Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Fiebre hemorrágica argentina : Caracterización de cepas patógenas y atenuadas del virus Junin

Candurra, Nélida Alicia

1988

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. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

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

Cita tipo APA:
Candurra, Nélida Alicia. (1988). Fiebre hemorrágica argentina : Caracterización de cepas patógenas y atenuadas del virus Junin. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2133_Candurra.pdf

Cita tipo Chicago:
Candurra, Nélida Alicia. "Fiebre hemorrágica argentina : Caracterización de cepas patógenas y atenuadas del virus Junin". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1988.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2133_Candurra.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES.

FIEBRE HEMORRAGICA ARGENTINA: CARACTERIZACION DE CEPAS PATOGENAS Y ATENUADAS DEL VIRUS JUNIN.

AUTOR: NELIDA ALICIA CANDURRA.

DIRECTOR: Dra. CELIA ESTHER COTO.

LUGAR DE TRABAJO: Laboratorio de Virología.

Departamento de Química Biológica.U.B.A.

2133
Ej 2.

Tesis presentada para optar al título de

doctor en Ciencias Químicas.

- 1988 -

A la memoria de Elsa y Sofía.

AGRADECIMIENTOS.

A la Dra. CELIA E. COTO por su dedicación y apoyo constante durante la realización de este trabajo.

A ELSA B. DAMONTE por su crítica y asesoramiento permanente.

A CRISTINA D'AIUTOLO por su estímulo constante y por la lectura crítica del manuscrito original.

A mis compañeros de laboratorio de Virología e Inmunoquímica por su colaboración, en especial a aquellos que me acompañaron durante el desarrollo de este trabajo: SUSANA, ERNESTO, MONICA, JORGE, LAURA, FELIX, GUILLERMO, GRACIELA, SILVIA, LUIS y JUAN.

A LILIANA por la tarea dactilográfica realizada.

INDICE.

pag.

INTRODUCCION

Fiebre Hemorrágica Argentina..... 1.

Características del virus Junín..... 6.

Cepas de virus Junín..... 10.

I. Patogenicidad en animales..... 12.

II. Multiplicación en cultivos celulares..... 23.

Caracterización de cepas virales..... 24.

I. Por técnicas inmunológicas..... 25.

Antecedentes en Arenavirus..... 32.

II. Por técnicas bioquímicas..... 37.

Antecedentes en Arenavirus..... 42.

OBJETIVOS..... 44.

MATERIALES Y METODOS.

Medios..... 45.

Soluciones..... 45.

Reactivos..... 47.

Animales..... 47.

Cultivos celulares..... 48.

Viabilidad celular..... 48.

Virus..... 49.

Preparación de stocks de virus Junín..... 51.

Stock en cerebro de ratón..... 51.

Stock en cultivos celulares..... 51.

Determinación de la infectividad..... 51.
Titulación por el método de formación de placas bajo agar... 51.
Titulación por observación de la acción citopatogénica..... 52.
Cuantificación de la acción citopatogénica..... 53.
Titulación en ratones lactantes..... 53.
Titulación en ratones de 14 días de edad..... 53.
Clonado de virus Junín en células Vero..... 54.
Curva de crecimiento viral..... 54.
Síntesis de proteínas celulares..... 54.
Pasajes concentrados del virus Junín en células Vero..... 56.
Obtención de inmunosueros..... 56.
Preparación de las dosis inmunizantes..... 56.
Inmunización de animales..... 57.
Ensayo de neutralización viral..... 57.
Cálculo del coeficiente d^2..... 58.
Análisis de las proteínas virales en células infectadas..... 59.
Marcación de las células..... 59.
Inmunoprecipitación..... 59.
Electroforesis en gel de poliacrilamida..... 60.
Fluorografía..... 60.

RESULTADOS.

Patogenicidad en animales..... 62.
I. Cobayos..... 62.
II. Ratones de 14 días..... 64.
Interacción del virus Junín con las células Vero..... 66.
I. Producción de acción citopatogénica..... 66.

1. Evolución de la acción citopatogénica..... 66.
2. Evolución de la acción citopatogénica a distintas multiplicidades de infección..... 70.
3. Cuantificación de la acción citopatogénica..... 72.
II. Morfología de las placas producidas bajo agar..... 75.
III. Curvas de crecimiento viral..... 79.
IV. Efecto de las cepas de virus Junín sobre la síntesis de proteínas celulares..... 81.
V. Síntesis de proteínas virales en células infectadas. 86.
Caracter termosensible..... 93.
Detección de partículas interferentes..... 95.
Relaciones antigénicas entre las cepas de virus Junín..... 98.

DISCUSION..... 111.

BIBLIOGRAFIA..... 123.

APENDICE: abreviaturas..... 149.

I N T R O D U C C I O N

. FIEBRE HEMORRAGICA ARGENTINA.

La Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA) es una enfermedad infecciosa endemoepidémica de etiología viral y circunscripta a la región central de la República Argentina. El cuadro clínico se caracteriza por un síndrome febril con alteraciones hematológicas, cardiovasculares, digestivas, renales y neurológicas. La severidad de la infección presenta una amplia variación: la mayoría de los pacientes se recuperan pero, en algunos casos, la enfermedad sigue un curso fatal.

La primera descripción de la FHA como una nueva entidad clínica se hizo en 1955 como resultado de las observaciones realizadas en la interpretación de los datos de las epidemias de los años 1953 y 1954 (Arribalzaga, 1955). La etiología viral de esta enfermedad fué establecida durante el brote epidémico de 1955 en forma independiente por dos grupos de investigadores dirigidos por Parodi (1958) y por Pirosky (1959 a), los cuales aislaron el virus a partir de sangre y órganos de pacientes internados en el Hospital Regional de la ciudad de Junín, nombre con el que se designó posteriormente al agente causal.

El aislamiento del virus Junín (VJ) fué posible luego del hallazgo de animales sensibles para su propagación, la demostración de la presencia de anticuerpos específicos contra el virus aislado en los sueros de individuos convalescientes y la inoculación experimental a voluntarios humanos (Pirosky y col., 1959 b; Rugiero y col., 1959). De esta forma se reprodujeron los cuadros clínico y hemorrágico de la enfermedad natural, con recuperación del agente etiológico a partir de sangre y órganos de animales infectados.

La ubicación del VJ dentro de las familias de virus permaneció

incierta aunque debido a un trabajo reportado sobre la presencia de virus en un artrópodo (Parodi y col., 1959) se lo incluyó temporariamente con los arbovirus. Años más tarde, en 1963 se encontró que el virus Tacaribe, aislado de murciélagos, y el VJ cruzaban por Fijación de Complemento (FC), por lo que ambos fueron incluídos entre los arbovirus aunque no se pudo encontrar un artrópodo vector para el virus Tacaribe. Cuando el virus Machupo, agente causal de la Fiebre Hemorrágica Boliviana fué aislado (Johnson y col., 1965), se comprobó que estaba serológicamente relacionado a los virus Junín y Tacaribe (Mackenzie y col., 1965). Al conjunto de estos virus, y a los que se aislaron en los años siguientes con características serológicas similares, se los agrupó en el Complejo Tacaribe, nombre elegido por ser éste el primer virus aislado del grupo (Johnson y col., 1973).

Al no encontrarse artrópodos vectores que sirvieran de puente entre los roedores (reservorios naturales del grupo) y el hombre, los investigadores iniciaron observaciones sobre otros aspectos biológicos de estos virus. Llamó la atención la similitud en la infección crónica que el virus Machupo establecía en su huésped natural, el Calomys callosus, y la descripta en el Mus musculus por el virus de la Coriomeningitis Linfocítica (LCM) (Johnson, 1967). El virus LCM no compartía relaciones serológicas por FC con el Complejo Tacaribe.

En 1969 se aclararon estas relaciones. Murphy y col. (1969) observaron por microscopía electrónica similitud en las partículas de los virus LCM, Machupo y Tacaribe, con características semejantes a las descriptas por Lascano y Berría (1969) para el virus Junín. A su

vez Rowe y col. (1970 b) encontraron reacción cruzada por inmunofluorescencia indirecta entre sueros del grupo Tacaribe y antígenos del virus LCM. Ambos aportes, morfológicos y serológicos, sumados a las características físico-químicas de estos virus descriptas hasta ese momento, fueron la base para proponer y definir una nueva familia de virus (Rowe y col., 1970 a). Así fué que en el año 1970 el Comité Internacional de Taxonomía de Virus instituyó la familia Arenaviridae que incluye, hasta el presente, los virus que se muestran en el Cuadro 1.

Una característica distintiva de esta familia es su morfología. Los viriones aparecen como partículas redondas, ovales o pleomórficas con un diámetro entre 60 y 350 nm (Murphy y Whitfield, 1975), con proyecciones superficiales de 2 a 10 nm de longitud que sobresalen de una envoltura lipoprotéica y gránulos internos de 20 nm de diámetro, indistinguibles morfológica y bioquímicamente de los ribosomas celulares (Murphy y col., 1970).

Otra propiedad de este grupo de virus es que todos sus integrantes están relacionados serológicamente en mayor o menor grado, dependiendo de la técnica y reactivos empleados. Con estos datos se han establecido dos grupos dentro de esta familia: a) los llamados virus del Viejo Mundo, que comprende al virus LCM, diseminado geográficamente en todo el mundo, y a los virus del Complejo Lassa, encontrados en Africa y b) los virus del Nuevo Mundo o Complejo Tacaribe, aislados de distintos lugares del Continente Americano. Con excepción del virus LCM los restantes arenavirus presentan una distribución geográfica limitada.

Los arenavirus patógenos para el hombre son: el VJ, el virus Ma-

Cuadro 1: Miembros de la Familia Arenaviridae.

VIRUS	LOCALIDAD	AÑO+	REFERENCIA
Viejo Mundo.			
Coriomeningitis Linfocítica.	Europa y América	1933	Armstrong and Lillie (1934)
Lassa	Africa Occidental.	1970	Frame y col. (1970).
Mopeia	Sur de Africa.	1977	Wulff y col. (1977).
Mobola	República de Africa Central.	1980	González y col. (1983).
Nuevo Mundo.			
Tacaribe	Trinidad.	1956	Downs y col. (1963).
Junín	Argentina.	1957	Parodi y col.(1958).
Machupo	Bolivia.	1962	Johnson y col.(1966).
Tamiami	Florida, Estados Unidos.	1963	Calisher y col. (1970).
Amaparí	Amapa, Brasil.	1964	Pinheiro y col. (1966)
Paraná	Paraguay.	1965	Webb y col. (1970).
Latino	Bolivia.	1965	Webb y col. (1973).
Pichinde	Colombia.	1970	Trapido y San Martín(1971)
Flexal	Para, Brasil.	1975	Pinheiro y col. (1977)

+ Año de aislamiento.

chupo, agente de la Fiebre Hemorrágica Boliviana (Johnson y col.,1965) que produce una enfermedad clínica semejante a la FHA, el virus Lassa (Buckley y Casals, 1970) aislado en Nigeria en 1969, agente de una severa enfermedad febril con alta tasa de mortalidad, y el virus LCM que produce generalmente infecciones leves o inaparentes (Rivers y Scott, 1935).

El área endemoepidémica de la FHA es, en la actualidad, el noroeste de la provincia de Buenos Aires, este de La Pampa y sur de las provincias de Córdoba y Santa Fé. Son aproximadamente 1.000.000 Km^2 donde residen más de 1.500.000 personas expuestas a esta enfermedad (Weissenbacher y col., 1987).

El VJ tiene su reservorio natural en los cricétidos que habitan en la zona endémica, principalmente las especies Calomys musculinus, Calomys laucha y Akodon azarae.El virus establece en ellos una infección persistente con viremia, viruria y replicación en glándulas salivales (Sabattini y col., 1977). La eliminación de virus por orina y saliva, comprobada natural y experimentalmente en Calomys musculinus (Martínez Peralta y col., 1979 a; Martínez Peralta y col., 1979 b; Lampuri y col., 1982), sería la causa de la contaminación de los pastos y del aire con los que está en contacto el trabajador rural. Los animales infectados al ser arrollados por los tractores producen aerosoles cargados de partículas virales. El trabajo manual de la cosecha de maíz y el alto grado de contaminación del peón del campo, le han dado a esta enfermedad el nombre de "Mal de los rastrojos", sinónimo de FHA.

La vía de entrada del VJ al ser humano sería entonces cutáneo-mucosa, por escoriaciones de la piel o a través de las mucosas conjun

tival, bucal y nasal. Estas vías fueron comprobadas en infecciones accidentales de laboratorio (Weissenbacher y col., 1976; Weissenbacher y col., 1978) y por infecciones experimentales en animales (Samoilovich y col., 1983).

La FHA no siempre cursa con una manifestación clínica evidente; estudios clínico-serológicos realizados en áreas endémicas demostraron que el 30% de las muestras de suero con índices de neutralización significativos antiJunín correspondieron a individuos que no presentaron ninguna manifestación clínica asociada con la FHA (Weissenbacher y col. 1983).Una situación similar se encontró entre el personal de los laboratorios de alto riesgo que emplean este agente, el 20% de las muestras con serología positiva se asociaron a infecciones inaparentes (Weissenbacher y col., 1980).

Entre las causas que podrían determinar que algunas infecciones cursen en forma inaparente y otras se manifiesten clínicamente se pueden mencionar: el estado del huésped, la vía de infección,la cantidad de virus que ha penetrado y la virulencia del mismo.

. CARACTERISTICAS DEL VIRUS JUNIN.

El genoma del virus Junín está constituído por ácido ribonucleico,lo que se determinó en forma indirecta al hacer multiplicar al mismo en presencia de deoxiuridinas halogenadas o arabinócido de citocina, drogas que inhiben la síntesis de ADN (Coto y Vombergar, 1969). Este ácido nucleico fué completamente degradado por ribonucleasas lo que indicó su estructura de cadena simple (Rawls y Buchmeier, 1975).Por electroforesis en geles de poliacrilamida del ARN aislado de virus pu

ro se encontraron cuatro especies moleculares predominantes con coeficientes de sedimentación de: 33, 28, 25 y 18 S (Añon y col., 1976).Mediante el estudio de la acción de inhibidores metabólicos se demostró que los ARN de 28 y 18 S son de orígen ribosomal, por lo que se asume que solamente los ARN de 33 y 25 S son virus específicos, es decir responsables de codificar para sus proteínas (Rawls y Buchmeier, 1975).

El análisis de las proteínas estructurales obtenidas de VJ purificado y tratado con detergentes (De Mitri y Martínez Segovia,1985) revelan la presencia de tres proteínas principales: NP(64.000 D) asociada a la nucleocápside y responsable de la reactividad cruzada entre los miembros del Complejo Tacaribe (Buchmeier y Oldstone, 1978) y dos glicoproteínas G_1 (51.0000 D) y G_2 (38.000 D). G_2 es una glicoproteína de envoltura facilmente extraíble por detergentes (Martínez Segovia y De Mitri, 1977), involucrada en la neutralización de la infectividad (Cresta y col., 1980). Sobre G_1 hay poco conocimiento de su localización y funciones y no aparece regularmente en las corridas realizadas en geles (De Mitri y Martínez Segovia, 1985). Algunos investigadores encuentran además otras proteínas que serían agregados o productos de ruptura de las tres especies principales (Martínez Segovia y De Mitri, 1977). Asimismo, se han reportado diferencias en los PM de las dos glicoproteínas (Grau y col., 1981). Estas podrían deberse a variaciones en el tiempo de cosecha del virus, marcado de las proteínas y procedimientos de purificación.

Los extractos de células infectadas con VJ e inmunoprecipitadas con sueros hiperinmunes revelan, además de las proteínas ya citadas, la presencia de un precursor glicosilado:GPC (72.000 D) que a veces

también aparece al correr virus purificado y tratado con detergente como si no se clivara completamente después de la brotación (De Mitri y Martínez Segovia, 1982).

La simetría de la nucleocápside,constituída por el genoma viral y proteínas estructurales, es desconocida en el VJ pero se ha descripto para otros arenavirus. El empaquetamiento del genoma del virus LCM está organizado en forma de dos nucleocápsides helicoidales que forman círculos cerrados de longitud variable (Young y Howard, 1983), en los que se comprueba la asociación íntima de la proteína NPal ARN. Una de las glicoproteínas estaría unida a la nucleocápside (Bruns y Lehmann-Grube, 1983), así como también se encontraría asociada a ellas la hipotética polimerasa (200.000 D) de difícil visualización en corridas electroforéticas de virus puro y de extractos de células infectadas (Harnish y col., 1981).

Se ha detectado actividad de ARN polimerasa asociada a preparaciones de VJ purificado (Mersich y col., 1976), lo que permitió suponer que el genoma viral era de polaridad negativa, siendo transcripto por la enzima para sintetizar el mARN. Sin embargo, la actividad específica de la enzima era extremadamente baja como para permitir una mejor caracterización de la misma.

Recientemente se iniciaron estudios para conocer la forma de expresión de la información genética del VJ (Ghiringhelli y col., 1987).

Estudios previos realizados con el virus Pichinde han demostrado, por el análisis de oligonucleótidos, hibridización de ácidos nucleicos y análisis de reasortantes, que las especies de 33 S (L) y 25 S (S) tienen secuencias únicas. El S ARN codifica para la proteína NP

y para el precursor de las glicoproteínas (GPC) y el segmento L lo haría para la transcriptasa del virión (Harnish y col., 1983).

El análisis secuencial del ARN demostró que los primeros 19 nucléotidos de los extremos 3' de ambos ARN son conservados para los virus Pichinde, LCM y Tacaribe (Auperin y col., 1982). El análisis de clones de cADN, ha demostrado que la proteína NPes codificada por la cadena viral complementaria correspondiente al extremo 3' del S ARN (Auperin y col., 1984 a).

Una vez finalizada la secuenciación del S ARN del virus Pichinde (Auperin y col., 1984 b), se pudo conocer que el segundo producto de ese gen (GPC) es codificado por una cadena subgenómica de mARN que no se superpone con la secuencia que codifica para la proteína NP. Asimismo, la región intergénica tiene una organización estructural particular, que estaría involucrada en la terminación de la transcripción.

El análisis de la secuencia nucleotídica del S ARN del virus Tacaribe confirmó que ese segmento de ARN es también de doble polaridad (Franze-Fernández y col., 1987).

Por metodologías semejantes se obtuvo la secuencia del extremo 3' del S ARN del VJ hasta el nucleótido 1899 (Ghiringhelli y col., 1988). El gen de la proteína NP iniciaría su transcripción en la posición 84-85 finalizando en los nucleótidos 1775-1777. Los 564 aminoácidos que forman la proteína NP del VJ comparten un 77% de similitud con el producto del gen homólogo del virus Tacaribe. A su vez, los 53 nucleótidos del extremo 3' del S ARN de ambos virus son idénticos; lo que confirma, al nivel molecular, las observaciones anteriores de la gran reactividad cruzada entre ambos virus (Damonte y col., 1983).

Una característica distintiva del VJ sería la estructura de doble horquilla encontrada al finalizar la lectura del gen NP(Ghiringhelli y col., 1987).

Usando anticuerpos monoclonales específicos para la nucleoproteína y las glicoproteínas del virus LCM se pudo demostrar que la estrategia de replicación de este virus sería semejante a la utilizada por los arenavirus del Nuevo Mundo (Riviere y col., 1985 a).

Por lo tanto todos los miembros de la familia Arenaviridae estudiados presentan un S ARN de doble polaridad.

. **CEPAS DE VIRUS JUNIN.**

La comprobación de que en el ciclo de transmisión de la FHA estaban involucrados los cricétidos llevó a la obtención de muestras positivas a partir de estos animales. Estas, junto con las muestras aisladas de sangre y vísceras de pacientes, constituyen los aislamientos de campo de VJ. Algunos de estos aislamientos fueron replicados in vivo y/o in vitro y caracterizados biológicamente constituyendo las cepas de VJ.

Entre las cepas definidas del VJ podemos nombrar a XJ (cepa prototipo de VJ (Parodi y col., 1958), RC (Boxaca, 1977) y Gar (Berría, 1977) aisladas de casos humanos y a PR_5 (usada durante mucho tiempo para obtener antígeno fijador de complemento) (Mettler y col., 1961) y MC_2 (Berría y col., 1967) obtenidas de cricétidos. La mayoría de ellas fueron altamente patógenas para animales de laboratorio (ratones, cobayos, ratas y hamsters) y para humanos, lo cual causó serios accidentes entre los laboratoristas que manipulaban las muestras (Teyssie y col.,1971).

La cepa XJ fué la más utilizada durante los primeros años para estudiar al VJ. Esta cepa fué sucesivamente pasada en plasma de cobayo y/o cerebro de ratón lactante conservando generalmente sus propiedades patógenas originales. Solo se pudo aislar de ella variantes atenuadas en algunos pasajes, tal fué el caso de XJ_o (Guerrero y Boxaca, 1980) y XJ_{44} (Kenyon y col., 1985). En otros casos se obtuvieron variantes atenuadas luego de clonar la cepa XJ en sistemas celulares: la cepa $XJCl_3$ es una subpoblación aislada en la línea celular heteroploide MA-111 (Guerrero y col., 1969) y Candid # 1 en la línea diploide FRhL (Barrera Oro y Eddy, 1982).

Los estudios de caracterización biológica y bioquímica del VJ se realizaron principalmente con las cepas XJ, $XJCl_3$ y MC_2. En algunos casos se utilizaron cepas con bajo número de pasajes in vivo para evitar alguna variación en las propiedades originales de las mismas o contaminaciones con otros agentes como el virus LCM o micoplasmas (Lascano , 1977).

En los últimos años se han aislado mutantes termosensibles (ts) de la cepa $XJCl_3$ a partir de una población viral crecida en presencia de 5-fluorouracilo (Ceriatti y col., 1983). Dichas variantes multiplican normalmente a la temperatura permisiva (37ºC) pero no así a la temperatura restrictiva (40ºC); una de ellas, el Cl_{67} tiene también una marcada atenuación para el ratón lactante y se comporta como mutante de rango de huésped (Scolaro y col., 1988).

Al mismo tiempo, se han obtenido variantes serológicas (caracterizadas por cinética de neutralización) a partir de Calomys musculinus infectados con la cepa $XJCl_3$, tanto durante el período agudo de la enfermedad como en el estado persistente (Alché y Coto, en prensa).

I. PATOGENICIDAD EN ANIMALES.

El VJ es capaz de infectar a una amplia variedad de huéspedes experimentales: ratones, cobayos, hamsters, ratas y primates (Weissenbacher y Damonte, 1983), variando su grado de virulencia en función de una serie de factores que dependen tanto del animal como del virus.

Los animales más usados para el estudio del VJ han sido los cobayos adultos y los ratones lactantes. El virus produce en el cobayo una enfermedad hemorrágica semejante, en algunos aspectos, a la que se observa en humanos (Guerrero y col., 1977). Este animal es muy sensible a la acción de las cepas del VJ de distinta virulencia y la mortalidad en el mismo ha sido usada para diferenciar cepas patógenas y atenuadas desde 1968 (Avila y col., 1979).

La infección de ratones hasta los 10 días de edad produce un cuadro típico de encefalitis con temblores, lateralización de la marcha, convulsiones, parálisis del tren posterior y muerte antes de la tercer semana de infección en el 95-100% de los casos (Weissenbacher y col., 1975), interviniendo en la fisiopatología de la enfermedad fenómenos de hipersensibilidad retardada (Taratuto y col., 1973). La infección experimental del ratón, al contrario de lo que ocurre en el cobayo, es independiente de la virulencia de la cepa de VJ utilizada (Boxaca, 1977). Sin embargo, en el caso del Cl_{67}, su comportamiento particular determina que la enfermedad no siga los patrones habituales (Scolaro y col., 1977).

Desde los 10 días de edad y hasta los 15 se observa en estos animales un comportamiento diferente al infectarlos por vía intracerebral (i.c.). Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio demostraron una exacerbación de la respuesta a la infección por VJ en ani-

males de 10 días de edad, con signos de enfermedad menos evidentes y muertes más tempranas (Coto y León, 1978). En ratones de 11 días, otros estudios indicaron que la patogenicidad del VJ en este animal estaba influenciada por el huésped en el cual se había replicado al virus, pero era independiente de la cepa de VJ utilizada. Los stocks preparados en cerebro de ratón fueron 100 veces más virulentos que los obtenidos en cultivos de líneas celulares, mientras que si se utilizaban cultivos primarios de embrión de ratón o de cricétidos se encontraba una respuesta intermedia (Candurra y Coto, 1986). Estos resultados sugerirían que en ratones infectados a los 11 días de edad hay un reconocimiento de un antígeno tisular homólogo que aumentaría la virulencia del VJ en este huésped.

Por el contrario, otros investigadores demostraron que los ratones infectados a los 11 y 14 días permitían caracterizar a las cepas del VJ. Los animales de 11 días fueron propuestos como marcadores de virulencia entre cepas atenuadas (Contigiani y Sabattini, 1983) y los de 14 días fueron utilizados para diferenciar entre cepas patógenas y atenuadas (Contigiani y Sabattini, 1977).

A partir de los 15 días de edad la susceptibilidad de este huésped al VJ disminuye considerablemente, llegando a índices muy bajos o nulos después del mes de vida (Weissenbacher y col., 1975).

Sin embargo, una reciente investigación demostró que la cepa XJ es capaz de infectar a ratones adultos de la cepa C3H/HeJ inoculados por vía i.c. (Campetella y col., 1987). Estos animales murieron en un 80-90% con signos neurológicos e histopatología semejante a la descripta en el ratón lactante. La cepa $XJCl_3$ no produjo morbimortalidad en ellos.

Futuros estudios serán necesarios para establecer si la cepa C3H/HeJ es la única que presenta un comportamiento atípico, y a su vez, encontrar la diferencia genética de la misma, lo que aportará nuevos datos para esclarecer la interacción del VJ con este huésped.

Al analizar la bibliografía existente sobre las infecciones experimentales por distintas cepas de VJ en diversos huéspedes se encontró que la evolución de la infección, en la mayoría de los casos, dependía de la cepa viral utilizada.

La cepa XJ se emplea como cepa patógena de referencia en los estudios experimentales sobre la FHA.

En el cobayo, esta cepa produce un 100% de mortalidad entre los días 11 y 14 post-infección (p.i.) por vía intramuscular (i.m.). La infección es también efectiva por otras vías: subcutánea, intranasal, intracerebral u oral (Boxaca y col., 1961).

El cuadro clínico se caracteriza por fiebre, disminución de peso y un descenso marcado de la temperatura durante las 24 hs previas a la muerte,con escasa excreción de virus por orina y saliva (Guerrero y col., 1977). La autopsia presenta lesiones hemorrágicas en tejido subcutáneo, intestinos, suprarenales y ganglios. El virus puede aislarse de la mayoría de los órganos pero no del sistema nervioso central (SNC), con viremia temprana que persiste hasta la muerte de los animales. En tejido linfático la replicación ocurre en macrófagos y en células dendríticas (Laguens y col., 1983 b). Se producen alteraciones hematológicas, con marcada plaquetopenia y leucopenia, deficiencias en el proceso de coagulación (Molinas y col., 1978) y disminución de proteínas totales e inmunoglobulinas (Budzko, 1965).

Esta cepa también induce una inmunosupresión hacia antígenos no relacionados (Parodi y col., 1967) y hacia el mismo virus, pues no se detectan anticuerpos específicos durante el transcurso de la enfermedad (Carballal y col., 1981 a). Se observa un menor número de linfocitos T en bazo, ganglio y sangre periférica, pero no se alteran los linfocitos B (Carballal y col., 1981 b).

Las lesiones histológicas que se encuentran en los órganos afectados se correlacionan con el antígeno viral detectado por inmunofluorescencia y los aislamientos positivos, lo que sugeriría un daño directo del virus sobre el tejido (Carballal y col., 1981 a).

La infección experimental con la cepa XJ de la rata es dependiente de la edad de las mismas y de la vía de inoculación. Esta cepa inoculada por vía i.c. en ratas Wistar de 2 días de edad produce una enfermedad neurológica leve, caracterizada por temblor generalizado e hiperexcitabilidad. Los síntomas aparecen a los 7 días p.i. y duran una semana. La mortalidad es siempre menor al 15%. Los animales que sobreviven fueron estudiados hasta los 180 días p.i. mostrando un descenso significativo del crecimiento y disminución de peso (Laguens y col., 1983 a). Si se infectan ratas de mayor edad la mortalidad se incrementa llegando al 95% a los 10 días, con una enfermedad semejante a la descripta en la infección a los 2 días de edad, pero más severa. Animales mayores de 26 días no se enferman.

Los estudios histológicos de los animales enfermos muestran lesiones cerebrales a partir del día 29 p.i. siendo éstas más severas en animales infectados a los 10 días de edad, llegando a abarcar grandes áreas necróticas a los 14 días p.i. previos a la muerte. El virus re-

plica en cerebro con altos títulos, mientras que en el resto de los órganos y en sangre se alcanzan niveles mucho menores (Avila y col., 1981).

En los animales que sobreviven al ser inoculados a los 2 días de edad se pudo aislar virus sólo por cocultivo de encéfalo con células Vero. En ellos se encontraron altos títulos de anticuerpos neutralizantes, lo que indicaría el desarrollo de una infección crónica no tolerante en este modelo. Se ha postulado que las células blanco cerebelosas se encontrarían en un estado no diferenciado en el momento de la infección, lo que dirigiría el curso de la enfermedad hacia la forma crónica (Laguens y col., 1983 a).

Si la infección se realiza por vía intraperitoneal (i.p.) en ratas de 2 días de edad, se observa una enfermedad neurológica activa con mortalidad acrecentada hasta índices del 85% (Blejer y col., 1983). La mayor neuropatogenicidad de la cepa XJ por esta vía estaría dada por una mayor capacidad de replicación en bazo e hígado, y con una viremia prolongada que facilitaría el acceso al SNC. Los infiltrados mononucleares meníngeos demostrados por anatomía patológica en este sistema, estarían indicando que la encefalitis mortal que se desarrolla se debería a un mecanismo de hipersensibilidad retardada.

La inoculación de la cepa XJ en primates del Nuevo Mundo dió enfermedad clínica sólo en Cebus sp (Carballal y col., 1983) y en Callithrix jacchus (Avila, 1983).

En el Cebus se presenta una enfermedad leve con leucopenia, plaquetopenia y viremia transitoria seguida por la aparición de anticuerpos. Algunos animales presentan un cuadro neurológico (Carballal y col., 1983).

Otros investigadores no coinciden con estos resultados (Mc Kee y col., 1985).

En Callithrix, por el contrario, la cepa XJ induce por vía i.m. una enfermedad mortal con sintomatología hemorrágica y/o neurológica, con amplia diseminación de virus en tejido nervioso y hematopoyético y con viremias después de la primer semana p.i.. Los órganos más afectados fueron el cerebro, pulmón, hígado, tejido linfático y médula ósea, con lesiones semejantes a las encontradas en enfermos humanos (Avila, 1983).

La cepa $XJCl_3$ fué originada por clonado en células MA-111 (línea heteroploide de riñón de conejo) en el Laboratorio de Virología Tropical del NIH (Bethesda Md. USA). A ese país se remitió el 2º pasaje por plasma de cobayo y 11º pasaje por cerebro de ratón (C_2R_{11}) de la cepa XJ; allí sufrió algunos pasajes no bien definidos antes de ser clonada (Guerrero y Boxaca, 1980). En 1966 se iniciaron los estudios con esta cepa, que resultó atenuada para cobayo pero semejante a XJ en otros huéspedes y cultivos celulares (Guerrero y col., 1969).

La inoculación de esta cepa en cobayos por vía i.m. provoca una enfermedad leve en el 80% de los casos y una mortalidad aproximada del 16% entre los días 22-26 p.i.. Los animales que mueren tienen pocas lesiones macroscópicas visibles. El aislamiento viral es sólo posible en bazo, ganglios, pulmón, páncreas y glándulas salivales. En animales agónicos y en todos los muertos se observan lesiones encefálicas (Avila y col., 1981).

No se observó inhibición de las respuestas inmunológicas a diferencia de lo que ocurre con la cepa XJ. Todos los animales que sobreviven a la infección presentan anticuerpos neutralizantes a partir del

día 13 p.i. que los protegen frente al desafío con la cepa patógena (Blejer y col., 1981). Un alto porcentaje de cobayos inoculados por esta vía establecen una infección persistente (Malumbres y col., 1984).

La replicación más tardía de esta cepa y su acceso a encéfalo en el momento en que ya ha comenzado la respuesta inmunológica al agente, permiten incluír en este modelo mecanismos inmunopatológicos de daño hístico (Avila y col., 1981).

La inoculación de cobayos por vía i.c. produce una enfermedad más grave (Boxaca y col., 1982).

Las ratas de 2-10 días de edad inoculadas con la cepa $XJCl_3$ por vía i.c. presentan mortalidad en un 95%. En ellas se detecta multiplicación viral en cerebro desde el 3º día p.i., alcanzando picos máximos entre el 6º y 10º. La mortalidad dada por esta cepa esta asociada con la aparición de un intenso exudado inflamatorio, con destrucción de una amplia zona del encéfalo. Los animales que sobreviven a la infección presentan atrofia neuronal sin infiltración inflamatoria (Jacobson y Pfau, 1980). El tratamiento con suero antitimocito disminuye la mortalidad en ratas infectadas a los 2 días de edad, indicando que la encefalitis tendría un orígen inmunopatológico (Weissenbacher y Damonte, 1983).

El porcentaje de mortalidad disminuye en animales infectados a mayores edades, siendo muy bajo después de los 26 días. Los animales que sobreviven desarrollan anticuerpos.

Por vía i.p. esta cepa llega sólo a un 15% de mortalidad en animales de 2 días de edad, siendo luego resistentes a la infección viral. Los animales que mueren desarrollan una enfermedad neurológica aguda (Nejamkis y col., 1982).

Los estudios en primates con la cepa $XJCl_3$ se realizaron en deta

lle en Callithrix jacchus. La inoculación de 1.000 DL_{50} por vía i.m. no causó mortalidad. La diseminación del virus a los órganos fué baja, obteniéndose títulos menores a 1.000 $DICT_{50}$/ml sólo en ganglios, médula ósea, pulmón y bazo, con viremias entre los 6 y 22 días p.i. No se observaron alteraciones histológicas ni hematológicas. Los anticuerpos neutralizantes aparecen al día 18 p.i. y se mantienen por lo menos durante los 150 días en que se observaron a estos animales (Avila, 1983).

Con esta cepa se desarrolló un modelo experimental por inoculación por vía i.p. en Calomys musculinus. El 50% de los animales inoculados hasta el 7º día de edad mueren con un cuadro encefálico semejante al producido en el ratón blanco. Los sobrevivientes desarrollan una enfermedad crónica donde la participación de variantes serológicas y/o mutantes termosensibles (ts) podrían ser uno de los motivos que definirían el curso de la enfermedad (Lampuri, 1984; Alché y Coto, 1986).

La sólida protección hacia la cepa XJ que es otorgada a cobayos por la cepa $XJCl_3$ cuando esta última es inoculada por vía i.m. hizo pensar en su posible uso como vacuna atenuada. Así fué como entre los años 1968 y 1971 se vacunaron 636 voluntarios. En ellos $XJCl_3$ indujo sólo una infección subclínica o una forma abortiva, con desarrollo de anticuerpos neutralizantes en el 96% de los casos (Parodi y col., 1970). Estos anticuerpos se mantuvieron por períodos de 7 a 9 años en el 90% de los casos estudiados (Rugiero y col., 1981).

Los motivos más importantes para interumpir el uso de la cepa $XJCl_3$ como vacuna humana fueron que dicha cepa se clonó en células heteroploides, la obtención de la vacuna en cerebro de ratón lactante y la neurovirulencia de la misma para cobayos y Cebus sp. inoculados por vía

i.c. (Weissenbacher y Damonte, 1983).

La cepa MC_2 fué aislada de vísceras de un cricétido del género **Calomys** en 1964, en la localidad de Mones Cazón (Provincia de Buenos Aires) (Berría y col., 1967). Inoculada por vía i.m. ocasiona en cobayos una mortalidad del 75 al 80%. Los animales tienen disminución de peso a partir de la 2º semana y se recuperan alrededor de la 4º semana. A los 21 días p.i. se aisla virus del bazo, adrenal, riñón y cerebro, pero raramente en sangre y otros órganos. Esta cepa muestra un marcado neurotropismo con altos títulos de virus en SNC, coincidente con una meningoencefalitis. A partir del día 21 p.i. se detectan anticuerpos neutralizantes que aumentan, llegando a índices altos, hasta los 65 días p.i. (Avila y col., 1981).

La aparición tardía de lesiones encefálicas, cuando la respuesta inmune del animal ya ha comenzado, sugiere la existencia de mecanismos inmunopatológicos en la producción del daño tisular.

En ratas de 2 días de edad inoculadas con esta cepa por vía i.c. se observó un comportamiento semejante al producido con la cepa $XJCl_3$ (Avila, 1983).

No se realizaron estudios detallados de infecciones con la cepa MC_2 en otros huéspedes.

La cepa XJ_0 deriva de un pasaje anterior al clonado en células MA-111 de la cepa XJ. En un momento se sospechó que la atenuación de la cepa $XJCl_3$ no se debía a una selección de una subpoblación obtenida por clonado en la línea heteroploide de conejo, sino a una selección natural previa. Por ese motivo, un grupo de investigadores de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Medicina (UBA) inició los

estudios para revelar esa incógnita con un pasaje anterior al clonado de la cepa XJ , remitido a Bs. As. en el pasaje C_2R_{16} (Guerrero y Boxaca, 1980).

La cepa XJ_o se inició en el pasaje C_2R_{19}.

Cuando fué inoculada por vía i.m. en cobayo, esta cepa mostró un comportamiento similar a la cepa $XJCl_3$. El porcentaje de mortalidad provocada por ambas fué practicamente el mismo, al igual que la distribución de las muertes en el tiempo. Estas semejanzas se extendieron a la recuperación de virus de los órganos de animales muertos, a la antigenicidad y a la capacidad protectora (Boxaca y col., 1981).

La virulencia de esta cepa en el cobayo se ve incrementada cuando se utiliza la vía i.c. o i.p. (Boxaca y col., 1980).

Se realizaron clonados de la cepa XJ_0 para seleccionar poblaciones virales que produjeran una respuesta biológica homogénea, principalmente en su capacidad protectora y grado de atenuación en células diploides MRC-5, las cuales son un sustrato aceptable para la replicación de cepas candidatas a vacunas para uso humano (Weber y col., 1985).

La cepa Candid # 1 fué derivada del pasaje 44 de la cepa prototipo XJ en cerebro de ratón lactante (Kenyon y col., 1985). Ha sido clonada y pasada 18 veces en la línea diploidea FRhL (pulmón fetal de mono Rhesus) (Barrera Oro, y Eddy, 1982).

Estudios realizados en ratones, cricétidos, cobayos y monos rhesus demostraron su baja o nula neurovirulencia y neuroinvasividad. Al mismo tiempo se evaluó su potencial inmunogénico en monos y cobayos por medición de la respuesta humoral y celular inducida en ellos (Barrera Oro y Eddy, 1982). Los resultados satisfactorios obtenidos en

esas pruebas, su atenuación estable a través de pasajes in vivo e in vitro (Peters y col., 1987) y el haber satisfecho todos los requerimientos preclínicos de seguridad de la Administración de Drogas y Medicamentos de Estados Unidos, incluyendo la inoculación i.c. en monos (Barrera Oro y col., 1986), permitió iniciar los ensayos en voluntarios humanos.

La evolución clínica de los primeros vacunados mostró un nivel bajo de efectos colaterales y una mejor eficacia al aplicarse por vía i.m. (Mac Donald y col., 1986). Los 66 voluntarios estudiados dieron respuesta humoral por varias técnicas: 94% fueron seropositivos por ELISA, 85% por neutralización (técnica de reducción de placas) y el 36% por inmunofluorescencia. La inmunidad celular fué medida por el ensayo de transformación de linfocitos; en este caso, el 98% de los vacunados respondieron positivamente (Kenyon y col., 1988).

Los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que esta cepa es aceptable como antígeno vacunal contra la FHA. Asimismo los estudios realizados en monos rhesus de protección cruzada con el virus Machupo sugieren la posibilidad de poder utilizar a Candid #1 como vacuna contra el agente etiológico de la Fiebre Hemorrágica Boliviana (Barrera Oro y col., 1988).

Hasta el presente, la mortalidad del cobayo adulto es el marcador de virulencia más adecuado para clasificar a las cepas de VJ. Si bien los primates han dado resultados más exactos al reproducir la enfermedad clínica que el VJ ocasiona en humanos (Kenyon y col., 1986), su uso es accesible sólo a algunos laboratorios.

De acuerdo a la mortalidad que provocan en el cobayo, las cepas

descriptas hasta el momento en este trabajo, se pueden clasificar como: XJ, altamente patógena; MC_2, de patogenicidad intermedia y $XJCl_3$, XJ_0 y Candid # 1, atenuadas.

II. MULTIPLICACION EN CULTIVOS CELULARES.

El virus Junín multiplica en una amplia variedad de cultivos primarios y células de líneas contínuas. En la mayoría de ellos no produce un efecto citopático aparente (Berría, 1977) aunque en otros, como células HeLa (Mettler y col., 1961), Vero (Boxaca y Savy, 1972) y MRC-5 (Guerrero y col., 1982), su acción citopatogénica (ACP) es evidente. La infección se caracteriza por un período inicial agudo seguido por una etapa persistente (Damonte, 1978). Estos estudios se hicieron con las cepas XJ, $XJCl_3$ y MC_2 principalmente y pocos de ellos fueron realizados en forma comparativa.

En la búsqueda de características de las cepas de VJ distintas de la patogenicidad, en 1970 se encontraron diferencias, en la línea Vero, en el tipo de placas producidas bajo agar por las cepas XJ y $XJCl_3$. Se concluyó que las placas originadas por la cepa XJ eran más grandes que las producidas por la cepa $XJCl_3$ (Coto y col., 1970). En el mismo trabajo se destacó una diferencia en la producción de ACP entre las mismas cepas cuando se las cultivaba en presencia de 5% de CO_2. La cepa $XJCl_3$ no produjo ACP en estas condiciones, mientras que sí lo hizo XJ.

En 1977 se estudió, en cultivos de la línea L-929, la relación entre la capacidad inductora de interferón y la patogenicidad del VJ. La cepa XJ no indujo interferón, MC_2 fué de acción moderada y la cepa

$XJCl_3$ alcanzó niveles más altos (Teyssie y col., 1977).

Los resultados encontrados por estos dos grupos de investigadores (Coto y col., 1970) (Teyssie y col., 1977) no han podido reproducirse luego en otros laboratorios. Distintos factores de las células huésped y de los stocks de virus utilizados contribuyen a obtener diferentes conclusiones.

Entre las variaciones atribuíbles a las células podemos citar las diferencias nutricionales, morfológicas y metabólicas entre iguales líneas mantenidas en distintas condiciones de cultivo, así como el estado metabólico de las mismas al iniciar y mantener una infección viral (Avila y Coto. 1978; Candurra y Damonte, 1985). Al mismo tiempo, las diferencias en las historias de pasajes de los stocks de las cepas utilizadas contribuyen modificando no sólo la ACP en la etapa aguda sino también determina distintas características en el estado persistente (Help y col., 1976). Es de mencionar, como uno de los parámetros más importantes, el porcentaje de partículas interferentes presentes en el inóculo viral (D'Aiutolo y Coto, 1986).

Por estas razones es que, hasta el momento, no se han podido encontrar marcadores in vitro para demostrar diferencias entre cepas patógenas y atenuadas del VJ.

. CARACTERIZACION DE CEPAS VIRALES.

La clasificación y caracterización de los virus es una necesidad práctica de particular importancia para identificar a las especies que causan enfermedad en el hombre. El poco conocimeinto de los virus en el pasado hizo muy difícil esta tarea. Fué así como los sistemas primi

tivos propuestos se han ido modificando a lo largo de los años a medida que las investigaciones sobre estructura y replicación fueron avanzando.

Los virus se clasifican en familias en base a sus diferencias morfológicas y a la clase de ácido nucleico de sus genomas (Matthews, 1985). La cantidad de miembros de cada familia es variable: Coronaviridae tiene 12 miembros mientras qeu Bunyaviridae posee al menos 10 veces más. Por ese motivo, a medida que se demostraron las características de infección, transcripción, diversificación y variación, los miembros de una familia establecida se categorizaron dentro de ella en subfamilias, géneros, serogrupos, subgrupos, etc. teniendo en cuenta propiedades comunes (Bishop, 1985).

I. POR TECNICAS INMUNOLOGICAS.

La infección de un huésped por un virus induce en éste una reacción inmunológica en respuesta a diferentes antígenos virales. Estos antígenos pueden ser componentes externos del virión o internos que se exponen durante la replicación del agente viral en el órgano blanco del organismo infectado.

Los antígenos virales externos son los que están expuestos a una presión de selección negativa, producida por anticuerpos, que los ha llevado evolutivamente a una variabilidad muy amplia. Por el contrario, los antígenos internos sufren una menor presión selectiva por lo que están más conservados.

Estas características antigénicas de los virus son usadas como base para diferenciar grupos dentro de los integrantes de una familia.

Los grupos serológicos están formados por virus que dan reacciones cruzadas entre sí porque comparten antígenos internos conservados. En la familia Togaviridae por ejemplo, serogrupo es igual a género:los integrantes del género alfavirus no reaccionan con virus de los géneros flavi y rubi. Asimismo, los virus de plantas forman 27 grupos que corresponden a serogrupos pues no hay reacción cruzada entre ellos (Van Regenmortel y Neurath, 1985).

Por otro lado, los antígenos virales externos han evolucionado, en respuesta a la presión selectiva, a una gran variedad de tipos antigénicos diferentes como en el caso de entero, rino y adeno o un solo tipo antigénico que presenta una gran variabilidad en el tiempo (mixo).

Algunos determinantes antigénicos superficiales son más conservados y son encontrados en todas las especies de un grupo, ellos son conocidos como antígenos específicos de grupo. Antígenos específicos de tipo son los que varían entre diferentes especies.

Las técnicas inmunológicas tradicionales: FC, IF, inhibición de la hemoaglutinación, neutralización y los estudios de protección cruzada sirven para clasificar a los virus dentro de una familia, género y tipo. Las técnicas más elaboradas como neutralizaciones cruzadas, cinética de neutralización y el uso de anticuerpos monoclonales permiten distinguir cepas y variantes pero, a su vez, brindan información sobre la estructura antigénica de las proteínas virales.

En el Cuadro 2 se registran las metodologías utilizadas para la clasificación y caracterización de virus y los resultados que se pueden obtener de ellas.

En los virus envueltos, las glicoproteínas por su posición externa

Cuadro 2: Métodos inmunológicos para la caracterización viral.

METODO	APLICACION
- Fijación de Complemento.	Detecta antígenos internos que dan reacciones cruzadas con todos los miembros de una familia, género o grupo.
- Inmunofluorescencia.	La técnica para antígenos citoplasmáticos con sueros policlonales, da igual información que fijación de complemento.
- Neutralización.	Identifica a las especies virales.
- Neutralización cruzada y cinética de neutralización.	Permiten diferenciar cepas entre sí y también variantes de una cepa.
- Protección cruzada.	Indica relaciones mas cercanas entre los miembros de un grupo.
- Anticuerpos monoclonales.	Su uso depende del determinante que reconozcan y de la proteína en la que él se encuentre. Con el anticuerpo monoclonal adecuado se puede establecer diferencias entre: * variantes de una cepa. * cepas de una misma especie. * virus más relacionados dentro de un grupo. * grupos dentro de una familia. * reconocer a todos los miembros de la familia.

en la superficie del virión, son las que interaccionan preferencialmente con los anticuerpos y son por ello los antígenos más comunmente involucrados en la neutralización de la infectividad viral. Los oligosacáridos que forman parte de ellas no son inmunogénicos, siendo específicos de la célula en la cual el virus replica, pero su posición en la cadena polipeptídica es codificada por el virus. Esto hace que una simple mutación en un nucleótido que se traduzca en un cambio en un aminoácido permitiendo la presencia de un nuevo oligosacárido en la proteína, podría modificar la estructura de esa glicoproteína, enmascarando un sitio antigénico e impidiendo su unión al anticuerpo. Esto se ha demostrado para la hemoaglutinina del virus Influenza (Alexander y Elder, 1984).

La reactividad antigénica de una proteína representa su capacidad de realizar uniones específicas con receptores en linfocitos y anticuerpos. Esta reactividad estaría restringida a una parte de su superficie conocida como determinante antigénico o epítope. Para algunos inmunólogos en la actualidad estos términos son sinónimos (Van Regenmortel, 1987). Otros consideran al determinante antigénico como un área sobre la superficie de la proteína que incluye al epítope, este último sería el que establece estrictamente la unión al anticuerpo (Margni, 1982).

En 1969, Sela clasificó a los determinantes antigénicos en secuenciales y conformacionales. Los primeros estarían formados por una secuencia de residuos independientes de la estructura terciaria de la proteína, mientras que los determinantes conformacionales estarían formados por residuos de una específica conformación dada por la proteína.

Atassi y Smith en 1978 definieron determinantes continuos y discontinuos, siendo continuos los representados por una secuencia contigua de residuos expuestos en la superficie de la proteína nativa con sus características conformacionales distintivas. Los discontinuos consistirían en residuos cercanos en la superficie de la proteína pero no continuos en su estructura primaria; son residuos distantes que se convierten en cercanos por el plegamiento de la cadena o por unión de dos cadenas de péptidos separadas.

Otra clasificación más reciente incluye a los criptotopes y a los neotopes (Van Regenmortel y Neurath, 1985). Los criptotopes serían los epítopes que solo son activos después de la fragmentación, depolimerización o desnaturalización de la proteína. En el caso de los virus son los epítopes que se encuentran en las subunidades de la cápside. Los neotopes son específicos de la estructura cuaternaria y estarían ausentes en las subunidades monoméricas. Estos epítopes existirían por cambios conformacionales inducidos por la unión de las subunidades o por estar formados con residuos de dos ó más subunidades cercanas.

East y col.(1980) definieron también determinante topográfico como aquel que se altera por cambios en un residuo distante y por ese motivo, un determinante de este tipo no podría definirse solo con los residuos que están en directo contacto con el sitio de unión al anticuerpo. Otros investigadores usan el término topográfico como sinónimo de conformacional.

El análisis de la estructura antigénica de una proteína consiste principalmente en localizar sus determinaciones antigénicos o epítopes. Es decir, reconocer cual zona accesible, sobre la superficie de la mo-

lécula, es reconocida por el sitio de unión (paratope) en la molécula de anticuerpo específico. Los estudios clásicos de Atassi (1984) con mioglobina y lisosima demuestran que una proteína contiene solo un pequeño número de discretos epítopes situados en la superficie altamente accesible de ella. Un ensayo común para localizar estos epítopes (Van Regenmortel y Neurath, 1985) es medir la habilidad de fragmentos naturales o sintéticos de la proteína para reaccionar con los anticuerpos originados hacia la molécula intacta. Dichos fragmentos, de 5 a 10 residuos, se designaron epítopes contínuos de la proteína en estudio. Sin embargo, dicho fragmento lineal podría no reflejar exactamente la estructura completa del epítope correspondiente de la proteína nativa. Es necesario un exceso molar de péptido para revelar alguna unión entre él y el anticuerpo, ya que la constante de afinidad del anticuerpo por el péptido es varios órdenes de magnitud menor que para la proteína nativa. De esta forma, dicho péptido lineal podría solo representar una parte de un epítope discontinuo mayor.

La mayoría de la información sobre la antigenicidad de proteínas está basada en la identificación de epítopes continuos que corresponderían a versiones incompletas o adulteradas de los epítopes originales que existen en la proteína nativa.

Se encontró que el área sobre la proteína que reconoce un anticuerpo es de aproximadamente 20 Å de diámetro, por lo que se asume que en una proteína globular, bajo esa área, es difícil encontrar un epítope continuo; por lo tanto todos los epítopes serían discontinuos.

En los últimos años el desarrollo de la tecnología para obtener anticuerpos monoclonales contribuyó a aclarar la estructura antigénica

compleja de las proteínas.

Las proteínas son antígenos multideterminantes y ellas producen, en animales inmunizados, una variedad de familias de anticuerpos heterogeneos capaces de reconocer, con varios grados de exactitud, un particular determinante antigénico de la proteína. Esta heterogeneidad de los antisueros policlonales originados contra la proteína es la responsable de la difícil obtención de una descripción inequívoca de los epítopes. Las diferencias que encontraron distintos investigadores al localizar los epítopes en mioglobina y lisosima se debería a la particularidad de cada antisuero, así como a diferencias en los métodos de inmunización y especie animal usada (Al Mondallal y col., 1982).

La homogeneidad molecular de los anticuerpos monoclonales asegura que solo un epítope sea investigado a un mismo tiempo y este hecho permite estudiar a ese determinante en una forma más definida y reproducible.

Para definir epítopes en proteínas, con anticuerpos monoclonales, se usa un panel de proteínas relacionadas que posean un número limitado de aminoácidos sustituídos. Luego, si una sustitución origina un cambio en la unión del anticuerpo, se asume que ese residuo es parte del epítope. Pero también puede ser un residuo que no pertenezca al epítope pero que, por algún tipo de mecanismo alostérico, produzca un cambio conformacional que altere la reactividad de la proteína (Al Mondallal y col., 1982) (epítope topográfico?).

Otros investigadores modifican los conceptos de zonas antigénicas y establecen que la superficie entera accesible de una proteína consiste en un continuo de epítopes potenciales superpuestos capaces de combi

narse con los anticuerpos apropiados (Benjamín y col., 1984). Como resultado de esta controversia, en la actualidad algunos investigadores no intentan descubrir la completa o definitiva estructura antigénica de las proteínas sino que se satisfacen con definir algún fragmento operacional o región de ella capaz de unirse específicamente al anticuerpo (Van Regenmortel y Neurath, 1985).

ANTECEDENTES EN ARENAVIRUS.

a) Uso de sueros policlonales.

Cada miembro de la familia Arenaviridae posee alguna relación antigénica con los otros miembros del grupo. El grado de reactividad cruzada es dependiente del sistema de ensayo empleado.

La prueba de fijación de complemento (FC) revela interrelaciones entre todos los miembros de la familia (Casals y col., 1975), aunque algunos investigadores obtienen una limitada reacción cruzada entre Tacaribe y LCM (Rowe y col., 1970 b).

Una relación cruzada mayor se observó entre Tacaribe, Junín y Machupo y en menor grado con los otros integrantes del Complejo Tacaribe (Casals y col., 1975). LCM y los virus del Complejo Lassa también cruzan entre sí.

El antígeno fijador de complemento está asociado con la nucleoproteína interna (Gschwender y Lehmann-Grube, 1973), por lo tanto no se pudieron encontrar diferencias entre las cepas de VJ por FC (Adler y Parodi, 1965).

Los primeros indicios que Tacaribe y LCM pertenecían al mismo grupo de virus fueron obtenidos por inmunofluorescencia (IF).

En general, detectando antígenos intracelulares por esta técnica se encuentra relaciones similares a las dadas por FC (Rowe y col.,1970b).

En cambio, la técnica de neutralización es específica para cada especie de familia (Matthews, 1982b).Por neutralizaciones cruzadas con sueros obtenidos en cobayos se encontraron diferencias serológicas entre aislamientos de virus Lassa aislados en distintas regiones de Africa. Las muestras de Liberia fueron distinguibles de las provenientes de Sierra Leona, y ambos grupos, fueron antigénicamente menos relacionados a los aislamientos de Nigeria (Jahrling y col., 1985).

El análisis de la cinética de neutralización realizado con sueros policlonales ha permitido observar diferencias entre tipos de virus muy relacinados o entre una especie y sus variantes (Gould y Butler, 1980). En nuestro laboratorio se pudo confirmar, con esta metología, la aparición de variantes serológicas durante la infección con VJ de cricétidos tanto en etapa aguda como en la crónica (Alché y Coto, en prensa).

b) Estudios con anticuerpos monoclonales.

En años recientes la obtención de anticuerpos monoclonales (AcM) hacia algunos arenavirus permitió un mejor análisis de las diferencias específicas entre los miembros de esta familia.

Buchmeier y colaboradores (1980) caracterizaron 46 AcM originados de la cepa ARM del virus LCM. Cinco de ellos, dirigidos a la proteína NP,muestran reactividad cruzada con Lassa y Mopeia; otro, dirigido hacia G_2 , reacciona solo con Mopeia.

En otro estudio (Buchmeier, 1984), AcM anti-proteína G_2 de la cepa WE de LCM reaccionan con antígenos de Mopeia y Pichinde pero no

con Lassa. Con AcM hacia G_1 no se reconocen antígenos hacia los miembros del Complejo Lassa. La proteína G_1 del virus LCM se considera la responsable de producir los anticuerpos neutralizantes.

Los AcM hacia la proteína NP del virus Pichinde reaccionan, frecuentemente, con otros miembros del Complejo Tacaribe y algunos lo hacen con antígenos del Complejo Lassa, sugiriendo así, que algún epítope situado en la nucleocápside es compartido por los virus del Viejo y Nuevo Mundo (Buchmeier y col., 1981).

Estudios más detallados con un panel de AcM preparados con las cepas ARM y WE de LCM permitieron definir 4 epítopes sobre G_1 (dos de ellos fueron neutralizantes: GP-1A y GP-1D), y 3 epítopes superpuestos sobre G_2 (GP-2A, GP-2B y GP-2C). GP-1A es común a cuatro cepas de LCM, mientras que GP-1D es reactivo solo con la cepa ARM (Parekh y Buchmeier, 1986).

Con los AcM dirigidos hacia GP-2A y GP-2B y péptidos sintéticos imitando secuencias de la glicoproteína precursora GPC, se pudo localizar la posición de ambos epítopes entre los aminoácidos 370 a 382 (Weber y Buchmeier, 1988). De estos aminoácidos, cinco de ellos se encuéntran conservados en los virus LCM, Lassa, Pichinde y Tacaribe. El péptido 370-382 se une específicamente a sueros policlonales de los virus LCM, Lassa y Junín, lo que permite suponer su utilidad como antígeno para diagnóstico de arenavirus.

Con AcM preparados hacia Tacaribe y Junín se pudo confirmar la asociación entre ellos y los virus Amapari y Machupo; Pichinde y Paraná se mostraron menos relacionados (Howard y col., 1985). Entre los anticuerpos específicos para Tacaribe, cinco de ellos reaccionan por IF con antígenos de la membrana de células infectadas con virus homó-

logo y neutralizan su infectividad in vitro. Estos AcM pudieron diferenciarse entre sí por inmunoensayos de competencia y así se distinguieron por lo menos dos epítopes. Los AcM que sólo reaccionan con antígenos citoplasmáticos en células fijadas fueron no sólo específicos para Tacaribe, sino que algunos también reaccionaron con Junín, Amaparí, Machupo, Pichinde y Paraná.

Los AcM antiJunín cepa $XJCl_3$ dieron reacción positiva por IF citoplasmática en sustratos infectados con el mismo virus y con Tacaribe, Machupo y Pichinde, pero no con Amapari y Paraná.

Recientmente han sido caracterizados otros AcM dirigidos hacia los polipéptidos del VJ (De Mitri y Martínez Segovia, 1988). Con técnicas de inmunoblotting se pudo establecer que 7 de ellos reaccionan con GP_{38}, proteína que constituye el antígeno inductor de anticuerpos neutralizantes. Con ellos pudieron establecerse al menos tres zonas antigénicas diferentes. A su vez, 17 AcM reaccionan con NP_{64}, proteína responsable de las reacciones cruzadas entre los integrantes del Grupo Tacaribe, mostrando cinco sitios antigénicos diferentes.

El uso de anticuerpos monoclonales ha confirmado las relaciones serlógicas encontradas con los sueros policlonales y también ha comenzado a revelar la complejidad antigénica de los arenavirus. Se necesita aún, la preparación de un mayor número de estos reactivos, en especial los dirigidos hacia las proteínas de envoltura donde se espera encontrar una mayor diversidad antigénica.

c) Otros estudios biológicos.

Estudios de protección cruzada en cobayos y monos permitieron establecer relaciones más cercanas entre algunos miembros de esta familia.

En contraste con el VJ, la mayoría de los miembros del Complejo Tacaribe no son patógenos para el cobayo. Esta propiedad ha sido útil para analizar las interrelaciones de los virus del grupo en pruebas de protección cruzada (Coto y col., 1967). Los animales inoculados con una sola dosis de virus Tacaribe fueron totalmente protegidos hacia la descarga posterior con VJ. Los virus Pichinde y Tamiami no protegen a los cobayos, mientras que Amapari y Machupo solo otorgan un porcentaje de protección intermedia, aunque mayor en el caso de Amapari (Coto y col., 1976).

Al inocular cobayos con virus Tacaribe por vía i.m. los anticuerpos neutralizantes antiTacaribe (homólogos) aparecen 10 días después de la infección y aumentan rápidamente. Los anticuerpos heterólogos antiJunín recién se demuestran y en bajo título a los 45 días p.i., aumentando luego considerablemente (Coto y col. 1980). Ya desde el 3º día p.i. con virus Tacaribe, se observa protección contra VJ aún en ausencia de anticuerpos séricos detectables, lo cual podría deberse a un fenómeno de interferencia (Damonte y col., 1978). Luego se pierde este estado de protección el que reaparece durante la segunda semana p.i. y se mantiene por lo menos 1 año (Coto y col., 1980).

En los animales infectados con virus Tacaribe y luego desafiados con VJ aparece una respuesta inmune secundaria específica para VJ ya a los 3 días p.i. con VJ.

Cuando el C. jacchus se inocula con virus Tacaribe no manifiesta síntomas clínicos y no se detecta viremia ni alteraciones hematológicas. La infección con virus Tacaribe en estos animales les otorga protección contra dosis letales de la cepa XJ del VJ (Weissenbacher y col., 1982). Los anticuerpos neutralizantes antiTacaribe se detectan

en el animal desde la 3º semana y aumenta sus niveles paulativamente. No se detectan anticuerpos antiJunín hasta 60 días después de la infección con Tacaribe, pero inmediatamente después del desafío con VJ, se observa, al igual que en los cobayos, una respuesta de anticuerpos heterólogos.

Se ha postulado principalmente como mecanismo de protección del virus Tacaribe en cobayos y monos frente al desafío con VJ, a la respuesta anamnésica que se demuestra a los primeros días p.i. con VJ o la probable participación de la inmunidad celular.

Al mismo tiempo, en cultivos de células Vero persistentemente infectadas con los virus Junín, Tacaribe y Amapari, se observó resistencia cruzada, que en el caso de Junín y Tacaribe ha sido explicada por la participación de partículas interferentes (Damonte y col., 1983).

En ambos casos, por protección cruzada in vivo o infecciones persistentes in vitro, los resultados fueron semejantes a los obtenidos con la técnicas serológicas.

Con los virus del grupo Lassa se han realizado estudios de protección cruzada semejantes. Los virus Mopeia y Mobola (no patógenos para el hombre) otorgan inmunidad a cobayos y monos frente a la infección posterior con virus Lassa (Kiley y col., 1979; Jahrling, 1983).

II. POR TECNICAS BIOQUIMICAS.

El avance en la metodología de las ciencias biológicas y químicas en sus ramas de biología molecular e ingeniería genética permiten caracterizar más precisamente a las especies virales conocidas y a las que día a día se descubren.

Años atrás, la biología y la bioquímica permitieron separar a los paramixovirus en géneros con características propias, a pesar de sus similitudes morfológicas. Más reciente es el descubrimiento de las distintas estrategias que utilizan para transcribir su información los S ARN de los distintos géneros de la familia Bunyaviridae (Bishop,1985).

A continuación se mencionarán algunas metodologías utilizadas para caracterizar a los miembros de un género viral o a los integrantes de una especie, puntualizando en aquellas que permiten asociar las diferencias encontradas con una mayor o menor virulencia.

Análisis de las proteínas virales.

En geles tradicionales de poliacrilamida monodimensionales es poco frecuente encontrar diferencias en la migración de las proteínas de las cepas virales. Una de las excepciones es el virus de la Rabia. Cuatro cepas de distinta virulencia del serotipo 1 de este virus fueron comparadas por esta metodología, pudiéndose visualizar diferencias en la migración de las proteínas G y M y en la cantidad de proteína L. Las cepas más virulentas poseían mayor cantidad de proteína L y presentaban una banda doble en la posición de la proteína G (Dietzschold y col., 1979).

En otros géneros, las diferencias entre las proteínas de distintos tipos solo se logró en geles modificados por incorporación de agentes químicos. En el caso de poliovirus se agregó urea; en estas condiciones las proteínas de la cápside de cada tipo migraron con un patrón característico (Kew y col., 1980).

Las diferencias en aminoácidos entre cepas de una especie viral o entre un virus y sus variantes es, en algunos casos, de uno o unos

pocos residuos que los geles monodimensionales no podrían resolverlas.

Los geles bidimensionales o el análisis de los péptidos obtenidos por ruptura de las proteínas virales con enzimas, permiten obtener una mayor información sobre las diferencias intratípicas. De esta forma, dos mutantes avirulentas de un mengovirus fueron comparadas con la cepa parental analizando sus proteínas por varias metodologías bioquímicas. Solo se pudieron observar diferencias en geles bidimensionales en los cuales la primera dimensión separaba por punto isoeléctrico y la segunda lo hacía por pesos moleculares. Una de las proteínas de superficie que se resolvía en varias marcas en la posición de su peso molecular presentó un patrón diferente en las variantes y en la cepa parental (Anderson y Bond, 1987).

Por el análisis de los péptidos trípticos se pudo determinar que las proteínas purificadas de cepas de virus aftosa tipo A presentaban diferencias en las proteínas de la cápside y en los productos de ruptura primaria P_{100} y P_{88} (Brown, 1980).

Análisis de los ácidos nucleicos.

La movilidad electroforética de los ácidos nucleicos de los virus con genoma segmentado provee un método para caracterizarlos. Los rotavirus presentan distintos patrones en sus segmentos 9, 10 y 11 dentro de un mismo serotipo (Garbarg-Chemon y col., 1986). Los virus con genoma no segmentado o con pocas especies de ácidos nucleicos en su ciclo replicativo, no ofrecen la posibilidad de visualizar pequeñas diferencias (a veces de muy pocos nucleótidos) que existirían entre virus de una misma especie.

Al igual que en el caso de las proteínas, la ruptura del ácido

nucleico en fragmentos de oligonucleótidos y su separación en geles en dos dimensiones, permiten un análisis más detallado. La relación entre la cepa vacunal de poliovirus Sabin tipo 2 con aislamiento de un enfermo paralítico se demostró por los mapas de oligonucléotidos. Las alteraciones en ellos aparecieron gradualmente a lo largo de tres años de estudio, reteniendo la mayoría de las marcas características de la cepa vacunal por un período largo de tiempo, lo que permitió confirmar el orígen vacunal de la infección (Yomeyama y col., 1982).

Estudios con reasortantes.

Los virus con genoma fragmentado también ofrecen la posibilidad de obtener reasortantes por coinfección en células sensibles. Fué así que utilizando dos rotavirus de distinto serotipo, que difería entre sí más de 50 veces en sus dosis diarreicas 50%, se obtuvieron reasortantes por las técnicas tradicionales.Los fenotipos de ellas fueron analizados determinándose la movilidad de los segmentos de ARN en geles de SDS-poliacrilamida, por comparación con los obtenidos simultaneamente con las cepas parentales. Las dosis diarreicas de las reasortantes fueron calculadas por infección en animales. Los resultados de estos estudios muestran que la diferencia en la virulencia fué debida al gen 4. Este gen codifica para una proteína de la cápside externa, cuyo clivaje está correlacionado con un incremento en la infectividad viral in vitro y que tendría un rol importante en la virulencia en el tracto gastrointestinal. Esta metodología ofrecería la posibilidad de variar la virulencia de los rotavirus por la formación de reasortantes con el gen 4 de una cepa atenuada y los otros genes de cepas patógenas (Offit y col., 1986).

Análisis secuencial del ARN.

Mutaciones espontáneas se acumulan en el genoma de los virus ARN con velocidades muy altas (Holland y col., 1982). De esta forma es problemático correlacionar las alteraciones de un gen con cambios específicos en las propiedades biológicas de los virus.

Comparando la secuencia nucleotídica del gen de la neuraminidasa de una cepa aviar del virus Influenza avirulenta con una derivada virulenta se observó, en un período de 6 meses, 8 sustituciones en ese solo gen (Deshpande y col., 1985). En este caso, es difícil establecer cual de esas mutaciones podrían alterar la virulencia del virus.

En otro caso, la sustitución de un nucleótido del gen S_1 de un rotavirus, que resulta en un cambio de lisina a ácido glutámico en su hemoaglutinina, altera su virulencia fenotípica (Kaye y col., 1986). Ambas cepas, la parental y la derivada, tienen crecimiento similar en el intestino, pero difieren en su neurovirulencia y neurotropismo.

Análisis de los fragmentos producidos por enzimas de restricción.

El genóma de las cepas del virus Herpes tipo 2 aisladas en Japón y Suecia fueron comparados por el análisis de los fragmentos producidos con 5 enzimas de restricción. Varios sitios de restricción fueron analizados y mostraron variaciones significativamente entre las muestras de los dos países y también en cada uno de ellos (Sakaoka y col.,1987). Sin embargo, la mayoría de los aislamientos en cada zona fueron genéticamente más relacionados entre sí que con los del otro país. Se sugirió, en ese caso, que unos pocos progenitores genéticamente similares del virus Herpes 2 existieron en cada zona y evolucionaron independientemente.

Técnicas de hibridización ARN-ARN.

Esta metodología se empleó para estudiar la relación genética entre cepas de rotavirus aisladas de infantes asintomáticos y cepas obtenidas de niños enfermos (Flores y col., 1987). Mediante dos ensayos distintos (Northern-blot e hibridización en solución en condiciones restringidas) se encontró que el gen 4 de los casos asintomáticos fallaba en hibridizar con los correspondientes genes recobrados de enfermos, independientemente de la especificidad serotípica. Al mismo tiempo, el gen 4 de las cepas asintomáticas fué altamente conservado. Esto sugeriría que la diferencia entre los dos grupos analizados se debería, al menos en parte, a la diferencia en el producto del gen 4.

ANTECEDENTES EN ARENAVIRUS.

Hasta el presente, algunas de las metodologías recién comentadas han sido aplicadas a la familia Arenaviridae. El análisis de los péptidos trípticos de la proteína N de los virus Pichinde (cepa prototipo) y Pichinde Munchique (aislamiento atenuado del mismo virus) demostró que las dos cepas pueden ser distinguidas por esta técnica (Vezza y col., 1980). Asimismo, los fragmentos obtenidos por la ruptura de los segmentos S y L del ARN de las cepas WE y ARN del virus LCM permitieron diferenciarlas (Kirk'y col., 1980).

Se han obtenido reasortantes de LCM con cepas de distinta virulencia: ARM, WE y Traub. Usando estas reasortantes y las cepas parentales se ha demostrado que la perturbación en la síntesis de la hormona de crecimiento en ratones C3H está asociada al S ARN (Riviere y col., 1985 c). También que el L ARN está asociado con una infección

aguda fatal en cobayos adultos (Riviere y col., 1985 b).

En otro estudio, se encontró que las reasortantes con genotipo WE/ARM y TRAUB/ARM causan una enfermedad letal en ratones BABLB/C, que no se produce con las cepas parentales o las reasortantes inversas. Estos resultados no esperados podrían explicar los brotes de virulencia de un agente infeccioso (Riviere y Oldstone, 1986).

De aquí la importancia del análisis bioquímico realizado en paralelo con los ensayos biológicos para obtener una caracterización completa de cepas virales. De omitir los estudios bioquímicos de las reasortantes virulentas del virus LCM recién citadas (Riviere y Oldstone, 1986) podrían no ser diferenciadas de las cepas parentales avirulentas por los métodos serológicos convensionales.

O B J E T I V O S.

OBJETIVOS.

Hasta el presente, el estudio de las propiedades biológicas del virus Junín se ha centrado en la caracterización de la patogenicidad de este agente para distintos modelos animales. Dicho análisis se ha efectuado principalmente con la cepa prototipo patógena XJ y sus derivadas atenuadas $XJCl_3$ y XJ_0.

El objeto de este trabajo de investigación fué estudiar en forma comparativa varias cepas patógenas y atenuadas de virus Junín a fin de establecer las propiedades diferenciables entre las mismas. Con ese fin se determinaron las características de la interacción de las cepas con células Vero comparando especialmente sus ciclos replicativos y capacidad citopatogénica in-vitro. También se establecieron las relaciones antigénicas mediante reacciones de neutralización cruzada, lo que permitió un ordenamiento de las cepas estudiadas a través de un dendrograma.

La posibilidad de encontrar características diferenciales entre estas cepas contribuirá al estudio de la variabilidad del virus Junín en la naturaleza y al establecimiento de parámetros que puedan relacionarse con la virulencia de las mismas.

M A T E R I A L E S

Y

M E T O D O S.

MEDIOS.

MEDIO DE CRECIMIENTO CELULAR (MC):

Medio esencial mínimo de Eagle (MEM) en solución salina balanceada de Earle, con glutamina y aminoácidos no esenciales (Medio sintético Gibco), suplementado con 5% de suero bovino Gibco inactivado a 56ºC 30 minutos y 50 µg/ml de gentamicina.

MEDIO DE MANTENIMIENTO CELULAR (MM):

Medio basal de Eagle (MBE) en solución salina balanceada de Earle, con glutamina (Medio sintético Gibco), suplementado con 3% de suero bovino inactivado y 50 µg/ml de gentamicina.

MEDIO PARA LA MARCACION DE PROTEINAS CELULARES Y VIRALES:

Medio basal de Eagle en solución salina balanceada de Earle, sin metionina y/o leucina, suplementado con 3% de suero bovino dializado y 50 µg/ml de gentamicina.

MEDIO DE PLAQUEO (MP):

Medio esencial mínimo de Eagle de doble concentración (MEM 2X), suplementado con 4% de suero bovino y 100 µg/ml de gentamicina. En el momento de ser usado se mezclaron volúmenes iguales de MEM 2X y agar al 2% en agua destilada.

SOLUCIONES.

SOLUCION BALANCEADA DE FOSFATOS (PBS):

Para 1000 ml.

ClNa	8,00 g.
ClK	0,20 g.

PO_4H_2K	0,20	g.
$PO_4HNa_2 . 2 H_2O$	1,44	g.

BUFFER PARA RADIOINMUNOPRECIPITACION (RIPA):

Tris-ClH pH 7,4	0,01	M.
ClNa	0,15	M.
SDS	0,1	%
Tritón X-100	1	%
PMSF	0,4	mM
Deoxicolato de Na	1	%

BUFFER DE MUESTRA PARA ELECTROFORESIS (PAGE 1X):

Tris-ClH pH 6,8	0,0625	M.
SDS	5	%
Glicerol	10	%
2-mercaptoetanol	2	%
Azul de bromofenol	0,005	%

BUFFER DE CORRIDA PARA ELECTROFORESIS:

Tris-ClH pH 8,8	0,05	M
SDS	0,1	%
Glicina	0,055	M

GEL DE RESOLUCION:

Acrilamida-bisacrilamida	12	%
Tris-ClH pH 8,8	0,375	M
SDS	0,1	%
TEMED		
$S_2O_8 (NH_4)_2$		

GEL DE SEPARACION:

Acrilamida-bisacrilamida	3,8 %
Tris-ClH pH 6,8	0,125 M
SDS	0,1 %
TEMED	
S_2O_8 $(NH_4)_2$	

COLORANTE:

Azul brillante de Coomassie R.250 al 0,25% en metanol: agua: ácido acético glacial (50:50:10).

DECOLORANTE:

Metanol: agua: ácido acético glacial (50:880:70).

SOLUCION CENTELLEADORA:

Tritón X-100	500	mg.
PPO	8,25	g.
Dimetil-POPOP	150	mg.
Tolueno	1.000	ml.

REACTIVOS.

^{35}S-metionina New England Nuclear	1.030	Ci/mmol.
^{3}H-leucina New England Nuclear	111,1	Ci/mmol.

ANIMALES.

RATONES BLANCOS:

Se usaron ratones albino suizo cepa OF_1 Iffa Credo Lyon, Francia; criados en el bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, cuyas edades fueron rigurosamente controladas.

COBAYOS.

Animales de la cepa Harley de 300 gramos de peso. Para estudios de patogenicidad se incoularon 1.000 UFP de cada cepa de virus Junín por vía intramuscular en la pata posterior izquierda.

CONEJOS:

Animales adultos utilizados para obtener inmunosueros.

CULTIVOS CELULARES.

CELULAS VERO:

Se utilizaron células Vero (riñón de mono verde africano (Cercopithecus aethiops) cultivadas en monocapa. La línea se mantuvo por repiques semanales en medio de crecimiento.

CELULAS BHK-21 CLON 13:

La línea BHK-21 (riñón de hamster bebé) fué crecida en monocapa en iguales condiciones y medios de cultivo que los utilizados con la línea Vero.

VIABILIDAD CELULAR.

Se sembraron distintas concentraciones de células Vero en tubos de ensayo. A las 24 hs, se tomaron muestras de cada concentración que se procesaron por dos métodos: una serie de tripsinó, resuspendió en

MM y se diluyó al medio con azul Tripán 0,4%. Las células se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente y se contaron en cámara de Newbawer. A la otra serie se la fijó durnate 10 minutos con formol 10% y se la coloreó con cristal violeta 0,05% durante 30 minutos. Al cabo de dicho tiempo, se retiró el colorante y la monocpa fué lavada con agua y secada al aire. El colorante se eluyó con 1 ml de etanol 50% - ácido acético 0,1% y se midió la DO a 590 nm. Se halló la relación entre el número de células viables (calculadas por la exclusión del colorante vital) y la cantidad de cristal violeta absorbido por las mismas (calculado por la DO a 590 nm) (Figura 4).

VIRUS.

JUNIN (VJ):

Se utilizaron cinco cepas de VJ cuyos orígenes, lugar y año de aislamiento e historia de pasajes se detallan en el Cuadro 3. Las cepas XJ y $XJCl_3$ se mantienen en nuestro laboratorio por pasajes en cerebro de ratón lactante (CR). La cepa MC_2 fué proporcionada por la Dra. María Inés De Mitri del Instituto Nacional de Microbiología "C. G. Malbrán" en su pasaje 8º en cerebro de ratón. La cepa IV_{4454} fué cedida por la Dra. Marta S. Contigiani del Instituto de Virología de la Universidad de Córdoba. La cepa AN_{9446} fué provista por la Dra. Susana Merani de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Medicina de Buenos Aires, quien la recibiera de la Dra. M. S. Contigiani. Independientemente de los pasajes anteriores, todas las cepas fueron clonadas tres veces en células Vero por el método de la dilución límite por formación de placas bajo agar y amplificadas en células BHK-21.

Cuadro 3: Detalles de aislamiento e historia de pasajes de las cepas de virus Junín.

CEPAS DE VJ	ORIGEN	LUGAR DE AISLAMIENTO	AÑO	PASAJES	REFERENCIA
XJ	Humano	Junín (Prov. de Bs. Aires)	1958	$Cobayo_{27}$ CR^{*}_{25}	Parodi y col.(1958)
MC_2	Cricétido	Mones Cazón (Prov. de Bs. Aires)	1964	CR_8	Berría y col.(1967)
IV_{4454}	Humano	Rosales (Prov. de Córdoba)	1970	CR_5	Contigiani y Sabattini (1977)
AN_{9446}	Cricétido	Laboulage (Prov. de Córdoba)	1967	CR_5	Contigiani (Comunicación personal).
$XJCl_3$	Derivada de XJ por clonado en células MA-111			$Cobayo_2$ CR_{11+X} MA-111# CR_{16}	Guerrero y col.(1969)

* CR : cerebro de ratón lactante.

\# MA-111 : línea de riñón de conejo.

PREPARACION DE STOCKS DE VIRUS JUNIN.

CEREBRO DE RATON LACTANTE:

Se inocularon ratones de 24-48 hs de edad por vía intracerebral (i.c.) con 200 UFP de virus. A los 7 días post-inoculación (p.i.) se sacrificaron los animales y se cosecharon los cerebros. Se preparó un homogenato al 10% p/v de cerebro de ratón en PBS (pH 7,4) conteniendo 10% de suero bovino inactivado. El homogenato se centrifugó a 13.000 g durante 30 minutos a 4ºC y el sobrenadante se fraccionó y se utilizó como fuente de virus, conservándolo a -70ºC.

CULTIVOS CELULARES:

Se infectaron monocapas de células BHK confluentes con una multiplicidad de infección (m.i.) de 0,02 UFP/célula. El inóculo se dejó adsorber 1 h a 37ºC. Se lavaron las células con PBS y se agregó medio de mantenimiento. A los 6 días p.i. se cosechó el sobrenadante y se centrifugó a 900 g durante 15 minutos para eliminar los restos celulares. El sobrenadante se fraccionó y se conservó a -70ºC.

DETERMINACION DE LA INFECTIVIDAD.

TITULACION POR EL METODO DE FORMACION DE PLACAS BAJO AGAR (UFP):

Se utilizó el método tradicional de formación de placas bajo agar con las modificaciones realizadas por Damonte y Coto (1974) para

la titulación del VJ. Monocapas confluentes de células Vero se infectaron con 0,2 ml de la dilución adecuada de la muestra a titular. Se dejó adsorber el inóculo durante 1 hora a 37ºC con agitación periódica. Luego de ese tiempo se retiró el inóculo, se lavó la monocapa con PBS y se cubrió con medio de plaqueo. Las botellas se incubaron en forma invertida durante 7 días a 37ºC. Al cabo de dicho tiempo, las células se fijaron con formol 10% durante 30 minutos, se retiró el agar y la monocapa se tiñó con cristal violeta 0,1% durante 15 minutos. Se utilizaron dos botellas por dilución y los títulos se calcularon en base al número de placas, volumen de inóculo y dilución considerada, de acuerdo a la fórmula:

Título (UFP/ml) = Nº de placas / volumen x dilución.

TITULACION POR OBSERVACION DE LA ACCION CITOPATOGENICA (ACP):

Se inocularon células Vero crecidas en tubos de ensayo o en microplacas de plástico de 24 pozos respectivamente con 0,2 ml o 0,1ml de cada dilución decimal seriada de virus. El inóculo se dejó adsorber una hora a 37ºC, renovándolo por MM una vez pasado ese tiempo. Las diluciones se inocularon por cuadruplicado. Los cultivose se observaron diariamente al microscopio óptico durante 10 días, registrándose la evolución e intensidad de la ACP. La misma se tabuló arbitrariamente de +1 a +5 de acuerdo al siguiente criterio:

grado +1 : $\leq$ 20% de la monocapa alterada.

grado +2 : de 20 a 40% de la monocapa alterada.

grado +3 : de 40 a 60% de la monocapa alterada.

grado +4 : de 60 a 80% de la monocapa alterada.

grado +5 : $\geq$ 80% de la monocapa alterada.

La dosis infectante 50% para cultivo de tejido ($DICT_{50}$) se calculó de acuerdo al método de Reed y Müench (1938).

CUANTIFICACION DE LA ACCION CITOPATOGENICA:

Adaptación de la técnica de Ito (1984). Se infectaron células Vero crecidas durante 24 horas en microplacas de 24 pozos con cuatro cepas de VJ a dos multiplicidades de infección (m.i.): 0,2 y 0,02 UFP/célula. Cultivos sin infectar se utilizaron como control. Los cultivos se fueron fijando en formol 10% durante 10 minutos a distintos días p.i. Al finalizar el ensayo, todos los cultivos fijados se procesaron en paralelo para determinar el efecto citolítico de las distintas cepas virales. Para ello todas fueron teñidas y decoloradas en forma análoga a la descripta, para células no infectadas, en viabilidad celular (Materiales y Métodos). Se calculó el porcentaje de destrucción de las monocapas infectadas como:

$$\% \text{ de destrucción} = 100 - (DO_{590} \text{ (muestra)}/DO_{590}\text{(control)}) \times 100$$

TITULACION EN RATONES LACTANTES:

Se inocularon 0,02 ml de cada dilución decimal seriada de virus por vía intracerebral (i.c.) en ratones de 24-48 hs. Se utilizaron lotes de 9 ratones por dilución. Se observó la morbimortalidad y se registró el día de muerte. La dosis letal 50% (DL_{50}) se calculó de acuerdo al método de Reed y Müech (1938).

TITULACION EN RATONES DE 14 DIAS DE EDAD:

Se realizó con la misma técnica que la titulación en ratones lactantes, inoculando 0,02 ml de dilucines de virus por vía i.c.

CLONADO DE VIRUS JUNIN EN CELULAS VERO.

Se infectaron monocapas de células con 50 UFP de VJ. El inóculo se dejó adsorber 1 hora a 37ºC. Pasado ese tiempo, se lavó la monocapa con PBS y se cubrió con medio de plaqueo. Los cultivos se incubaron a 37ºC durante 6 días, al cabo de los mismos se agregó un volumen menor del medio anterior adicionado de rojo neutro 1:1000. El colorante se dejó difundir 24 hs a 37ºC y se picaron las placas visibles. El virus así recogido se amplificó en células BHK-21 o se clonó nuevamente con el mismo procedimiento, previa dilución al décimo o centécimo.

Los títulos de los stocks de las cepas de VJ utilizadas en este trabajo se muestran en el Cuadro 4.

CURVA DE CRECIMIENTO VIRAL.

Monocapas de células Vero se infectaron a las 24 hs de sembradas con las cepas de VJ con una m.i. de 0,1 UFP/célula. Luego de pasado el tiempo de adsorción, se retiraron los inóculos y los cultivos se incubaron a 37ºC con medio de mantenimiento. Se cosecharon los sobrenadantes diariamente, se centrifugaron a baja velocidad para eliminar los restos celulares y se conservaron a -70ºC hasta el momento de ser titulados por UFP.

SINTESIS DE PROTEINAS CELULARES.

Para medir la incorporación de ^{3}H-leucina en cultivos celulares se utilizó la técnica de Ball y col. (1973) modificada por Mersich (1980). Cultivos de células Vero crecidos en viales de contador de centelleo líquido fueron infectados con las cepas de VJ e incubados con medio de mantenimiento a 37ºC. A los tiempos indicados en cada experi

Cuadro 4: Título de los stocks de las cepas de virus Junín.

CEPAS DE VIRUS JUNIN	TITULO[#] (UFP / ml)
$XJCl_3$	5.48×10^6
XJ	4.72×10^6
MC_2	3.45×10^6
IV_{4454}	8.35×10^6
AN_{9446}	4.00×10^6

[#] Título obtenido en células Vero.

mento los cultivos fueron marcados con 1 uC/ml de ^{3}H-leucina durante 30 min .Una hora y media antes del período de marcación, el medio fué renovado por medio sin leucina. Luego de la marcación se agregó 4 ml de PBS en cada vial y se incubó a 4ºC durante 15 min para detener la incorporación. Se descartó el sobrenadante y se precipitaron las proteínas con 1 ml de ácido perclórico 1,5% durante 15 min a 4ºC.Pasado ese tiempo se descartó el fijador y se lavaron las monocapas con PBS.Finalmente todos los materiales fueron hidrolizados en HONa 0,1 N durante 4 hs y se registró la radioactividad emitida en un contador de centelleo líquido previo agregado de 3 ml de mezcla centelleadora. En todos los casos se calculó el porcentaje de incorporación del precursor marcado en las células infectadas con respecto a las células sin infectar.

PASAJES CONCENTRADOS DEL VJ EN CELULAS VERO.

Se infectaron células Vero de 24 hs con cepas de VJ a una m.i. de 2 UFP/célula durante 1 hora a 37ºC. Se descartó el virus no adsorbido, se lavaron las células con PBS y se cubrieron con MM reincubándolas a 37ºC. Al 4º día p.i., se cosechó el sobrenadante, se centrifugó a 900 g y se congeló a -70ºC. Este material se denominó PC_1 (pasaje concentrado número 1). Para obtener PC_2 se infectaron células Vero con 0,2 ml de PC_1 sin diluir procediendo exactamente como en el caso anterior y así sucesivamente hasta obtener PC_7.

OBTENCION DE INMUNOSUEROS.

PREPARCION DE LAS DOSIS INMUNIZANTES:

Se utilizaron monocapas confluentes de células Vero de 24 hs, crecidas en botellas de 500 ml, las que fueron infectadas con una m.i. de 0,1 UFP/célula de cada cepa de virus.Los sobrenadantes se cosecharon al 3º y 4º día p.i. obteniéndose un volumen aproximado de 150 ml

por cultivo, el que fué centrifugado a 100.000 g por 15 min para separar los restos celulares y luego ultracentrifugado a 100.000 g por 2 hs para concentrarlo. El sedimento obtenido se resuspendió por sonicación en el volumen necesario de PBS como para concentrar 100 veces el material de orígen. El virus concentrado se distribuyó en alícuotas que fueron tituladas por el método de UFP y que constituyeron las dosis administradas (aproximadamente 10^6 UFP/ml).

INMUNIZACION DE ANIMALES:

Se inocularon conejos adultos por vía intravenosa (oreja). El esquema de inoculación fué de 4 dosis de 1 ml de virus concentrado cada 8 días. A los 10 días de la última dosis los animales fueron sangrados por punción cardíaca. La sangre obtenida se dejó coagular 1 hora a 37ºC y luego se mantuvo a 4ºC durante 20 hs para permitir la retracción del coágulo. Al cabo de ese tiempo se centrifugó durante 30 min a 7.500 g. El suero así obtenido se fraccionó en alícuotas y se conservó a -20ºC.

ENSAYO DE NEUTRALIZACION VIRAL.

Los sueros fueron inactivados durante 30 min a 56ºC para decomplementarlos. Se realizaron diluciones seriadas al 1/2 en MM. Se mezclaron volúmenes iguales de las diluciones de suero con una suspensión de 200 UFP/0,2 ml de virus. Una serie que sirvió como control, se preparó diluyendo suero normal de conejo en forma similar a los sueros inmunes antiVJ y mezclándolos con la misma suspensión viral. Ambas series se incubaron a 37ºC durante 60 minutos. Se inocularon monocapas de células Vero con 0,2 ml de cada muestra, titulándose la

infectividad residual por el método de UFP. El título de los inmunosueros se calculó como la inversa de la dilución de suero con capacidad de neutralizar el 50% de las placas del control.

CALCULO DEL COEFICIENTE d^2.

El coeficiente taxonómico de distancia d^2 fué usado para medir las relaciones antigénicas entre dos cepas de virus. Este ha sido definido acorde a la fórmula de Beyer y Masurel (1985):

$$d^2_{jk} = \sum_{i=1}^{n} \frac{(x_{ij}-x_{ik})^2}{n-1}$$

donde: i = un antisuero, j y k = dos cepas de virus comparadas entre sí, n= número de antisueros; x_{ij}, x_{ik} = log de los títulos de las cepas j y k con el antisuero i.

Con estos coeficientes se obtuvo una matriz de datos los que fueron ajustados por el método de grupos de pares pesados usando el promedio aritmético, tal como la describe Sneath y Sokal (1973). Este método consiste en elegir el par de cepas que posean el coeficiente más pequeño en la matriz (virus más relacionados), promediar los índices de ese par y considerarlos como un solo valor para construir una nueva matriz reducida. Luego se repite el procedimiento anterior eligiendo nuevamente el par de cepas de coeficiente menor de la segunda matriz y así sucesivamente hasta que todas las cepas se integren en grupos y por lo tanto se relacionen entre sí. Con los índices encontrados en los grupos formados se construyó un dendrograma.

ANALISIS DE LAS PROTEINAS VIRALES EN CELULAS INFECTADAS.

MARCACION DE LAS CELULAS:

Se infectaron células Vero crecidas en botellas de 15 ml con las cuatro cepas de VJ en estudio a una m.i. de 1 UFP/célula. Luego de 1 hora de adsorción a 37ºC, se retiró el inóculo y las células se incubaron con medio de mantenimiento durante 48 hs a la misma temperatura. Transcurrido ese tiempo, se lavaron las monocapas con PBS y se agregó 2 ml de MM carente de metionina. Después de 2 hs de ayuno en esas condiciones se agregó a cada botella 50 µC/ml de ^{35}S-metionina. Se continuó la incubación durante 4 hs. Luego se volcaron los sobrenadantes, se lavaron las monocapas con PBS y se resuspendieron en 1 ml de buffer RIPA. La suspención de células se sometió a tres ciclos de congelado y descongelado. Finalmente se sonicó durante 60 segundos en un Sonifier Cell Disruptor,Model 185 Heat Systems Ultrasome. Se centrifugó durante 30 minutos a 10.000 g y el sobrenadante se utilizó como fuente de antígenos virales para la prueba de inmunoprecipitación (Harnish y col,1981). El mismo tratamiento se realizó con células no infectadas.

INMUNOPRECIPITACION:

Se incubaron 300 µl de cada extracto ultracelular con 50 µl de suero hiperinmune homólogo durante 30 min a 37ºC y 90 min a 4ºC. A cada mezcla se agregó 100 µl de anti γ globulina de conejo obtenida en cabra. La mezcla obtenida se incubó 30 min a temperatura ambiente y 90 min a 4ºC, el precipitado formado se sedimentó por centrifugación a 10.000 g durante 30 min , se lavó tres veces con buffer RIPA y se resuspendió en 50 µl de buffer muestra para electroforesis (PAGE).

Las muestras se calentaron durante 3 min en baño de agua hirviendo y se conservaron a -70ºC hasta el momento de siembra.

ELECTROFORESIS EN GEL:

Se utilizaron geles planos de poliacrilamida según el sistema de Laemmili (1970) y con la modificación en el sistema buffer de Marsden (1972). Para la resolución de las proteínas se preparó un gel con una solución de acrilamida 12% en buffer Tris-HCl 0,375 M y agentes polimerizantes TEMED y persulfato de amonio.

Sobre el gel de resolución se agregó un pequeño volumen de gel separador consistente en una solución de acrilamida 3,8% en Tris-HCl 0,125 M y los mismos agentes polimerizantes. En el gel así preparado se sembraron 25 µl de cada muestra y se sometieron a electroforesis a 150 voltios a 4ºC hasta que el frente de corrida entró en el gel de resolución. A partir de ese momento se subió el voltaje a 180 voltios prosiguiendo la corrida hasta que el colorante alcanzó la parte inferior de la placa (aproximadamente 8 hs). Junto con las muestras de inmunoprecipitados se sembró en una línea 15 µl de marcador de peso molecular de proteínas. Terminada la corrida el gel se tiñó con una solución de Coomassie y se decoloró con solución decolorante.

FLUOROGRAFIA.

Una vez desteñidos los geles se preapraron para fluorografía de acuerdo al método de Booner y Lasky (1974). Para ello se sumergió el gel en dos baños sucesivos consistentes en 20 volúmenes de dimetilsulfóxido (DMS) durante 30 min cada vez. Luego se sumergió el gel en una solución de 2-5 difenil osaxol (PPO) al 20% en DMS durante 3 hs. Finalmente se colocó el gel en agua hasta el día siguiente. Se secó por a-

plicación de vacío y calor. Una vez seco el gel se puso en contacto con una película Kodak X-OMAT Rp a -70ºC en oscuridad. Después de un período de 15 a 20 días se revelaron las placas con una solución de revelador Kodak GEX durante 1 min y luego de lavarlos en ácido acético 0,1% se fijaron en fijador Kodak. Todo el proceso de revelado se realizó a temperatura ambiente.

R E S U L T A D O S .

PATOGENICIDAD EN ANIMALES.

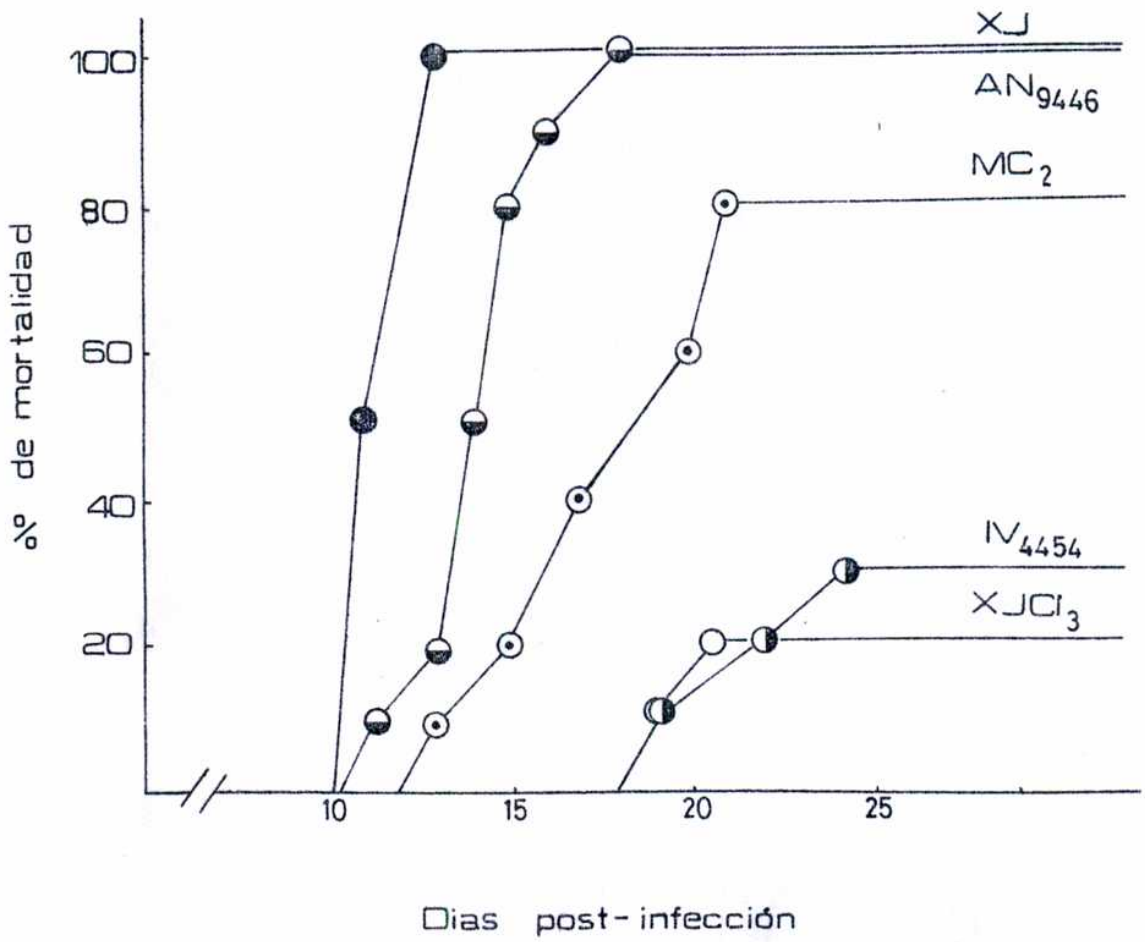
I. COBAYOS.

El cobayo es una de los animales de laboratorio más sensibles al VJ. La mortalidad que produce en este huésped parece correlacionarse con la mayor o menor patogenicidad para el hombre (Avila y col., 1979).

Para conocer la respuesta de estos animales ante la inoculación con las cepas de VJ en estudio, se inocularon 10 cobayos con 1.000 UFP de cada una de elllas. Diez controles normales se mantuvieron en iguales condiciones durante toda la experiencia. Todos los animales es observaron diariamente, registrándose su mortalidad durante dos meses. Inmediatamente después de la muerte de cada animal infectado con las cepas de Córdoba se practicó una autopsia, realizándose en todos los casos una observación macroscópica de los órganos internos. Todos aquellos animales inoculados que murieron presentaron algunas o todas las lesiones características de la infección experimental del VJ en el cobayo, dependiendo de la cepa. No se observó muerte en ninguno de los controles.

En la Figura 1 se muestran las curvas de mortalidad acumulativa producidas por las cepas estudiadas. Se observa que la cepa XJ alcanza una mortalidad del 100% con muertes entre los días 11 y 13 p.i. y un promedio del día de muerte de 12. La cepa AN_{9446} llega a igual mortalidad pero las muertes ocurren en un intervalo mayor de días (11-18 p.i.) y un promedio del día de muerte de 14,5. Los animales inoculados con MC_2 alcanzaron una mortalidad del 80%, muriendo entre los días 13 y 21 p.i. con un promedio de 18,2 .IV_{4454} y $XJCl_3$ fueron las cepas menos virulentas para cobayo, la mortalidad alcanzada por ellas fué del 30 y 20% respectivamente, siendo el promedio del día de muerte de 21,8 y 20,2.

Figura 1. Curvas de mortalidad acumulativa de cobayos inoculados con cuatro cepas del virus Junín.



La susceptibilidad del cobayo a la inoculación intramuscular con VJ permitió agrupar a las cepas analizadas en diferentes categorías: cepas $XJCl_3$ y IV_{4454} de baja virulencia, cepa MC_2 de virulencia intermedia y cepas XJ y AN_{9446} de alta virulencia.

II. RATONES DE 14 DIAS DE EDAD.

La patogenicidad que presenta el VJ en el ratón, a diferencia de lo que ocurre en cobayos, es dependiente de la edad del huésped y de la vía de inoculación del virus. Se ha observado que la inoculación intracerebral produce una mortalidad del 100% en animales de 1 a 7 días de edad, mientras que ésta disminuye a un 7% si se infectan ratones de más de 30 días de vida (Weissenbacher y col., 1975). Algunos investigadores han propuesto a los ratones de 14 días como marcadores de virulencia para las distintas cepas de VJ (Contigiani y Sabattini,1977), ya que estos huéspedes presentaban índices de letalidad diferenciales para las cepas catalogadas como patógenas o atenuadas en base a su efecto sobre los cobayos.

Con el objeto de corroborar estos hallazgos y en base a datos obtenidos en nuestro laboratorio que demuestran una susceptibilidad atípica a la infección por VJ en ratones de 11 a 14 días de edad (Candurra y Coto, 1986; Coto y León, 1978), se inocularon ratones de 14 días con cuatro cepas en estudio y se calculó el índice de virulencia como el cociente entre el título obtenido en células (UFP/ml) y el obtenido en ratones (DL_{50}/ml).

Como puede observarse en el Cuadro 5, se obtuvo un patrón de virulencia similar al presentado por estas cepas en cobayos.La cepa XJ fué la más virulenta para el ratón de 14 días con un índice (en UFP/DL_{50})

Cuadro 5: Patogenicidad de las cepas de virus Junín para ratón de 14 días de edad.

CEPAS DE VIRUS	T I T U L O UFP/ml*	DL_{50}/ml#	INDICE DE VIRULENCIA[a] UFP / DL_{50}
$XJCl_3$	$1,2 \times 10^6$	$8,7 \times 10^4$	13,79
IV_{4454}	$2,1 \times 10^6$	$3,0 \times 10^5$	7,17
AN_{9446}	$4,0 \times 10^6$	$3,1 \times 10^5$	4,00
XJ	$2,0 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	1,33

*Título obtenido en células Vero.

#Dosis letales 50% para ratones de 14 días de edad.

[a]Título en UFP/ml/Título en DL_{50}/ml.

de 1,33. En orden decreciente se observa a AN_{9446} con 4 IV_{4454} con 7,17 y $XJCl_3$ con 13,79. Sin embargo, el rango de variación en el índice de virulencia entre la cepa más atenuada ($XJCl_3$) y la más virulenta (XJ) es aproximadamente de un logaritmo, rango muy pequeño que dificulta la caracterización de cepas intermedias.

Por lo tanto, aunque la infección del ratón de 14 días de edad ha permitido diferenciar las cepas XJ y $XJCl_3$ este huésped no ha sido útil para realizar una caracterización satisfactoria de la virulencia de las cepas de VJ en estudio.

INTERACCION CON LAS CELULAS VERO.

I. PRODUCCION DE ACCION CITOPATOGENICA (ACP).

El virus Junín multiplica en una amplia variedad de cultivos celulares sin producir efecto citopático (Berría, 1977). Se conocen tres líneas celulares donde el virus multiplica y causa destrucción celular: las células Vero, HeLa y MRC-5 (Boxaca y Savy, 1972; Mettler y col.,1961; Gerrero y col., 1982). El sistema más estudiado es el que se establece en las células Vero por infección con la cepa $XJCl_3$. Este sustrato permite visualizar una ACP más definida y reproducible, caracterizada por la formación de acúmulos de células redondeadas que en los días posteriores a la infección aumentan en número y tamaño y se desprenden dejando áreas de lisis en la monocapa. Con otras cepas de VJ no se ha realizado un análisis detallado de sus interacciones con las células Vero.

1. Evolución de la ACP.

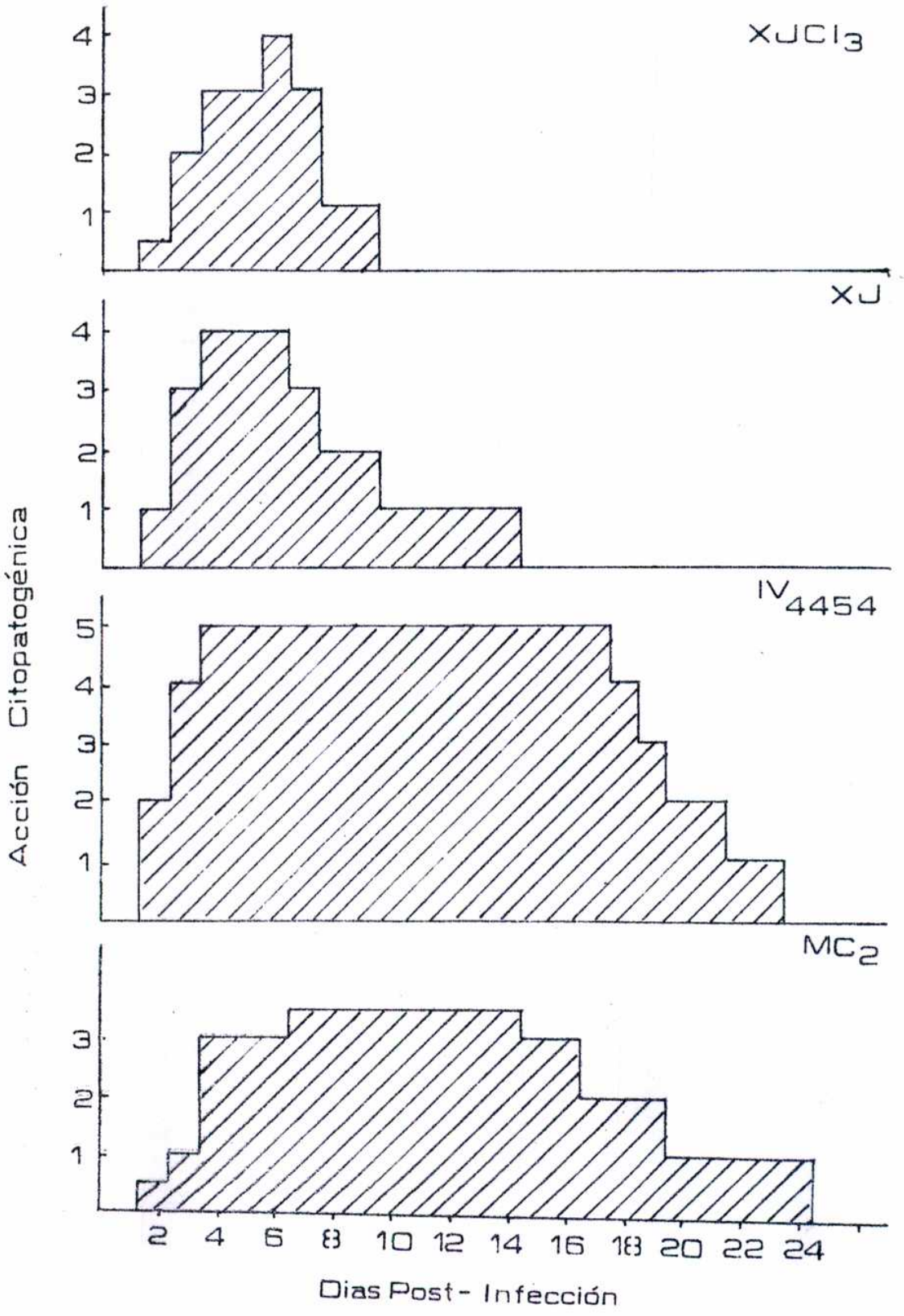
En este trabajo se analizó en forma paralela la infección de

cultivos de células Vero con cuatro de las cepas de VJ en estudio. En la Figura 2 se muestra el grado y evolución de la ACP en cultivos infectados a una m.i. de 0,1 UFP/célula. En nuestras condiciones de trabajo, la cepa $XJCl_3$ tuvo un comportamiento semejante al descripto anteriormente(Damonte, 1978). La ACP incipiente se observa al 2º día p.i. con la aparición de algunos grupos pequeños de células granulosas y más oscuras. Entre el 2º y el 6º día p.i. el número de estos focos aumenta y también su tamaño, siendo las células que los forman cada vez más redondas. En algunos focos las células centrales se desprenden. De esta forma al 6º día p.i. el 70% del cultivo está compuesto por células con morfología distinta a las células del cultivo sin infectar. A partir del 7º día p.i. las células que sobreviven a la acción viral comienzan a recuperarse y luego de una activa multiplicación reconstituyen el cultivo, iniciándose así una infección persistente.

La ACP causada por la cepa XJ también comienza al 2º día p.i. pero afecta a un mayor número de células que aparecen oscuras y con aspecto granuloso, distribuidas por toda la monocapa. En los días siguientes se observan focos más definidos, que ya al 4º día p.i., abarcan el 80% de la monocapa y se pueden ver zonas importantes de desprendimiento celular. A partir del 6º día p.i. comienza la recuperación del cultivo que se completa el día 14.

La cepa IV_{4454} muestra un comportamiento más agresivo desde los primeros días p.i., con la producción de muchos focos de células oscuras y granulosas que aumentan rapidamente en número y tamaño. Al 4º día p.i. la mayor parte del cultivo lo forman células redondas y se observan zonas grandes de desprendimiento. Al 5º día p.i. hay muy pocas

Figura 2. Grado y evolución de la ACP en células Vero infectadas con cepas de VJ.



células adheridas al vidrio, algunas con morfología normal y otras oscuras y granulosas. Esa pequeña cantidad de células con morfología semejante al cultivo control es la que, por sucesivas divisiones, reconstituye lentamente la monocapa. Recién al día 23 p.i. el cultivo está totalmente recuperado.

Con la cepa MC_2 se observó una ACP más moderada que la desarrollada con la cepa $XJCl_3$. Las pocas células que comienzan a alterarse al 2º-3º día p.i. forman focos pequeños que permanecen aislados. Casi no se observa desprendimiento celular. Al 6º día p.i. el porcentaje de células con morfología alterada no excede el 50% del total. La ACP aumenta durante la segunda semana de la infección, con focos de células redondeadas más definidos y en algunos de ellos se observa el desprendimiento de las células del centro. A partir del día 14 p.i. comienza la involución de la ACP que procede en forma lenta. La recuperación de la monocapa se obtiene recién al día 24 p.i.

Se puede observar que la ACP del VJ en las células Vero es diferente para cada una de las cepas estudiadas. IV_{4454} es la cepa más lítica en este sistema, luego le siguen, en orden decreciente, las cepas XJ, $XJCl_3$ y MC_2.

Todas las cepas presentan una ACP mayor que la descripta anteriormente para la cepa $XJCl_3$ para una m.i. semejante (Damonte, 1978), caracterizada por su día precoz de aparición y una intensidad mayor en el daño celular. En nuestro caso se trabajó con poblaciones virales obtenidas por clonado, es de suponer por ello, que la mayor citopatogenicidad de las cepas estudiadas se deba a las características culturales de los stocks empleados.

Independientemente del grado de intesidad y duración del período lítico de la infección, todos los cultivos logran recuperar sus monocapas, las que fueron mantenidas por pasajes semanales durante los 80 días subsiguientes.

2. Evolución de la ACP a distintas multiplicidades de infección.

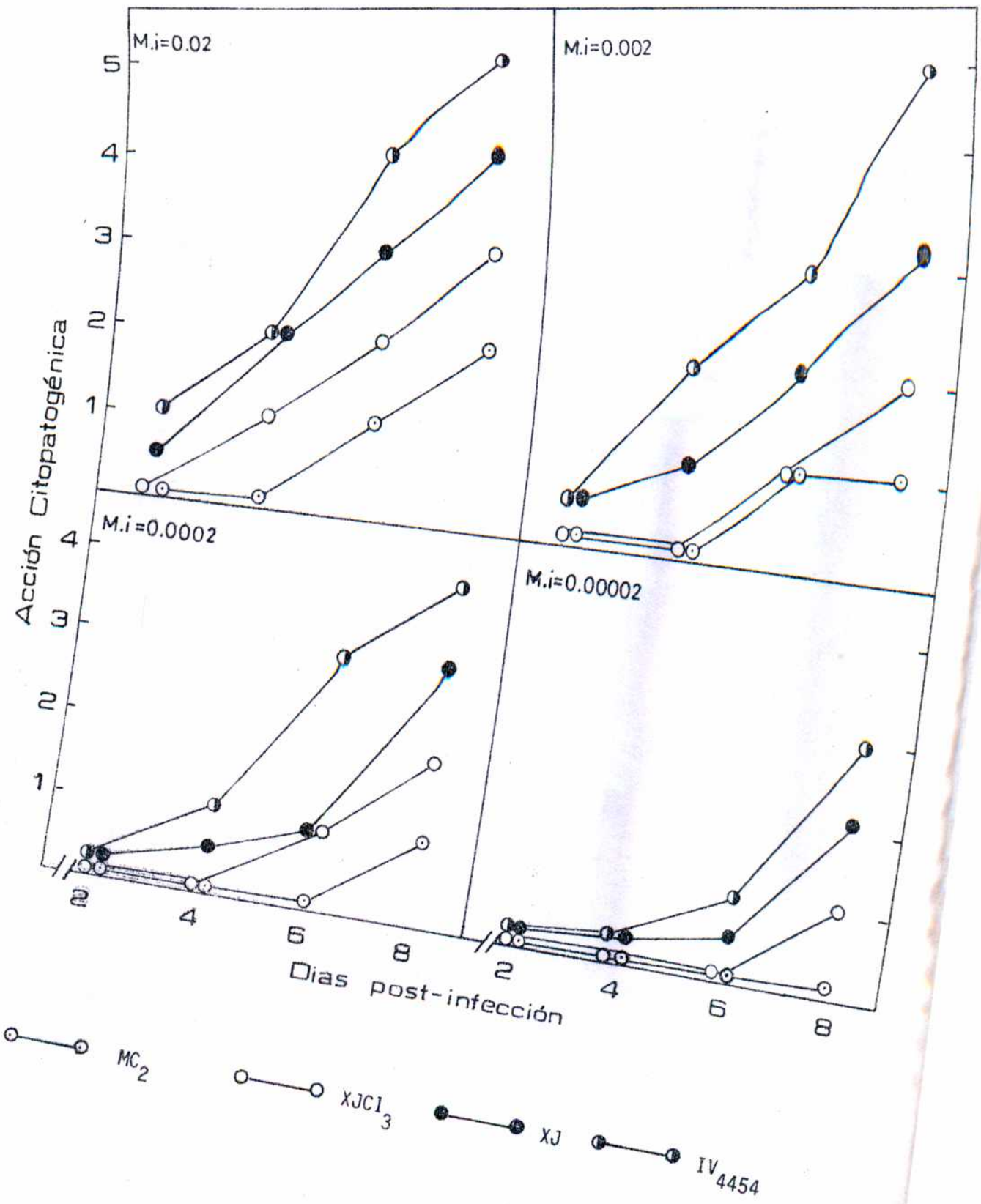
Es un fenómeno muy conocido que la ACP es regulada por la presencia de partículas interferentes (PI) en los stocks. Se sabe que a altas multiplicidades de infección (m.i.) se observa una menor acción lítica debida a interferencia (Help, 1980). Por dicha razón se volvieron a repetir los experimentos utilizando esta vez, distintas m.i. para ver si las cepas de VJ se comportaban de diferente forma.

A m.i. mayores de 0,1 UFP/célula se observó una destrucción casi total de la monocapa a las 72 hs con la cepa mas citolítica (IV_{4454}). Se ensayó entonces con menores m.i.

Se infectaron monocapas de células Vero crecidas en policubetas con las 4 cepas de VJ con m.i. entre 0,02 y 0,00002 UFP/célula. Los cultivos se observaron durante 8 días. Como se ve en la Figura 3 el tiempo de aparición de la ACP depende de la dosis inicial de infección. Para la mayor m.i. las cepas IV_{4454} y XJ comienzan la ACP al 2º día p.i., mientras que las cepas $XJCl_3$ y MC_2 lo hacen al 4º y 6º día respectivamente. A medida que disminuye la m.i., la aparición de ACP es más tardía y alcanza valores menores en la escala previamente fijada (ver Materiales y Métodos).

En las cuatro m.i. ensayadas la aparición e intensidad de la ACP conserva un orden igual para las cepas. La cepa (IV_{4454}) es la que produce ACP más temprano mientras que XJ, $XJCl_3$ y MC_2, están retrasa

Figura 3. Evolución de la ACP en células Vero infectadas con cuatro cepas de virus Junín a distintas multiplicidades de infección.



das en uno o dos días entre sí.

Con las m.i. utilizadas, los stocks de las cepas de VJ en estudio no presentan el fenómeno de autointerferencia descripto por otros autores para stocks preparados en cerebro de ratón lactante o con un pasaje en cultivos de células Vero (Help, 1980)

3. Cuantificación de la acción citopatogénica.

Las observaciones descriptas en el punto 1 son cualitativas y permitieron conocer la evolución del cultivo infectado desde la etapa de infección aguda a la persistente. Puesto que la observación de la ACP es de caracter subjetivo, se decidió utilizar un método que permitiera cuantificar la citopatogenicidad de las cepas para las células Vero descripto en Materiales y Métodos.

En la Figura 4 se puede observar que existe una relación lineal entre el número de células del cultivo y la cantidad de cristal violeta absorbido por las mismas. Cuando se infectaron células Vero con las cepas de VJ a distintas m.i. y se utilizó este procedimiento colorimétrico se pudo cuantificar el daño celular en los cultivos.

La Figura 5 muestra los valores de destrucción celular obtenidos al infectar monocapas con una m.i. de 0,2 UFP/célula. A esta m.i. se puede observar que para las cepas IV_{4454} y $XJCl_3$ la muerte celular comienza al 1º día p.i., siendo máxima al 4º día en que se alcanza una destrucción celular equivalente al 85% de la monocapa para la cepa IV_{4454} y del 65% para la cepa $XJCl_3$. La acción de la cepa XJ se observa un día más tarde, sin embargo, aumenta a mayor velocidad que la desarrollada por la cepa $XJCl_3$. En cambio MC_2 se diferencia claramente de las anteriores por su baja capacidad citolítica que no

Figura 4. Relación entre el número de células y la incorporación de colorante medida por Densidad Optica (590 nm).

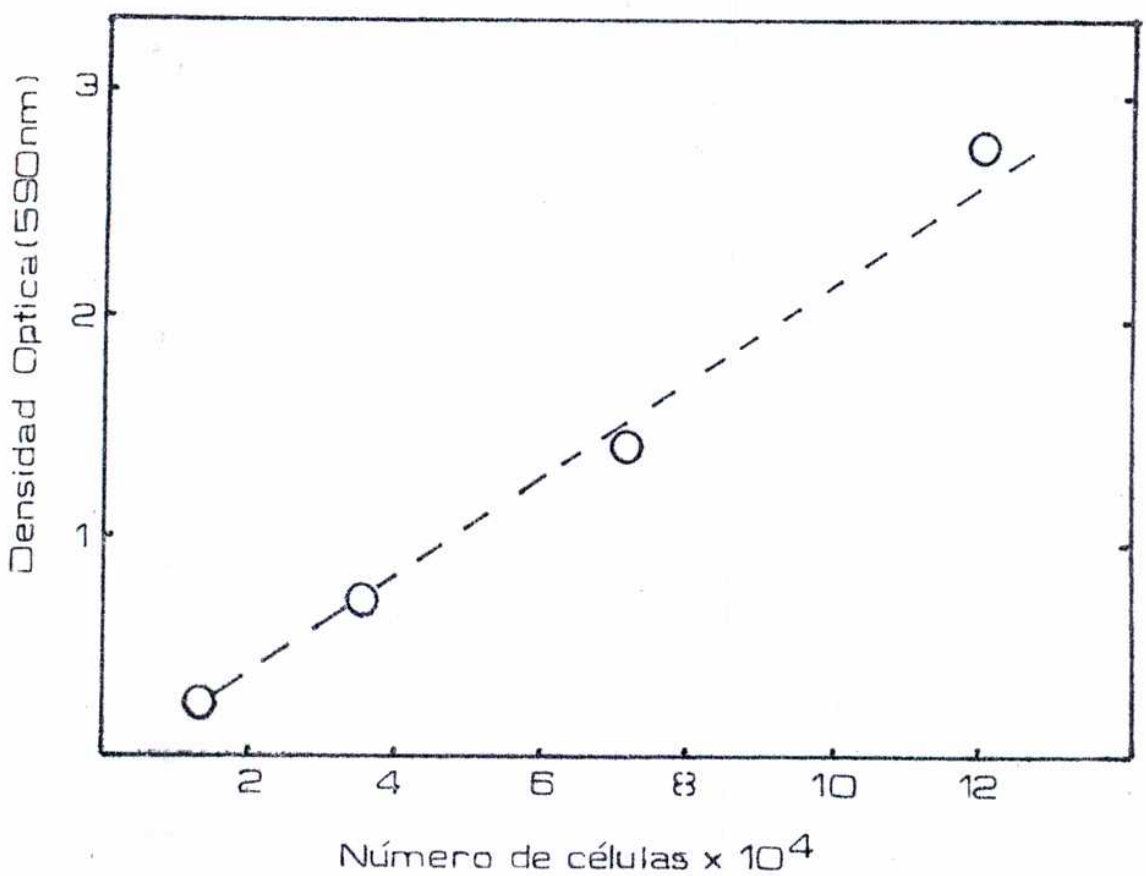
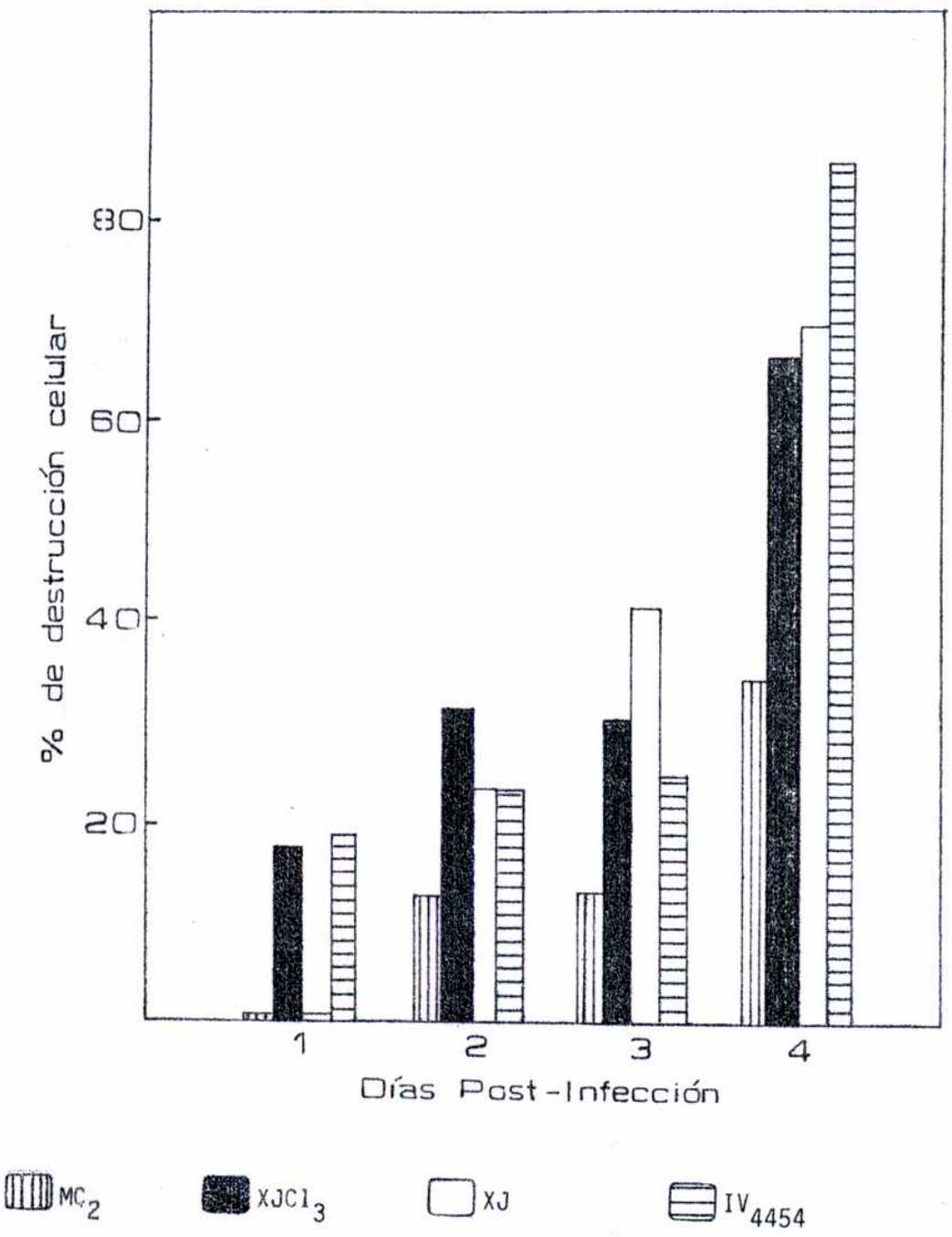


Figura 5. Efecto citolítico de las cepas de VJ sobre células Vero (m.i. = 0,2 UFP/célula).



alcanza niveles mayores al 30%.

A la m.i. ensayada, al 4º día p.i. los cultivos infectados con la cepa IV_{4454} estaban completamente destruídos. Este hecho y las diferencias en velocidad de producción de daño celular observadas con las cepas XJ y $XJCl_3$, nos indujo a realizar el mismo ensayo pero a una m.i. menor.

En la Figura 6 se presentan los resultados obtenidos cuando se repitieron los experimentos infectando con una m.i. de 0,02 UFP/célula. En este caso la ACP comienza más tardiamente y alcanza menores niveles de destrucción celular para las cepas $XJCl_3$ y MC_2 al 8º día p.i. que los observados al 4º día p.i. a la m.i. mayor (Figura 5).

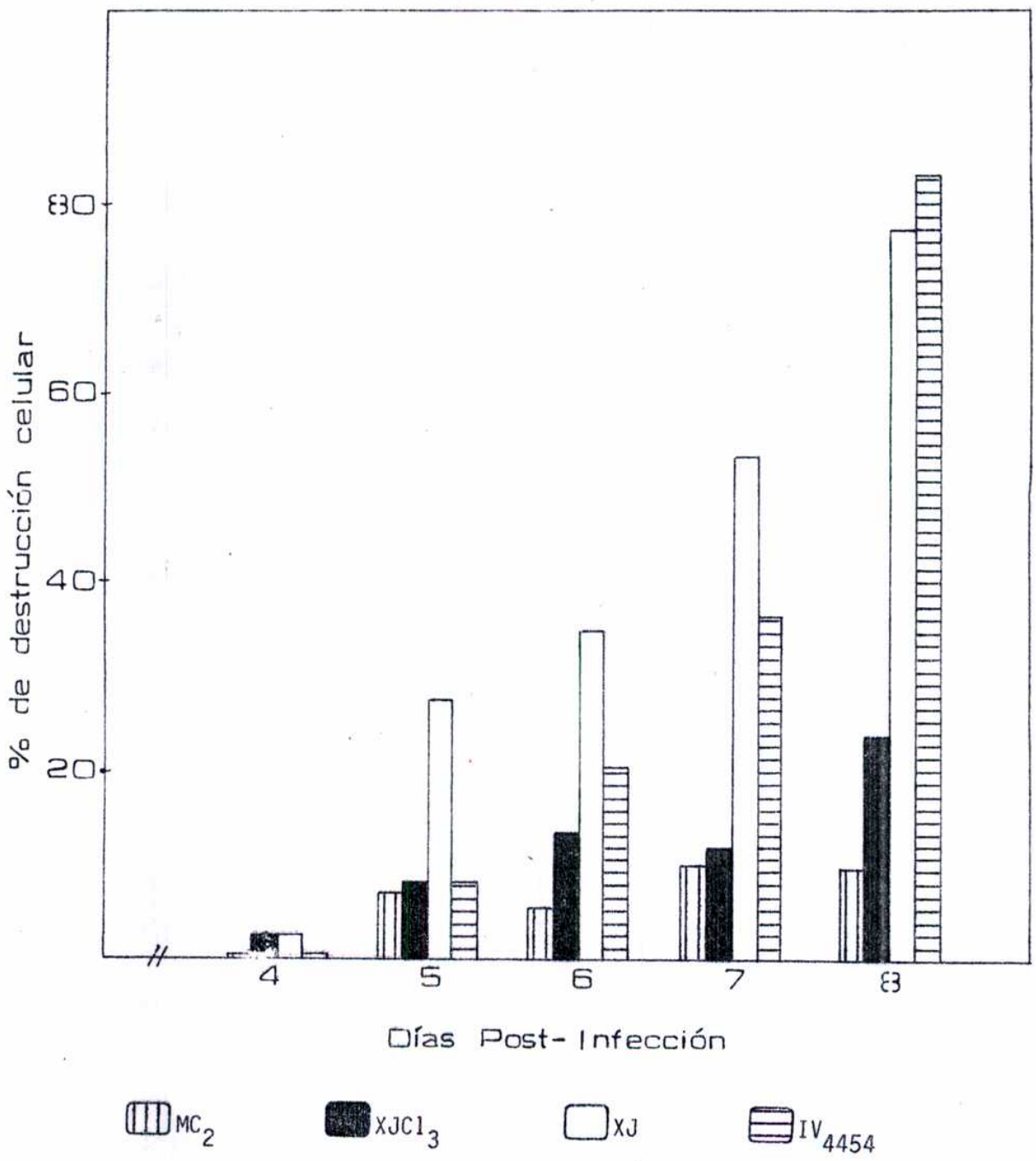
Se puede afirmar entonces, que hay una graduación en la citopatogenicidad de las cepas estudiadas; siendo esta mayor para las cepas IV_{4454} y XJ y más moderada para MC_2. $XJCl_3$ se comportaría como una cepa de acción citopatogénica intermedia, siendo semejante a XJ a m.i. de 0,2 UFP/célula y a MC_2 a m.i. de 0,02 UFP/célula.

Los valores cuantitativos del daño celular obtenidos con esta metodología son semejantes a las apreciaciones cualitativas de la observación de la ACP, confirmando las diferencias encontradas en la capacidad citopatogénica de las cepas de VJ en las células Vero.

II. MORFOLOGIA DE LAS PLACAS PRODUCIDAS BAJO AGAR.

El virus Junín produce placas bajo agar al infectar células Vero confluentes. Las características de morfología y tamaño de las placas que se obtienen en este sistema dependen del estado fisiológico de los cultivos utilizados (Damonte y Coto, 1974).

Figura 6. Efecto citolítico de las cepas de VJ sobre células Vero (m.i. = 0,02UFP/célula).



En un ensayo preliminar se obtuvieron por este método los títulos de las cepas que se utilizan en este trabajo (Materiales y Métodos). Teniendo en cuenta estos títulos, se prepararon diluciones de los stocks de las cuatro cepas de VJ para obtener aproximadamente 50 UFP en 0,2 ml. Con cada uno de estos materiales se infectaron simultaneamente cultivos de células Vero.Todas las monocapas se originaron a partir de un cultivo único y se desarrollaron en idénticas condiciones desde el momento en que fueron sembrados hasta el final de la experiencia. Estos recaudos se tomaron para minimizar las influencias del sustrato celular.

Para conocer el día de aparición de las placas y el mayor tamaño alcanzado por las mismas, se procedió a revelar cultivos diarios a partir del 5º y hasta el 9º día. Este procedimiento se efectuó con cada una de las cepas ensayadas.

En el Cuadro 6 se muestran las características de las placas para las distintas cepas. Se puede observar que las cepas IV_{4454} y XJ son las que forman placas más temprano, líticas y de tamaño pequeño, mientras que $XJCl_3$ y MC_2 producen placas visibles al 7º - 8º día, que son turbias y de mayor tamaño. Estas últimas características se ven más acentuadas con la cepa MC_2.Las placas producidas por las cepas XJ e IV_{4454} no aumentaron su tamaño en los días posteriores.

Estos resultados están de acuerdo con la capacidad citolítica de cada cepa reflejada en las Figuras 2, 5 y 6.

Las cepas más citopatogénicas (XJ e IV_{4454}) dan placas líticas que se visualizan al 5º y 6º día p.i. y las cepas con acción más moderada dan placas turbias a tiempos mayores.

Cuadro 6: Características de las placas producidas bajo agar por cepas de VJ.

CEPAS DE VJ	DIA DE APARICION (días)	ASPECTO*	TAMAÑO# (diámetro en mm)
IV_{4454}	5	líticas	1,2
XJ	5	líticas	1,3
$XJCl_3$	6 - 7	turbias	1,6
MC_2	7 - 8	muy turbias	2,0

* Placas líticas: circulares, con bordes rectos, transparentes.
Placas turbias: circulares, con bordes irregulares, no transparentes.

Tamaño determinado al 8º día p.i.

III. CURVAS DE CRECIMIENTO VIRAL.

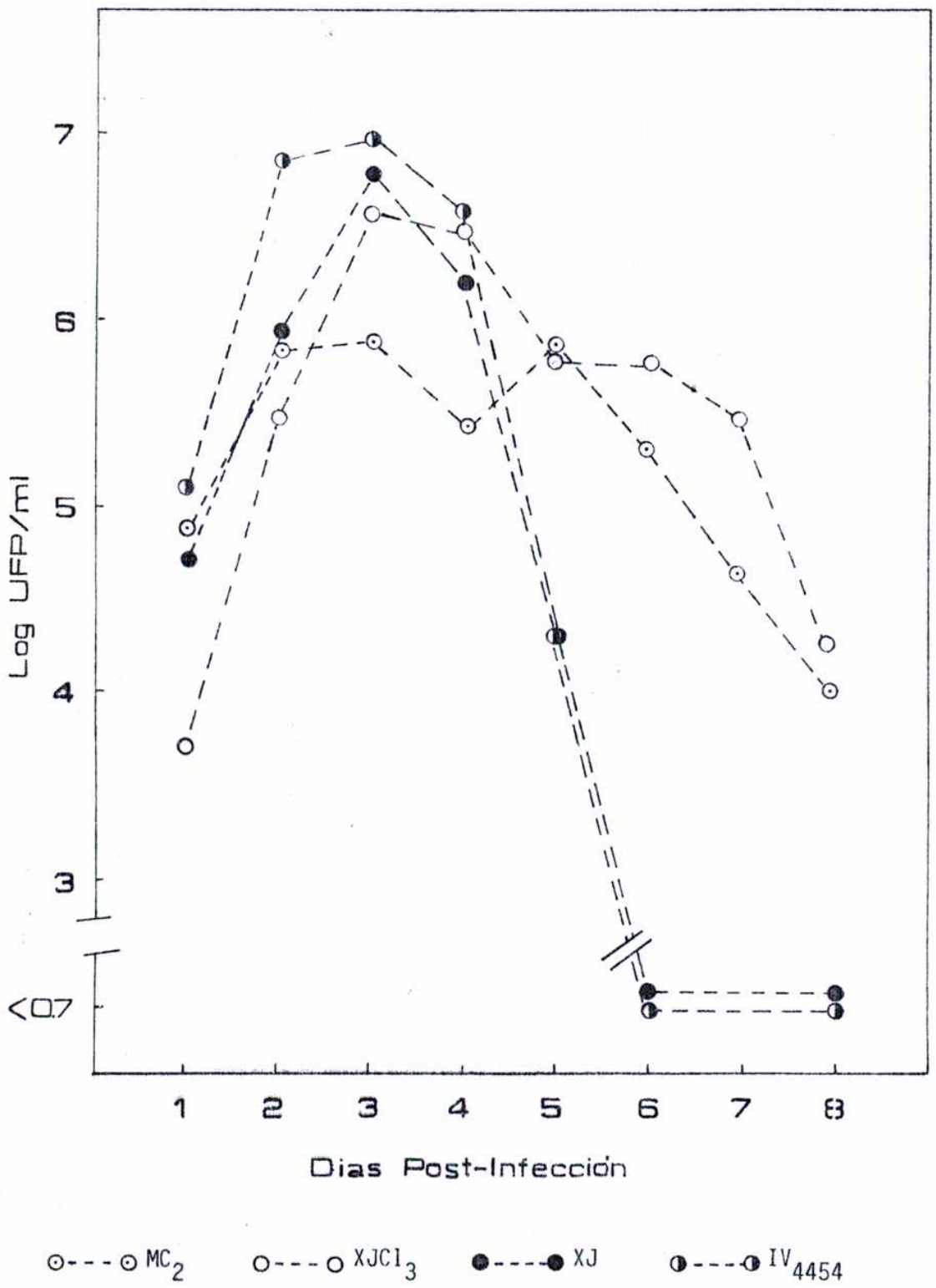
Los resultados anteriores de la acción citopática y tipo de placas producidas en células Vero por las cepas de VJ indicaban características diferenciables entre ellas. Para corroborar estas diferencias se cuantificaron los crecimientos virales.

En la Figura 7 se muestran las curvas de crecimiento extracelular de las cepas de virus Junín realizadas a una m.i. de 0,1 UFP/célula. El título de virus en todos los casos alcanza su valor máximo al 3º día p.i., a partir de ese día los títulos decaen.

La cepa IV_{4454} es la que multiplica más rápido, liberando aproximadamente 10^7 UFP/ml desde el 2º día. Al 4º día comienza a disminuir la producción viral. La ACP en este cultivo es muy marcada, las pocas células que quedan adheridas no permiten detectar virus en el sobrenadante a partir del 6º día. La cepa XJ muestra un comportamiento más gradual: el título del sobrenadante aumenta casi linealmente del 1º al 3º día p.i. con un ritmo aproximado de 1 log por día. A partir del 4º día p.i. disminuye la producción viral y no se detecta título extracelular en los días siguientes al igual que con la cepa IV_{4454}. La cepa $XJCl_3$ sigue un patrón similar a la cepa XJ, pero con valores menores hasta el 3º día. Luego de alcanzado su valor máximo, la declinación es más gradual, con títulos mayores a 10^5 UFP/ml hasta el día 7º p.i. La cepa MC_2 multiplica en este sistema menos eficientemente, con valores que no superan las 10^6 UFP/ml desde el 2º al 5º día p.i.

La cepa $XJCl_3$ sigue patrones similares y que coinciden con los datos aportados previamente (Damonte, 1978). XJ e IV_{4454} presentan un período de producción viral más corto, donde se destaca una declinación muy pronunciada luego que es alcanzado el título máximo viral.

Figura 7. Curvas de crecimiento de cepas de VJ en células Vero (m.i. = 0,1 UFP/célula).



Por el contrario en la infección con la cepa MC_2 pareciera establecerse un estado estacionario que dura un período de cinco días. Las células Vero parecerían ser menos permisibles para esta cepa. Asimismo, la velocidad de producción viral no es la misma para las cepas estudiadas, IV_{4454} es la cepa que alcanza comparativamente el mayor título al 2º día. Estas características son resumidas en el Quadro 7.

La replicación del VJ estaría relacionada directamente con su capacidad citolítica en cuanto a la velocidad de producción viral y título alcanzado e indirectamente en la amplitud del período productivo. Por el contrario el día en que se alcanza el mayor título viral para cada cepa es independiente de la misma.

IV. EFECTO SOBRE LA SINTESIS DE PROTEINAS DE LA CELULA HUESPED.

Resultó de interés en esta investigación, al encontrarnos con stocks citolíticos, analizar con más detalle la interacción del VJ con su huésped. Para ello se estudió la síntesis de las proteínas celulares en cultivos infectados con cuatro cepas de VJ, midiendo la incorporación de ^{3}H-leucina en las primera horas p.i. antes que se observara la ACP, como se indica en Materiales y Métodos.

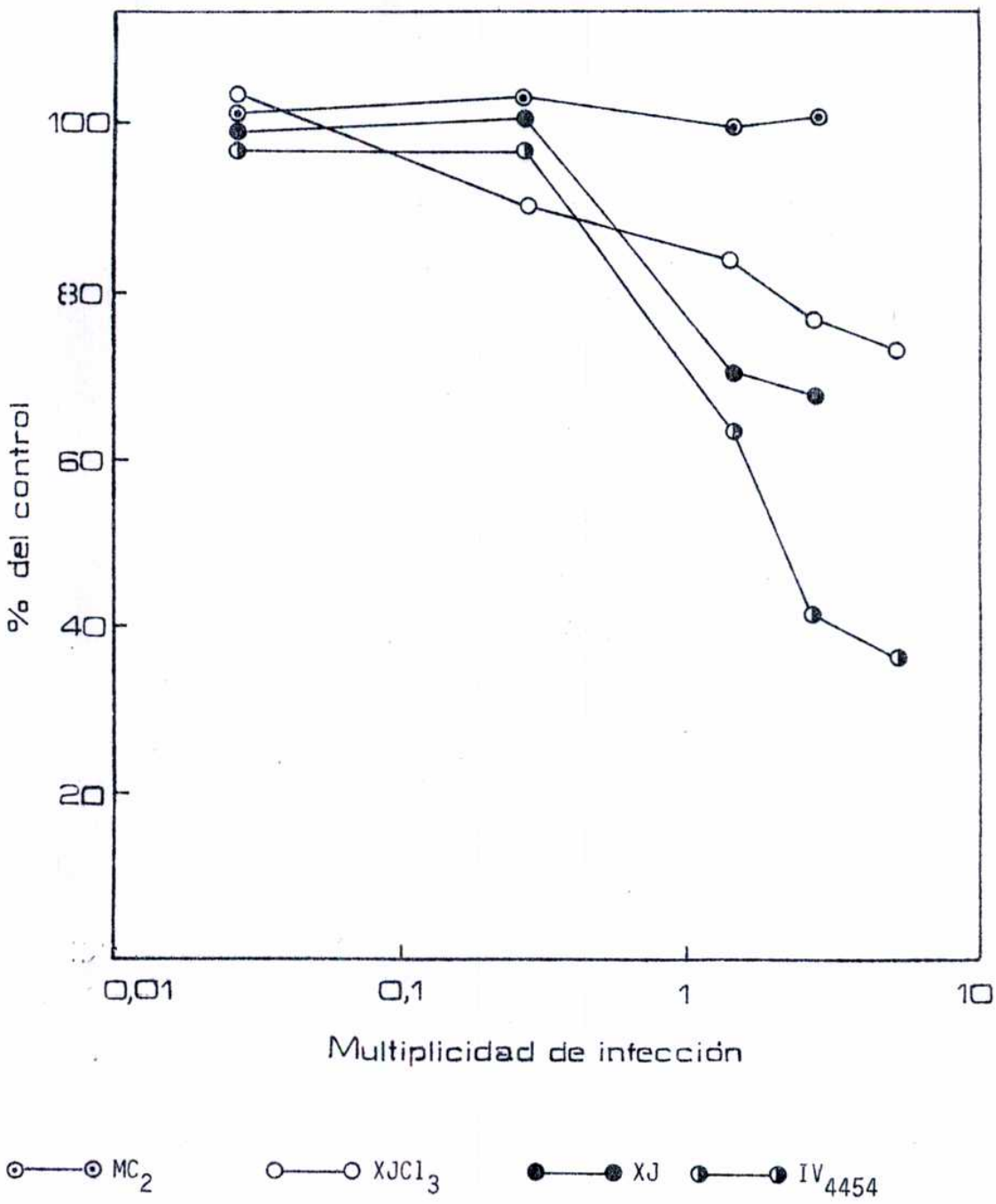
Se comenzó midiendo la incorporación del precursor en cultivos infectados con m.i. entre 5 y 0,025 UFP/célula, a las 40 horas p.i.. En la Figura 8 se muestran los valores obtenidos. Se puede observar en ella que la incorporación de ^{3}H-leucina es dependiente de la m.i.. A multiplicidad mayor de 0,5 UFP/célula, la inhibición es directamente proporcional a ella. Sin embargo, la capacidad de inhibir la síntesis de proteínas celulares no es inherente a todas las cepas. La cepa IV_{4454} produce un 60% de inhibición a m.i. de 2,5 UFP/célula mientras

Cuadro 7: Características de la replicación de las cepas de VJ en células Vero.

CEPAS DE VIRUS	MAXIMO TITULO ALCANZADO (UFP/ml)*	DIA DE TITULO MAXIMO
XJ	$4,7 \times 10^6$	3
IV_{4454}	$9,4 \times 10^6$	3
$XJCl_3$	$3,8 \times 10^6$	3 - 4
MC_2	$8,0 \times 10^6$	2,3 - 5

* Título obtenido en células Vero.

Figura 8. Síntesis de proteínas celulares infectadas con cepas de virus Junín.



que la cepa MC_2 , aún a esa m.i., no presenta diferencias con el control. Las cepas XJ y $XJCl_3$ muestran un comportamiento intermedio.

Se quiso determinar si la membrana de las células infectadas presentaban alguna alteración respecto de la entrada de ^{3}H-leucina a las 40 hs p.i. Para ello fué necesario conocer la fracción total del precursor que penetraba en las células durante el pulso. Esa cantidad se consideró formada por dos fracciones. Una de ellas fué el precursor precipitado luego de la hidrólisis (índice medido en el experimento de la Figura 8), que en esta oportunidad llamaremos, para distinguirla, fracción insoluble. La otra fracción la constituyó todos los productos marcados que permanecieron solubles luego de la acción del agente precipitante (ácido tricloroacético), más los eliminados en los lavados con PBS. A la cantidad de ^{3}H-leucina recuperada de estas soluciones se la denominó fracción soluble.

Para tal fin se infectaron células Vero con las cepas $XJCl_3$ e IV_{4454} con una m.i. de 2,5 UFP/célula. Se realizó el pulso de ^{3}H-leucina a las 40 hs p.i. en los cultivos infectados y en los controles sin infectar. Pasado ese tiempo, se procedió en forma análoga que en el experimento anterior pero recuperando al precursor de la fracción insoluble (cpm al finalizar la hidrólisis) y de la fracción soluble (cpm recuperadas de la solución de agente precipitante y de las utilizadas en los lavados).

En el Cuadro 8 se muestran los resultados obtenidos. Se puede observar en él que los valores totales del precursor son semejantes en los tres cultivos estudiados. Esto demuestra que la multiplicación del VJ en las células Vero a las 40 hs p.i. no altera la entrada de ^{3}H-leucina.

Cuadro 8: Distribución de ^{3}H-leucina en cultivos normales e infectados.

CULTIVOS	FRACCION INSOLUBLE*	FRACCION SOLUBLE	TOTAL
Sin infectar	1238#	3644	4882
Infectados con:			
$XJCl_3$	884	3962	4846
IV_{4454}	681	4114	4795

cpm de incorporación de ^{3}H-leucina. Valor promedio de cuatro mediciones.

* la definición de las fracciones solubles e insolubles se detallan en el texto.

Dado que la multiplicidad de 2,5 permitió distinguir un efecto diferencial de las cepas en estudio, se eligió la misma para establecer la cinética de la síntesis de proteínas celulares.

En la Figura 9 se puede observar que a partir de las 28 horas p.i. la síntesis de proteínas en las células infectadas es dependiente de la cepa utilizada. Si bien MC_2 tiene un comportamiento semejante al control hasta las 48 hs p.i., las otras tres cepas inhiben en forma variable la síntesis de proteínas. A las 40 hs p.i. las cepas XJ, $XJCl_3$ e IV_{4454} inhiben un 30% y a las 48 hs se observa para IV_{4454} un 55% de inhibición, para XJ un 42% y para $XJCl_3$ un 38%.

De la observación de las Figuras 8 y 9 se puede concluir que la cepa IV_{4454}, que fué la más citolítica para las células Vero, inhibe significativamente la síntesis de proteínas celulares; mientras que MC_2, la de menor citopatogenicidad, no afecta la síntesis de proteínas de las células Vero. Las cepas XJ y $XJCl_3$ tienen nuevamente un comportamiento intermedio.

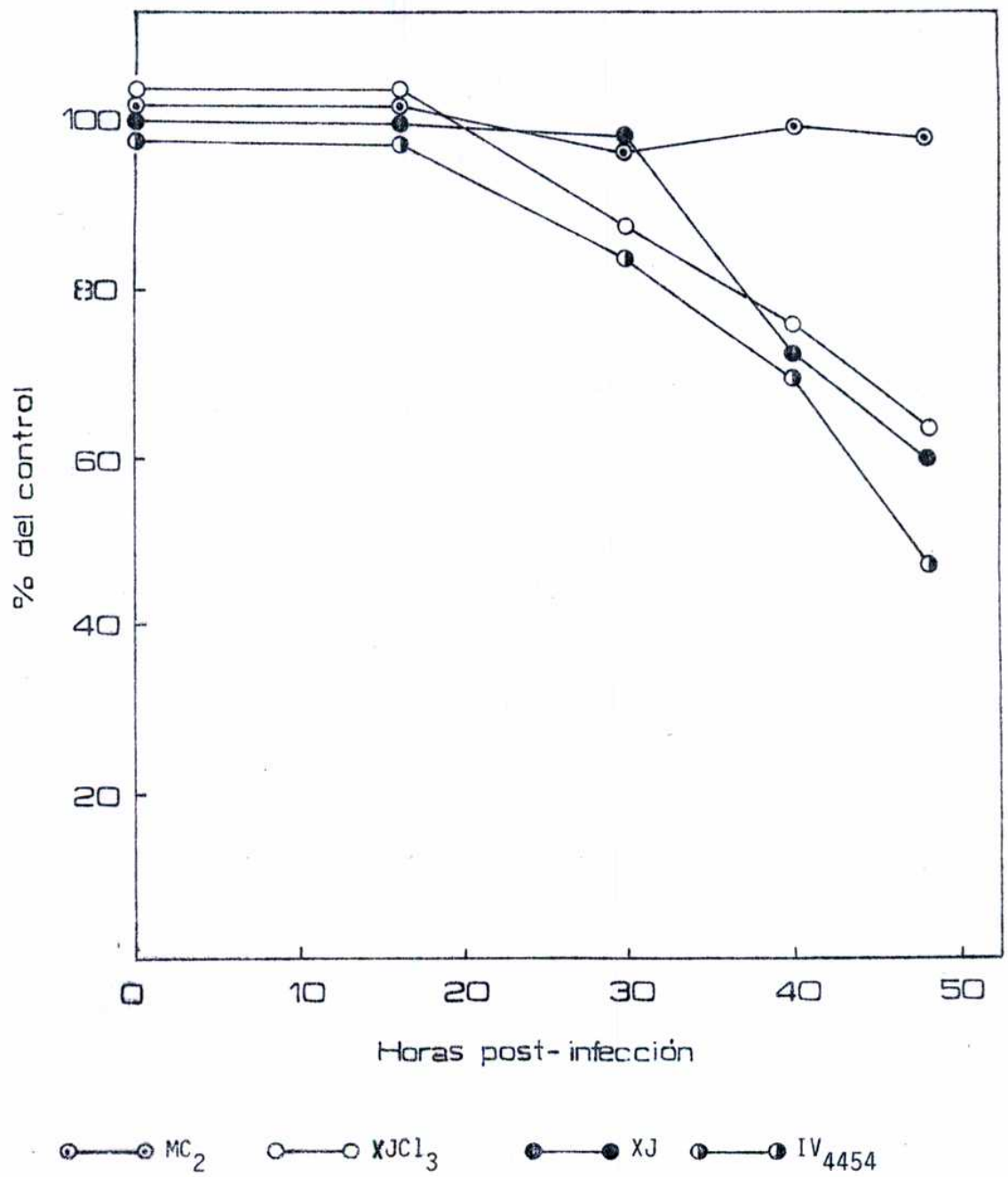
V. SINTESIS DE PROTEINAS VIRALES EN CELULAS INFECTADAS.

En algunas familias de virus se han encontrado diferencias en la movilidad electroforética de las proteínas entre distintas cepas de una misma especie (Dietzchold y col., 1979). Hasta el momento, esta variación no ha sido estudiada para los arenavirus.

Al considerar el amplio rango de virulencia encontrado en las cepas de VJ utilizadas fué de interés conocer si estas variaciones se podrían correlacionar con alguna diferencia en sus proteínas.

Se comenzó este estudio analizando los polipéptidos de las cepas de VJ inmunoprecipitados con sus sueros homólogos de cultivos de

Figura 9. Cinética de la síntesis de proteínas celulares infectada con cepas de virus Junín.



células Vero infectados, marcados con ^{35}S-metionina y procesados como se detalla en Materiales y Métodos. Simultaneamente se corrieron en todos los geles marcadores de PM que se revelaron por tinción de proteínas previa a la fluorografía, lo que permitió conocer los PM de las bandas originadas por los polipéptidos virales.

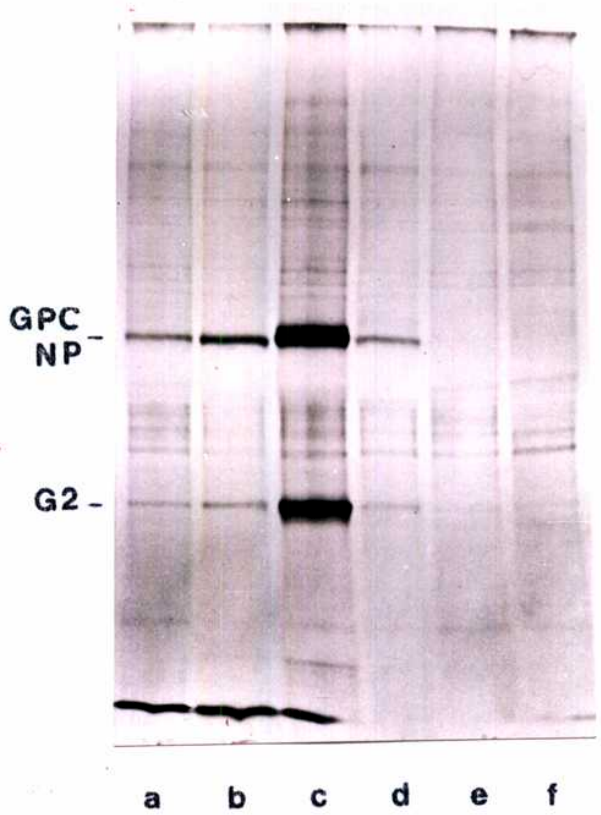
La fluorografía obtenida se muestra en la Figura 10. Las cuatro muestras ensayadas muestran algunos de los polipéptidos del VJ previamente reportados: GPC, NP y G_2 (De Mitri y Martínez Segovia, 1985). El precursor de las glicoproteínas GPC (64-67 K) y la nucleoproteína NP (60-64 K) comigran en las condiciones utilizadas debido a la similitud de sus PM. La glicoproteína G_2 se visualiza en la posición 36-38K. No se observó en este gel a la glicoproteína G_1, situación ya informada por otros investigadores (De Mitri y Martínez Segovia, 1985).

No se observaron diferencias en la posición de los polipéptidos de las cepas utilizadas. La única variación es en la intensidad de las bandas de cada cepa, siendo más destacadas para $XJCl_3$ y menos detectables para las otras, la cepa MC_2 presentó las bandas más tenues. Esta variación podría deberse a diferencias en la reactividad de los inmunosueros utilizados.

Ha sido comprobado en nuestro Laboratorio que los virus Junín y Tacaribe son igualmente inmunoprecipitados por sus sueros homólogos y heterólogos (Damonte y col., 1986). Con este antecedente se realizó un ensayo para comprobar la reacción cruzada entre las cepas de VJ.

Siguiendo la misma metología anterior se infectaron cultivos con las cepas $XJCl_3$ y XJ y se inmunoprecipitaron los polipéptidos virales con el suero anti$XJCl_3$, suero con el que se obtuvo las bandas más intensas en el experimento anterior.

Figura 10. Síntesis de polipéptidos en células Vero infectadas con las cepas de virus Junín.



Fluorografía de los polipéptidos de extractos de células Vero infectadas con las cepas: a) MC_2, b) IV_{4454}, c) $XJCl_3$, d) XJ y no infectadas: e) y f); marcadas con ^{35}S-metionina a las 48 hs p.i. e inmunoprecipitadas con sueros: a) y f) antiMC_2 b) antiIV_{4454}, c) anti$XJCl_3$, d) y e) antiXJ.

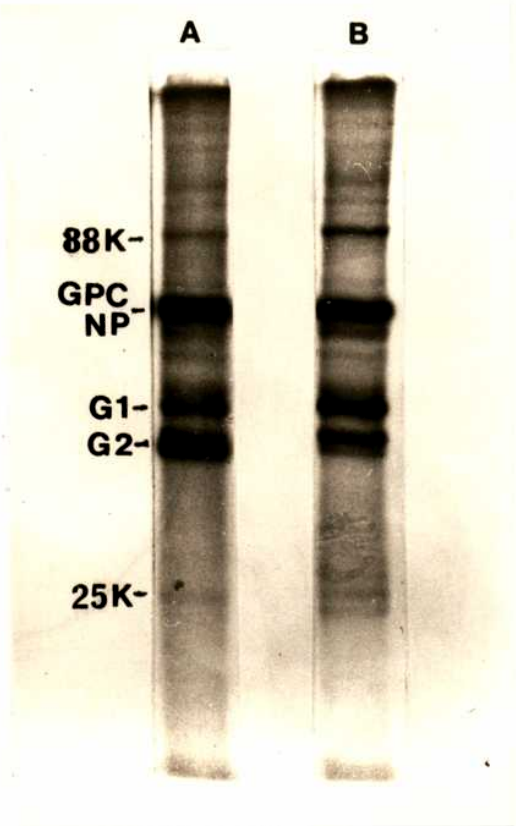
En la Figura 11 se muestra la fluorografía obtenida. En esta oportunidad se pudo visualizar la posición de los polipéptidos principales GPC, NP, G_1 y G_2 y también las bandas de los polipéptidos menores 88K y 25K (De Mitri y Martínez Segovia, 1985). No se observó diferencia en la posición e intensidad de las bandas de las cepas XJ y $XJCl_3$ lo que demuestra que el suero utilizado es igualmente reactivo con su cepa homóloga y con la cepa heteróloga.

Se quiso conocer también la cinética de la síntesis de proteínas de las cepas de VJ. Para ello se hizo la inmunoprecipitación de los polipéptidos de las células infectadas con las cepas XJ, $XJCl_3$ e IV_{4454} a distintos tiempos p.i., utilizando el suero anti$XJCl_3$ que mostró ser el más reactivo.

En la Figfura 12 se muestra la fluorografía obtenida. A las 24 hs p.i. las cepas $XJCl_3$ e IV_{4454} presentan las bandas de los polipéptidos GPC, NP, G_2 y 25K. En las células infectadas con XJ la glicoproteína G_2 esta ausente a ese tiempo. A las 48 hs p.i. se observa, además de las proteínas presentes a las 24 hs, las bandas correspondientes a G_1 y 88K: así como también G_2 en la cepa XJ. A ese tiempo se observa la síntesis mayor de proteínas para todas las cepas. A las 72 hs p.i. disminuye la intensidad de las bandas de los polipéptidos en los tres casos analizados.

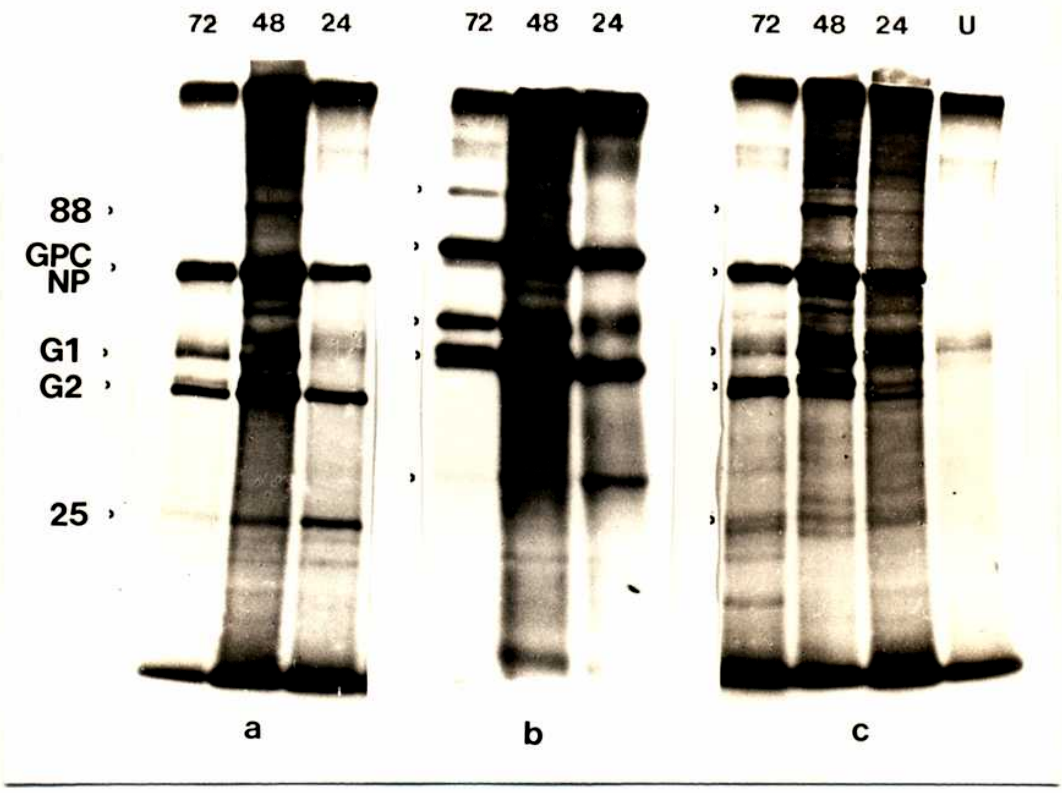
La cinética y el patrón electroforético de las proteínas virales fué semejante con las tres cepas. El incremento de la síntesis de todas las proteínas virales hasta llegar al máximo a las 48 hs es también muy similar. La cepa IV_{4454}, sin embargo muestra mayor intensidad en la marcación de sus polipéptidos, lo que se correlaciona con la mayor producción viral observada en su curva de crecimiento en la Figura 7.

Figura 11. Síntesis de polipéptidos en células Vero infectadas con las cepas XJ y $XJCl_3$.



Fluorografía de los polipéptidos de extractos de células Vero infectadas con las cepas: A) $XJCl_3$ y B) XJ, marcadas con ^{35}S-metionina a las 48 hs p.i. e inmunoprecipitadas con suero anti$XJCl_3$.

Figura 12. Cinética de la síntesis de polipéptidos en células Vero infectadas con las cepas de virus Junín.



Fluorografía de los polipéptidos de extractos de células Vero infectadas con las cepas: a) $XJCl_3$, b) IV_{4454} y c) XJ, marcadas con ^{35}S-metionina a las 24, 48 y 72 hs p.i. e inmunoprecipitadas con suero anti$XJCl_3$. U) células Vero no infectadas.

Al mismo tiempo esta cepa es la que produce una inhibición destacada en la síntesis de las proteínas celulares. Este hecho podría favorecer su mayor eficiencia de replicación y de síntesis de proteínas virales.

CARACTER TERMOSENSIBLE.

La eficiencia de multiplicación de la cepa prototipo XJ y de su derivada $XJCl_3$ en las células Vero es semejante dentro del rango de temperatura de 34 a 40ºC (Ceriatti, 1985). Con el objeto de comparar la capacidad de replicación de las cepas en estudio en ese rango de temperaturas se titularon por el método de UFP a 37 y 40ºC simultaneamente.

En el Cuadro 9 se muestran los títulos obtenidos a esas temperaturas y el índice de termosensibilidad (índice ts) de cada cepa definido como el cociente entre el título a 40ºC y el título a 37ºC. En todos los casos se observa que las cepas multiplican mejor a 37ºC que a 40ºC, casi con un 50% más de eficiencia a la menor temperatura. Estos resultados, similares para las cuatro cepas estudiadas, son a su vez, los obtenidos en nuestro laboratorio con los stocks de la cepa $XJCl_3$ (en células Vero) usados como controles en estudios de termosensibilidad (Ceriatti, 1985; Candurra y Coto, 1986).

El carácter termoestable de las cepas de VJ analizadas en este ensayo al igual que otros parámetros antes descriptos como la patogenicidad en cobayo, nos confirman que el clon elegido de cada cepa para realizar los estudios de caracterización son representativos de la cepa respectiva.

Cuadro 9: Titulación de las cepas de VJ a 37 y 40ºC.

CEPAS DE VIRUS	T I T U L O (U F P / m l) 37ºC	40ºC	INDICE ts#
$XJCl_3$	9,30 x 10^5	6,00 x 10^5	0,64
IV_{4454}	2,55 x 10^6	9,40 x 10^5	0,37
XJ	1,36 x 10^6	5,75 x 10^5	0,42
AN_{9446}	1,48 x 10^6	9,85 x 10^5	0,67
MC_2	8,20 x 10^5	4,80 x 10^5	0,59

Indice ts = Título a 40ºC / Título a 37ºC.

DETECCION DE PARTICULAS INTERFERENTES.

Varios investigadores encontraron una relación entre la capacidad citolítica de los stocks de arenavirus y la presencia o no de partículas interferentes (PI) (Dutko y Pfau, 1978; López y Franze-Fernández, 1985) . La mayoría de los stocks de VJ que fueron analizados en nuestro laboratorio provenían de cerebro de ratón o con un pasaje en cultivos celulares (Help, 1980). El procedimiento por el cual nosotros obtuvimos los stocks de esta investigación (clonado en tres pasos sucesivos y posterior amplificación a baja multiplicidad), minimiza la producción de PI (Huang y col., 1986).

Fué de nuestro interés conocer si la capacidad citolítica diferencial de las cepas de VJ se debía a la presencia de distintos porcentajes de PI.

La presencia de estas partículas en los stocks de VJ ha sido demostrada por la protección que se observa al infectar cultivos con los materiales concentrados: efecto llamado de prozona (Help, 1980). Para caracterizar al material interferente en los stocks de las cepas en estudio, se infectaron monocapas de células Vero con los materiales concentrados y diluídos 1/10 y 1/100, titulándolos por el método de formación de placas.

Se pudo observar lisis total en los materiales concentrados y casi total en los diluídos 1/10 para todas las cepas ensayadas. No fue posible visualizar el fenómeno de prozona en ellos, lo que demuestra que la proporción de partículas interferentes presentes en las cepas en estudio no es detectable por esta metodología.

Un procedimiento descripto para enriquecer a los stocks virales

en PI (Help, 1980) es realizar pasajes sucesivos a altas m.i. Siguiendo esas pautas se intentó conocer la capacidad de producción de PI de las cepas de VJ. Para ello se realizaron pasajes concentrados con las cepas $XJCl_3$ e IV_{4454} como se indica en Materiales y Métodos, los que fueron titulados por UFP.

En el Cuadro 10 se muestran los valores de los títulos de los sobrenadantes de los pasajes concentrados. Se puede observar que en el sistema VJ-células Vero utilizado se obtiene una alta producción viral infectiva en todos los pasajes realizados. La infectividad disminuye del 1º al 3º pasaje en aproximadamente 1,5 log., pero vuelve a aumentar a títulos semejantes a los del 1º pasaje en forma rápida. Estos stocks se comportan en forma distinta a los stocks ricos en PI descriptos por Help (1980), por el contrario serían semejantes a los pasajes realizados en esa investigación a baja m.i. y, por ese motivo, con baja producción de PI.

Los altos títulos de los pasajes concentrados y la lisis total que se observa al titular los stocks concentrados nos impiden cuantificar el porcentaje de PI.

Se puede observar que el comportamiento de las cepas IV_{4454} y $XJCl_3$ es similar en estos experimentos a pesar de ser IV_{4454} una cepa de alta capacidad citolítica y $XJCl_3$ de acción moderada.

De todas estas osbervaciones se concluye que la proporción de PI en las cepas de VJ estudiadas es muy baja e independiente de la capacidad citolítica de cada cepa.

Cuadro 10: Pasajes concentrados de cepas de VJ en células Vero.

PASAJES	TITULO (UFP/ml)	
	$XJCl_3$	IV_{4454}
PC_1*	$1,3 \times 10^6$	$2,1 \times 10^7$
PC_2	$7,1 \times 10^5$	$4,0 \times 10^6$
PC_3	$9,4 \times 10^4$	$6,0 \times 10^5$
PC_4	$> 10^5$	$8,3 \times 10^5$
PC_5	$> 10^6$	$3,1 \times 10^6$
PC_6	$> 10^6$	$1,6 \times 10^7$
PC_7	$> 10^6$	$1,4 \times 10^7$

* PC_x = pasaje concentrado número x.

RELACIONES ANTIGENICAS ENTRE LAS CEPAS DE VJ.

Como vimos en la Introducción los virus del Complejo Tacaribe dan reacciones serológicas cruzadas por las pruebas de FC e IF mientras que la neutralización de la infectividad es el único ensayo específico de especie. Por ese motivo, la técnica de neutralización fué elegida para estudiar las relaciones antigénicas entre las cepas de VJ.

Se utilizaron sueros policlonales hiperinmunes preparados en conejos. Diluciones de ellos se enfrentaron a 100 UFP de cada cepa como se indica en Materiales y Métodos. La infectividad residual de cada muestra, titulada en células Vero, fué utilizada para construir las curvas de neutralización que se muestran en las Figuras 13, 14, 15 y 16.

Se puede observar en ellas que las cepas de VJ presentan una respuesta heterogénea frente a los sueros. La actividad neutralizante en todos los casos es mayor para las cepas homólogas y menor para las heterólogas. Se distingue también, un grado variable de reactividad cruzada, lo que permite deducir diferencias en la afinidad de los sueros hacia las cepas de VJ.

El suero anti$XJCl_3$ (Figura 13) muestra una diferencia importante entre la curva homóloga y las heterólogas, que en este caso son semejantes entre sí, sugiriendo una respuesta antigénica diferencial entre la cepa clonada in vitro y las cepas de campo.

El suero antiXJ (Figura 14) muestra una similitud antigénica mayor entre la cepa homóloga y la cepa AN_{9446}, intermedia para MC_2 e IV_{4454} y muy lejana para $XJCl_3$.

Figura 13. Curvas de neutralización de las cepas de virus Junín con suero anti$XJCl_3$

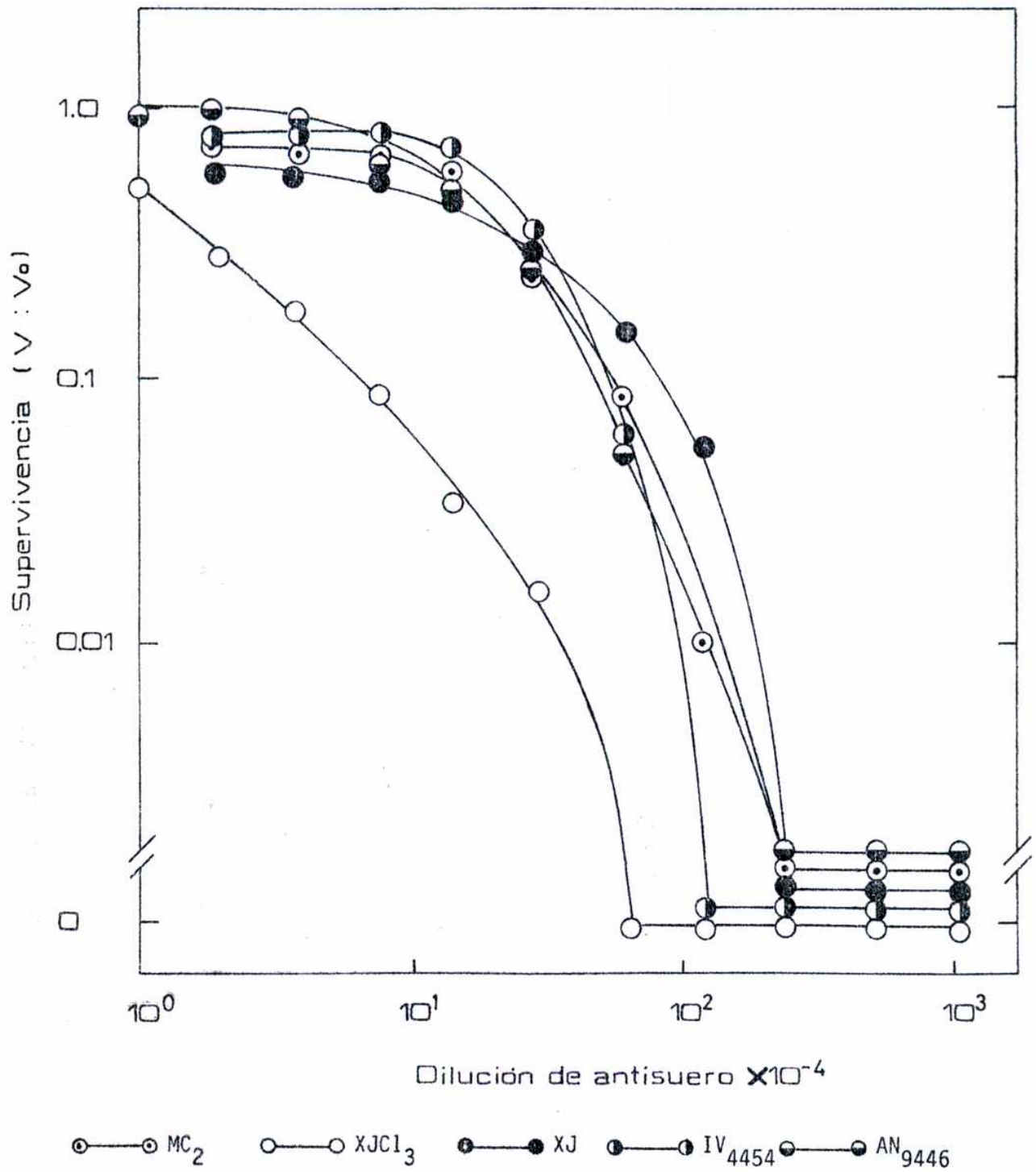
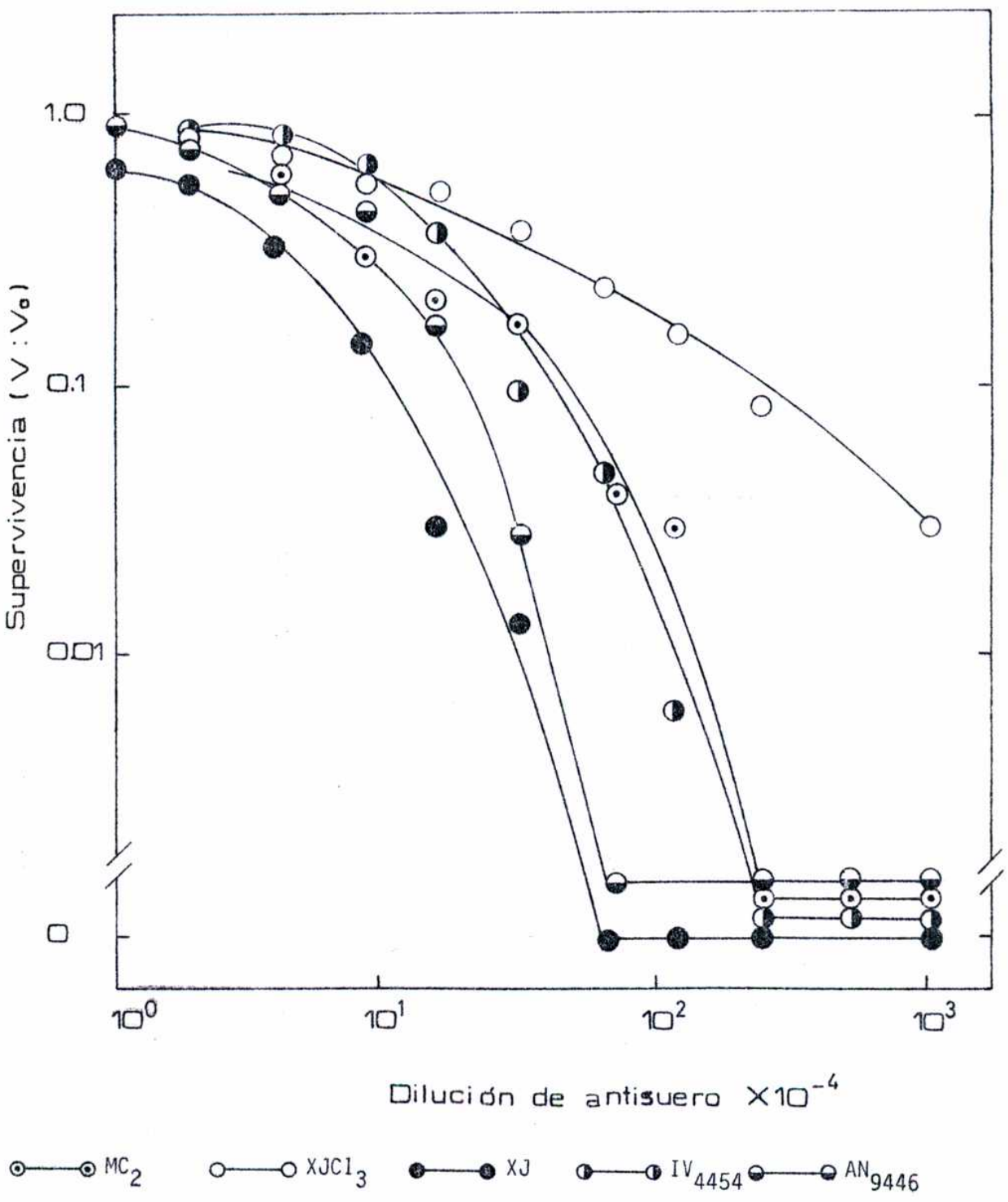


Figura 14. Curvas de neutralización de las cepas de virus Junín con suero antiXJ.



El suero antiIV_{4454} (Figura 15) permite diferenciar marcadamente a su cepa homóloga y a la cepa $XJCl_3$. Las otras cepas heterólogas, en este caso, presentan curvas que se entrecruzan a distintas diluciones, impidiendo relacionar a la cepa IV_{4454} con las cepas XJ, MC_2 y AN_{9446}.

El suero antiMC_2 es de menor potencia antigénica, sin embargo la Figura 16 sugeriría una mayor afinidad de la cepa homóloga con la cepa XJ y una relación más distante con la cepa IV_{4454}.

Debido a la dificultad en la interpretación de las relaciones antigénicas entre las cepas mediante el análisis de las curvas de las Figuras 13-16, se calcularon los títulos neutralizantes de los sueros como se describe en Materiales y Métodos. Estos índices son presentados en el Cuadro 11. Se puede observar una amplia variación entre los títulos de los sueros con las cepas homólogas y con las heterólogas, lo que sugiere que estos sueros policlonales permiten diferenciar antigénicamente a las cepas de VJ.

Los títulos homólogos de los sueros son distintos entre sí. La mayor respuesta antigénica la presentaron los animales inoculados con la cepa IV_{4454} con un título de 11.171 y la menor los que recibieron la cepa MC_2 con un título de 764, aunque todos los inóculos fueron preparados en forma semejante.

Para poder independizarnos de las diferencias de los títulos homólogos entre sí y poder analizar las relaciones cruzadas entre las cepas se calculó, para cada sistema, el cociente entre los títulos homólogos y heterólogos. Los índices obtenidos son mostrados en el Cuadro 12. Con estas relaciones se pueden apreciar mejor las variaciones

Figura 15. Curvas de neutralización de las cepas de virus Junín con suero anti IV_{4454}.

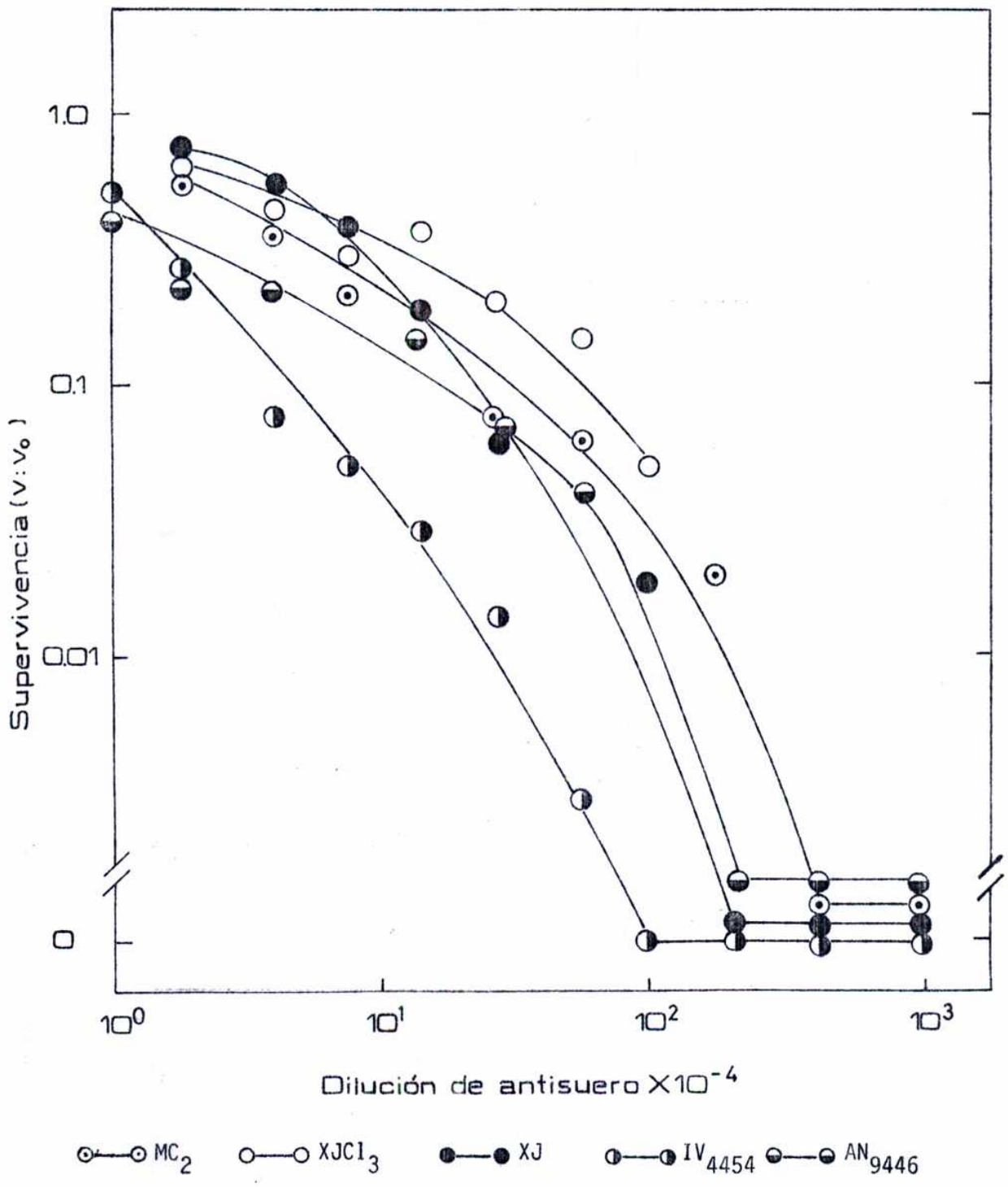
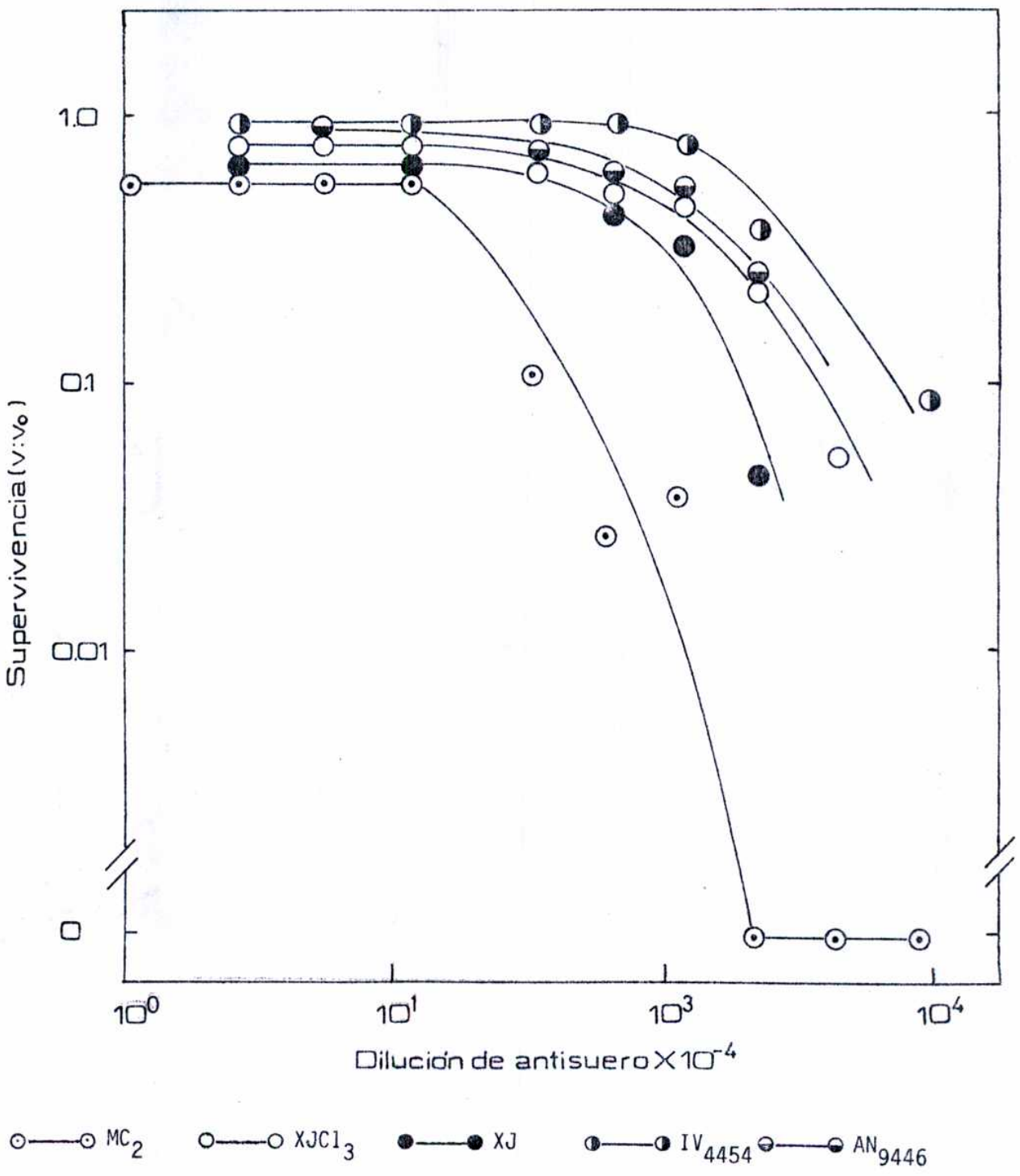


Figura 16. Curvas de neutralización de las cepas de virus Junín con suero antiMC_2



Quadro 11: Neutralización de cepas de VJ con sueros homólogos y heterólogos.

CEPAS DE VIRUS	ANTISUEROS			
	XJ	MC_2	IV_{4454}	$XJCl_3$
XJ	4053*	199	2021	584
MC_2	1933	764	4053	901
IV_{4454}	898	72	11171	407
$XJCl_3$	520	160	3550	9058
AN_{9446}	2080	70	8681	558

* Título del suero: inversa de la dilución de suero que reduce el 50% de las placas del control.

Cuadro 12: Relaciones de los títulos neutralizantes de las cepas de VJ con sueros homólogos y heterólogos.

CEPAS DE VIRUS	ANTISUEROS			
	XJ	MC_2	IV_{4454}	$XJCl_3$
XJ	1,0*	3,8	5,5	15,5
MC_2	2,1	1,0	2,8	10,1
IV_{4454}	4,5	10,6	1,0	22,3
$XJCl_3$	7,8	4,8	3,1	1,0
AN_{9446}	1,9	10,9	1,3	16,2

* Título del suero con virus homólogo / título del suero con virus heterólogo.

antigénicas entre las cepas, pues los valores de estos índices se encuentran en un amplio rango entre 1,3 y 22,3.

El suero anti$XJCl_3$ fué el mas discriminativo, con índices mayores a 10 para todas las cepas heterólogas. Este suero permite relacionar a la cepa homóloga y a la MC_2 como más cercanas antigenicamente, con un índice de 10,1. Las otras cepas se hallan menos relacionadas, con índices distintos y mayores: XJ muestra un índice de 15,5, AN_{9446} de 16,2 e IV_{4454} de 22,3.

El suero antiIV_{4454} mostró una relación cercana entre su cepa homóloga y la cepa AN_{9446}, con un índice de 1,3 , aunque para este suero las diferencias de las cepas heterólogas son menores a las que se observan con el suero anti$XJCl_3$. El rango de variación es de 1,3 para AN_{9446} a 5,5 para XJ, siendo esta última la más lejana antigenicamente a la cepa homóloga de este suero.

El suero antiXJ permite relacionar a la cepa homóloga con MC_2 y AN_{9446} en mayor grado, con índices de 2,1 y 1,9 respectivamente.Las cepas $XJCl_3$ e IV_{4454} estarían menos relacionadas con índices de 7,8 y 4,5.

El suero antiMC_2 presenta una relación antigénica distinta para XJ y $XJCl_3$ con índices de 3,8 y 4,8 y más distantes para las cepas IV_{4454} y AN_{9446} aunque no los diferencia entre sí (10,6 y 10,9).

Los títulos mostrados en el Cuadro 11 fueron utilizados para calcular los coeficientes de distancia d^2. Con ellos se construyó la matriz del Cuadro 13. Los valores de esta matriz permiten analizar mejor los resultados obtenidos en los Cuadros 11 y 12 pues muestran las interacciones de un par de cepas con sus dos sueros simultaneamente. Para cada par de cepas los índices más pequeños indican una

Cuadro 13: Valores de d^2 obtenidos con las cepas de VJ con sueros homólogos y heterólogos.

	XJ	MC_2	IV_{4454}	$XJCl_3$	AN_{9446}
XJ	0*	0,19	0,40	0,76	0,23
MC_2		0	0,49	0,61	0,40
IV_{4454}			0	0,75	0,06
$XJCl_3$				0	0,70
AN_{9446}					0

* El cálculo de los coeficientes d^2 se detalla en Materiales y Métodos.

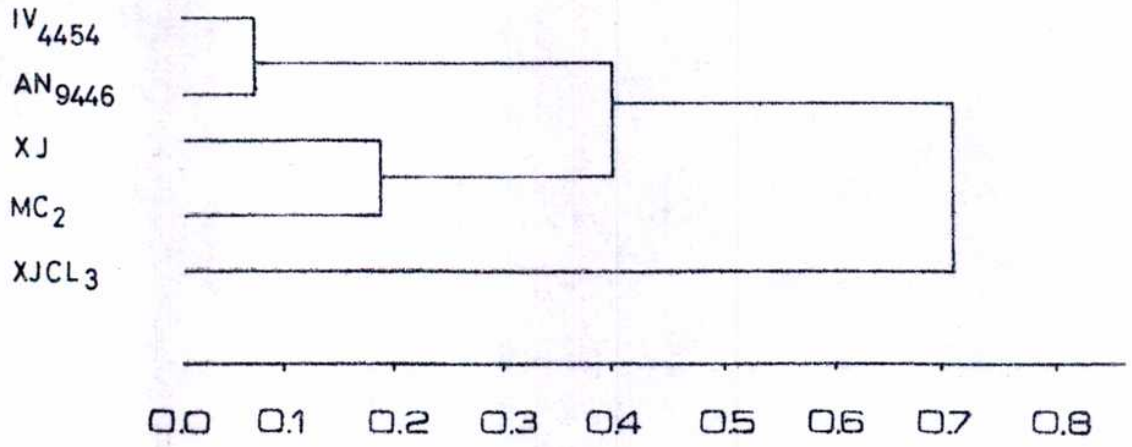
mayor cercanía antigénica. Este es el caso para las cepas AN_{9446} e IV_{4454} con un $d^2 = 0,06$ y MC_2 y XJ cuyo d^2 es de 0,19. Los índices más grandes corresponden a los pares $XJCl_3$-XJ: 0,76; $XJCl_3$-IV_{4454}:0,75; $XJCl_3$-AN_{9446}: 0,70 y $XJCl_3$-MC_2: 0,61. Estos índices muestran a la cepa $XJCl_3$ como la más alejada antigenicamente de las otras cuatro cepas estudiadas.

Con los datos de la matriz, utilizando el procedimiento explicado en Materiales y Métodos, se obtuvo el dendrograma de la Figura 17. Se puede observar en él dos grupos formados por cepas muy relacionadas entre sí. El primero corresponde a las cepas IV_{4454} y AN_{9446} aisladas en la Provincia de Córdoba, una de un caso de FHA y la otra de un cricétido, ambas de distinta patogenicidad en cobayo. El otro grupo esta formado por las cepas XJ y MC_2 que también son de distinta virulencia para cobayo y especie pero de lugar cercano de aislamiento. La cepa $XJCl_3$ se distingue por su lejanía antigénica de las otras cuatro cepas de campo, conclusión deducida anteriormente de la Figura 13 y del Cuadro 12.

Las relaciones antigénicas entre las cinco cepas de VJ estudiadas con sueros hiperinmunes muestran:

- Independencia de la historia de pasajes de cada cepa. Esto se observa con las cepas XJ y $XJCl_3$, ambas con mayor número de pasajes que las otras tres cepas, pero distantes en el dendrograma.
- Mayor cercanía antigénica entre las cepas de campo que con la $XJCl_3$ clonada in vitro. A pesar de que $XJCl_3$ deriva de XJ.

Figura 17. Dendrograma obtenido con los coeficientes d^2.



- Los grupos formados por cepas más relacionadas entre sí son independientes de la virulencia en cobayo y del origen de su aislamiento (humano o cricétido).
- La única relación entre las cepas que forman los grupos es el lugar geográfico de aislamiento. Un grupo está compuesto por cepas aisladas en la Provincia de Córdoba: IV_{4454} y AN_{9446} y el otro por cepas aisladas en la Provincia de Buenos Aires: XJ y MC_2.

D I S C U S I O N

Las cepas de virus Junín aisladas hasta el presente de casos de Fiebre Hemorrágica Argentina y de cricétidos de la zona endémica muestran un amplio espectro de virulencia tanto para cobayos como para monos. Estas diferencias en patogenicidad, caracterizadas en diferentes animales de laboratorio usados como modelos de Fiebre Hemorrágica Argentina experimental, sugirieron la posible existencia de variaciones en otras propiedades biológicas aún no estudiadas.

El objeto de esta investigación fue analizar, en forma comparativa cepas patógenas y atenuadas de virus Junín con el fin de establecer las posibles propiedades diferenciales entre las mismas.

Los experimentos realizados permitieron establecer diferencias y similitudes entre cinco cepas de virus Junín de distinta virulencia. Se caracterizaron algunos parámetros de la infección de células Vero con estas cepas y se demostró la heterogeneidad antigénica entre ellas por reacciones de neutralización cruzada con sueros hiperinmunes.

En general los virus ARN presentan una frecuencia de mutación mucho mayor que los genomas ADN. Esto lleva a que los stocks de virus ARN tales como polio, influenza y VSV, sean una población heterogénea de particuals virales donde se logra un equilibrio dinámico con predominio de un tipo de partículas llamadas salvajes (Holland y col.,1982). En determinadas condiciones dicho equilibrio se altera debido a cambios producidos en la interacción virus-huésped que favorecen el enriquecimiento de ciertas partículas presentes en el stock.

Una forma de determinar la presencia de partículas diferentes en un stock viral es analizar las subpoblaciones obtenidas por clonado del mismo. Asimismo, Huang y col. (1986) observaron que el clonado

sucesivo de los stocks y la amplificación posterior a baja multiplicidad de infección de las subpoblaciones obtenidas minimizaban la presencia de las partículas interferentes (PI), las que podrían modificar las características de multiplicación viral.

Dos stocks de la cepa $XJCl_3$ del virus Junín fueron analizados por esta metodología, en ellos se estudiaron varias propiedades biológicas pero solo la virulencia para ratones de 11 días de edad fue el parámetro común a ambas investigaciones.

Contigiani y col. (1981) por clonado en células Vero y posterior amplificación en cerebro de ratón lactante obtuvieron 15 subpoblaciones virales que presentaron una virulencia diferencial para ratones de 11 y 14 días y cobayos de 11 días de edad. El ratón de 11 días fue el que permitió observar las mayores diferencias en los índices de virulencia (log UFP/DL_{50}) con un rango de 0,73 a 5,99.

Por el contrario, Candurra y Coto (1987) observaron un comportamiento homogéneo al analizar las subpoblaciones obtenidas por clonado de la misma cepa. En este caso los parámetros estudiados fueron: termosensibilidad, termolabilidad y virulencia para ratones de 2 y 11 días de edad. Los 12 clones estudiados no presentaron diferencias significativas en la mortalidad de ratones de 11 días (índice de virulencia entre 1,7 y 2,3). Es de hacer notar que a diferencia de lo realizado por Contigiani, este stock fue tanto clonado como amplificado en células Vero. Esta aparente discrepancia podría deberse al pequeño número de subpoblaciones analizadas en ambos casos.

Este trabajo de investigación fue realizado con cinco cepas de VJ. Tres de ellas: XJ aislada de un enfermo de Fiebre Hemorrágica Argentina, MC_2 obtenida de un cricétido de la zona endémica y $XJCl_3$ de-

rivada por clonado de la cepa XJ, estaban caracteizadas en su patogenicidad para varios animales, pero la información de su acción in vitro se limitaba a las cepas XJ y $XJCl_3$ (Weissenbacher y Damonte, 1983; Weissenbacher y col., 1987). Se analizaron también las cepas IV_{4454} y AN_{9446} aisladas de un caso humano y de un cricétido respectivamente, las que no habían tenido caracterización previa. Todas ellas fueron clonadas por tres pasajes sucesivos en células Vero y amplificadas posteriormente en células BHK-21 a baja multiplicidad de infección.

El cobayo es el animal de laboratorio que generalmente se utiliza como modelo experimental de la Fiebre Hemorrágica Argentina porque el virus Junín produce en él una enfermedad semejante a la observada en humanos, y ha sido usado como marcador de virulencia para cepas patógenas y atenuadas de este virus (Avila, 1983). Contigiani y Sabattini (1977) demostraron que el ratón de 14 días de edad también puede ser usado para ese fin.

Los estudios de patogenicidad en el cobayo permitieron caracterizar a las cepas en tres grupos: XJ y AN_{9446} fueron altamente virulentas, MC_2 presentó un comportamiento intermedio y $XJCl_3$ e IV_{4454} fueron atenuadas para este huésped. Con las cepas XJ, MC_2 y $XJCl_3$ se pudo confirmar los resultados obtenidos previamente (Avila, 1983), las cepas IV_{4454} y AN_{9446} no habían sido estudiadas en este huésped.

El origen del aislamiento al igual que la historia de pasajes de las cepas (Cuadro 3) resultó independiente de su virulencia en el cobayo. Los tres aislamientos con bajo número de pasajes MC_2, AN_{9446} e IV_{4454} se ubicaron en distintas categorías de patogenicidad. Las cepas de origen humano fueron: una altamente patógena (XJ) y otra atenuada (IV_{4454}) y los aislamientos de cricétidos resultaron: AN_{9446} alta-

mente virulento y MC_2 de acción intermedia.

En cambio, no fue posible obtener una consistente caracterización de virulencia en ratones de 14 días de edad, ya que el rango de variabilidad entre la mortalidad producida por la cepa más atenuada ($XJCl_3$) y la más patógena (XJ) fue de solo 1,5 log lo que impidió categorizar a las cepas de virulencia intermedia.

Estos resultados son distintos a los informados por Contigiani y Sabattini quienes obtuvieron un rango de variación doblemente mayor para las cepas patógenas y atenuadas en este huésped. Es de notar, que ambas investigaciones se relaizaron con distintas cepas de ratones (OF_1 y Rockefeller W1 respectivamente) siendo la susceptibilidad diferencial de las mismas al virus Junín la posible causa de los distintos resultados obtenidos.

Para el virus LCM se encuentra documentado un comportamiento similar. Características biológicas de cepas patógenas y atenuadas de este virus son específicas de una determinada cepa de cobayos o de ratones (Dutko y Oldstone, 1983; Peters y col., 1987).

En nuestro laboratorio se ha informado una respuesta atípica al virus Junín en la infección de ratones entre los 10 y 14 días de edad, pero las diferencias de comportamiento encontradas al infectar ratones OF_1 de esa edad no incluyeron una respuesta diferente para cepas de distinta virulencia en cobayos. Estos animales inoculados con virus Junín y Tacaribe por vía intracerebral a los 10 días de edad, muestran signos de enfermedad menos evidentes y muertes más tempranas (Coto y León, 1978). Asimismo, otra investigación posterior utilizando ratones de 11 días, de la misma cepa, indicaron que la patogenicidad del virus Junín en este animal estaba influenciada por el huésped en el cual se

había replicado el virus (Candurra y Coto, 1987). Los stocks preparados en cerebro de ratón fueron 100 veces mas virulentos que los obtenidos en cultivos de líneas celulares, mientras que si se utilizaban cultivos primarios de embrión de ratón o de cricétidos se encontraba una respuesta intermedia. Estos resultados sugirieron que en los ratones infectados a los 11 días de edad había un reconocimiento de un antígeno tisular homólogo que aumentaría la virulencia del virus Junín en este huésped.

La interacción de los virus con células in vitro varía con distintos parámetros que dependen tanto del virus como del cultivo.

Para poder asegurar que las diferencias encontradas entre las cepas de virus Junín en las infecciones en células Vero, realizadas durante el curso de este trabajo de investigación, son características propias de las cepas, se trabajó siempre con las cepas en forma paralela y con monocapas originadas de un cultivo único, manteniendo iguales las condiciones de cultivo para todas las infecciones.

Se obtuvo una caracteización de las cepas en dos grupos. Uno lo forman XJ e IV_{4454} quienes fueron más citopatogénicas en este sistema: dieron ACP más temprano y de mayor intensidad, placas bajo agar al 5-6º día, con aspecto lítico y de tamaño pequeño que no aumentó en los días siguientes. A su vez, desarrollaron una mayor producción viral en un período más corto de tiempo. Estas características fueron más acentuadas para la cepa IV_{4454}. El otro grupo lo componen las cepas de acción moderada: MC_2 y $XJCl_3$.. Estas cepas mostraron una ACP más débil y placas bajo agar revelables al 7-9º día, de mayor tamaño y de aspecto turbio. La producción viral fué menor para ellas pero duró un período de tiempo mayor. La cepa MC_2 mostró estas caracterís

ticas más destacadas.

Resultó notorio el carácter lítico de las cepas estudiadas: XJ, IV_{4454} y $XJCl_3$ mostraron una ACP más intensa que la documentada anteriormente para el sistema $XJCl_3$ - células Vero. Los orígenes de los stocks del virus Junín utilizados en cada caso podrían ser la causa de estas diferencias. Los resultados previos informados fueron de virus replicado en cerebero de ratón o con un solo pasaje en cultivo (Damonte, 1978) y no de virus clonado.

Asimismo, en las infecciones realizadas con las cepas a distintas multiplicidades de infección se obtuvo una relación directa entre la ACP producida y la multiplicidad utilizada. Aunque multiplicidades mayores de 0,5 UFP/célula no pudieron utilizarse en forma comparativa en experimentos que requerían varios días de observación pues la cepa IV_{4454} destruyó el cultivo completamente al 3-4º día p.i.

Generalmente se observa, en cultivos infectados con arenavirus a altas multiplicidades de infección, una inhibición de la ACP debido a la protección que las partículas interferentes otorgan al cultivo. Dutko y Pfau (1978) demostraron la responsabilidad de la presencia de las PI en la modulación de la ACP en células MDCK y PK-15. Estas líneas son restrictivas para la síntesis y desarrollo de funciones de las PI de los virus LCM y Pichinde. La infección de tres cepas de virus LCM en ellas mostró una ACP diferenciables, la cual pudo ser inhibida al coinfectar esos mismos materiales con un stock de PI de LCM.

En los stocks de las cepas de VJ utilizados en este trabajo no fue posible demostrar la presencia de PI. Los mismos se prepararon en condiciones que minimizan el porcentaje de estas partículas (Huang y col., 1986). Al mismo tiempo, cuando se quiso generar PI por pasajes

sucesivos concentrados, no se obtuvo el patrón caracterizado por Help (1980) para stocks no clonados, en los cuales la infectividad disminuída significativamente a medida que aumentaban los pasajes. El comportamiento de las cepas $XJCl_3$ e IV_{4454} fue distinto al caracterizado por Help pero semejante entre ellas, a pesar de ser ambas cepas de acción citopatogénica distinta.

Podemos concluir de estas observaciones que la presencia de PI en los stocks de las cepas utilizadas sería irrelevante e indiferenciable entre ellas.

El orden de citopatogenicidad de las cepas: IV_{4454} > XJ >> $XJCl_3$ > MC_2 está en relación directa con la inhibición de la síntesis de proteína celulares que ellas inducen (Figura 8).

Las primeras observaciones de la modificación de la síntesis de macromoléculas del huésped por arenavirus fueron documentadas por Friedlander y col. (1984) quienes demostraron que la infección de macrófagos murinos con virus Pichinde causa la inhibición de la síntesis de ADN. Al mismo tiempo, López y Franze Fernández (1985) encontraron que los stocks líticos del virus Tacaribe provocaban la inhibición de la síntesis de proteínas, ARN Y ADN de las células Vero. Estos stocks fueron también preparados en condiciones que minimizan la presencia de las PI. Por el contrario, los stocks enriquecidos en las PI, que resultaron no citopáticos,no mostraron alteraciones en la síntesis macromolecular del huésped. Los autores postulan que la presencia de las PI enmascararía la inhibición producida por las partículas infecciosas.

En este trabajo se confirman las observaciones de López y Fraze Fernández ya que los stocks de las cepas de virus Junín analizados se

comportan en forma semejante a los stocks líticos de estos autores pero, a su vez, se demuestra que la propiedad de inhibir la síntesis de proteínas celulares es una característica diferenciable de las cepas de virus Junín.

No se observó correlación entre las características de las infecciones con las cepas en células Vero y sus respectivas virulencias para el cobayo. Las cepas atenuadas para este marcador IV_{4454} y $XJCl_3$ mostraron un comportamiento diferencial in vitro: la primera fue la más citopatogénica y $XJCl_3$ tuvo acción moderada. La cepa MC_2, de patogenicidad intermedia para cobayo, fue la que produjo un efecto menor en cultivo. XJ, la única cepa patógena en animales que se analizó en células Vero, fue altamente citopatogénica pero siempre en menor grado que la cepa atenuada IV_{4454} . Asimismo, no se halló correlación entre la virulencia de las cepas para el cobayo y la morfología de las placas producidas bajo agar (pequeñas y líticas para XJ y IV_{4454} y turbias de mayor tamaño para MC_2 y $XJCl_3$) ni tampoco con la inhibición de las proteínas celulares y el rendimiento viral (IV_{4454}> XJ> $XJCl_3$»» MC_2).

En otras especies virales se encontraron también cepas capaces de producir ACP de variable intensidad y distinta morfología de placas y rendimiento viral. En algunos casos esas diferencias se pudieron relacionar con patrones de atenuación o virulencia in vivo y en otros casos no.

Así por ejemplo, las placas producidas por el virus de la Encefalitis Venezolana son consideradas marcadores de virulencia para esta especie: el fenotipo de placas pequeñas corresponde a las cepas patógenas para equinos (Stanick y col., 1985).

En cambio, para Herpes Simplex I Yamada y col. (1986) encontraron que las variantes sinciciales de la cepa Miyama que originan placas de mayor tamaño son más patógenas para ratón; aunque esta característica no se cumple para todas las cepas de este virus.

Otro estudio, con nueve cepas de Influenza C realizado por Goto y col. (1984) mostró diferencias en el rendimiento viral y en el tamaño de las placas producidas en células LLC-MK2, pero estos parámetros no se correlacionaron entre sí.

Otro ejemplo se encuentra en un estudio realizado con el virus Rift Valley (Rossi y Turell, 1988). En este caso dos variantes de la cepa patógena seleccionadas por su tamaño pequeño y homogéneo de placas resultaron ser: una tan patógena como la cepa que la originó (de fenotipo de placas variables con predominio de placas grandes) y la otra más atenuada que la cepa propuesta como vacuna (de fenotipo de placas pequeñas).

El análisis de las proteínas virales presentes en células infectadas mostraron un patrón semejante para las cuatro cepas analizadas. Al mismo tiempo, pudo comprobarse la reactividad cruzada de los sueros utilizados ya que se observaron bandas de igual intensidad al precipitar a la cepa homóloga y a la heteróloga.

Como se describió en la Introducción, las diferencias entre las cepas de una especie no siempre se traducen en distintos patrones electroforéticos de sus proteínas. Este también fue el caso para las cepas del virus Junín analizadas, pues no se observaron diferencias de movilidad en las bandas de los polipéptidos NP, G_1, G_2 y GPC.

Asimismo, la cinética de síntesis de proteínas virales sigue un patrón similar para las tres cepas estudiadas. Todos los polipéptidos

virales se incrementan hasta las 48 hs p.i. La única diferencia encontrada entre ellas fue la mayor intensidad en la marcación de los polipéptidos de la cepa IV_{4454}. Esta mayor eficiencia se correlaciona con la mayor producción viral (Figura 7), la que se encuentra favorecida por la inhibición significativa de la síntesis de proteínas que esta cepa induce en las células Vero (Figura 8).

El amplio espectro de virulencia de las cepas de virus Junín sugirió que podrían existir diferencias antigénicas entre las mismas. Fue así, como la heterogeneidad antigénica de las cinco cepas de virus Junín analizadas en este estudio pudo demostrarse por la realización de neutralizaciones cruzadas con sueros hiperinmunes.

Las cepas de virus Junín no habían podido diferenciarse por las técnicas de fijación de complemento o inmunofluorescencia (Adler y Parodi, 1965; Carballal y col., 1980) ni por neutralizaciones con sueros de convalescientes (Maiztegui, 1975). Estos sueros neutralizan en forma semejante a la cepa XJ y a su derivada atenuada $XJCl_3$.

Las diferencias osbervadas en los títulos neutralizantes de los sueros usados en este trabajo, con las cepas homólogas y heterólogas demuestran que estos sueros permiten diferenciarlas antigénicamente. Los índices obtenidos al realizar los cocientes entre los títulos homólogos y heterólogos confirman la heterogeneidad de las cepas, pues estos varían en un amplio rango entre 1,3 y 22,3.

En los arenavirus no está definida la clasificación taxonómica a nivel de serotipo o especie. Por el contrario, en los adenovirus y rotavirus se definieron serotipos por neutralizaciones cruzadas con diferencias mayores de 16 y 20 respectivamente entre las relaciones de los títulos homólogos y heterólogos en ambas direcciones (Mathews,

1982a; Wyatt y col., 1982). Si aplicamos para las cepas de VJ el mismo criterio que el utilizado para los adeno y rotavirus, las cepas analizadas pertenecerían al mismo serotipo.

En la familia Arenaviridae, las cepas del virus Lassa fueron distinguidas por la misma técnica usada en este trabajo (Peters y col., 1987). Por el contrario, Dutko y Oldstone (1983) no pudieron diferenciar las cepas del virus LCM por la técnica de neutralización con sueros policlonales a pesar de utilizar cepas con distintas propiedades biológicas y diferencias genómicas.

El ordenamiento antigénico obtenido con el dendrograma no guarda correlación con la patogenicidad de las cepas para cobayo, con el origen del aislamiento (humano o cricétido), ni tampoco con la caracterización encontrada en la interacción con las células Vero. Los dos grupos distinguidos en el dendrograma relacionan cepas solo por su cercanía geográfica de aislamiento, IV_{4454} y AN_{9446} aisladas en la Provincia de Córdoba y MC_2 y XJ en la Pronvincia de Buenos Aires. Una relación antigénica similar fué documentada por Jahrling y Peters (1987) para las cepas del virus Lassa. Los resultados obtenidos por estos autores, les permitieron diferenciar las cepas del virus Lassa de diferente origen geográfico.

Los estudios bioquímicos y moleculares realizados en la familia Arenaviridae con los virus LCM y Pichinde han permitido no solo conocer la estrategia de replicación de esta familia sino también, con la información que provee la formación de recombinantes entre cepas de distinta patogenicidad, relacionar la información genética con propiedades biológicas.

Así se pudo establecer que el segmento S codifica por la nucleo

proteína y las glicoproteínas de superficie mientras que el segmento L codifica por una proteína de 200K, presumiblemente la polimerasa viral. Esto induciría a correlacionar al segmento S con las variaciones antigénicas del virus ya que las glicoproteínas, por encontrarse en la superficie viral, son las más expuestas a la presión selectiva producida por los anticuerpos y están sometidas a una variabilidad más amplia.

Los estudios realizados tendientes a correlacionar la virulencia con algunos de los segmentos genómicos en los arenavirus han arrojado resultados complejos y contradictorios. Así, Kirk y col. (1980) demostraron que la patogenicidad para cobayo en el virus LCM estaba regulada por el segmento S de ARN. Posteriormente, Riviere y col. (1985 b) encontraron que la misma propiedad se asociaba al fragmento L. Por otro lado, este mismo grupo de investigadores muestran evidencias de que ambos segmentos L y S estaban asociados a la producción de una enfermedad fatal en ratones Balb/C (Riviere y Oldstone, 1986).

Por lo tanto, no rsulta extraña la falta de correlación entre la patogenicidad de las cepas de virus Junín y el ordenamiento antigénico que se obtuvo con los sueros policlonales en este estudio, ya que la expresión de ambas propiedades (virulencia y características antigénicas) no estaría asociada al mismo fragmento genómico.

La ampliación de los estudios moleculares y el análisis antigénico de un número mayor de cepas del virus Junín podrán completar los resultados de esta investigación y poder llegar a establecer las relaciones evolutivas de las mismas.

B I B L I O G R A F I A.

Adler, E. y Parodi, A.S. (1965) Relaciones antigénicas entre siete cepas de virus Junín aisladas en epidemias de diferentes años. Rev. Soc. Arg. Biol. 41: 102-109.

Alché, L.E. y Coto, C.E. (1986) Antigenic variants of Junin virus isolated from infected Calomys musculinus. Arch. Virol. 90: 343-348.

Alché, L.E. y Coto. C.E. (en prensa) Differentiation of Junin virus and antigenic variants isolated in vivo by kinetic neutralization assays J. Gen. Virol.

Alexander, S. y Elder, J.H. (1984) Carbohydrate dramatically influences immune reactivity of antisera to viral glycoprotein antigens. Science 226: 1328-1330.

Al Mondallar, Z., Briand, J.P. y Van Regenmortel, M.H.V. (1982) Monoclonal antibodies as probes of the antigenic structure of Tobacco Mosaic virus. The EMBO Journal 1: 1005-1010.

Anderson, K. y Bond, C.W. (1987) Structural and physiological properties of Mengovirus avirulent, hemagglutination-defective mutants express altered Alpha (1D) proteins and are adsorption-defective. Arch. Virol. 93: 13-29.

Añón, M.C., Grau, O., Martínez Segovia, Z. y Franze Fernández, M.T. (1976) RNA composition of Junin virus. J. of Virol. 18: 833-838.

Armstrong, C.R. y Lillie, R.D. (1934) Experimental lymphocytic choriomeningitis of monkeys and mice produced by a virus encountered in studies of the 1933 St. Louis encephalitis epidemic. Public. Health Rep. (Washington) 49: 1019-1027.

Arribalzaga, R.A. (1955) Una nueva enfermedad epidémica a germen desconocido:hipertermia nefrotóxica,leucopénica y enantémica.Día Médico 27:1204-1210.

Atassi, M.Z. (1984) Antigenic structure of proteins. Eur. J. Biochem. 145: 1-20.

Atassi, M.Z. y Smith, J.A. (1978) A proposal for the nomenclature of antigenic sites in peptides and protein. Immunochemistry 15: 609-610.

Auperin, D.D., Compans, R.W. y Bishop, D.H.L. (1982) Nucleotide sequence conservation at the 3' termini of the virion RNA species of New and Old World Arenaviruses. Virology 121: 200-203.

Auperin, D.D., Galinski, M. y Bishop, D.H.L. (1984a) The sequence of the N protein gene and intergenic region of the S RNA of Pichinde arenavirus. Virology 134: 208-219.

Auperin,D.D., Romanowski, V., Galinski, M. y Bishop, D.H.L.(1984b) Sequencing studies of Pichinde arenavirus S. RNA indicate a novel coding strategy, an ambisense viral S RNA. Journal of Virology 52: 897-904.

Avila, M.M. (1983) Diferencia de comportamiento entre cepas atenuadas y patógenas del VJ en la infección de primates, cobayos, ratas y hamster. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,UBA.

Avila, M.M., Laguens, R.M., Laguens, R.P. y Weissenbacher, M.C. (1981) Selectividad tisular e indicadores de virulencia de tres cepas del VJ. Medicina (Bs. As.) 41: 157-166.

Avila, M.M., Samoilovich, S.R. y Weissenbacher, M.C. (1979) Infección del cobayo con la cepa atenuada del virus Junín $XJCl_3$. Medicina (Bs. As.) 39: 597-603.

Avila, R.T. y Coto, C.E. (1978) Influencia de las condiciones culturales sobre la involución del efecto citopático producido por el VJ en células Vero. Rta. Asoc. Arg. Microbiol. 10: 94-101.

Ball, C.R., Van den Berg, H.W. Y Poynter, R.W. (1973) The measurement of radiactive precursor incorporation into small monolayer cultures. Methods in Cell Biology Vol. 13, Capítulo 18, pag. 348-360. Ed.: D. M. Prescott As. Press NY.

Barrera Oro, J.G. y Eddy, G.A. (1982) Characteristics of candidate life attenuated Junin virus vaccine. Presentado en: 4º International Conference on Comparative Virology. Banft. Alberta, Canada, Octubre 17-22.

Barrera Oro, J.G., Lupton, H.W., Jahrling, P.B., Meegan, J., Kenyon, R.H. Y Peters, C.J. (1988) Cross-protection against Machupo virus with Candid # 1 live-attenuated Junin virus vaccine. Resumen en: Segunda Conferencia Internacional sobre el impacto de las enfermedades virales en el desarrollo de países de Latinoamérica y de la Región del Caribe. Mar del Plata 20-25 de Marzo. pag. 167-169.

Barrera Oro, J.G., Mc Kee, K.T., Kuchne, A.I., Mahlandt, B.C., Cole, F. y Lupton, H.W. (1986) Vacuna de virus Junín atenuada Candid # 1. Inmunogenicidad y eficacia protectora de animals de laboratorio. Resumen en: II? Congreso Argentino de Virología, Córdoba 20-24 de Octubre, pag. 58.

Benjamín, D.C., Berzofsky, J.A., East, I.J., Gurd, F.R.N., Hannum, C. y Leach, S.J. (1984) The antigenic structure of proteins: a reappraisal. An. Rev. Immunol. 2: 67-101.

Berría, M.I. (1977) El virus Junín en cultivos celualres. Ciencia e Investigación 33: 355-358.

Berría, M.I., Gutman Frugone, L.F., Girda, R. y Barrera Oro, J.G. (1967) Estudios inmunológicos con virus Junín 1. Formación de anticuerpos en cobayos inoculados con virus vivo. Medicina (Bs. As.) 27: 93-98.

Beyer, W.E.P. y Masurel, N. (1985) Antigenic heterogeneity among Influenza A (H_3N_2) field isolates during an outbreak in 1982/83, estimated by methods of numerical taxonomy. Journal of Hygiene, Cambridge 94: 97-109.

Bishop, D.H.L. (1985) The genetic basis for describing viruses as species Intervirology 24: 79-93.

Blejer, J.L., Galassi, N.V. y Nejamkis, M.R. (1983) Infección en ratas por vía intraperitonial con VJ. Rev. Arg. de Microb. 15: 223-225.

Blejer, J.L., Galassi, N.V., Nejamkis, M.R., Barrios, H. y Nota, N.R. (1981) Marcadores inmunológicos de atenuación en cobayos infectados con cepas o variantes del VJ. Medicina (Bs. As.) 41: 44-52.

Bonner, W.M. y Lasky, R.A. (1974) A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrilamide gels. Eur. J. Biochem. 46: 83-88.

Boxaca, M.C. (1977) Fiebre Hemorrágica Experimental en el ratón. Aspectos virológicos. Ciencia e Investigación 33: 332-339.

Boxaca, M.C., Guerrero, L.B., Elsner, B., Avagnina, A., Gómez, M.M. y López, S. (1982) Efecto de la inoculación intracerebral del VJ en el cobayo. Medicina (Bs. As.) 42: 284-294.

Boxaca, M.C., Guerrero, L.B., Frigerio, M.J., Rondinone, S.N. y Rabinovich, R.D. (1980) Algunos aspectos de la infección experimental del cobayo con una variante atenuada del VJ. Medicina (Bs. As.) 40: 521-530.

Boxaca, M.C., Guerrero, L.B., Weber, E. L. y Malumbres, E. (1981) Protección inducida en el cobayo por la variante XJ_0 del VJ. Medicina (Bs. As.) 41: 25-34.

Boxaca, M.C., Parodi, A.S., Rugiero, H. y Blay, R. (1961) Fiebre Hemorrágica Experimental en el cobayo (VJ). Rev. Soc. Argnet. Biol. 37: 170-179.

Boxaca, M.C. y Savy, V. (1972) Estudio comparativo de la acción del VJ en distintos cultivos celulares. Medicina (Bs. As.) 32: 260-268.

Brown, F. (1980) Molecular basis of antigenic variation in the picorna virus. Annals New York Academic of Sciences 354: 202-218.

Bruns, M. y Lehmann Grube, F. (1983) LCM virus V. Proposed structurd arrangement of proteins in the virion. J. Gen. Virol. 64: 2157-2167.

Buchmeier, M.J. (1984) Antigenic and structural studies on the glycoproteins of LCM virus. En: Segmented Negative Strand Viruses. Eds. R.W. Compans y D.H.L. Bishop, pag. 193-200 Academic Press, NY.

Buchmeier, M.J., Lewicki, H.A., Tomori, O. y Johnson, K. (1980) Monoclonal antibodies to LCM virus react with pathogenic arenaviruses. Nature 288: 486-487.

Buchmeier, M.J., Lewicki, H.A., Tomori, O. y Oldstone, M.B.A. (1981) Monoclonal antibodies to LCM and Pichinde viruses generation, characterization and cross-reactivity. Virology 113: 73-85.

Buchmeier, M.J. y Oldstone, M.B.A. (1978) Identity of the viral protein responsible for serological cross-reactivity among the Tacaribe Complex arenaviruses. En: Negative Strand Viruses and the host cell. Eds. B.J.W. Mahy y R.D. Barry. Academic Press, NJ. pag. 91-97.

Buckley, S.M. y Casals, J. (1970) Lassa fever, a new virus disease of man from West Africa III. Isolation and characterization of the virus. Am. J. Trop. Med. Hyg. 19: 680-691.

Budzko, D.B. (1965) Electroforesis de las proteínas séricas de cobayo inoculado con VJ. Rev. Soc. Argent. Biol. 41: 91-101.

Calisher, C.H., Tzianabos, T., Lord, R.D. y Coleman, P.H. (1970) Tamiani virus, a new member of the Tacaribe group. Am. J. Trop. Med. Hyg. 19: 520-526.

Campetella, O.E., Galassi, N.V. y San Juan, N.A. (1987) Un nuevo modelo murino para el estudio de la infección por VJ. 10º Reunión Científica Anual de la Soc. Argent. de Virología. Buenos Aires 26-27 de Noviembre.

Candurra, N.A. y Coto, C.E. (1986) Susceptibilidad del ratón de 11 días a la infección con VJ propagado en distintos huéspedes. Rev. Arg. de Microbiología 18: 13-20.

Candurra, N.A. y Damonte, E.B. (1985) Influence of cellular funtions on the evolutions of persistent infections with Junín virus. Arch. Virol. 86: 275-282.

Carballal, G., Cossio,P.M., Laguens, R.P., Ponzinibio, C., Cubiña, J., Cabeza Meckert, P., Rabinovich, A. y Arana, R.A. (1981a) Junin virus infection of guinea pigs: Immunohistochemical and ultrastructural studies of the hemopoietic tissue. J. Infect. Dis. 143: 1-14.

Carballal, G., Cossio, P.M., Oubiña, J.R., de la Vega, M.I., Nagle, C.,Casanova, M.B., González, P.H. y Arana, R.M. (1983) Infección experimental de un primate subamericano el Cebus sp. con la cepa XJ de VJ. Medicina (Bs. As.) 43: 639-646.

Carballal, G., Cossio, P.M., Rabinovich, A., Oubiña, J. y Arana, R.M. (1980) Description of a BHK-21 cell line persistently infected with JV: its use in diagnostic procedures. Intervirology 14: 173-179.

Carballal, G., Oubiña, J.R., Rondinone, S.N., Elsner, B. y Frigerio, M.J. (1981b) Cell-mediated immunity and lymphocyte populations in experimental Argentine Hemorrhagic Fever (JV). Inf. and Imm. 34: 323-327.

Casals, J., Buckley, S.M. y Cedeno, R. (1975) Antigenic properties of the arenaviruses. Bull. WHO 52: 421-427.

Ceriatti, F.S. (1985) Obtención y caracterización de mutantes termosensibles del virus Junín. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Fisicoquímicas y Naturales. Universidad Nacional de Río Cuarto.

Ceriatti, F.S., Damonte, E.B. y Coto, C.E. (1983) Inducción de mutantes termosensibles del VJ por efecto del 5-fluorouracilo. Rev. Asoc. Argent. Microbiol. 15: 105-112.

Contigiani, M.S. y Sabattini, M.S. (1977) Virulencia diferencial de cepas de VJ por marcadores biológicos en ratones y cobayos.Medicina (Bs. As.) 37 (Supl. 3): 244-251.

Contigiani, M.S. y Sabattini, M.S. (1983) Letalidad producida por una cepa atenuada de VJ en ratones lactantes. Medicina (Bs. As.) 43:737.

Contigiani, M.S., Sabattini, M.S. y Daffner, J. (1981) Virulencia para ratones y cobayos de clones derivados de la cepa atenuada de virus Junín, $XJCl_3$. 8º Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Virología, La Plata, 25 de Septiembre.

Coto, C.E., Damonte, E.B., Calello, M.A. y Weissenbacher, M.C. (1980) Protection of guinea pig inoculated with Tacaribe virus against lethal doses of JV. J. Infect. Dis. 141: 389-393.

Coto, C.E., Help, G.I. Y Vombergar, M.D. (1970) Estudio comparativo de las cepas prototipo y vacunante de VJ. Medicina (Bs.As.) 30 (Supl. 1): 45-49.

Coto, C.E. y León, M.E. (1978) Susceptibilidad exacerbada del ratón de 10 días a la infección con arenavirus. Medicina (Bs. As.) 38:281-280.

Coto, C.E., Rey, E. y Parodi, A.S. (1967) Tacaribe virus infection of guinea pig. Virus distribution, appearance of antibodies and immunity against JV infection. Arch. Ges. Virusforsch 20: 81-86.

Coto, C.E. y Vomberger, M.D. (1969) The effect of 5-iodo deoxyuridine and actinomycin D on the multiplication of JV. Arch. Ges. Virusforsch 27: 307-316.

Coto, C.E., Weissenbacher, M.C. y Calello, M.A. (1976) Protección del cobayo contra la FHA por inoculación de virus del Complejo Tacaribe. Medicina (Bs. As.) 36: 9-16.

Cresta, R., Padula, P. y Martínez Segovia, Z. (1980) Biological properties of JV proteins. I Identification of the immunogenic glycoprotein. Intervirology 13: 284-288.

D'Aiutolo, A.C. y Coto, C.E. (1986) Vero cells persistently infected with Tacaribe virus: role of interfering particles in the establishment of the infection. Virus Research 6: 235-244.

Damonte, E.B. (1978) Arenavirus: persistencia de los virus Junín y Tacaribe en células cultivadas in-vitro. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. U.B.A.

Damonte, E.B. Y Coto, C.E. (1974) Análisis de los factores que condicionan la formación de placas en células Vero infectadas con los virus Junín y Tacaribe. Revta. Asoc. Arg. Microbiol. 6: 15-22.

Damonte, E.B., Coto, C.E., Calello, M.A. y Weissenbacher, M.C. (1978) Inmunización heteróloga contra VJ. Protección temprana. Medicina (Bs. As.) 38: 226-232.

Damonte, E.B., Mersich, S.E., Candurra, N.A. y Coto, C.E. (1986) Cross reactivity between Junin and Tacaribe viruses as determined by neutralization test and immunoprecipitation. Medical Microbiology and Immunology 175: 85-88.

Damonte, E.B., Mersich, S.E. y Coto, C.E. (1983) Response of cells persistently infected with Arenaviruses to superinfection with homotypic and heterotypic viruses. Virology 129: 474-478.

De Mitri, M.I. y Martínez Segovia, Z. (1982) Proteinas del VJ asociadas a la célula infectada. Resumen en: IIIº Congreso Argentino de Microbiología G-170.

De Mitri, M.I. y Martínez Segovia, Z. (1985) Polypeptide synthesis in Junin virus infected BHK-21 cells. Acta Virol. 29: 97-103.

De Mitri, M.I. y Martínez Segovia, Z. (1988). Epitopes characterization of main Junin virus antigens. Segunda Conferencia Internacional sobre el impacto de las enfermedades virales en el desarrollo de países de Latinoamérica y de la Región del Caribe. pag. 139.

Deshpande, K.L., Naeve, C.W. y Webster, R.G. (1985) The neuraminidases of the virulent and avirulent A/chicken/Pennsylvania/83 (H_5N_2) Influenza A viruses: sequence and antigenic analyses. Virology 147: 49-60.

Dietzchold, B., Cox, J.H. y Schneider, L.G. (1979) Rabies virus strains. A comparison study by polypeptide analysis of vaccine strains with different pathogenic patterns. Virology 98: 63- 75.

Downs, W.G., Anderson, C.R., Spence, L., Aitken, T.H.G. y Greenhall, A.H. (1963). Tacaribe virus, a new agent isolated from Artibeus bats and mosquitoes in Trinidad, West Indies. Am. J. Trop. Med. Hyg. 12: 640-646.

Dutko, F.J. y Oldstone, M.B.A. (1983) Genomic and biological variation among commonly used LCM virus strains. J. Gen. Virol. 64: 1689-1698.

Dutko, F.J. y Pfau, C.J. (1978) Arenavirus defective interfering particles mask the cell- killing potential of standard virus. J. Gen. Virol. 38: 195-208.

East, I.J., Todd, P.E. y Leach, S.J. (1980) On topographic antigenic determinants in myoglobins. Molec. Immunol. 17: 519-525.

Fores, J., Midthun, K., Hoshino, Y., Green, K., Gorziglia, M., Kapikian, A. y Chanock, R.M. (1987) Conservation of the fourth gene among rotaviruses recovered from asymptomatic newborn infants and its posible role in attenuation. J. of Virol. 60: 972-979.

Frame, J.D., Badwin, J.M., Gocke, D.J. y Troup, J.M. (1970) Lassa fever, a new virus disease of man from West Africa 1. Clinical description and pathological findings. Am. J. Trop. Med. Hyg. 19: 670-676.

Franze Fernández, M.T., Zetina, C., Iapalucci, S., Lucera, M.A., Bovissou, C., López, R., Rey, O., Daelli, M., Cohen, G.N. y Zakin, M.M. (1987) Molecular structure and early events in the replication of Tacaribe arenavirus S RNA. Virus Research 7: 309-324.

Friedlander, A.M., Jahrling, P.B., Merril, P. y Tobery, S. (1984) Inhibition of mouse peritoneal macrophage DNA synthesis by intection with the arenavirus Pichinde. Inf. and Imm. 43: 283-288.

Garbarg Chemon, A., Bricont, F. y Nicolas, J.C. (1986) Serological characterization of human reassortant rotaviruses, J. of Virol. 59: 510-513.

Ghiringhelli, P., Rivera Pomar, R.V., Manzella, E.M., Baró, N.I.,Grau, O. y Romanowski, V. (1987) Clonado molecular del gen de la nucleocápside del virus Junín. 10º Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Virología Bs. Aires 26-27 de Noviembre.

Ghiringhelli, P.D., Rivera Pomar, R.V., Manzella, E.M., Baró, N.I., Rosas, M.F., Grau, O. y Romanowski, V. (1988). Molecular cloning and sequencing of Junin virus S RNA. Segunda Conferencia Internacional sobre el impacto de las enfermedades virales en el desarrollo de países Latinoamericanos y de la Región del Caribe. Mar del Plata, 20-25 de Marzo.

González, J.P., Mc Cormick, J.B., Saluzzo, J.F., Herve, J.P., Georges, A.J. y Johnson, K.M. (1983) An Arenavirus isolated from wild-caught rodents (Praomys Species) in the Central African Republic. Interviro logy 19: 105-112.

Goto, H., Tanoka, T. y Tobita, K. (1984) Comparison of nine strains of Influenza C virus growth characteristic and viral polypeptides. (1984) Archives of Virology 82: 111-117.

Gould, J. y Butler, M. (1980) Differentiation of rubella virus strains by neutralization kinetics. J. Gen. Virol. 49: 423-426.

Grau, O., Franze Fernández, M.T., Romanowski, V., Rustici, S.M. y Rosas, M.F. (1981) Junin virus structure. En: The replication of negative strand viruses. Eds. D.H.L. Bishop y R.W. Compans. Elsevier North Holland NJ . pag. 11-14.

Gschwender, H.H. and Lehmann Grube, F. (1973) Antigenic properties of LCM virus: virion and Complement-fixing antigen. En: Lymphocytic Choriomeningitis Virus and other Arenaviruses. Ed: F. Lehmann Grube. Springer Verlag. Berlin. pag. 25-35.

Guerrero, L.B. y Boxaca, M.C. (1980) Estudio preliminar de una variante atenuada del VJ derivada de la cepa prototipo XJ. Medicina (Bs. As.) 40: 267-274.

Guerrero, L.B., Boxaca, M.C., Weissenbacher, M.C. y Frigerio, M.J. (1977) Infección experimental del cobayo con VJ. II Cuadro clínico, diseminación y eliminación de virus. Medicina (Bs. As.) 37: 271-278.

Guerrero, L.B., Weber, E.L. y Boxaca, M.C. (1982) Multiplicación y clonado de VJ en células diploides humanas. Resumen en: IIIº Congreso Argentino de Microbiología. G-174.

Guerrero, L.B., Weissenbacher , M.C. y Parodi, A.S. (1969) Inmunización contra la FHA con una cepa atenuada del virus Junín. 1. Estudio de una cepa modificada del virus Junín. Inmunización de cobayos. Medicina (Bs. As.) 29: 1-5.

Harnish, D.G., Dimock, K., Bishop, D.H.L. y Rawls, W.E. (1983) Gene mapping in Pichinde Virus: assignment of viral polypeptides to genomic L and S RNAs. J. of Virol. 46: 638-641.

Harnish, D.G., Leung, W.C. y RAwls, W.E. (1981) Characterization of polypeptides immunoprecipitable from Pichinde virus-infected BHK-21 cells. J. of Virol. 38: 840-848.

Help, G.I. (1980) Biogénesis de partículas interferentes y su posible rol en las infecciones por virus Junín. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA.

Help, G.I., León, M.E. y Coto, C.E. (1976) Interferencia asociada a cultivos celulares cronicamente infectados con VJ. Rta. Asoc. Arg. Microbiol. 8: 45-53.

Holland, J., Spindlei, K., Harodysky, F., Graban, E., Nichol, S. y Vande Pol.,S. (1982) Rapid evolution of RNA genomes. Science 215: 1577-1585.

Howard, C.R., Lewicki, H., Allison, I., Salter, M. y Buchmeier, M.J. (1985) Properties and characterization of monoclonal antibodies to Tacaribe virus J. Gen. Virol. 66: 1383-1395.

Huang, A.S., Wu, T., Yilma, T. y Lanman, G. (1986) Characterization of virulent isolates of VSV in relation to interference by defective particles. Microbial. Pathogenesis 1: 205-215.

Ito, M. (1984)Microassay for studying anticellular effects of human interferons. J. of Interferon Research 4: 603-608.

Jacobson, S. y Pfau, C.J. (1980) Viral pathogenesis and resistance to defective interfering particles. Nature (London) 283: 311-313.

Jahrling, P.B. (1983) Protection of Lassa immune plasma of guinea pigs, with Lassa immune plasma of guinea pig, primate and human origin. J. of Med. Virol. 12: 93-102.

Jahrling, P.B., Frame, J.D., Smith, S.B. y Morison, M.H. (1985) Endemic Lassa fever in Liberia. III Characterization of Lassa virus isolates. Trans. of the Royal Soc. of Trop. Med. and Hyg. 79: 374-379.

Jahrling, P.B. y Peters, C.J. (1986) Serology and virulence diversity among Old World arenaviruses and the relevance to vaccine development. Medical Microbiology and Immunology 175: 165-167.

Johnson, K.M. (1967) Symposium on some aspects of hemorrhagic fevers in the Americas. Epidemiology of Machupo virus infection. III Significance of virological observations in man and animals. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 14: 816-818.

Johnson, K.M., Kuns, M.L., Mackenzie, R.B., Webb, P.A. y Yunker, C.E. (1966)Isolations of Machupo virus from wild rodent Calomys callosus. Am. J. Trop. Med. Hyg. 15: 103-106.

Johnson, K.M., Webb, P.A. Y Justines, G. (1973) Biology of Tacaribe Complex viruses. En: Lymphocytic Choriomeningitis virus and other Arena viruses. Ed. F. Lehmann Grube. Sringer Verlag. Berlín pag. 241-258.

Johnson, K.M., Wiebenga, N.H., Mackenzie, R.B., Kuns, M.L., Tauraso, N.M., Shelokou, A., Webb, P.A., Justines, G. y Beye, M.K. (1965) Virus isolation from human cases of hemorrhagic fever in Bolivia. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 118: 113-118.

Kaye, K.M., Spriggs, D.R., Bassel Duby, R., Fields, B. y Tyler, K.L. (1986)Genetic basis for altered pathogenesis of an immune selected antigenic variant of Reovirus Type 3 (Dearing). J. of Virol. 59:90-97.

Kenyon, R.H., Barrera Oro, J.G., Mac Donald, C., Meegan, J. y Peters, C.J. (1988) Lymphocyte transformation assays for Junin virus. Resumen

en: Segunda Conferencia Internacional sobre el impacto de las enfermedades virales en el desarrollo de países de Latinoamérica y de la Región del Caribe. Mar del Plata 20-25 de Marzo.

Kenyon, R.H., Green, D.E. y Peters, C.J. (1985) Effect of immunosupression on experimental Argentine Hemorrhagic fever in guinea pigs. J. of Virol. 53: 75-80.

Kenyon, R.H., Mc Kee, K.T., Maiztegui, J.I., Green, D.E. y Peters,C.J. (1986) Heterogeneity of Junin virus strains. Medical Microb. and Immunology 175: 169-172.

Kew, O.M., Pallansch, M.A., Omilianowsky, D.R. Y Rueckert, R.R. (1980) Changes in three of the four coat proteins of oral Polio vaccine strain derived from Type 1 Poliovirus. J. of Virol. 33: 256-263.

Kiley, M.P., Lange, J.V. y Johnson, K.M. (1979) Protection of rhesus monkeys from Lassa virus by immunization with closely related arenavirus. Lancet II: 738.

Kirk, W.E., Cosh, P., Peters, C.J. y Bishop, D.H.L. (1980) Formation and characterization of an intertypic LCM recombinant virus. J. Gen. Virol. 51: 213-218.

Laemmli, U.K. (1970) Clearage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T_4. Nature (London) 227: 680-695.

Laguens, R.P., Cabeza Meckert, P., Avila, M.M., Nejamkis, M.R. y Weissenbacher, M.C. (1983a) Infección crónica con VJ en la rata. Medicina (Bs. As.) 43: 391-397.

Laguens, R.M., Chambó, J.G. y Laguens, R.P. (1983b) In vivo replication of pathogenic and attenuated strains of JV in different cell populations of lymphotic tissue. Inf. and Imm. 41: 1279-1283.

Lampuri, J.S (1984) Infección experimental del Calomys musculinus con VJ: modelo de infección crónica. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, U.B.A.

Lampuri, J.S., Vidal, M.C. y Coto, C.E. (1982) Respuesta del Calomys musculinus a la infección experimental con VJ. Medicina (Bs. As.) 42: 61-66.

Lascano, E.F. (1977) Microscopía electrónica del VJ. Ciencia e investigación 33: 283-289.

Lascano, E.F. y Berría, M.I. (1969) Microscopía electrónica de cultivos primarios de fibroblastos de ratón inoculados con VJ. Medicina (Bs. As.) 29: 487-493.

López, R. y Franze Fernández, M.T. (1985) Effect of Tacaribe virus infection on host cell protein and nucleic acid synthesis. J. Gen. Virol. 66: 1753-1761.

Mac Donald, C., Mc Kee, K., Briggiler, A., Feinsod, F., Morrill, J. Gibbs, P., Peters, C., Maiztegui, J.I. y Barrera Oro, J.G. (1986) Ensayos iniciales en humanos de una vacuna viva atenuada contra FHA (Candid # 1). Resumen en: IIº Congreso Argentino de Virología. Córdoba 20-24 de Octubre.

Mackenzie, R.B., Webb, P.A. y Johnson, K.M. (1965) Detection of complement fixing antibody after Bolivian Hemorrhagic Fever, employing Machupo, Junín and Tacaribe virus antigens. Am. J. Trop. Med. Hyg. 14: 1079-1084.

Maiztegui, J.I. (1975) Clinical and epidemiological patters of Argentine Hemorrhagic Fever. Bull WHO 55: 567-575.

Malumbres, E., Boxaca, M.C., Guerrero, L.B., Berría, M.I. y Lascano, E.F. (1984) Persistence of attenuated Junin virus strains in guinea pigs infected by IM o IC routes. J. of Infect. Dis. 149: 1022.

Margni, R.A. (1982) Antígenos En: Inmunología e Inmunoquímica. Editorial Médica Panamericana. pag. 45.

Marsden, H.S., Crombie, J.K. y Snabak Sharpe, J.H. (1972) Control of proteins synthesis in Herpes virus infected cells, analysis of the polypeptides induced by wild type and sixteen ts-mutants of HSV strain 17. J. Gen. Virol. 31: 347-372.

Martínez Peralta, L.A., Cossio, P.M., Sabattini, M.S., Maiztegui, J.I., Aranza, R.M. y Laguens, R.P. (1979a) Ultrastructural, immunohistochemical and virological studies in organs of Calomys musculinus infected with JV of natural routes. Medicina (Bs. As.) 39: 213-217.

Martínez Peralta, L.A., Laguens, R.P., Cossio, P.M., Sabattini, M.S., Maiztegui, J.I. y Arana, R.M. (1979b) Presence of viral particles in the salivary gland of Calomys musculinus infected with Junín virus by a nature route. Intervirol. 11: 111-116.

Martínez Segovia, Z. y De Mitri, M.I. (1977) Junín virus structural proteins.J. of Virol. 21: 579-583.

Matthews, R.E.F. (1982) Clasification and nomenclature of viruses.Fourth report of the International Committe on Taxonomy of viruses. Intervirology 17: 59-61 (a), 119-121 (b).

Matthews, R.E.F. (1985) Viral taxonomy for the nonvirologist.Ann. Rev. Microbiol. 39: 451-474.

Mc Kee, K.T., Green, D.E., Mahlandt, B.G., Bagley, L.R., Lyerly, W.H., Peters, C.J. y Eddy, G.A. (1985) Infection of cebus monkeys with JV. Medicina (Bs. As.) 45: 144-152.

Mecham, J.O. y Trent, D.W. (1983) A biochimical comparison of the in vitro replication of a virulent and an avirulent strain of Venezuelan Encephalitis virus. J. Gen. Virol. 64: 1111-1119.

Mersich, S.E. (1980) Estrategia del genoma del Virus Junín. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. U.B.A.

Mersich, S.E., Damonte, E.B. y Coto, C.E. (1976) Actividad de ARN polimerasa en virus Junín purificado. Resumen en: Iº Congreso Argentino de Microbiología. pag. 104.

Mettler, N.E., Buckley, S.M. y Casals, J. (1961) Propagation of Junin virus the etiological agent of Argentinian Hemorrhagic Fever, in HeLa cell cultures. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 107: 684-688.

Molinas, F.C., Paz, R.A., Rimoldi, M.T. y Bracco, M.M.E. (1978) Studies of blood coagulation and pathology in experimental infection of guinea pig with Junin virus. J. Infect. Dis. 137: 740-746.

Murphy, F.A., Webb, P.A., Johnson, R.M. y Whitfield, S.G. (1969) Morphological comparison of Machupo with lymphocytic chroiomeningitis virus: basis for a new taxonomic group. J. of Virol. 4: 535-541.

Murphy, F.A., Webb, P.A., Johnson, K.M., Whitfield, S.G. y Champpell, W.A. (1970) Arenavirus in Vero cells: ultrastructural studies. J. of Virol. 6: 507-518.

Murphy, F.A. y Whitfield, S.G. (1975) Morphology and morphogenesis of arenaviruses. Bull. WHO 52: 409-420.

Nejamkis, M.R., Blejer, J.L. y Galassi, N.V. (1982) Infección intraperitoneal de la rata como marcador biológico de antenuación de cepas de VJ. Reunión Científica de la Soc. Arg. de Investigaciones clínicas.

Offit, P.A., Blavat, G., Greenberg, H.B. y Clark, H.F. (1986) Molecular basis of rotavirus virulence: role of gene segment 4. J. of Virol. 57: 46-49.

Parekh, B.S. y Buchmeier, M.J. (1986) Proteins of LCM: antigenic topography of the viral plycoproteins. Virology 153: 168-178.

Parodi, A.S., Greenway, D.J., Rugiero, H.R., Rivero, E., Frigerio, M.J., Mettler,N.E., Garzón, F., Boxaca, M.C., Guerrero, L.B. y Nota, N.R. (1958) Sobre la etiología del brote epidémico de la Provincia de Buenos Aires. Día Médico 30: 2300-2302.

Parodi, A.S., Guerrero, L.B., Astarloa, L.,Cintora, A., Gonzáles Cambaceres, C., Maglio, F., Magnoni, C.,Milani, H., Rugiero, H. y Squassi,G. (1970) Inmunización contra la FHA con una cepa atenuada de VJ. IV. Variación de respuestas clínicas e inmunológicas. Medicina (Bs. As.) 30 (Supl. 1): 3-7.

Parodi, A.S., Nota, N.R., Guerrero, L.B., Frigerio, M.J., Weissenbacher, M.C. y Rey, E. (1967) Inhibition of immune response in experimental hemorrhagic fevers (JV).Acta Virol. 2: 120-125.

Parodi, A.S., Rugiero, H.R., Greenway, D.J., Mettler, N.E., Martínez, A., Boxaca, M.C. y De la Barrera, J.M. (1959) Aislamiento del virus Junín de los ácaros de la zona endémica (Echinolaelaps echidninus, Berlese) Prensa Médica Arg. 46: 2242-2244.

Peters, C.J., Jahrling, P.B., Liu, C.T., Kenyon, R.H., Mc Kee, K.T. y Barrera Oro, J.G. (1987) Experimental studies of arenaviral hemorrhagic fevers. Current Topics in Microb. and Immunology 134: 5-68.

Pinheiro, F.P., Shope, R.E., Andrade, A.H.P., Bersabath, G., Cacios,G.U. y Casals, J. (1966) Amapari, a new virus of the Tacaribe Group from rodents and mites of Amapa Territory, Brasil. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 122: 531-535.

Pinheiro, F.P., Woodall, J.P., Da Rosa, A.P. y Da Rosa, J.F.T. (1977) Studies of Arenaviruses in Brazil. Medicina (Bs. As.) 37 (Supl. 3); 175-181.

Pirosky, I., Zuccarini, J., Molinelli, E.A., Di Pietro, A., Barrera Oro, J.G., Martini, P. y Copello, A.R. (1959 a) Virosis hemorrágica del noroeste bonaerense; endemoepidémica, febril, enantemática y leucopénica. Inst. Nac. Microb., Buenos Aires. Ministerio de Asistencia Social y Salud Pública. pag. 197.

Pirosky, I., Zuccarini, J., Molinelli, A., Di Pietro, A., Martini, P., Ferreyra, B., Gutman Frugone, L.F. y Vázquez, T. (1959b) Virosis hemorrágica del noroeste bonaerense. 1. La primera inoculación experimental al hombre. Orientación Médica 8: 144-148.

Pulkkinen, A.J. y Pfau, C.J. (1970) Plaque size heterogeneity: a genetic trait of LCM virus. Applied Microbiology 20: 123-128.

Rawls, W.E. y Buchmeier, M.J. (1975) Arenaviruses: Purification and physicochemical nature. Bull. WHO 52: 383-402.

Reed, L.J. y Muech, H.A. (1938) A simple method of estiamting 50% end point. Am. J. Hyg. 27: 493-497.

Rivers, T.M. y Scott, T.F.M. (1935) Meningitis in man caused by a filterable virus. Science 81: 439-440.

Riviere, Y., Ahmed, R., Southen, P.J., Buchmeier, M.J., Dutko, F.J. y Oldstone, M.B.A. (1985a) The S RNA segment of LCM virus codes for the nucleoprotein and glucoproteins 1 and 2. J. of Virol. 53: 966-968.

Riviere, Y., Ahmed, R., Southern, P.J., Buchmeier, M.Y. y Oldstone, M. B.A. (1985b) Genetic mapping of LCM virus pathogenicity: virulence in guinea pig is associated with the L RNA segment. J. of Virol. 55: 704-709.

Riviere, Y., Ahmed, R., Southern, P.J. y Oldstone, M.B.A. (1985c) Pertubation of differentiated functions during viral infection in vivo. II Viral reassortants map growth hormone defect to the S RNA of the LCM virus genome. Virology 142: 175-182.

Riviere, Y. y Oldstone, M.B.A. (1986) Genetic reassortants of LCM virus: unexpected disease and mechanism of pathogenesis. J. of Virol. 59: 363-368.

Rossi, C.A. y Turell, M.J. (1988) Characterization of attenuated strains of Rift Valley Fever virus. J. Gen. Virol. 69: 817-823.

Rowe, W.P., Murphy, P.A., Bergold, G.H., Casals, J. Hotchin, J., Johnson, K.M., Lehmann Grube, F., Mims, C.A., Traub, E. y Webb, P.A. (1970a) Arenaviruses. Proposed name for anewly defined virus group. J. of Virol. 5: 651-652.

Rowe, W.P., Pugh, W., Webb, P.A., Peters, C.J. (1970b) Serological relationship of the Tacaribe Complex of virus to LCM virus. J. of Virol. 5: 289-292.

Rugiero, H.R., Greenway, D.J., Parodi, A.S., Lomban, F.R., Frigerio, M.J., Precerutti, A.C. y Boxaca, M.C. (1959) Inoculación voluntaria del virus de la Fiebre hemorrágica epidémica. Estudio clínico y etiológico. Día Médico 31: 218-224.

Rugiero, H.R., Magnoni, C., Guerrero, L.B., Milani, H.A., Pérez Izquierdo, F., Milani, H.L. y Weber, E.L. (1981) Persistence of antibodies and clinica evaluation in volunteers 7 to 9 years following the vacunation against AHF. J. Med. Virol. 7: 227-232.

Sabattini, M.S., González Del Río, L., Díaz, G., Vega, V.R. (1977) Infección natural y experimental de roedores con VJ. Medicina (Bs. As.) 37 (Supl. 3): 149-161.

Sakaoka, H., Kawona, T., Grillner, L., Aomari, T., Yamaguchi, T., Saito, H. y Fujinoga, K. (1987) Genome variations in HSV-2 strains isolated in Japan and Sweden. J. Gen. Virol. 68: 2105-2116.

Samoilovich, S.R., Carballal, G. y Weissenbacher, M.C. (1983) Protection against a pathogenic strain of Junin virus by mucosal infection with an attenuated strain. Am. J. Trop. Med. Hyg. 32: 825-828.

Scolaro, L.A., Mersich, S.E. y Damonte, E.B. (1988) An attenuated mutant of Junin Virus with a restricted multiplication in murine cells. Segunda Conferencia Internacional sobre el impacto de las enfermedades virales en el desarrollo de países de Latinoamérica y de la Región del Caribe.Mar del Plata, 20-25 de Marzo. pag. 136.

Sela, M. (1969) Antigenicity: some olecular aspects. Science 166: 1365-1374.

Sneath, P.H.A. Y Sokal, R.R. (1973) The aims and principles of numerical taxonomy. En: Numerical Taxonomy. The principles and practice of numerical classification. Ed: P.H.A. Sneath y R.R. Sokal. San Francisco: Freeman. pag. 68-75.

Stanick, D.R., Wiebe, M.E. y Scherer, W.F. (1985) Markers of Venezuelan Encephalitis virus which distinguish enzootic strains of subtype I-D from those of I-E. American J. of Epidemiology 122: 234-244.

Taratuto, A., Tkaczevski, L., Nota, N.R., Nejamkis, M.R. Y Giovaniello, O. (1973). Junín virus encephalitis in mice: its inhibition by antithymocyte serum. Arch. Ges. Virusforsch. 43: 173-183.

Teyssie, A.R., Gutman Frugone, L.F., Ayerra, B.H. y Barrera Oro, J.G. (1971) Nivel de anticuerpos contra VJ en un grupo de personal de laboratorio. Medicina (Bs. As.) 31: 113-116.

Teyssie, A.R., Knecher, L.M. y Ayerra, B.H. (1977) Interferón en la infección in vitro con VJ. Medicina (Bs. As.) 37 (Supl. 3): 53-58.

Trapido, H. y San Martín, C. (1971) Pichinde Virus. A new virus of Tacaribe group form Columbia. Am. J. Trop. Med. Hyg. 20: 631-641.

Van Regenmortel, M.H.V. (1987) Antigenic cross-reactivity between proteins and peptides: New insights and applications. Trend in Biochemical. Sciencies 12: 237-240.

Van Regenmortel, M.H.V. y Neurath, A.R. (1985) Structure of viral antigenes. En: Immunochemistry of viruses. The basis for serodignosis and vaccines. Eds. M.H.V. Van Regenmortel y A.R. Neurath. Elsevier Amsterdam. pag. 1-11.

Vezza, A.C., Cosh, P., Jahrling, P.B., Eddy, G. y Bishop, D.H.L. (1980) Arenavirus recombiantion: the formation of recombinats between prototype Pichinde and Pichinde Munchique viruses and evidence that arenavirus S RNA codes for N polypeptide. Virology 106: 250-260.

Webb, P.A., Johnson, K.M., Hibbs, J.B. y Kons, M.L. (1970) Parana, a new Tacaribe Complex virus from Paragua. Arch. Ges. Virusforsch. 32: 379-388.

Webb, P.A., Johnson, K.M., Peters, C.J. y Justines, G. (1973) Behaviour of Machupo and Latino viruses in Calomyus callosus from two geographic areas of Bolivian. En: LCM virus and other Arenaviruses. Ed. F. Lehmann Grube. Springer Verlag. pag. 313-321.

Weber, E.L. y Buchmeier, M.J. (1988) Fine mapping of a peptide sequence containing an antigenic site conserved among Arenaviruses. Segunda Conferencia Internacional sobre el impacto de las enfermedades virales en el desarrollo de países de Latinoamérica y de la Región del Caribe Mar del Plata 20-25 de Marzo. pag. 142.

Weber, E. L., Guerrero, L.B. y Boxaca, M.C. (1985) MRC-5 cells, a model for Junín virus persistent infection. J. Gen. Virol. 66:1179-1183.

Weissenbacher, M.C., Coto, C.E., Calello, M.A., Rondinone, S., Damonte, E.B. y Frigerio, M.J. (1982) Cross-proteccion in nonhuman primates agasinst FHA. Inf. and Imm. 35: 425-430.

Weissenbacher, M.C. y Damonte, E.B. (1983) Fiebre Hemorrágica Argentina. Adelantos en Microbiología y enfermedades infecciosas 2: 119-171.

Weissenbacher, M.C., Edelmuth, E., Frigerio, M.J., Coto, C.E. y Guerrero, L.B. Serological survey to detect subclinical Junín virus infection in laboratory personnel. J. Med. Virol. 6: 223-226.

Weissenbacher, M.C., Grela, M.E., Sabattini, M.S., Maiztegui, J.I., Coto, C.E., Frigerio, M.J., Cossio, P.M., Rabinovich, A.S. y Barrera Oro,J.G. (1978) Inapparent infections with Junín virus among laboratory workers. J. Imfect. Dis. 137: 309-313.

Weissenbacher, M.C., Guerrero, L.B. y Boxaca, M.C. (1975) Experimental biology and pathogenesis of Junin virus infection in animals and man. Bull. WHO 52: 507-515.

Weissenbacher, M.C., Guerrero, L.B. y Frigerio, M.J.(1976) Infección subclínica, infección clínica y vacunación con virus Junín. Medicina (Bs. As.) 36: 1-8.

Weissenbacher, M.C., Laguens, R.P. y Coto, C.E. (1987) Argentine Hemorrhagic Fever. Current Topics in Microbiology and Immunology 134:79-116.

Weissenbacher, M.C., Sabattini, M.S., Avila, M.M., Sangiorgio, P.S., Sensi, M.R.F., Contigiani, M.S., Levis, S. y Maiztegui, J.I. (1983) Junín virus activity in two rural populations of the AHF endemic area. J. Med. Virol. 12: 273-280.

Wulft, H., Mc Intosh, B.M., Hamner, D.B. y Johnson, K.M. (1977) Isolation of an arenavirus closely related to Lassa virus from Mastomys natalensis in south-east Africa. Bull. WHO 55: 441-444.

Wyatt, R.G., Greenberg, H.B., James, W.D., Pittman, A.L., Kalica, A.R., Flores, J., Chamock, R.M. y Kapikian, A.Z. (1982) Definition of human rotavirus serotypes by plaque reduction assay. Inf. and Imm. 37: 110-115.

Yamada, M., Uno, F. y Nii, S. (1986) In vitro cytopathology and pathogenicity to inbred mice shown by five variants of a laboratory strain of Type I Herpes Simplex virus. Arch. Virol. 90: 183-196.

Yomeyama, T., Hagiwara, A., Hara, M. y Shinojo, H. (1982) Alteration in oligonucleotide fingerprint patterns of the viral genome in poliovirus type 2 isolated from paralytic patients. Inf. and Imm. 37:36-53.

Young, P.R. y Howard, C.R. (1983) Fine structure analysis of Pichinde virus nucleocapsids. J. Gen. Virol. 64: 833-842.

APENDICE.

Abreviaturas.

AcM : Anticuerpo monoclonal.

ACP : acción citopatogénica.

ADN : ácido desoxirribonucleico.

ARN : ácido ribonucleico.

cpm : cuentas por minuto.

D : Dalton.

$DICT_{50}$: dosis infectante para cultivo de tejido 50%.

DL_{50} : dosis letal 50%.

FC : fijación de complemento.

FHA : Fiebre Hemorrágica Argentina.

IF : inmunofluorescencia.

i.c. : intracerebral.

i.m. : intramuscular.

i.p. : intraperitoneal.

K : kilo Dalton.

LCM : virus de la Coriomeningitis Linfocítica.

mARN : ácido ribonucleico mensajero.

m.i. : multiplicidad de infección.

p.i. : post-infección.

PI : partícula interferente.

PMSF : fluoruro de fenil metil sulfonilo.

SDS : dodecil sulfato de sodio.

SNC : sistema nervioso central.

TEMED : tetra metil etilendiamina.

ts : termosensible.

UFP : unidades formadoras de placas.

VJ : virus Junín.