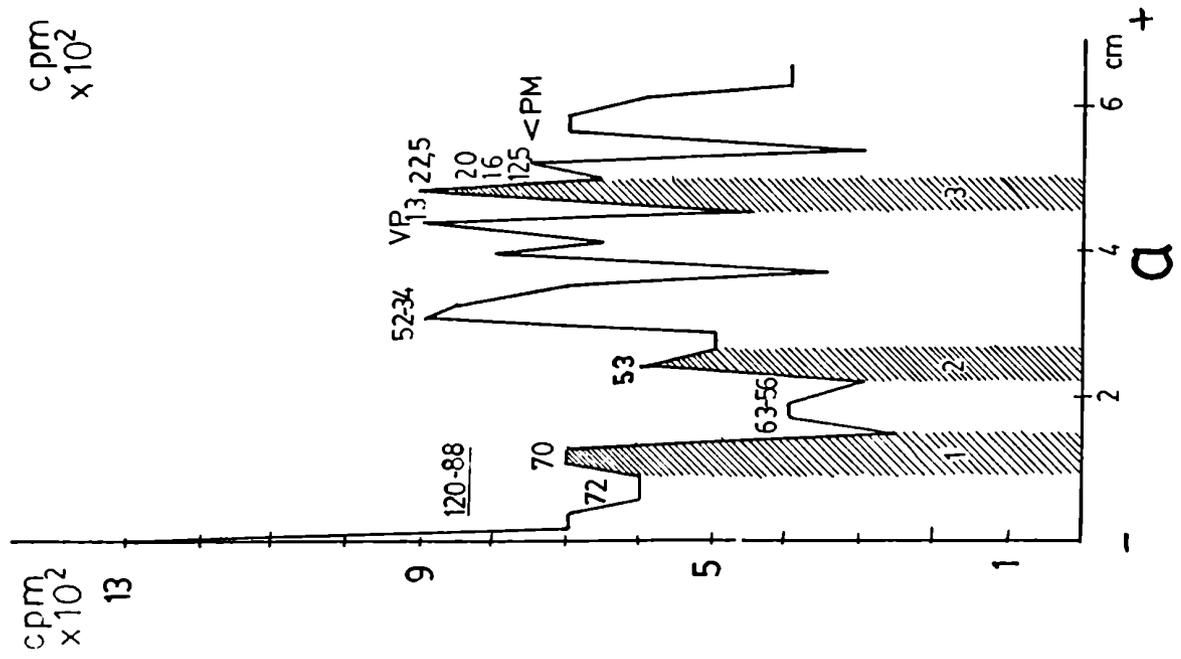


Gráfico 3

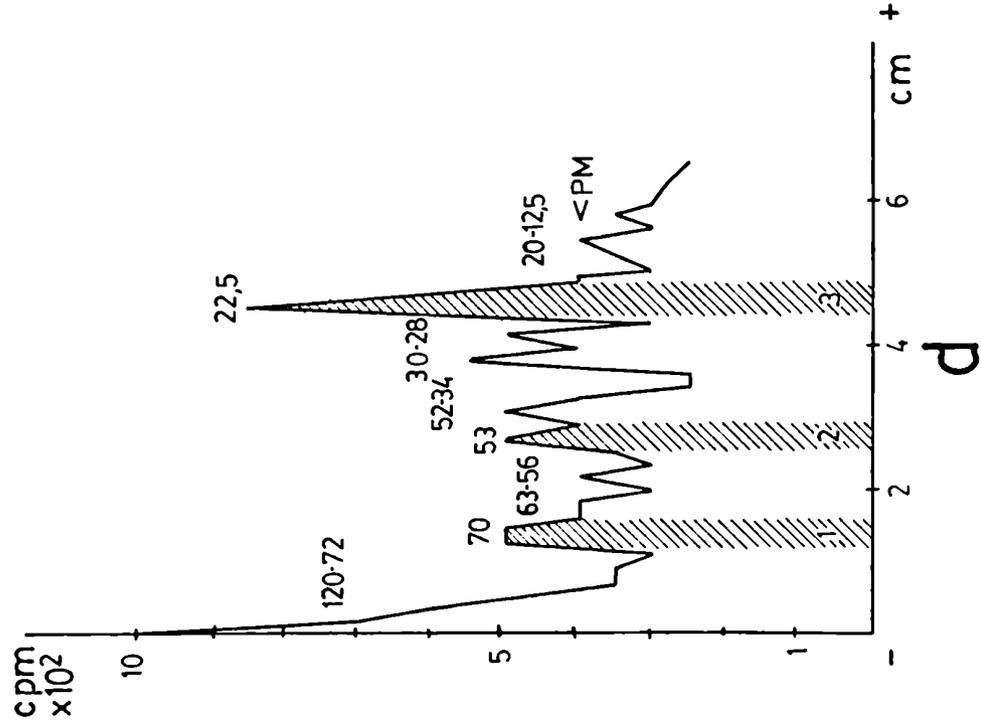
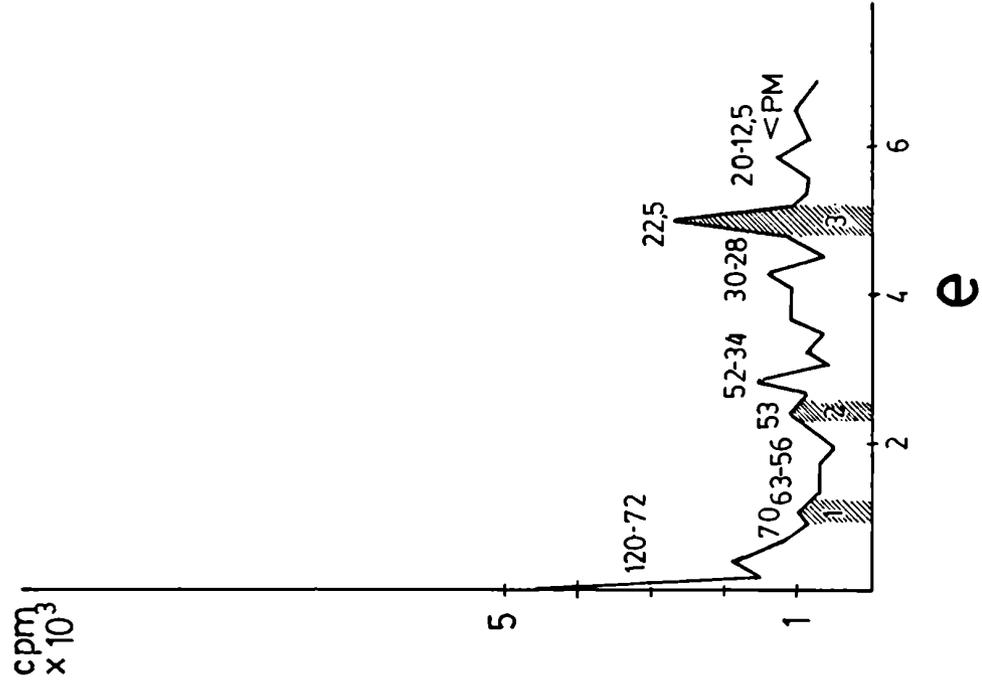


Grafico 3

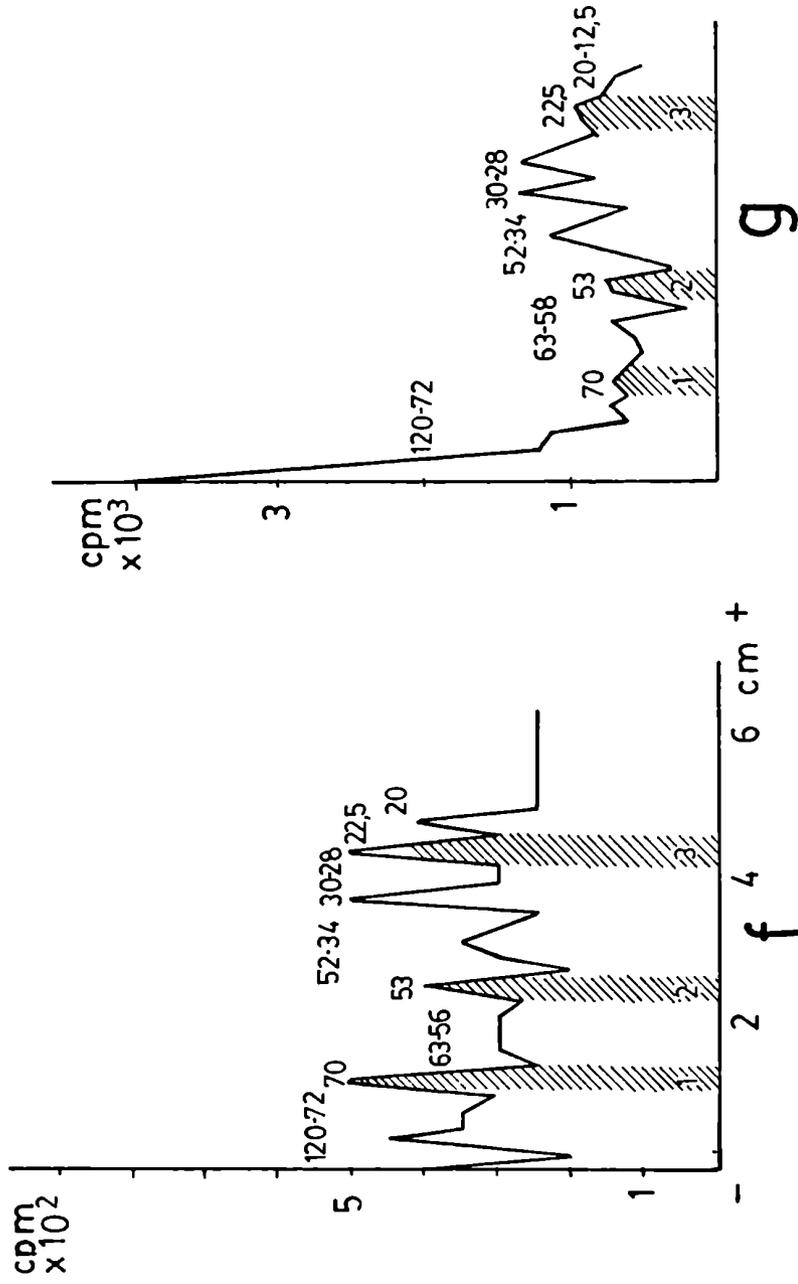


Gráfico 3

se observó una disminución de polipéptidos presentados en células infectadas respecto a sin infectar (ni en Ag, ni en precipitados), o sea, que el virus al multiplicar no inhibiría la producción de proteínas por la célula (19, 20, 70). Al mismo tiempo se pudieron detectar los cambios inducidos por el virus en células, hecho que se observó en el inmunoprecipitado Ag T₀-suero de conejo anti virus de 8 hs p.i. (Gráfico 3 g) que mostró respecto al precipitado BHK-suero anti BHK (Gráfico 3 f) un aumento en polipéptidos de alto PM, de PM entre 63.000-56.000 y muy notoriamente de PM entre 52.000-34.000 y 30.000-28.000, a la vez que la aparición de polipéptidos de PM entre 20.000 y 12.500.

Estos productos, que se detectaron con Ac presentes en el suero de conejo anti virus, son similares a los observados en el análisis por coloración y radioactividad del aftovirus de 8 hs p.i. (Figura 12, Gráfico 2 b).

a.2) Se analizaron precipitados radioinmunes donde se enfrentaron los Ag T₀/T₅ con suero de conejo anti células BHK (Gráfico 4). Se compararon con el diagrama mostrado por el precipitado BHK-suero anti BHK (Gráfico 3 f).

El análisis de T₀-suero anti BHK (Gráfico 4 a) mostró polipéptidos, que se unieron a Ac, cuyo PM fué elevado, aumento en los de PM entre 63.000-56.000, 52.000-34.000 y 30.000-28.000, así como la aparición en cantidad, de los de PM entre 20.000-12.500 y aún más de menor PM

T₁-suero anti BHK (Gráfico 4 b): mostró una notoria diferencia en su esquema con el de BHK-suero homólogo, con un evidente aumento en polipéptidos de PM entre 30.000-28.000 y de menor PM.

T₂-suero anti BHK (Gráfico 4 c): Los anticuerpos del antisuero se unieron a todo el rango de PM de los polipéptidos y notoriamente a los de 38.000 a 28.000.

T₃-suero anti BHK (Gráfico 4 d): en general se observó disminución en los polipéptidos, siendo los más elevados los de PM entre 120.000-72.000 y 30.000-28.000.

T₄-suero anti BHK (Gráfico 4 e): Se observó una disminución general.

T₅-suero anti BHK (Gráfico 4 f): mostró alta cantidad de polipéptidos en general, y especialmente los de alto PM.

Del análisis de éstos precipitados surgió que los per-

GRAFICO 4.

Perfil de radioactividad de electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de precipitados inmunes utilizando suero de conejo anti células BHK₂₁ y los siguientes Ags:

- a) Células BHK infectadas por 60 minutos (T₀).
- b) Células BHK infectadas por 65 minutos (T₁).
- c) Células BHK infectadas por 75 minutos (T₂).
- d) Células BHK infectadas por 90 minutos (T₃).
- e) Células BHK infectadas por 120 minutos (T₄).
- f) Células BHK infectadas por 210 minutos (T₅).

1: Cadena H de IgM.

2: Cadena H de IgG.

3: Cadena L de Igs.

Los números sobre el perfil del gráfico indicaron el PM de los polipéptidos x 10³.

VP_{0,1,2,3}: polipéptidos estructurales del virus.

VIA: Ag asociado a la infección viral.

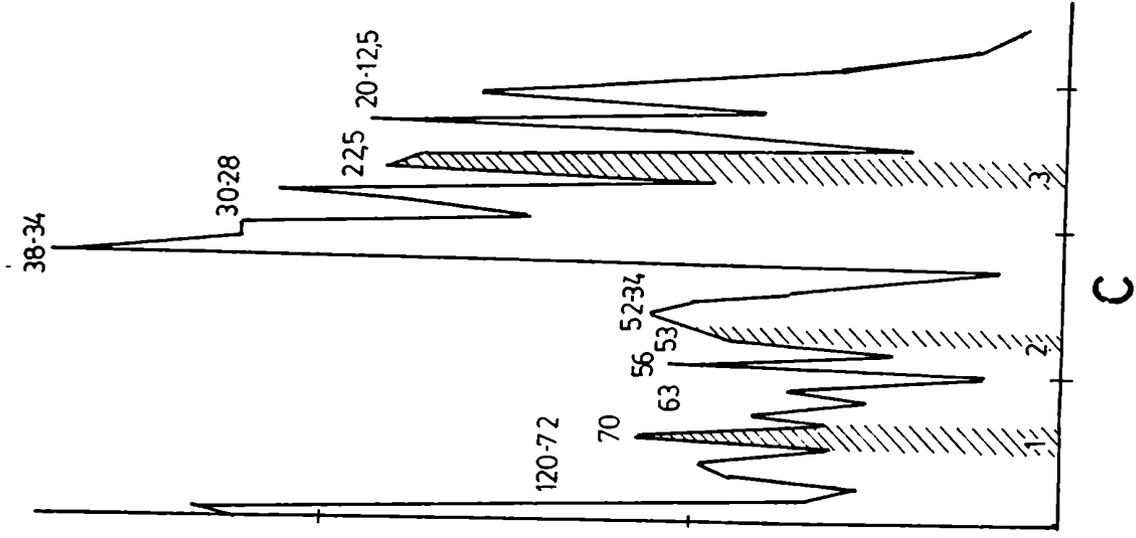
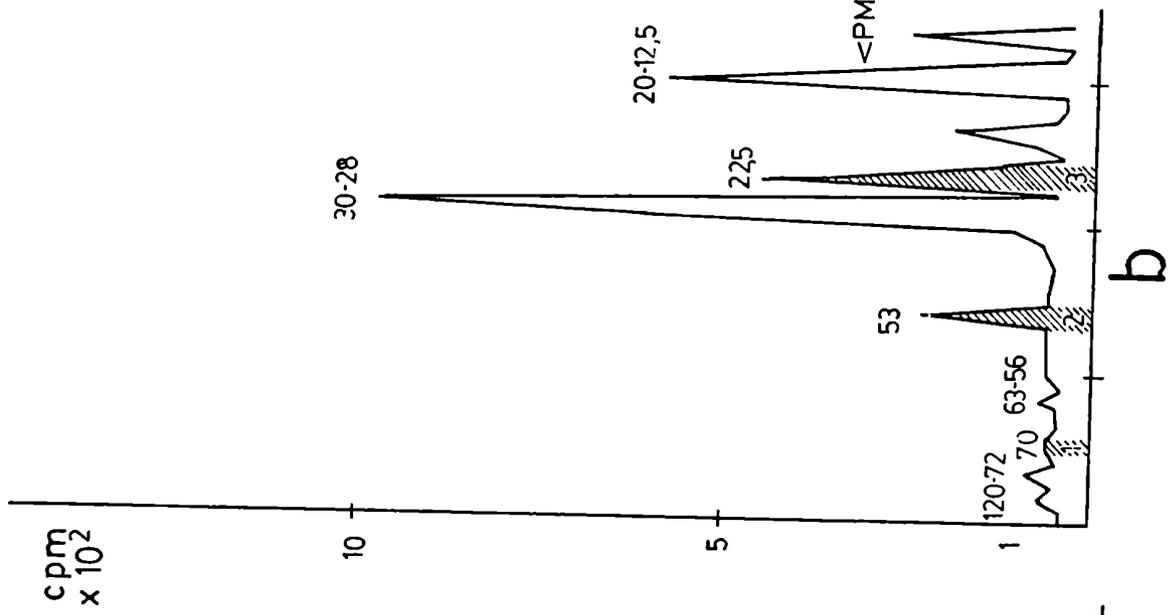
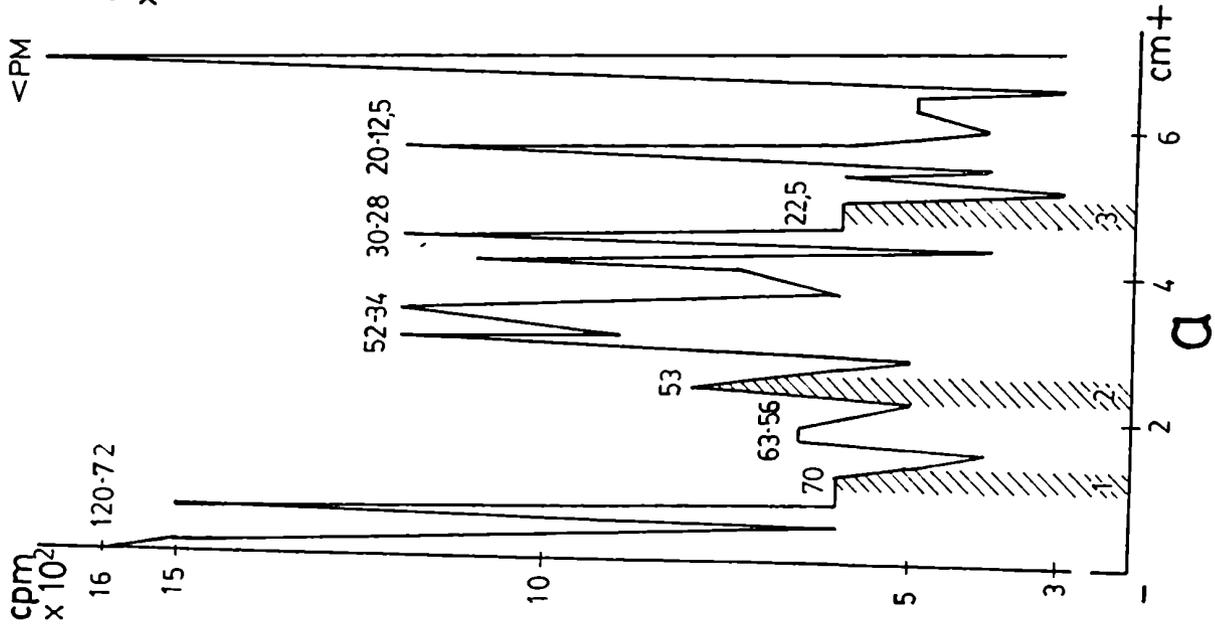


Grafico 4

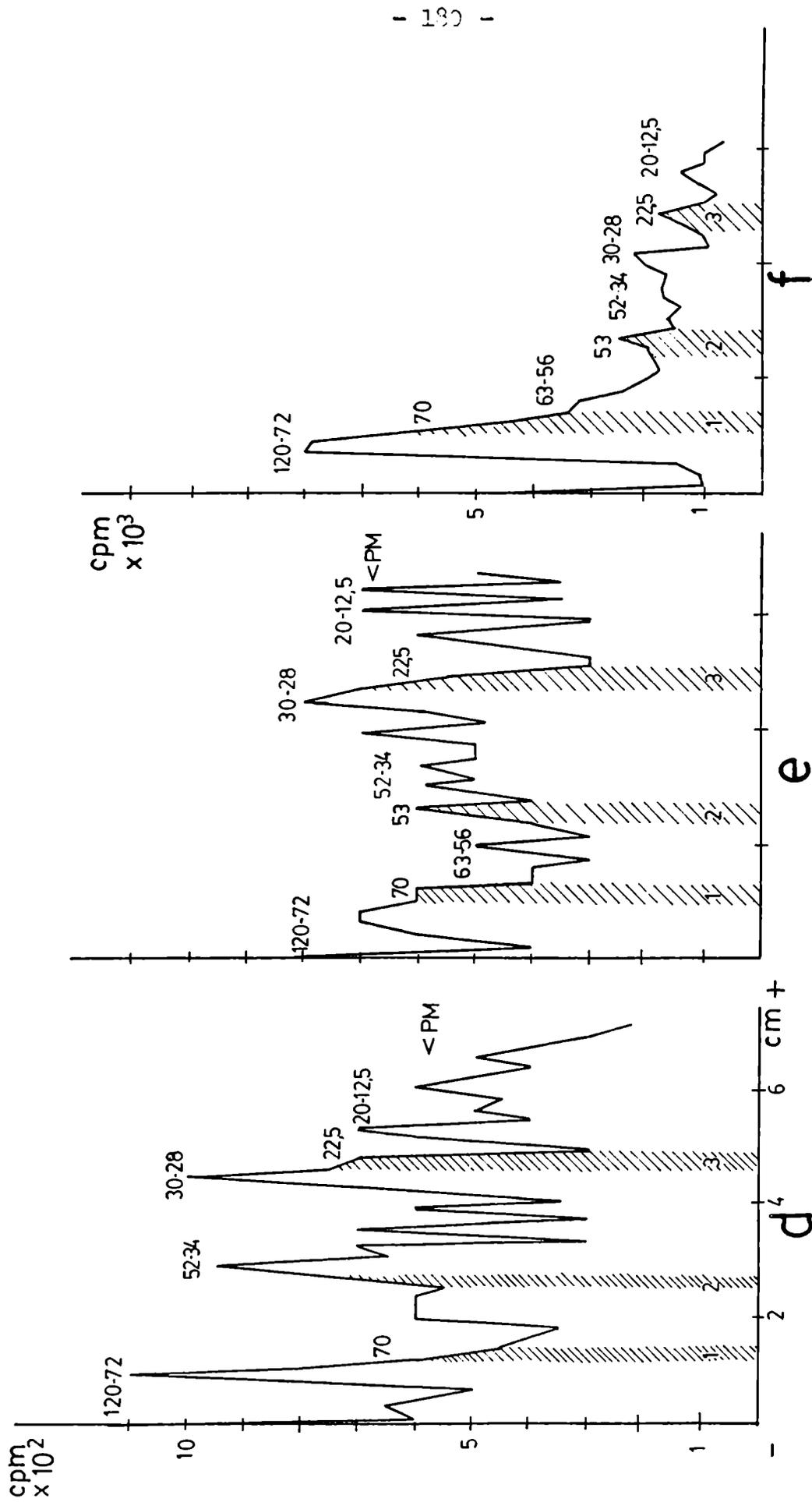


Grafico 4

files observados con los Ag T_1 y T_5 fueron diferentes a los demás y al de sus precipitados con suero homólogo y al análisis de los Ag individualmente (Gráficos 2 y 3).

Se hace notar que los gráficos mostrados por los precipitados Ag-suero anti BHK fueron diferentes al de BHK-suero homólogo: los Ac del suero anti BHK detectaron en los Ag polipéptidos de PM menor de 20.000, pero éste hecho no sucedió con células BHK. Esto podría explicarse suponiendo que los polipéptidos de bajo PM existieron en BHK pero en pequeña proporción y frente al resto de los productos no se fabricaron Ac específicos contra ellos (competición antigénica por baja concentración). Otra razón podría ser que los Ac formados no fueran precipitantes ó existieran en baja concentración y no se detectaron por la técnica empleada. Podría haber sucedido también que la detección de polipéptidos de bajo PM en las preparaciones antigénicas se hubiera debido a que existirían en células BHK sin infectar polipéptidos que compartirían determinantes antigénicos con los de bajo PM inducidos por el virus, que a su vez expondrían nuevos sitios enmascarados (criptotopes) (49). El suero anti BHK

poseería Ac hacia polipéptidos mayores que darían reacción cruzada con los menores.

De los resultados observados en a1 y a2, surgió como hecho notable que los precipitados inmunes formados con los Ag T₂ y T₅ presentaron los mayores valores de radioactividad (Gráficos 3 c, e; 4 c, f), recordando que sus antisueros producidos en conejos fueron los que protegieron al ratón lactante de la infección viral (Resultados 6).

En el precipitado T₂-suero anti T₂ se encontró la mayor marcación en los polipéptidos de PM entre 52.000-34.000 y en varios de PM menor de 12.500. El precipitado T₅-suero anti T₅ mostró alta radioactividad en polipéptidos de PM entre 120.000-72.000, mientras que los de PM 52.000-34.000 estaban disminuídos respecto a T₂-suero anti T₂, y permanecieron iguales los de PM entre 30.000-28.000 y un único pico de PM menor de 12.500

a.3) Se realizaron controles de precipitados, invirtiendo los reactivos respecto al caso anterior: se utilizó como Ag células BHK y se enfrentaron a los antisueros anti cada tiempo post infección y antivirüs, realizados en conejos.

De cada perfil se restaron las células BHK obtenidas como blanco de precipitación.

Analizando el Gráfico 5, se vió que, en general, los diagramas son distintos entre si, a pesar de que se encontró cierta semejanza entre BHK suero anti virus, anti T_0 y anti T_5 (Gráficos 5 g, a, f). Todos los perfiles mostraron diferencias con BHK-suero anti BHK (Gráfico 3 f). Con el suero anti T_1 (Gráfico 5 b) se detectaron gran cantidad de polipéptidos de PM 20.000 y menor, hecho que también se encontró con suero anti T_2 (Gráfico 5 c). Los valores disminuyeron con suero anti T_3 (Gráfico 5 d); los Ac del suero anti T_4 y T_5 (Gráficos 5 e, f) se unieron a una alta cantidad de polipéptidos entre PM 30.000-28.000.

Estos resultados indicaron que las células BHK sin infectar poseían polipéptidos de muy bajo PM, en baja concentración, ya que fueron detectados por antisueros obtenidos con células BHK infectadas a diferentes tiempos, quienes contendrían Ac anti aquellos polipéptidos, los cuales, se sugiere que su aumento fue inducido por el virus en las células.

Se analizaron por comparación los perfiles de BHK-sue-

ro anti células infectadas con los obtenidos al enfrentar los Ag con suero anti BHK (Gráfico 4) y se observó que en los que se utilizó suero anti T_1 , T_3 y T_5 los diagramas fueron diferentes. Con los antisueros anti T_0 , T_2 y T_4 se obtuvieron semejanzas, con pequeñas diferencias.

Estas correlaciones encontradas serían debidas a diferencias en los anticuerpos de los sueros utilizados.

GRAFICO 5.

Perfil de radioactividad de electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de precipitados inmunes utilizando como Ag células BHK₂₁ sin infectar y los siguientes antisueros.

- a) Suero de conejo anti células BHK₂₁ infectadas por 60 minutos (T₀).
- b) Suero de conejo anti células BHK₂₁ infectadas por 65 minutos (T₁).
- c) Suero de conejo anti células BHK₂₁ infectadas por 75 minutos (T₂).
- d) Suero de conejo anti células BHK₂₁ infectadas por 90 minutos (T₃).
- e) Suero de conejo anti células BHK₂₁ infectadas por 120 minutos (T₄).
- f) Suero de conejo anti células BHK₂₁ infectadas por 210 minutos (T₅).
- g) Suero de conejo anti virus sobrenadante de 8 hs p.i.

1: cadena H de IgM; 2: cadena H de IgG; 3: cadena L de Igs.

Los números sobre el perfil del gráfico indicaron el PM de los polipéptidos x 10³.

VP_{0,1,2,3}: polipéptidos estructurales del virus.

VIA: antígeno asociado a la infección viral.

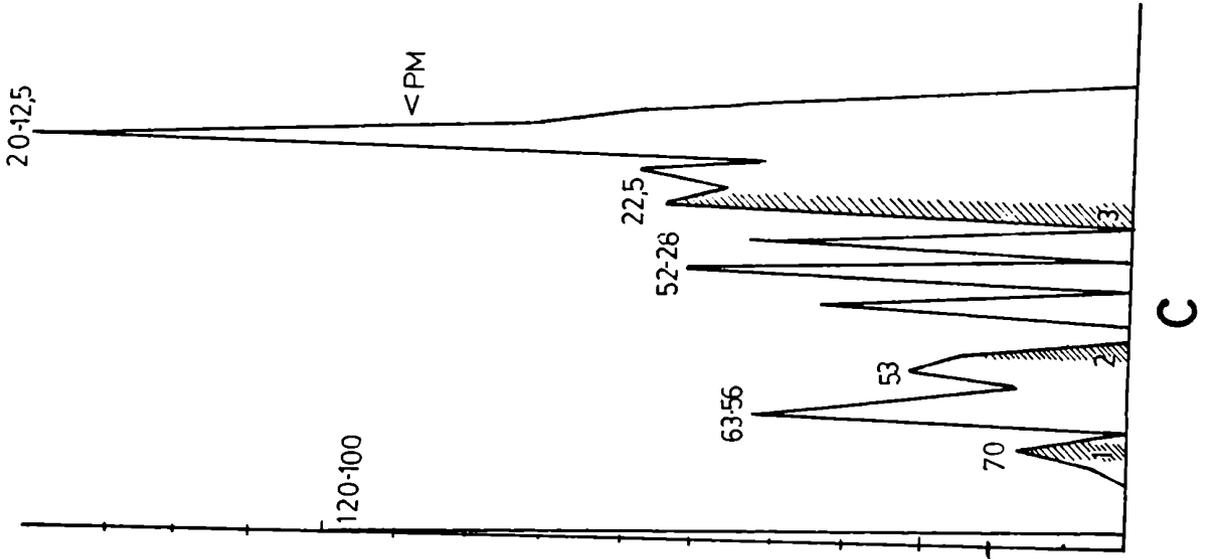
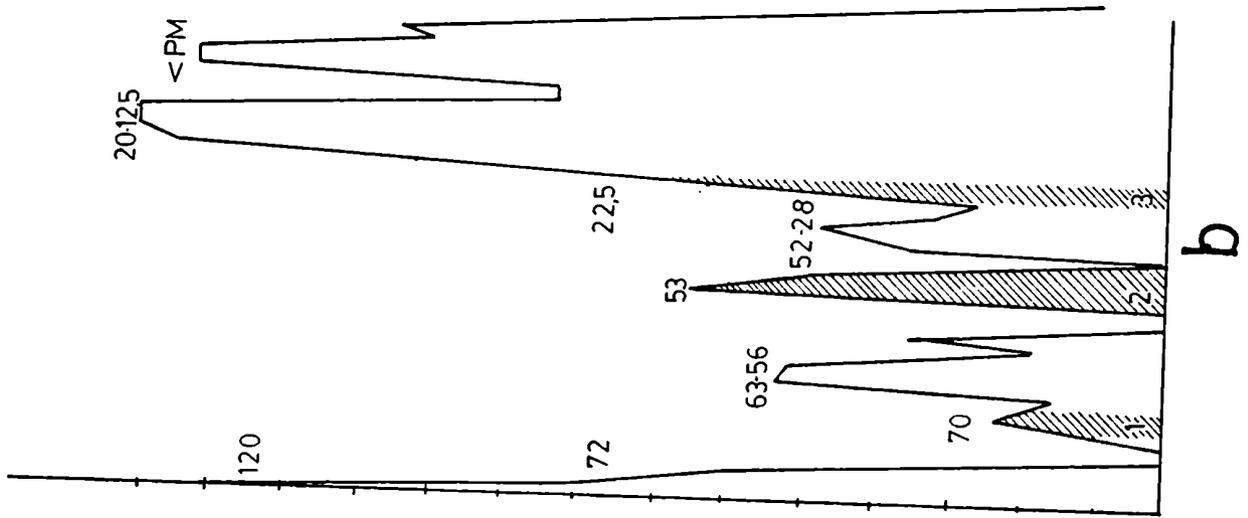
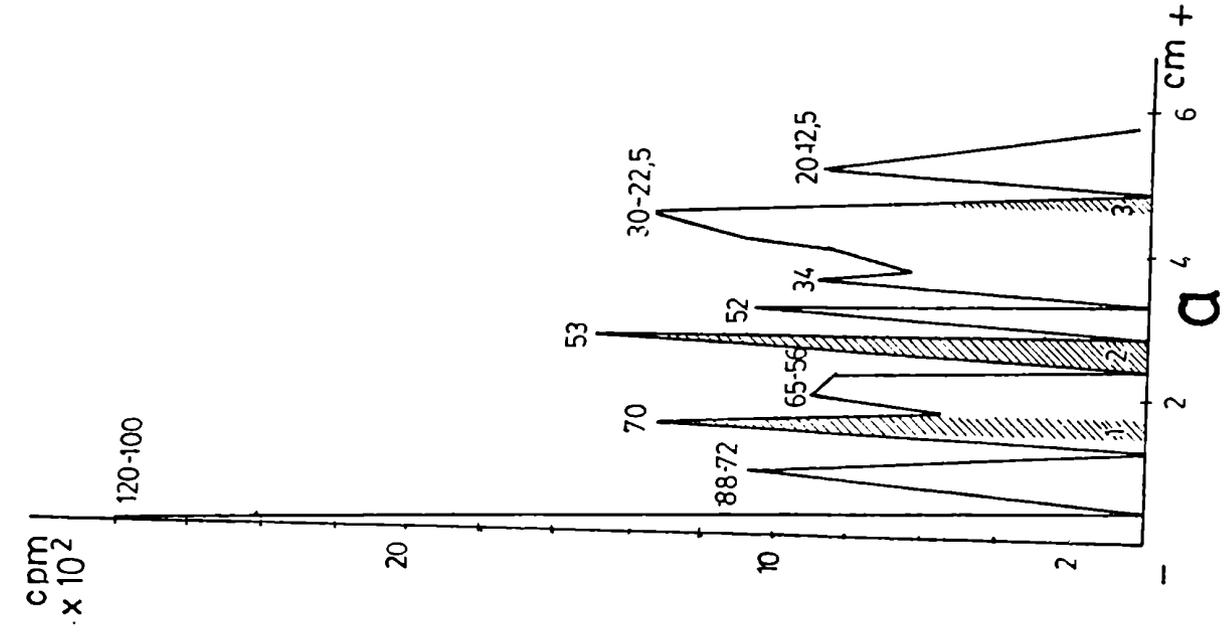


Grafico 5

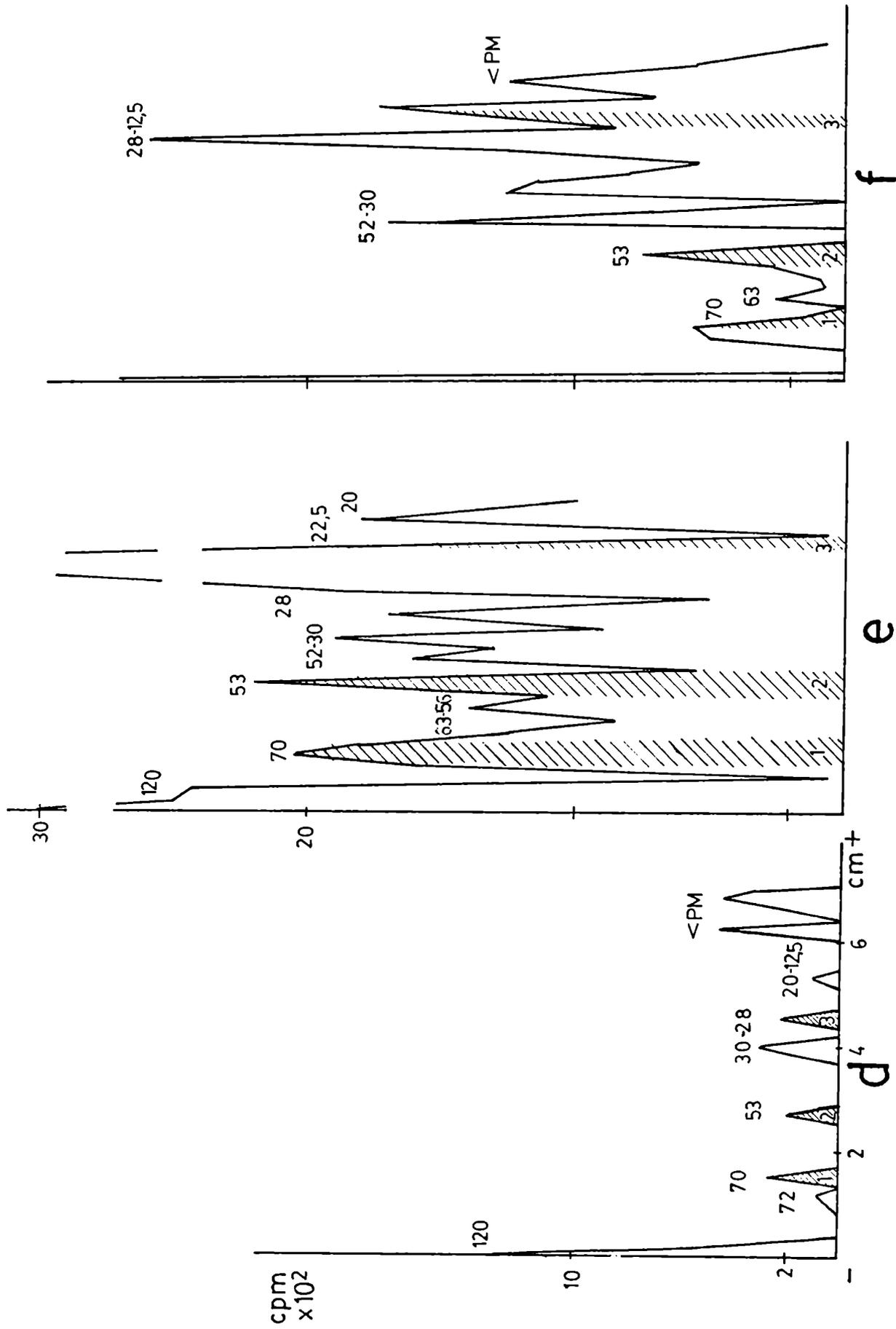


Gráfico 5

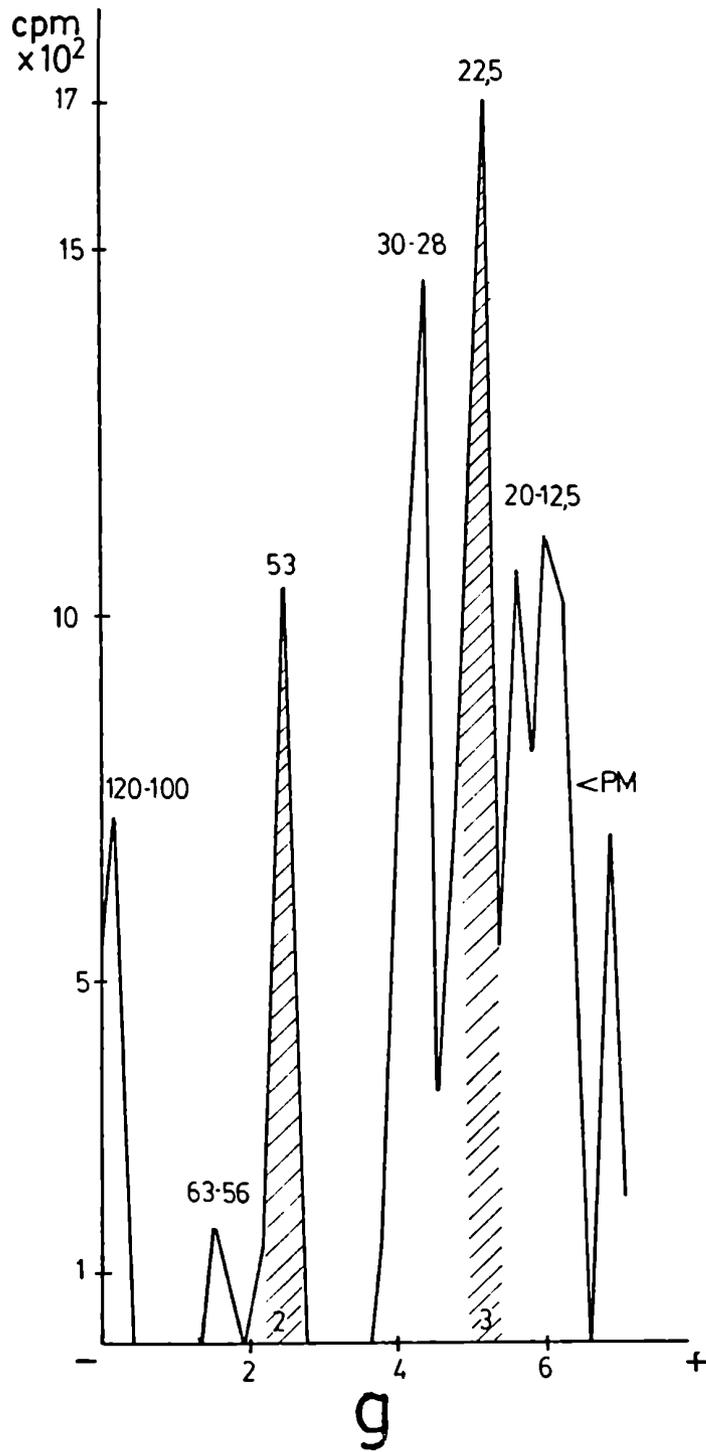


Grafico 5

b) Análisis de precipitados inmunes utilizando sueros bovinos.

Todos los análisis realizados en inmunoprecipitación trataron de validar e identificar fracciones polipeptídicas de células infectadas para estudiar en sueros de bovinos infectados y vacunados e infectados la probable existencia de Ac que se unieran específicamente a productos precursores, intermediarios ó maduros del virus.

Se realizaron los precipitados inmunes entre los Ag T_0/T_5 y los sueros de bovinos testigos y vacunados e infectados con aftovirus C pertenecientes a Laboratorios Estrella-Merieux, cuya descripción se realizó en Materiales y Métodos 6.1. Como control se reemplazó el Ag por células BHK₂₁ sin infectar y no se obtuvieron bandas.

Se analizaron los polipéptidos coloreados obtenidos en el gel de poliacrilamida, teniendo en cuenta la posición de Igs y componentes virales ya explicada al comienzo de ésta sección.

Debemos aclarar que para todos los precipitados se unificaron inicialmente las cadenas H y L de IgG e IgM, que pudieron coincidir con polipéptidos de su mismo PM. Algunos

sueros originaron precipitados que poseyeron IgG e IgM y otros sólo una de las dos Igs, recordando que en el análisis individual de las proteínas séricas se obtuvieron variaciones en bandas de movilidad β (Resultados 7) y el estudio cromatográfico de sueros de cobayo anti virus indicó protección y neutralización en esas mismas fracciones (Resultados 5).

El Cuadro 5 mostró los resultados obtenidos con sueros bovinos testigos, de animales de zonas libres de la enfermedad que se infectaron con 10.000 DI_{50} y se sangraron a diferentes días post-infección. Los sueros utilizados fueron cuatro: 51-52, 17-18, 77-78 y 49-50 y se estudiaron las sangrías 5a. (3 días p.i.), 6a. (7 días p.i.) y 7a. (14 días p.i.).

Analizando el Cuadro 5 se obtuvo que, en general, en las diferentes sangrías de animales testigos se detectaron Ac que se unieron a polipéptidos de los Ag T_0/T_5 cuyos PM fueron mayor de 70.000, entre 63.000-56.000, 52.000-34.000, 30.000-28.000 y menor de 20.000.

Se hace notar que casi todas las sangrías mostraron Ac hacia polipéptidos de PM mayor de 70.000.

Los Cuadros 6, 7, 8 y 9 mostraron los resultados obtenidos con sueros de bovinos vacunados y a los 21 días desafiados con 10.000 DI50. Las sangrías estudiadas fueron:

- 1: sangría previa (animal normal).
- | | | |
|------------|---|---|
| Sangrías | [| 2: 7 días post vacunación. |
| post | | 3: 14 días post vacunación. |
| vacunación | | 4: 21 días post vacunación e infección. |
| Sangrías | [| 5: 3 días post infección. |
| post | | 6: 5 días post infección. |
| infección | | 7: 7 días post infección. |

Para analizar la posible presencia de Acs en los sueros, que se hubieran unido específicamente a polipéptidos de los Ag T_0/T_5 , se agruparon de acuerdo a lo indicado en el análisis de proteínas de las sangrías en gel de poliacrilamida clásica (Resultados 7). Los grupos formados fueron: 1 sueros 525-526, 531-532 y 41-42, quienes respondieron en forma similar a la vacunación y descarga; 2: sueros 575-576 y 71-72, quienes no modificaron notoriamente sus proteínas frente a la vacunación y respondieron diferentemente a la

descarga; y 3 y 4: sueros 79-80 y 561-562 respectivamente los cuales presentaron cada uno respuestas individuales.

El Cuadro 6 mostró los resultados obtenidos con los sueros del grupo 1. En general la detección de Ac en sangrías post vacunación fué pobre, salvo el suero 525-526, cuyos Ac de 2a. y 3a. sangría se unieron específicamente a polipéptidos presentes en T_0 .

La determinación de Ac en sangrías post infección fué similar a la de sueros testigos (Cuadro 5).

Analizando los resultados del Cuadro 7, donde se utilizaron los sueros del grupo 2, se vió que el 71-72 presentó Ac en sus sangrías post vacunación que se unieron específicamente a polipéptidos antigénicos: en 1ra. y 4a. con los Ags T_2 , T_3 y T_4 y en 3a. con T_1 . El PM de los polipéptidos detectados fué mayor de 70.000, entre 63.000-56.000, 52.000-34.000 y menor de 20.000, quienes en algunos casos presentaron más de una banda.

Los Ac del suero 575-576, en 2a. sangría, se unieron a polipéptidos del Ag T_4 cuyo PM fué mayor de 70.000 y entre 63.000-56.000.

El comportamiento del suero 71-72 luego de la infección fué similar al de los testigos.

Los resultados del estudio utilizando el suero 79-80 (Grupo 3) (Cuadro 8) mostraron en las sangrías post vacunación, frente a los Ag T_0 , T_1 y T_3 , Ac que se unieron a polipéptidos de PM mayor de 70.000, entre 63.000-56.000, 52.000-28.000 y menor de 20.000 y en un caso un polipéptido cercano a cadena L (PM 23.000). En sus sangrías post vacunación, éste suero mostró semejanzas con el 71-72.

No se evidenciaron Ac en las sangrías post infección, salvo la 7a. con Ag T_4 , donde se detectaron Ac que se unieron específicamente a polipéptidos de PM 30.000-28.000 y menor de 20.000.

En todas las sangrías del suero 561-562 (Grupo 4) (Cuadro 9) se obtuvo una buena detección de Ac. La unión de éstos, en sangrías post vacunación e infección, a polipéptidos no mostró diferencias entre las dos etapas.

Como observación de éstas experiencias debemos recalcar que, en general, se evidenció en los geles una banda a aproximadamente 1 mm del origen, que pudo deberse a Ig no

digerida ó a polipéptidos de alto PM. También existieron bandas notables que indicaron Acs unidos a polipéptidos de PM mayor de 70.000 y menor e igual a 20.000 (en algunos casos varias bandas). El significado de los polipéptidos de muy bajo PM aún no se conoce.

Del análisis de las diferentes sangrías post vacunación de los siete sueros, se concluyó que el 561-562 mostró Ac que reaccionaron específicamente con polipéptidos de todos los Acs. Otros dos sueros (71-72 y 79-80) presentaron Acs en aproximadamente la mitad del total de sangrías, mientras que las muestras 575-576 y 525-526 presentaron reacción pobre y el resto no respondieron.

En las sangrías post infección, tres sueros (41-42, 79-80 y 575-576) no evidenciaron Acs, mientras que los demás mostraron un comportamiento similar a los testigos.

CUADRO 5.

Estudio de digestión y electroforesis en gel de poliacrilamida de precipitados inmunes obtenidos con sueros bovinos testigos (17-18, 49-50, 51-52 y 77-78) y Ags T₀/T₅.

Ag	Suero	Sangría	PM de los polipéptidos						Subunidades de			Ac	
			mayor 70.000	63.000- 56.000	52.000- 34.000	30.000- 28.000	20.000	menor 20.000	H de IGM	H de Igg	L		
T ₀	51-52	5	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	17-18	5	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
T ₁		6	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
		7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T ₂	51-52	6	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	17-18	5	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
T ₃		6	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	49-50	5	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
T ₄	51-52	5	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	77-78	6	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
T ₅	17-18	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	49-50	7	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
T ₅	51-52	6	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	77-78	5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
T ₅	17-18	5	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		6	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

CUADRO 6.

Estudio de digestión y electroforesis en gel de poliacrilamida de precipitados inmunes obtenidos con sueros bovinos del grupo 1 (41-42, 525-526 y 531-532) y Ags T_0/T_5 .

Sangrías: 2, 3 y 4 post vacunación; 5, 6 y 7 post infección.

1: 2 bandas.

Con el Ag T_5 no se obtuvieron bandas.

Ag	Suero	Sangría	PM DE LOS POLIPEPTIDOS				SUBUNIDADES DE AC			
			mayor 70.000	63.000- 56.000	52.000- 34.000	30.000- 28.000	menor 20.000	H de IGM	H de IgG	L
T ₀	525-526	2	+	-	-	-	+	-	+	+
			+	-	+	-	+	+	+	+
			-	-	-	-	+	-	+	+
T ₁	525-526	4	+	-	-	-	+	+	+	+
T ₂	41-42	3	+	-	-	-	-	+	-	+
T ₃	41-42	2	+	-	-	-	-	-	+	+
T ₀	525-526	5	+	-	+	-	-	+	+	+
T ₂	41-42	7	+	-	+	+	-	+	+	+
T ₃	531-532	5	+	+	+	-	-	+	+	+
T ₄	525-526	5	+	-	-	-	-	+	-	+
		6	-	-	+	-	-	+	+	+

sangrías post vacunación

sangrías post infección.

CUADRO 6.

CUADRO 7.

Estudio de digestión y electroforesis en gel de poliacrilamida de precipitados inmunes obtenidos con sueros bovinos del grupo 2 (71-72 y 575-576) y Ags T_0/T_5 .

Sangrías: 1 prevacunación; 2; 3 y 4 post vacunación; 5; 6 y 7 post infección.

1: 2 bandas.

2: 3 bandas.

AG	Suero	Sangría	PM de los polipéptidos						Subunidades de Ac			
			mayor 70.000	63.000- 56.000	52.000- 34.000	30.000- 28.000	menor 20.000	H de Igl:	H de Igg	L		
T ₁	71-72	3	+	+	-	-	-	-	+	-	+	
			+1	-	+1	-	+	+	+	+	+	
			+1	+1	+	-	+	+	+	+	+	+
			+1	+	-	-	+	+	+	+	+	+
T ₂	71-72	4	+	+1	-	-	-	-	+	-	+	
			+	-	+1	-	+	+	+	+	+	
			+	+1	+	-	+	+	+	+	+	+
			+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
T ₃	71-72	1	+	-	-	-	-	-	+	-	+	
			+	-	-	-	-	+	-	+	+	
			+	-	-	-	-	+	-	+	+	+
			+	-	-	-	-	+	-	+	+	+
T ₄	71-72	4	+	-	-	-	-	-	+	-	+	
			+	-	-	-	-	+	-	+	+	
			+	-	-	-	-	+	-	+	+	+
			+	-	-	-	-	+	-	+	+	+
T ₅	575-576	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
			+	-	-	-	-	+	+	+	+	
			+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
			+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
T ₆	71-72	6	+	-	-	-	-	-	+	+	+	
			+	-	-	-	-	+	+	+	+	
			+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
			+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
T ₇	71-72	7	+2	+1	-	-	-	-	+	+	+	
			+	-	+	-	-	+	+	+	+	
			+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
			+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
T ₈	71-72	7	+	+	+	+1	+	+	+	+	+	
			+	+	-	-	-	+	+	+	+	
			+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
			+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
T ₉	71-72	7	+	-	-	-	-	-	+	-	+	
			+	-	-	-	-	+	-	+	+	
			+	-	-	-	-	+	-	+	+	+
			+	-	-	-	-	+	-	+	+	+
T ₁₀	575-576	5	+1	-	-	-	-	-	+	-	+	
			+	-	-	-	-	+	-	+	+	
			+	-	-	-	-	+	-	+	+	+
			+	-	-	-	-	+	-	+	+	+

Sangría post vacunación

Sangría post infección

CUADRO 7.

CUADRO 8.

Estudio de digestión y electroforesis en gel de poliacrilamida de precipitados inmunes obtenidos con sueros bovinos del grupo 3 (79-80) y Ags T_0/T_5 .

Sangrías: 2, 3 y 4 post vacunación; 5, 6 y 7 post infección.

1: 2 bandas.

2: se detectó una banda de PM aproximadamente 23.000.

Los Ag T_2 y T_5 no dieron bandas.

AG	Suero	Sangría	PM de los polipéptidos						Subunidades de			Ac
			mayor 70.000	63.000- 56.000	52.000- 34.000	30.000- 28.000	menor 20.000	H de IgM	H de IgG	L		
T ₀	79-80	2	+	-	-	-	+	+	-	+	+	
			+	+ ^L	+	+	+	+	+	+	+	
T ₁	79-80	2	+	+ ^L	+	+	+	+	+	+	+	
			+	+ ^L	-	-	+	+	-	+	+	
T ₃	79-80	22	+	+ ^L	-	-	+	-	+	+	+	
			+	-	-	-	+	-	+	+	+	
T ₄	79-80	7	-	-	-	+	+	+	-	+	+	
			-	-	-	+	+	+	-	+	+	

sangría
Post vacunación

sangría
s post
infec.

CUADRO 8.

CUADRO 9.

Estudio de digestión y electroforesis en gel de poliacrilamida de precipitados inmunes obtenidos con sueros bovinos del grupo 4 (561-562) y Ags T₀/T₅.

Sangrías: 2, 3 y 4 post vacunación; 5, 6 y 7 post infección.

1: 2 bandas.

2: 3 bandas.

1 1 1
+ + +

DISCUSION.

El estudio por análisis radioactivo en gel de poliacrilamida de las preparaciones antigénicas obtenidas por infección con aftovirus C₂ de células BHK₂₁, clon 13, a diferentes tiempos mostró diferentes perfiles entre si, a medida que transcurrió el tiempo p.i. y distintos a células sin infectar (Figura 12 , Gráfico 2).

Se evidenciaron cambios en los polipéptidos entre 60 y 210 minutos p.i. En todos los Ag se presentaron polipéptidos de muy bajo PM (menor de P₁₆), correspondiendo la mayor cantidad a 65 y 210 minutos. P₂₀₋₁₆ se encontraron aumentados en 120 y 210 minutos. P₃₈ mostró altos valores sólo en 75 minutos mientras P₅₂ permaneció constante en todos los Ag. P₆₃ y P₇₂ aumentaron en 120 y 210 minutos. P₈₈ mostró mayores valores en 90 y 120 minutos y P₁₀₀ en 65 y 120 minutos. P₁₂₀ aumentó en 60 y 120 minutos. De las proteínas estructurales, VP₀ aumentó en 65, 75, 90 y 120 minutos y VP₁₋₃ existió en más cantidad en 60 y 65 minutos, siendo mayor aún en 120 y 210 minutos, en quienes también se en-

contró aumentado VP_4 .

Se observó inmunofluorescencia a partir de 65' p.i. utilizando suero de conejo anti virus sobrenadante y desde 75' p.i. con suero de cobayo hiperinmune anti virus (Figuras 8-10). Se debe tener en cuenta que la visualización fluorescente dependió del tipo de Ac con el cual se realizó la experiencia ya que el suero de conejo, fabricado con virus multiplicado en células, dió positivo un tiempo p.i. más temprano.

La fluorescencia observada hasta 120 minutos p.i., (Figura 9-10) de acuerdo al estudio del perfil radioactivo en gel de poliacrilamida de los Ag (Gráfico 2) podría deberse a la presencia de polipéptidos primarios, intermedios y maduros del virus.

Después de 120 minutos pi (Figuras 8-10) se observó fluorescencia con alteraciones y cambios morfológicos en las células, provocados por efecto citopático viral, coincidiendo con la presencia en los perfiles radioactivos de mayor cantidad de VP_{1-4} (Gráfico 2). Los datos hallados en la bibliografía indicaron que diversos autores, estudiando la multipli-

cación viral en diferentes sistemas celulares por distintos métodos encontraron que la producción de virus llega a un máximo entre 270-300 minutos p.i.. En este tiempo según Cartwright y col. (41) y Polatnick y Bachrach (109) el virus se encontró uniformemente repartido entre las células y el líquido sobrenadante y luego su producción disminuye gradualmente a causa de la destrucción de las células productoras de virus y de la inactivación térmica. Estos autores (109) indicaron que la fase de latencia tendría una duración de 100 a 110 minutos, mientras que Thorne (148) por métodos bioquímicos postuló 90 minutos para esa fase, coincidiendo con los estudios de Dragonas y Pappous (58) por inmunofluorescencia. A su vez Pledger (107) estimó que 90 minutos fue el tiempo para la formación de progenie intracelular y 150' el de liberación de progenie al medio extracelular.

Los citados estudios de Dragonas (58) mostraron que la primera fluorescencia se vió a los 90' p.i., haciéndose luego más intensa, para después de 2 hs diferenciar entre distintas fases: granular y parcial hasta compacta y comple-

ta a 8 hs p.i., donde desaparecía el núcleo celular.

Los trabajos de Yilma y col. en 1978 (162), utilizando varias metodologías, entre ellas inmunofluorescencia, indicaron la aparición de ésta a las 2 hs p.i., lo cual estaría de acuerdo a la demostración de progenie temprana en sus estudios de curva de crecimiento del virus. No detectó cambios ó alteraciones morfológicas en éste tiempo. Se observaron células redondeadas 3 hs p.i. y postularon que la liberación de virus en vacuolas citoplasmáticas, en éste tiempo, sugeriría un mecanismo general de liberación preláctica para picornavirus.

Los trabajos de interacción de aftovirus con células, en etapas tempranas, de Campos (37) determinaron que la infectividad intracelular a través de un ciclo de replicación viral, hasta 80 a 90' p.i. se debió a virus penetrante, mientras que Cavanagh y col. (43) en 1978, recuperaron de células infectadas, en los primeros 15-30' p.i., el 80% del virus disociado en partículas 12 S que poseían la misma composición polipeptídica que las obtenidas por acidificación; el 20% restante tenía igual composición proteica y ARN que

el virus nativo. Estos últimos autores (43) postularon que la secuencia de eventos en la unión de aftovirus a células se dividiría en tres etapas:

- 1) Unión irreversible del virus a componentes de la superficie celular sin aparente desestabilización de la cápside.
- 2) Liberación espontánea de una pequeña proporción del virus unido, en asociación con componentes celulares, sin aparente alteración en la composición polipeptídica de la partícula viral.
- 3) Rápida penetración, posiblemente en vacuolas y ruptura del virus en subunidades 12S.

En el transcurso de nuestro trabajo, la visualización microscópica de los efectos del virus sobre células determinó que éstas aparecían redondeadas luego de 3 h 30' p.i., lo cual haría suponer una rápida adaptación del agente al cultivo. Existiría cierta coincidencia con los trabajos de Yilma y col. (162) quienes encontraron progenie temprana sin cambios morfológicos a las 2 hs p.i. y postularon un mecanismo de liberación preláutico a las 3 hs p.i. y con los estudios de Dragonas y Pappous (58), quienes encontraron los

siguientes valores de virus en el sobrenadante de células infectadas:

1ra. hora : 4×10^4 UFP/ml.

2da. hora : 7×10^4 UFP/ml.

4ta. hora : 9×10^4 UFP/ml.

Existe similitud entre éstos valores y los nuestros, donde se encontró una constancia, con leve aumento hasta 120' p.i. y datos significativos luego de éste tiempo (Resultados 4-4), lo cual nos induciría a pensar en una liberación preléctica sin deformación celular.

De toda la información expuesta de bibliografía y nuestros resultados, podríamos postular un posible mecanismo que ocurriría en las preparaciones de células infectadas a diferentes tiempos: hasta los 75' p.i. existiría virus no desadsorbido y penetrante; entre 75' y 120' p.i. habría progenie viral temprana, con posible liberación preléctica y luego de 120' p.i. formación y liberación de progenie viral.

Los estudios por inmunodifusión (Figura 2), recordando la menor sensibilidad de dicho método, detectaron Ag VIA en nuestras preparaciones antigénicas de células infectadas por 90, 120 y 210 minutos. Se obtuvieron resultados contradictorios con diferentes lotes de Ag VIA y sus antisueros, lo cual nos lleva a hacer incapié en que, para extraer conclusiones con ésta metodología, se debería tener Ag VIA puro y antisueros muy específicos.

De las reacciones cruzadas obtenidas con nuestros Ag y sueros antiaftovirus A y O (Figuras 6-7) sugerimos que la responsabilidad estaría en Ag VIA ó en polipéptidos primarios inducidos por el virus en células, ya que los trabajos de Brown (27), analizando péptidos trípticos de P₂₀, 52 y 100 indicaron homologías en los tres tipos de virus, con un alto grado de relación, mientras que P₈₈ no poseía esa propiedad. Es evidente la importancia de la naturaleza de las preparaciones antigénicas, al analizar Ac de sistemas virales de Ag múltiples, ya que determina la especificidad de tipo de la reacción, así como la aparición y desaparición de dichos Ac en el curso del tiempo.

De los estudios de seroprotección en ratón lactante (Cuadro 3), de los antisueros obtenidos en conejos con nuestras preparaciones antigénicas, se obtuvieron resultados significativos para las células infectadas por 75 y 210', mientras que las de 120' dieron protección. Dicha protección fue específica para aftovirus. Al estudiar la especificidad de tipo de la reacción, se obtuvo sobrevida pobre, no significativa, para aftovirus 0, lo cual podría indicar alguna producción de Ac protectores por polipéptidos primarios (no P₈₈) (27).

El suero anti VIA dió protección leve, no significativa. Los sueros de conejo anti virus sobrenadante y concentrado no protegieron.

El análisis de los polipéptidos existentes en las tres preparaciones antigénicas que provocaron Ac protectores mostró diferencias (Gráfico 2). En 75' p.i. existieron en mayor concentración P_{120',100',56} y 38'. En 120' p.i. P_{120', 100', 88', 72', 63} y VP₁₋₃'. En 210' p.i. P_{120', 72', 63} y VP₁₋₃'. Recordemos que el virus sobrenadante tenía mayor concentración de P_{120', 88', VP₀₋₄}'.

Por la metodología utilizada, no podemos discernir

cuales polipéptidos habrán inducido Ac que protegieron a ratones lactantes de la infección viral, pero de acuerdo a Mc Cahon (93), los polipéptidos P_{88'}, 63', 56 b y 39' provendrían del extremo 5' del genoma y serían precursores de proteínas estructurales del virus, y existiendo en nuestros Ags dichas proteínas, la inducción de Ac protectores en conejos se debería a polipéptidos precursores de estructurales. El hecho de que el Ag de 75' p.i. poseía menor cantidad de VP₁₋₃, indicaría que ellos no serían los principales determinantes para inducir en conejo Ac protectores. Nuestro virus sobrenadante, que poseía mayor cantidad de polipéptidos estructurales y P₁₂₀, no indujo dichos Ac.

En conejo, serían más inductores de Ac protectores los polipéptidos precursores de estructurales que éstos mismos.

La producción de Ac protectores por los antígenos indicados, sería el resultado de la acumulación de múltiples determinantes antigénicos, diferentes en calidad y cantidad que los encontrados en virus sobrenadante.

Utilizando nuestras preparaciones antigénicas, se tes-

taron Ac de sueros bovinos infectados y vacunados e infectados por inmunoprecipitación y análisis en gel de poliacrilamida con SDS, para determinar diferencias entre los 2 grupos de bovinos. Dichos Ac se unieron específicamente a polipéptidos de los Ags, que fueron inducidos por aftovirus en cultivos celulares. Los blancos de precipitación, donde se reemplazó el suero por PBS y los controles donde se hizo reaccionar células BHK sin infectar con los sueros bovinos, no dieron bandas.

El estudio de Ac de los sueros bovinos mostró la existencia de IgG e IgM. Al realizar el análisis de sueros hiperinmunes de cobayo anti aftovirus (Resultados 5, Cuadro 2) se encontraron los mayores índices de actividad de Ac en proteínas con movilidad β_1 , β_2 y γ_2 . Debemos recordar que los datos bibliográficos referentes a la respuesta de Ac inducida por virus, indicaron su característica bifásica, presentando un pico inicial después de 5 a 8 días p.i., seguido por otro a los 15-20 días. La naturaleza bifásica de esta curva-respuesta se debe a la aparición secuencial de las clases de Ac IgM e IgG.

Brown y Graves inicialmente demostraron éste cambio en las características físico-químicas de Ac inducidos por aftovirus en ganado bovino y cobayos (22, 23). Se vió que el Ac presente el 7º día después de la infección era IgM mientras que 14 días después aparecían Ac IgG (25 , 46 , 47, 64 , 94 , 136)

Por otro lado, se determinó que inmunoglobulinas conteniendo Ac, se encontraron en sueros bovinos en las áreas de gamma globulinas, Beta globulinas y trazas en alfa 2 globulinas (77).

Nuestro estudio de proteínas de sueros bovinos testigos y de prueba, por electroforesis en gel de poliacrilamida (Cuadro 4 , Figuras 13-33) no acusó un aumento general, notable, en la concentración proteica. Se presentaron variaciones en las fracciones globulínicas con características individuales, aunque las sangrías de sueros testigos mostraron, en líneas generales, aumentos en las zonas de γ , β_2 , β_1 , inter $\alpha - \beta$ y α_2 globulinas, siendo más notorias las variaciones en inter $\alpha - \beta$ que se presentaron en todos los sueros. Las sangrías de animales vacunados mostraron

también características individuales, aunque en general, los mayores aumentos se vieron en zonas de γ , β_2 , β_1 , inter $\alpha - \beta$ y α_2 globulinas.

Considerando éstas variaciones debemos decir que la calidad de Ac pertenece a una clase ó subclase determinada y es independiente de la concentración de la misma, es decir, dentro de la totalidad de moléculas de Ac, sólo algunas poseerían una actividad biológica determinada. (31, 149, 157, 158, 159, 160, 161).

Para poder discutir los resultados obtenidos de nuestros precipitados inmunes con sueros bovinos debemos explicitar los siguientes datos brindados gentilmente por Laboratorios Estrella-Merieux: los bovinos de Esquel (Pcia. de Chubut) fueron vacunados con vacuna trivalente, hidroxisaponinada, de tipo Frenkel sin diluir. El desafío se realizó con 10^4 DI50 de virus bovinizado monoespecífico. Todos los sueros fueron analizados por seroneutralización en cultivos primarios de células de riñón de cerdo y luego del desafío se realizaron las lecturas de lesiones provocadas por el virus.

Los sueros utilizados en nuestras experiencias (desafiados con aftovirus C) dieron los siguientes índices de neutralización a los 21 días p.v. (se consideró alto entre 1,65-1,80, intermedio entre 1,40 y 1,65 y dudoso de 1,2 ó menor):

<u>Suero</u>	<u>Seroneutralización a tipo de virus</u>
71-72	C: 1,50; A: 1,50
41-42	C: 1,80; A: 1,65
79-80	C: 1,65; A: 1,50
531-532	C: 1,80; A: 1,50
525-526	C: 1,65; A: 1,65
561-562	A: 1,65; O: 1,65
575-576	C: 1,60; O: 1,65; A: 1,50

Los títulos de seroneutralización de sangrías previas fueron negativos.

Todos los animales testigos generalizaron la infección, mientras que los vacunados no enfermaron, excepto los 525-526 y 531-532 que mostraron lesiones primarias en boca de 2 y 1 cruz respectivamente.

Recordamos que todos nuestros controles confirmaron resultados negativos y que los estudios de radioinmunoprecipitación y análisis en gel de poliacrilamida de nuestros Ag con sueros de conejo homólogos y heterólogos nos permitieron deducir la existencia, en los precipitados, de polipéptidos inducidos por virus en células, así como determinar su PM aproximado (Gráficos 3, 4, 5), coincidiendo estos estudios con los de Harris y col. (70) utilizando metodologías similares. El análisis de los precipitados obtenidos entre los Ags y los sueros testigos mostró unión de sus Ac hacia polipéptidos de PM mayor de 70.000 en todas las sangrías; en menor cantidad se unieron a polipéptidos de PM menor ó igual de 20.000 y unas pocas con polipéptidos de PM entre 63.000-56.000, 52.000-34.000 y 30.000-28.000 (Cuadro 5).

Los sueros testigos presentaron aumento de IgM luego de la infección, aunque en forma individual, ya que , p. ej. el 17-18 lo hizo en 5a. S y el 49-50 en 6a. y 7a. Recordemos que éstos sueros mostraron luego de la infección

aumentó en las zonas γ , β_2 , β_1 , inter $\alpha - \beta$ y α_2 , siendo más notoria y repetitiva la de inter $\alpha - \beta$ (Resultados 7).

Se detectaron Ac hacia nuestros Ags en las sangrías 5a (Cuadro 5), mientras que Brown (23) encontró que sueros de bovinos convalescientes de una infección con aftovirus O presentaron Ac a los 7 días p.i. de movilidad β globulina y 14 días después γ globulinas, determinando en 1964 (25) que el Ac temprano era 19 S. En 1962, por inmunofluorescencia indirecta, Seibold y col. (127) detectaron, en sueros de bovinos infectados con aftovirus A₁₁₉, Ac en el día 6 p.i. Cowan en 1973 (49) indicó que, los bovinos infectados con aftovirus C daban más alta respuesta de Ac que con C ó A y detectaban por inmunodifusión radial y fijación de complemento Ac en el día 4 p.i.

Se dedujo que con nuestra metodología y nuestras preparaciones antigénicas se detectaron Ac de sueros de bovinos infectados hacia polipéptidos inducidos por virus en células, en tiempos algo más tempranos (3 días p.i.) que

los indicados en la bibliografía, ó que dichos animales presentaban algún tipo de información previa.

La detección de Ac en sueros de bovinos vacunados e infectados mostró un comportamiento individual, ya que las sangrías de determinados sueros reaccionaron con todos los Ags, mientras que algunas de otros sueros sólo lo hicieron con unos pocos. (Cuadros 6, 7, 8 y 9). La reacción en las sangrías post vacunación fue más intensa (a veces con más de una banda) y hacia mayor variedad de polipéptidos que en las sangrías de testigos (Cuadro 5). Las sangrías p.i. dieron reacciones similares a las de sueros de bovinos infectados.

La sangría previa del bovino 71-72, presentó Acs unidos a polipéptidos de PM mayor de 70.000, entre 63.000-56.000, 52.000-34.000 y menor de 20.000 (Cuadro 7).

Los sueros de los bovinos vacunados e infectados mostraron en sus sangrías postvacunación aumento de Igm en las muestras 71-72, 79-80 y 561-562, mientras que en todas las sangrías p.i. también aumentó, salvo en el suero 561-562. Recordemos que en el análisis de las fracciones proteicas,

las sangrías p.v. evidenciaron aumentos en γ , β_1 , β_2 , inter $\alpha - \beta$ y α_2 globulinas, y en las p.i. un contenido similar a testigos (Resultados 7).

En líneas generales, las diferencias que esperabamos obtener en detectar polipéptidos distintos, por medio de Ac de sangrías de sueros bovinos testigos y vacunados, no fueron significativas, de donde deducimos que dichas diferencias, a nivel de vacunación con virus inactivado e infección deberán buscarse en la inmunidad celular ó en factores humorales no Ac clásico.

Recordemos que los sueros de conejo anti células infectadas por 75, 120 y 210 minutos habían protegido al ratón lactante de la infección viral (Cuadro 3). En los estudios de precipitación con sueros bovinos, los polipéptidos de dichos Ag, no mostraron una unión diferencial, respecto a los de células infectadas por 60, 65 y 90 minutos (Cuadros 5-9).

Comparando los datos de seroneutralización de los sueros bovinos (brindados anteriormente en ésta discusión) y la respuesta hacia nuestros Ags, no se encontró correlación;

por ejemplo los sueros 531-532 y 525-526 presentaron título de seroneutralización altos, lesiones primarias en boca y la reactividad de las distintas sangrías en la inmunoprecipitación fué pobre (Cuadro 6). Abarcon y col., indicaron que valores más bajos de títulos de Acs neutralizantes que los fijados para protección no indicaban necesariamente falta de ella (1). Sützmoller halló diferencias significativas en la relación título de Ac neutralizantes y protección frente al desafío entre distintos laboratorios y tipos de virus, considerando la existencia de ésta última en bovinos que no desarrollaron lesiones podales (146).

Además, Brunengo y col. hallaron bajos títulos de seroneutralización en bovinos que al ser descargados con virus A₂₄ se hallaron protegidos (30), indicando Lombard que no se puede esperar que exista correlación entre los títulos neutralizantes, especialmente en un sistema heterólogo, y protección en el campo (87).

Hacemos incapié en los datos mostrados por el animal vacunado 71-72 (Cuadro 7), donde Ac de sangría previa (la) se unieron específicamente a polipéptidos de nuestras preparaciones antigénicas, así como la reacción observada en

animales infectados a los 3 días p.i., donde casi todos los sueros ofrecieron positividad (Cuadro 5). Se encuentran en la bibliografía datos donde podrían encuadrar nuestros resultados. Una explicación la podría brindar el hecho comprobado de la existencia de bovinos sanos portadores de virus, (153) de los cuales se aisló el agente, del líquido esofagofaríngeo, quien en algunos casos podría estar enmascarado por Ac ya que el tratamiento con fluorocarbono aumenta su infecciosidad de 10 a 100 veces (144). La investigación de dichos animales se utiliza en programas de importación y exportación de bovinos y en encuestas como indicador epidemiológico (42,143). Además, en Colombia, en una zona declarada libre de FA se detectaron Ac anti VIA en sueros de portadores sanos (84).

Se encontraron inhibidores no específicos en sueros de bovinos jóvenes, que tenían la propiedad de neutralizar virus y aunque no protegen de la infección viral (con 10^4 DI50), prolongan el período de aparición de lesiones primarias y generalizadas (132). Existen además diversas reacciones cruzadas entre suero bovino normal y aftovirus,

debidas a una respuesta de IgM luego de una infección ó reinfección con un agente que compartiría antígenos, reactivando a un virus latente por estímulo antigénico (2), ó como consecuencia de un traslado de bovinos de zona libre de aftosa, cuyos sueros poseían Acs reaccionantes con el virus aftoso, que aumentaban luego del viaje (4). También se notificaron reacciones entre aftovirus SAT₁ (no de los otros tipos) y suero de cobayo anti enterovirus bovino, debido a IgM (3). O sea que el suero normal de una variedad de especies contiene sustancias que reaccionan con una serie de virus (103).

Meloen (96) estudió la actividad precipitante y neutralizante de suero bovino normal con varios tipos de aftovirus, éste tratado con tripsina y sin tratar. Obtuvo resultados positivos debidos a componentes del suero normal que se asemejarían a Ac 19 S específicos y diferenció entre reacciones específicas y no específicas por inmunodifusión. La explicación podría estar en una infección no reconocida en los animales, con un agente no relacionado o en el hecho de que las sustancias detectadas formarían parte de una clase

de mecanismo de vigilancia heredado (76).

Además la naturaleza "específica" del agente precipitante en suero bovino normal reflejaría un fenómeno mas general ya que se obtuvieron reacciones entre suero equino normal y poliovirus (151); para éste último la actividad se asoció a IgG e IgA (152).

Para tratar de clarificar en cual caso estarían incluidos nuestros resultados, se realizó una experiencia de inmunodifusión donde colocamos nuestros antisueros de conejo anti T₀/T₅, enfrentados a epitelios linguales bovinos infectados con aftovirus C por 30, 60, 80 y 120'. Se observaron durante una semana y dieron reacciones positivas con todos los Ag. O sea que en nuestras preparaciones antigénicas habría partículas iguales ó similares a las existentes en epitelio lingual infectado, que son reconocidas por los Ac de sueros de conejo obtenidos con células BHK infectadas. Los sueros de bovinos infectados y vacunados poseerían Acs hacia esas estructuras antigénicas.

Nos inclinamos a pensar que los sueros de bovinos poseen Ac que reaccionan específicamente con polipéptidos in-

ducidos por aftovirus ó con estructuras del mismo, sin poder descartar la posible existencia de reacciones cruzadas con otros agentes ó de sustancias específicas encontradas naturalmente en el suero del animal.

La existencia de Ac hacia los polipéptidos en forma dispersa en nuestros sueros bovinos (Cuadros 5-9) nos inducen a pensar que la vacuna, tipo Frenkel, ó el virus replicante, forman Ac hacia partículas que detectamos con células HEK infectadas. Existirían entonces, en bovinos infectados y vacunados, Ac anti polipéptidos precursores, intermedios, maduros y de bajo PM que tendrían importancia a nivel de protección y considerando que la mayor cantidad de los Ac estaban dirigidos hacia estructuras de PM mayor de 70.000 y menor de 20.000, sugerimos que éstos polipéptidos tendrían una función de mayor importancia que la que actualmente se les asigna.

Nuestras deducciones sobre el posible poder protector de dichos Ac se extrajeron de los sueros de animales que presentaron altos títulos de seroneutralización, pobre ó mala respuesta a los polipéptidos y lesiones primarias en boca.

De éste trabajo no podemos concluir definitivamente sobre las posibles diferencias a nivel de Ac entre sueros de bovinos infectados y vacunados, pero dada nuestra experiencia en cobayos y sueros bovinos, nos inclinamos a pensar que dichas diferencias irían más allá de Ac circulantes.

A. Baunert

E. J. Monod

RESUMEN.

En este trabajo se hicieron estudios de anticuerpos circulantes en sueros de bovinos infectados y vacunados e infectados, provenientes de pruebas de vacunas. Dichos animales fueron originarios de zona libre de fiebre aftosa, se vacunaron con vacuna trivalente, tipo Frenkel, hidroxisaponinada y 21 días después se desafiaron con 10^4 DI₅₀ de virus mono-específico, junto con bovinos no vacunados (testigos). Todos los sueros fueron analizados por seroneutralización en cultivos primarios de células de riñón de cerdo y luego del desafío se realizaron las lecturas de lesiones provocadas por el virus, habiendo generalizado la infección los testigos, mientras que los vacunados no enfermaron.

En éste trabajo se estudiaron los sueros de bovinos desafiados con aftovirus C y de cada uno, diversas sangrías post vacunación y post infección (éstas también de sueros testigos). Los anticuerpos de dichos sueros se analizaron por su unión específica a polipéptidos inducidos por el virus en preparaciones antigénicas que consistieron en célu-

las BHK₂₁, clon 13 infectadas con aftovirus C por 60, 65, 75, 90, 120 y 210 minutos.

Para poder determinar las diferencias existentes entre todas las preparaciones antigénicas, se estudiaron por inmunodifusión, inmunofluorescencia, cuantificación de virus en sobrenadantes de células infectadas y electroforesis en gel de poliacrilamida de antígenos radioactivos para identificar los polipéptidos presentes y su variación en las diferentes muestras.

Los perfiles radioactivos fueron diferentes entre las distintas muestras y a las células sin infectar. En todos los antígenos se presentaron polipéptidos de muy bajo PM (menor P₁₅), correspondiendo la mayor cantidad a 65 y 210 minutos. P₂₀₋₁₆ aumentaron en 120 y 210 minutos. P₃₈ fué alto en 75 minutos y P₅₂ no varió. P₆₃ y P₇₂ tuvieron mayores valores en 120 y 210 minutos, P₈₈ en 90 y 120 minutos, P₁₀₀ en 65 y 120 minutos y P₁₂₀ en 60 y 120 minutos. Los mayores valores de VP₀ se encontraron en 65, 75, 90 y 120 minutos, mientras que los de VP₁₋₄ en 120 y 210 minutos.

La fluorescencia observada hasta 120 minutos post in-

fección podría deberse a polipéptidos primarios, intermedios y maduros del virus.

Después de 120 minutos p.i., se observó fluorescencia con alteraciones y cambios morfológicos en las células, provocados por el efecto citopático viral.

Se postuló que hasta los 75 minutos post infección existiría virus no desadsorbido y penetrante; entre 75 y 120 minutos post infección habría progenie viral temprana con posible liberación preláctica y luego de 120 minutos post infección formación y liberación de progenie viral.

Los estudios de los antígenos por inmunodifusión con sueros homólogos y heterólogos llevaron a demostrar la presencia de antígeno asociado a la infección viral en 90, 120 y 210 minutos, a pesar de que, por metodologías más sensibles, se detectó P₅₆ en todos los antígenos. También se obtuvieron resultados contradictorios según los lotes de antígeno VIA y su antisuero. Para obtener conclusiones con ésta metodología se deberían poseer antígenos puros y antisueros específicos.

Los ensayos de inmunodifusión con sueros anti aftovi-

rus O y A dieron reacciones cruzadas; se dedujo que la responsabilidad estaría en antígeno asociado a la infección viral o polipéptidos primarios inducidos por virus en células (excepto P₃₈).

De los sueros de conejo anti células infectadas a diferentes tiempos, sólo los correspondientes a 75, 120 y 210 minutos protegieron específicamente para aftovirus, siendo significativos los índices correspondientes al primero y al último. El suero anti antígeno asociado a la infección viral dió protección leve y los sueros de conejo antiviruses sobrenadante y concentrado no lo hicieron.

Por los análisis realizados sobre los antígenos, no pudimos discernir cuales polipéptidos serían más inductores de anticuerpos protectores en conejo, pero nos inclinamos a pesar que la responsabilidad estaría en los precursores de estructurales, más que en éstos mismos. La producción de anticuerpos protectores a los antígenos indicados, sería el resultado de la acumulación de múltiples determinantes antigénicos, diferentes en calidad y cantidad que los encontrados en el virus sobrenadante.

Todos los estudios mencionados fueron necesarios para iniciar el estudio de sueros bovinos desde el punto de vista de contenido proteico y precipitados inmunes analizados por electroforesis en gel de poliacrilamida.

Nuestros sueros de cobayo hiperinmune anti virus mostraron la mayor actividad de anticuerpo en las fracciones γ_2 , β_1 y β_2 globulinas, no habiendo existido correlación con la concentración proteica total. Esta misma falta de correlación entre actividad y concentración se encontró en los sueros bovinos, notandose que en las diferentes sangrías, las fracciones que más aumentaron fueron γ_1 , β_1 , β_2 , inter $\alpha - \beta$ y α_2 globulinas, de las cuales se sabe que poseen actividad de anticuerpo las γ , β y trazas en α_2 globulinas. Considerando las variaciones encontradas debemos decir que la calidad de anticuerpo pertenece a una clase ó subclase determinada y es independiente de la concentración de la misma, es decir, dentro de la totalidad de moléculas de anticuerpo, solo algunas poseerían una actividad biológica determinada.

De los estudios realizados sobre precipitados inmunes

entre nuestros antígenos y los sueros de conejo homólogos y heterólogos a dichos antígenos extrajimos las conclusiones necesarias para hacer el estudio en sueros bovinos, caracterizando los polipéptidos precipitados inducidos por virus en células y su peso molecular aproximado por electroforesis en gel de poliacrilamida.

La detección de Ac en sueros de bovinos vacunados e infectados mostró un comportamiento individual, ya que las sangrías de determinados sueros reaccionaron con todos los antígenos, mientras que algunas de otros sueros lo hicieron con unos pocos. La reacción en las sangrías post vacunación fué más intensa (a veces con más de una banda) y hacia mayor variedad de polipéptidos que en las sangrías de testigos. Las sangrías post infección dieron reacciones similares a las de sueros de bovinos infectados.

No existió correlación entre los valores de seroneutralización de los sueros bovinos y su respuesta de anticuerpos en unión a diferentes polipéptidos de los antígenos.

De los estudios de inmunodifusión entre epitelios linguales bovinos infectados y antisueros de conejo se dedujo

que en nuestras preparaciones antigénicas habría partículas iguales ó similares a las existentes en epitelio lingual infectado y el suero de bovinos infectados y vacunados poseerían anticuerpos hacia dichas partículas.

La reacción entre anticuerpos de sueros bovinos y polipéptidos inducidos en células por aftovirus fué específica, sin poder descartar la posible existencia de reacciones cruzadas con otros agentes ó de sustancias específicas encontradas naturalmente en el suero del animal.

La vacuna (tipo Frenkel) ó el virus replicante formaría anticuerpos hacia determinadas partículas que se detectaron con células BHK infectadas. Los Ac detectados en bovinos infectados y vacunados se dirigieron hacia polipéptidos precursores, intermediarios, maduros y de bajo PM, y tendrían importancia a nivel de protección, considerando que se unieron mayormente hacia estructuras de PM mayor de 70.000 y menor de 20.000, sugerimos que éstos tendrían mayor importancia que la que actualmente se les asigna.

De éste trabajo no podemos concluir definitivamente sobre las posibles diferencias a nivel de anticuerpos entre

sueros de bovinos infectados y vacunados, pero nos inclinamos a pensar que dichas diferencias irían más allá de anticuerpos circulantes.

Alumena

de Monoy

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Abarcon, D.; Alonso Fernández, A.; Magallanes, N.; Charles, E.G.; Durini, L.A. Protección de bovinos después de vacunados con vacunas antiaftosas con adyuvante oleoso. Blnn Centro Panamericano Fiebre Aftosa 37-38: 41-43, 1980.
- 2.- Andersen, A.A. Cross reactions of normal bovine serum with FMDV. Proc. Ann. Mtg. U.S. Anim. Hlth. Ass. 81: 264-269, 1977.
- 3.- Andersen, A.A. Cross reactions between bovine enterovirus and South African territories I₅ FMDV. Amer. J. Vet. Res. 39: 59-63, 1978.
- 4.- Andersen, A.A. Cross reactions of normal bovine sera with FMDV: incidence, duration and effects of shipping stress. Amer. J. Vet. Res. 39: 603-606, 1978.
- 5.- Arlinghaus, R.B.; Bachrach, H.L.; Polatnick, J. Site of FMDV RNA synthesis and some properties of its double-stranded form. Biochim. Biophys. Acta 161: 170-179, 1968.
- 6.- Arlinghaus, R.B.; Polatnick, J. The isolation of two enzyme-ribonucleic acid complexes involved in the synthesis of FMDV-RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 62: 821-828, 1969.
- 7.- Bachrach, H.L.; Hess, W.R.; Callis, J.J. FMDV: Its growth

- and cytopathogenicity in tissue culture. *Science* 122:1269-1270, 1955.
- 8.- Bachrach, H.L.; Trautman, R.; Breese, S.S. Chemical and physical properties of virtually pure FMDV. *Am. J. Vet. Res.* 25: 333-342, 1964.
 - 9.- Bachrach, H.L. Foot and mouth disease. *Ann. Rev. Microbiol.* 22: 201-244, 1968.
 - 10.- Bachrach, H.L.; Moore, D.M.; Mc Kercher, P.D.; Polatnick, J. Immune and antibody response to an isolated capsid protein of FMDV. *J. Immunol.* 115: 1636-1641, 1975.
 - 11.- Bachrach, H.L. FMDV: Properties, Molecular Biology and Immunogenicity. *Beltsville Symposia in Agricultural Research I. Virology in Agriculture* J.A. Romberger (ed.) Allanheld, Osmun and Co. Montclair 1-32, 1977.
 - 12.- Bachrach, H.L.; Moore, D.M.; Mc Kercher, P.D.; Polatnick, J. An experimental protein vaccine for FMD. *Perspectives in Virology*, Vol. 10, 1978. Ed. Morris Pollard, N.Y.
 - 13.- Bachrach, H.L.; Morgan, D.O.; Moore, D.M. FMDV immunogenic capsid protein VP_T: N terminal sequences and immunogenic peptides obtained by CNBr and tryptic cleavages. *Intervirol.* 12: 65-72, 1979.

- 14.- Bachrach, H.L.; Mc Kercher, P.D.; Morgan, O.O., Moore, D.M.
The FMDV protein immunogen. Abstr. Ann. Mtg. Amer. Soc.
Microbiol. 81: 72, 1981.
- 15.- Balmaceda, R.H. Fracciones proteicas del suero bovino. Rev.
Med. Vet. 52: 151-155, 1971.
- 16.- Baltimore, D. The replication of picornaviruses. En H. B.
Levy (ed.). The biochemistry of viruses. Marcel Dekker, N.
Y., p. 101-176, 1969.
- 17.- Barteling, S.J.; Wagenaar, F.; Gielkens, A.L.J. VP₁ of FMDV
(type O₁) contains a strongly basic part, wich seems to play
a role in cell attachment. 5^o International Congress of Virology.
Abstracts. Strassbourg, France, 1981.
- 18.- Baxt, B.; Grubman, M.J.; Bachrach, H.L. The relation of poli
(A) lenght to specific infectivity of viral RNA: A comparition
of different types of FMDV. Virology. 98: 480-483, 1979.
- 19.- Black, D.N.; Underwood, B.O. Protein synthesis in BHK₂₁
cells infected with FMDV. J. Gen. Virology. 5: 553-556, 1970.
- 20.- Black, D.N. Proteins induced in BHK cells by infection with
FMDV. J. Gen. Virology. 26: 109-119, 1975.
- 21.- Blank, S.E.; Gerrie, A.L.; Clem, L.W. Antibody affinity and
valence in viral neutralization. J. Immunology. 108: 665-673,
1972.

- 22.- Brown, F.; Graves, J.H. Changes in specificity and electrophoretic mobility of precipitating antibodies present in the serum of cattle recovering from FMD. *Nature*, 183: 1688-1689, 1959.
- 23.- Brown, F. A beta globulin antibody in the sera of guinea pigs and cattle infected with FMDV. *J. Immunol.* 85: 298-303, 1960.
- 24.- Brown, F.; Cartwright, B.; Stewart, D.L. Further studies on the infections of pig-kidney cells by FMDV. *Biochim. Biophys. Acta* 55: 768-774, 1962.
- 25.- Brown, F.; Cartwright, B. Newman, J.F.E. Further studies of the early antibody in the sera of cattle and guinea pigs infected with FMDV. *J. Immunol.* 93: 397-402, 1964.
- 26.- Brown, F.; Smale, C.J. Demonstration of three specific sites on the surface of FMDV by antibody complexing. *J. Gen. Virol.* 7: 115-127, 1970.
- 27.- Brown, F. Molecular basis of antigenic variation in the picornaviruses. *Ann. N. Y. Acc. Sci. Genetics variation of viruses. Vol. 354, Ed. Palese P. and Roizman, B., 1980.*
- 28.- Brooksby, J.B. FMD-a world problem. *Nature*, 213: 120-122, 1967.
- 29.- Brooksby, J.B. Variants and immunity: definitions for serological investigations. *Int. Symp. on FMD: variants and*

immunity, Lyon, 1967. Symposia series in Immunological Standardization 8: 1-10, 1968.

- 30.- Brunengo, A.M.; Díaz Primerano, A.M.; Peso, O.A. Anticuerpos neutralizantes y protectores en el suero de bovinos vacunados contra la fiebre aftosa. *Rev. Arg. Microb.* 9: 115-125, 1977.
- 31.- Brunengo, A.M.; Pérez, A.C.; Massouh, E.J. Respuesta inmune en cobayos al virus de la fiebre aftosa. Estudio de las actividades biológicas de las subclases de IgG en sueros de animales hiperinmunizados. *Rev. Arg. Microbiol.* 12: 87-99, 1980.
- 32.- Burrows, R. Excretion of FMDV prior to the development of lesions. *Vet. Rec.* 82: 387-388, 1968.
- 33.- Burroughs, J.N.; Rowlands, D.J.; Sangar, D.V.; Talbot, P.; Brown, F. Further evidence for multiple proteins in the FMDV particle. *J. Gen. Virol.* 13: 73-84, 1971.
- 34.- Butterworth, B.E.; Rueckert, R.R. Gene order of EMC virus is determined by studies with pactamycin. *J. of Virol.* 9: 823-828, 1972.
- 35.- Callis, J.J. Nuevas vacunas y perspectivas futuras en la inmunización contra la fiebre aftosa. III Reunión Interamericana sobre el control de Fiebre Aftosa y otras zoonosis.

- Organización Mundial de la Salud. Bs. As. Argentina. 1970.
- 36.- Camargo, M.E. Introducción a las técnicas de inmunofluorescencia. Instituto de Medicina Tropical San Pablo. Brasil. 1973.
- 37.- CAMPOS, R.H. Mecanismo de penetración del virus de la fiebre aftosa en células susceptibles cultivadas "in vitro". Tesis doctoral. Facultad de Farmacia y Bioquímica. U.B.A.
- 38.- Capstick, P.B.; Telling, R.C.; Chapman, N.G.; Stewart, D.L. Growth of a cloned strain of hamster kidney cells in suspended culture and their susceptibility to the virus of FMD. *Nature (Lon.)* 195: 1163-1164, 1962.
- 39.- Carlström, G.; Liberg, P. Agarose gel electro phoretic separation of blood serum proteins in cattle. *Acta Vet. Scand.* 16: 520-524, 1975.
- 40.- Carrillo, E.; Giachetti, C.; de Torres, R.A. Penetration of FMDV in BHK₂₁ cells. 5° International Congress of Virol. Abstracts. Strassbourg, France, 1981.
- 41.- Cartwright, S.F.; Pay, T.W.F.; Henderson, W.M. Multiplication of the FMDV in culture. *J. Gen. Microbiol.* 16: 730-748, 1957.
- 42.- Casas Olascoaga, R. Summary of current research of Pan American FMD Center on oil adjuvanted vaccines. *Bull. off. int. Epiz.* 89: 1015-1054, 1978.

- 43.- Cavanagh, D.; Rowlands, D.J.; Brown, F. Early events in the interaction between FMDV and primary pig-kidney cells. *J. Gen. Virol.* 41: 255-264, 1978.
- 44.- Chatterjee, N.K.; Polatnick, J.; Bachrach, H.L. Cell free translation of FMDV RNA into identifiable non-capsid and capsid proteins. *J. Gen. Virol.* 32: 383- 394, 1976.
- 45.- Cooper et al. Picornaviridae. Second report. *Intervirology* 10: 165-180, 1978.
- 46.- Cowan, K.M.; Trautman, R. Antibodies produced by guinea pigs infected with FMDV. *J. Immunol.* 94: 858-867, 1965.
- 47.- Cowan, K.M. Heterogeneity of antibodies produced by cattle infected with FMDV. *Amer. J. Vet. Res.* 27: 1217-1227, 1966.
- 48.- Cowan, K.M.; Graves, J.H. A third antigenic component associated with FMD infection. *Virol.* 30: 528-540, 1966.
- 49.- Cowan, K.M. Antibody response to viral antigens. *Adv. Immunol.* 17: 195-253, 1973.
- 50.- Crowther, J.R. Subtyping of FMD virus. New approaches. *Bull. Off. Epiz.* 89: 831-850, 1978.
- 51.- Cunha, R.G.; Junior, J.A.B.; Serrao, U.M.; Torturella, J. El uso de ratones en la evaluación de los anticuerpos contra la fiebre aftosa y su significación inmunológica. *Gac. Vet.*, 19: 243-267, 1957.

- 52.- Davis, B.J. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. Ann. N.Y. Acad. Sci. 121: 404-410, 1964.
- 53.- Denoya, C.D.; Scodeller, E.A.; Vázquez, C.; Latorre, J.L. FMDV II: Endoribonuclease activity within purified virions. Virol. 89: 67-74, 1978.
- 54.- Denoya, C.D.; Scodeller, E.A.; Vázquez, C.; Latorre, J.L. Ribonuclease activities associated with purified FMDV. Arch. of Virol. 57: 153-159, 1978.
- 55.- Deutsch, H.F. Preparation of immunoglobulins concentrates. En: Williams C.A. and Chase M.W. (Eds.) Methods in Immunology and Immunochemistry. Vol. I, p. 315-321, New York and London Academic Press, 1967.
- 56.- Dimmock, N.J.; Watson, D.H. Proteins specified by influenza virus in infected cells; analysis by polyacrylamide gel electrophoresis of antigens not present in the virus particle. J. Gen. Virol. 5: 499-509, 1969.
- 57.- Doel, T.R.; Sangar, D.V.; Rowlands, D.J.; Brown, F. A reappraisal of the biochemical map of FMDV RNA. J. Gen Virol. 41: 395-404, 1978.
- 58.- Dragonas, P.N.; Pappous, C.P. Etude par immunofluorescence de la cinétique du virus aphteux sur cultures cellulaires. Ann. Inst. Pasteur 117: 125-132, 1969.

- 59.- Dulbecco, R.; Vogt, M. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J. Exp. Med.*, 99: 167-182, 1954.
- 60.- Flanagan, J.B.; Baltimore, D. Poliovirus polyuridylic acid polymerase and RNA replicase have the same viral polypeptide. *J. Virol.* 29: 352-360, 1979.
- 61.- Fontaine, J.; Mackowiak C.; Roumiantzeff, M. Types, sous-types et variantes du virus aphteux. *Symposia series in Immunological Standar.* 8: 13-64, 1968.
- 62.- Fracastorius, H. De Contagione et Contagiosis Morbis et Curatione Bk₁, chap. 12 (Venecia) 1546.
- 63.- Frenkel, H.S. Research on FMD. III. The cultivation of the virus on a practical scale in explantation of bovine tongue epithelium. *Am. J. Vet. Res.* 12: 187-190, 1953.
- 64.- Graves, J.H.; Cowan, K.M.; Trautman, R. Characterization of antibodies produced by guinea pigs inoculated with inactivated FMDV antigens. *J. Immunol.* 92: 501-506, 1964.
- 65.- Grubman, M.J.; Bachrach, H.L. Isolation of FMDV messenger RNA from membrane-bound polyribosomes and characterization of its 5' and 3' termini- *Virol.* 98: 466-470, 1979.
- 66.- Grubman, M.J. The 5' end of FMD virion RNA contains a protein covalently linked to the nucleotide P^UP. *Arch. Virol.* 63: 311-315, 1980.

- 67.- Grubman, M.J.; Baxt, B.; Latorre, J.L.; Bachrach, H.L.
Identification of a protein kinase activity in purified
FMDV. *J. Virol.* 39: 455-462, 1981.
- 68.- Haresnape, J.M.; King, A.M.Q.; Mc Cahon, D.; Sangar, D.V.
Location of an immunizing determinant within the tripsin-
sensitive polypeptide of FMDV. 5^o International Congress
of Virol. Abstracts, Strassbourg, France, 1981.
- 69.- Harris, T.J.R. The nucleotide sequence at the 5' end of
FMDV RNA. *Nucleic Acids Research.* 7: 1765-1786, 1979.
- 70.- Harris, T.J.R.; Brown, F.; Sangar, D.V. Differential
precipitation of FMDV proteins made in vivo and in vitro
by hyperimmune and virus particle guinea pig antisera.
Virol. 112: 91-98, 1981.
- 71.- Harris, T.J.R.; Lowe, P.A.; Rowlands, D.J.; Sangar, D.V.
The organisation and function of FMDV genome. 5^o International
Congress of Virol. Abstracts, Strassbourg, France, 1981.
- 72.- Hecke, F. Zuchtungsversuche des Maulundplauen-seuchavirus
in gewebe kulturen. *Zentz. Bakteriolog. Parasitolog.* 116:
385-414, 1930.
- 73.- Heide, K.; Schwick, H.G. Salt fractionation of immunoglobulins.
En Weir, D.M.(Ed.). *Handbook of experimental immunology.* Vol.
I. pag. 7.1-7.11, Oxford, Blackwell Scientific Publications,
1978.

- 74.- Honess, R.W.; Watson, D.H. Herpes simplex virus specific polypeptides studied by polyacrylamide gel electrophoresis of immune precipitates. *J. Gen. Virol.* 22: 171-185, 1974.
- 75.- Hyslop, N.St.G. Secretion of FMDV and antibody in the saliva of infected and immunized cattle. *J. Comp. Pathol.* 75: 111-117, 1965.
- 76.- Ihle, J.N.; Domotor, J.J.; Bengali, K.M. Characterization of the type and group specificities of the immune response in mice to murine leukemia viruses. *J. Virol.* 18: 124-131, 1976.
- 77.- Jensen, I.K. Electrophoretic studies of normal bovine and guinea-pig serum. *Acta Vet. Scand.* 9: 54-84, 1963.
- 78.- Kaaden, O.R.; Adam, K.H.; Strohmaier, K. Induction of neutralizing antibodies and immunity in vaccinated guinea pigs by cyamogen-bromide peptides of VP₃ of FMDV. *J. Gen. Virol.* 34: 397-400, 1977.
- 79.- King, A.M.Q.; Sangar, D.V.; Harris, T.J.R.; Brown, F. Heterogeneity of the genome-linked protein of FMDV. *J. Virol.* 34: 627-634, 1980.
- 80.- Kitamura, N.; Adler, C.; Wimmer, E. Structure and expression of the picornavirus genome. *En Annals N.Y. Acc. Sci. Genetic variations of viruses Vol. 354.* Ed. Palese and Roizman, 1980.

- 81.- Knigshoffer, H.O. ed. 1975. En Animal Health Yearbook 1974. FAO Italia.
- 82.- Laemli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature (London) 227: 680-685, 1970.
- 83.- Larghi, O.P. Prueba de anticuerpos fluorescentes para rabia. Centro Panamericano de Zoonosis, Argentina, 1975.
- 84.- Lobo, C.A.; Arbelaez, G.R.; Restrepo, G.S.; Restrepo, J.A. Prevalencia de anticuerpos VIA en bovinos del norte del Chocó, Colombia, 1975. Bltn Centro Panamericano Fiebre Afetosa 26: 31-35, 1977.
- 85.- Lodisch, H.F.; Houseman, D.; Jacobsen, M. Initiation of haemoglobin synthesis. Specific inhibition by antibiotics and bacteriophage ribonucleic acid. Biochem 10: 2348-2356, 1971.
- 86.- Loeffler, F.; Frosch, P. Zentr. Bakteriolog. Parasitenk. Abt. I. Orig., 22: 257-59, 1897.
- 87.- Lombard, M. Use of vaccinated cattle sera in the evaluation of FMDV strains in the field. Mtg of the European Commission of the Control of FMD, Lindholm, Denmark, 1979.
- 88.- Lowry, O.; Rosebrough, N.; Farr, A.; Randall, K. Protein

- measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275, 1951.
- 89.- Lundquist, R.E.; Ehrenfeld, E.; Maizel, J.V. Isolation of a viral polypeptide associated with the poliovirus replication complex. PNAS, U.S.A., 71: 4773-4777, 1974.
- 90.- Mac Pherson, I.A.; Stoker, M.G.P. Serial hamster fibroblast cell-line BHK₂₁ and its derivatives. Nature, 203: 1255-1357, 1964.
- 91.- Maitland, M.C.; Maitland, H.B. Cultivation of FMDV. J. Compt. Pathol. Therap. 44: 106-113, 1931.
- 92.- Martinsen, J.S. Neutralizing activity of sera from guinea pigs inoculated with FMDV variants. Res. Vet. Sci. 13: 97-99, 1972.
- 93.- Mc Cahon, D. The genetics of Aphthovirus. Archives Virol. 69: 1-23, 1981.
- 94.- Mc Kercher, P.D.; Giordano, A.R. Immune response of steers inoculated with chemically treated FMDV preparations previously studied in swine. Arch. Ges. Virusforsch. 20: 190-197, 1967.
- 95.- Melnick, J.L. Taxonomy of viruses. Prog. Med. Virol. 24: 207-212, 1978.

- 96.- Meloen, R.H. Differentiation between specific and nonspecific reactions of bovine sera and FMDV in immunodiffusion tests. Arch. Virol. 58: 35-43, 1978.
- 97.- Meloen, R.H.; Briaire, J. A study of the cross-reacting antigens on the intact FMDV and its 12 S subunits with anti-sera against the structural proteins. J. Gen. Virol. 51: 107-116, 1980.
- 98.- Mowat, G.N.; Chapman, W.G. Growth of FMDV in a fibroblastic cell line derived from hamster kidneys. Nature 194: 253-255, 1962.
- 99.- Mowat, G.N.; Barr, D.A.; Bennet, J.H. The development of an attenuated FMDV vaccine by modification and cloning in tissue cultures of BHK₂₁ cells. Arch. Ges. Virusforsch. 26: 341-354, 1969.
- 100.- Newman, J.F.E.; Cartwright, B.; Doel, T.R.; Brown, F. Purification and identification of the RNA-dependent RNA polymerase of FMDV. J. Gen. Virol. 45: 497-507, 1979.
- 101.- Ouchterlony, O. Antigen antibody reactions in gels. Arch. Kemi. Mineral. Geol., 268: 1-9, 1949.
- 102.- Palma, E. L. Virus de la Fiebre Aftosa. Rev. Arg. Microb. 7: 111-124, 1975.

- 103.- Patty, R.E. Inhibition of FMDV by normal bovine serum. Amer. J. Vet. Res. 31: 165-171, 1970.
- 104.- Pereira, H.G. Subtyping of FMDV. Develop Biol. Standard. 35: 167-174, 1977.
- 105.- Perez, H.A.; Rossetti, O.L.; Campos, R.H.; de Torres, R.A. Etapas tempranas en la replicación del virus de la fiebre aftosa. Localización subcelular del virus penetrante. Rev. Asoc. Arg. Microb. 8: 93-98, 1976.
- 106.- Pinto, A.A.; Hedger, R.S. The detection of antibody to VIA antigen in various species of African wild life following natural and experimental infection with FMDV. Arch. Virol. 57: 307-314, 1978.
- 107.- Pledger, R.A. Formation and release of FMDV from bovine calf kidney cell cultures. Virol. 13: 365-367, 1961.
- 108.- Plum Island Animal Disease Center; Pan American FMD Center. Vacunas contra la fiebre aftosa: I Comparación entre vacunas preparadas con virus inactivado con formalina y absorbido en hidróxido de aluminio y vacunas preparadas con virus inactivado con AEI emulsificado con adyuvante incompleto de Freund. Btn. Centro Pan. Fiebre Aftosa, 19-20: 1-8, 9-16, 1975.
- 109.- Polatnick, J.; Bachrach, H.L. Metabolic studies of bovine

- kidney cultures infected with FMDV. *Viol.* 12: 450-462, 1960.
- 110.- Polatnick, J.; Bachrach, H.L. Production and purification of milligram amounts of FMDV from BHK cell cultures. *Appl. Microbiol.* 12: 368-373, 1964.
- 111.- Polatnick, J.; Arlinghaus, R.B. FMDV-induced ribonucleic acid polymerase in BHK cells. *Viol.* 31: 601-608, 1967.
- 112.- Polatnick, J.; Arlinghaus, R.B.; Graves, J.H.; Cowan, K.M. Inhibition of cell-free FMDV RNA synthesis by antibody. *Viol.* 31: 609-615, 1967.
- 113.- Polatnick, J. Isolation of a FMD polyuridylic acid polymerase and its inhibition by antibody. *J. of Virol.* 33: 774-779, 1980.
- 114.- Putnak, R.J.; Phillips, B.A. Picornaviral structure and assembly. *Microbiol. Reviews*, 45: 287-315, 1981.
- 115.- Reed, L.J.; Muench, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Amer. J. Hyg.* 27: 493-497, 1938.
- 116.- Rowlands, D.J.; Sangar, D.V.; Brown, F. A comparative chemical and serological study of the full and empty particles of FMDV. *J. Gen. Virol.* 26: 227-238, 1975.
- 117.- Rowland, D.J.; Harris, T.J.R.; Brown, F. A more precise location of the polycytidylic acid tract in FMDV RNA. *J. of Virol.* 26: 335-343, 1978.

- 118.- Rweyenamu, M.M.; Terry, G.; Pay, T.W.F. Stability and immunogenicity of FMDV empty capsids. Arch. Virol. 59, 69-79, 1979.
- 119.- Sangar, D.V.; Rowlands, D.J.; Cavanah, D.; Brown, F. Characterization of the minor polypeptides in the FMD particle J. Gen. Virol. 31: 35-46, 1976.
- 120.- Sangar, D.V.; Black, D.N.; Rowlands, D.J.; Brown, F. Biochemical mapping of the FMDV genome. J. Gen. Virol. 35: 281-297, 1977.
- 121.- Sangar, D.V.; Rowlands, D.J.; Harris, T.J.R.; Brown, F. Protein covalently linked to FMDV RNA. Nature 268: 648-650, 1977.
- 122.- Sangar, D.V. The replication of picornaviruses. J. Gen. Virol. 45: 1-13, 1979.
- 123.- Sangar, D.V.; Black, D.N.; Rowlands, D.J.; Harris, T.J.R.; Brown, F. Location of the initiation site for protein synthesis of FMDV RNA by "in vitro" translation of defined fragments of the RNA. J. of Virol. 33: 59-68, 1980.
- 124.- Scheidegger, J.J. Une micro méthode de l'immunoélectrophorèse Internat. Arch. Allergy. 7: 103-110, 1955.
- 125.- Seibold, H.R. A revised concept of the lingual lesions in

- cattle with FMD. Am. J. Vet. Res. 24: 1123-1130, 1963.
- 126.- Seibold, H.R. Modification of FMDV in primary dog kidney cell cultures. Am. J. Vet. Res. 30: 591-603, 1969.
- 127.- Seibold, H.R.; Gailiunas, P.; Cottral, G.E.; Campbell, C. H. The use of the fluorescent antibody technique for detecting cattle convalescent from FMD. U.S. Liv. Sant. Ass. 66: 370-379, 1972.
- 128.- Sellers, R.F. Growth and titration of the viruses of FMD and vesicular stomatitis in kidney monolayer tissue culture. Nature, 176: 547-549, 1955.
- 129.- Sellers, R.F. Quantitative aspects of the spread of FMD. Vet. Bull. 41: 431-439, 1971.
- 130.- Sellers, R.F.; Herniman, K.A.J.; Gumm, I.D. The airborne dispersal of FMDV from vaccinated and recovered pigs, cattle and sheep after exposure to infection. Res. Vet. Sci. 23: 70-75, 1977.
- 131.- Sha Han, M.S. The virus of FMD. Ann. N.Y. Acad. Sci. 101: 444-454, 1962.
- 132.- Shazhko, Zh. A.; Onufriev, V.P.; Shazhko, L.F.; Okovyitaya, M.A. Non specific virus-neutralizing inhibition of cattle

- serum and post-vaccinal immunity against FMD. Sel'skhokh. Biol. 13: 227-280, 1980.
- 133.- Spier, R.E.; Whiteside, J.P. The production of FMDV from BHK₂₁ C₁₃ cells growth on the surface of glass spheres Bio-tech and Bioeng. 18: 649-657, 1976.
- 134.- Stanworth, D.R.; Turner, M.W. Immunochemical analysis of Igs and their subunits. In Weir D.M. (Ed.) Handbook of Experimental Immunology. Vol. 1. pag. 6-1/6-102. Oxford. Blackwell Scientific Publications, 1978.
- 135.- Studier, F.M. Analysis of bacteriophage T₇ early RNA_s and proteins on slab gels. J. Mol. Biol. 79: 237-248, 1973.
- 136.- Svehag, S.E. The formation and properties of poliovirus neutralizing antibody. III Sequential changes in electrophor mobility of 19 S and 7 S antibodies synthesized by rabbits after a single virus injection. J. Exp. Med. 119: 225-240, 1964.
- 137.- Taber, R.; Rekosh, D. ; Baltimore, D. Effect of pactamycin on synthesis of poliovirus protein: a method of genetic mapping. J. Virol. 8: 395-401, 1971.
- 138.- Talbot, P.; Brown, F. A model of FMDV. J. gen. Virol. 15: 163-170, 1972.

- 139.- Tetu, M. Mise en evidence des protéines seriques chez la porc par disque - électrophorése en gel de polyacrylamide. Arch. Vet. 18: 29-40, 1978.
- 140.- Spier, R.E.; White Side, J.P. The production of FMDV from BHK₂₁ C₁₃ cells growth on the surface of DEAE sephadex A 50 beads. Biotech and Bioeng. 18: 659-667, 1976.
- 141.- Strohmaier, K.; Franze, R.; Adam, K.H. The antigenic regions of the immunizing protein of FMDV. 5^o International Congress of Virol. Abstracts, Strassbourg, France, 1981.
- 142.- Summers, D.F.; Maizel, J.V. Determination of the gene sequence of poliovirus with pactamycin. PNAS, U.S.A., 59: 966-971, 1971.
- 143.- Sutmoller, P.; Gaggero, C.A. FMD carriers. Vet. Rec. 77: 968-969, 1965.
- 144.- Sutmöller, P.; Cottral, G.E. Improved techniques for the detection of FMDV in carrier cattle. Arch. Ges. Virusforsch 21: 170-177, 1967.
- 145.- Sutmöller, P.; Mc Vical, J.W. FMD changes in serum neutralizin activity of immunized cattle shortly after virus exposure. Inf. Imm. 6: 718-722, 1972.
- 146.- Sütmoller, P.; Vieira, A. Relación de títulos de anticuerpos

- neutralizantes y la protección de bovinos frente al V.F.A. Bln Centro Panamericano Fiebre Aftosa 39-40: 51-56, 1980.
- 147.- Thorne, H.W.; Cartwright, S.F. Reactions of the virus of FMD with cells and cells debris. *Virology*. 15: 245-257, 1961.
- 148.- Thorne, H.V. Kinetics of cell infections and penetration by the FMDV. *J. Bact.* 84: 929-942, 1962.
- 149.- Tokumaru, T. The protective effect of different immunoglobulins against herpetic encephalitic and skin infection in guinea pig. *Arch. ges. Virusforsch.* 22: 332-348, 1967.
- 150.- Ubertini, B.; Nardelli, L.; Santero, G.; Panina, G. Process report: large scale production of FMDV. *J. Biochem. Microb. Technol. Eng.* 2: 327-338, 1960.
- 151.- Urasawa, S.; Urasawa, T.; Kanamitsu, M. Further studies of specificity of antibodies contained in antiserum against poliovirus, *Japan J. Microbiol.* 20: 11-16, 1976.
- 152.- Urasawa, S.; Urasawa, T.; Kanamitsu, M. Radioimmuno electrophoretic identification of poliovirus inhibitors and their characteristic mode of action. *Arch. ges. Virusforsch.* 33: 113-125, 1971.
- 153.- Van Bekkum, J.G.; Frenkel, H.S.; Frederiks, H.H.J.; Frenkel, S. Observations on the carriers state of cattle exposed to

- FMDV. Tijdschr. Diergeneesj 84: 1159-1164, 1959.
- 154.- Vande Woude, G.I.; Ascione, R. Translation products of FMDV-infected BHK cells. Archiv. Ges. Virus. 45: 259-271, 1974.
- 155.- Wagner, G.; Card, J.L.; Sowan, K.N. Immunochemical studies of foot-and-mouth disease VII. Characterization of foot-and-mouth disease virus concentrated by polyethylenglycol precipitation. Arch. Ges. Virus. 30: 343-352, 1970.
- 156.- Waldman, O.; Kobe, K. Die aktive immunisierung des rindes gegen Maulund.klauenseuche. Berl. Tiërazte. wschr. 46: 317-320, 1938.
- 157.- Webster, R.G. The immune response to influenza virus. I. Effect of the route and schedule of vaccination on the time course of the immune response, measured by three serological methods. Immunol. 9: 501-509, 1965.
- 158.- Webster, R.G. The immune response to influenza virus II. Effect of the route and schedule of vaccination on the quantity and avidity of antibodies. Immunol. 14: 29-37, 1968.
- 159.- Webster, R.G. The immune response to influenza virus. III. Changes in the avidity and specificity of earle IgM and IgG antibodies. Immunol. 14: 39-51, 1968.

- 160.- Yagi, Y.; Maier, P.; Pressman, D. Two different anti-insulin antibodies in guinea pigs antisera J. Immunol. 89: 442-451, 1962.
- 161.- Yagi, Y.; Maier, P.; Pressmann, D. Immuno-electrophoretic identification of guinea pig anti insulin antibodies, J. Immunol. 89: 736-744, 1962.
- 162.- Yilma, T.; Mc Vicar, J.W.; Breese, S.S. Jun. Pre-lytic release of FMDV in cytoplasmic blebs. J.Gen. Virol. 41: 105-114, 1978.