

## Tesis de Posgrado

# Caracterización del virus de la fiebre aftosa atenuado para bovinos por pasajes en embrión de pollo

Polacino, Patricia Susana

1983

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

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

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

**Cita tipo APA:**

Polacino, Patricia Susana. (1983). Caracterización del virus de la fiebre aftosa atenuado para bovinos por pasajes en embrión de pollo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1784\\_Polacino.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1784_Polacino.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Polacino, Patricia Susana. "Caracterización del virus de la fiebre aftosa atenuado para bovinos por pasajes en embrión de pollo". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1983.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1784\\_Polacino.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1784_Polacino.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

CARACTERIZACION DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA  
ATENUADO PARA BOVINOS POR PASAJES EN EMBRION DE POLLO

Patricia Susana POLACINO

Director de Tesis: Dr. Eduardo Lucio PALMA

Departamento de Virología

Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

Tesis presentada para optar al título de

Doctora en Ciencias Biológicas

1983

1784  
Ej. 2

A mis padres y  
a mi esposo.

## A G R A D E C I M I E N T O S

- ... Al Dr. Eduardo Lucio Palma por su excelente dirección científica y su constante apoyo durante la realización de este trabajo;
- ... al Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, en especial a los doctores P. Suttmöller y R. Casas Olascoaga, por la gentil provisión de las cepas de virus aftoso;
- ... al licenciado Gerardo Kaplan por su colaboración en algunas de las experiencias.

O B J E T I V O S

La obtención natural o artificial de mutantes es una propiedad común a todos los virus. Estas mutantes se pueden caracterizar por su sensibilidad a la temperatura, por su patogenicidad en diferentes animales, por su especificidad hacia un determinado huésped, etc.. Cepas atenuadas aisladas en distintos sistemas virales han sido utilizadas como agentes vacunantes con resultados muy alentadores. Actualmente, se están empleando en Venezuela cepas de virus de la fiebre aftosa atenuadas para bovinos en la producción de vacunas. Estas cepas han sido utilizadas teniendo en cuenta su bajo grado de patogenicidad y alta calidad inmunogénica. Sin embargo, el criterio por el cual fueron seleccionadas es altamente empírico ya que se conoce muy poco acerca del mecanismo de atenuación. Principalmente, habían sido estudiadas en cuanto a sus características biológicas de multiplicación respecto de las cepas virulentas.

En base a lo previamente expuesto, se plantearon los siguientes objetivos para este tema de tesis:

- 1º) El estudio de los factores celulares y/o virales que influyen en el mecanismo de atenuación.
- 2º) Las características inhibitorias de la multiplicación del virus salvaje por las cepas atenuadas.

Estos objetivos fueron enfocados a través de tres puntos principales:

- Caracterización biológica del virus atenuado (infectiosidad, ciclo de multiplicación, etc.).
- Caracterización de la interferencia por el virus atenuado en la multiplicación del virus salvaje.
- Caracterización físicoquímica del virus atenuado y de sus componentes (coeficiente de sedimentación, densidad, análisis de su genoma).

## I N D I C E

	Pág.	
I.-	INTRODUCCION	1
I.1.-	FIEBRE AFTOSA . . . . .	
I.1.1.-	Introducción. . . . .	1
I.1.2.-	Distribución geográfica . . . . .	2
I.1.2.1.-	Zonas epizooticas	2
I.1.2.2.-	Zonas marginales	3
I.1.2.3.-	Zonas libres	3
I.1.3.-	Consideraciones económicas. . . . .	3
I.1.4.-	Huéspedes . . . . .	4
I.1.5.-	Patobiología de la enfermedad . . . . .	4
I.1.5.1.-	Ubicación del virus en la naturaleza	4
I.1.5.2.-	Patología	5
I.1.5.3.-	Persistencia de la infección	6
I.1.6.-	Programas de control y prevención . . . . .	12
I.1.6.1.-	Rifle sanitario	13
I.1.6.2.-	Cuarentena y vacunación	13
I.1.6.3.-	Vacunación sistemática contra la fiebre aftosa	14
I.1.7.-	Características bioquímicas del virus aftoso. .	20
I.1.7.1.-	Características generales	20
I.1.7.2.-	Estructura proteica	23
I.2.-	ATENUACION. . . . .	30
I.2.1.-	Métodos para disminuir la patogenicidad viral .	31
I.2.1.1.-	Modificación del virus aftoso en pollos y embriones de pollo	31
I.2.1.2.-	Modificación del virus en ratones	32
I.2.1.3.-	Modificación del virus en conejos	34
I.2.1.4.-	Modificación del virus en cultivos celulares. Selección de clones atenuadas	35
I.2.1.5.-	Otros métodos de atenuación	37
I.2.1.6.-	Ensayos para determinar la atenuación de patogenicidad para bovinos	37
I.2.2.-	Marcadores genéticos de atenuación. . . . .	38
I.2.2.1.-	Infecciosidad para cultivos de origen bovino. Tamaño y morfología de placas	39
I.2.2.2.-	Efecto de diferentes compuestos sobre la multiplicación del virus aftoso	40
I.2.2.3.-	Inactivación por acción de la temperatura y el pH	40
I.2.2.4.-	Producción de interferón	41
I.2.3.-	Factores positivos y de riesgo en el uso de virus modificados. . . . .	41
I.2.3.1.-	Ventajas	41
I.2.3.2.-	Desventajas	42

I.3.-	INTERFERENCIA. . . . .	45
I.3.1.-	Interferencia extrínseca. Interferón . . . . .	45
I.3.1.1.-	Características generales	45
I.3.1.2.-	Producción de interferón	46
I.3.1.3.-	Inducción y regulación	47
I.3.1.4.-	Producción de interferón en infecciones con virus aftoso	48
I.3.2.-	Interferencia intrínseca . . . . .	49
I.3.2.1.-	Introducción	49
I.3.2.2.-	Interferencia heteróloga	50
I.3.2.3.-	Interferencia homóloga	51
II.-	MATERIALES Y METODOS . . . . .	55
II.1.-	CELULAS. . . . .	55
II.2.-	VIRUS. . . . .	55
II.3.-	PROCEDIMIENTO DE CLONADO DE VIRUS. . . . .	56
II.4.-	TITULACION DE LOS VIRUS. . . . .	57
II.4.1.-	Método de titulación en placa. . . . .	57
II.4.2.-	Método de dilución al punto final. . . . .	57
II.4.3.-	Titulación en ratón lactante . . . . .	58
II.5.-	FIJACION DE COMPLEMENTO. . . . .	58
II.6.-	INMUNOFLORESCENCIA. . . . .	59
II.7.-	INFECCIONES CON PASAJES DILUIDOS Y SIN DILUIR DEL VIRUS ATENUADO . . . . .	59
II.8.-	DETERMINACION DEL COEFICIENTE DE SEDIMENTA- CION Y DENSIDAD DE LOS VIRUS SALVAJE Y ATE- NUADO. . . . .	60
II.8.1.-	Producción de virus radioactivo. . . . .	60
II.8.2.-	Purificación de virus. . . . .	60
II.8.3.-	Determinación de la densidad . . . . .	61
II.9.-	OBTENCION DE ACIDO RIBONUCLEICO VIRAL PARA MA PEO DE OLIGONUCLEOTIDOS... . . . .	61
II.9.1.-	Producción de virus. . . . .	61
II.9.2.-	Purificación de virus. . . . .	62
II.9.3.-	Preparación de los ARN virales . . . . .	62
II.9.4.-	Tratamiento enzimático de los ácidos ribonu- cleicos purificados. . . . .	63
II.9.5.-	Condiciones de la electroforesis bidimensio- nal. . . . .	64
II.10.-	ENSAYOS DE INTERFERENCIA . . . . .	65
II.10.1.-	Interferencia en células de RFB determinada como disminución del título infeccioso . . . . .	65
II.10.2.-	Procedimiento de infección y marcación de áci- dos ribonucleicos y proteínas en condiciones de interferencia . . . . .	65
II.10.3.-	Procedimiento de infección y marcación de pro- teínas intracelulares en condiciones de inter- ferencia . . . . .	67

II.10.3.1.-	Condiciones de infección	67
II.10.3.2.-	Preparación de extractos citoplasmáticos	67
II.10.3.3.-	Electroforesis en geles de poliacrilamida	67
III.-	RESULTADOS. . . . .	69
III.1.-	CARACTERISTICAS BIOLÓGICAS DE LA ATENUACION .	69
III.1.1.-	Susceptibilidad de diferentes sistemas frente al virus atenuado . . . . .	69
III.1.1.1.-	Infecciosidad del virus atenuado en células BHK-21 y patogenicidad en ratón lactante	69
III.1.1.2.-	Atenuación para células de riñón bovino	69
III.1.2.-	Modificación de la población atenuada . . . . .	72
III.1.3.-	Características de infectividad de clonas aisladas . . . . .	75
III.1.3.1.-	Reversión de la clona atenuada	79
III.1.3.2.-	Infecciones persistentes con clonas atenuadas	81
III.2.-	INTERFERENCIA EN LA REPLICACION DEL VIRUS SALVAJE. . . . .	82
III.2.1.-	Interferencia no inducida por interferón. . .	82
III.2.2.-	Posible rol de las partículas DI en la interferencia. . . . .	83
III.2.3.-	Interferencia por virus atenuado. . . . .	88
III.2.3.1.-	Disminución del título de virus infeccioso	88
III.2.3.2.-	Inhibición en la síntesis de ácidos ribonucleicos virales	88
III.2.3.3.-	Dependencia de la interferencia con la multiplicidad de infección del virus atenuado	91
III.2.3.4.-	Relación entre el grado de interferencia y el número de pasajes del virus atenuado por células BHK-21	91
III.2.3.5.-	Inhibición en la síntesis de virus y partículas vacías	94
III.2.3.6.-	Inhibición en la síntesis de proteínas inducidas por el virus	94
III.3.-	CARACTERISTICAS FISICOQUÍMICAS. . . . .	101
III.3.1.-	Determinación del coeficiente de sedimentación. . . . .	101
III.3.2.-	Determinación de la densidad en cloruro de cesio . . . . .	101
III.3.3.-	Presencia de partículas virales de mayor densidad . . . . .	106
III.3.4.-	Análisis de los ácidos ribonucleicos virales. Mapeo de oligonucleótidos . . . . .	106
III.3.4.1.-	Fraccionamiento de oligonucleótidos por electroforesis bidimensional	106
III.3.4.2.-	Mapeo de los oligonucleótidos de los ácidos ribonucleicos de los virus aftosos estudiados	109



IV.-	DISCUSION. . . . .	117
V.-	RESUMEN. . . . .	123
VI.-	BIBLIOGRAFIA . . . . .	124

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADN = Acido desoxiribonucleico  
ARN = Acido ribonucleico  
BHK-21 = Línea celular de riñón de hamster  
CPE-ECP = Efecto citopático  
DI = Defectivas *interferentes*  
DICT<sub>50</sub> = Dosis infecciosas cultivo de tejido 50%  
DL<sub>50</sub> = Dosis letal 50%  
EDTA = Etilén diamin tetraacetato de sodio  
FMDV = Virus de la fiebre aftosa  
MEM = Medio esencial mínimo Eagle  
m.o.i. = multiplicidad de infección  
p.i. = post-infección  
PNK = polinucleótido quinasa  
RFB = Riñón de feto bovino  
RNasa T<sub>1</sub> = Ribonucleasa T<sub>1</sub>  
SAT = Cepa de virus aftoso (South African territories)  
SDS = Dodecil sulfato de sodio  
TCA = Acido tricloroacético  
UFP = Unidades formadoras de placa

## I.- INTRODUCCION

### I.1.- FIEBRE AFTOSA

#### I.1.1.- Introducción

La fiebre aftosa es una enfermedad vesicular de origen viral altamente contagiosa para todos los animales de pezuña hendida.

El problema de esta enfermedad es de carácter mundial puesto que afecta a la población animal de una gran parte de la superficie terrestre. Debido a la extraordinaria facilidad de propagación del virus, ninguna zona puede, en principio, considerarse a salvo. Ciertamente, la enfermedad no es una de las de mayor mortalidad pero se considera que reduce en un 25% aproximadamente la productividad de los animales y, por lo tanto, ocupa un lugar importante en la lista de enfermedades que la industria pecuaria desearía ver eliminada(22).

En 1514 Fracastorius describió las características de un brote de una enfermedad en bovinos, las cuales coincidían con las descritas actualmente para la fiebre aftosa. Los animales rehusaban alimentarse y el interior de sus bocas se encontraba enrojecido y con pequeñas vesículas que, posteriormente, descendieron a las patas. La mayoría de los animales que mostraron tales síntomas se recuperaron. Se pensó que el contagio, difundido desde la provincia de Friaul hacia el distrito de Euganean y posteriormente hasta Verona, fue diseminado principalmente por el aire, aunque otros medios tales como el agua y fangales no fueron excluidos (9). Como puede apreciarse, esta descripción hecha hace mas de 400 años en latín tiene una sorprendente semejanza con las descritas actualmente para esta enfermedad.

Sin embargo, no fue hasta 1897 en que Loeffler y Frosch lograron demostrar que la fiebre aftosa era causada por un agente filtrable, o sea, tenía un origen viral (9).

La enfermedad afecta principalmente a los animales biungulados, algunos de los cuales son muy importantes para el hombre, tales como bovinos, porcinos, ovinos y caprinos. Su elevada infecciosidad para

determinadas especies, la facilidad con la cual el virus se disemina, su amplia distribución y la pluralidad de serotipos constituyen algunas de las características que dificultan el control de la fiebre aftosa (34).

### I.1.2.- Distribución geográfica

#### I.1.2.1.- Zonas epizooticas

En vastas regiones de Asia, Africa e incluso algunas de América del Sur, la enfermedad continúa propagándose. En dichas zonas se mantiene a un nivel constante, con algunos períodos de mayor incidencia. Esta situación refleja la acción recíproca entre el virus, con sus distintos cambios, y la inmunidad variable del ganado.

Una epizootia extensa debida a un tipo de virus determinado suele ir seguida de un período en que la aparición de ese tipo no es frecuente en la zona en cuestión (22) y la incidencia de la enfermedad vuelve a un nivel bajo. Cuando no ha habido infecciones recientes, el nivel de anticuerpos en los animales susceptibles puede ser reducido, si bien mas adelante en la reinfección, puede obtenerse una respuesta secundaria con desarrollo rápido de anticuerpos. La situación de equilibrio entre el virus y las especies susceptibles se mantiene en tanto no intervengan factores externos (22). Un nuevo tipo de virus o nuevos huéspedes alteran el equilibrio y la virulencia de la enfermedad se pone de manifiesto.

En Africa se ha puesto especial atención al problema planteado por los animales salvajes de pezuña hendida como reservorios naturales del virus. Se ha tratado de estimar el valor de anticuerpos en estos animales como prueba de infección, observándose que los títulos mas altos corresponden al búfalo.

En los lugares de mayor explotación agrícola, tales como varios países europeos, vastas zonas de América del Sur y en sectores muy reducidos de Africa y Asia, se procura disminuir la propagación de la enfermedad. Las medidas que limitan el movimiento de los animales y productos pecuarios reducen la propagación y con ello la aparición de nuevos brotes se reduce sensiblemente. En las zonas vacunadas, la propagación epizootica grave suele relacionarse con la aparición de

un nuevo tipo o subtipo. En esas zonas la incidencia de la enfermedad plantea un verdadero problema, ya que las lesiones son graves y las complicaciones secundarias que causan son muy perjudiciales para la productividad.

#### I.1.2.2.- Zonas marginales

Son aquéllas en las que la enfermedad queda eliminada por períodos relativamente largos. El control en esas regiones se realiza mediante el sacrificio de las reses que muestran los síntomas de la enfermedad (rifle sanitario). La aparición de nuevos brotes ocurre fundamentalmente por la importación de animales provenientes de zonas donde la enfermedad es endémica, por lo que no es necesaria la proximidad geográfica con las regiones infectadas.

Los países escandinavos, el Reino Unido, los Estados Unidos y los países de América Central se encuentran dentro de esta categoría.

#### I.1.2.3.- Zonas libres

Las zonas que se hallan libres de la fiebre aftosa disfrutan de esa condición gracias al aislamiento geográfico y se mantienen así por medio de estrictas medidas de control tales como la cuarentena y restricciones a la importación. Australia y Japón están libres de esta enfermedad desde hace muchos años o, como en el caso de Nueva Zelanda, nunca la ha sufrido.

#### I.1.3.- Consideraciones económicas

En todos los países donde ha existido fiebre aftosa, la enfermedad interfirió con el comercio de importación y exportación de animales y de productos de origen animal. La entrada a los países libres de fiebre aftosa de productos provenientes de áreas enzoóticas está sometido a prohibiciones o a severas restricciones, medidas que influyen notablemente en el precio de los mismos.

Debido a la interferencia de la fiebre aftosa en el comercio internacional, frecuentemente la enfermedad fue considerada una enfermedad política. Sin embargo, los problemas resultantes del control de la fiebre aftosa son tan políticos como reales. A pesar del interés

público por la enfermedad -el cual tiene una larga historia- y de las medidas de cuarentena aplicadas por muchos países en todo el mundo, el control efectivo esta todavía lejos de ser alcanzado (34).

#### I.1.4.- Huéspedes (34)

Mientras que la infección natural se limita a animales de pezuña hendida, domésticos y salvajes, experimentalmente se puede propagar el virus a otras especies que incluyen perros, gatos, gallinas, ratas, ratones, conejos y cobayos.

La enfermedad existe en una amplia gama de animales salvajes tales como ciervos, antílopes, jabalíes y búfalos. Durante una epizootia cualquiera de ellos puede constituirse en una amenaza para el control de la infección.

El hombre raramente es afectado, por lo que la enfermedad no se considera un problema de salud pública.

#### I.1.5.- Patobiología de la enfermedad

##### I.1.5.1.- Ubicación del virus en la naturaleza

El virus puede ser hallado en los animales infectados en la saliva (99), las heces (30), la leche (30,91,117), los mocos vaginal y uretral (48,30) y en el semen (48). Durante el período crítico de la enfermedad aumenta la cantidad de virus en dichas áreas (141,173), detectándose además en orina (48), el contenido nasal (173) y en el epitelio y líquido de vesícula.

Si bien el virus puede utilizar múltiples vías de infección, se acepta que la puerta de entrada principal es el tracto respiratorio. La multiplicación del virus en esta zona fue demostrada luego de vaporizar por vía intranasal suspensiones de virus en animales susceptibles inmunizados y hasta recuperados (118). Una vez establecida la viremia, el virus es transportado por la sangre hasta puntos de su predilección, como la lengua y la cavidad bucal, las patas y cualquier órgano o área del cuerpo en la cual puede multiplicar: músculo cardíaco (149), páncreas (13), glándula pituitaria (172), riñones, glándulas mamarias (31), pilares del rumen y picl (34).

Experimentalmente, el virus puede ser multiplicado fácilmente en el epitelio lingual (179) y en el pulmón (65,197). Algunas partículas llegan a lugares adecuados para la multiplicación, mientras que otras son rápidamente eliminadas por mecanismos de defensa natural (194).

La posibilidad de infección del virus aftoso a través del aire había sido mencionada por Korn en sus trabajos, pero el virus no pudo ser transmitido de bovino a bovino por este método bajo condiciones controladas sino recién hasta 1950, informándose este dato 10 años más tarde. No se identificó ningún insecto que sea vector importante en la diseminación de la fiebre aftosa y tampoco es probable que exista alguno, por cuanto la transmisión no es dependiente de la estación o de la geografía. En garrapatas previamente alimentadas en animales infectados, se observó una prolongada permanencia del virus, sin embargo existen pocos informes sobre la transmisión de la enfermedad a través de garrapatas a bovinos (9).

Indirectamente, la fiebre aftosa puede ser diseminada de muchas maneras, ya sea a partir de materiales contaminados, animales y pájaros silvestres, camiones, equipos agrícolas, barcos, ropas o personas. La importación de carne fresca y de productos de origen animal provenientes de países afectados y la descarga de basuras crudas de los barcos, fueron consideradas responsables de los brotes ocurridos en los Estados Unidos, Inglaterra y otros países que realizaban tales importaciones (9).

#### I.1.5.2.- Patología

Los signos clínicos de la infección se inician con una pequeña área blanca en el epitelio que se llena de líquido, formando una vesícula. Al agrandarse y unirse con otras puede reventar y formar escoriaciones de cubierta epitelial. El epitelio se desprende y deja un área erosionada o úlcera. El epitelio se restituye pero pueden formarse líneas de demarcación que luego van desapareciendo y casi en algunos casos no se nota cicatrización.

El período que va desde el comienzo hasta el fin de una lesión de fiebre aftosa está influenciado por varios factores, como la salud general del animal, la alimentación y, especialmente, la contamina-

ción bacteriana o infección secundaria en el sitio de la lesión primaria (47). Durante el período en que las lesiones están presentes el animal tiene abundante salivación, lagrimea o hay escurrimiento nasal. Si las lesiones se desarrollan en las patas caminan con dificultad. Casi al mismo tiempo en que revientan las vesículas, termina el período febril.

Esto es seguido por el fin de la viremia y es en esta fase que empiezan a aparecer anticuerpos circulantes. A medida que el nivel de anticuerpos aumenta, hay una caída del título viral.

Los signos clínicos duran de 15 a 30 días, dependiendo de los factores mencionados (34). El pico de mayor infecciosidad se alcanza cuando el animal está desarrollando los signos clínicos (84).

#### I.1.5.3.- Persistencia de la infección

La persistencia de la infección es considerada una secuela natural de la fiebre aftosa en rumiantes y conduce al llamado estado de portador.

##### a) Portadores

Aunque los bovinos pueden presentar una recuperación completa tras la infección con virus aftoso, un cierto número de ellos se tornan portadores del virus durante largos períodos y, de acuerdo con la evidencia epidemiológica, sirven como focos para nuevos brotes de la enfermedad.

La existencia de portadores ha sido generalmente aceptada desde hace por lo menos 70 años. Primeramente, se observó que, con frecuencia y sin que existiera la posibilidad de otra fuente de infección, la fiebre aftosa se presentaba en rebaños susceptibles poco tiempo después de la introducción de bovinos que la había padecido y se habían recuperado mucho tiempo antes. En Suiza, entre 1919 y 1923, la transmisión cuya causa se atribuyó a bovinos portadores, fue observada con más frecuencia en el período comprendido entre 2 y 8 meses después de la recuperación, aunque hubo un brote que fue atribuido a animales portadores que se habían recuperado hacía 29 meses. Después de estas observaciones, fue prohibida la repoblación de rebaños susceptibles con animales convalecientes hasta 8 meses posteriores a su recuperación (9).



Se ha comprobado que el virus puede ser encontrado en la orina durante los 8 meses subsiguientes a infecciones con diversos tipos de virus aftosos. Sin embargo, el primer aislamiento confirmado del virus a partir de animales portadores que se habían recuperado, fue publicado en 1959 por Van Bekkum y col. (205).

En dicho trabajo, se halló persistencia de virus de los tres tipos europeos en ganado que había sido expuesto a infección por contacto con animales infectados o por inoculación del virus por vía intradermolingual. Las muestras de fluídos recogidas del esófago de dichos animales tenían virus infeccioso que era evidenciado por la inyección intraperitoneal en ratones lactantes. Se obtuvieron resultados positivos hasta 6 meses después de la exposición.

En función del tiempo el porcentaje de muestras positivas disminuía. En algunos casos, cuando no se podía recuperar virus por inoculación en ratón lactante, la inyección de grandes cantidades de material en ganado susceptible por vía intradermolingual o intramuscular eran mas efectivas. Los animales portadores generalmente eran de ganado que había recibido varias dosis de vacuna antes de ser expuestos. Además, los portadores tenían niveles altos de anticuerpos neutralizantes en su suero.

Según Durrows (29), las células que se encuentran en la zona faríngea parecen ser uno de los principales sitios de producción de virus. Indicó que el estado portador persistía unos 15 meses en bovinos y 4 meses en ovinos. En bovinos se comprobó que el paladar duro y la faringe eran los principales puntos de multiplicación del virus, mientras que en ovinos el tejido tonsilar y faríngeo eran los mas importantes. Con el objeto de poder determinar la presencia de animales portadores del virus aftoso, cada grupo de investigadores desarrolló sus propios métodos para procesar y ensayar las muestras obtenidas.

En el trabajo original de Van Bekkum (205) las muestras se diluían directamente en soluciones salinas de fosfato y se ensayaban en ratones lactantes. Sutmöller y Gaggero (195) usaban el mismo procedimiento pero empleaban monocapas de células de riñón de hamster (BIK) para la detección del virus. Van Bekkum (205) señala el empleo de la

técnica de plaqueo usando células de riñón fetal bovino (RFB), con resultados positivos para detectar infecciones persistentes de virus aftoso en ganado.

Han sido observadas infecciones persistentes en monocapas de células de RFB luego de ser infectadas con virus aftoso (36) o bien se aisló el virus de cultivos de células de riñones de terneros infectadas. Por otra parte, en cultivos de tejidos mucofaríngeos, esófago, rumen y lengua de ganado convalesciente 7 días después de la infección con virus aftoso, se demostró la persistencia de virus en los cultivos por la técnica de inmunofluorescencia y por subcultivos en células de riñón de cerdo usando técnicas como ensayo de placas y determinación del efecto citopático (CPE) (162). Estos resultados indicaban una infección persistente de las células huéspedes sin demostrar lesiones o signos clínicos.

Los bovinos portadores parecen imprimir cambios en la virulencia y antigenicidad del virus aftoso. Se informó que el virus aislado de bovinos portadores fue mas virulento para cerdos que para bovinos, encontrándose, además, que el pasaje de virus O y SAT en bovinos inmunos o parcialmente inmunos producía cambios antigénico en el subtipo de virus (9). Por otra parte, fueron observados cambios semejantes en la antigenicidad del virus SAT<sub>1</sub> durante el pasaje del mismo por cultivos en células renales de cerdo, en presencia de dosis gradualmente crecientes de anticuerpos específicos para la cepa.

Seibold (63,164) también observó una modificación en el virus aftoso luego de una prolongada residencia en células de riñón fetal bovino, modificación que se correlacionaba con una disminución en el tamaño de placas y en la patogenicidad para novillos.

Virus tipo A, cepa 119, modificado por infección crónica en cultivos primarios de RFB, no producía inmunización en bovinos o cerdos. Una infección subclínica (viremia sin lesiones) se producía cuando se hacía una inoculación intramuscular con la última dilución anterior al punto final de infectividad. El virus recogido de la primera viremia en novillos infectados subclínicamente con el virus de residencia crónica, tenía mas patogenicidad intradermolingual que el virus recogido al terminar la viremia (175).

Estos resultados parecían indicar que ambos virus contenían un componente patogénico residual, un componente infeccioso avirulento capaz de producir viremia sin signos clínicos y un componente no infeccioso. Este último conteniendo, aparentemente, partículas defectivas interferentes (DI). Todos estos datos explicarían la aparición de nuevos subtipos en el campo en áreas donde la fiebre aftosa es endémica.

Mientras que los portadores pueden ser fácilmente detectables, el verdadero papel de los mismos en la diseminación de la enfermedad aún no está claro, dado que no se ha demostrado fehacientemente que dichos portadores sean responsables de la infección de otros bovinos. Sin embargo, muchos investigadores concluyen que esto ocurre sólo porque el portador no fue estimulado para eliminar bastante virus durante determinados períodos de stress o que el animal susceptible no tuvo contacto adecuado con el virus liberado por el portador o una combinación de estas circunstancias (6).

Hasta tanto no sea demostrada la diseminación del virus por los portadores, la mayoría de los investigadores los consideran un riesgo en potencia y, consecuentemente, se hace un esfuerzo para excluir tales animales del tráfico internacional de ganado de países donde existe fiebre aftosa a aquellos países que están libres de la enfermedad (34).

Desde la década de 1960, la denominada prueba de "Probang" para portadores ha sido extensamente utilizada. Durante los últimos años, el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa viene utilizando el método para determinar presencia o ausencia de virus aftoso en rebaños de bovinos o en áreas pilotos. En 1980 se inició un trabajo experimental para verificar la posibilidad de utilizar material faríngeo de bovinos sacrificados en mataderos para encuestas de presencia o ausencia de fiebre aftosa en el campo (7). Aún considerando el número relativamente pequeño de observaciones y que la información habitual de los mataderos en cuanto al origen de los bovinos que faenan no siempre es confiable, la metodología descrita puede ser útil para programas de vigilancia epidemiológica de la fiebre aftosa, tanto para áreas libres de la enfermedad como endémicas.

En base a lo anteriormente expuesto, puede decirse que, en los últimos 20 años, se ha realizado una larga serie de experiencias con el fin de esclarecer el papel de los portadores en las rupturas de inmunidad. De tales experiencias pueden extraerse dos conclusiones, generalmente aceptadas:

- El desenlace del equilibrio virus-huésped en un individuo enfermo de fiebre aftosa es imprevisible; y
- Toda población afectada mantiene el virus en algunos de sus individuos durante períodos variables que pueden llegar hasta 2 años o mas después de la infección.

La caracterización del papel de los portadores sanos en la cadena epidemiológica de la enfermedad, constituye uno de los problemas para la aplicación de medidas de prevención y erradicación de la fiebre aftosa en Sudamérica.

Rosenberg y Augé de Mello (159) establecieron tres hipótesis alternativas para la transmisión del virus de los portadores:

- I - Todo convaleciente portador es potencialmente capaz de transmitir la infección;
- II - El animal enfermo de fiebre aftosa sólo puede transmitir la infección durante la fase aguda de la enfermedad; y
- III - El animal portador de virus aftoso puede actuar ocasionalmente como fuente de infección, siempre y cuando coexistan ciertos factores condicionantes indispensables (transmisión condicionada).

Teniendo en cuenta las evidencias presentadas en los numerosos trabajos realizados en relación al tema de los portadores sanos, el autor se inclina a postular la tercera hipótesis como la mas probable. A su vez, los factores condicionantes pueden ser agrupados bajo dos tipos de mecanismos:

- 1.- Uno en el que se incluyen estímulos que determinan un aumento de la replicación viral en el portador; y
- 2.- Otro en el que se incluyen factores ambientales o del huésped que aumenten la posibilidad de transmisión sin que sea

preciso aumentar la cantidad de virus excretado.

Probablemente, mas de uno de los modelos propuestos sobre la transmisión condicionada actúen en la realidad, ya que las evidencias experimentales obtenidas hasta el presente no favorecen a ninguno en particular.

#### b) Infecciones persistentes

Al menos han sido sugeridos cuatro mecanismos diferentes para el establecimiento y persistencia de infecciones virales crónicas en cultivos de tejidos:

- 1.- La producción de partículas DI ha sido ampliamente discutida en los últimos tiempos, sobretodo en relación al importante papel que puedan desempeñar en el establecimiento de infecciones persistentes, especialmente para Mixovirus y Rabdovirus (73,97,129,152,162);
- 2.- La generación de mutantes sensibles a la temperatura ( $ts$ ) que parecen competir y desplazar al virus tipo salvaje en cultivos mantenidos en condiciones no permisivas para los mutantes  $ts^+$  (73,129,150,151,152);
- 3.- El tercer factor se refiere al interferón. Se ha encontrado que, en algunos sistemas, la presencia de interferón puede ser responsable del mantenimiento del estado crónico de la infección (72,73,129,210); y
- 4.- Varios estudios recientes han informado que copias de ADN integradas al genoma celular por Retrovirus, es una manera de establecer cultivos persistentemente infectados (184, 227).

Aparentemente, alguno de los factores mencionados o varios combinados, juegan un papel importante en el establecimiento y persistencia de infecciones crónicas en cultivos de células con virus que normalmente son líticos para dicho sistema celular. Debería distinguirse bien entre cuáles son los factores responsables para la iniciación de una infección crónica y cuáles son los responsables de su mantenimiento (73). En relación al virus aftoso, varios autores han observado infecciones persistentes en monocapas de células de RFB.

Philipson y Dinter (144) pudieron correlacionar la presencia de interferón con el establecimiento de infecciones persistentes en células de RFB infectadas con el virus aftoso. Seibold (174), empleando cultivos primarios de células de riñón bovino, observó efecto citopatógeno parcial como resultado de la infección con varios tipos de virus aftoso. Las células no destruídas crecían nuevamente y el virus persistía en los cultivos con títulos entre  $10^2$  y  $10^3$  UFP/ml. Por otra parte, Dinter (61) tratando los cultivos de células de riñón bovino con suero hiperinmune después de la adsorción del virus aftoso tipo 0, obtuvo infecciones persistentes.

También fueron informados aislamientos del virus aftoso a partir de cultivos de riñón bovinos preparados con terneros 6 días después de la inoculación (96) y de cultivos de tejidos mucofaríngeos, esófago, rumen y lengua de animales convalescientes 7 días después de la infección con virus aftoso (122). Asimismo, se ha considerado que la interacción en el crecimiento de dos Picornavirus (virus aftoso y enterovirus bovino (BEV)) en la zona esofágica-faríngea podría explicar el establecimiento de una forma latente de virus aftoso (84, 197). Específicamente, se propuso que el ácido ribonucleico aftoso era encapsidado en la cubierta proteica del BEV .

Trautman y Sutmöller (202) en infecciones simultáneas en células de riñón bovino con virus aftoso y BEV recuperan un agente viral que tiene el genoma de aftosa pero: 1) es neutralizado por anticuerpos contra BEV y no por anticuerpos contra virus aftoso; 2) tiene la estabilidad en medio ácido característica del BEV y la densidad de flotación de BEV y no de aftosa.

Sutmöller (197) postula que el curso de la infección con virus aftoso depende de la relación BEV/FMDV. Si el nivel de exposición es masivo puede no ser determinante el mecanismo de transcapsidación pero si el nivel es bajo, el resultado puede ser una infección abortiva o localizada.

#### I.1.6.- Programas de control y prevención

Los programas de control de la fiebre aftosa deben tener en cuenta diversos factores, tales como la distribución geográfica, variedad de transmisores, contagiosidad, variabilidad antigénica, corta dura

ción de la inocuidad en bovinos y porcinos convalescientes o vacunados, etc.. Las medidas a tomar en cada país son variables debido a factores tales como el clima, la producción ganadera, la tecnología disponibles, etc. (9).

En América del Sur la enfermedad es endémica en amplias regiones y se halla presente desde hace mas de un siglo. En América del Norte y Central, donde el último brote ocurrió en México en 1954, se mantienen en rigor programas de prevención.

Desde la década del 40 existe en el mercado sudamericano vacuna antiaftosa. A principios de la década del 50 con la introducción de la enfermedad en Colombia y Venezuela, se iniciaron campañas nacionales de vacunación. Pero es recién a partir de 1960 que comenzaron los programas integrales (Argentina en 1960, Brasil 1965, Chile, Paraguay y Uruguay en 1968). Los métodos de lucha se basan en vacunaciones masivas y en el control de brotes. Además, se da énfasis al entrenamiento del personal y a los programas de vigilancia epidemiológica (157).

#### I.1.6.1.- Rifle sanitario

El rifle sanitario o método de sacrificio, fue practicado en algunos países como Estados Unidos y Gran Bretaña. Productores y veterinarios son instruídos para reconocer e informar tempranamente cualquier sospecha de fiebre aftosa. En caso de un brote, son impuestas medidas de cuarentena dentro y alrededor del área afectada. Los animales infectados y los susceptibles expuestos al virus son sacrificados y enterrados en el lugar. Cuando los signos disponibles indican que el brote fue eliminado, la zona se limpia y se desinfecta. Si no hay nuevos brotes de aftosa en animales susceptibles dentro de los 90 días subsiguientes a la fecha de ser introducidos en la zona descontaminada, se eliminan las medidas de restricción (9).

#### I.1.6.2.- Cuarentena y vacunación

Países en los cuales la enfermedad es endémica o que estan expuestos repetidamente a contaminaciones del exterior, generalmente procuran controlar los brotes por medio de cuarentena y vacunación. Las áreas afectadas son puestas en cuarentena, procediéndose a la vacunación en anillo de todos los animales susceptibles en dichas zonas (9).

### I.1.6.3.- Vacunación sistemática contra la fiebre aftosa

En los países donde la fiebre aftosa es endémica, las campañas de control se basan en la inmunización activa de la población ganadera, junto con una serie de medidas sanitarias apropiadas. Las vacunas utilizadas en las campañas de control y erradicación de la fiebre aftosa deben reunir los siguientes requisitos (68):

- 1.- Deben ser inocuas.
- 2.- No deben causar reacciones adversas en los animales vacunados.
- 3.- Deben inducir una inmunidad sólida y de duración suficiente como para proteger frente a posibles infecciones de campo.
- 4.- Deben disponer de un amplio espectro antigénico.
- 5.- Deben ser adaptables a grandes producciones industriales.
- 6.- Su costo debe ser razonable y su aplicación práctica

Las vacunas contra la fiebre aftosa se pueden dividir en dos grupos: vacunas a virus vivo modificado y vacunas inactivadas.

#### a) Vacunas a virus vivo modificado

Estas vacunas son usadas únicamente en países que no son exportadores de carne. En América, sólo Venezuela utiliza en sus campañas este tipo de vacuna. Los países exportadores de carne no pueden utilizarlas por las restricciones que imponen los países importadores en previsión de que los productos puedan albergar el virus modificado. Este tema se desarrolla "in extenso" en la Sección I.2.-

#### b) Vacunas inactivadas

Este tipo de vacuna se utiliza desde hace mas de 30 años por la mayoría de los países. La primera vacuna fue desarrollada en 1938 por Waldmann (212-213), utilizando como antígeno el virus aftoso extraído del epitelio de lesiones frescas de la lengua de animales artificialmente infectados.

El virus era adsorbido con hidróxido de aluminio (concentrado) e inactivado con formaldehído. La producción de antígeno según este método en grandes cantidades presentaba serios inconvenientes, rela-



cionados con el costo y con el peligro de fuga de virus de los locales donde se infectaban los animales.

La técnica desarrollada por Frenkel en 1947 (71) produjo un gran avance en la producción de vacuna, ya que se pudo contar con suficiente cantidad de antígeno como para una producción en mayor escala.

#### i.- Vacuna tipo Frenkel

La vacuna Frenkel tal como se la conoce actualmente fue preparada por primera vez en los años posteriores a la segunda guerra mundial (70). Para cultivar el virus de la fiebre aftosa "in vitro" Frenkel utilizó epitelio tomado de la lengua de ganado vacuno sacrificado. El tejido se recoge poco después de la muerte de la res y se lo sumerge en una solución estabilizadora. El tejido se mantiene en suspensión por agitación continua a 37°C. El medio de cultivo suele ser una solución estabilizadora complementada con aminoácidos, vitaminas, antibióticos, etc.. Los cultivos alcanzan su máximo rendimiento entre las 20 y 24 horas después de la siembra. Tanto el epitelio como el líquido de cultivo contienen grandes cantidades de virus. La vacuna se prepara por adsorción del virus en hidróxido de aluminio, inactivación con formaldehído a una temperatura entre 25 y 26°C añadiéndosele, finalmente, un coadyuvante tal como la saponina.

En la actualidad, como consecuencia del desarrollo de las modernas técnicas de cultivos de tejido y la dificultad para la obtención de epitelio lingual bovino en determinados países, el método Frenkel ha sido desplazado por otros métodos de producción de antígeno.

#### ii.- Vacunas preparadas en cultivos de tejidos

La producción en escala industrial del virus aftoso en cultivos primarios de células de riñón de ternero comenzó en 1960. Este método estuvo limitado por la dificultad de obtención de las células provenientes de los riñones y del bajo rendimiento celular (9).

En 1962, Mowat y Chapman (124) introdujeron una línea estable de células de riñón de hamster (BHK-21) para cultivar virus aftoso. Estas células forman multiestratos con una densidad 5 veces mayor que las células de riñón de ternero. También pueden ser cultivadas en sus

pensión en volúmenes que varían de 30 a 3000 litros (38).

Con los modernos métodos de almacenamiento de células se dispone de un suministro constante de una célula huésped uniforme para la producción sistemática de virus. La línea celular debe cumplir ciertos requisitos como ser: rápida velocidad de multiplicación, alta densidad celular, ser completamente susceptibles al virus y dar títulos elevados. Asimismo, los productos celulares no deben producir efectos no deseados en el animal inoculado, tales como tumores o choques anafilácticos. Diversas experiencias han demostrado que no producen tumores, como no sea por la célula intacta y, en tal caso, exclusivamente contra la especie homóloga (23).

### iii.- Vacunas con virus producido en conejos neonatos (3)

La producción de virus aftoso en conejos recién nacidos se aplicó en algunos países. En Brasil, esta técnica tomó un desarrollo industrial de gran importancia, llegando en el año 1970 a cubrir un 70% de la producción nacional. Las técnicas de producción seguidas por los distintos laboratorios industriales eran un tanto empíricas, adoptadas en general por analogías con otros métodos de producción (Waldmann, Frenkel, etc.).

La falta de información sobre la verdadera eficacia inmunogénica de los virus multiplicados en gazapos era casi total. Además, el comportamiento de las vacunas a campo no era satisfactorio frente a los virus actuantes en ese momento. Frente a esta situación, el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa decidió realizar experiencias, buscando obtener respuestas prácticas para los interrogantes planteados con este tipo de vacunas.

Se determinó que el virus puede adaptarse muy fácilmente y en pocos pasajes. El virus multiplicado en conejos tiene buenos títulos infectantes en ratones lactantes y en cultivos de tejidos. Para obtener un buen rendimiento viral es muy importante que los conejos hayan sido recientemente separados de la madre y estén en óptimas condiciones físicas. La suspensión vírica puede ser inactivada por formaldehído o con acetiletilenimina (AEI).

La evolución de la curva de anticuerpos y el efecto de revacunaciones con vacunas producidas con virus de conejos, coinciden con los

resultados obtenidos con vacunas tipo Frenkel o células BHK. La conservación del poder inmunogénico del virus congelado fue excelente durante 12 meses para 4 cepas del virus.

Debido a la utilización de un gran número de conejos recién nacidos para la elaboración de suficiente cantidades de antígeno, se hace necesario recurrir a criaderos particulares para un abastecimiento factible y sin interrupción, lo cual constituye un factor negativo (68).

El virus se multiplica especialmente en el tejido muscular de los conejos y la preparación del antígeno da lugar a una suspensión vírica que contiene grandes cantidades de proteínas específicas de conejo que, eventualmente, pueden interferir con la inactivación del virus, pudiendo asimismo ocasionar reacciones indeseables en la revacunación viral. De este modo, la preparación del virus exige una purificación adecuada para que sea utilizable.

Todos estos inconvenientes llevaron a que este método de producción sea reemplazado por el cultivo de células en suspensión tipo BHK.

#### iv.- Inactivantes

El formaldehído fue el primer inactivante aplicado en la producción de vacunas contra el virus de la fiebre aftosa. El primer investigador en utilizarlo fue Vallée en 1926 (203). La cinética de inactivación del virus por el formaldehído demostró que la misma cambiaba con mucha frecuencia, lo que tornaba muy difícil determinar el tiempo necesario para una completa inactivación, afectando a su vez el grado de inocuidad de la vacuna (68).

La concentración del antígeno por medio de su adsorción en hidróxido de aluminio permitió disminuir, en parte, este problema. Sin embargo, se sabe que, aún con este procedimiento, no todo el antígeno es inactivado en un determinado período y, a menudo, es difícil detectar pequeñas cantidades de virus infeccioso (1,11). Por esta razón, se estudiaron otros agentes inactivantes del virus aftoso tales como la betapropiolactona (66), el glicilaldehído (20) y la acetiletilenimina (AEI).

Asimismo, Brown y col. (24,25) observaron alguna degradación del virus cuando fue inactivado con 0,02% de formaldehído pero no con 0,05 % de AEI, aún después de 72 horas de incubación a 37°C. Además, determinaron que las vacunas AEI-Hidróxido de aluminio eran mas eficientes que las de formol-hidróxido de aluminio.

#### v.- Adyuvantes

Se llama adyuvante a todo elemento que actua incrementando la respuesta inmune de un antígeno específico. Las sustancias utilizadas son de una gran variedad (compuesto de aluminio, aminas alifáticas, aceites, etc.).

En la producción de vacunas antiaftosas parece ser un factor importante el tipo de adyuvante utilizado. El primero fue el hidróxido de aluminio, introducido en 1936 por Schmidt (171). Ha sido ampliamente utilizado debido a que tiene algunas ventajas sobre otros adyuvantes. Su preparación es fácil y económica y a menudo es realizada en el mismo laboratorio productor de vacunas. El hidróxido de aluminio es muy bien tolerado por los animales y no causa problemas en el lugar de inoculación.

Posteriormente, se incorporó la saponina al hidróxido de aluminio con la finalidad de mejorar la inmunidad conferida por las vacunas. Dalsgaard (54,55) demostró la actividad adyuvante de la saponina cuando la usaba en combinación con vacuna monovalente con una dosis estandar de virus aftoso vacunal de diferentes serotipos. Mas tarde, observó que la adición de saponina a la vacuna inducía un nivel mayor de anticuerpos contra los tres serotipos (56).

También se ha estudiado la acción de adyuvantes oleosos formados por aceites minerales de grado farmaccútico y el Arlacel A. En algunos casos, se utiliza el Tween 80 con la finalidad de aumentar la estabilidad de la emulsión.

Rivenson y col. (155-156) utilizando una modificación del adyuvante incompleto de Freund, con el nombre de adyuvante INTA (Marcol 52, Arlacel 83, Tween 80), elaboraron vacuna antiaftosa oleosa trivalente con virus producido por el método Frenkel. Inoculada en bovinos mostró una protección no menor de 6 meses en lugar de los 4 meses reconocidos para la vacuna hidroxi-saponinada convencional.

Los nódulos producidos por la vacuna oleosa en el punto de inoculación no fueron mayores de 4 cm y a los 30 días habían desaparecido en un 50% (155).

En otro ensayo realizado por este grupo de investigadores, conjuntamente con el Centro de Enfermedades Animales de Plum Island (Estados Unidos), elaboraron vacuna trivalente con los virus  $O_1$ ,  $A_{24}$  y  $C_3$  multiplicados en cultivos de células BLK-21 e inactivados con AEI. No encontraron una significativa influencia de la concentración sobre la eficiencia de la inmunidad, confirmándose además una protección mínima de 6 meses.

En bovinos primo vacunados se ha obtenido buena inocuidad hasta el sexto mes después de la vacunación. Bovinos revacunados hasta un año después de la revacunación mostraron protección aceptable. Debido al beneficio que esto significaría, ya que permitiría reducir el número de revacunaciones anuales de 3 a 2, se han realizado numerosos estudios para posibilitar su aplicación en gran escala.

Otro de los adyuvantes que se han investigado es el DEAE-dextrano, el cual es un adyuvante útil para la vacunación de porcinos pero causa reacciones secundarios en bovinos (220,221).

#### vi.- Pruebas de inocuidad. Control de calidad

Las pruebas de inocuidad se realizan normalmente en bovinos y ratones lactantes. La utilización de bovinos tiene la desventaja que, por razones económicas, solamente se puede utilizar en un pequeño número de animales. Esto limita el tamaño del muestreo y aumenta la posibilidad del error estadístico. En América del Sur donde la enfermedad es endémica, es difícil disponer de animales susceptibles libres de fiebre aftosa. Por lo tanto, se torna mas factible el empleo de ratones lactantes lo cual permite el análisis de mayores volúmenes de vacuna y aumenta el factor seguridad (68).

Las pruebas de control de calidad o de potencia, deben ser realizadas en todas las partidas producidas. Existen varias pruebas que permiten evaluar la calidad de una vacuna con bastante precisión, siendo la mas confiable la que se realiza en bovinos determinando la dosis protectora 50% (DP50).

Las otras técnicas se basan en la determinación de la cantidad de anticuerpos circulantes específicos, medidos en cultivos de tejidos o ratones lactantes. La prueba indirecta más corriente es la que se realiza en cobayos, dado que éste es un animal que se puede obtener con facilidad.

#### I.1.7.- Características bioquímicas del virus aftoso

##### I.1.7.1.- Características generales

El virus aftoso es uno de los virus animales más ampliamente estudiados. Se ha recopilado mucha información sobre su morfología, estructura, composición físico-química y funciones biológicas. El conocimiento de estas características no sólo resultan de gran utilidad para estudios comparativos o teóricos sino que, además, sirven de base para desarrollar nuevas técnicas de control sobre la fiebre aftosa.

Pertenece a la familia Picornaviridae la cual está dividida en cuatro géneros: Enterovirus, Cardiovirus, Rhinovirus y Aftovirus (46). Los cuatro géneros tienen características en común aunque también tienen importantes diferencias, siendo una de ellas la estabilidad al pH ácido. El género Aftovirus se caracteriza por ser sensible al medio ácido, inactivándose a pH menores de 6,5 (127). Además, se ha encontrado que su inestabilidad a diferentes valores de pH está influenciada por la fuerza iónica del medio (207). El virus aftoso es inactivado a pH menores de 6,5 en un medio isotónico (11) y se disocia en proteína y ácido ribonucleico a pH 7.5 en condiciones de baja fuerza iónica (8).

La densidad de flotación del virus en una solución de cloruro de cesio tiene un rango de 1,42 a 1,51 g/ml (153), estableciéndose el valor de la partícula vírica normal en 1,43 g/ml (127). Se ha correlacionado esta mayor densidad en cloruro de cesio con la sensibilidad a bajos pH que tienen los Aftovirus. Los virus estables a pH por debajo de 4 (Enterovirus y Cardiovirus) tienen una menor densidad de flotación en cloruro de cesio (1,34 g/ml) (127).

Las diferencias encontradas en cuanto a la densidad de flotación en cloruro de cesio implicaban distintas estructuras dentro de los picornavirus. Poliovirus bandeaa a densidad 1,34 g/ml, su cubierta es impermeable al cesio y así no permite el intercambio de iones cesio con los cationes naturalmente unidos al ARN. Rhinovirus tiene una densidad mayor (1,40 g/ml), su cubierta proteica es permeable al cesio lo cual permite que dicho ión se una al ARN. Si el ARN de poliovirus es expuesto a iones cesio mientras el virus es ensamblado une aproximadamente el mismo número de átomos de cesio que rhinovirus (4000-4500). Esto sugiere que tanto poliovirus como rhinovirus tienen la misma fracción de su ARN neutralizado por la proteína de la cubierta (112). En cambio, el virus aftoso con una densidad de 1,43 g/ml une un ión cesio por cada uno de sus 7500 grupos fosfato. Esto indicaría que su ARN no está neutralizado por los grupos positivos de la cubierta proteica (112).

Se ha encontrado dentro de los picornavirus la presencia de una partícula viral de mayor densidad que la del virus estandar. Este componente se ha denominado partícula densa y ha sido citado para los diferentes grupos de los picornavirus. Korant (104) determinó en rhinovirus la presencia de una partícula de mayor densidad que el virión intacto que contenía ARN y los polipéptidos VP1 y VP3. También se determinó su presencia en varios enterovirus de vertebrados: poliovirus (tipo 1), enterovirus bovino y virus de la enfermedad vesicular del cerdo (SVDV). Este componente más denso tenía la misma morfología que el virus estandar (más liviano). Ambos tenían la misma proporción de ARN y proteínas y la misma composición de polipéptidos. Se encontró, además, que el componente liviano tenía una infectividad específica cuatro veces mayor que el más denso (164).

En células HeLa infectadas con poliovirus fueron aisladas partículas de mayor densidad conteniendo ARN y los cuatro polipéptidos estructurales (222). Estas partículas tenían una menor infectividad específica y fueron neutralizadas por antisuero específico contra poliovirus. Tendrían una conformación diferente más abierta que la cápside normal del virus.

La producción de estas partículas se observa durante la infección tan tempranamente como el virus normal, pero desaparece cuando la producción del virus cesa (229). La mayor densidad de flotación parece estar correlacionada con la alta labilidad de la partícula densa (215).

La progenie de virus obtenida por replicación de cualquiera de las dos formas contiene la misma proporción de componente denso y liviano que el virus original (104), indicando que las dos poblaciones son genéticamente idénticas.

En el virus aftoso fue observada una pequeña proporción de partículas víricas de mayor densidad. Analizando varias cepas de virus aftoso tipo O, A, C y SAT<sub>2</sub> se encontró una pequeña proporción de virus con densidades entre 1,46 y 1,475 g/ml. Estos componentes representan, presumiblemente, partículas virales en las cuales los cationes que neutralizan las cargas negativas del ARN son rápidamente sustituidos por iones cesio.

El ARN en la mayoría de las partículas virales parece ser parcialmente sustituido por iones cesio en una primera etapa, para luego continuar la sustitución hasta saturación. La proporción de ARN que puede ser rápidamente sustituido permitiría explicar las diferencias de densidad observadas para distintas cepas de virus (201).

Muchas cepas de virus aftoso han sido caracterizadas por su resistencia a la inactivación térmica. Curvas de sobrevivencia a 55°C y 61°C para el virus A<sub>119</sub> en medio de cultivo mostraron una inactivación inicial rápida de primer orden, seguida por una prolongada acción residual, revelando la presencia de una fracción resistente al calentamiento (11). Por encima de 43°C se produce una rápida desnaturalización de las proteínas de la cápside y a temperaturas mas bajas una inactivación lenta del genoma viral (11).

El virus inactivado por incubación prolongada a 25°C o 37°C pierde su infecciosidad debido a la degradación de su ARN por acción de la nucleasa viral (58) sin cambio aparente de la cápside proteica (26).



Los aldehídos y el óxido de etileno reaccionan con uniones primarias, mientras que detergentes, urea, guanidina, fenol, afectan uniones secundarias. El virus aftoso es bastante resistente a detergentes aniónicos, catiónicos y no iónicos a temperaturas de 25° a 28°C (9). Los solventes orgánicos no tienen efecto sobre el virus dado que no tiene lípidos. Por lo tanto, para purificar al virus se realizan extracciones con cloroformo por la propiedad que tiene de separar lípidos y proteínas de nucleoproteínas. El fenol, excelente desnaturizante de proteínas, despoja al virus de este componente, liberando ARN infeccioso (9).

Para inactivar el virus han sido utilizados reactivos alquilantes tales como formaldehído, acetiltilenimina y glicilaldehído. El formaldehído reacciona con grupos amino y amido de la proteína y con grupos aminos no afectados por las uniones hidrógeno de las bases purina y pirimidina del ARN. Una reacción inicial rápida que forma grupos aminoetilos es probablemente reversible y una reacción secundaria lenta, mas estable, resulta en la formación de puentes metileno. La cinética de inactivación con formol se desvía de una reacción de primer orden, dificultando la evaluación del momento en que la inactivación es completa. Esto podría ocultar un residuo viral infeccioso en la vacuna. En cambio, con la AEI, la cinética para inactivación del virus a 37°C es de primer orden y la inactivación ocurre en un período de 24 a 48 horas sin destrucción del virus o las propiedades inmunizantes (9).

La radiación electromagnética tiene acción letal sobre el genoma viral provocada por la destrucción de la cadena ribosa-fosfato y de la aromaticidad de las bases purínicas y pirimidínicas (9).

#### I.1.7.2.- Características estructurales

##### a) Estructura proteica

El virión de 23 nm posee un coeficiente de sedimentación de 146 S, tiene una densidad de 1,43 g/ml, peso molecular  $6,9 \times 10^6$  y representa la unidad del virus aftoso que es capaz de reproducirse e iniciar una infección (114).

Está formado por la cápside (estructura proteica) y el ARN viral que se unen conforme al sistema cúbico con la configuración de un icosaedro truncado. La composición química del virión es 31% de ARN y 69% de proteína.

Además de la partícula completa de 146S, se encuentran cápsides vacías en células infectadas con el virus. Tienen un diámetro de 21-22 nm y un coeficiente de sedimentación de 75S. Su peso molecular es de  $4,7 \times 10^6$  y su densidad es de 1,31 g/ml. El cápside vacío está compuesto de proteína viral y no contiene ARN viral, por lo que carece de infectividad. Con respecto a la inmunogenicidad, se comporta como la partícula 146S.

El análisis de las proteínas estructurales por geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS), mostró que el virus aftoso contenía cuatro polipéptidos denominados VP1, VP2, VP3 y VP4, con un peso molecular de 34.000, 30.000, 26.000 y 13.500 respectivamente (199). Estos polipéptidos estaban presentes en la relación 1:1:1:0,5. Se considera que, en general, en cada partícula viral se encuentran 60 copias de cada uno de los polipéptidos (166). Otros polipéptidos presentes en la cápside del virión pero en una proporción mucho menor que los estructurales son: moléculas de VP0, el precursor no clivado de VP2 y VP4 (165, 208, 228) y un polipéptido de origen viral componente de la ARN-polimerasa ARN-dependiente (169). Las partículas vacías obtenidas artificialmente contienen los cuatro polipéptidos estructurales mientras que las obtenidas naturalmente contienen algunas moléculas de VP0 sin clivar.

El virus aftoso puede ser disociado a pH 6,5 en ARN y subunidades proteicas que contienen los tres polipéptidos más grandes y un precipitado insoluble que contiene al polipéptido menor (32). La subunidad conteniendo a los tres polipéptidos mayores sedimenta a 12S en gradientes de sacarosa.

Estas subunidades aparecen al microscopio electrónico como partículas en forma de coma y son idénticas a los capsómeros virales. Se estimó el peso molecular de la subunidad en  $289 \times 10^3$  y  $282 \times 10^3$  pero resultados posteriores la ajustaron a  $265 \times 10^3$  (199).

Los capsómeros tienen un diámetro de 12 nm, densidad de 1,3 g/ml y son estables a valores de pH entre 5,25 y 10,5 (209). No son infecciosos y no son buenos inmunógenos.

Se detectó, además, una pequeña proteína que sedimenta a 3S, denominada antígeno VIA (antígeno asociado a la infección viral) dado que anticuerpos contra la misma pueden ser encontrados en el suero de animales que han sido infectados con virus aftoso pero no en aquéllos que han sido inoculados con virus inactivado (169). El antígeno VIA encontrado durante la replicación del virus aftoso no forma parte de la partícula viral. No es una proteína de la cápside y estaría relacionada con la replicasa viral (85). Se demostró que el suero de animales infectados con el virus, conteniendo anticuerpos contra el antígeno VIA, inhibían la actividad de la ARN polimerasa "in vitro". El suero de animales normales o vacunados con virus inactivados no mostraban esta propiedad. La aplicación de un test para detectar el antígeno VIA en un estudio epizootiológico permite fácilmente diferenciar animales infectados de vacunados (159).

De las cuatro proteínas estructurales, se ha demostrado que VP3 (24 Kd) es inmunogénica por sí sola. Es sensible a la tripsina y ha sido designada alternativamente como VP<sub>T</sub>, teniendo en cuenta la presencia de treonina como aminoácido N-terminal.

#### b) Acido nucleico viral

El ácido nucleico del virus posee toda la información para la síntesis de las proteínas virales y la construcción de la cápside. Cuando se rompe la envoltura proteica en determinadas condiciones puede ser liberado en forma biológicamente activo (9,27,153,199).

El genoma del virus es ácido ribonucleico de cadena simple, con un coeficiente de sedimentación de 37S. Su peso molecular ha sido estimado en  $2,6 \times 10^6$  (108,192,199,216). Tiene una densidad de 1,67 g/ml y es estable a valores de pH entre 3,5 a 11,5 (114). La molécula de ARN es de polaridad positiva, pudiendo actuar como mensajero, como templado para la producción de cadenas complementarias o puede ser encapsidada en la partícula viral.

Una secuencia de ácido poliadenílico (poli (A)) se halla presente en el extremo 3' del ARN viral (40), la cual es heterogénea en longitud pudiendo tener de 40 a 100 nucleótidos. Esta secuencia de poli(A) es característica del extremo 3' de los mensajeros (mARN) y ARN heterogéneo nuclear (hnARN) en células eucarióticas (14). Se la ha encontrado también en los mRNA aislados de células infectadas con virus animales, con excepción de reovirus (10). Se identificó también en los ARN de otros picornavirus (5,28).

La cadena de ARN de polaridad positiva del virus aftoso sintetiza su extremo 3' durante la replicación de la secuencia 5' poli (U) de su templado negativo (222). El papel del poli (A) aún no está muy claro. En estudios realizados con poliovirus y encefalomiocarditis (EMC) se lo trató de relacionar con la infectividad específica (78,188).

En un trabajo con el virus aftoso subtipo  $\Lambda_{12}$  se separaron dos poblaciones virales, una con menor longitud de poli(A) que la otra (10 y 40 residuos de adenosina). Sin embargo, no se obtuvieron diferencias en la infectividad específica (87).

Como en el resto de los picornavirus el extremo 5' del ARN no termina en un grupo oxidrilo libre (217), sino que está bloqueado por una proteína denominada VPg codificada por el virión (93,107, 169). La proteína está unida covalentemente al nucleótido pUp del extremo 5'. El peso molecular de VPg en el virus aftoso es de 12.000 (86). La naturaleza de la unión entre la proteína y el ARN es de tipo fosfodiéster entre la tirosina y el ácido uridílico (4).

Teniendo en cuenta que se ha encontrado VPg en las cadenas nacientes del complejo intermediario de poliovirus (130), se ha sugerido que el VPg puede actuar como cebador en la síntesis de ARN. La secuencia nucleotídica del ARN mensajero viral es idéntica a la del ARN del virión, con la salvedad que el extremo 5' no tiene unida la proteína. Habría una escisión posttranscripcional del VPg de la cadena de ARN naciente. Este VPg clivado es rápidamente degradado (218). En cepas de virus aftoso clonado por plaqueo, se ha encontrado que el VPg es heterógeno en cuanto a su carga, aislandose dos poblaciones que difieren en su composición de aminoá-

cidos (218). Se supone que el ARN de los aftovirus codifica para dos o mas VPg diferentes que son usados al azar. El VPg puede estar involucrado en el proceso morfogénico, facilitando el reconocimiento del ARN del virión por los precursores poliproteicos de las procápsides (167).

El ARN del virus aftoso, al igual que el de los cardiovirus, contiene una zona de ácido policitidílico (poli(C)) (89,167). El tamaño parece ser homogéneo para un virus aislado en particular pero hay considerables diferencias en la longitud de los poli(C) provenientes de virus aislados de distintos orígenes (167). Se ha calculado que el poli(C) del virus aftoso tiene unos 100-200 nucleótidos de longitud y que se localiza a 400 nucleótidos del extremo 5', donde esta unida la proteína VPg.

La posición de la región del poli(C) fue establecida usando una enzima (la RNasa H) que degrada específicamente híbridos ARN/ADN. Por lo tanto, hibridizando al poli(C) con oligo(dG) se puede digerir la zona del poli(C) viral. Luego de la degradación se obtienen dos fragmentos, uno largo (L) con 7500 nucleótidos derivados del extremo 3' del genoma y otro corto (S), con 250 a 400 nucleótidos, derivado del extremo 5' conteniendo al VPg (167). El fragmento L no es infeccioso, por lo que podría suponerse que el poli(C) o el fragmento S o ambos tuviesen algún papel importante en la infección con virus aftoso.

### c) Replicación

Se ha aceptado, en general, que los picornavirus contienen un solo sitio de unión al ribosoma, aunque podría haber evidencias de otro sitio secundario (167). El hecho de tener un solo sitio de unión al ribosoma (hacia el extremo 3' del poli(C)) significaría que la síntesis de proteínas se iniciaría cercana al extremo 5' y atravesaría todo el genoma hasta dejar el extremo 3'. Este mecanismo permitiría producir un polipéptido con el tamaño acorde con la capacidad codificante del genoma completo.

Este polipéptido gigante -llamado poliproteína- ha sido hallado bajo condiciones en que el procesamiento proteolítico ha sido inhibido (167). Esta poliproteína es escindida normalmente durante el proceso de traducción, no pudiendo ser detectada a no ser en

las condiciones anteriormente mencionadas o empleando determinados mutantes de temperatura (ts) creciendo a la temperatura restrictiva.

En las primeras escisiones de la poliproteína están involucradas proteasas celulares, mientras que en las escisiones de los precursores primarios participan proteasas codificadas específicamente por el virus (103).

El hecho de tener un solo sitio de unión al ribosoma ha facilitado el mapeo bioquímico de los productos genómicos, empleándose pulsos de radioactividad a diferentes intervalos de tiempo después de la inhibición de la iniciación de la traducción con pactamicina (33,193).

En infecciones de células BHK-21 con el virus aftoso, se han detectado tres productos primarios importantes, sintetizados en el orden 5' a 3': P88, P52, P100. El producto primario P88 es precursor de las proteínas estructurales, mientras que P100 contiene al precursor de la ARN polimerasa específica del virus (128). P52 corresponde a la zona central del genoma y se supone que podría codificar para proteasas que escinden el precursor estructural de las proteínas VP0, VP1 y VP3. Hay, además, otro producto primario P20, localizado entre el extremo 5' y el precursor de las proteínas estructurales (167).

El polipéptido codificado por el extremo 3' en el genoma del virus aftoso -P100- puede escindirse para dar P72 o puede ser procesado para producir dos polipéptidos: P56a y P56c. Se ha encontrado que el P56a es componente de la ARN-polimerasa ARN-dependiente inducida por el virus. Hay aproximadamente más de 30 proteínas inducidas por el virus en células infectadas y es posible que muchas de ellas tengan papeles importantes para la replicación viral, pero hasta el momento no se han podido correlacionar a todas.

#### d) Variabilidad viral

Se ha mencionado que los aftovirus eran fácilmente modificados en cuanto a su virulencia y antigenicidad. Se ha citado variación en virulencia entre cepas de diferentes rupturas de inmunidad pero

también variaciones dentro de la misma ruptura (115). Se definieron 7 tipos antigénicos por ensayos de fijación de complemento (O, A, C, SAT<sub>1</sub>, SAT<sub>2</sub>, Asia<sub>1</sub> y Asia<sub>2</sub>) y mas de 60 subtipos serológicos.

La frecuencia de mutación que se ha encontrado para mutantes sensibles a temperatura es de  $10^{-3}$  por UFP y de  $10^{-2,9}$  para mutantes frías (cs). No habría una distribución al azar de las mutaciones ts, ya que el 83% de las mismas se mapean en la región de las proteínas estructurales.

La frecuencia de reversión de una mutante ts a ts<sup>+</sup> es de aproximadamente  $10^{-4,0}$  a  $10^{-5,4}$  por UFP que no es muy diferente a la de otros virus. Por lo tanto, la variabilidad observada en el campo podría ser debida a la presión de selección a la cual el virus es expuesto mas que a una excepcional frecuencia de mutación. Se ha encontrado además, que la complementación es baja e ineficiente, aunque es posible obtener mezclas fenotípicas entre aftovirus y enterovirus bovinos. Por otro lado, se han determinado fenómenos de recombinaciones entre aftovirus (115).

## I.2.- ATENUACION

Los cambios moleculares asociados a la atenuación de cepas virales usadas para la producción de vacunas no son conocidos y es de suponer que sean diferentes para cada tipo de virus. Por supuesto, el proceso por el cual fueron seleccionadas es altamente empírico teniendo en cuenta que se sabe poco acerca de los mecanismos responsables de la atenuación. Sin embargo, numerosos virus animales patógenos han sido disminuídos en su virulencia para ser utilizados como antígenos en vacunas de uso comercial.

Las investigaciones realizadas en Europa desde la descripción de Peragallo en 1937 sobre la adaptación del virus de la fiebre aftosa a huevos embrionados, fueron confirmadas por Traub y Schneider en 1948. En 1951 el descubrimiento de Skinner sobre la susceptibilidad de los ratones lactantes al virus aftoso y en 1954 los trabajos de Gillespie describiendo la técnica de adaptación del virus aftoso a pollos de un día, dieron las pautas iniciales para que nuevas investigaciones en nuestro continente y el resto del mundo comprobaran que, mediante técnicas del pase continuo del virus aftoso en diversos huéspedes, se pueden obtener cepas vacunales atenuadas en cuanto a su patogenicidad y alta calidad inmunogénica.

Los principales países donde se ha estudiado la aplicación de vacunas a virus vivo modificado contra diversos tipos de virus aftoso (A y O Vallée, C Waldmann, SAT<sub>1</sub>, SAT<sub>2</sub> y Asia-1) son: Israel, Kenia, Sudáfrica, Transvaal, Africa del Sudoeste, Guyana, Brasil, Colombia, Ecuador, Chile y Venezuela (138). En Sud América, la primera información sobre las investigaciones y administración de vacunas a virus vivo modificado contra la fiebre aftosa fue publicada por Rubino y Tortorella en 1940 (52).

Los métodos de atenuación se desarrollaron utilizando diferentes huéspedes, siendo los mas importantes: ratones lactantes y adultos embriones de pollo y pollos de un día, conejos y cultivos celulares.



### I.2.1.- Métodos para disminuir la patogenicidad viral

#### I.2.1.1.- Modificación del virus aftoso en pollos y embriones de pollo

Cuando se inoculan pollos recién nacidos con el virus aftoso (por vía intravenosa) los síntomas clínicos están caracterizados por lesiones macroscópicas en el epitelio (virus epiteliotrópico). Cuando se inoculan embriones de pollo de 14 días, la mayor infectividad se encuentra en el tejido cardíaco, siendo las lesiones macroscópicas del corazón un rasgo de diagnóstico específico de la infección. Se requieren aproximadamente unas  $10^5$  dosis infecciosas 50% (DI50) en ratón para producir una buena infección, pero una vez que el virus es reaislado de los embriones inoculados, los posteriores pasajes son relativamente sencillos.

Varios estudios acerca de la propagación del virus aftoso en pollos y en embriones de pollo fueron llevados a cabo en el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (224). Se intentaron propagar los virus A y O Vallecé y C Waldmann en pollos. El virus A mostraba una parcial atenuación después de 60 pasajes y pérdida de patogenicidad en bovinos, mientras que el virus O se mantenía altamente patógeno para el ganado aún después de 70 pasajes (225,226). A partir de 1960, estudios realizados por Bernal y col. con el virus O<sub>1</sub> Campos con pases seriados por huevos embrionados revelaron que la patogenicidad disminuía progresivamente, manteniendo buena inmunidad incluso en el pasaje 99.

En ensayos realizados con el virus A<sub>24</sub> Cruzeiro los datos obtenidos en los pasajes 67, 80 y 92 en huevos embrionados indicaron que la patogenicidad de este virus para bovinos susceptibles (de zonas exentas de fiebre aftosa) fue 16/32 para el pasaje 67, de 13/32 en el 80 y de 16/104 en el pasaje 92 (16,53,132). A este nivel, la patogenicidad era muy leve. En todos los bovinos vacunados, se obtuvo una buena inmunidad aún en los casos en que se había utilizado virus antigénicamente distinto (A<sub>18</sub> y A<sub>19</sub>). No hubo indicación de propagación de la infección por contacto de los bovinos vacunados a los animales susceptibles (138). Sin embargo, a pesar de no ser patógeno para bovinos, el virus mantenía aún su patogenicidad para los cerdos en el pasaje 113.

Palacios y col. en Venezuela modificaron la cepa O Lara (tipo O<sub>1</sub> Vallecé subtipo O<sub>3</sub>) por pasajes en huevos embrionados y pollos de un día (133-137). A partir de los pasajes 162-163 se observó una disminución acentuada de la patogenicidad para los bovinos. Se obtuvo buena inmunidad en bovinos inoculados con los pasajes estudiados, con excepción del pasaje 202. Los bovinos susceptibles que estuvieron en contacto con animales vacunados no contrajeron la enfermedad. La patogenicidad de este virus para el ganado porcino era muy elevada, aún en el pasaje 301.

La producción de vacunas a virus vivo modificado con la cepa Lara del virus O<sub>1</sub> Vallecé, se inició a fines de 1964, utilizando virus de pasajes 101-103. El empleo de esta vacuna en gran escala fue seguida de reacciones post-vacunales. En 1965, se administró una vacuna de pasaje 162-163 en polluelos de un día, no registrándose reacciones adversas en el ganado vacuno, repitiendo la vacunación cada 6 meses.

En la actualidad, Venezuela continúa vacunando con vacunas a virus vivo con una cepa O<sub>1</sub> Campos modificada (12), ensayándose las vías de inoculación intranasal e intramuscular (17-18).

#### I.2.1.2.- Modificación del virus en ratones (185,187)

En el ratón lactante, la infección clínica está caracterizada por parálisis muscular generalizada y es, invariablemente, fatal. Una resistencia a infección con pequeñas dosis de virus se desarrolla a partir del décimo a catorceavo día de edad. Con el aumento de la edad se debe ir incrementando la dosis de virus utilizada para producir una infección clínica. En el ratón adulto, susceptible a infección, cuando se lo inocula intraperitonealmente, sólo se afectan clínicamente los músculos de las patas posteriores pero, con frecuencia, se recupera totalmente.

El pasaje de virus en ratones lactantes se hace por vía intraperitoneal, usando la suspensión de corazón y carcasa eviscerada (excluyendo la cabeza) (45). Las cepas pasadas por ratones lactantes se llaman "n" usando un sistema establecido para otros grupos (45). Por ejemplo, m40 significa con 40 pasajes por ratones lactantes.

Cepas pasadas por ratones adultos son llamadas cepas "mo". Un procedimiento común en este caso es inocular ratones adultos con suspensiones del tejido del músculo de la pata. Se recogen las patas posteriores de los ratones que han mostrado mas rápido una severa parálisis.

Con el aumento de la edad del ratón la variación individual en la susceptibilidad del mismo va aumentando. Además, la infectividad en los músculos de las patas seleccionadas es variable y, en los mejores casos, se consigue menor cantidad de virus que el que se recoge en ratones lactantes. Por esta razón, es usual que cuando se obtiene una cepa "mo" se infectan ratones lactantes y se usan como fuente de tejido para asegurar un alto título.

Virus atenuado en ratón fue utilizado como antígeno vacunal con éxito en Africa (75). Se emplearon dos cepas de virus atenuado: la cepa Rho 1 (tipo SAT<sub>2</sub>), pasada 28 veces en ratones lactantes y 89 veces en ratones adultos y la cepa RV 11 (tipo SAT<sub>1</sub>), pasada 34 veces en ratones adultos.

En el año 1959 se realizó una experiencia de vacunación con la cepa Rho 1 en Africa del Sur. Los bovinos vacunados fueron desafiados tres semanas después por inoculación intramuscular de virus SAT<sub>2</sub> aislado de una epizootia en bovinos. Mas del 70% de los animales vacunados fueron resistentes a la fiebre aftosa. Un 53% de los bovinos que reaccionaron presentaron lesiones en la boca y en 3 o 4 de sus miembros. Sobre el 47% restante algunos desarrollaron lesiones de la boca. El 97% de los testigos no vacunados tuvieron grave infección generalizada.

Los resultados fueron alentadores dado que, además, no se comprobó aborto ni efectos inesperados después de la vacunación. El porcentaje de animales con reacciones adversas a la vacuna fue del 0,4% y no hubo prueba de propagación de la cepa vacunal por contacto con animales no vacunados (75).

Galloway informó también el uso de la cepa Rho 1 en Kenia durante un brote correspondiente al tipo SAT<sub>2</sub>. Se determinaron dos focos de infección y se efectuó una extensa vacunación alrededor de ellos. Cerca de 80.000 bovinos fueron vacunados, entre los cuales

había razas nativas como cruza. No hubo pruebas después de la va cunación de diseminación de la infección. Las reacciones post-va- cunales fueron de carácter benigno y limitado sólo a un 10% en las razas europeas y sus cruza con el tipo autóctono. Si bien el virus de campo era un subtipo diferente al que se usó en la vacu- na, fue posible limitar y controlar la difusión de la enfermedad.

Un importante brote con el virus SAT<sub>1</sub> fue diagnosticado en 1961 en el sudoeste de Africa (211), registrado como una de las mas grandes epizootias de fiebre aftosa. Se realizó vacunación con la cepa atenuada RV 11 en torno a la zona central infectada y, ade- más, vacunación con vacuna inactivada alrededor de la zona en la que se utilizaba la vacuna a virus vivo. Las cifras disponibles mostraron una protección en el 90% de los animales vacunados con RV 11. Además, en los vacunados con vacuna inactivada se obtuvo una inmunidad del 95%. Se consiguió detener la epizootia y la en- fermedad quedó definitivamente eliminada hacia fines de 1962.

#### I.2.1.3.- Modificación del virus en conejos

La susceptibilidad del conejo al virus de la fiebre aftosa fue descrita por varios autores en el año 1929. Inoculando la lengua del conejo con virus aftoso se obtenían vesículas primarias pero no se desarrollaban lesiones secundarias.

En 1952 se investigó la propagación del virus aftoso en conejos lactantes con el objeto de desarrollar nuevas fuentes de virus pa- ra la producción de vacunas. Se seleccionó esta especie porque el período de gestación y tiempo de desarrollo fetal es similar a los del ratón.

En 1959, Cunha (52) describió la propagación de dos cepas de vi- rus aftoso, tipos Vallecó (A y O) y Waldmann (C), en conejos lac- tantes y adultos. Se inoculaba una suspensión viral por vía intra- peritoneal y se observaba a las dos semanas post-inoculación. Se extraía de los animales muertos el músculo de la pata como fuente de virus. Si se requería mayor cantidad de virus, se sacaba toda la musculatura. En pocas ocasiones se extraía corazón, pulmones, hígado, bazo, riñón y cerebro. El tejido muscular mostraba los tí- tulos mas altos y el cerebro los menores. También se pudieron es-

tablecer infecciones seriadas en conejos adultos. Estos pasajes seriados dieron como resultado una marcada reducción en la patogenicidad para el ganado en el tipo 0.

Con un virus tipo C modificado en los pasajes 66 y 67 se observó un bajo grado de patogenicidad (3/96) y una buena inmunidad en el ganado (91/106) (52). Por el contrario, todo el ganado porcino inoculado presentó fiebre aftosa generalizada (10/10) y siete de los animales murieron. No se registraron contagios entre los bovinos, pero en los cerdos resultó considerablemente elevado.

#### I.2.1.4.- Modificación del virus en cultivos celulares. Selección de clonas atenuadas

Como se mencionó en los puntos anteriores, durante muchos años se trató de modificar el virus aftoso por pasajes seriados en diferentes huéspedes (animales pequeños). En todos estos métodos se pasaba sucesivamente la cepa viral hasta que se alcanzaba un nivel bajo de patogenicidad para el ganado, necesitándose en la mayoría de los casos efectuar numerosos pasajes.

En 1960 se probó atenuar el virus aftoso pasandolo por cultivos celulares de riñón de cerdo o de bovino, pero se requerían entre 400 a 500 pasajes para disminuir la patogenicidad.

Todos estos métodos habían sido relativamente empíricos y los resultados habrían sido difíciles de predecir, teniendo en cuenta que aún en diluciones límites el pasaje de virus debería consistir de una mezcla de partículas conteniendo diferentes características.

Por lo tanto, la aplicación del método de clonado en cultivos de tejidos permitiría obtener una población viral homogénea. Este método ayudaría, además, en el análisis de las características de los virus componentes de cepas modificadas y de las propiedades de un número de muestras en diferentes períodos de la modificación, todo lo cual facilitaría la comprensión del fenómeno de atenuación.

Durante las experiencias efectuadas con una cepa SAT<sub>1</sub> atenuada por pasajes en cultivos de células BHK-21, se demostró que la modificación había provocado en la población viral una variación de

la relación partículas patógenas a atenuadas (123). Las clonas fueron ensayadas para patogenicidad por inoculación intradermolingual de grupos de doce bovinos. De 24 clonas con cuatro pasajes por BHK que se analizaron, todas fueron patógenas mientras que, en el pasaje 48, sólo dos de 60 clonas fueron patógenas (123).

Se probaron las propiedades inmunizantes de una clona atenuada obtenida después de 82 pasajes por células BHK (clona SAT<sub>1</sub>-82) y se encontró que sobre 100 bovinos y 36 ovejas se protegía el 80% de los bovinos y el 100% de las ovejas, contra la descarga del virus homólogo sin modificar. Para proteger el 80% del ganado vacunado se requerían  $10^{8,0}$  DI50 m (126).

Para obtener una dosis protectora 50% (DP50) se debían utilizar  $10^{7,3}$  DI50 m que son, aproximadamente, 100 veces mayores que con la cepa atenuada RV 11 (DP50 =  $10^{5,5}$  DI50 m) o mucho más aún que con la Rho 1 m89 que produce 90% de protección con  $10^{3,9}$  DI50 m, pero que produce reacciones en el 8% de los animales. Estos datos sugerían que sólo aquellas cepas modificadas que habían retenido algo de patogenicidad eran altamente inmunogénicas.

Sin embargo, un ejemplo que se contrapone a estas observaciones es el de una cepa clonada -denominada clona 4- del virus aftoso A Kemron (142), la cual si bien es altamente inmunogénica carece de citopatogenicidad. Esta clona fue aislada por medio del método de plaqueo e inoculada una suspensión de la misma con título de  $10^9$  DI 50 m por la vía intradermolingual en bovinos susceptibles mostró ser completamente inocua.

Esto permitía la posibilidad de producción de vacunas antiaftosas vivas modificadas a partir de una población vírica clonada que conservaba sus propiedades inmunogénicas pero que era totalmente inocua.

Uno de los problemas más graves en el control de las epizootias del virus aftoso estaría causada por la heterogeneidad del virus. Teniendo en cuenta esto, las vacunas serían totalmente efectivas cuando se utilizara la cepa homóloga que produjo la epizootia. Utilizando esta metodología rápida de atenuación y clonado, se podría controlar la enfermedad obteniendo virus modificado a partir del que dio origen a la ruptura de inmunidad.

Según Mowatt (126) las ventajas de este método de atenuación serían:

- 1.- Rápida separación de las clonas atenuadas de las patógenas;
- 2.- Muestreo de un alto número de clonas inoculando en la lengua del bovino; y
- 3.- La atenuación en células BHK-21 produce cepas capaces de multiplicar rápido y con altos títulos.

#### I.2.1.5.- Otros métodos de atenuación

Se han realizado numerosos esfuerzos para explorar las posibilidades de emplear productos químicos para producir mutantes con pérdida de la patogenicidad para el huésped natural.

La obtención de mutantes virales no patógenos por mutagénesis química, empleando ácido nitroso o hidroxilamina, fue estudiada en diferentes sistemas virales (82). El modo de acción de estos mutágenos es el siguiente: ambas sustancias actúan directamente sobre el material genético del virus induciendo cambios en la composición del ácido ribonucleico. Estos cambios llevan a una alteración permanente del ácido ribonucleico transcripto. Usando ácido nitroso como mutágeno para el virus de Newcastle, se pudo aislar mutantes menos virulentas que la cepa original cuando la inoculación se realizaba en huevos embrionados. Mientras el ácido nitroso fue excelente como mutágeno para otros virus, las consideraciones prácticas no garantizaban su uso en el virus aftoso. Por lo tanto, se prefirió la hidroxilamina (111).

Se ha demostrado que el virus aftoso puede ser atenuado por este método y que, además, se puede obtener una mejor adaptación a células BHK-21, realizando pasajes del virus en este sistema. Sin embargo, pierde la inmunogenicidad ya que el virus pasado más de seis veces por células BHK-21 es menos inmunogénico que en los primeros pasajes (110).

#### I.2.1.6.- Ensayos para determinar la atenuación de patogenicidad para bovinos (9)

El virus se titula en el epitelio de la lengua y se hace una estimación de la dilución que produce lesiones en el 50% de los luga-

res inoculados, existiendo una gran correlación entre este dato y la determinación de la dosis letal 50% (DL50) en ratón para las cepas de campo.

Para detectar la gradual atenuación de la patogenicidad viral de la cepa modificada, la misma se titula periódicamente en novillos. A medida que el virus se va modificando, las DI50 m requeridas para producir lesiones vesiculares van aumentando.

En un determinado número de pasajes se llega a un estado en el cual un grupo de animales inoculados en la lengua con  $10^6$  DI50 m no desarrollan lesiones. En esta etapa la inocuidad e inmunogenicidad del virus es determinada empleando otras rutas de inoculación. Se analizan dosis 10 veces mayores que la inocua, por inoculación intradermolingual. Además, se debe determinar que por ninguna de las rutas de inoculación usuales (intramuscular, subcutánea, intracutánea, intranasal) se logre una infectividad mayor que cuando la inoculación se efectúa en el epitelio lingual.

Cuando se van realizando los ensayos de inocuidad para el ganado, la cepa es titulada simultáneamente en ratones lactantes y en el epitelio de la lengua del bovino. Las mismas series de diluciones son inoculadas en cobayos por inoculación intradérmica en la almohadilla de la pata.

Estos datos comparativos en animales pequeños (cobayos, ratones), se realizan para obtener información que resulte mas económica que con ganado. En ratones adultos, se puede determinar el poder inmunizante realizando ensayos de seroneutralización.

#### I.2.2.- Marcadores genéticos de atenuación

Durante años se llevó a cabo la búsqueda de marcadores genéticos con la esperanza de hallar y seleccionar características que fueran útiles para separar virus atenuados de virulentos.

Wittman y Ahl (219) clasificaron los marcadores genéticos del virus aftoso en tres grupos:

- Marcadores de virulencia;
- Marcadores de multiplicación;
- Marcadores de resistencia.



Los marcadores de virulencia son específicos de la especie animal. Dichos marcadores se modifican durante el proceso de atenuación, pasando del estado virulento al avirulento. La duración del proceso de atenuación depende de la cepa y del tipo de virus.

Los marcadores de multiplicación y de resistencia que pudieron ser determinados para los virus aftosos atenuados son, asimismo, señales del proceso de atenuación. La categoría, número y momento de aparición de tales marcadores parece que depende, en primer lugar, de la cepa. Estos marcadores no permiten establecer una conclusión segura en cuanto al grado de virulencia, pero son muy útiles para caracterizar la cepa atenuada.

Los más importantes marcadores de resistencia son la facilidad para multiplicar a altas y bajas temperaturas, resistencia a inactivación para cortos períodos a temperaturas entre 50-56°C, resistencia a la inactivación al pH entre 6,0 y 6,5. Otros factores son las características del efecto citopático observado a altas y bajas temperaturas, el tamaño de placa, patogenicidad para diferentes animales de laboratorio, efecto del calor en presencia de iones, etc.

Teniendo en cuenta las diferentes fuentes de virus atenuados tanto como la variación en la cepa original de la cual han derivado, es poco probable que haya concordancia en los marcadores. Sin embargo, es de particular interés que con cepas de cultivos -llamadas cepas frías (cs)- pasadas a bajas temperaturas, se ha encontrado correlación en algunos marcadores característicos, tanto como pérdida de la resistencia a la inactivación a 50-56°C (por períodos cortos) como resistencia a pH 6,0 por diez minutos (21).

#### I.2.2.1.- Infecciosidad para cultivos de origen bovino. Tamaño y morfología de placas

Empleando cepas de virus aftoso modificado en ratón y embrión de pollo Sellers (180) observó que, mientras el virus del ganado multiplicaba bien y producía efecto citopático en cultivos de cerdo, cordero, ternero y buey, las cepas modificadas no multiplicaban de igual modo y, por lo tanto, se podría correlacionar atenuación con permisividad celular. Resultados similares se han obtenido con vi

rus modificado en embrión de pollo O<sub>1</sub> Campos, C<sub>3</sub> Resende y A<sub>24</sub> Cruzeiro (79,50).

Goldsmith (77) determinó la cantidad de virus atenuado requerido para producir efecto citopático. Observó que la cantidad de virus SAT<sub>1</sub> atenuado necesario para iniciar la multiplicación en células de RFB es cuatro logaritmos mayor que la requerida para el virus salvaje.

Por otra parte, se ha correlacionado la virulencia con el tamaño de placa producido (19,49-50,77). En general, las cepas virulentas producen placas mas grandes que las atenuadas. El virus reactor (recuperado de animales vacunados) generalmente produce placas mas grandes que el virus atenuado y el de campo.

#### I.2.2.2.- Efecto de diferentes compuestos sobre la multiplicación del virus aftoso

Estudios realizados con cepas atenuadas de poliovirus demostraron que éstas tenían inhibida su multiplicación en presencia de sulfatos polisacáridicos. Teniendo en cuenta este comportamiento, se analizó el efecto de estos polisacáridos sobre la multiplicación y formación de placas de cepas virulentas y no virulentas del virus aftoso.

Cepas de virus C Detwold y O<sub>3</sub> Venezuela modificadas por pasajes en cultivos de riñón bovino, fueron inhibidas en su multiplicación por la presencia de dextrán-sulfato (15). En cambio, no resultaron afectadas por este tratamiento las cepas de virus tipo A y O Vallecé y C Waldmann, modificadas en embrión de pollo. Si fueron inhibidas por acción de DEAE-dextrano.

#### I.2.2.3.- Inactivación por acción de la temperatura y el pH

Gomez y Crandell (79) estudiaron la temperatura mínimo de crecimiento y la inactivación por temperatura y pH de tres cepas de virus O<sub>1</sub> Campos, C<sub>3</sub> Resende y A<sub>24</sub> Cruzeiro. Los virus atenuado y reactor de las cepas O<sub>1</sub> Campos y C<sub>3</sub> Resende fueron mas resistentes a la inactivación térmica (56°C) y a la acidez (pH 6,4) que el virus virulento. Además, a 30°C la capacidad reproductiva del virus atenuado y reactor era 100 veces mayor que en la cepa virulenta.

En cambio, en la cepa  $\Lambda_{24}$  Cruzeiro el virus salvaje era mas resistente a la inactivación térmica que los virus atenuado y reactor (79,50). Por otra parte, con los virus  $\Lambda_4$  Western Germany, C Detwold y  $O_3$  Venezuela modificados en cultivos de riñón bovino, los virus salvajes fueron mas resistentes a la inactivación térmica y a la acidez que los virus atenuados (15). De lo anteriormente expuesto se deduce que cada parámetro en consideración debe estar referido específicamente a una cepa.

#### I.2.2.4.- Producción de interferón

La producción de interferón por el virus de la fiebre aftosa fue demostrado por Dinter y Philipson (62). En cultivos de células de tiroides de bovinos, cepas de virus modificado por diferentes métodos, fueron menos citopatogénicas y producían mas interferón que las cepas virulentas de la cual derivaban (182).

Sellers (176,178) trabajando con virus O y A avianizados observó que estos virus atenuados producían mas interferón y eran mas sensibles a la acción de éste que los virus salvajes. Sugirió que la población atenuada estaba compuesta por 1-5% de virus competente capaz de iniciar multiplicación y producción de virus. El otro 95-99% no competente entraba a la célula induciendo un estado de resistencia y la producción de interferón que, por supuesto, inhibía la replicación del virus competente.

Se quizá determinar si se podía correlacionar inocuidad para el ganado con el incremento de la producción de interferón y la disminución de la citopatogenicidad en cultivos de células de tiroides de bovino. Para ello se seleccionó una cepa modificada por pasajes en células BHK-21. Los resultados obtenidos fueron positivos, indicando que dicha correlación podía ser usada como marcador de inocuidad (183).

#### I.2.3.- Factores positivos y de riesgo en el uso de virus modificados

##### I.2.3.1.- Ventajas

La aplicación en gran escala de virus modificados para vacunas en varias partes del mundo demostró que podía ser un arma mas a utilizar en la lucha contra la fiebre aftosa, aplicada ya sea en forma

independiente o en combinación con vacunas inactivadas, en bovinos.

La utilización de este tipo de cepas vacunales en Medio Oriente, Africa y América del Sur mostró su eficacia dentro de los focos activos, ya que se logró detener la enfermedad o interferir en la propagación de la misma. Algunas vacunas de virus modificado han mostrado su capacidad de inmunizar a los bovinos aún contra otros subtipos heterólogos, como el del virus  $A_{24}$  Cruzeiro que protegió frente a tres subtipos diferentes:  $A_{18}$ ,  $A_{19}$  y  $A_{27}$  (138).

La revacunación produce una mejor inmunidad de acción mas prolongada, la cual puede llegar a durar cerca de un año frente a virus homólogos. Por otra parte, la aplicación de vacunas polivalentes no parece aumentar la patogenicidad ni interferir en la producción de anticuerpos (138).

Como conclusión de lo anteriormente expuesto puede decirse que, entre las ventajas que puede proporcionar la utilización de virus modificado para vacunas, se halla la estimulación de una inmunidad mas duradera y la protección contra un espectro antigénico amplio.

#### I.2.3.2.- Desventajas

Los principales problemas que se han podido registrar en el empleo de vacunas a virus vivo modificado se refieren al tiempo necesario para proceder a la modificación del virus y a la presencia de cierto grado de patogenicidad. Si bien la modificación mediante pasajes en cultivos de células como BHK-21 y la selección de clonas acortaba el tiempo necesario para obtener cepas atenuadas, las mismas presentaban una disminución de la inmunogenicidad, necesitándose grandes masas virales para obtener protección en el bovino.

Un problema no superado por cualquiera de estos métodos es la disminución de patogenicidad para, porcinos.

Si bien Palacios (138) menciona que no existen pruebas para atribuir a las vacunas modificadas brotes de fiebre aftosa en bovinos, considera que se debe estudiar el problema de los portadores y la supervivencia de los virus modificados en los tejidos del animal, como así también cada una de las cepas individualmente, pues al parecer muestran un comportamiento diferente.

La falta de conocimiento acerca de la supervivencia del virus vivo modificado de la fiebre aftosa en bovinos vacunados representó un obstáculo a la aplicación práctica de vacunas de este tipo por los países exportadores de carnes. Los países importadores adoptaron medidas restrictivas al comercio de carnes con aquéllos que emplean vacunas con virus vivo modificados, en virtud del peligro de contaminación que podría derivarse de una posible infecciosidad residual del virus (131).

Por lo tanto, fue necesario determinar el tiempo que sobrevivía en los tejidos el virus modificado a fin de evaluar los riesgos inherentes al comercio internacional de carnes de animales vacunados con dichos virus.

En el empleo de vacunas con virus vivos modificados es importante saber si la inmunogenicidad es debida a la multiplicación del virus en el animal inoculado o es el resultado de la introducción de una masa antigénica grande. Con tal motivo, se realizaron varios estudios para determinar si el virus multiplicaba en el ganado y, además, conocer su distribución y persistencia en el animal. Se pudo recuperar virus de ganado inoculado con la cepa aftosa modificada A Kemron (76).

Augé de Nello y col. (6) realizaron ensayos de aislamientos del virus aftoso modificado en órganos, tejidos y material esofágico-faríngeo de bovinos vacunados o revacunados y bovinos en convivencia. Emplearon cepas avianizadas  $O_1$  Campos y  $A_{24}$  Cruzeiro y una cepa lapinizada  $C_3$  Resende. De bovinos vacunados con una vacuna bivalente, constituida por una cepa modificada y otra lapinizada, se aisló el virus lapinizado de muestras de coágulos sanguíneos, médula ósea, piel, páncreas, riñón y amígdalas, detectándose hasta 62 días post-vacunación.

En el curso de los 180 días post-vacunación (en los cuales se realizó el ensayo) se consiguió aislar virus lapinizado de muestras de material esofágico-faríngeo de bovinos vacunados y no vacunados mantenidos en convivencia. El hecho de haber aislado virus también en los bovinos en convivencia demostró que los animales vacunados eliminaban virus. Estas observaciones fueron diferentes a las de Van Bekkum y col. que trabajaron con el virus salvaje (205).

Aparentemente, los virus vivos modificados presentaron características diferentes entre sí en cuanto a la supervivencia de los mismos en bovinos. La supervivencia del virus C lapinizado sugirió que podría estar relacionado con el tipo de virus o con el sistema empleado para modificarlo.

### 1.3.- INTERFERENCIA

Cuando una célula es infectada por viriones de diversos tipos, cada uno puede multiplicarse sin perturbaciones, salvo por la posible recombinación o mezcla de fenotipos. Sin embargo, en ciertas condiciones, la multiplicación de un tipo de virus puede inhibirse en una proporción variable por la presencia de otro en la misma célula. Esta inhibición se denomina interferencia vírica.

El estudio de la interferencia con los virus animales experimentó un cambio importante cuando Isaacs y Lindenmann en 1957 (100) descubrieron que la interferencia también puede ser mediada por una sustancia producida por células infectadas con virus: el interferón.

En base a lo anteriormente expuesto se pueden definir dos tipos de interferencia:

Interferencia extrínseca: Mediada por una proteína extrínseca, detectable bajo condiciones que favorecen resistencia a un amplio espectro de virus y que es característica de la interferencia inducida por interferón.

Interferencia intrínseca: Definida como un estado de resistencia celular a la infección con un segundo virus y que es inducido por el genoma del primero pero que coexiste con un estado de susceptibilidad a un amplio espectro de otros virus (113).

#### I.3.1.- Interferencia extrínseca. Interferón

##### I.3.1.1.- Características generales

El interferón fue descrito por primera vez en 1957 (100). Se descubrió que el tratamiento de células de membrana corioalantoidea sin infectar con el medio de células infectadas con el virus de la gripe (inactivado por radiación ultravioleta), inducía un estado antiviral. Estos sobrenadantes, aunque estaban libres de partículas víricas, inhibían la multiplicación del virus de la gripe. Se demostró que el inhibidor era una sustancia soluble producida en

la mayoría de las células infectadas con virus animales, ya fueran virus a ADN o ARN. A estas sustancias se las denominó interferones.

Los interferones que proceden de diferentes fuentes están constituidos por pequeñas proteínas que son estables a pH ácido y moderadamente resistentes al calor. Los interferones no tienen especificidad celular. Los interferones producidos en distintas especies después de la infección con un mismo tipo de virus difieren tanto en su especificidad antigénica como en su peso molecular.

Los diferentes interferones son distinguibles acorde a los tipos de células de las cuales se origina, a la especie, las condiciones de inducción y a la estabilidad de las proteínas. Hay fibroblásticos, leucocíticos e inmunointerferón. El inmunointerferón es producido solamente por células del sistema inmune y en respuesta a mitógenos o antígenos (189). Cada interferón está caracterizado por su propio rango de especies, teniendo su máxima potencia en las células de la especie en la cual se originó. El interferón humano producido en leucocitos es activo en células de mono y en células de bovinos, mientras que el interferón humano producido en fibroblastos es sólo activo en células humanas (81). El rango de especies está presumiblemente determinado por la presencia de receptores celulares (81).

#### I.3.1.2.- Producción de interferón

Es importante observar que el estado antiviral una vez establecido por el interferón puede ser transmitido de una célula a otra por una ruta independiente del interferón. Esto estaría indicando cómo el efecto protector podría rápidamente extenderse a través de un órgano (81).

Tanto la producción de interferón como la aparición de resistencia vírica dependen, al parecer, de la interacción entre tres genes celulares. De las tres proteínas codificadas por estos genes, sólo el interferón existe con seguridad, la presencia de las otras dos ha sido inferida.



Las características más importantes de este mecanismo son (57):

- 1° - El interferón actúa tanto en la célula en que es producido como sobre las células expuestas a él;
- 2° - La acción antiviral no se debe directamente al interferón sino a la proteína antivírica producida por acción del mismo;
- 3° - Tanto la producción de interferón como su actividad antiviral requieren la expresión de genes celulares, por lo que son bloqueados por inhibidores de la transcripción o traducción;
- 4° - El nivel de producción de interferón depende del equilibrio entre la inducción por acción del inductor y la represión autoinducida;
- 5° - Existe una producción constante de interferón en ausencia del inductor cuya presencia aumenta la producción, desplazando el equilibrio entre inducción y represión.

El interferón es producido por las células infectadas con viriones completos infecciosos o inactivados. En general, los virus que se multiplican muy rápidamente y causan alteraciones precoces de las células son productores pobres de interferón, mientras que los que se multiplican muy lentamente y no lesionan las células producen grandes cantidades del mismo. Si bien la totalidad de las células animales son capaces de producir interferón, las células de la médula ósea, del bazo y los macrófagos parecen tener un papel especial.

#### I.3.1.3.- Inducción y regulación

Luego del hallazgo original de la inducción de interferón por una infección viral, un amplio rango de sustancias que incluyen polímeros, moléculas pequeñas, bacterias inmunogénicas y mitógenos, se han encontrado activos en la inducción de interferón (81). Los ARN de doble cadena y ciertos polinucleótidos sintéticos son capaces de inducir producción de interferón en numerosas especies animales.

La actividad se centra en poliribonucleótidos que poseen un contenido helicoidal elevado, como ser polímeros sintéticos de cadena formada por ácido poliriboinosínico y ácido poliribocitidílico (po

li(I:C)). También resultan efectivos los polímeros sintéticos de cadena simple. Los híbridos ADN-ARN resultan inactivos al igual que los desoxiribonucleótidos.

También los ARN que contienen fragmentos de doble cadena durante la replicación de los ARN víricos (complejos replicativos) pueden ser inductores del interferón (81). En el caso de virus a ADN el inductor sería un ARN de doble cadena producido por la superposición de la transcripción.

Como resultado del reconocimiento del ARN de doble cadena, que es un producto viral característico, la célula sintetiza interferón como un mecanismo de defensa frente a los virus. En las células infectadas por virus a ARN la actinomicina D impide la expresión de los genes celulares pero no de los virales. Cuando se la agrega a las células antes de la infección, inhibe la formación de interferón con lo cual se demuestra que la producción de esta proteína depende de la síntesis de nuevo ARN mensajero celular. Por consiguiente, el virus parece inducir la activación de un gen celular. La presencia de un mRNA específico para interferón ha sido demostrado en ensayos usando una cadena de ácido poliriboinosínico y una cadena de ácido poliribocitidílico (poli(I:C)) en células de ratón.

La regulación de la síntesis del interferón se lleva a cabo mediante un represor producido como consecuencia de la acción del mismo, ya que la síntesis de interferón puede ser inhibida por la adición de interferón exógeno.

#### I.3.1.4.- Producción de interferón en infecciones con virus aftoso

La presencia de un factor que interfería en la distribución y replicación del virus aftoso fue citado por Dinter en 1960 (60). Este factor debería estar presente en el sobrenadante de células de riñón bovino infectadas con el virus. Su efecto inhibitorio sería, probablemente, responsable de la resistencia de la célula en cultivos persistentemente infectados con virus aftoso.

En 1962, Dinter y Philipson (62) demostraron la producción de interferón por virus aftoso en células de riñón bovino y estudiaron la multiplicación viral y síntesis de interferón en cultivos per-

sistentemente infectados. Sellers en 1963 informa la producción de interferón en cultivos de epitelio lingual bovino infectados (176). El mismo autor en 1965 (178), individualizando el comportamiento de cepas atenuadas de virus aftoso en cultivos de tejidos, encuentra que los virus atenuados multiplican con bajos títulos y producen más interferón que el correspondiente a la cepa virulenta. Además, estas cepas eran más sensibles a la acción del interferón que la cepa virulenta.

### I.3.2.- Interferencia intrínseca

#### I.3.2.1.- Introducción

Teniendo en cuenta que los métodos de detección de interferón pueden ser poco sensibles, no se puede excluir su participación en un caso de interferencia. Sin embargo, si la interferencia se establece precozmente en el ciclo de infección, la participación del interferón puede considerarse improbable.

En estos casos, nos encontramos con un tipo de interferencia específicamente mediada por virus que se ha llamado interferencia intrínseca. Este tipo de interferencia se considera que está bastante distribuida en la naturaleza y que involucraría varias clases de virus no relacionados, no citopáticos y, probablemente, algunos tipos virulentos. Esta interferencia tendría ciertas características tales como:

- 1) Sería una propiedad intrínseca de la célula infectada con virus que no se hace extensible a la célula no infectada;
- 2) Es inducida bajo condiciones en que está totalmente descartada la interferencia mediada por interferón;
- 3) Sería llevada a cabo por una proteína codificada por el genoma del virus inductor;
- 4) La velocidad de inducción del estado interferente estaría en función de la multiplicidad de infección del virus inductor;
- 5) Se requiere la presencia de virus activo;
- 6) Es insensible a la presencia de actinomicina D; y
- 7) Se requiere síntesis proteica dado que es inhibida en presencia de puromicina.

Se puede considerar la presencia de dos tipos de interferencia viral: la interferencia heteróloga (entre virus no relacionados) y la interferencia homóloga.

#### I.3.2.2.- Interferencia heteróloga

Los mecanismos de interferencia heteróloga varían según los sistemas, como se puede ver en los siguientes ejemplos:

- a) El virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) resulta incapaz de multiplicarse en células que hayan sido infectadas previamente por otros virus a ARN (113). Varios virus pueden inducir un estado refractario para el NDV tales como el virus de Rubella, Sindbis, Poliovirus. Si bien el virus NDV se adsorbe a las células y penetra en condiciones normales, no puede replicarse. Probablemente, existiría una proteína codificada por el genoma del virus inductor, que actuaría bloqueando la traducción del ARN del NDV.
- b) El virus de la influenza porcina (SW) es inhibido por el virus de la plaga de las gallinas (FPV) al nivel de síntesis de ARN cuando las células huéspedes son infectadas con ambos virus a altas multiplicidades de infección. El efecto es altamente inhibido cuando las células son infectadas con el virus FPV una a dos horas después de la infección con SW o bien cuando se utiliza baja multiplicidad de FPV (161).
- c) El virus de la estomatitis vesicular (VSV) y el ortomixovirus pueden ser inhibidos al nivel de síntesis de ARN. La inhibición de la multiplicación del VSV por el FPV presenta las siguientes características: 1) no es interferencia a nivel de adsorción; 2) la síntesis de todos los componentes del FPV está afectada si el virus interferente está presente en las etapas iniciales de la replicación del FPV; 3) competencia de la ARN polimerasa del virus interferente con templado heterólogo se descarta por ensayos realizados "in vitro" con la ARN polimerasas de VSV y FPV.

Una explicación alternativa podría ser que la interferencia ocurre a nivel de traducción del mRNA viral (160). Antecedentes al respecto se han dado para otros virus en donde se encontró que

la exclusión del fago M12 por el T4 en *Escherichia coli* es debida a inhibición de la traducción del ARN de M12 en los polisomas (90) o bien que la infección con poliovirus inhibe la traducción del ARN del virus herpes simplex (170).

### I.3.2.3.- Interferencia homóloga

#### a) Introducción

En casos en que dos cepas distintas de un mismo virus infecten una misma célula, dichos virus deben competir por los mismos precursores y los mismos receptores celulares. De ahí que la multiplicación de uno de ellos se halla a menudo disminuída. Este efecto es mayor si uno de los virus presenta cierta ventaja en relación al tiempo y a la multiplicidad de infección.

Este tipo de interferencia se produce en el caso del virus NDV en el momento de la adsorción, como resultado de la destrucción de receptores celulares específicos. En el caso de los leucovirus, la interferencia se produce en el momento de la penetración mientras que en otros se produce durante la replicación.

#### b) Interferencia durante la replicación

Se han citado numerosos casos de interferencia de este tipo, ya sea inducida por mutantes de temperatura o por virus atenuados. El virus de Semliki-Forest, tipo salvaje, tiene interferida su replicación por una mutante temperatura sensible,  $ts_{11}$ , en condiciones de restricción de temperatura (39°C). Esta mutante es incapaz de inducir la síntesis de ARN viral y, por consiguiente, síntesis de proteínas a la temperatura de restricción. Se supone que esta mutante tiene un defecto de síntesis o función de la ARN polimerasa. La mutante induce una inhibición en la síntesis de ARN dando como resultado una disminución en la producción de virus infeccioso. Se sugiere que la interferencia estaría causada por un componente estructural -ARN o proteína- del virión  $ts_{11}$  que inhibiría la acción de la ARN polimerasa (102).

Una cepa de poliovirus tipo 1, incapaz de producir virus infeccioso a 39,5°C, puede suprimir la producción de otra cepa de poliovirus tipo 1 capaz de reproducirse a dicha temperatura. Con relaciones

constantes de virus interferente a virus superinfectante, se mantiene un grado constante de interferencia. Con una dosis constante de virus interferente la interferencia es menor a medida que aumenta la dosis del virus superinfectante. Hasta un intervalo de una hora post-infección con el virus interferente, la interferencia puede revertirse con dosis altas del segundo virus. Dado que la interferencia no esta afectada por la presencia de guanidina, es de suponer que el evento ocurre antes de la síntesis de ARN del virus interferente (145).

En el virus aftoso se han encontrado casos de interferencia viral empleando cepas modificadas para bovinos. Estos virus pueden inhibir la multiplicación y la citopatogenicidad de cepas virulentas en cultivos de tejidos de bovinos pero en los animales sólo inhiben el desarrollo de lesiones en la lengua producidas por el virus virulento (181). Dinter, en 1958, describió interferencia entre cepas virulentas de alto y bajo grado de patogenicidad (59).

También se ha inducido interferencia viral por una mutante temperatura sensible del virus aftoso en células de riñón bovino. La infección de células de riñón bovino con la mutante ts a la temperatura no permisiva de 38,5°C inhibe el crecimiento y la síntesis del ARN del virus salvaje superinfectante (148).

### c) Interferencia por partículas defectivas

Las partículas DI fueron descubiertas por Von Magnus (1947) usando el sistema del virus de influenza. Las llamó partículas incompletas o inmaduras. Posteriormente, fueron descubiertas para otros sistemas virales.

Posiblemente el sistema viral mejor estudiado sea el del VSV dado que sus partículas defectivas son mas cortas que el virus que las origina y, por lo tanto, pueden ser purificadas con facilidad en gradientes de sacarosa (98).

Las partículas DI constituyen una clase de mutantes de delección de los virus animales que tienen un número de propiedades en común tales como: 1) incapacidad de propagarse en ausencia de un virus "helper" (defectividad); 2) capacidad de ser complementadas por vi

rus "helper" y multiplicarse en su presencia, disminuyendo la producción del virus tipo salvaje (interferencia); 3) habilidad de incrementar su proporción en células coinfectadas con el virus salvaje (enriquecimiento) (94,98).

Para distinguir las partículas DI del virus que les dio origen Huang y Baltimore en 1970 (97) denominaron al virus parental virus estandar. Además, postularon que las partículas DI jugaban un papel significativo en las enfermedades virales agudas y persistentes. Dentro del grupo de los picornavirus, se han detectado partículas DI en poliovirus (41-43) cuyo defecto es la disminución del ARN en un 15% respecto al virus estandar.

El análisis de la traducción de ARN de partículas DI "in vitro" indicó que el tamaño máximo del producto formado es un 15% menor que el máximo producto sintetizado bajo la dirección del ARN del poliovirus estandar. Este tipo de partículas DI reunía las siguientes características:

- 1.- Bandeaban a menor densidad que el virus estandar en gradientes de cloruro de cesio;
- 2.- El ARN-DI es un 13-18% menor que el ARN estandar;
- 3.- La delección corresponde a la región del genoma que codifica para las proteínas estructurales;
- 4.- Las partículas DI interfieren con la replicación del virus estandar -aparentemente- por competición por el huésped o por productos virales;
- 5.- Las partículas DI solas pueden realizar todas las funciones virales, menos la síntesis de proteínas de la cápside.

En los últimos años se ha citado la presencia de partículas DI de poliovirus con delecciones de menor tamaño que, por supuesto, no pueden ser separadas del virus estandar por gradientes de cloruro de cesio. Empleando geles de agarosa y ARN desnaturizados con glioxal, se han podido identificar delecciones pequeñas (4-6%) en el genoma de partículas virales (116).

Durante varios años los rasgos característicos de la interferencia mediada por partículas DI fue esquematizado usando al VSV como sig

tema prototipo para estudio. Estas características son aplicables a otros sistemas virales y pueden resumirse del siguiente modo:

- i - La interferencia ocurre intracelularmente y no en la superficie celular.
- ii - Es específica y homotípica, es decir, que la interferencia ocurre en primer lugar contra el virus estandar del cual la partícula DI ha derivado, con virus cercanamente relacionados ocurre en menor grado mientras que con virus no relacionados no sucede.
- iii - Este fenómeno puede existir independientemente de la interferencia mediada por interferón (95).

El paso crítico durante la multiplicación del VSV, poliovirus, Sindbis, SV<sub>40</sub> afectado por las DI es el momento de la replicación viral. Dado que estos virus tienen diferentes estrategias para replicar sus ácidos nucleicos, los detalles moleculares de la interferencia por partículas DI varían para cada grupo individualmente (95).



## II.- MATERIALES Y METODOS

### II.1.- CELULAS

Se utilizaron células BHK-21, clon 13 (190) provistas por el Centro Panamericano de Zoonosis, pcia. de Buenos Aires, y células de RFB cedidas por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Castelar, pcia. de Buenos Aires.

Ambos tipos de células fueron propagadas en monocapa (124) o en cultivos en suspensión (38) con medio mínimo esencial Eagle (MEM) suplementado con 10% de triptosa fosfato y 10% de suero de ternera (todos obtenidos de Gibco, Laboratories Grand Island, USA).

Las células RFB fueron utilizadas como cultivos primarios y hasta el tercer subcultivo inclusive. Cuando dichas células eran empleadas para ensayos en suspensión, se tripsinaban y resuspendían en MEM con suero, dejándolas en agitación varias horas antes de su uso.

En condiciones de infección viral, las monocapas de células o los precipitados de células en suspensión, fueron lavados con solución salina PBS (0,13 M NaCl, 0,005 M KCl, 0,006 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,001 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) pH 7,4 para eliminar todo resto de suero y durante el tiempo de infección viral se utilizaron los medios anteriormente mencionados, sin el agregado del 10% de suero.

En ensayos en los cuales era necesario agregar radioisótopos, se utilizaron medios especiales de infección, tales como medio sin leucina (MEM-Leu<sup>-</sup>), sin metionina (MEM-Met<sup>-</sup>), etc.

### II.2.- VIRUS

Fue utilizada la cepa de virus aftoso A<sub>24</sub> Cruzeiro, extraída de epitelio lingual bovino con menos de seis pasajes por células BHK-21 y la misma cepa atenuada para bovinos por 101 pasajes por embrión de pollo (124). Además, se utilizaron cepas salvajes y atenuadas correspondientes a los subtipos O<sub>1</sub> y C<sub>3</sub>. Tanto las cepas atenuadas como las salvajes que les dieron origen fueron gentilmente cedi-

das por el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, Rio de Janeiro, Brasil (16-50). El enterovirus bovino utilizado en estas experiencias (106) fue obtenido del cepario del Departamento de Virología, INTA, Castelar, pcia. de Buenos Aires.

Los stocks de virus fueron producidos por multiplicación en células BHK-21 y conservados a  $-70^{\circ}\text{C}$  o en ampollas en nitrógeno líquido.

### II.3.- PROCEDIMIENTO DE CLONADO DE VIRUS (146)

Se prepararon monocapas de células BHK-21 en frascos planos de  $60\text{ cm}^3$  (monocapa confluyente de  $3,5 \times 10^6$  células aproximadamente) incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$ . Luego de volcar el medio de crecimiento, se lavaron las monocapas con MEM sin suero, retirándose por succión el exceso de líquido. Las diluciones de virus a utilizar fueron preparadas en medio estéril. Se plaquearon 0,2 ml de cada dilución viral dejando como control frascos inoculados con 0,2 ml de medio sin virus.

Luego de un período de adsorción de 45 min a  $37^{\circ}\text{C}$ , se retiró el líquido por succión, agregando por frasco 5 ml de la siguiente mezcla: un volumen de 1,8% de bactoagar en agua estéril y un volumen de MEM 2x suplementado con antibiótico y caldo triptosa fosfato. Una vez gelificada la solución agarizada, se pusieron los frascos en incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  hasta que las placas fueran visibles. El revelado de las mismas se realizó con 1 ml de solución de rojo neutro (0,02% concentración final) por frasco e incubando durante 1 a 3 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  en la oscuridad.

Las clonas que se seleccionaron fueron extraídas con pipeta Pasteur de punta curva y sembradas en tubos con monocapas de células BHK-21 para su enriquecimiento. Este procedimiento de clonado se realizó tres veces consecutivas para asegurar la homogeneidad de la población viral. Se registró el tamaño y morfología de las clonas aisladas.

## II.4.- TITULACION DE LOS VIRUS

La determinación de los títulos virales se realizó empleando tres métodos:

### II.4.1.- Método de titulación en placa (64)

Hallando las unidades formadoras de placas por mililitro (UFP/ml). Para ello se prepararon monocapas de células BHK-21 crecidas en frascos planos de 60 cm<sup>3</sup> incubadas a 37°C. Cuando las monocapas estuvieron confluentes (24 a 48 horas después de ser sembradas), fueron infectadas con 0,2 ml de las diluciones virales correspondientes, siguiendo el procedimiento indicado para el clonado de virus. Luego de un período de adsorción de 45 min a 37°C se removió el líquido por succión. Se agregaron 5 ml por frasco de la mezcla agariada ya descrita y una vez gelificada la misma, se incubaron los frascos a 37°C hasta que las placas fueran visibles.

De cada dilución viral se hicieron triplicados o cuadruplicados. Se revelaron algunas placas a las 24 y 48 horas post-infección para observar el desarrollo de la infección. A las 72 horas se revelaron todas las placas fijandolas con una solución de formaldehído al 10% y luego tñiéndolo con una solución al 1% de fucsina básica fenicada.

### II.4.2.- Método de dilución al punto final

Se determinaron las dosis infecciosas cultivo de tejido 50% (DICT50). Para ello se prepararon placas de plástico de 96 orificios en las cuales crecieron monocapas de células BHK-21 y/o células de RFB. De estas últimas se emplearon cultivos primarios, primer subcultivo o tercer subcultivo. Las células fueron utilizadas a las 48 horas de ser sembradas con MEM completo, tal como se indicó en II.1.. La incubación se llevó a cabo a 37°C y en atmósfera de 3% de anhídrido carbónico. Las infecciones se hicieron con 0,1 ml de dilución viral.

Los medios de infección utilizados fueron MEM con 10% de caldo triptosa fosfato, gentamicina 50 ug/ml, buffer HEPES 0,025 M pH 7,4 (ácido N-2-hidroxietil piperazina-N'-2-etanosulfónico, Sigma Chemi-

cal Co.) y Tris 0,01 M pH 7,4 (Trizma Base, Sigma Chemical Co.).

El efecto citopático fue controlado diariamente y los datos finales fueron los registrados a las 72 horas post-infección, haciéndose la cuantificación por el método de Reed y Muench (154).

#### II.4.3.- Titulación en ratón lactante

Se utilizaron ratones de 4-6 días, cepa C F<sub>1</sub>, para estimar la patogenicidad de la población viral en estudio. Se inocularon con 0,05 ml de dilución viral por vía intraperitoneal seis ratones lactantes por dilución.

Los ratones fueron controlados diariamente para determinar alguna alteración que fuese originada por la acción del virus hasta producirse la muerte del animal. Los datos obtenidos a los siete días post-infección se consideraron definitivos. Se determinó la dosis letal 50% en ratón lactante (DL50) cuantificando por el método de Reed y Muench (154).

#### II.5.- FIJACION DE COMPLEMENTO 50% (2)

Los ratones lactantes que murieron por la acción del virus aftoso fueron procesados macerando sus tejidos. El macerado se inactivó a 56°C durante 30 min al cabo de los cuales se centrifugó separando el sobrenadante viral efectuándose la tipificación del mismo. El antígeno viral se enfrentó a sueros hiperinmunes de cobayos (previamente titulados y diluidos) tipo O, A y C, siguiendo las indicaciones de la técnica (2).

Una vez tipificado el virus se realizó la subtificación. Para lo cual se hicieron diluciones de virus que se enfrentaron a los diferentes sueros hiperinmunes de cobayos (de las cepas correspondientes al tipo viral) Por ejemplo, el tipo A se subtifica frente a A<sub>24</sub>, A<sub>81</sub>, A<sub>79</sub>, etc. Se siguieron las mismas condiciones que para la tipificación.

## II.6.- INMUNOFLORESCENCIA

Monocapas de RFB cultivadas en tubos con laminillas fueron infectadas con clonas del virus  $A_{24}$  Cruzeiro atenuado. Se examinó diariamente la aparición de efecto citopático. Se seleccionaron las laminillas que luego de 72 a 96 horas post-infección no mostraban CPE, extrayendo el medio de los tubos y lavando las monocapas celulares con medio sin suero. Las laminillas se sacaron de los tubos y se colocaron sobre un soporte, fijándolas en acetona a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 10 min y luego dejando secar al aire.

A continuación, se colocó una gota de dilución (1/5) de suero hiperinmune de bovino contra el  $A_{24}$  Cruzeiro sobre cada laminilla y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 45 min. Se lavaron los preparados con solución salina PBS, tres lavados de 10 min cada uno, en agitación, y se colorearon con antigamaglobulina de bovino marcada con isotiocianato de fluoresceína.

Los preparados fueron incubados a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 45 min en cámara húmeda. Se lavaron tres veces con solución salina PBS y un último lavado con agua destilada. Se montaron con glicerina tamponada 50% y se observaron en microscopio de fluorescencia Ortholux Leitz (39).

## II.7.- INFECCIONES CON PASAJES DILUIDOS Y SIN DILUIR DEL VIRUS ATENUADO (140, 146)

Monocapas de células BHK-21 crecidas en frascos planos, fueron infectadas en condiciones de alta y baja multiplicidad con el virus  $A_{24}$  Cruzeiro atenuado. Las monocapas de BHK-21, luego de ser lavadas con medio sin suero, se infectaron con 1 ml de virus a baja multiplicidad de infección (m.o.i. 0,2) o con 1 ml de virus a alta multiplicidad (m.o.i. 10-20). Luego de 60 min de adsorción, se retiró el inóculo y se lavaron las células con 5 ml de MEM sin suero. Se cosechó el virus al tener CPE. Una alícuota de cada uno de los pasajes se separó para ser titulada. Del resto se tomó una parte para ser usada como inóculo del pasaje siguiente. Así se continuó sucesivamente hasta finalizar el número de pasajes requeridos.

## II.8.- DETERMINACION DEL COEFICIENTE DE SEDIMENTACION Y DENSIDAD DE LOS VIRUS SALVAJE Y ATENUADO

### II.8.1.- Producción de virus radioactivo (80)

Células BHK-21 crecidas en monocapa en frascos rotantes ( $1 \times 10^8$  células aproximadamente) fueron infectadas con virus A<sub>24</sub> Cruzeiro salvaje o atenuado en condiciones de alta multiplicidad. Luego del período de adsorción de 45 min se retiró el inóculo y se agregó MEM sin suero, conteniendo 5 ug/ml de actinomicina D (Grado III, Sigma Chemical Co) y buffer HEPES 0,025 M pH 7,5.

La marcación en ácidos nucleicos se hizo a los 180 min post-infección, agregando 100 uCi de uridina-<sup>3</sup>H (New England Nuclear Co., actividad espec. 37,9 Ci/mmol) por frasco. La incubación continuó hasta observar CPE. Al cabo de la misma el sobrenadante fue clarificado en una ultracentrífuga preparativa Beckman L50, a 14.000 x g durante 15 min a 4°C.

### II.8.2.- Purificación de virus

El virus del sobrenadante clarificado se concentró por ultracentrifugación a 100.000 x g durante 120 min a 4°C. El precipitado viral -siempre mantenido en frío- se resuspendió en buffer NET pH 7,4 (0,05 M Tris-ClH, 0,1 M NaCl, 0,01 M EDTA) y fue tratado con 0,5% de deoxicolato de sodio (DOC) (Fischer Scientific Co.). El virus se purificó por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa en buffer NET 10-30% (p/v) a 100.000 x g durante 180 min a 4°C (69).

Al final de la corrida, se recogieron los gradientes en alícuotas de 0,5 ml, registrando su densidad óptica a 260 nm. Se tomaron alícuotas de 20 ul de cada tubo y se le agregó 5 ml de solución centelladora hidrófluor (2 partes de metilcellosolve y 3 partes de liquid fluor: PPO 0,8 %, POPOP 0,008% y tolueno esp 1 lt.). Las cuentas por minuto presentes en cada alícuota fueron determinadas en un contador de centelleo líquido Hewlett-Packard.

Las fracciones correspondientes al pico de virus se juntaron, manteniéndose a 4° C si eran utilizadas de inmediato o congelándose a -70°C para ser procesadas posteriormente.

### II.8.3.- Determinación de la densidad

Las fracciones del pico viral fueron diluídas en un volumen igual de buffer NET pH 7,4. El virus se concentró por centrifugación a 200.000 x g durante 50 min a 4°C. El precipitado viral se resuspendió en buffer NET pH 7,4 agregándose cloruro de cesio (Carlo Erba) hasta concentración final de 1,42 gr/ml. Los gradientes de cloruro de cesio se centrifugaron durante 16 hs a 144.000 x g a 4°C. (139). Al final de la corrida se recogieron en alícuotas de 0,2 ml (146).

La densidad de las diferentes fracciones fue determinada por refractometría. A cada fracción del gradiente se le agregó 3 ml de ácido tricloroacético (TCA) 8% en presencia de ARN de levaduras para precipitar los ácidos ribonucleicos.

Las fracciones fueron filtradas por filtros Millipore (poro 0,45 u) y lavados con TCA 5% frío. Cada uno de los filtros fue colocado en un vial al que se le agregaron 5 ml de solución centelladora para poder determinar la radioactividad acumulada en un contador de centelleo líquido (69).

### II.9.- OBTENCION DE ACIDO RIBONUCLEICO VIRAL PARA MAPEO DE OLIGONUCLEOTIDOS

#### II.9.1.- Producción de virus

Células BHK-21 crecidas en monocapas en frascos rotantes fueron infectadas con los virus salvaje, atenuado o revertante, a multiplicidades de infección entre 1 y 10. Luego del período de adsorción que fue de 45 min para los virus salvaje y revertante y de 60 min para el virus atenuado, se retiró el inóculo viral. Cada frasco recibió 15 a 20 ml de MEM sin suero conteniendo buffer HEPES pH 7,5 concentración final 0,025 M.

La infección prosiguió hasta observar CPE, controlando el pH de los frascos durante todo el proceso de infección y ajustando el mismo cuando fue necesario con una solución de bicarbonato al 5%.

Este control debió ser muy estricto en el caso de los virus atenuados cuyo tiempo de infección era de aproximadamente 18 horas. En estos casos, para evitar la inactivación o la degradación del virus

circulante antes de observar CPE total, se realizaron varias cosechas.

En todos los casos, al final de la infección los sobrenadantes infecciosos fueron clarificados a 14.000 x g durante 15 min a 4°C.

#### II.9.2.- Purificación de virus

Los sobrenadantes virales clarificados fueron centrifugados a 144.000 x g durante 55 min a 4°C. El precipitado conteniendo el virus se resuspendió en 0,5 ml de buffer NET pH 7,5 tratado con 1% de sarcosil (Sigma Chemical Co.) a 4°C y purificado por ultracentrifugación en gradientes de 5-30% sacarosa en buffer NET pH 7,4 (p/v) durante 75 min a 200.000 x g en rotor Beckman SW40 y a 4°C.

Al final de la corrida se recogieron alícuotas de 0,5 ml de cada gradiente. El pico de virus fue identificado por medida de la absorbancia a 260 nm de las diferentes fracciones. Se juntaron las fracciones correspondientes al pico viral y se congelaron a -70°C.

#### II.9.3.- Preparación de los ARN virales (147)

El pico de virus se diluyó con un volumen de buffer NET pH 7,4. Se añadió 0,5 % de SDS (Sigma Chemical Co.). Para hacer la extracción del ácido ribonucleico se agregó medio volumen de fenol saturado en agua, agitándose en vortex. Luego se añadió medio volumen de cloroformo-alcohol isoamílico 2%, agitándose nuevamente en vortex y dejando en reposo. Al cabo de un minuto la solución se centrifugó a 10.000 x g para una mejor separación de la fase fenólica de la acuosa. Todo el proceso se repitió una segunda vez en las mismas condiciones. Luego de una última extracción con cloroformo-alcohol isoamílico solamente, se retiró la fase acuosa transfiriéndola a un nuevo tubo estéril.

El ARN se precipitó a -20°C durante una noche por el agregado de dos volúmenes de etanol frío y 0,2 M NaCl. Al cabo de este tiempo, el precipitado fue concentrado por ultracentrifugación a 10.000 xg durante 1 hora en frío en centrífuga Sorvall.

El precipitado de ARN se resuspendió en buffer NET pH 7,4 y se purificó por ultracentrifugación en gradientes de 15-30% sacarosa en



buffer NET pH 7,4 (p/v) conteniendo 0,5% de sarcosil a 200.000 xg durante 6 horas a 4°C en un rotor Beckman SW40 (147). Se recogieron alícuotas de 0,45 ml, determinándose la absorbancia a 260 nm de cada una y se juntaron las fracciones conteniendo el pico del ARN viral (37S). Estas fracciones se diluyeron a la mitad con buffer NET pH 7,4 realizando nuevamente las extracciones con fenol-cloroformo, tal como se describió previamente. Luego de la última extracción con cloroformo-alcohol isoamílico, se hizo una extracción con éter. La fase acuosa fue retirada y colocada en otro tubo limpio y estéril. El ARN se precipitó agregando dos volúmenes de etanol y 0,2M de NaCl, dejando toda la noche a -20°C.

El precipitado de ARN se vuelve a concentrar tal como se ha descrito precedentemente y se resuspende en 0,5 ml de solución ET (0,01 M Tris-ClH pH 8,0, 0,01 M EDTA). Se vuelve a precipitar con dos volúmenes de etano y 0,2M NaCl dejando unas horas a -20°C.

#### II.9.4.- Tratamiento enzimático de los ácidos ribonucleicos purificados

El ARN viral precipitado y concentrado se resuspende en 5 ul de buffer ET y es digerido con 8 U/ug de ribonucleasa T<sub>1</sub> (Sankyo, Calbiochem) incubando a 37°C durante 45 min. Para completar la digestión debido a la presencia de estructuras secundarias del ARN, se calentó a 100°C durante 2 min enfriando rápidamente y digiriendo nuevamente con 8 U de RNasa T<sub>1</sub>, completando un segundo ciclo de digestión.

Los oligonucleótidos así obtenidos fueron marcados "in vitro" con ATP-gama 32P (2000-2000 Ci/mmól, New England Nuclear Co) (147) y polinucleótido quinasa (T<sub>4</sub> infected E.coli B. Pl Biochemicals, Inc.) Al cabo de dos horas de incubación a 37°C se agregaron 2 ug de tRNA (Sigma Chemical Co.) extrayendo con fenol para luego precipitar con dos volúmenes de etanol y 0,2M NaCl a -20°C durante 30 min. Los oligonucleótidos marcados fueron separados por electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida.

### II.9.5.- Condiciones de la electroforesis bidimensional (89,214)

#### Primera dimensión:

Se preparó una solución de acrilamida 10% (Eastman Kodak Co.) en buffer 0,025 M ácido cítrico (Mallinckrodt) 6M urea (Merck) pH 3,5. Placas de vidrio de 20 x 40 cm perfectamente limpias con alcohol, se sellaron con sellador (Thomas Lubriscal, A.H. Thomas Co.) y cera. Se agregó la solución conteniendo la acrilamida 10%, y se colocó el peine separador dejando polimerizar a temperatura ambiente por una hora. Luego de este tiempo, se retiró el peine, lavando cuidadosamente los orificios antes de sembrar la muestra.

A la muestra de ARN ya digerida y procesada, se le agregó 4 mg de urea y 10 ul de mezcla de colorantes (xylene cyanol y azul de bromofenol, Sigma Chemical Co.) dejándola lista para usar. Una vez sembrada la muestra, se conectó el polo negativo a la cámara superior y el polo positivo a la inferior, realizándose la corrida a voltaje constante de 400V durante 12 horas.

#### Segunda dimensión:

Una vez corrida la primera dimensión, se retiró la placa de vidrio superior y se hizo autoradiografía para poder ubicar la zona del gel a extraer para la segunda dimensión. La banda del gel de la primera dimensión que se corrió en la segunda tenía unas dimensiones de 1x21 cm. Esta banda se transfirió cuidadosamente a otra placa de vidrio de 24x29 cm, perfectamente limpia.

Se colocó el segundo vidrio sobre el anterior, sellando los bordes como en la primera dimensión. Se agregó la mezcla de gel para la segunda dimensión (Acrilamida 20% en buffer 0,2M Tris-ClH, 0,2M ácido bórico, 0,005 M Edta pH 8,3) dejando polimerizar a temperatura ambiente. La corrida se efectuó a intensidad constante de 30 a 35 mA por gel durante 15 horas a 4°C, hasta que el colorante azul de bromofenol alcanzó una distancia de 18 cm. Ambas dimensiones se autoradiografiaron usando película Kodak X-Omat AR.

## II.10.- ENSAYOS DE INTERFERENCIA

### II.10.1.- Interferencia en células de RFB determinada como disminución del título infeccioso

Se prepararon microplacas de células RFB que fueron incubadas a 37°C en atmósfera de 3% de anhídrido carbónico (CO<sub>2</sub>). A las 48 horas de ser sembradas las células, las monocapas ya confluentes se lavaron con medio sin suero y se infectaron con virus atenuado con dos pasajes por células BHK a baja multiplicidad (moi= 1).

A las 24 horas post-infección se retiró el sobrenadante vírico y las células se superinfectaron con 0,1 ml de diluciones de virus aftoso salvaje, subtipos A<sub>24</sub> y C<sub>3</sub> y con enterovirus bovino (106). Las placas control fueron infectadas solamente con los virus tipo salvaje.

El ensayo se realizó a 37°C en atmósfera de 3% de anhídrido carbónico empleando para las infecciones medio MEM con 10% de caldo triptosa fosfato, gentamicina 50 ug/ml, buffer HEPES 0,025M pH 7,5 y Tris-ClH 0,01M. Se controló diariamente el ECP tanto en las placas control como en las superinfectadas, determinando la inhibición en la producción de los virus por disminución de los títulos infectantes respecto de los controles a las 72 horas p.i..

### II.10.2.- Procedimiento de infección y marcación de ácidos ribonucleicos y proteínas en condiciones de interferencia

Se emplearon células de RFB crecidas en monocapa y llevada a suspensión unas horas antes del ensayo (II.1.-).

Estas células fueron resuspendidas a una concentración de  $5 \times 10^6$  células/ml e infectadas con la cepa salvaje del virus A<sub>24</sub> Cruzeiro a m.o.i. = 1. Luego de 45 min de adsorción, las células se centrifugaron a muy baja velocidad (800 x g) por 2 min a 4°C. El sobrenadante vírico se descartó y las células se resuspendieron en un volumen igual de virus A<sub>24</sub> Cruzeiro atenuado (m.o.i. = 1), dejándose otros 45 min de adsorción. Al cabo de este período, el sobrenadante fue descartado en las mismas condiciones que para la cepa salvaje. En esta etapa, las células se resuspendieron en MEM conteniendo actinomicina D 5 ug/ml y buffer HEPES 0,025 M pH 7,5 (146).

Con el objeto de determinar la interferencia en la síntesis de ácidos ribonucleicos específicos del virus, se agregaron 0,5 uCi/ml de uridina-<sup>14</sup>C (New England Nuclear, Co., actividad específica 53,2 mCi/mmol) a los 110 min post-infección.

Se determinó a distintos intervalos de tiempo la cantidad de radioactividad insoluble en TCA 10% en alícuotas de 50 ul. Cada alícuota así tratada fue filtrada a través de filtros Millipore (poro 0,45 u) registrando la actividad acumulada en un contador de centelleo líquido tal como se describió (80).

Para el análisis de virus y partículas vacías las incubaciones se hicieron en medios sin leucina (MEM-Leu<sup>-</sup>). A los 150 min post-infección se añadieron 25 uCi/ml de Leucina-<sup>3</sup>H (actividad específica 59,2 Ci/mmol), continuando la infección hasta ver CPE (80).

Al final de la infección se separaron sobrenadantes víricos centrifugando a 800 xg durante 3 min. Los sobrenadantes se guardaron en frío mientras que con el precipitado celular se hicieron extractos citoplasmáticos de la siguiente manera: 10<sup>7</sup> células se resuspendieron en 0,5 ml de buffer hipotónico RSB-Mg pH 7,4 (0,01 M Tris-ClH, 0,01 M NaCl, 0,015 M MgCl<sub>2</sub>). A esta suspensión se le agregó Tritón X-100 5 ul de una solución 0,01%. Los núcleos fueron precipitados centrifugando a 1000 x g por 2 min y se restauró la isotonicidad del medio con NaCl 2M (69).

El sobrenadante obtenido (virus intracelular) se unió con el primer sobrenadante (virus extracelular). Ambos sobrenadantes se trataron con EDTA pH 7,4 hasta concentración final de 0,01 M. Se centrifugaron a 20.000 x g durante 15 min en frío y el clarificado se incubó durante 15 a 20 min con RNasa, concentración final 50 ug/ml (Sigma Chemical Co.) (69).

Las muestras se siembran en gradientes 10-30% de sacarosa en buffer NET pH 7,4 (p/v) cuyas condiciones de corrida fueron a 100.000 x g durante 180 min a 4°C en un rotor Beckman SW40 (69).

### II.10.3.- Procedimientos de infección y marcación de proteínas intracelulares en condiciones de interferencia

#### II.10.3.1.- Condiciones de infección

Se prepararon monocapas de aproximadamente  $5 \times 10^5$  células de RFB, tercer subcultivo, crecidas en microplacas de plástico, con orificios de  $2 \text{ cm}^2$  de superficie. Estas células fueron infectadas con virus aftoso atenuado a una m.o.i. de 0,2.

A las 24 horas post-infección, se superinfectaron las monocapas con virus  $A_{24}$  Cruzeiro salvaje. Los controles correspondientes son células infectadas con virus atenuado, células infectadas con virus  $A_{24}$  Cruzeiro salvaje y células sin infectar (146). Previo a los tiempos de marcación, se hizo un ayuno de 120 min con MEM-Met<sup>-</sup> con 4 cambios de medio de 30 min cada uno.

Las células se marcaron con 10 uCi de metionina-<sup>35</sup>S (New England Nuclear Co., actividad específica 1195,5 Ci/nmol) en 0,1 ml de MEM-Met<sup>-</sup> para cada punto (109). El ensayo se realizó a 37°C en atmósfera de anhídrido carbónico.

#### II.10.3.2.- Preparación de extractos citoplasmáticos

Transcurrido el tiempo de marcación de tres horas, se realizaron los extractos citoplasmáticos para cada una de las muestras. Se extrajo por succión el sobrenadante de las monocapas y se les agregó 0,5 ml de MEM-Met<sup>-</sup> para lavar la monocapa antes de lisar las células. Se agregó 75  $\mu$ l de buffer de disolución (0,0625 M Tris-ClH pH 6,8, 2% SDS, 0,5 M urea (Merck), 2% 2-mercaptoctanol (BDH Biochemicals Ltd.), 10% glicerol (Mallinckrodt Chemical Works) y 0,1% de azul de bromofenol (105). Las muestras que no fueron utilizadas inmediatamente se congelaron a -70°C. Antes de la siembra, las muestras se desnaturalizaron calentándolas a 100°C durante 5 min.

#### II.10.3.3.- Electroforesis en geles de poliacrilamida

Para preparar el gel de acrilamida 10% (S.T. Baker Chemical Co.), 0,25% N-N'-Metilenebisaacrilamida (Eastman Kodak Co.) en placa se emplearon vidrios de 16 x 18 cm. Se usó gel separador de 5% de acrilamida según el método descrito por Laemmli (105) con algunas modificaciones. Antes de la siembra de las muestras se tomó una a

lícuota de 10 ul de cada una precipitándola en TCA 5% en frío. Luego de ser filtradas por filtros Millipore (poro 0,45 u) en las condiciones ya descritas, se determinó la radioactividad incorporada. Esto se hizo con el objeto de sembrar cantidades de muestra equivalentes en cuanto a sus actividades medidas. Previo a su siembra en el gel, las muestras se trataron nuevamente con 2% de mercaptoctanol.

Como marcadores de peso molecular fueron usadas moléculas desde 94.000 a 14.400 daltons: fosforilasa B (94.000), albúmina (64.000), ovoalbúmina (43.000), anhidrasa carbónica (30.000), inhibidor de tripsina (20.100) y alfa-lactoalbúmina (14.400) (todas obtenidas de Pharmacia Fine Chemicals Co.). La electroforesis se realizó a 25-30 mA durante 4 a 5 horas.

Al final de la corrida el gel fue fijado en una solución de TCA 10% y alcohol isopropílico 25%, dejándose toda una noche en la misma. La tinción fue realizada con una solución conteniendo ácido acético 7%, alcohol isopropílico 25% y azul brillante de Coomassie 0,05% durante una hora. Luego de este período el gel fue desteñido, usando una solución conteniendo ácido acético al 7% y alcohol isopropílico 10%. El gel se deshidrató en un secador de geles Bio-Rad y fue autoradiografiado usando película Kodak X-Omat AR.

### III.- RESULTADOS

#### III.1.- CARACTERISTICAS BIOLOGICAS DE LA ATENUACION

##### III.1.1.- Susceptibilidad de diferentes sistemas frente al virus atenuado

##### III.1.1.1.- Infecciosidad del virus atenuado en células BHK-21 y patogenicidad en ratón lactante

Se determinaron los valores de infecciosidad en células BHK-21 para los virus A<sub>24</sub> Cruzeiro salvaje y atenuado, los resultados de las titulaciones realizadas en microplacas o en tubo por el método de dilución al punto final y la cuantificación por UFP fueron similares, no hallándose variaciones importantes entre las dos cepas virales, tal como se muestra en la Tabla 1.

Las únicas diferencias que se observaron fue en el tamaño de las placas -la cepa salvaje producía placas grandes (8 a 10 mm de diámetro)- y la atenuada producía placas medianas (4 a 5 mm) y grandes- y en el tiempo de replicación -de 9 a 10 horas con el virus salvaje y de 14 a 18 horas con el virus atenuado-.

En cuanto a la patogenicidad en ratón lactante tampoco se encontraron diferencias, siendo perfectamente comparables los resultados para ambos virus (Tabla 1). Es decir que, ambas cepas mostraron similar infectividad para células BHK-21 como para ratones lactantes, comportamiento que es coincidente con el obtenido con otros virus modificados en embrión de pollo (51,79).

##### III.1.1.2.- Atenuación para células de riñón bovino

Cuando las titulaciones se hicieron en monocapas de células de RFB, se observaron diferencias de varios logaritmos entre los títulos infectantes de la cepa atenuada y la salvaje (Tabla 1). La cantidad de virus liberado de células BHK-21 y de células de RFB infectadas con la cepa salvaje es, aproximadamente, la misma. Si bien con la cepa atenuada hay un comportamiento similar en células BHK-21, la cantidad de virus liberado en células de riñón bovino es considerablemente menor que la producida en BHK-21.

Tabla N° 1.- INFECTIVIDAD Y PATOGENICIDAD DE LAS CEPAS SALVAJE Y ATENUADA

VIRUS	Infectividad		Patogenicidad	
	Log <sub>10</sub> RFB <sup>a</sup> DICT 50/ml	Log <sub>10</sub> BHK-21 <sup>b</sup> UFP/ml	Log <sub>10</sub> Ratón	Lactante <sup>c</sup> DL 50/ml
A <sub>24</sub> Cruzeiro Salvaje	6,50	7,30		6,80
A <sub>24</sub> Cruzeiro Atenuado	2,50	6,65		8,04

- a) Dosis infecciosas 50% determinadas por el método de Reed y Muench a las 72 horas post-infección en microplacas de RFB incubadas a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub>.
- b) Unidades formadoras de placas obtenidas en monocapas de células BHK-21 luego de 72 horas de infección a 37°C. Aproximadamente  $5 \times 10^6$  células por frasco. Se utilizaron triplicados de cada dilución.
- c) Dosis letal 50% para ratones lactantes, determinadas por el método de Reed y Muench a los 7 días post-inoculación. Se emplearon cajas con 6 ratones por dilución.



Además, como se puede observar en la Tabla 1, la cantidad de virus salvaje requerido para producir efecto citopático y multiplicación es aproximadamente, igual en células BHK-21 que en RFB, mientras que, la cantidad de virus atenuado requerido para iniciar multiplicación, es varios logaritmos mayor para células de riñón bovino. La cepa atenuada mostraba una eficiencia de plaqueo (título sistema permisivo/título sistema semipermisivo) de  $10^3$ - $10^5$  en células BHK-21 respecto de células de RFB. Estas diferencias de 3 a 5 logaritmos se observó también al comparar con titulaciones del virus en ratón lactante.

En cultivos primarios de células de RFB infectadas con el virus atenuado no se producía efecto citopático total sino un ataque diferencial sobre la monocapa. El virus atenuado dejaba grupos de células fibroblásticas sin atacar. Haciendo subcultivos de células RFB a partir de un cultivo primario, se observó que luego de tres pasajes predominaban las células fibroblásticas.

Teniendo en cuenta esta observación, se analizó el grado de atenuación que se producía usando distintos pasajes de células de RFB. Para determinar si existían diferencias, se emplearon cultivos de RFB con uno o tres subcultivos a partir de un cultivo primario.

Los resultados obtenidos no permitieron determinar si existía un número de pasajes que fuera preferencial ya que, en algunos ensayos, se obtuvo mayor atenuación en un cultivo de pasaje uno que en uno de pasaje tres y en otros mayor atenuación para pasaje tres que para pasaje uno. Probablemente, esta irregularidad fuera ocasionada por las diferencias inherentes al cultivo, teniendo en cuenta que no se trata de una línea celular sino de un cultivo primario que se realiza cada día con riñones provenientes de fetos diferentes. Si bien se usa un mismo protocolo para la preparación del cultivo celular, la composición porcentual de cada tipo de célula puede no ser reproducible, originándose las oscilaciones observadas. Sin embargo, en todos los casos, el virus manifestaba su atenuación. Por lo tanto, se determinó utilizar indistintamente subcultivos del pasaje primero o tercero.

### a) Autointerferencia

Otra característica que se pudo apreciar es que el virus atenuado no producía efecto citopático sobre las células de riñón bovino cuando se encontraba en las diluciones menores. Por el contrario, se incrementaba el efecto de la destrucción celular con el aumento de la dilución viral (Tabla 2). Este fenómeno es característico de la autointerferencia habiendo sido descrito con otros virus en diferentes sistemas celulares y también en bovinos como por ejemplo con el subtipo  $\Lambda_{119}$  del virus aftoso modificado con el cual se obtuvo menor incidencia de viremia en el ganado bovino inoculando altas dosis del mismo (175).

### b) Atenuación para células de bovino con otros virus atenuados

Los resultados mostrados precedentemente indicaban que el virus  $\Lambda_{24}$  Cruzeiro atenuado para bovino tenía una marcada disminución en su infecciosidad para sistemas celulares de bovino. Para determinar si ésta era una característica asociada a esta cepa, se estudiaron otras dos cepas atenuadas para bovinos por el mismo procedimiento:  $O_1$  Campos y  $C_3$  Resende. Se determinó la eficiencia de incorporación de uridina- $^{14}C$  en células BHK-21 y células de RFB infectadas con estas cepas.

De los datos señalados en la Tabla 3 se puede concluir que hay una marcada reducción en la citopatogenicidad en células de bovinos para los virus aftosos modificados por pasajes en embrión de pollo. Estos resultados confirman los hallados por otros investigadores que utilizaron virus atenuados en embrión de pollo o en ratón (51,77,79,180).

### III.1.2.- Modificación de la población atenuada

Se ha señalado en los puntos anteriores que el virus  $\Lambda_{24}$  Cruzeiro atenuado para bovinos tiene una manifiesta disminución de la citopatogenicidad para células de riñón bovino a diferencia de una normal infecciosidad para células BHK-21 y ratones lactantes. Sin embargo, diferentes stocks de virus atenuados presentaban distintos grados de citopatogenicidad en células de RFB. Esta inestabilidad se puso de manifiesto al efectuar pasajes seriados sin diluir en monocapas de células BHK-21, determinándose al final de cada pasaje la infectividad en

Tabla N° 2.- CRECIMIENTO DE VIRUS AFTOSO ATENUADO Y SALVAJE EN MONOCAPAS DE CELULAS BHK-21 Y CELULAS DE RFB.

Virus	Dilución Viral	BHK-21		RFB	
		ECP	Título	ECP	Título
Atenuado	10 <sup>-1</sup>	++++		---+	
	10 <sup>-2</sup>	++++		++++	
	10 <sup>-3</sup>	++++		---+	
	10 <sup>-4</sup>	++++	6,50	---+	3,63
	10 <sup>-5</sup>	+++-			
	10 <sup>-6</sup>	-+--			
	10 <sup>-7</sup>	----		----	
	Salvaje	10 <sup>-1</sup>	++++		++++
10 <sup>-2</sup>		++++		++++	
10 <sup>-3</sup>		++++		++++	
10 <sup>-4</sup>		++++	7,00	++++	7,50
10 <sup>-5</sup>		++++		++++	
10 <sup>-6</sup>		-+++		+--+	
10 <sup>-7</sup>				-+--	

Monocapas de células BHK-21 y RFB crecidas en tubos fueron infectadas con diluciones de los virus A<sub>24</sub> Cruzeiro atenuado y salvaje. Luego de 50 min de adsorción se agregaron 2 ml de medio de infección. Se determinó ECP a las 72 horas post-infección. Cada dilución se realizó por cuadruplicado.

Título expresado como  $\log_{10} \text{DICT}_{50/\text{ml}}$  determinado siguiendo las mismas indicaciones de la Tabla 1.

Tabla N° 3.- CORRELACION ENTRE ATENUACION PARA BOVINO Y PERMISIVIDAD PARA CELULAS DE RFB.

Virus	Característica de la cepa	Incorporación máxima(cpm)	Porcentaje de incorporación
A <sub>24</sub> Cruzeiro	Salvaje	2.834	29,11
	Atenuado	825	
O <sub>1</sub> Campos	Salvaje	1.727	48,63
	Atenuado	840	
C <sub>3</sub> Resende	Salvaje	2.366	51,81
	Atenuado	1.226	

Células de RFB resuspendidas en MEM sin suero a una concentración de  $10^7$  células/ml fueron infectadas con los virus correspondientes en las mismas multiplicidades de infección. Luego de 45 min de adsorción, se diluyó con MEM conteniendo 5 ug/ml de actinomicina D y 0,025 M buffer HEPES pH 7,4.

A los 100 min post-infección, se efectuó la marcación con 0,5 uCi de uridina-<sup>14</sup>C, determinándose a distintos intervalos de tiempo la cantidad de radioactividad insoluble en TCA 5%. En la tabla se presentan las cuentas por minuto (cpm) correspondientes a la máxima incorporación de cada virus.

El control de incorporación de uridina-<sup>14</sup>C fue realizado en células sin infectar, durante todo el ciclo de infección. La incorporación celular fue descontada en cada tiempo de infección.

Se emplearon virus A<sub>24</sub> Cruzeiro, O<sub>1</sub> Campos y C<sub>3</sub> Resende, los tres atenuados por el mismo procedimiento y con tres pasajes por células BHK-21.

los sistemas permisivos (ratón lactante) y semipermisivo (RFD). Los resultados obtenidos se indican en la Figura 1.

Hasta el pasaje 5 la relación de infectividad entre el sistema permisivo y semipermisivo fue de, aproximadamente, 4 logaritmos. En los pasajes sucesivos esta diferencia disminuyó hasta que en el pasaje 8 se invirtió la relación, indicando un cambio en la población viral la cual se comportaba como la cepa salvaje.

Esta modificación también fue acompañada de un acortamiento de los tiempos de infección. En los primeros pasajes se tuvieron ciclos de 18 horas mientras que en los últimos se acortaron a 8 y 10 horas.

Resultados similares en cuanto a cambios en las características poblacionales fueron descritos por Campbell (37) empleando dos poblaciones de virus aftoso tipo 0 sin clonar, una patógena y otra no patógena para ratón adulto. Observó que en 10 pasajes por células de riñón de cerdo la cepa no patógena adquiría características de patogenicidad mientras que, por otra parte, la cepa viral originalmente infecciosa disminuía su patogenicidad luego de varios pasajes por este sistema celular. Teniendo en cuenta que ninguna de las poblaciones virales había sido clonada, cada una consistiría de una mezcla de variantes y la presión de selección ejercida por el sistema celular favorecía a alguna de ellas.

### III.1.3.- Características de infectividad de clones aisladas

Con el objeto de determinar si la pérdida de atenuación durante los pasajes por células BHK-21 se debía a la generación de revertantes o a una selección de partículas virales no atenuadas presentes en la población, se clonó el virus atenuado siguiendo las condiciones ya descritas en Materiales y Métodos. Con un inóculo de 0,2 ml de dilución viral se inocularon frascos planos con monocapas de  $3 \times 10^6$  células BHK-21. Del virus salvaje se seleccionaron tres clones de los frascos inoculados con la dilución  $10^{-4}$ . Del virus atenuado se aislaron 8 clones de los frascos inoculados con la dilución  $10^{-4}$ . El grado de atenuación de las diferentes clones del virus  $\Lambda_{24}$  Cruzeiro atenuado se determinó por su eficiencia de replicación en células de RFB respecto a los sistemas permisivos (BHK-21 y ratón lactante). Los resultados de infecciosidad de algunas de las clones obtenidas se indican en la Tabla 4.

FIGURA N° I

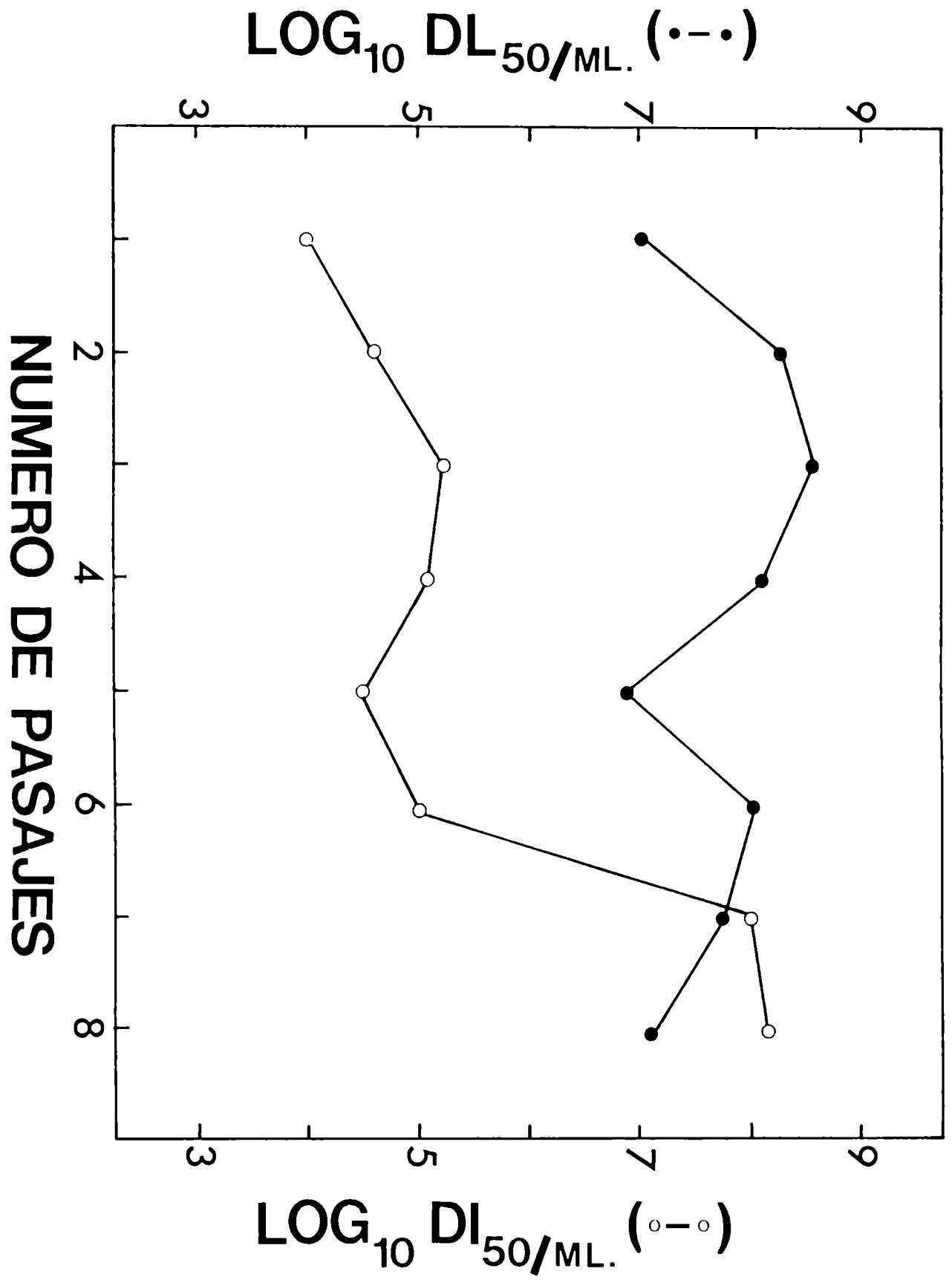


Figura N° I.- Modificación de la población atenuada

Monocapas de  $3 \times 10^6$  células BHK-21 crecidas en frascos planos, fueron infectadas con virus  $\Lambda_{24}$  Cruzeiro atenuado a una multiplicidad de infección (m.o.i.) de 10-20. Luego de 50 min de adsorción, se retiró el inóculo y se agregaron 5 ml de MEM sin suero. El virus se cosechó al tener efecto citopático total.

Una alícuota del inóculo se retiró para ser titulada mientras que otra alícuota de 1 ml se utilizó como inóculo para el siguiente pasaje por células BHK-21.

Se determinaron los títulos como  $\log_{10}$  DL50/ml en ratón lactante (●—●) y  $\log_{10}$  DICT50/ml en RFB (○—○).

Tabla 4.- INFECTIVIDAD Y PATOGENICIDAD DE LAS CLONAS ATSLADAS DEL VIRUS  $A_{24}$  CRUZEIRO

Clona	Virus original	Infectividad		Patogenicidad	
		Log <sub>10</sub> BHK-21 UFP/ml	Log <sub>10</sub> RFB DICT <sub>50</sub> /ml	Log <sub>10</sub> Ratón	Lactante DL <sub>50</sub> /ml
3	Salvaje	5,18	6,20	6,80	
8	Atenuado	6,00	1,50	5,70	
9	Atenuado	6,90	4,10	-	
10	Atenuado	6,00	5,50	6,80	
11	Atenuado	5,70	5,95	6,80	

Monocapas de  $3 \times 10^6$  células BHK-21 fueron infectadas con 0,2 ml de diferentes diluciones de virus  $A_{24}$  Cruzeiro atenuado o salvaje. Luego de 45 min de adsorción a 37°C se retiró el inóculo y se agregaron 5 ml de medio con agar (un volumen de 1,8% bactoagar en agua y 1 volumen de MEM 2 x). Se incubaron las células infectadas a 37°C durante 48 horas. El revelado se realizó con solución de rojo neutro 0,02%. Las clonas seleccionadas se extrajeron y fueron sembradas en tubos con monocapas de células BHK-21 para su enriquecimiento.



Si comparamos los datos de las titulaciones vemos que las clonas 10 y 11 aisladas de la cepa atenuada, tienen una infecciosidad similar a la clona 3 aislada de la cepa salvaje, tanto en células BHK-21 como en patogenicidad en ratón lactante. Por otra parte, las clonas 8 y 9, también provenientes de la cepa atenuada, infectaban normalmente las células BHK-21 o el ratón lactante pero sus títulos disminuían en células de RFB mostrando así sus características de atenuación.

Para obtener una mayor homogeneidad de la población viral, luego de un pasaje en células BHK-21, se repitió el clonado y la titulación. De las clonas 8 y 9 se seleccionaron las subclonas 82 (clon 8, subclona 2), 94 y 95. Los resultados de este nuevo clonado se muestran en la Tabla 5.

Las subclonas 82, 94 y 95 se comportan como el virus atenuado original, ya que mantienen infecciosidad en células BHK-21 y en ratón lactante pero en células de RFB sus títulos disminuyen, por lo menos, en 4 logaritmos.

#### III.1.3.1.- Reversión de la clona atenuada

Se analizaron las modificaciones que aparecieron en los sucesivos pasajes de una clona atenuada por células BHK-21 para esclarecer si el mecanismo que las producía era la selección o la reversión. En la Tabla 6 se muestran los resultados de infectividad de una clona de la cepa atenuada (clona 835) luego de uno y nueve pasajes sin diluir en monocapas de células BHK-21.

El comportamiento de la clona atenuada luego de 9 pasajes, en cuanto a sus características de infectividad, era igual al obtenido por pasajes seriados con la cepa atenuada sin clonar. Durante el pasaje por células BHK-21 se produjeron mutaciones y selecciones dando como resultado la aparición de revertantes sin características de atenuación. Los revertantes pasan a ser predominantes en la población viral debido a que su ciclo de multiplicación es de 8 horas mientras que el de la clona atenuada es de 18 horas.

Tabla N° 5.- INFECTIVIDAD Y PATOGENICIDAD DE TRES SUBCLONAS DEL VIRUS ATENUADO

Subclona	Infectividad		Patogenicidad	
	BHK-21 Log <sub>10</sub> UFP/ml	RFB Log <sub>10</sub> DICT <sub>50</sub> /ml	Ratón Log <sub>10</sub>	Lactante DL <sub>50</sub> /ml
82	6,00	2,00		5,70
94	5,78	3,00		6,54
95	6,00	3,20		6,30

Las condiciones de clonado son las ya señaladas en la leyenda de la Tabla N° 4.

Tabla N° 6.- CARACTERISTICAS DE INFECTIVIDAD DE LA CEPA ATENUADA CLONADA LUEGO DE 9 PASAJES EN CELULAS BHK-21

Clona	Infectividad		Patogenicidad	
	BHK-21 Log <sub>10</sub> UFP/ml	RFB Log <sub>10</sub> DICT <sub>50</sub> /ml	Ratón Log <sub>10</sub>	Lactante DL <sub>50</sub> /ml
835 P <sub>1</sub> BHK-21	6,0	2,6		7,8
835 P <sub>9</sub> BHK-21	6,4	6,2		8,0

Monocapas de  $3 \times 10^6$  células BHK-21 fueron infectadas con la clona 835 a alta multiplicidad de infección. Luego de la adsorción, se retiró el inóculo viral y se agregaron 5 ml de MEM con 10% de caldo triptosa fosfato, gentamicina 50 ug/ml y buffer HEPES pH 7,4 (0,025M). Se cosechó el virus al observar efecto citopático total.

### III.1.3.2.- Infecciones persistentes con clonas atenuadas

Se observó que cuando se infectaban células de RFB con la clona atenuada 821 no se producía efecto citopático. Los sobrenadantes de las infecciones que no produjeron efecto citopático se titularon en ratón lactante para detectar la presencia de virus aftoso determinándose, además, su tipo serológico (2).

Las células infectadas con la clona 821 no mostraron efecto citopático a pesar de estar en presencia de aproximadamente  $10^6$  unidades infecciosas de virus siendo, además, resistentes a la superinfección con virus aftoso salvaje.

Al ser analizadas por la técnica de inmunofluorescencia indirecta (ver Materiales y Métodos), se observó en algunas células la presencia de antígenos virales intracelulares detectada como fluorescencia citoplasmática muy tenue y fluorescencia perinuclear. Aparentemente, en determinadas condiciones el virus atenuado podría establecer infecciones persistentes en células de RFB. Estos resultados son coincidentes con las de otros investigadores que describieron infecciones persistentes en células de riñón bovino luego de infecciones con el virus aftoso. Células de riñón bovino que no fueron destruidas por la infección con virus aftoso tipo 0 replicaban normalmente y producían virus con títulos que variaban entre  $10^2$  y  $10^3$  UFP/ml (174). Philipson y Dinter(144) también describieron infecciones persistentes con el virus aftoso en células de riñón bovino y consideraron que el interferón estaría involucrado en el establecimiento del estado de persistencia viral.

### III.2.- INTERFERENCIA EN LA REPLICACION DEL VIRUS SALVAJE

En condiciones en que células de RFB se infectaban con ambos virus -salvaje y atenuado-, se observó una inhibición de la producción de virus salvaje. La interferencia podía ser inducida por interferón, por partículas defectivas interferentes o por el mismo virus atenuado. Con tal motivo, se realizaron ensayos para confirmar o descartar el posible rol de cada uno de ellos.

#### III.2.1.- Interferencia no inducida por interferón

La acción de interferón ha sido descripta en infecciones con el virus aftoso. Dinter (62,144) demostró la presencia de interferón en células de RFB infectadas con virus aftoso con la consiguiente disminución de la cantidad de virus producido.

Sellers (176-177) analizando las diferencias encontradas entre dos cepas de virus aftoso, una virulenta y la otra atenuada, concluye que la cepa atenuada produce mas interferón y es mas sensible a la acción del mismo que la cepa virulenta.

A pesar de estos antecedentes no se ha podido confirmar su participación en el sistema estudiado por mí ya que:

- 1) Cuando se realizaron ensayos de interferencia con el sobrenadante proveniente de la centrifugación del virus a 100.000 x g durante 120 min. no se obtuvo interferencia. En cambio, con el precipitado correspondiente (virus concentrado), se inhibía la replicación del virus salvaje. Dado el PM del interferón, éste tendría que estar en la fracción del sobrenadante.
- 2) Se obtuvo interferencia en la replicación del virus salvaje en infecciones realizadas en presencia de actinomicina D, que es un inhibidor de la síntesis de ácido ribonucleico celular y, por lo tanto, en su presencia no se sintetiza interferón que es codificado por el genoma celular (200) (Figura 3, Tabla 8).
- 3) La interferencia por interferón tiene especificidad de especie celular (200) y cepas de virus atenuado provenientes de cultivos de células BHK-21 interferían los ensayos realizados en células de RFB.

4) La interferencia es específica para el virus aftoso.

Para analizar los puntos 3 y 4 se realizó el siguiente ensayo: subcultivos de células de RFB fueron infectadas con virus aftoso atenuado obtenido de células BHK-21 y luego de 24 hs se superinfectaron con los virus aftosos salvajes (subtipos  $A_{24}$  y  $C_3$ ) y con un enterovirus bovino.

Como puede observarse en la Tabla 7, el virus atenuado produjo una disminución de, aproximadamente, 5 log en los títulos de los virus  $A_{24}$  y  $C_3$  mientras que los valores del enterovirus bovino no se modificaron.

Considerando que el interferón es específico de especie y que el inóculo de virus atenuado se obtuvo a partir de células BHK-21, no era de esperarse que tuviera efecto inhibitorio en células de RFB. Si igualmente hubiese actuado con una eficiencia menor que en el propio sistema de células BHK-21, se hubiese esperado que su acción antiviral inhibiera la replicación del enterovirus bovino.

Estos resultados permitieron confirmar que el interferón no era responsable de la interferencia observada.

### III.2.2.- Posible rol de las partículas DI en la interferencia

Teniendo en cuenta que la interferencia no se debió al efecto producido por interferón, se estudió la presencia de partículas DI en la población de virus atenuado.

Recientemente, se ha detectado la presencia de partículas DI en varios miembros de los picornavirus, excepto en el virus aftoso (116). A diferencia de lo que se observó en poliovirus, la presencia de partículas DI sólo se pudo poner de manifiesto por electroforesis de los ARN virales en geles de agarosa, dado que las partículas DI de los picornavirus no se diferencian de las partículas virales normales por su densidad de flotación -a excepción de poliovirus- (41-43).

Los ensayos realizados con la cepa atenuada arrojaron los siguientes resultados:

- Las purificaciones en gradientes de sacarosa de los virus salvaje y atenuado mostraron picos virales de gran homogeneidad en cuanto a su velocidad de sedimentación.

Tabla N° 7.- INTERFERENCIA HOMOLOGA POR EL VIRUS  $\Lambda_{24}$  CRUZEIRO ATENUADO.

V i r u s	Infectividad en células RFB ( $\log_{10}$ DTCT50/ml)
$\Lambda_{24}$	6,5
$\Lambda_{24}$ + $\Lambda_{24}$ Atenuado	1,5
$C_3$	7,5
$C_3$ + $\Lambda_{24}$ Atenuado	2,5
Enterovirus bovino	6,0
Enterovirus bovino + $\Lambda_{24}$ Atenuado	6,0

Monocapas de células de RFB crecidas en microplacas de plástico fueron infectadas con virus atenuado (m.o.i. = 1) e incubadas a 37°C en atmósfera de  $CO_2$ . A las 24 horas post-infección fueron superinfectadas con virus salvaje  $\Lambda_{24}$ ,  $C_3$  Resende y enterovirus bovino. las placas controles fueron infectadas solamente con virus  $\Lambda_{24}$ ,  $C_3$  Resende y enterovirus bovino.

- La determinación de la homogeneidad viral en cuanto a su densidad se efectuó por ultracentrifugación en gradientes de cloruro de cesio. Los resultados no permitieron detectar partículas de menor densidad (Figura VII).
- El análisis de los ácidos ribonucleicos de las cepas virales atenuada y salvaje en geles de agarosa, no permitió establecer diferencias en la velocidad de migración de los ARN debido a la degradación parcial de los ácidos nucleicos virales por acción de la ribonucleasa asociada al virus (58), cuya acción estaba favorecida por el ciclo de replicación lento del virus atenuado.
- Teniendo en cuenta que la presencia de partículas defectivas interferentes no se pudo establecer por las técnicas anteriormente mencionadas, se realizaron infecciones de manera de favorecer su amplificación, es decir, por pasajes seriados de virus a alta multiplicidad.

Este tipo de experiencia fue efectuado teniendo en cuenta los resultados obtenidos con otros virus que indicaron que la interferencia viral por partículas DI se pone fácilmente de manifiesto por determinación del título infectante en pasajes sucesivos sin diluir. Pasajes seriados con el virus Sindbis a altas multiplicidades de infección muestran una variación cíclica del título. La disminución del título esta correlacionada con la aparición de partículas DI, es decir, de viriones de menor tamaño y ARN viral truncado (101). Con el virus de la estomatitis vesicular se produce una infección cíclica cuando se realizan pasajes del virus sin diluir causada por el efecto interferente de las partículas DI (140).

Los resultados obtenidos en este trabajo con la población atenuada en pasajes sin diluir, muestran el modelo cíclico de infección característico del producido por partículas DI (Figura II-a) con una oscilación máxima de 1,5 log mientras que en pasajes diluidos se observa constancia en los títulos al cabo de los diferentes pasajes (Figura II-b).

FIGURA N° II

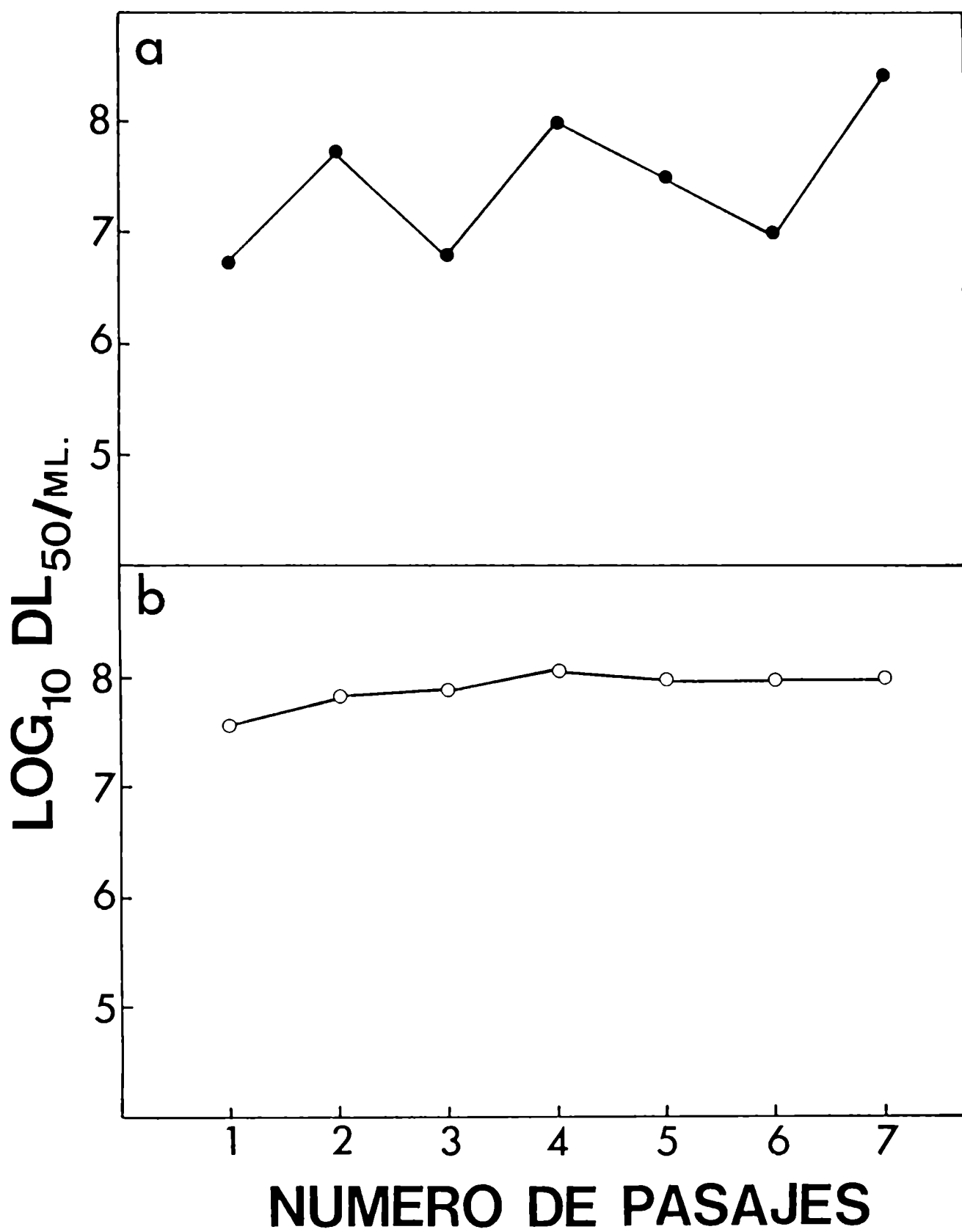




FIGURA N°II.- Pasajes seriados del virus atenuado diluido y sin diluir

Monocapas de  $3 \times 10^6$  células BHK-21 fueron infectadas con 1 ml de virus atenuado sin diluir (moi=10) y diluido (moi=0,1). Luego de 60 min de adsorción, se retiró el inóculo y se agregaron 5 ml de medio de infección. Se incubó a 37°C hasta tener efecto citopático total. El virus cosechado se utilizó como inóculo del siguiente pasaje. Al final de cada pasaje se retiró una alícuota para determinar patogenicidad en ratón lactante.

A.- Inóculo sin diluir. B.- Inóculo diluido

### III.2.3.- Interferencia por virus atenuado

#### III.2.3.1.- Disminución del título de virus infeccioso

La posibilidad de interferir de la partícula atenuado con la producción de virus estandar fue estudiada, en primer lugar, midiendo la producción de virus infeccioso. Con tal motivo, células de RFB fueron infectadas con el virus atenuado. A las 24 horas post-infección, se superinfectaron con el virus aftoso subtipo A<sub>24</sub> o con el subtipo C<sub>3</sub> o con enterovirus bovino. Se produjo un marcado efecto inhibitorio sobre el aftovirus, independientemente del tipo serológico usado, manifestado como una brusca disminución de los títulos infecciosos respecto de los controles. La población atenuada no interfirió la replicación del enterovirus bovino (Tabla 7).

Estos resultados solamente indicaban que el virus atenuado estaba interfiriendo la producción de virus infeccioso pero, dadas las condiciones del ensayo, no se podía determinar si se trataba de una interferencia a nivel intracelular o a nivel de receptores celulares. Conviene recordar que se hizo una primera infección con el virus atenuado y posterior infección con el virus salvaje, condiciones en la que se detectó una disminución de virus infeccioso.

#### III.2.3.2.- Inhibición en la síntesis de ácidos ribonucleicos virales

Para descartar una posible interferencia a nivel de receptores celulares específicos, se diseñó la experiencia haciendo una infección con el virus salvaje, en primer lugar, y superinfectando con el virus atenuado. La superinfección se realizó luego que el virus salvaje había completado las etapas de adsorción y penetración a las células huéspedes. Con tal motivo, células de RFB fueron infectadas con la cepa salvaje y luego de 45 min fueron superinfectadas con la cepa atenuada. Se utilizó como medida de la interferencia viral la inhibición de la síntesis de los ácidos ribonucleicos virales.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura III. La síntesis de ácidos ribonucleicos no es detectable, tanto en las células infectadas con la cepa atenuada como en aquéllas infectadas con la cepa salvaje y luego superinfectadas con la atenuada. Es decir, que la cepa atenuada inhibe totalmente la síntesis de ácidos ribonucleicos del virus y

FIGURA Nº III

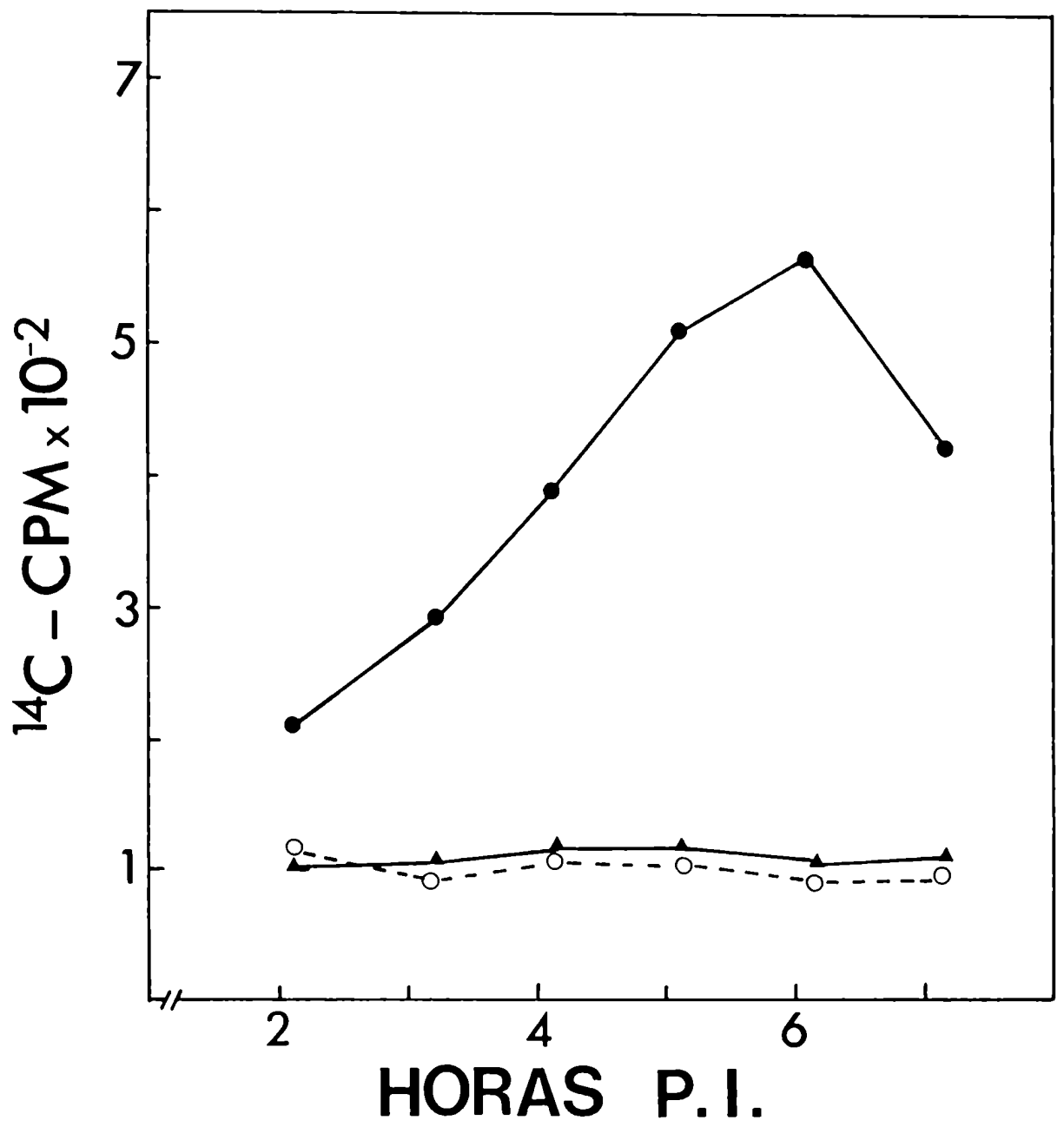


FIGURA N° III.- Interferencia en la síntesis de ácido ribonucleico del virus salvaje inducida por el virus atenuado

Células de RFB ( $5 \times 10^6$ ) fueron infectadas con el virus salvaje  $\Lambda_{24}$  Cruzeiro (m.o.i. 1) a 37°C. Luego de 45 min de adsorción, se retiró el inóculo viral y las células fueron superinfectadas con el virus  $\Lambda_{24}$  Cruzeiro atenuado a igual m.o.i.. Al cabo de otros 45 min de adsorción se retiró el inóculo viral y se agregó medio de infección suplementado con buffer HEPES pH 7,4 (concentración final 0,025M) y actinomicina D 5 ug/ml. A los 110 min post-infección se hizo marcación con 0,5 uCi de uridina-<sup>14</sup>C. Se determinó a distintos tiempos post-infección la cantidad de radioactividad insoluble en TCA 5%.

Se realizaron controles de incorporación celular tal como se indicó en la Tabla 3.

su efecto totalmente inhibitorio puede observarse ya a las 2 horas post-infección.

Dadas las condiciones del ensayo queda demostrado que la interferencia es a nivel intracelular.

Para confirmar que la actividad interferente estaba asociada específicamente a la partícula atenuada, se realizó un ensayo con la clona atenuada 835 y una clona salvaje 34. Las condiciones fueron similares a las mencionadas en la Figura III. Los resultados pueden apreciarse en la Tabla 8. En la misma puede verse claramente que es específicamente la clona atenuada la que interfiere la síntesis del ARN del virus salvaje. Por otra parte, también quedaría descartada la posibilidad que partículas DI estuvieran presentes en el inóculo de virus atenuado ya que, luego de 3 clonados, éstas estarían en muy baja proporción o habrían desaparecido.

#### III.2.3.3.- Dependencia de la interferencia con la multiplicidad de infección del virus atenuado

Las relaciones de multiplicidad entre la cepa atenuada y la salvaje se variaron en infecciones simultáneas en células de RFB para determinar si el efecto interferente dependía de la multiplicidad del virus atenuado. Se emplearon tres multiplicidades de infección del virus atenuado tal como puede verse en la Tabla 9. Se observó mayor inhibición de la síntesis de ARN al aumentar la relación virus atenuado/virus salvaje. Cuando la relación era muy baja, es decir, muy poco virus atenuado, la síntesis de ácido ribonucleico viral no se hallaba inhibida.

#### III.2.3.4.- Relación entre el grado de interferencia y el número de pasajes del virus atenuado por células BHK-21

Debido a que diferentes stocks de virus atenuados (obtenidas por pasajes en células BHK-21) mostraron distintos grados de interferencia en ensayos realizados con las mismas relaciones de cepa atenuada a cepa salvaje, se determinó la influencia del número de pasajes de la cepa atenuada por células BHK-21 en cuanto a su poder interferente.

Tabla N° 8.- INTERFERENCIA EN LA REPLICACION DE UNA CLONA SALVAJE INDUCIDA POR UNA CLONA ATENUADA

V i r u s	Incorporación de <sup>14</sup> C-Uridina en el ARN viral	
	c.p.m.	%
Clona 34	450	100
Clona 34 + Clona 835	250	55
Clona 835	125	27

Células de RFB a una concentración de  $5 \times 10^6$  células/ml fueron infectadas con la clona salvaje 34 (m.o.i. 1). Luego de 45 min de adsorción se retiró el inóculo viral y se agregó la clona atenuada 835 (m.o.i. 1). Luego de 45 min se retiró el inóculo viral y se agregó medio de infección con HEPES pH 7,4 (0,025M) y actinomicina D 5ug/ml.

Al cabo de 110 min post-infección, se agregaron 0,5 uCi de <sup>14</sup>C-Uridina determinándose a distintos tiempos post-infección la radioactividad insoluble en TCA 5%.

Se realizaron controles de incorporación celular tal como se señaló en la leyenda de la Tabla 3.

Tabla N° 9.- VARIACION DE LA INTERFERENCIA CON LA MULTIPLICIDAD DE INFECCION DE LA CEPA ATENUADA

Multiplicidad del Virus Infeccionante		Incorporación de $^{14}\text{C}$ -Uridina	
Virus Salvaje	Virus Atenuado	c.p.m.	%
10	0	1800	100
10	5	350	19,4
10	0,5	850	47
10	0,05	1900	105

Células de RFB ( $5 \times 10^6$  células) fueron infectadas con virus salvaje  $\Lambda_{24}$  Cruzeiro a una m.o.i. igual a 10.

Luego de 45 min de adsorción, se retiró el inóculo viral y se agregó el virus  $\Lambda_{24}$  Cruzeiro atenuado (m.o.i. 5; m.o.i. 0,5 o m.o.i. 0,05). Al cabo de otros 45 min de adsorción, se retiró el inóculo del atenuado y se agregó medio de infección con actinomicina D 5 ug/ml y buffer HEPES pH 7,4 (0,025M). A los 110 min post-infección, se agregaron 0,5 uCi de  $^{14}\text{C}$ -Uridina. Se determinó a distintos tiempos post-infección la radioactividad insoluble en TCA 5%.

Se realizaron controles de incorporación celular.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 10. Luego de tres pasajes sucesivos del virus, la capacidad interferente del mismo disminuyó. Tales resultados indicaron que durante los pasajes por células BHK-21 se produjo un cambio en la población viral, cuyo resultado fue la selección de partículas virales no interferentes. Este resultado es, por lo tanto, coincidente con la modificación del virus atenuado, dado que una modificación del mismo está relacionada con una modificación del efecto interferente.

### III.2.3.5.- Inhibición en la síntesis de virus y partículas vacías

Con el objeto de determinar si la inhibición en la síntesis de ARN viral se correlacionaba con la de partículas virales y partículas vacías, se infectaron células de RFB con el virus salvaje y se superinfectaron con el atenuado, en presencia de  $^3\text{H}$ -Leucina.

En condiciones de inhibición total de la síntesis de ARN (Figura III) no se detectaron partículas virales completas ni vacías (Figura IV). Estos datos permiten inferir que el efecto de interferencia es muy temprano, aparentemente anterior a la síntesis de ácido ribonucleico del virus salvaje y anterior a la traducción, pues tampoco se encontró acumulación de partículas vacías.

### III.2.3.6.- Inhibición en la síntesis de proteínas inducidas por el virus

Con el objeto de analizar la síntesis de proteínas virales y el bloqueo de la síntesis de proteínas celulares inducida por el virus, se infectaron células de RFB con la cepa atenuada en presencia de  $^{35}\text{S}$ -Me $^t$ teionina, analizándose las células infectadas en geles de poliacrilamida.

Los resultados mostrados en la Figura V indican que la cepa atenuada no inhibe la síntesis de proteínas celulares, luego de 30 horas de infección (calles 3 y 4) contrariamente a lo que sucede con la cepa salvaje a una multiplicidad de infección semejante (calle 5). En este caso, se observa además síntesis de proteínas específicas del virus, fundamentalmente las estructurales. Por otra parte, las células infectadas con la cepa atenuada y superinfectadas con la salvaje, muestran claramente el efecto interferente al observarse una disminución en la síntesis de proteínas virales específicas del virus (calles 5 y 6).



Tabla N° 10.- VARIACION DEL GRADO DE INTERFERENCIA DEL VIRUS ATENUADO  $\Lambda_{24}$  CRUZEIRO Y EL NUMERO DE PASAJES POR CELULAS BHK-21

Virus	Incorporación de $^{14}\text{C}$ -Uridina en el ARN viral	
	c.p.m.	%
Salvaje	1950	100
Salvaje + Atenuado $P_1$	420	21
Atenuado $P_1$	360	18,5
Salvaje + Atenuado $P_2$	860	44
Atenuado $P_2$	270	14
Salvaje + Atenuado $P_3$	1500	75
Atenuado $P_3$	590	30

Ensayo en las mismas condiciones de infección que las indicadas en la leyenda de la Figura III.

Se emplearon las cepas de virus  $\Lambda_{24}$  Cruzeiro, salvaje y atenuada de pasaje uno ( $P_1$ ), pasaje dos ( $P_2$ ) o pasaje tres ( $P_3$ ) por células BHK-21.

M.o.i. virus salvaje = 10; m.o.i. virus atenuado = 5

FIGURA N° IV

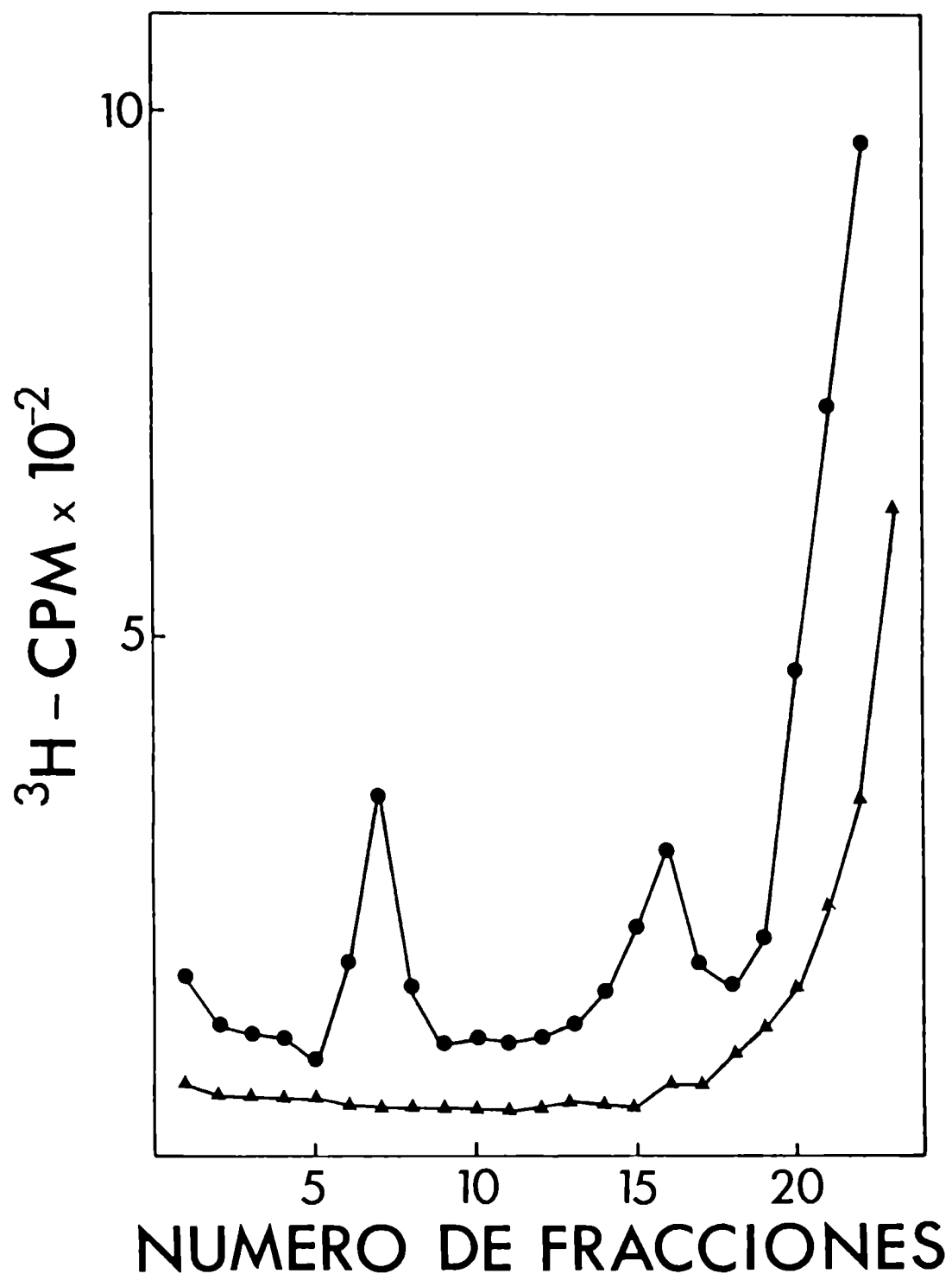


FIGURA N° IV.- Interferencia en la producción de virus y partículas vacías

Células de RFB ( $5 \times 10^6$ ) fueron infectadas con virus A<sub>24</sub> Cruzeiro salvaje. Luego de 45 min de adsorción, se descartó el sobrenadante vírico y se superinfectó con virus A<sub>24</sub> Cruzeiro atenuado. A los 45 min de adsorción, se descartó el sobrenadante y se agregó medio de infección sin leucina. A los 150 min post-infección, se hizo la marcación con 25 uCi de <sup>3</sup>H-Leucina y se incubó hasta tener efecto citopático total. Se realizaron los extractos citoplasmáticos y su purificación por gradientes de sacarosa, tal como se describe en Materiales y Métodos.

FIGURA N° V

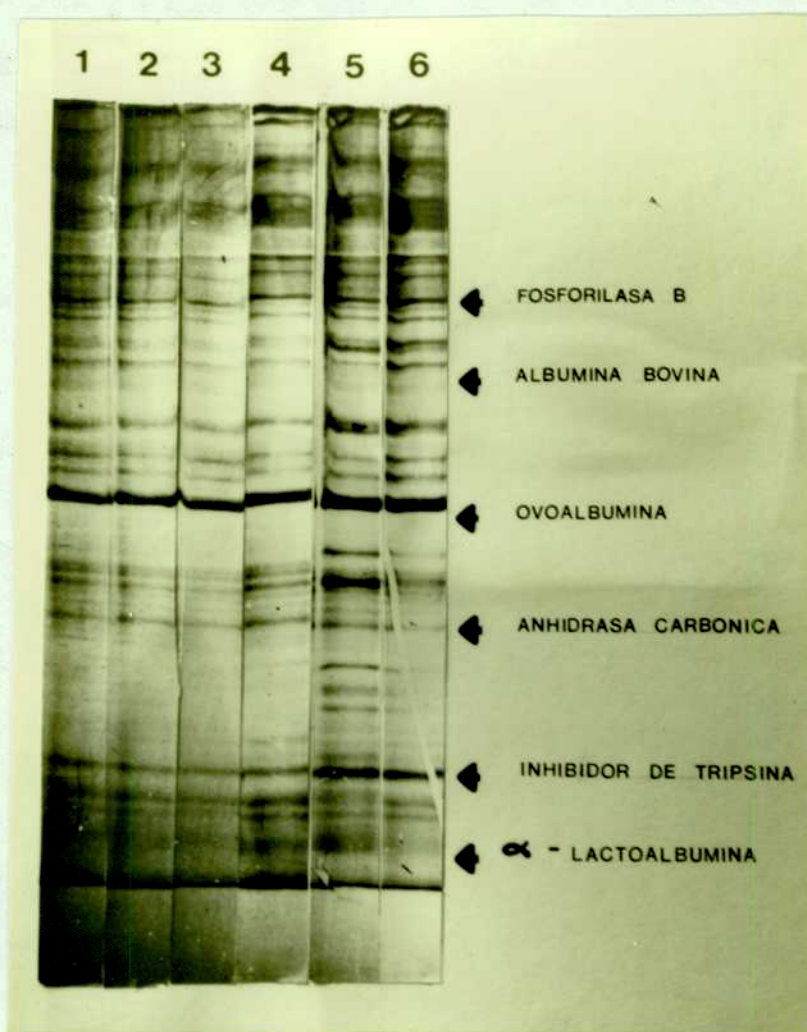


FIGURA N° V.- Electroforesis en geles de poliacrilamida de proteínas intracelulares de células de RFB infectadas con las cepas  $\Lambda_{24}$  Cruceiro salvaje y/o atenuado.

Monocapas de  $5 \times 10^5$  células de RFB fueron infectadas con virus atenuado a una multiplicidad de infección de 0,2. A las 21 horas p.i. se inocularon las monocapas controles con virus  $\Lambda_{24}$  Cruceiro salvaje (m.o.i.=0,2) o bien se superinfectaron aquéllas que ya tenían virus atenuado. Previo a los tiempos de marcación, se hizo un ayuno de 120 min con MEM sin metionina. La marcación se hizo con 10 uCi de  $^{35}\text{S}$ -Metionina en 0,1 ml de MEM-Met<sup>-</sup> por cada  $5 \times 10^5$  células de RFB y durante un período de 3 horas. Los extractos citoplasmáticos preparados con buffer de disolución fueron desnaturalizados calentándolos a 100°C durante 5 min. Las muestras se sembraron en geles de 10% de acrilamida y se realizó la electroforesis en las condiciones indicadas en Materiales y Métodos.

Calle 1 = Células sin infectar, a las 9 horas.

Calle 2 = Células sin infectar, a las 30 horas.

Calle 3 = Células a las 9 horas p.i. con el virus atenuado.

Calle 4 = Células a las 30 horas p.i. con el virus atenuado.

Calle 5 = Células infectadas con la cepa salvaje solamente durante 9 horas a las 21 horas p.i.

Calle 6 = Células a las 21 horas p.i. con el virus atenuado y superinfectadas con la cepa salvaje durante 9 horas.

Los resultados sugieren que no es necesaria la síntesis de proteínas específicas de la cepa atenuada para poder interferir la replicación del virus salvaje, ya que en las condiciones experimentadas no se detectó la presencia de proteínas intracelulares específicamente virales cuando se infectaron las células con el virus atenuado solamente.

### III.3.- CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS

El haber encontrado diferencias en el virus atenuado en cuanto a su comportamiento en sistemas biológicos, llevo al análisis de sus características estructurales. Con tal motivo, se determinó su coeficiente de sedimentación, su densidad y se realizó el mapeo de sus oligonucleótidos.

#### III.3.1.- Determinación del coeficiente de sedimentación

Se infectaron células BHK-21 con virus atenuado o con virus salvaje que fueron marcados con  $^3\text{H}$ -Uridina. El virus radioactivo producido en ambos casos fue concentrado y purificado por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa. La determinación del coeficiente de sedimentación indicó valores de 140S tanto para el pico viral atenuado como para el salvaje (9,127).

Las fracciones correspondientes a la zona 140S fueron totalmente coincidentes con el pico de mayor incorporación de  $^3\text{H}$ -Uridina. En la Figura VI puede apreciarse el perfil de incorporación de  $^3\text{H}$ -Uridina en células infectadas con el virus salvaje (Figura VI-A) y con el virus atenuado (Figura VI-B).

#### III.3.2.- Determinación de la densidad en cloruro de cesio

Los picos virales correspondientes a los virus salvaje y atenuado (Figura VI) se ultracentrifugaron en gradientes de cloruro de cesio para determinar la densidad de ambos virus. Al final de la centrifugación (las condiciones se señalan en Materiales y Métodos) se recogieron alícuotas de cada gradiente. En algunas fracciones se determinó el índice de refracción y luego se hizo la conversión a densidad. Simultáneamente, se cuantificó la radioactividad ácido insoluble de cada fracción y se determinó que el máximo de incorporación coincidía con el pico de densidad de 1,43 g/ml, valor esperado para el virus aftoso (127). Los perfiles de incorporación y su densidad pueden apreciarse en la Figura VII, en la cual se observa que el pico de densidad de 1,43 g/ml del virus atenuado (Figura VII-A) es coincidente con el del virus salvaje (Figura VII-B).

FIGURA N° VI

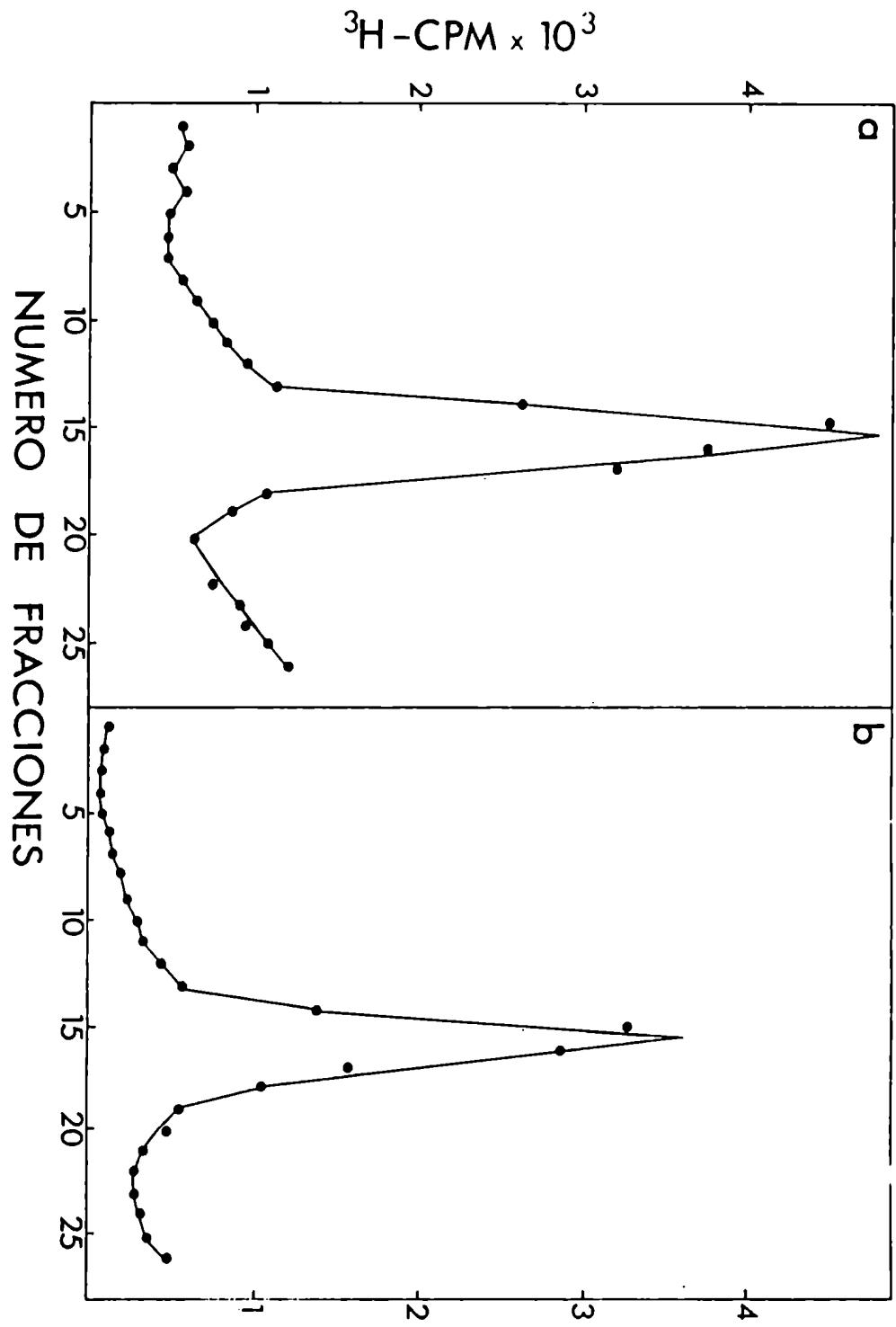




FIGURA N° VI.- Determinación del coeficiente de sedimentación de la cepa atenuada y salvaje del virus A<sub>24</sub> Cruzeiro

Células BHK-21 ( $10^8$ ) fueron infectadas con virus A<sub>24</sub> Cruzeiro atenuado o salvaje a una alta multiplicidad de infección. A los 180 min post-infección, fueron marcadas con 100 uCi de  $^3\text{H}$ -Uridina en presencia de actinomicina D (5 ug/ml). El virus se cosechó cuando el efecto citopático era total. El sobrenadante vírico clarificado y concentrado se purificó por centrifugación en gradientes de sacarosa 10=30% (p/v) en buffer NET pH 7,4 a 100.000 x g durante 180 min a 4°C. Al final de la centrifugación se recogieron fracciones de 0,5 ml.

En la figura se pueden observar los perfiles correspondientes al virus salvaje (A) y al virus atenuado (B).

FIGURA N° VII

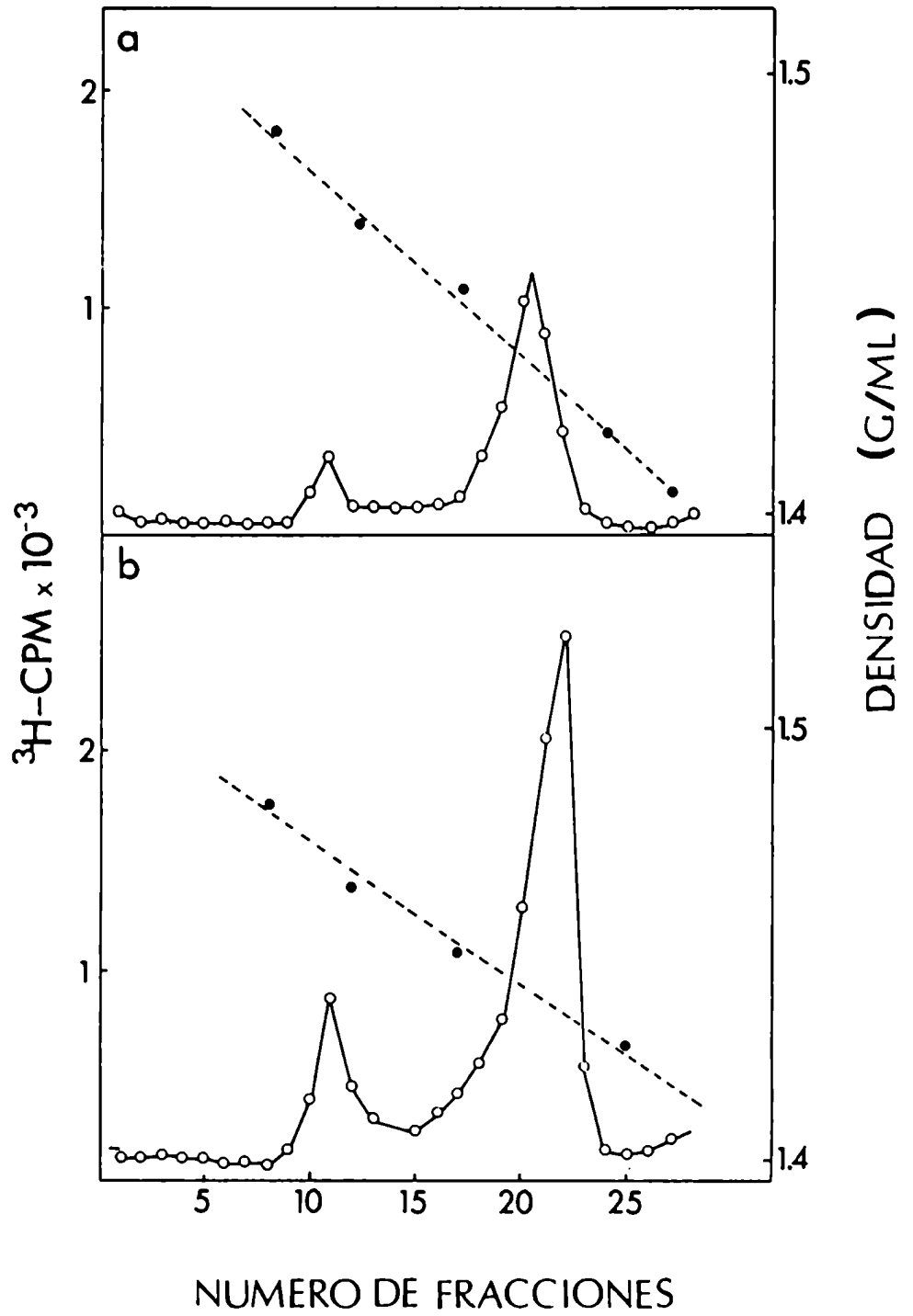


FIGURA N° VII.- Determinación de la densidad en cloruro de cesio de la cepa atenuada y salvaje del virus  $\Lambda_{24}$  Cruzeiro

Células BHK-21 ( $10^8$ ) fueron infectadas con virus  $\Lambda_{24}$  Cruzeiro atenuado o salvaje a una alta multiplicidad de infección. A los 180 min post-infección fueron marcadas con 100 uCi de  $^3\text{H}$ -Uridina en presencia de actinomicina D (5 ug/ml). Se cosechó el virus al observar efecto citopático total. El sobrenadante vírico clarificado y concentrado se purificó por centrifugación en gradientes 10-30% de sacarosa (p/v) en buffer NET pH 7,4 a 100.000 x g durante 180 min a 4°C. Se recogieron fracciones de 0,5 ml cada una.

Las fracciones del pico viral diluidas en un volumen igual de buffer NET pH 7,4 se centrifugaron a 200.000 x g 50 min a 4°C. El precipitado viral se resuspendió en buffer NET pH 7,4 agregándose cloruro de cesio hasta una concentración final de 1,42g/ml. Los gradientes de cloruro de cesio fueron centrifugados a 144.000 x g durante 16 horas a 4°C. Se recogieron alícuotas de 0,2 ml. Se determinó la densidad de diferentes puntos del gradiente. Alícuotas de cada fracción se precipitaron con TCA 10% y se determinó la radioactividad ácido insoluble.

Se pueden ver los perfiles correspondientes al virus atenuado (A) y al virus salvaje (B).

### III.3.3.- Presencia de partículas virales de mayor densidad

Durante la purificación del virus aftoso en gradientes de densidad en cloruro de cesio se encontró la radioactividad distribuida en dos picos. Uno correspondía a la densidad informada para el virus aftoso (1,43) y el otro tenía una densidad de 1,47 g/ml, coincidente con las partículas densas citadas para otros virus (104,164,222,229) y también para el virus aftoso (201).

La relación de las partículas densas a las partículas virales intactas fue calculada por integración de la radioactividad de las fracciones de densidad de 1,47 g/ml y 1,43 g/ml. Este cálculo se hizo basándose en que las partículas densas y la partícula viral tienen la misma cantidad de proteína y ácido ribonucleico y se marcan de igual modo como ya ha sido demostrado para otros virus (222). Tomando como 100% la radioactividad de la partícula viral (Figura VII) la cantidad relativa de partícula densa es de, aproximadamente, el 30%.

Se demostró también que esta partícula densa no se obtiene por un artefacto de técnica, ya que el pico de densidad de 1,43 g/ml vuelto a centrifugar en un gradiente de cloruro de cesio dio solamente un pico correspondiente a la densidad del virus aftoso normal (Figura VIII).

Observando al microscopio electrónico ambos picos se encontró que el de densidad 1,43 g/ml correspondía a virus entero y en el de mayor densidad (1,47 g/ml) aparecían más partículas rotas durante el tratamiento con acetato de uranilo lo que indicaba su fragilidad. También se demostró que las partículas de mayor densidad eran infecciosas. Resultados similares han sido informados para las partículas densas de poliovirus (164,222) donde la infectividad es menor que la de la partícula viral.

### III.3.4.- Análisis de los ácidos ribonucleicos virales. Mapeo de oligonucleótidos

#### III.3.4.1.- Fraccionamiento de oligonucleótidos por electroforesis bidimensional

La primera etapa de separación de oligonucleótidos pequeños en la electroforesis bidimensional depende, principalmente, de la carga neta

FIGURA N° VIII

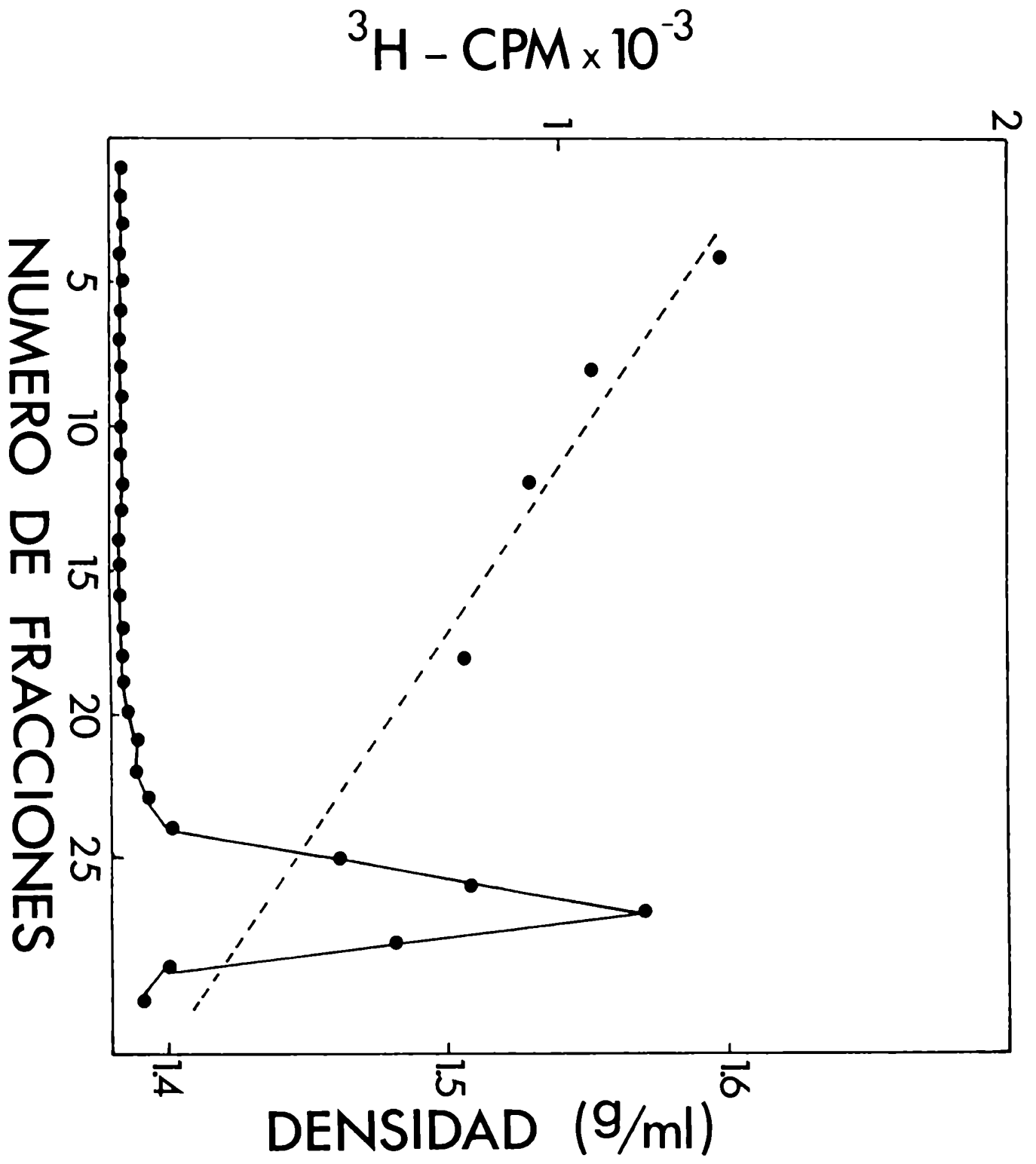


FIGURA N° VIII.- Centrifugación del pico de partícula viral (densidad 1,43 g/ml) en cloruro de cesio

El pico de virus atenuado de densidad 1,43 g/ml (Figura VII) se purificó en un gradiente de cloruro de cesio concentración final 1,42 g/ml en las mismas condiciones que las ya señaladas en la leyenda de la Figura 7. Se recogieron fracciones de 0,2 ml, determinándose la densidad de las mismas. Alícuotas de cada fracción se precipitaron en TCA 10% y se determinó la radioactividad ácido insoluble.

de los mismos. Dado que se realiza a pH ácido, la carga neta va a depender de la composición de bases. Esto es así ya que su pequeño tamaño impide un tamizado apreciable en geles de acrilamida 10%. En cambio sí se produce la separación de los oligonucleótidos mas grandes en base al tamaño molecular, efecto que se superpone con el fraccionamiento de los mismos en base a sus cargas.

El fraccionamiento en una segunda dimensión en geles de acrilamida 20% a pH 8,3 y en ausencia de urea, depende del tamaño molecular y el efecto del tamizado es suficiente para separar por diferencias de tamaño los distintos tipos de oligonucleótidos en clases de nucleótidos de tamaño mayor al mononucleótido. Los fragmentos así separados se ubican en una serie de manchas acordes a su contenido en uracilo, con un retraso progresivo en ambas dimensiones por incremento de su contenido en adenina y citosina. El uso de tris-borato en la segunda dimensión y de un mayor tamaño de las placas de vidrio, incrementa la resolución de los oligonucleótidos mayores (74).

#### III.3.4.2.- Mapeo de los oligonucleótidos de los ácidos ribonucleicos de los virus aftosos estudiados

Para facilitar la comprensión del proceso de atenuación y su posterior cambio al estado virulento, se realizó el estudio de las diferencias a nivel molecular entre la cepa atenuada y la virulenta. Para analizar las variaciones genómicas producidas en los pasajes del virus por embrión de pollo que condujeron a la atenuación para bovinos, se realizó el mapeo por electroforesis bidimensional de los oligonucleótidos radioactivos marcados con  $^{32}\text{P}$  resistentes a la digestión por ribonucleasa  $T_1$ .

En tal sentido, se prepararon para su análisis los siguientes stocks de virus:  $\Lambda_{24}$  Cruzeiro salvaje, clona 835 atenuada y clona 835 revertante. Los tres virus producidos en células DMK-21 fueron concentrados y purificados en gradientes 5-30% de sacarosa (p/v) en buffer NET pH 7,5. Las fracciones correspondientes a cada pico viral se colectaron y se hizo la extracción del ácido ribonucleico con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico.

El ARN viral así obtenido fue purificado en gradientes 15-30% de sacarosa en buffer NET (p/v) con 0,5% de sarcosil, reextraído, concentrado y posteriormente digerido con ribonucleasa T<sub>1</sub>. Esta enzima corta específicamente en residuos de guanosina quedando un hidroxilo en posición 5'. Se obtiene un ARN que consiste de oligonucleótidos de un rango variable de tamaños, ninguno con residuos internos de guanosina.

Los oligonucleótidos producidos por la digestión con la ribonucleasa T<sub>1</sub> fueron marcados "in vitro" con la enzima polinucleótido quinasa, en presencia de ATP-  $\gamma$  -<sup>32</sup>P. Esta enzima introduce un fósforo radioactivo en la posición 5' del oligonucleótido (147). Los oligonucleótidos marcados se separaron por electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (74,214). Los mapas de oligonucleótidos se obtuvieron por autoradiografía de los geles usando películas Kodak X-Omat. Los mapas de oligonucleótidos de los tres virus pueden verse en las Figuras IX, X, XI y XII.

El mapa de oligonucleótidos de la cepa  $\Lambda_{24}$  Cruzeiro salvaje (Figura IX) es totalmente similar al previamente reportado para la cepa  $\Lambda_{24}$  Cruzeiro (157). Si se compara con el obtenido para la clona 835 atenuada (Figura X) se encuentra que difieren en sólo dos oligonucleótidos (A y B) que aparecen en este último. Dichos oligonucleótidos mapean en la zona correspondiente a la de los oligonucleótidos de bajo peso molecular y corresponden a un tamaño entre 5 y 10 nucleótidos.

En la Figura XI se puede observar los mapas de oligonucleótidos correspondientes a la zona que va desde el origen de siembra hasta la zona mapeada en las Figura IX y X, que comprende el lugar en que migran los poli(C). La presencia de un tramo de poli(C) en el virus aftoso fue informada por Brown y col. (88) y confirmado por Frisby y col. (74). Este oligonucleótido se mueve muy lentamente en la primera dimensión y puede ser fácilmente separado del resto de los fragmentos. Además, el análisis de los oligonucleótidos tratados con ribonucleasa A mostraron que no había otros productos que contuvieran más de 10 residuos de citosina (88).

Como puede apreciarse no existen diferencias entre los poli(C) de la cepa salvaje (Figura XI-A) y los de la clona 835 atenuada (Figura XI-B). Estos resultados difieren con los encontrados por Harris y Brown (89) para una cepa de virus aftoso SAT<sub>1</sub> atenuada por pasajes seriados en c $\acute{e}$



lulas BHK-21, en la cual disminuía el número de nucleótidos del poli(C). Por lo tanto, se podría afirmar que en el virus  $\Lambda_{24}$  Cruzcero atenuado el acortamiento del poli(C) no estaría relacionado con el fenómeno de atenuación.

En la Figura XII se muestra el mapa de oligonucleótidos de la clona 835 atenuada con 9 pasajes por células BHK-21 (es decir, clona 835 revertante). Los oligonucleótidos A y B correspondientes a la atenuación apenas son perceptibles (se encuentran en relación submolar) debido a que la población atenuada está presente en dicho pasaje en muy baja proporción respecto a la revertante (Figura I). Tampoco se encontró diferencias entre el poli(C) de esta revertante y los de la cepa salvaje y clona 835 atenuada. Por lo tanto, los mapas de oligonucleótidos de la cepa salvaje y de la clona 835 revertante son idénticos.

En las Figuras IX, X y XII se puede observar la presencia de poli(A). Este es un tramo de ácido poli-adenílico que varía en su longitud, pudiendo tener desde 15 residuos (en cardiovirus) a cerca de 90 residuos de adenina (en poliovirus) (74).

FIGURA N° IX

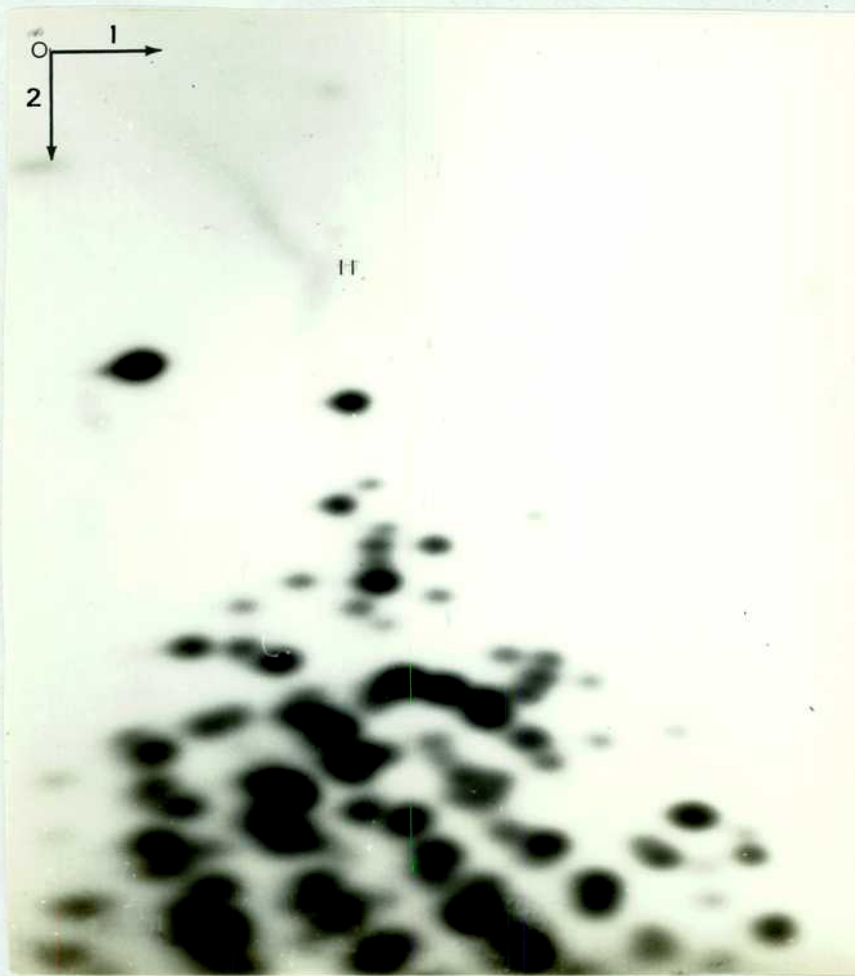


FIGURA N° IX.- Autoradiografía del gel bidimensional de poliacrilamida de los oligonucleótidos resistentes a RNasa T<sub>1</sub> del virus A<sub>24</sub> Cruzeiro salvaje.

Células BHK-21 fueron infectadas con virus A<sub>24</sub> Cruzeiro salvaje a una m.o.i. = 10. cosechándose al tener ECP total. Los sobrenadantes virales se clarificaron y se concentraron por centrifugación a 144.000 x g durante 55 min a 4°C. El precipitado viral, resuspendido en buffer NET y tratado con 1% de sarcosil, fue purificado en gradientes 5-30% de sacarosa (p/v) centrifugando durante 75 min a 200.000 x g a 4°C.

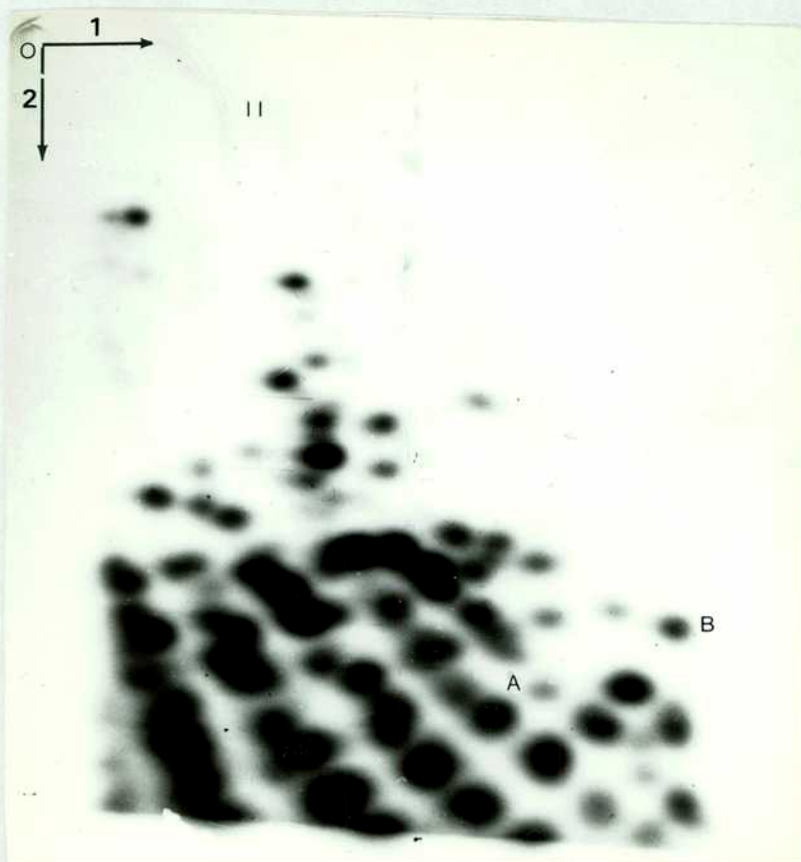
Se extrajo el ARN viral con fenol cloroformo y se precipitó a -20°C en etanol agregando 0,2M NaCl. El ARN fue purificado en gradientes 15-30% de sacarosa en NET (p/v) con 0,5% de sarcosil, centrifugando a 200.000 x g durante 6 horas a 4°C.

Se separaron las fracciones correspondientes al pico de ARN viral y se precipitó en las condiciones ya indicadas.

Este ácido ribonucleico, resuspendido en buffer ET, fue digerido con 8 U/ug de RNasa T<sub>1</sub>. Los oligonucleótidos obtenidos fueron marcados "in vitro" con ATP- $\gamma$ -<sup>32</sup>P en presencia de PNK. Estos oligonucleótidos fueron separados por electroforesis bidimensional y autoradiografiados en las condiciones indicadas en Materiales y Métodos.

El origen (0) se encuentra en el borde izquierdo superior y las flechas indican el sentido de la primera y segunda dimensión. El poli(A) está marcado con II

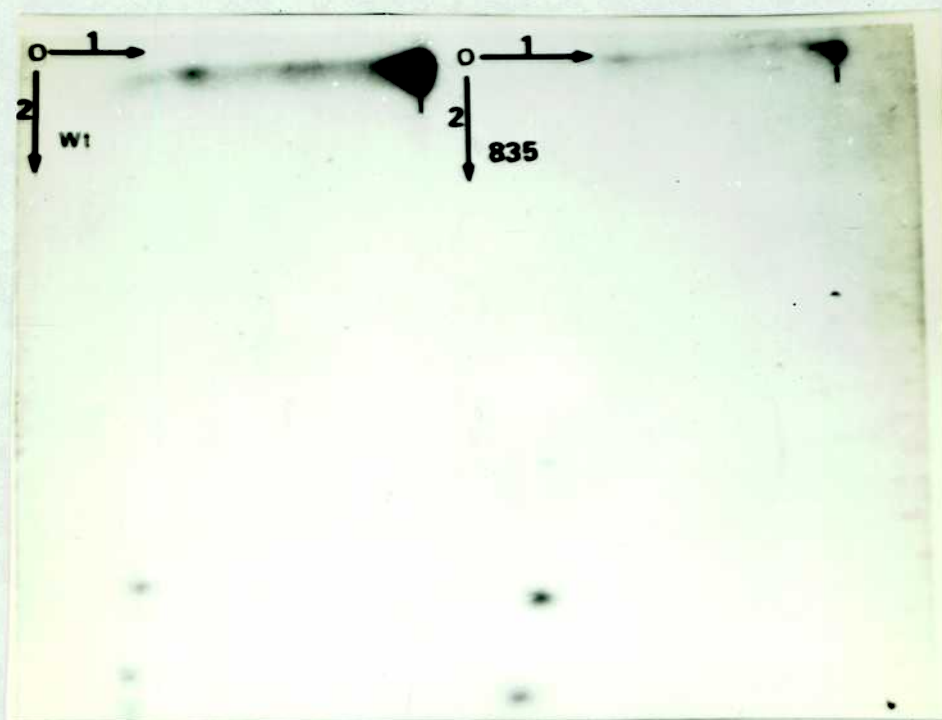
## FIGURA N° X



Autoradiografía del gel bidimensional de poliacrilamida de los oligonucleótidos resistentes a RNasa  $T_1$  de la clona 835 atenuada. A y B son los oligonucleótidos correspondientes a la atenuación. El poli (A) está marcado con II. El origen (0) se encuentra en el borde superior izquierdo y las flechas indican en sentido de la primera y segunda dimensión.

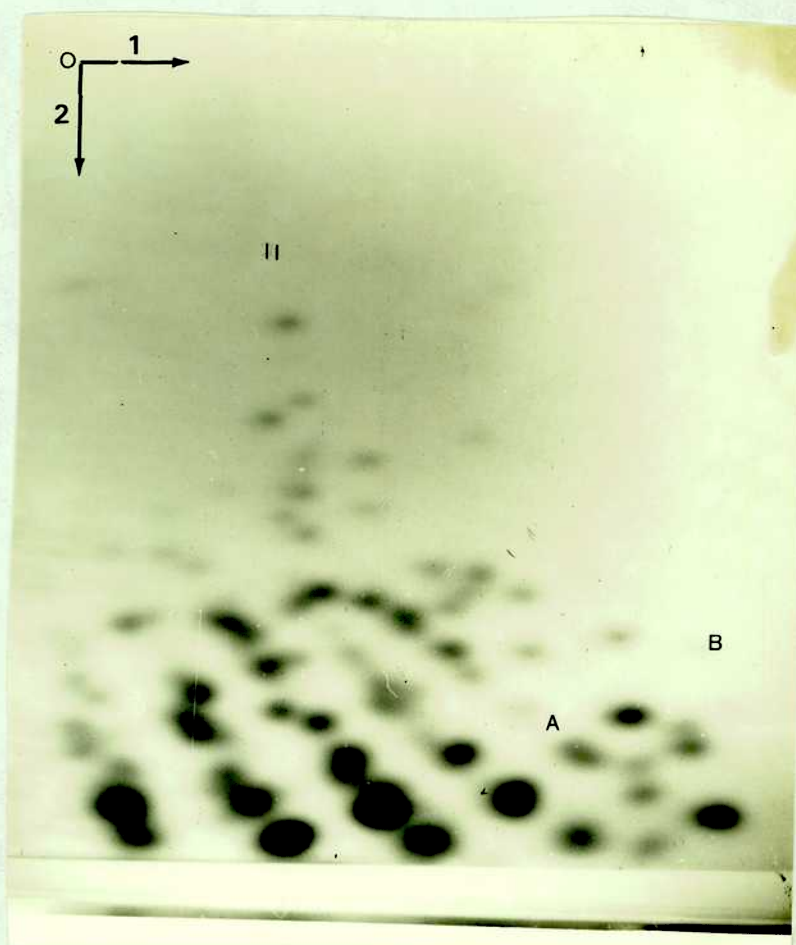


FIGURA N° XI



Autoradiografía del gel bidimensional de poliacrilamida de los dígonucleótidos resistentes a RNasa T<sub>1</sub> correspondientes a la zona desde el origen de siembra hasta las mapeadas en las Figuras IX y X, pertenecientes a los virus  $\Lambda_{24}$  Cruzeiro salvaje (wt) y clona 835 atenuada. El poli(C) está marcado con I. El origen (C) se encuentra en el borde izquierdo superior y las flechas indican el sentido de la primera y segunda dimensión.

FIGURA N° XII



Autoradiografía del gel bidimensional de poliacrilamida de los oligonucleótidos resistentes a RNasa  $T_1$  de la clona 835 revertante. El origen (0) está en el borde superior izquierdo y las flechas indican el sentido de la primera y segunda dimensión. El poli(A) está marcado con II.

IV.- DISCUSION

En el desarrollo de este tema de tesis se ha realizado la caracterización de la cepa de virus aftoso A<sub>24</sub> Cruzeiro atenuada para bovinos por pasajes seriados en embrión de pollo. Se han analizado no solamente sus propiedades biológicas y físicoquímicas sino también su capacidad interferente en la replicación del virus salvaje.

Se ha observado que la cepa atenuada manifiesta una marcada disminución de la citopatogenicidad en células de RFB (Tablas 1 y 2), la cual podría correlacionarse con la reducción de la patogenicidad en bovinos. Se detectó, además, un estado de interferencia en la replicación del virus A<sub>24</sub> Cruzeiro salvaje en presencia de la cepa atenuada homóloga, cuando las infecciones se realizaban en células de RFB.

Los factores que podían ser responsables de la inducción de la interferencia, como el interferón, partículas DI o la cepa atenuada "per se" fueron analizados durante el desarrollo de este trabajo.

Estudios previos realizados con el virus aftoso habían permitido establecer que por utilización de mutantes ts (148) o de virus modificado de baja velocidad de multiplicación (176,178,182-183), se favorece la síntesis de interferón, el cual interfiere la replicación del virus salvaje. Sin embargo, frente a los resultados observados, la inducción de interferón por el virus atenuado fue descartada (Figura III, Tablas 7 y 8).

La participación de partículas DI en el fenómeno de interferencia no fue un problema de solución sencilla dado que su presencia no pudo evidenciarse en gradientes de sacarosa (Figura VI), de doruro de cesio (Figura VII) ni en geles de agarosa. Este último resultado probablemente haya sido consecuencia de no haber encontrado las condiciones óptimas para separarlas en este tipo de geles. Teniendo en cuenta la posible degradación parcial de los ácidos ribonucleicos virales por acción de la nucleasa asociada al virus (58), cuya acción pudo ser eficiente por el lento ciclo de replicación del virus atenuado.

No se descarta su presencia dentro de la población viral caracterizada en este trabajo dado que, si bien no han sido caracterizadas en todos los sistemas virales, existen pocas dudas de que esten distribuídas u-



niversalmente y tengan un rol significativo en la replicación del virus (97-98). La única evidencia acerca de la presencia de estas partículas en mi sistema de estudio fueron los pasajes seriados sin diluir del virus atenuado (Figura II-A), en los cuales se observó un modelo cíclico de infección característico de las partículas DI (101,140). En pasajes diluidos los ciclos de infección muestran un valor constante en el título infeccioso a través de los sucesivos pasajes (Figura II-B). Si bien ambas poblaciones virales podían separarse biológicamente, igual se obtuvo interferencia con la población original diluida, indicando que el rol de las partículas DI en este fenómeno no es determinante.

Los datos obtenidos indicaban que se trataba de interferencia específicamente inducida por el virus atenuado.

La interferencia en los primeros pasos del ciclo de replicación -tales como adsorción y penetración- fue descartada, demostrándose interferencia en células infectadas con el virus salvaje y superinfectadas con el virus atenuado (Figura III, Tabla 8).

La interferencia viral se puso de manifiesto en ensayos de infectividad (Tabla 7), de síntesis de ácidos nucleicos (Figura III, Tabla 8) y síntesis de proteínas virales intracelulares (Figura V). Además, la interferencia fue dependiente de la multiplicidad de infección (Tabla 9) tanto como del tiempo de infección (Figura V, Tabla 7) del virus atenuado.

En las condiciones adecuadas de multiplicidad de infección, el virus atenuado puede suprimir completamente la producción del virus salvaje homólogo, aún cuando la cepa atenuada no puede completar su propio proceso de replicación. Aparentemente, la replicación del virus salvaje estaría detenida en algún estadio anterior a la síntesis de ácido ribonucleico. Posiblemente, el evento que causa interferencia en ausencia de multiplicación ocurra antes que el virus interferente induzca su ARN polimerasa. Una evidencia en favor de esta hipótesis es que el virus atenuado no sintetiza su propio ARN ni sus proteínas específicas en células de RFB. Esta situación es similar a la interferencia obtenida entre poliovirus y una cepa del mismo que no puede multiplicar (145).



Probablemente, alguno de los modelos propuestos para las cepas de poliovirus que no multiplican pudiera explicar el fenómeno que ocurre con la cepa atenuada del virus aftoso  $A_{24}$  Cruzeiro. Uno de ellos supone que los dos ácidos ribonucleicos compiten por un mismo sitio para la síntesis de sus ARN. El ARN viral interferente podría ocupar en forma irreversible el sitio más accesible, dejando el menos accesible para el ARN del virus salvaje o también podría existir una competencia reversible con el ARN del virus salvaje, en cuyo caso la interferencia podría seguir simplemente la ley de acción de masas.

Otro modelo propone la participación de proteínas específicas (codificadas por el virus o por el huésped) que son inducidas por el virus interferente y, de este modo, inhibirían la replicación del ARN del virus homólogo. Si bien por la sensibilidad del método empleado no se detectaron proteínas virales de la cepa atenuada en células infectadas (Figura V, calles 3 y 4), no puede descartarse la presencia de las mismas actuando a muy baja concentración o muy bajo peso molecular ya que el gel no permite resolver proteínas con un peso molecular inferior a los 12.500.

Probablemente, el primer modelo explique mejor la reversibilidad que se obtuvo en la interferencia cuando la descarga se hizo con altas multiplicidades del virus  $A_{24}$  Cruzeiro salvaje pero tal vez ninguno de los dos sea el definitivo.

A pesar que en este trabajo se ha descartado la posible contribución del interferón y de las partículas DI en el fenómeno de interferencia, estableciéndose una relación entre el fenómeno de interferencia y la infección con la cepa atenuada, estos resultados no pueden extrapolarse a lo que ocurriría en el bovino vacunado con este tipo de virus. En estas condiciones, es probable que exista un equilibrio dinámico entre la replicación residual del virus modificado, la multiplicación de revertantes y la interferencia inducida por la cepa atenuada por interferón y/o por partículas DI.

Por lo tanto, la variabilidad en cuanto al grado de patogenicidad por cepas atenuadas dependería de dicho equilibrio. En determinados virus mo dificados esta regulación de la replicación mantendría los niveles de virus lo suficientemente bajos para no producir patogenicidad pero daría lugar a una síntesis activa de anticuerpos que permitirían proteger al bovino.

La atenuación para células de RFB desaparecía luego de 8 a 9 pasajes del virus  $A_{24}$  Cruzeiro atenuado por células BHK-21, seleccionándose una población no atenuada (Figura II). Debido a la posible heterogeneidad de la población atenuada no se pudo confirmar, en principio, si el cambio en la población se debía exclusivamente a la selección de una subpoblación con características de la cepa salvaje o a mutaciones de la cepa atenuada (reversión) seguida por selección.

Para esclarecer este fenómeno se analizó el comportamiento de una clona atenuada (835) luego de 9 pasajes por células BHK-21 (Tabla 5). Durante el pasaje por células BHK-21 se produjeron mutaciones y selecciones dando como resultado la aparición de revertantes sin características de atenuación. Las revertantes pasan a ser predominantes en la población viral debido a que su ciclo de multiplicación es de 8 horas mientras que el del virus atenuado es de 18 horas.

Esta situación estaría reflejando la variabilidad del virus aftoso que ha llegado a ser considerada excepcional en dos propiedades: virulencia y antigenicidad. La aparición de mutantes letales condicionales ha sido determinada con una frecuencia de  $10^{-3}$  por UFP para mutantes ts y de  $10^{-2,9}$  para mutantes frías (cs), siendo la frecuencia de reversión para una mutación ts entre  $10^{-4,5}$  y  $10^{-5,4}$  por UFP. Teniendo en cuenta estos valores, es de esperar que la variabilidad observada a campo sea debida a la presión de selección a la cual el virus se expone o a la cantidad de multiplicaciones del virus que ocurren en una ruptura de inmunidad, mas que a una excepcional velocidad de mutación (115).

Los resultados de las purificaciones virales no evidenciaron diferencias entre la población salvaje y la atenuada ni en cuanto a su coeficiente de sedimentación en gradientes de sacarosa (Figura VI) ni a su densidad de flotación en cloruro de cesio (Figura VII). Ambas poblaciones presentaron una partícula de mayor densidad (1,47 g/ml) en una relación del 30% respecto al virus normal (densidad 1,43 g/ml) (Figura VII). Como esta población densa se encontró en las dos cepas, no se le pudo atribuir su participación en la interferencia.

Una mayor información de las modificaciones adquiridas en la atenuación y reversión a la virulencia, se obtuvo estudiando las diferencias a nivel molecular. En tal sentido, se analizaron las variaciones produ

cidas en el ARN viral después de los pasajes del virus por embrión de pollo para originar la cepa.

El mapa de oligonucleótidos del virus salvaje difiere del mapa de la clona atenuada en dos oligonucleótidos designados como A y B, que se hallan presentes en este último y no en la cepa salvaje (Figura IX y X). Dichos oligonucleótidos se ubican en la zona de bajo peso molecular del mapa bidimensional de la cepa atenuada. En el mapa de la clona 835 revertante (Figura XII) los oligonucleótidos correspondientes a la atenuación, se encuentran en relación submolar, debido a que la población atenuada está presente en dicho pasaje en muy baja proporción respecto de la revertante.

No se encontró diferencia en la zona del poli(C) de la clona atenuada y la cepa salvaje. Por lo tanto, en la cepa  $A_{24}$  Cruzeiro atenuada usada en este trabajo, el acortamiento del poli(C) no estaría relacionado con el fenómeno de atenuación. Estos resultados difieren con los informados previamente para una cepa del virus aftoso SAT<sub>1</sub> (Clona SAT<sub>1</sub>-82 en la cual la reducción de la patogenicidad fue atribuida a la disminución del número de nucleótidos del poli(C) originado por una deleción de 70 nucleótidos. Sin embargo, es poco probable que esa deleción fuera responsable de la atenuación, dado que la clona SAT<sub>1</sub>-82 recupera su virulencia en sólo 3 pasajes por bovino (89,126).

Si bien se encontraron pequeños cambios que conducían a la aparición de dos oligonucleótidos resistentes a RNasa T<sub>1</sub> determinantes de la atenuación para bovinos, no necesariamente tendrían que haber aparecido ya que por el método de mapeo de oligonucleótidos sólo se tiene información del 10-20% del genoma viral (74). En este caso, se puede asegurar que, por lo menos, se produjeron cambios dentro del genoma no detectándose otros ya que no se dispone de mayor información del resto del ARN.

Teniendo en cuenta que se esperaba detectar grandes modificaciones en el genoma del virus  $A_{24}$  Cruzeiro atenuado luego de los numerosos pasajes por embrión de pollo, los resultados obtenidos permitieron determinar que modificaciones mínimas en el genoma viral pueden ser responsables de la atenuación para bovinos. La cepa salvaje difiere de la cepa atenuada para bovinos por mutaciones puntuales que revierten muy fácilmente en los pasajes por células BHK-21. Esta facilidad de reversión

así como la posible selección de revertantes por el sistema huésped, torna muy peligroso el empleo de este tipo de virus.

Por lo tanto, es importante remarcar el inconveniente en la utilización de esta cepa atenuada para vacunación debido a que, por ser producto de mutaciones puntuales podría revertir induciendo patogenicidad, pudiendo provocar tanto la enfermedad en animales vacunados como el contagio en otros.

V.- RESUMEN

Se ha establecido una correlación entre la infección con la cepa atenuada y el fenómeno de interferencia observado en células de RFB, descartándose la contribución del interferón y las partículas DI en el mismo.

Se ha podido caracterizar la interferencia como un evento que ocurre intracelularmente y que se manifiesta con la inhibición de la síntesis de ácidos ribonucleicos y de proteínas específicas del virus salvaje homólogo.

El virus atenuado revierte al tipo salvaje en pocos pasajes por células BHK-21. Durante estos pasajes se producen mutaciones y selecciones dando como resultado la aparición de revertantes que se hacen predominantes en la población viral. El mapa de oligonucleótidos del virus atenuado difiere del mapa del salvaje por la aparición de dos oligonucleótidos resistentes a RNasa T<sub>1</sub> determinantes de la atenuación para bovinos. En la población revertante estos oligonucleótidos aparecen en relación submolar, dado que la subpoblación atenuada se encuentra en menor proporción dentro de la población revertante. No se encontraron diferencias en el tamaño del poli(C) de los tres virus.

Si bien se esperaba detectar grandes modificaciones en el genoma del virus  $\Lambda_{24}$  Cruzeiro atenuado luego de los numerosos pasajes por embrión de pollo, los resultados permiten determinar que mínimas modificaciones en el genoma viral pueden ser responsables de la atenuación para bovinos.




---

Lic. Patricia S. Polacino




---

Dr. Eduardo L. Palma  
Director de Tesis

VI.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- ABREU MARTINS, I. de (1971) Vacunas antiaftosas hidróxido saponi-  
nadas inactivadas por el formol. Bol. Ctro. Panam.F.A. 1:  
1-19.
- 2.- ADLER, E. (1967). Manual de fijación de complemento para serolo-  
gía de fiebre aftosa. Inst. Nac. Tec. Agrop. (INTA),Bs.As..
- 3.- ALBARACON, D. (1974). Algunos ensayos sobre producción de vacunas  
antiaftosas inactivadas a partir de virus multiplicado en  
conejos neonatos. Bol. Ctr. Panam. F.A. 13-16:30-50.
- 4.- AMBROS, V. y Baltimore, D. (1978). Protein is linked to the 5'  
end of poliovirus RNA by a phosphodiester linkage to tyro-  
sine. J. Biol. Chem. 253:5263-5266.
- 5.- ARMSTRONG, J.A., Edmonds, M., Nakazato, H., Phillips, B. y Vau-  
ghan, M.H. (1972). Polyadenylic acid sequences in the vi-  
rion RNA of poliovirus and eastern equine encephalitis vi-  
rus. Science 176:526-528.
- 6.- AUGÉ de MELLO, P., Honigman, M.N. y Fernández, M.V. (1966). Super-  
vivencia en bovino del virus modificado de la fiebre afto-  
sa. Bull. Off. int. Epiz. 65(11-12):2091-2106.
- 7.- ————, ————, ————, y Süttmoller, P. (1980). Detección del virus de  
la fiebre aftosa en material faríngeo de bovinos sacrifi-  
cados en matadero. Bol. Ctro. Panam. F.A. 39-40:63-65.
- 8.- BACHIRACH, H.L. (1964). Foot-and-mouth disease virus:structure and  
mechanisms of degradation as deduced from absorbance-tempe-  
rature relationships. J. Mol. Biol. 8:348-358.
- 9.- ————, ————. (1968). Foot-and-Mouth disease. Rev. Microb. 22:  
201-244.
- 10.- ————, ————. (1978). Comparative strategies of animal virus re-  
plication. En "Advances in virus research", ed. M.A. Lauf-  
fer y col., 22:163-186, Acad. Press., N.Y.
- 11.- ————, ————, Breese, S.S. Jr., Callis, J.J., Hess, W.R. y Pat-  
ty, R.E. (1957). Inactivation of foot and mouth disease vi-  
rus by pH and temperature changes and by formaldehyde. Proc.  
Soc. Exp. Biol. Med. 95:147-152.
- 12.- DALESTRINI, J., Bernal, C., Jiménez, J.M., Maldonado, A., Castañe-  
da, J.M. y Gómez, G. (1976). Últimas observaciones sobre  
el comportamiento de las vacunas a virus vivo contra la  
fiebre aftosa en Venezuela. Rvta. Vet. Trop. 1(1):3-14.
- 13.- BARBONI, E. y Manocchio, L. (1962). Severe diffuse changes in pan-  
creas with disappearance of B cells. Arch. Vet. Ital. 13:  
477.
- 14.- BRAWERMAN, G. (1974). Eukaryotic messenger RNA. Ann. Rev. Biochem. 43:621-642.
- 15.- BENGTTSSON, S., Dinter, Z. y Philipson, L. (1963). Genetic markers  
associated with virulence of foot-and-mouth disease virus.  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 113:1019-1022.

- 16.- BERNAL, L.C., Cunha, R.G., Honigman, M.N. y Gómez, I. (1966). Estudio sobre la modificación de una muestra de virus de fiebre aftosa (tipo A Valleé) y su utilización como vacuna. Proc. 5th. Pan-Amer. Cong. Vet. Med. and Zoot. 2:42-58.
- 17.- ———, —.—, Balestrini, J., Castro, G., Espinoza, M., Castañeda, J.M., Chaurell, A. y Adrian, M. (1981). Comparación de las vías intranasal e intramuscular de vacunación con virus atenuado de la fiebre aftosa tipo "O". Bol. Ctro. Panam. F.A. 41-42:43-45.
- 18.- ———, —.—, Campos, E., Espinoza, M., Adrian, M., Chaurell, A., Jiménez, J., Gómez, I., Freitas Costa, K. de y Ferreira, M.E.M. (1981). Vacunación y revacunación intranasal de bovinos con vacuna antiaftosa producida con la cepa atenuada de virus O<sub>1</sub> Campos. Bol. Ctro. Panam. F.A. 41-42:51-56.
- 19.- BORGEN, H.C. y Schwobel, W. (1964). A plaque marker of type C foot-and-mouth disease virus strain from a porcine epizootic. Nature 202:932-933.
- 20.- BORGHI, G., Galiardi, G. y Zoletto, R. (1965). Antigenicity of foot and mouth disease virus inactivated by glyceraldehyde. Atti. Soc. Ital. Sci. Vet. 19:754-757.
- 21.- BROOKSBY, J.B. (1966). Standards for modified strain vaccines in foot and mouth disease. Bull. Off. int. Epiz. 65(11-12): 1941-1947,
- 22.- ———, —.—. (1968) La fiebre aftosa un problema mundial. Bol. Ofic. Sanit. Panam. 54(5):377-385.
- 23.- ———, —.—. (1971). Vacunas preparadas en riñón de hamster lactante (BIK).III. Reunión interamericana sobre el control de la fiebre aftosa y otras zoonosis. OMS 218:55-60.
- 24.- BROWN, F. y Crick, J. (1959). Application of agar gel diffusion analysis to a study of the antigenic structure of inactivated vaccines prepared from the virus of foot-and-mouth disease. J. Imm. 32:444-447.
- 25.- ———, —.—, Hyslop, H.St.G., Crick, J. y Morrow, A.W. (1963). The use of acetyleneimine in the production of inactivated foot and mouth disease vaccines. J. Hyg. 61:337-344.
- 26.- ———, —.—, Cartwright, B. y Stewart, D.L. (1963). The effect of various inactivating agents on the viral and ribonucleic acid infectivities of foot-and-mouth disease virus and on its attachment to susceptible cells. J. gen. Microb. 31:179.
- 27.- ———, —.— y Hull, R. (1973). Comparative virology of the small RNA virus. J. gen. Virol. 20:43.
- 28.- BURNES, A.T.H., Pardoe, I., Duffy, E.M., Bhalla, R.B. y Goldstein, N.O. (1977). The size and location of poly(A) tract in EMC virus RNA. J. gen Virol. 34:331-344.
- 29.- BURROWS, R. (1966). Studies on the carrier state of cattle exposed to foot and mouth disease virus. J. Hyg.(Camb)64:81-90.
- 30.- ———, —.—. (1972). Excretion of foot-and-mouth disease virus prior to development of lesions. Vet. Rec. 82:387-388.

- 31.- \_\_\_\_\_, -, Mann, J.A. Greig, A., Chapman, W.G. y Goodridge, D. (1971). The growth and persistence of foot and mouth disease virus in the bovine mammary gland. *J. Hyg. (Camb)* 69:307.
- 32.- BURROUGHS, J.N., Rowlands, D.J., Sangar, D.V., Talbot, P. y Brown F. (1971). Further evidence for multiple proteins in the foot and mouth disease virus particle. *J. gen. Virol.* 13:73.
- 33.- BUTTERWORTH, B.E. y Rueckert, R.R. (1972). Gene order of encephalomyocarditis virus as determined by studies with pactamycin. *J. Virol.* 9:823-828.
- 34.- CALLIS, J.J. (1974). Fiebre aftosa en bovinos. Algunas relaciones entre la patogenicidad y la epizootiología. *Bol. Ctro. Panam. P.A.* 13-16:9-17.
- 35.- CAMPBELL, C.H. (1963). Influence of tissue culture passage on virulence of foot-and-mouth disease virus for mother mice. *J. Bact.* 86:593-597.
- 36.- \_\_\_\_\_, -.-. (1967). Regrowth of primary cell cultures after infection with foot and mouth disease virus. *Am. J. Vet. Res.* 28:1601-1603.
- 37.- \_\_\_\_\_, -.-. (1979). Selection of foot and mouth disease virus by passage in bovine and kidney cells cultures. *Vet. Microb.* 4(1):1-10.
- 38.- CAPSTICK, P.B., Telling, R.C., Chapman, W.G. y Stewart, D.L. (1962) Growth of a cloned strain of hamster kidney cell in suspended cultures and their susceptibility to the virus of foot and mouth disease. *Nature* 195:1163-1164.
- 39.- CARBREY, E.A., Stewart, W.C., Kreece, J.I. y Lee, L.R. (1966). Technical aspects of tissue culture fluorescent antibody technique. *Proc. 69 th. Ann. Meet. U.S. Livestock. Sanit. Ass., 1965*, 487-500.
- 40.- CHATTERJEE, N.K., Cachrach, H.L. y Polatnick, J. (1976). Foot-and-mouth disease virus RNA. Presence on 3' terminal poly riboadenylic acid and absence of amino acid binding ability. *Virol.* 69:369-377.
- 41.- COLE, C.N., Smoler, D., Wimmer, E. y Baltimore, D. (1971). Defective interfering particles of poliovirus. I. Isolation and physical properties. *J. Virol.* 7:478.
- 42.- \_\_\_\_\_, -.-. y Baltimore, D. (1973a). Defective interfering particles of poliovirus. II. Nature of the defect. *J. Mol. Biol.* 76:325.
- 43.- \_\_\_\_\_, -.-. y \_\_\_\_\_, -. (1973b). Defective interfering particles of poliovirus. III. Interference and enrichment. *J. Virol.* 12:1414.
- 44.- \_\_\_\_\_, -.-. y \_\_\_\_\_, -. (1973c). Defective interfering particles of poliovirus. IV. Mechanisms of enrichment. *J. Virol.* 12:1418.
- 45.- COMMITTEE on Nomenclature of the National Foundation for Infantile paralysis (1948). *Science* 108:701.



- 46.- COOPER, P.D., Agol, V.I., Bachrach, H.L., Brown, F., Ghendon, Y., Gibbs, A.J., Gillespie, J.H., Lonberg-Holm, K., Mandel, D., Melnick, J.L., Mohanty, S.B., Povey, R.C., Rueckert, R.R., Schaffer, F.C., Tyrrell, D.A.J. (1978). Picornaviridae: Second report. *Interv.* 10:165-180.
- 47.- COTTRAL, G.E. (1972). Diagnosis of bovine vesicular diseases. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 161 (11):1293-1298.
- 48.- ———, ———, Gailiunas, P. y Cox, B.F. (1968). Foot and mouth disease virus in semen of bulls and its transmission by artificial insemination. *Arch. ges. Virusforsch.* 23:362.
- 49.- ———, ———, Patty, R.E., Gailiunas, P. y Scott, F.W. (1966). Relationships of foot-and-mouth disease virus plaque size on the cell cultures to infectivity of cattle by intramuscular inoculation. *Arch. ges. Virusforsch.* 3:276-293.
- 50.- CRANDELL, R.A. y Gómez, I. (1970). Plaque morphology of some South American strains of foot-and-mouth disease virus and the effects of polyonic compounds on plaque formation. *Arch. ges. Virusforsch.* 30:137-146.
- 51.- ———, ———. y ———, ———. (1970). Further studies on markers of foot and mouth disease virus. *Bull. Off. int. Epiz.* 73 (5-6):521-533.
- 52.- CUNHA, R.G. y Einchhorn, E.A. (1959). Studies with rabbit adapted foot and mouth disease virus. I. Propagation and pathogenicity. *Am. J. Vet. Res.* 20:133.
- 53.- ———, ———, Bernal, C., Honigman, M.N. y Gómez, I. (1964). Vaccinations bivalentes and deux souches modifiés de virus aphteux. *Bull. Off. int. Epiz.* 61(7/8):801-818.
- 54.- DALSGAARD, K. (1974). Saponin adjuvants. III. Isolation of a substance from *Quillaja saponaria molina* with adjuvant activity in foot and mouth disease vaccine. *Arch. ges. Virusforsch.* 44:243-245.
- 55.- ———, ———, Jensen, M.H. y Sorensen, K.J. (1966). Saponin adjuvants. IV. Evaluation of the adjuvant Quil A in the vaccination of cattle against foot and mouth disease. *Acta Vet. Scand.* 18:349-360.
- 56.- ———, ———. y Jensen, M.H. (1977). Saponin adjuvants. VI. The adjuvant activity of Quil A in trivalent vaccination of cattle and guinea pigs against foot and mouth disease. *Acta Vet. Scand.* 18:367-373.
- 57.- DAVIS, B.O., Dulbecco, R., Eisen, H.N., Ginsberg, H.S. y Barry Wood, W. (1978). *Tratado de Microbiología*. SALVAT ed., Barcelona, España.
- 58.- DENOYA, C.D., Scodeller, E.A., Gimenez, B.H., Vasquez, C. y La Torre, J.L. (1978). Foot and mouth disease. I. Stability of its ribonucleic acid. *Virol.* 84:230-235.
- 59.- DINTER, Z. (1958). Interferency zwischen cytopathogenen und nicht-cytopathogenen partikeln des virus der Maul und Klauen-sucht (MKS). *Arch. ges. Virusforsch.* 8:42.
- 60.- ———, ———. (1960). Interference in the system consisting of foot and mouth disease virus and cell cultures of calf kidney. *Bull. Off. int. Epiz.* 53:651-653.

- 61.- ———, —., Philipson, L. y Wessien, T. (1959). Persistent foot and mouth disease infectious of cells in tissue culture. *Virol.* 8:542-544.
- 62.- ———, —. y Philipson, L. (1962). An interferon produce by foot and mouth disease virus (FMDV) in calf kidney cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 109:893.
- 63.- DOUGHERTY, E., Seibold, H.R. y Patty, R.E. (1968). Effects of chronic residence on size and size distribution of plaques of type A foot and mouth disease virus in primary calf kidney cell cultures. *Am. J. Vet. Res.* 29(3):693-701.
- 64.- DULBECCO, R. (1952). Production of plaques in monolayer tissue culture by single particles of an animal virus. *Proc. Nat. Acad. Sci.(USA)* 38:747.
- 65.- ESKILDSEN, M.K. (1969). Experimental pulmonary foot-and-mouth disease infection of cattle. Europe Comm. Cntr. FMD Rep. Meet. Res. Group. Standing Tech. Comm., Lindhol, Denmark, Rome, FAO, U.N. 124 pp.
- 66.- FAYET, M.T., Peterman, H.G., Fontaine, J., Terre, J. y Roumiantzef, M. (1967). Use of the propiolactone as an inactivating agent in the preparation of anti foot-and-mouth disease vaccines. *Ann. Inst. Pasteur* 112(1):65-77.
- 67.- FENNER, F. (1968). *The Biology of Animal Viruses*, vol. 1, pp.351-400, Acad. Press, N.Y.
- 68.- FERNANDEZ, M.V. (1972). Ultimos avances en vacunas contra la fiebre aftosa. *Bol. Ctro. Panam. F.A.* 8:1-14.
- 69.- FIRPO, E. y Palma, E.L. (1979). Inhibition of foot and mouth disease virus and procapsid synthesis by zinc ions. *Arch. Virol.* 61:175-181.
- 70.- FRENKEL, H.S. (1951). Research on foot and mouth disease. III. The cultivation of the virus on a practical scale in explanations of bovine tongue epithelium. *Am. J. Vet. Res.* 12:187.
- 71.- ———, —.—. (1955). Inactivation of viruses for the production of foot and mouth disease vaccines. *Bull. Off. int. Epiz.* 43:624-631.
- 72.- FRIEDMAN, R.M. (1977). The antiviral activity of interferon. *Bact. Rev.* 41:543-567.
- 73.- ———, —.—. y Ramseur, J.M. (1979). Mechanisms of persistent infectious by cytopathic viruses in tissue culture. *Arch. Virol.* 60:83-103.
- 74.- FRISBY, D.P., Newton, C., Carey, N.H., Fellner, P., Newman, J.F. E., Harris, T.J.R. y Brown, F. (1976). Oligonucleotide mapping of Picornavirus RNAs by two dimensional electrophoresis. *Virol.* 71:379-388.
- 75.- GALLOWAY, I.A. (1962). Results of the use of two live attenuated strains vaccines RH0-1 (SAT<sub>2</sub> type) and RV-11 (SAT<sub>1</sub> type) in controlling outbreaks of foot and mouth disease. *Bull. Off. int. Epiz.* 57(5/6):748-788.
- 76.- GOLDSMITH, L. (1962). Recovery of virus from cattle inoculated with foot and mouth live modified strains (Kemron) and their apparent multiplication and distribution in vivo. *Bull. Off. int. Epiz.* 57(5/6):789-791.

- 77.- \_\_\_\_\_, -. y Barzili, E. (1964). Differences between some growth characteristics of attenuated and virulent foot and mouth disease virus strain. Bull. Off. int. Epiz. 61(7-8): 819-824.
- 78.- GOLDSTEIN, N.O., Pardoe, I.U. y Burness, A.T.H. (1976). Requirement of an adenylic acid rich segment for the infectivity of EMC RNA. J. gen. Virol. 31:271-278.
- 79.- GOMEZ, I. y Crandell, R.A. (1969). Marker studies of foot and mouth disease virus. Bull. Off. int. Epiz. 71(5-6):835-846.
- 80.- GOMEZ YAFAL, A. y Palma, E.L. (1979). Morphogenesis of foot and mouth disease virus. I. Role of procapsids as virion precursors. J. Virol. 30(3):643-649.
- 81.- GORDON, J. y Minks, M.A. (1981). The interferon renaissance: molecular aspects on induction and action. Microb. Rev. 45(2): 244-266.
- 82.- GRANOFF, A. (1961). Induction of Newcastle disease virus mutants with nitrous acid. Virol. 13:402-408.
- 83.- GRAVES, J.H., McVicar, J.W., Sutmöller, P., Trautman, R. y Wagner, G.G. (1971). Latent viral infection in transmission of foot and mouth disease by contact between infected and susceptible cattle. J. Infect. Dis. 124(3):270-276.
- 84.- \_\_\_\_\_, -. ., \_\_\_\_\_, -. ., \_\_\_\_\_, -. y \_\_\_\_\_, -. (1971). Contact transmission of foot and mouth disease from infected to susceptible cattle. J. Infect. Dis. 123(4):386-391.
- 85.- \_\_\_\_\_, -. ., \_\_\_\_\_, -. . y Yedloutsching, R.J. (1977). Review of the VIA reaction in diagnosis of foot and mouth disease 81st. annual meeting of the U.S. Animal Health Association, Minneapolis, Minnesota.
- 86.- GRUBMAN, M.J. (1980). The 5' end of foot-and-mouth disease virion RNA contains a protein covalently linked to the nucleotide pUp. Arch. Virol. 63:311-315.
- 87.- \_\_\_\_\_, -. ., Baxt, B. y Bachrach, H.L. (1979). Foot and mouth disease virion RNA: studies on relation between the length of its 3'-Poly(A) segment infectivity. Virol. 97:22-31.
- 88.- HARRIS, T.J.R. y Brown, F. (1976). The location of the poly(C) tract in the RNA of foot and mouth disease virus. J. gen. Virol. 33:493-501.
- 89.- \_\_\_\_\_, -. . . v \_\_\_\_\_, -. (1977). Biochemical analysis of a virulent and an avirulent strain of foot-and-mouth disease virus. J. gen. Virol. 34:75-105.
- 90.- HATTMAN, S. (1970). Influence of T<sub>4</sub> superinfection on the formation of RNA bacteriophage coat protein. J. Mol. Biol. 47: 599-603.
- 91.- HEDGERS, R.S. (1970). Foot-and-mouth disease virus in milk. An epidemiological study. Vet. Rec. 87:180-188.
- 92.- HESS, W.R., Bachrach, H.L. y Callis, J. (1960). Persistence of foot and mouth disease virus in bovine kidneys and blood as related to the occurrence of antibodies. Am. J. Vet. Res. 21:1104-1108.

- 93.- HIRUBY, D.E. y Roberts, W.K. (1978). Encephalomyocarditis virus RNA. III. Presence of a genome associated protein. *J. Virol.* 25:413-415.
- 94.- HUANG, A.S. (1973). Defective interfering viruses. *Ann. Rev. Microbiol.* 27:101.
- 95.- ———, —. (1977). Viral pathogenesis and molecular biology. *Bact. Rev.* 41(4):811-821.
- 96.- ———, —. y Wagner, R. (1966). Defective T particles of vesicular stomatitis virus. II. Biologic role in homologous interference. *Virol.* 30:173-181.
- 97.- ———, —. y Baltimore, D. (1970). Defective particle and viral disease processes. *Nature* 226:325-327.
- 98.- ———, —. y ———, —. (1977). Defective interfering animal viruses. *Comp. Virol.* 10:73.
- 99.- HYSLOP, N. (1965). Secretion of foot-and-mouth disease virus and antibody in the saliva of infected and immunized cattle. *J. Comp. Pathol.* 75:111-117.
- 100.- ISAACS, A y Lindenmann, F. (1957). Virus interference. I. The interferon. *Proc. R. Soc. London Ser. B* 147:258-287.
- 101.- JOHNSTON, R.E., Tovell, D.R., Brown, D.T. y Faulkner, P. (1975). Interfering passages of Sindbis virus: concomitant appearance of interference, morphological variants and truncated viral RNA. *J. Virol.* 16(4):951-958.
- 102.- KERANEN, S. (1977). Interference of wild type virus replication by an RNA negative temperature-sensitive mutant of Semliki Forest virus. *Virol.* 80:1-11.
- 103.- KORANT, B.D. (1972). Cleavage of viral precursor proteins "in vivo" and "in vitro". *J. Virol.* 10:751-759.
- 104.- ———, —., Lonberg-holm, K., Noble, J. y Stasny, J.T. (1972). Naturally occurring and artificially produced components of three rhinovirus. *Virol.* 48:71-86.
- 105.- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* 227:680.
- 106.- LAGER, J.A., Sadir, A.M., Corbellini, C.N., Pereyra, J. y Schudel, A. (1980). Enterovirus bovino. Caracterización de un aislamiento realizado en el país. *Rev. Militar Vet.* 27:141.
- 107.- LEE, Y.F., Nomoto, A., Detjen, B.M. y Wimmer, E. (1977). A protein covalently linked to poliovirus genome RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 74:59-63.
- 108.- LIEBERMANN, H. y Schulze, P. (1971). Strukturdes Maul-und kalven seuchevirus. I. Mitteilung: zum aufbau der Proteinhülle. *Arch. für Experim. Veter.* 25:171.
- 109.- LOWE, P.A., King, A.M.Q., McCahon, D., Brown, F. y Newman, J.W. I. (1981). Temperature-sensitive RNA polymerase mutants of a Picornavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 78(7):4448-4452.
- 110.- MAES, R. (1970). Attenuation of foot and mouth disease virus by chemical means. *Arch. ge. Virusforsch.* 29:63-76.

- 111.- ———, —. y Mesquita, J. (1970). High mutation rate of foot and mouth disease virus treated with hydroxylamine. Arch. ges. Virusforsch. 29:72-82.
- 112.- MAPOLES, J.E., Anderegg, K.W. y Ruecker, R.R. (1978). Properties of poliovirus propagated in medium containing caesium chloride implications of Picornaviral structure. Virol. 90: 103-111.
- 113.- MARCUS, P.I. y Carver, D. (1967). Intrinsic interference: a new type of viral interference. J. Virol. 1:334-343.
- 114.- MAYR, A. (1974). Investigaciones básicas sobre las características del virus de la fiebre aftosa. Bol. Ctro. Panam. F.A. 13-16:18-30.
- 115.- McCANON, D. (1981). The genetics of Aphthovirus. Arch. Virol. 69:1-23.
- 116.- McClure, M.A., Holland, J.J. y Perrault, J. (1980). Generation of defective interfering particles in Picornaviruses. Virol. 100:408-418.
- 117.- McVICAR, J.W. y Suttmöller, P. (1972). Foot-and-mouth disease in sheeps and goats. Early virus growth in the pharynx and udder. U.S. An. Hth. Ass. Proc. 76:194-199.
- 118.- ———, —.—. y ———, —. (1976). Growth of foot and mouth disease virus in the upper respiratory tract of non-immunized vaccinated and recovered cattle after intranasal inoculation. J. Hyg. (Camb.) 76:467-481.
- 119.- METZ, D.H. (1975). The mechanism of action of interferon. Cell 6:439.
- 120.- MICHELSEN, E. (1946). Orienterende interferensforsøg med Mund-og klosesygnavirus. Maanedsskr. Dyclaege 58:346.
- 121.- MINOR, P.D. (1980). Comparative biochemical studies of type 3 poliovirus. J. Virol. 34:73-84.
- 122.- MOHANTY, G.C. y Cottral, G.E. (1971). Foot and mouth disease virus carrier state in cell culture from tissues of convalescent cattle. Arch. ges. Virusforsch. 3:1-13.
- 123.- MOWAT, G.N. (1964). Selection of attenuated strains of foot and mouth disease virus by cloning in tissue cultures. Bull. Off. int. Epiz. 61(7-8):639-649.
- 124.- ———, —.—. y Chapman, W.G. (1962). Growth of foot and mouth disease virus in a fibroblastic cell line derived from hamster kidney. Nature 194:253-255.
- 125.- ———, —.—., Brooksby J.B. y Pay, T.W.F. (1962). Use of BHK-21 cells in the preparation of mouse attenuated live foot-and-mouth disease vaccines for the immunization of cattle. Nature 196:655.
- 126.- ———, —.—., Barr, D.A. y Bennett, J.H. (1969). The development of an attenuated foot and mouth disease virus vaccine by modification and cloning in tissue cultures of BHK-21 cells. Arch. ges. Virusforsch. 26:341-354.
- 127.- NEWMAN, J.F.E., Rowlands, D.J. y Brown, F. (1973). A physico-chemical sub-grouping of the mammalian Picornaviruses. J. gen. Virol. 18:171-180.

- 128.- ———, —.—.—., Cartwright, B., Doel, T.R. y Brown, F. (1979). Purification and identification of the RNA-dependent RNA-polymerase of foot-and-mouth disease virus. *J. gen. Virol.* 45:497-508.
- 129.- NISHIYAMA, Y. (1977). Studies on L cells persistently infected with VSV. Factors involved in regulation of persistent infection. *J. gen. Virol.* 35:265-269.
- 130.- NOMOTO, A. Detjen, B., Pozzatti, R. y Wimmer, E. (1977). The location of the polio genome protein in viral RNAs and its implication for RNA synthesis. *Nature* 268:208-213.
- 131.- OFICINA Internacional de Epizotias (1965). Resoluciones adoptadas por la 33a. sesión general del Comité de la Ofic. int. de Epiz. II. Inventario de vacunas de virus vivos atenuados; información sobre la naturaleza y utilización en los diferentes países, incidencia de su empleo sobre los intercambios internacionales de animales y productos de origen animal. *Bull. Off. int. Epiz.* 64(2):1752-1753.
- 132.- PALACIOS GARCIA, C. (1964). Investigaciones realizadas con los virus atenuados de la fiebre aftosa de los tipos "0" y "A" Vallecé en Venezuela, Caracas. *Ctro. Invest. Vet.*, 1964, 28 págs. (Conferencia Sud. antiaft., Río de Janeiro, 1964).
- 133.- ——— ———, —. (1968). Estudios sobre vacunas de virus vivo contra la fiebre aftosa. *Bull. Off. San. Panam.* 64:386.
- 134.- ——— ———, —. y Fuentes Marins, R. (1955). Adaptación del virus de la fiebre aftosa tipo "0" Vallecé (cepa Lara) a pollos de un día de edad. *Bol. Inst. Inv. Vet. Maracay*, 7(23):14-33.
- 135.- ——— ———, —. y ——— ———, —. (1958/9). Adaptación del virus de la fiebre aftosa tipo "0" Vallecé (Cepa Lara) a pollos de un día de edad. III. Patogenicidad e inmunidad en la especie bovina. *Bol. Inst. Inv. Vet. Maracay* 10/11:23-33.
- 136.- ——— ———, —., Fuentes Marins, R., Castañeda García, J. y Maldonado Hernández, A. (1960). Avianización del virus de la fiebre aftosa tipo "0" Vallecé (cepa Lara) de Venezuela. *Bol. Inst. Inv. Vet. Maracay* 12(27):3-27.
- 137.- ——— ———, —. et al (1962). Efectos de una vacuna antiaftosa a virus vivo modificado en ganado lechero, informe preliminar. I Jornadas Vet. y III Jornadas Agroqcas., 1962.
- 138.- ——— ———, —., Maldonado, A., Castañeda, J.A. y Balestrini, J. (1967). Investigaciones realizadas con vacunas antiaftosa atenuada del tipo "0" Vallecé, cepa Lara, de altos pases. V. Congreso de Med. Vet. y Zoot., Caracas, Venezuela, 1967.
- 139.- PALMA, E.L. (1975). Purificación del virus aftoso obtenido por el método Frenkel. Experiencias realizadas con el mismo. Tesis para optar al título de Dr. en Cs. Qcas., Fac. Cs. Exactas y Naturales, U.B.A., Bs.As., Argentina.
- 140.- ———, —.—.—. y Huang, A. (1974). Cyclic production of vesicular stomatitis virus caused by defective interfering particles. *J. Inf. Dis.* 129(4):402-409.

- 141.- PARKER, J. (1971). Presence and inactivation of foot-and-mouth disease virus in animal feces. *Vet. Rec.* 19:659-662.
- 142.- PAY, T.W.F., Feris, R.D. y Braccwell, C.D. (1964). The use of a "plaque-purified" clone derived from a modified foot and mouth disease virus strain as a living vaccine.
- 143.- PERRAULT, J. y Holland, J. (1972). Variability of vesicular stomatitis virus autointerference with different host cells and virus serotypes. *Viol.* 50:148-158.
- 144.- PHILIPSON, L. y Dinter, Z. (1963). The role of interferon in persistent infection with foot and mouth disease virus. *J. gen. Microb.* 32:277-285.
- 145.- POHJANPELTO, P. y Cooper, P.D. (1965). Interference between polioviruses induced by strains that cannot multiply. *Viol.* 25:350-357.
- 146.- POLACINO, P.S., Kaplan, G. y Palma, E.L. (1983). Homologous interference by a foot and mouth disease virus strain attenuated for cattle. *J. Virol.* (in press).
- 147.- ———, ———, ———, ———, Gomez Yafal, A. y Palma, E.L. (1983). Biochemical characterization of a foot-and-mouth disease strain attenuated for cattle. *Arch. Virol.* (in press).
- 148.- POLATNICK, J. y Richmond, J.Y. (1979). Viral interference. Phenomena induced by foot and mouth disease temperature-sensitive mutants in bovine kidney cells. *Arch. Virol.* 6:105-114.
- 149.- POTEL, K. (1958). Recent results in the area of the experimental pathology of foot-and-mouth disease. *Monatsh. Veterinarmed.* 13:401-405.
- 150.- PREBLE, O.T. (1973). Selection of temperature sensitive mutants during persistent infection. Role in maintenance of persistent Newcastle disease virus infection in L cells. *J. Virol.* 12:481-491.
- 151.- ———, ———. (1975). Temperature-sensitive virus and the etiology of chronic and inapparent infections. *J. Inf. Dis.* 131:467-473.
- 152.- ———, ———. y Yougner, J.S. (1972). Temperature-sensitive mutants isolated from L-cells persistently infected with Newcastle disease virus. *J. Virol.* 9:200-206.
- 153.- RECZKO, E. y Stromahier, K. (1970). Electro microscopy of the RNA of foot and mouth disease virus. *J. gen. Virol.* 7:65.
- 154.- REED, L.J. y Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty per cent end points. *Am. J. Hyg.* 27:493.
- 155.- RIVENSON, S. (1979). Las vacunas oleosas en medicina veterinaria. *Rev. Med. Vet.* 60(1):1-17.
- 156.- ———, ———, Ibarra, O., Gaggino, O.P., Laporte, O., García Olano, H., Pizzi, J.C. y Marangunich, L. (1972). Estudio comparativo con un nuevo tipo de vacuna antiaftosa oleosa on bovinos. *Rev. Inv. Agrop., Ser. 4, IX*:53-80.
- 157.- ROBSON, K.J.H., Crowther, J.R., King, A.M.Q. y Brown, F. (1979). Comparative biochemical and serological analysis of five isolates of a single serotype of foot and mouth disease. *J. gen. Virol.* 45:579-590.

- 158.- ROSENBERG, F.J. y Goic, R. (1972). Programas de control y preven  
ción de la fiebre aftosa en las Américas. Bol. Ctro. Panam.  
F.A. 8:15-17.
- 159.- ———, —. y Augé de Mello, P. (1974). Portadores de virus  
aftoso. Proceso terminal de la infección o eslabón en la  
cadena epidemiológica de la enfermedad. Bol. Ctro. Panam.  
F.A. 13-16:50-60.
- 160.- ROTT, R., Scholtissek, C., Klenk, H.D. y Kaluza, G. (1972). In-  
trinsic interference between different enveloped RNA virus  
es. J. gen. Virol. 17:255-264.
- 161.- ———, —., Orlich, M. y Scholtissek, C. (1981). Intrinsic interfer  
ence between influenza and fowl plague virus. Arch. Vi-  
rol. 69:26-32.
- 162.- ROUX, L. y Waldvogel, F.A. (1981). Establishment of Sendai vi-  
rus persistent infection:biochemical analysis of the early  
phase of a standard plus defective interfering virus infec-  
tion of BHK cells. Virol. 112:400-410.
- 163.- ROWLANDS, D.J., Sangar, D.V. y Brown, F. (1971). Buoyant density  
of Picornaviruses in caesium salts. J. gen. Virol. 13:141-  
152.
- 164.- ———, —. Shirley, M.W., Sangar, D.V. y Brown, F. (1975).  
A high density component in several vertebrate enterovirus  
es. J. gen. Virol. 29:223-234.
- 165.- RUECKERT, R.R., Dunker, A.K. y Stoltzfus, C.M. (1969). The struct  
ure of Mouse-Elberfeld virus: a model. Proc. Nat. Acad.  
Sci. (USA) 62:912-919.
- 166.- ———, —. (1971). Picornaviral architecture. En Comp.Virol.  
pp. 255-306, ed. K. Maramorosch y E. Kurstak, N.Y., Acad.  
Press.
- 167.- SANGAR, D.V. (1979). The replication of Picornaviruses. J. gen.  
Virol. 45:1-13.
- 168.- ———, —., Rowlands, D.J., Cavanagh, H. y Brown, F. (1976).  
Characterization of the minor polypeptides in the foot and  
mouth disease particles. J. gen. Virol. 31:35-46.
- 169.- ———, —., ———, —., Harris, T.J.R. y Brown, F. (1977).  
A protein covalently linked to foot and mouth disease virus  
RNA. Nature 268:648-650.
- 170.- SAXGON, R.E. y Stevens, J.G. (1972). Restriction of Herpes sim-  
plex virus replication by poliovirus:a selective inhibition  
of viral translation. Virol. 48:207-220.
- 171.- SCHMIDT, S., Schmidt, J.H. y Hansen, A. (1936). The use of acetyl-  
ethuleneimine in the production of inactivated foot and  
mouth disease vaccines. Rev. d'Immun. 2:359-368.
- 172.- SCOTT, F.W., Cottral, G.W. y Gailiunas, P. (1965). Presence of  
foot and mouth disease virus in the pituitary and central  
nervous system of experimentally infected cattle. U.S. Li-  
vestock Sanit. Ass. Proc. 69:67-75.
- 173.- ———, —., ———, —. y ———, —. (1966). Persistence  
of foot and mouth disease virus in external lesions and sa-  
live of experimentally infected cattle. Am.J.Vet.Res.27:  
1531-1536.



- 174.- SEIBOLD, H.R., Cottral, G.E., Patty, R.E. y Gailiunas, P. (1964). Apparent modification of foot-and-mouth disease after prolonged residence in surviving cells. *Am. J. Vet. Res.* 25: 806-814.
- 175.- ———, ———, Dougherty, E. y Martinsen, J.S. (1965). Observations on pathogenicity and immunogenicity of cell culture modified foot and mouth disease virus. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 147:1603-1618.
- 176.- SELLERS, R.F. (1963). Multiplication, interferon production and sensitivity of virulent and attenuated strains of the virus of foot-and-mouth disease. *Nature* 198:1228.
- 177.- ———, ———. (1964). Virulence and interferon production of strains of foot-and-mouth disease. *J. Imm.* 93:6.
- 178.- ———, ———. (1965). Behaviour of an attenuated strain of foot and mouth disease virus in culture. *Nature* 208:210-211.
- 179.- ———, ———. (1971). Quantitative aspects of the spread of foot and mouth disease. *Vet. Bull.* 41:431-439.
- 180.- ———, ———, Durt, M., Cumming, A. y Stewart, D.L. (1959). The behavior of strains of the virus of foot and mouth disease in pig, calf, ox and lamb kidney tissue cultures. *Arch. ges. Virusforsch.* 2:637-646.
- 181.- ———, ———. y Howat, G.N. (1968). Interference between modified and virulent strains of foot and mouth disease virus. *Arch. ges. Virusforsch.* 23:20-26.
- 182 - ———, ———, Bennett, J.H., Howat, G.N. y Snowden, W.A. (1968). Some factors affecting interferon production by foot and mouth disease virus in bovine tissue cultures. *Arch. ges. Virusforsch.* 23:1-11.
- 183.- ———, ———, ———, ———, ———, ———. y Barr, D.A. (1968). The use of interferon production as a marker in the development of a modified strain of foot-and-mouth disease virus. *Arch. ges. Virusforsch.* 23:12-19.
- 184.- SIMPSON, R.W. y Tinuma, M. (1975). Recovery of infectious proviral DNA from mammalian cells infected with respiratory syncytial virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 72:3230-3234.
- 185.- SKINNER, H.H., Henderson, W.M. y Brooksby, J.B. (1952). Use of unweaned white mice in foot and mouth disease research. *Nature* 169:794.
- 186.- ———, ———. (1959) Infection of domestic poultry with the viruses of foot and mouth disease and vesicular stomatitis. *Arch. ges. Virusforsch.* 2:92-126.
- 187.- ———, ———. (1960). Some techniques for producing and studying attenuated strains of the virus of foot and mouth disease. *Bull. Off. int. Epiz.* 53:634-650.
- 188.- SPECTOR, D.H. y Baltimore, D. (1974). Requirement of 3'-terminal poly(adenylic acid) for the infectivity of poliovirus RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 71:2983-2987.
- 189.- STEWART, W.E. (1979). The interferon system. Springer-Verlag, A. G. Vienna.

- 190.- STOKER, M. y McPherson, H. (1964). Syrian hamster fibroblast cell line BHK-21 and its derivatives. *Nature* 203:1355.
- 191.- STROMANIER, K. (1972). Determinations of molecular parameters of foot and mouth disease virus. *Proc. 2nd. Int. Cong. Virol.* 1971, ed. J.L. Melnick, Basel Karger.
- 192.- ———, —. y Mussgay, M. (1959). Density gradient centrifugation with infectious ribonucleic acid of foot and mouth disease virus. *Science* 130:3369.
- 193.- SUMMERS, D.F. y Maizel, J.V. (1968). Evidence for a large precursor proteins in polio virus synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 59:966-971.
- 194.- SUTMOLLER, P. (1976). Pathogenesis of foot and mouth disease: clearance of the virus from the circulation of cattle and goats during experimental viremia. *J. Hyg. (Camb.)* 77(2):245-253.
- 195.- ———, —. y Gaggero, A. (1965). Foot and mouth disease carriers. *Vet. Rec.* 77:968-969.
- 196.- ———, —. y Cottral, G.E. (1967). Improved techniques for the detection of foot and mouth disease virus in carrier cattle. *Arch. ges. Virusforsch.* 21:170-177.
- 197.- ———, —., Graves, J.H. y McVicar, J.W. (1972). Influence of enterovirus on foot and mouth disease virus infection: a hypothesis. *FAMD Bull.* 11(1):15.
- 198.- ———, —. y McVicar, J.W. (1976). Pathogenesis of foot and mouth disease: the lung as an additional portal of entry of the virus. *J. Hyg. (Camb.)* 77(2):235-243.
- 199.- TALBOT, P. y Brown, F. (1972). A model for foot-and-mouth disease virus. *J. gen. Virol.* 15:163-170.
- 200.- TAYLOR, J. (1965). Studies on the mechanism of action of interferon. *Virology* 25:340-349.
- 201.- TERRY, G.M., Clark, R.F. y Rweyemamu, M.M. (1982). Variations in the buoyant density of foot-and-mouth disease virus strains. *Arch. Virol.* 71:333-341.
- 202.- TRAUTMAN, R. y Suttmöller, P. (1971). Detection and properties of a genomic masked viral particle consisting of foot and mouth disease virus nucleic acid in bovine enterovirus protein capsid. *Virology* 44:537-543.
- 203.- VALLEE, H., Carré, H. y Rinjard, P. (1926). Immunization against foot and mouth disease by formalised virus. *Rev. gen. Med. Vet.* 35:129-134.
- 204.- VAN BEKKUM, J.C. (1971). Utilización y experiencias con la vacuna tipo Frenkel. III. Reunión interamericana sobre el control de la fiebre aftosa y otras zoonosis. *Organ. Panam. de la Salud* 218:49-54.
- 205.- ———, —.—., Frenkel, H.S., Frederik, H.H.J., y Frenkel, S. (1959). Observations on the carrier state of cattle exposed to foot and mouth disease virus. *T. diegenesesk* 84:1159-1163.

- 206.- ———, ———, Straver, P.J., Bool, P.H. y Frenkel, S. (1966). Further information of the persistence of infective foot-and-mouth disease virus in cattle exposed to virulent virus strain. *Bull. Off. int. Epiz.* 65(11-12):1949-1965.
- 207.- VANDE WOUDE, G.F. (1967). The inactivation of foot and mouth disease virus at ionic-strength dependent isoelectric points. *Virol.* 31:436-441.
- 208.- ———, ———, Swaney, J.B. y Bachrach, H.L. (1972). Chemical and physical properties of foot and mouth disease virus: a comparison with Maus-Elberfeld virus. *Biochem. Biop. Res. Com.* 48:1222-1229.
- 209.- VASQUEZ, C., Palma, E.L. y J. Barrantes (1972). Foot-and-mouth disease virus. I. Capsid fine structure. *J. Microsc.* 14: 147-154.
- 210.- VILCEK, J., Yamazaki, S. y Hauehl, E.A. (1977). Interferon induction by vesicular stomatitis virus and its role in virus replication. *Infect. Imm.* 18:863-865.
- 211.- VILJOEN, J.H.B. (1964). The successful use of attenuated and inactivated foot and mouth disease vaccine in major epizootic. *Bull. Off. int. Epiz.* 61:9-10.
- 212.- WALDMAN, O. y Pyl, G. (1937). Active immunization of cattle against foot and mouth disease with formolised virus. *Zent. Bakt. Parasitk de I (Orig.)* 138:401-412.
- 213.- ———, ———, Pyl, G., Hobohm, K.O. y Möhlmann, H. (1941). Development of the riems foot and mouth disease adsorbate vaccine and its preparation. *Zentbl. Bakt. Parasitk de I (Orig.)* 148:1-15.
- 214.- WATCHER, D. y Fiers, W. (1972). Preparative two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis of <sup>32</sup>P-labeled RNA. *Analytical Biochem.* 49:184-194.
- 215.- WIEGERS, K.J., Yamaguchi-Koll, V. y Drzeniek, R. (1977). Differences in the physical properties of dense and standard poliovirus particles. *J. gen. Virol.* 34:365-473.
- 216.- WILD, I. Y Brown, F. (1970). Replication of foot and mouth disease virus ribonucleic acid. *J. gen. Virol.* 7:1.
- 217.- WIMMER, E. (1972). Sequence studies of poliovirus RNA. I. Characterization of the 5'-termini. *J. Mol. Biol.* 68:537-540.
- 218.- ———, ———. (1982). Genome-linked proteins of viruses. *Cell* 28:199.
- 219.- WITTMAN, G. y Ahl, R. (1964). Marqueurs génétiques de souches atténuées du virus aphteux. *Bull. Off. int. Epiz.* 61:591-606.
- 220.- ———, ———, Bauer, K. y Mussgay, H. (1970). Studies on vaccination of pigs with vaccines of inactivated foot and mouth disease virus. II. Study with ethylethyleneimine inactivated virus and DEAE-dextran as adjuvant. *Arch. ges. Virusforsch.* 29(2-3):139-158.
- 221.- ———, ———, ———, ———, ———, ———. (1971). Studies on protective inoculation of 6 to 8 weeks old piglets with ethylethyleneimine (EEI)/diethylaminoethyl-dextran (DEAE-D) vaccines against foot and mouth disease caused by virus type O<sub>1</sub>. *Zentbl. Vet. Med. B* 18(2):135-146.

- 222.- YAMAGUCHI-KOLL, V., Wieggers, K.J. y Drzenick, R. (1975). Isolation and characterization of dense particles from poliovirus infected HeLa cells. *J. gen. Virol.* 26:207-319.
- 223.- YOGO, Y., Teng, M.H. y Wimmer, E. (1974). Poly(U) in poliovirus minus RNA is 5'-terminal. *Biochem. Bioph. Res. Commun.* 61: 1101-1109.
- 224.- ZAHIRAN, G.E.D. (1960). Results of attempts on the modification of foot and mouth disease virus in chick and chick embryos. *Bull. Off. int. Epiz.* 53(5/6):630-631.
- 225.- ———, —.—.— (1961). Foot-and-mouth disease virus. I. Propagation of three immunologic types of virus in chick. *Am. J. Vet. Res.* 22(88):518-526.
- 226.- ———, —.—.— (1961). Foot- and mouth disease virus.II. Propagation and modifications of three immunological types of virus in embryonating chicken eggs. *Am. J. Vet. Res.* 22(88): 527-532.
- 227.- ZIDANOV, V.M. y Parfanovic, H.M.I. (1974). Integration of measles virus nucleic acid into all genome. *Arch. ges. Virusforsch.* 45:225-234.
- 228.- ZIOLA, B.R. y Scraba, D.G. (1974). Structure of the Mengovirion. I. Polypeptide and ribonucleate components of the virus particle. *Virology.* 57:531-542.