Tesis de Posgrado



Análisis serológico de la variación antigénica del virus de la fiebre aftosa del serotipo A12

Piatti, Patricia Gabriela

1994

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.



Piatti, Patricia Gabriela. (1994). Análisis serológico de la variación antigénica del virus de la fiebre aftosa del serotipo A12. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2685_Piatti.pdf

Cita tipo Chicago:

Piatti, Patricia Gabriela. "Análisis serológico de la variación antigénica del virus de la fiebre aftosa del serotipo A12". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1994. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2685_Piatti.pdf



Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ANALISIS SEROLOGICO DE LA VARIACION ANTIGENICA DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA DEL SEROTIPO A12

PATRICIA GABRIELA PIATTI

Director de Tesis: Dr. FRED BROWN

Lugar de trabajo: USDA, ARS, PLUM ISLAND ANIMAL DISEASE CENTER, NEW YORK, U.S.A.

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires.

1994

FCE y N BIBLIOTEGA

A mis queridos padres, quienes me dieron las "alas" necesarias para completar este proyecto, como también las raíces que siempre nos mantendrán unidos.

AGRADECIMIENTOS

Mi estadía en el Centro de Enfermedades Animales en Plum Island con el objeto de concretar este trabajo de tesis, no se limitó a ser una experiencia laboral o profesional, sino que significó una extraordinaria experiencia de vida. Desde estar lejos de mis seres queridos, la adaptación a un nuevo estilo de vida con sus pro y sus contras, hasta la oportunidad de conocer gente nueva, y de conocerme a mi misma, todo se complementa con la gran experiencia que fué trabajar en Plum Island para hacer de esto que alguna vez fué proyecto, una realidad. Es por esto que en esta sección de agradecimientos quiero llegar a toda la gente que estuvo cerca de mí, tanto en su participación a nivel laboral, como fuera del laboratorio. Nada de lo que esta tesis es hoy hubiera sido posible sin ninguno de ellos. El orden en que aparecen es totalmente aleatorio, ya que me es imposible darles algún tipo de prioridad.

Al fallecido Dr. D.O. Morgan, con quien tuve mi primera experiencia de trabajo en Plum Island y quien nos dejó a todos muy solos muy pronto.

Al Dr. Fred Brown, mi director de tesis. Recuerdo nuestra primera charla, cuando le expresé mi necesidad de tener un director de tesis que estuviera más cerca de mi mesada del laboratorio que de los papeles de su oficina. Mi agradecimiento va primero, a su compromiso en que fuera de ese modo, y segundo al cumplimiento de su promesa. Siempre tuvo palabras de aliento y demostró interés sincero por cada simple y pequeño experimento que realizé, y muchas veces su entusiasmo superó el mío. Su visión personal de la ciencia ha sido una gran anseñanza para mí, y creo, para todos los jóvenes científicos que compartimos este tiempo juntos.

Al Dr. John Newman por su apoyo y paciencia. Compartir el laboratorio con John me ha dado el lujo de compartir su experiencia, su gran capacidad intelectual, el amor por lo que hace, y sobre todo, de disfrutar la compañía de su maravillosa persona.

A Analía Berinstein, mi puerto y refugio de mucha tormentas, siempre presente también para compartir la euforia de los buenos momentos. Gracias por todo, Ani.

A Elizabeth Rieder, por su compañía durante estos años, y sus consejos y ayuda en la concreción de la tesis.

A Mary y Andy Ciupryck, por ser, según sus propias palabras, un poco mis padres adoptivos, y de quienes recibí gran apoyo durante los que fueron los duros primeros meses en USA.

Al resto de la gente con quien compartí el laboratorio, tan solo por eso, por dejarme compartir esos momentos. Gracias Traci, Juan, Stuart. Para Lee, también mil gracias por los momentos dedicados a la explicación de sus resultados en el análisis de estructura.

A todo el personal de Plum Island, desde su director, hasta la gente de mantenimiento. La realización de sus propias tareas, hizo posible que yo realizara la mía.

A Paul, por los buenos y no tan buenos momentos que compartimos. Such is life!

Los resultados presentados en esta tesis forman parte de las siguientes publicaciones:

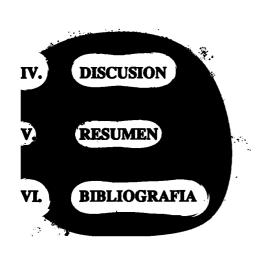
-.Circular dichroism, molecular modeling and serology indicate that the structural basis of antigenic variation in foot-and-mouth disease virus is α-helix formation.. France, L.L., Piatti, P.G., Newman, J.F.E., Toth, I., Gibbons, W.A. and Brown, F. (1994). Aceptado para su publicación en PNAS.

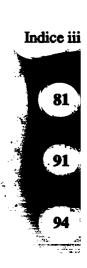
-. Antigenic variants in a plaque-isolate of foot-and-mouth disease virus: implications for vaccine production. P. Piatti, S. Hassard, J.F.E. Newman and F. Brown. (1994). Aceptado para su publicación en Vaccine.

INDICE

		Página
L.	INTRODUCCION	1
I.1	Características generales de los picornavirus	1
I.2	La fiebre aftosa	4
I.2.1	Un poco de historia	4
I.2.2	Síntomas clínicos, transmisión y estado de portador	5
I.2.3	Vacunas	7
I.3	El virus de la fiebre aftosa (VFA)	10
I.3.1	Características morfológicas del VFA	10
I.3.2	Organización del genoma. Productos de la traducción	16
I.3.3	Ciclo de replicación del VFA	20
I.4	Variabilidad genética en virus ARN	22
I.4.1	Heterogeneidad de los genomas ARN	22
I.4.1.1	El concepto de cuasiespecie	24
I.4.1.2	Evidencias de la heterogeneidad de las poblaciones virales a ARN	26
I.5	Variabilidad del VFA	29
I.5.1	Bases moleculares de la variación antigénica	30
I.6	Objetivos	33
П.	MATERIALES Y METODOS	35
П.1	Células	35
П.2	Variantes utilizadas en este estudio	35
П.3	Péptidos	37
П.3.1	Acople de los péptidos a las proteínas carriers SAB y KLH	37
П.4	Animales	38
П.5	Vacunas	39

П.5.1	Vacunas a virus inactivado		
П.5.2	Vacunas a péptidos acoplados a SAB	40	
П.6	ELISA	40	
П.7	Seroneutralización (SN)	42	
П.8	Radioinmunoprecipitación (RIP)	42	
П.8.1	Obtención y purificación de viriones marcados con ³⁵ S-Metionina	43	
П.8.2	Ensayo de inmunoprecipitación	44	
II.9	Absorción de anticuerpos neutralizantes	44	
m.	RESULTADOS	46	
Ш.1	Estandarización de las técnicas de serología	48	
Ш.1.1	ELISA	48	
III.1.2	Ensayo de radioinmunoprecipitación (RIP)	52	
Ш.2	Perfil serológico de las variantes antigénicas del virus A12	53	
III.2.1	Región 132-159 como el principal sitio inmunogénico de VP1	53	
ПІ.2.2	Caracterización antigénica con antisueros anti-péptido 141-160 de VP1	56	
III.2.2.1	Inmunización con péptidos acoplados a SAB con glutaraldehído (GA)	56	
Ш.2.2.2	Inmunización con péptidos acoplados a SAB a través del extremo		
	C-terminal	62	
Ш.3	Caracterización antigénica con antisueros anti-virus inactivado	69	
Ш.4	Estudio de las características antigénicas de la semilla de la variante SL	73	
Ш.4.1	Propagación a diferentes m.o.i. en ausencia de suero	75	
Ш.4.2	Crecimiento bajo la presión selectiva de suero policional anti-péptido	78	





INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Estructura de la cápside del VFA.	11
2	Representación esquemática del motivo "barril-ß" que	
	adoptan VP1, VP2 y VP3	12
3	Protómero al cual le falta la zona del bucle GH, cuya estructura	
	no ha sido totalmente definida.	14
4	Mapa bioquímico de genoma del VFA	19
5	Secuencia correspondiente a la región 141-160 de la proteína	
	viral VP1 de cada una de las seis variantes antigénicas utilizadas	
	en este trabajo.	33
6 a	Determinación de la dilución de conjugado anti-cobayo para	
	el ensayo de ELISA.	50
6b	Determinación de la dilución de conjugado anti-cobayo para	
	el ensayo de ELISA.	51
7	Determinación de la dosis de péptido libre necesaria para	
	sensibilizar las placas de ELISA.	52
8	Reactividad de dos antisueros anti-péptidos con sus péptidos	
	homólogos y con KLH activada con el agente acoplante SMCC.	64

Tabla	Título	Página
1	Propiedades físicoquimicas de los picomavirus.	3
2	Variantes utilizadas en el estudio de variación antigénica. Las	
	variantes se denominan de acuerdo a los aminoácidos en las	
	posiciones 148 y 153 de la proteína de la cápside viral VP1.	36
3	Absorción de anticuerpos dirigidos contra el sitio	
	inmunodominante de VP1 presentes en sueros anti-péptido	
	y anti-virus	55
4	Test de ELISA para antisueros anti-péptido~SAB	57
5	Test de ELISA para antisueros anti-péptido~SAB	59
6	Seroneutralización de las variantes con sueros anti-péptidos~SAB	60
7	Esayo de ELISA con antisuero anti-péptido~SAB unido	
	a través del grupo SMCC.	65
8	Radioinmunoprecipitación de las variantes marcadas con 35S-	
	metionina con antisueros anti-péptido~SAB unido a través del	
	grupo SMCC.	67
9	Seroneutralización de las variantes con antisueros anti-	
	péptido~SAB unido a través del grupo SMCC.	68
10	ELISA indirecto de los antisueros provenientes de animales	
	vacunados con virus inactivado correspondiente a cada una de	
	las seis variantes.	70
11	RIP de la variante ³⁵ S-FenPro con antisueros provenientes de	
	animales vacunados con virus inactivado correspondiente a cada	
	una de las seis variantes.	71
12	Seroneutralización de las seis variantes con antisueros	
	provenientes de animales vacunados con virus inactivado.	72

13	Caracterización serológica y secuenciación de la progenie obtenida		
	de propagar el virus semilla SL bajo diferentes m.o.i.	76	
14	Caracterización serológica y secuenciación de la progenie obtenida		
	al propagar el virus semilla SL en presencia de suero policional		
	anti-péptido.	80	

I. INTRODUCCION

I.1. Características generales de los Picornavirus

Picornaviridae es una familia diversa, de virus pequeños, con genoma de ARN(+) infeccioso de cadena simple, poliédricos y sin envoltura.

Sobre la base de sus propiedades fisicoquímicas como estabilidad en condiciones ácidas (Melnick et al., 1974) y densidad de flotación, se los ha dividido en cinco géneros principales: enterovirus, rinovirus, cardiovirus, aftovirus y hepatovirus (el virus de la hepatitis A ha sido asignado a este nuevo género, Minor, 1991). Cada género es subdividido a su vez en tipos y subtipos mediante la caracterización de sus antígenos de superficie (Cooper et al., 1978; Sangar 1979) (Tabla 1).

Los picornavirus también pueden ser agrupados de acuerdo al receptor celular que reconocen, aunque para algunos serotipos el receptor está aún por ser identificado. La mayoría de los rinovirus, junto con algunos enterovirus (coxsackievirus 13, 18 y 21), se unen a un mismo receptor conocido como molécula de adhesión celular 1 (ICAM-1), proteína que se encuentra en la superficie de muchos tipos de células (Greve et al., 1989, Stauton et al., 1989). ICAM-1 es miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas, proteínas con estructura similar a la de las inmunoglobulinas. El receptor celular de poliovirus, utilizado por todos los serotipos, es un miembro previamente desconocido de la misma superfamilia (Mendelsohn et al., 1989). Miembros del grupo B de los coxsackievirus parecen reconocer otro receptor diferente, probablemente compartido con algunos ecovirus, incluyendo el tipo 6 (Crowell et al., 1987).

Coxsackievirus A9 (CAV-9), aunque poseen alta homología de nucleótidos con el grupo B, no reconoce el mismo receptor. Recientemente, se reportó al receptor de vitronectina (integrina $\alpha_V\beta_3$) como receptor para CAV-9 y VFA (Rovainen et al., 1993; Berinstein et al., 1994).

La posibilidad de cristalizar picornavirus y la aplicación de la cristalografía de rayos X, ha generado datos adicionales muy importantes en cuanto a estructura y características antigénicas para rinovirus (Rossmann et al., 1985), poliovirus (Hogle et al., 1985), mengovirus (Luo et al., 1987) y aftovirus (Acharya et al., 1989; Logan et al., 1993).

Los picornavirus poseen una cápside de simetría icosaédrica compuesta de 60 copias de cada una de las proteínas estructurales virales: VP1, VP2, VP3 y VP4. El ensamble de la partícula viral se realiza a través de intermediarios pentaméricos compuestos de copias de VP1, VP3 y una proteína precursora, VP0, en la cual VP4 y VP2 están covalentemente unidas.

Las proteínas de la cápside encierran a la única molécula de ARN (+) de cadena simple, con 7200 a 8500 nucleótidos que puede actuar como mensajero tanto in vivo como in vitro (Colter et al., 1957, Alexander et al., 1958). El extremo terminal 5' está unido covalentemente a una pequeña proteína viral, VPg. La traducción del ARN viral da como resultado una poliproteína cuyo procesamiento, producido en varias etapas, da lugar a las proteínas estructurales y no estructurales del virus (Kitamura 1981; Racaniello and Baltimore 1981; Grubman et al., 1984; Rueckert and Wimmer, 1984). Las proteínas no estructurales incluyen una ARN polimerasa ARN dependiente codificada por el virus que funciona en conjunto con proteínas celulares para replicar el ARN genómico a través de un intermediario de cadena(-).

 Tabla 1:
 Propiedades físicoquimicas de los picornavirus.

Género	Virus	Número de serotipos	Estabilidad	Densidad de flotación(ClCs)
Enterovirus	Polio	3	estable 3-9	1.34
2	Coxsackie A	23		1.5
	Coxsackie B	6		
	Eco	32		
	120	32		
Cardiovirus	EMC*	1	estable 3-9	1.34
Rinovirus	Rinovirus			
	humano	>100	lábil 6	1.40
	Rinovirus			
	equino	2		
Aftovirus	Fiebre aftosa	7	lábil 6.8	1.43
Hepatovirus	Hepatitis A	1	estable 3-9	1.34

Se incluye el número de serotipos presentes para dar una idea de la variabilidad antigénica que muestra esta familia. * Encefalomiocarditis.

I.2. La fiebre aftosa

I.2.1. Un poco de historia

La fiebre aftosa (FA) ha sido conocida por alrededor de cuatro siglos. Fracastorius fue el primero en reportar un brote de la enfermedad en bovinos en Italia en 1514 (Fracastorius, 1546). La descripción que hace de los síntomas en los animales afectados (anorexia, vesículas en lengua que luego también aparecen en las pezuñas y la recuperación de la mayoría de los animales enfermos) tiene una similitud asombrosa con aquellos observados en la actualidad (Bachrach, 1968). Sin embargo, no fue hasta 1897 que Loeffler y Frosh demostraron que la enfermedad era causada por un agente filtrable (Loeffler and Frosh, 1897). En sus experimentos con bovinos notaron la rápida replicación viral en el animal enfermo y aplicando el método de dilución limitante titularon el virus presente en tejido infectado. También realizaron neutralización del virus con suero de animales convalescientes. Avances significativos no fueron realizados hasta después de 25 años, siendo el principal obstáculo lo costoso de trabajar con el hospedador natural. Fueron entonces Waldman y Pape quienes reprodujeron la enfermedad en cobayos inoculados en la base de la pata (Waldman and Pape, 1921).

En Europa la investigación fué focalizada a la solución de problemas en el campo ya que la enfermedad se diseminaba rápidamente. Brotes particularmente severos en el Reino Unido llevaron a la apertura de institutos nacionales en toda Europa: Insel Reims en Alemania en 1909, Pirbright en el Reino Unido en 1924 y en Lindholm en Dinamarca en 1925 así como la dedicación de institutos veterinarios ya existentes como en Alfort, Francia y en Brescia, Italia (Brooksby,

1982). En cuanto a la situación en el resto del mundo, el primer récord de la enfermedad en América del Sur data de 1871, apareciendo primero en Argentina y luego en Brasil, Chile y Uruguay tras la importación de bovinos desde Europa durante el amplio brote ocurrido allí en 1870. El primer récord de la enfermedad en Perú, Bolivia y Paraguay es de 1910 y en Colombia y Venezuela de 1950. La ocurrencia en Africa y Asia está menos documentada, pero es probable que surgiera del transporte de animales infectados desde Europa, aunque los serotipos son diferentes a los "clásicos" europeos (Brown 1986).

A pesar de ser una enfermedad conocida por más de cuatro siglos, cuyo agente causal fue descubierto hace casi cien años, y a pesar de que los medios para el crecimiento de virus en cantidades suficientes para la producción de vacunas a gran escala están disponibles desde 1950, la enfermedad aún está presente en muchos países del mundo. La falla en el control puede deberse a varios factores como la imposibilidad de aplicar las vacunas eficientemente en programas organizados de control o también al uso de vacunas de baja potencia o de cobertura insuficiente, debido a los elevados costos que implicaría su mejoramiento.

L2.2. Síntomas clínicos, transmisión y estado de portador

La FA tiene la reputación de ser una de las enfermedades más temidas del ganado doméstico, principalmente por su amplia distribución y por ser altamente contagiosa. Afecta al ganado bovino, porcino, ovino y caprino y su gran efecto es debido más a la disminución de la producción que a la muerte de los animales infectados. La mortalidad en el bovino es menor que el 5%, pero puede llegar al

50% cuando el virus invade el músculo cardíaco en los animales jóvenes (Bachrach, 1968).

La enfermedad se caracteriza por la formación de vesículas o aftas en las mucosas de la boca, en la nariz y en la piel interdigitante de las pezuñas. Las llagas bucales dificultan la ingestión de alimentos y las de las pezuñas hacen difícil el traslado del animal, siendo frecuentes además los abortos de animales en gestación.

El virus se transmite entre los animales por diversos mecanismos: contacto directo (a través de saliva, leche y semen) o indirecto (herramientas o ropa contaminadas, animales salvajes, aerosol, etc). Como ejemplo puede citarse la predicción por modelos matemáticos del área de diseminación por aerosol del virus en el brote ocurrido en Inglaterra en 1981. Los cálculos predijeron un área de 250 km, desde Francia a la isla de Wight, Inglaterra (Donaldson et al., 1982).

Una vez que el virus de la fiebre aftosa (VFA) penetra en el animal susceptible por la vía respiratoria o a través de los epitelios de la boca y nariz, le sigue un período corto de incubación de la enfermedad. Luego aparecen las aftas primarias en el punto de entrada. Posteriormente es posible detectar viremia, fiebre y aftas secundarias (pezuñas, lengua y paladar). La respuesta del sistema inmune hace que desaparezca el virus de sangre pero no necesariamente de los tejidos.

Pasada la fase aguda los animales pueden aparecer como totalmente recuperados, pero un número variable puede convertirse en portadores del virus, estado durante el cual puede aislarse virus infeccioso de las secresiones esófago-faríngeas cuando son inoculadas en animales susceptibles o en cultivo celular (Sutmoller and Gaggero, 1965; Burrows, 1966; Straver et al., 1970; Fellowes and Sutmoller, 1970; Augé de Mello et al., 1970). Se ha documentado aislamiento viral hasta 560 días post inoculación (Rossi et al., 1988; Gebauer et al., 1988) y persiste aún en presencia de anticuerpos neutralizantes (van Bekkum et al., 1959; Sutmoller and Gaggero, 1965; Burrows, 1966). En animales infectados persistentemente con

virus C3 se detectaron variaciones en la secuencia nucleotídica del ARN viral lo cual se correlacionó con cambios de antigenicidad detectables con anticuerpos monoclonales (Gebauer et al., 1988). Estos estudios resaltan la importancia del animal portador como reservorio natural para el virus y como fuente potencial de nuevas variantes.

L2.3. Vacunas

La producción de anticuerpos séricos repesenta el mecanismo de defensa más importante del animal susceptible frente a la infección por el VFA. La respuesta serológica inducida luego de la infección o vacunación con VFA ha sido bien caracterizada en el ganado bovino (Cowan, 1973) y en animales de experimentación como el cobayo (Waldmann and Pape, 1920; Knudsen et al., 1983) y el ratón (Borca et al., 1984; Borca et al 1986; Fernández et al., 1986; Piatti et al., 1991). Varios estudios han sugerido que la neutralización por anticuerpos y la agregación u opsonización de los viriones seguida de su fagocitosis, son probablemente los efectores principales de la inmunidad contra el virus (Mc Cullough et al., 1987; Mc Cullough et al., 1992).

El control de la enfermedad se realiza principalmente a través de tres métodos, dependiendo de la situación epidemiológica de la región. En aquellos países que normalmente no tienen FA, se toman todas las medidas necesarias para que todo aquel material que pueda acarrear el virus no sea importado; y en la eventualidad de un brote se aplica el rifle sanitario. En aquellas partes del mundo donde la enfermedad es endémica, el control se realiza a través de la vacunación sistemática, con campañas de vacunación controladas en parte por el Estado.

Para la producción de las vacunas a virus inactivado actualmente en el mercado (el uso de vacunas atenuadas fue abandonado rápidamente al observarse reversión a virulencia), el virus es crecido a gran escala en cultivo celular tanto en monocapa como en suspensión. Luego es inactivado, generalmente con una imina, y la vacuna se completa con el agregado de hidróxido de aluminio o una fase oleosa de composición establecida. Con vacunas de estas características se logran buenos títulos protectores, aunque existen varios inconvenientes o desventajas, como son: limitada vida útil, la necesidad de mantener la cadena de frío, la baja duración de la inmunidad inducida y los problemas asociados con la no contención del virus dentro de los perímetros de la planta productora (inactivación incompleta del virión o escape del virus debido a incompletas medidas de seguridad). Frente a estos problemas se ha iniciado la búsqueda de otras tecnologías en el desarrollo y producción de vacunas.

Para ello se ha hecho uso de las características antigénicas del virion. Los antígenos virales han sido identificados en la mitad carboxiterminal de la proteína de la cápside viral VP1, en particular las secuencias de aminoácidos 140-160 y, aunque menos importante, el segmento 200-213, ambos conteniendo epitopes involucrados en la inducción de anticuerpos neutralizantes (Strohmaier et al., 1982; Bittle et al., 1982; Geysen et al., 1984; Xie et al., 1987).

Se han desarrollado vacunas experimentales que utilizan VP1 o sus sitios antigénicos relevantes expresados en E.coli. En el caso de aquellas que contienen VP1, los mejores resultados han sido obtenidos con serotipo A tanto en bovinos como en cerdos, lográndose protección frente al desafío con dosis altas del inmunógeno o con vacunaciones repetidas (Kleid et al., 1981; Mc Kercher et al., 1985). Cuando se utilizaron los sitios inmunogénicos de VP1 expresados como proteínas de fusión, Broekhuijsen y colaboradores lograron protección en cobayos y cerdos con la secuencia 137-162 de VP1 repetida en tándem ocho veces (con 8µg

para cobayos y 400µg para cerdos en formulación oleosa) (Broekhuijsen et al., 1987). Un péptido con dos sitios (200-207)2-(140-153), incorporados a la proteína PhoE de E.coli, indujo anticuerpos neutralizantes y protegió cobayos contra el desafío (Agterberg et al., 1990). Con un dímero (200-213~141-158)-TrpE con la secuencia correspondiente al serotipo O, también se logró protección frente al desafío (Giavedoni et al., 1991). Estos sitios fueron también incorporados a la proteína del core del virus de la hepatitis B. Las partículas virales así formadas tuvieron una inmunogenicidad similar a la del VFA tanto en cobayos como en cerdos (Clarke et al., 1987).

Otro tipo de vacunas que utilizan sólo los sitios antigénicos de VP1, son aquellas a péptidos obtenidos por síntesis química y posterior acople, o no, a una proteína carrier. Resultados positivos fueron obtenidos con el péptido 141-160 tanto acoplado a KLH como libre, cuando fue inoculado en cobayos (Bittle et al., 1982; Pfaff et al., 1982).

Los experimentos en bovinos han sido generalmente desalentadores. Dimarchi y colaboradores lograron inducir buen nivel de anticuerpos neutralizantes con un dímero 141-158 y 200-213 con una alta dosis (5 mg) pero no la protección total (Dimarchi et al., 1986). Estas diferencias en la respuesta a los péptidos encontradas en diferentes especies pone de manifiesto la importancia de la restricción de la misma por los genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH). La no respuesta frente a estos péptidos fue estudiada en ratón y se la pudo revertir acoplando secuencias correspondientes a epitopes T pertenecientes a otras proteínas (ovoalbúmina o mioglobina de ballena de esperma) que están bajo la restricción del mismo haplotipo del CMH (Francis et al., 1987).

En adición a los inconvenientes ya mencionados no debe olvidarse también el gran problema que acarrea la alta variabilidad del virus y que hace imposible la protección cruzada de serotipos. Estos cambios de antigenicidad e inmunogenicidad

del virus son de vital importancia en la lucha contra la enfermedad, ya que el grado de protección de la población vacunada depende entre otras cosas de la homología existente entre la cepa vacunal y la de campo. Estos cambios no sólo repercuten en la producción y control de las vacunas, sino que también complican el diagnóstico.

I.3. El virus de la fiebre aftosa (VFA)

L3.1. Características morfológicas del VFA

La partícula viral consiste de una cápside desnuda de 30 nm de diámetro que aloja en su interior al genoma viral constituído por una cadena simple de ARN de polaridad (+) (Vázquez et al., 1979).

La cápside posee una estructura icosaédrica de simetría 5:3:2 (Figura 1). Está formada por 60 copias de cada una de las cuatro proteínas estructurales VP1, VP2, VP3 y VP4, más una o dos copias de VP0, precursor no clivado de VP2 y VP4 (Bachrach, 1977; Rueckert, 1976; Talbot et al., 1973; Dubra et al., 1981). Tanto VP1 como VP2 y VP3 se hallan parcialmente expuestas en la superficie viral, en cambio VP4, la más pequeña de las proteínas estructurales, es interna y tiene unido en su extremo amino terminal ácido mirístico (Boothroyd et al., 1982; Chow et al., 1987).

Figura 1: Estructura de la cápside del VFA.

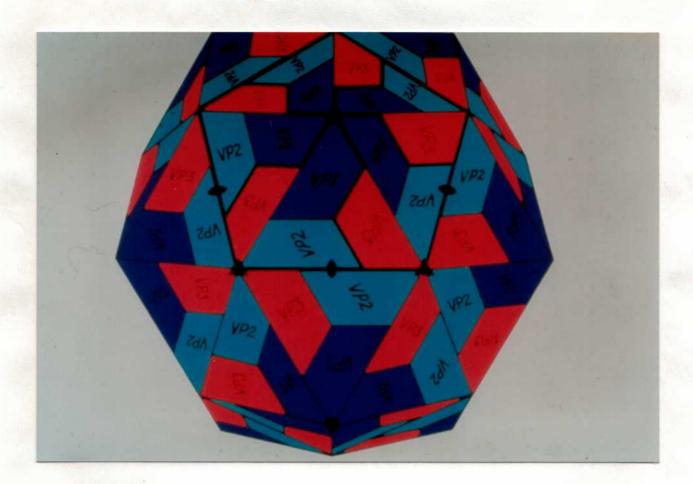
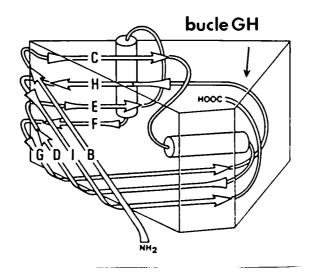


Diagrama representando la cápside viral del VFA. Los cinco protómeros alrededor del eje de simetría quíntuple () se encuentran delineados con trazo grueso . Se señalan también los ejes de simetría 3 (triple) , y 2 (doble) . Basado en Arnold et al., 1987

Recientemente la estructura tridimensional de la cápside del VFA de los serotipos O y C fue determinada por la técnica de difracción de rayos X del virus cristalizado (Fox et al., 1987; Acharya et al., 1989; Lea et al, 1994). Estos estudios predicen que aunque difieren en secuencia, VP1, VP2 y VP3 adoptan una misma configuración espacial denominada "barril ß" (Figura 2). Esta estructura consiste en ocho cadenas de estructura \(\beta\), plegadas unas sobre otras a manera de un sandwich: cada hoja formada por cuatro cadenas, una sobre la otra conectadas por bucles que sobresalen de la superficie. Son las cadenas \(\beta\) las que forman las paredes del barril (BIDG la anterior y CHEF la posterior). Los bucles entre las cadenas son identificados por las letras que denominan las cadenas que conectan; así, el bucle G-H conecta las cadenas \(\beta\) G y H.

Figura 2: Representación esquemática del motivo "barril-ß" que adoptan VP1, VP2 y VP3

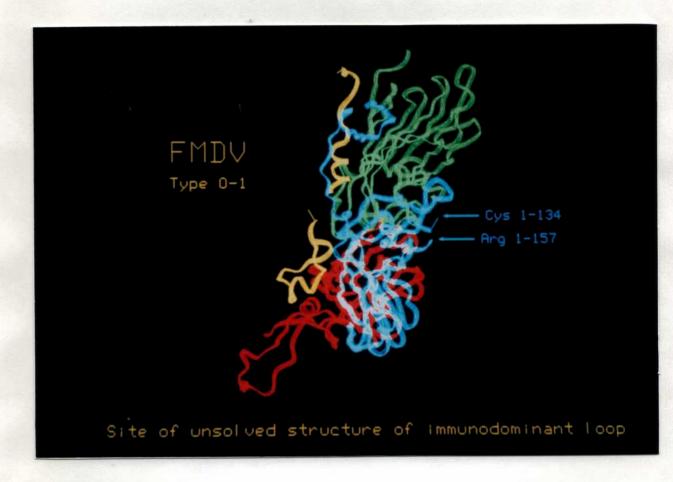


Las cadenas ß están representadas con flechas y rotuladas alfabéticamente (B a I). Las hélices se representan como cilindros. (Hogle et al., 1985).

La subunidad biológica o protómero comprende una molécula de VP1 y una de VP2 más una de VP3 perteneciente al área triangular adyacente (Figura 1). Así, el protómero posee forma de "barrilete" y no triangular, de acuerdo a cálculos de pérdida de área accesible al solvente (Fry et al., 1990).

Las dos regiones de la proteína VP1 que determinan las propiedades antigénicas e inmunogénicas del virus (aminoácidos 141-160 y aminoácidos 200-213) están, como se esperaba, expuestas en la superficie de la partícula viral. La característica más sobresaliente es que la secuencia 141-160 (bucle GH) está altamente desordenada en lo que respecta a su densidad electrónica, lo que impidió la determinación de su estructura espacial en este primer análisis. El mapa de densidad electrónica es claro hasta el aa 134, pero luego se desordena y se hace claro nuevamente en el aa 159. Los residuos 134 y 157 están situados muy próximamente en la superficie de la cápside, sugiriendo que la secuencia desordenada que se encuentra entre ellos debe ser un bucle prominente y flexible sobre la superficie (Acharya et al., 1990). No fue hasta muy recientemente que este bucle pudo ser definido en estructura, aunque aún sigue siendo la región más móvil de la cápside (Logan et al ,1993). Esto fue posible para el virus de serotipo O1 BFS y luego de la reducción del puente disulfuro que se forma en la base del bucle entre los residuos Cis 134 y Cis 130 de VP2. Este puente no está presente en todos los virus del serotipo O. El análisis de estructura a través de la difracción de rayos X realizado para el serotipo C (cepa C-S8c1) reveló la región amino terminal de la proteína VP2, que, se especula, modifica su disposición espacial durante la última etapa de la morfogénesis viral que resulta en el clivaje de VP0 en VP2 y VP4 (Lea et al., 1994)(Figura 3).

Figura 3: Protómero al cual le falta la zona del bucle GH, cuya estructura no ha sido totalmente definida.



Código de colores: VP1: azul; VP2: verde; VP3: rojo y VP4: amarillo.

Aunque la secuencia del bucle (aa 140-160) es hipervariable no sólo en secuencia sino en longitud entre distintos aislamientos, hay un triplete de aminoácidos, Arg-Gly-Asp (RGD) altamente conservado en las posiciones 145-147

. Esta secuencia ha recibido mucha atención últimamente ya que se ha reconocido su unión a la proteína extracelular vitronectina, miembro de la familia de receptores llamados integrinas (Berinstein et al, 1994). Si bien el RGD es de gran importancia en la unión del VFA a las células (Mason et al., 1994), no sería el único elemento involucrado, ya que removiendo el extremo C-terminal de VP1, la unión a las células se ve afectada (Fox et al., 1989). Todo parece indicar que en el VFA el mecanismo de unión al receptor es el opuesto al que ha sido propuesto para rinovirus (Rossmann et al., 1985). En este virus el sitio de unión al receptor reside en una profunda depresión o cañón en la superficie de la cápside viral, escondido del sistema inmune y por lo tanto no sometido a presiones para mutar y evitar así la neutralización por anticuerpos.

En 1966 Cowan y Graves dieron a conocer la presencia de un proteína que era específica de grupo en células infectadas con VFA, la cual fue denominada "antígeno asociado a la infección" o VIA, identificada luego como la ARN polimerasa viral o proteína 3D. Debido al hecho de que era imposible detectar anticuerpos contra VIA en el suero de animales vacunados, Cowan y Graves concluyeron que su presencia estaba asociada con el proceso de infección. Sin embargo, se ha demostrado recientemente la presencia de anticuerpos contra este antígeno y otras proteínas no estructurales en sueros de animales vacunados (Tesar et al., 1989; Berger et al., 1990; Neitzert et al., 1991), y también había sido comprobado anteriormente en suero de animales inoculados con preparaciones de virus altamente purificadas (Sangar et al., 1976; Rowlands et al., 1969). Basados en estos antecedentes y con el uso de la proteína 3D expresada en E. coli, Newman y colaboradores obtuvieron evidencias directas de que la polimerasa viral es un componente de las partículas virales (Newman et al., 1994). En adición y confirmando trabajos previos realizados por Denoya y su grupo, se muestra que la polimerasa 3D expresada en E.coli actúa también como endonucleasa y su presencia en la partícula viral explica la rápida pérdida de infectividad que ocurre cuando el virus es incubado a 37°C, hecho que se correlaciona con la degradación in situ del ARN genómico (Denoya et al., 1978a; Denoya et al., 1978b; Brown et al., 1963; Brown et al., 1966).

I.3.2. Organización del genoma. Productos de la traducción

El genoma del VFA consiste de una molécula de ARN monocatenario de 2.93X10⁴ Da, que corresponde a 8450 pb. El extremo 3' se encuentra poliadenilado y en el extremo 5' presenta una pequeña proteína unida covalentemente denominada VPg. El ARN viral presenta un único marco de lectura abierto que codifica para una poliproteína cuya masa molar es de 258.9Kd y dos regiones no codificantes a ambos extremos.

En el extremo 5' se encuentra una región no codificante de variada longitud en los picornavirus, y que en el VFA consiste en 1200 nucleótidos y posee un alto grado de estructura secundaria (Figura 4). Esta región presenta estructuras conservadas comunes para afto y cardiovirus (Pilipenko et al., 1989; Kühn et al., 1990). Por un lado se encuentra un segmento de citidinas, poli(C), cuya longitud en el VFA es de unos 100 a 420 nucleótidos (Black et al., 1979; Escarmís et al., 1992; Harris and Brown, 1976). Basados en el hecho de que una cepa virulenta del serotipo SAT1 tenía un poli(C) de longitud mayor que el de la cepa atenuada derivada, Harris y Brown sugirieron que el segmento poli(C) podía tener un rol en la determinación de la virulencia. Aún así hay varios reportes que hacen incierta esta afirmación (Costa Giomi et al., 1988; Escarmís et al., 1992). Clones infecciosos de cDNA correspondientes a los serotipos O (Zibert et al., 1990) y A

(Rieder et al., 1993), han sido utilizados, entre otros aspectos, para dilucidar el rol del poli(C) en la virulencia del VFA. Estos trabajos reportan que no habría relación entre la longitud del poli(C) y la virulencia.

Dentro de esta región se encuentra también una secuencia que dirige la traducción (sitio interno de entrada del ribosoma, IRES) presente en el genoma de los picornavirus y en otros mensajeros eucariotes (Jang et al., 1988; Jackson et al 1990; Molla et al., 1992; Belsham et al., 1990; Pelletier and Sonemberg, 1988; Trono et al., 1988).

La proteína VPg, unida covalentemente al extremo 5' mediante el residuo pUpUp del ARN y el grupo hidroxilo fenólico de un residuo tirosina dela misma, se cree pueda estar involucrada en la síntesis del ARN viral. Esto fue estudiado especialmente en poliovirus (Crawford y Baltimore, 1983; Flanegan et al., 1977; Lee et al., 1977; Takeda et al., 1987). Además de su rol en la replicación del ARN genómico, se piensa que VPg pueda estar también implicada en la encapsidación del ARN viral (Nomoto et al., 1977 y 1977a), debido a que en los viriones sólo es posible encontrar VPg unida al ARN viral, mientras que el mismo ARN sin VPg unida covalentemente es hallado en células infectadas. El rol de VPg en el VFA parece ser más complejo que el que tiene en otros picomavirus. Análisis de la secuencia del genoma revelaron tres genes de VPg ordenados en tándem y denominados VPg1, VPg2 y VPg3 (Forss y Schaller, 1982). Los genes están relacionados pero son distinguibles unos de los otros y se encuentran en los viriones en cantidades equimolares. Falk y colaboradores analizaron las implicancias del número de copias de VPg en la replicación del VFA y encontraron una gran tolerancia en el número de copias de la proteína, aunque la óptima viabilidad fue obtenida cuando el genoma codificaba para tres copias de VPg (Falk et al., 1992). Otro punto para destacar es el hecho de que no se encontraron diferencias significativas entre las moléculas de VPg con respecto a su rol para promover la

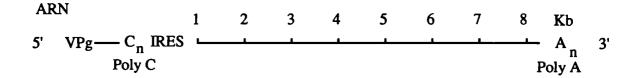
síntesis del ARN viral, lo que sugiere que las tres VPgs actúan de forma similar en la replicación viral.

Otra característica interesante del genoma del VFA es que existen dos codones de iniciación AUG en el mismo marco de lectura (Clarke et al., 1985). Esto tiene como consecuencia que la proteína líder (L), el primer componente de la poliproteína, es producida en dos formas, Lab, cuando el primer AUG es utilizado como codón de iniciación y Lb, que posee 28 aa menos y que es la forma mayoritaria en los sistemas de traducción *in vitro* y también *in vivo*.. Medina y colaboradores demostraron que las dos formas, expresadas individualmente, poseen la misma actividad, incluyendo el clivaje del componente p220 del complejo de iniciación de la traducción (Medina et al., 1993).

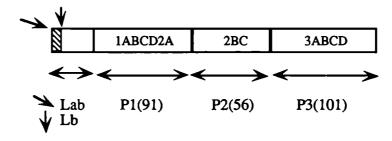
El extremo 3' poliadenilado presenta un número variable de residuos por molécula de ARN, y se ha visto que la heterogeneidad en la longitud de este segmento no es eliminado por purificación por plaqueo de la población viral (Chatterjee et al., 1976; Polatnick et al., 1980; Rueckert et al., 1985). Si bien la función del poli(A) no es totalmente conocida, se ha visto que moléculas de ARN con segmentos cortos de poli(A) poseen menor infectividad específica (Sarnow et al., 1989).

Con el conocimiento de la estructura primaria del genoma del VFA sumado a la caracterización bioquímica de los polipéptidos inducidos por el virus, fue posible mapear las zonas que codifican para los distintos productos genómicos como así también asignar las funciones a las cuales están asociados los mismos (Figura 4).

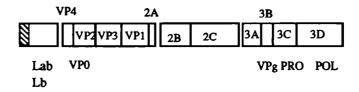
Figura 4: Mapa bioquímico de genoma del VFA



POLIPEPTIDOS PRECURSORES



PROTEINAS MADURAS



La iniciación de la traducción tiene un sitio principal y uno alternativo, dando como producto la proteína Lab o Lb (L o L' respectivamente en Vakharia et al., 1987). La nomenclatura de las proteínas corresponde al sistema propuesto por Rueckert and Wimmer (1984). IRES: Sitio interno de entrada de los ribosomas.

L3.3. Ciclo de replicación del VFA

El ciclo de replicación del VFA tiene como evento inicial la adsorsión del virión a receptores específicos ubicados en la membrana plasmática de células susceptibles. Este proceso es reversible y su etapa inicial está gobernada por fuerzas electrostáticas y por la presencia de cationes divalentes (Ca⁺⁺, Mg⁺⁺) (Brown et al., 1962).

En aftovirus el sitio de reconocimiento al receptor celular está representado por la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) correspondiente a las posiciones 145-147 de VP1 (Fox et al., 1989). Recientemente se ha identificado al receptor de vitronectina como una de las moléculas receptoras para el VFA (Berinstein et al., 1994), sin embargo, estudios de competición han demostrado previamente la existencia de inhibición solo parcial de la unión al receptor entre diferentes cepas del virus, aún cuando todas ellas poseen la misma secuencia RGD (Sekiguchi et al., 1982; Baxt and Bachrach, 1980). Esto podría significar la existencia de más de un receptor en células susceptibles; de este modo diferentes cepas virales tendrían algunos receptores que serían comunes o compartidos y otros que serían únicos.

Luego de la adsorsión, la entrada del virión al citoplasma tiene lugar a través de endocitosis mediada por receptor. El desnudamiento tiene lugar dentro de los endosomas, cuyo pH ácido proporciona el medio necesario para la ruptura del virión en las subunidades proteicas 12S, dejando así el ARN genómico libre para iniciar su replicación (Carrillo et al., 1984; Carrillo, 1985; Baxt, 1987).

El genoma viral liberado en el citoplasma se une a la maquinaria biosintética celular para producir una poliproteína que es rápidamente procesada. Por otro lado, la replicación del ARN viral involucra la síntesis de una cadena complementaria de polaridad (-) que es utilizada para amplificar el número de cadenas de ARN(+). La

elongación de ambas cadenas tiene lugar gracias a la actividad de la enzima viral ARN polimerasa ARN dependiente (3D) (Newman et al., 1979; Robertson et al., 1983).

El ensamble de las proteínas virales y el ARN es un proceso que consta de varias etapas y que va generando intermediarios con diferentes características morfológicas y también antigénicas. El primer paso implica la formación de subunidades de 13S, compuestas por un agregado de cinco protómeros inmaduros; ésto es VP0, VP1 y VP3. El ensamble de estas subunidades de 13S en agregados de doce da lugar a los intermediarios llamados procápsides. La incorporación del ARN a las procápsides resulta en la formación de los proviriones. El virión maduro de 146S se genera gracias al clivaje proteolítico de casi la totalidad de las cadenas VPO en VP2 y VP4, hecho que también tiene como consecuencia un reordenamiento espacial de la cápside viral. Finalmente se produce la liberación de los viriones infecciosos por lisis de las células infectadas. Esta descripción del ensamble de la partícula viral para el VFA es en realidad considerada regla general para los picornavirus, sin embargo ciertos pasos aún generan controversia, como lo es el hecho de que es más fácil visualizar las subunidades de 13S ensamblándose alrededor del ARN que a éste siendo incorporado o internalizado dentro de la procápside formada en un paso previo (Rueckert, 1976).

L4. Variabilidad genética en virus ARN

Los virus ARN han sido objeto de extensiva investigación debido a que son los responsables de una variedad de enfermedades de importancia médica y económica tanto para el hombre como para plantas y animales. Su extraordinario éxito evolutivo se atribuye a su habilidad para utilizar diferentes estrategias de replicación y a la capacidad de adaptarse al amplio espectro de nichos biológicos que encuentran al replicar en uno o diferentes huéspedes.

Estudios realizados en la década del '40 con influenza y con el virus del mosaico de tabaco (Burnet and Bull, 1943; Kunkel, 1947) mostraron que los virus ARN eran altamente mutables. En años recientes, técnicas de biología molecular y celular más modernas han permitido estudios detallados de virus provenientes de aislamientos naturales y también de cepas de laboratorio. Estos estudios muestran a los virus ARN como poblaciones extremadamente heterogéneas, lo que les permite desarrollar una gran adaptabilidad y rápida evolución.

I.4.1. Heterogeneidad de los genomas ARN

La variabilidad genética de los virus ARN es el resultado de la generación de genomas mutantes durante la replicación viral. Esto es consecuencia del alto nivel de error en el proceso de copiado del templado que es inherente a las ARN polimerasas y a las transcriptasas reversas de los retrovirus (Holland et al., 1982; 1992).

Las tasas de mutación (definida como el número de eventos de incorporación errónea de nucleótidos por sitio por ronda de replicación) para genomas ARN están en el rango de 10-3 a 10-4 (Weissman et al., 1973). En el caso de las ADN polimerasas virales, procariotas y eucariotas, ha sido demostrado un mecanismo capaz de corregir la incorporación incorrecta de bases durante la síntesis de ADN, por lo cual la tasa de mutación para virus ADN se estima en 10-7 a 10-11 por nucleótido incorporado (Kornberg, A., 1980, Drake, J.W., 1969). Curiosamente, la tasa de mutación para el ADN de los genes que codifican la región variable de las moléculas de inmunoglobulinas puede ser tan alta como 10-3 por ciclo celular en ciertos estadíos de desarrollo de los linfocitos B. Este hecho muestra que cuando el objetivo es generar variabilidad, el mecanismo de corrección de errores de las polimerasas es suprimido y la fidelidad de copia del ADN se hace comparable a la del ARN (O'Brien et al., 1987; Siekevitz et al., 1987).

En adición a la alta frecuencia de mutaciones puntuales, los virus ARN tienen a su disposición otros mecanismos que originan variabilidad, como son la generación de reasortantes en el caso de virus con genomas segmentados, y la recombinación genética.

Como ejemplo de la generación de reasortantes, se pueden citar algunos episodios de pandemia que son causados periódicamente por influenza tipo A como resultado del reordenamiento de segmentos genómicos entre cepas humanas y aviares o entre diferentes cepas humanas, lo cual genera virus antigénicamente diferentes y nuevos (Bean et al., 1980; Desselberger et al., 1978; Webster et al., 1982; Young, J.F., and Palese, P., 1979).

La recombinación genética ha sido demostrada sólo para un número limitado de virus fuera de la familia de los retrovirus donde es más frecuente. Ha sido demostrado para picornavirus como el VFA (Kirkegaard, K. and Baltimore, D.,

1986; King et al., 1982) y poliovirus (McCahon et al., 1977; Minor et al., 1986; Tolskaya et al., 1983).

La alta tasa de mutación que se observa en los virus ARN determina que estas poblaciones virales consistan de una mezcla heterogénea de genomas (Domingo et al., 1980, 1985; Sobrino et al., 1983; Martínez-Salas et al., 1985; Martínez et al., 1988). Esto les confiere una alta adaptabilidad a nuevos ambientes debido a las múltiples variantes ya presentes en la población y a la gran facilidad de producir nuevas mutantes (Holland et al., 1982).

L4.1.1. El concepto de cuasiespecie

La definición standard de especie biológica no es aplicable a las poblaciones de virus con genomas ARN. Tampoco es posible hablar de un "tipo salvaje" como la forma que predomina en una población y que está particularmente adaptada al ambiente en el cual vive. Estas definiciones y conceptos son aplicables sólo a poblaciones con genomas ADN que replican con alta precisión. Pero en el caso de las poblaciones virales con genomas ARN, donde el proceso de replicación es altamente imperfecto, se define a la <u>cuasiespecie</u> como una población de secuencias genómicas relacionadas que se reproducen imperfectamente pero suficientemente bien como para retener su identidad en el tiempo. Biológicamente la cuasiespecie es el verdadero blanco del proceso de selección. El "tipo salvaje" se refiere al promedio de un conjunto de secuencias que son las mejores adaptadas.

Este concepto de cuasiespecie fue desarrollado sobre bases puramente teóricas por Manfred Eigen (1971) al estudiar el conjunto de individuos que formaban parte de un clon de ácidos nucleicos. Experimentos posteriores realizados con el ARN de

clones del fago QB de E.coli demostraron que estos clones reflejaban una distribución de genomas típico de una cuasiespecie y así se extendió el concepto para virus ARN (Domingo et al., 1978, 1980, 1985; Weissman et al, 1973).

La cuasiespecie debe considerarse como una población en equilibrio dinámico, con variantes genómicas surgiendo a alta velocidad (debido a las características replicativas de los genomas ARN discutidas anteriormente) y factores selectivos afectando la eficacia biológica o adaptabilidad de cada genoma.

Basándose en estos conceptos, la variación genética en los virus ARN puede explicarse como el resultado de un proceso en dos pasos. Primero es la generación de genomas mutantes como consecuencia de la naturaleza proclive de la ARN polimerasa y la transcriptasa reversa a cometer errores de copia. Posteriormente a la generación de las variantes, se establece la competencia entre las mismas, lo que se refleja en la eficacia de todos los procesos en el ciclo de vida del virus (replicación del genoma, síntesis de proteínas y procesamiento, ensamblado, etc).

Una nueva mutante no podrá dominar sobre la distribución de genomas inicial si esta última está mejor adaptada. Esta situación en la cual una población de variantes genómicas produce la misma secuencia promedio o consenso repetidamente se denomina población en equilibrio, aunque hay una constante generación de mutantes. El equilibrio será perturbado tan pronto como surjan mutantes mejores adaptadas como resultado del proceso de mutación (Domingo et al., 1993). No importa cuán alta sea la tasa de mutaciones, en una situación de equilibrio como el descripto no se producirá evolución.

Este proceso de generación de variación genética en dos pasos (generación de mutantes seguido de la competencia) tiene una influencia importante en la diversificación genética de los virus ARN.

I.4.1.2. Evidencias de la heterogeneidad de las poblaciones virales con genomas ARN

El primer reporte de las características de cuasiespecie de las poblaciones virales ARN fue realizado utilizando el fago Qß (Domingo et al., 1978). Basados en experimentos que comprendieron curvas de crecimiento y mapeo de oligonucleótidos generados por la nucleasa T1, este grupo concluyó que la población en estudio existía en equilibrio dinámico con mutantes viables que por un lado se generaban con elevada frecuencia, y por el otro estaban siendo seleccionadas unas contra otras.

La variabilidad en virus animales es un fenómeno reconocido y el ejemplo del virus influenza es probablemente el mejor estudiado.

El virus influenza se clasifica en tres tipos: A, B y C sobre las bases de antígenos específicos de tipo que se encuentran en las proteínas de matriz y nucleoproteínas. El tipo A se subdivide a su vez en subtipos de acuerdo a las características antigénicas de los antígenos de superficie: hemaglutinina (HA, 13 subtipos diferentes) y neuraminidasa (NA, 9 subtipos diferentes) (Webster et al., 1982; Palese and Young, 1982). Dos tipos de mecanismos distintos de generación de variabilidad genética han sido demostrados para influenza. Uno es el llamado shift antigénico e implica el reemplazo de un gen codificante para una HA por otro que codifica una HA diferente, pudiendo estar o no acompañado también por el reemplazo del gen de la NA. Desde que el primer virus influenza fue aislado en 1933, shifts antigénicos han ocurrido en 1957 cuando el subtipo H2N2 reemplazó al H1N1; en 1968 cuando apareció el virus H3N2 y en 1977 cuando reapareció el virus H1N1. La base molecular del shift antigénico es la generación de virus reasortantes como consecuencia del reordenamiento o intercambio de fragmentos

genómicos entre virus diferentes que co-circulan al mismo tiempo o bien con la reaparición de virus que causaron epidemias en el pasado y se mantienen "escondidos" por varios años (Nakajima et al., 1978).

El otro mecanismo se conoce como drift antigénico y consiste en pequeños cambios que son el resultado de la acumulación gradual de mutaciones puntuales que ocurren naturalmente o bien como variantes seleccionadas en el laboratorio en ausencia o presencia de anticuerpos (Brand et al., 1980; Lubeck et al., 1980).

A partir de análisis de secuencia, se ha observado que los genes que codifican tanto las proteínas internas como las de superficie del virus influenza tipo A evolucionan con frecuencias que son aproximadamente 106 veces mayores que aquellas de genes eucariotas (Buonagurio et al., 1986; Palese, 1986). Parvin y colaboradores (1986) midieron de forma directa las tasas de mutación *in vitro* del gen de la NA y las compararon con aquellas del gen VP1 de poliovirus tipo 1. Como resultado este grupo muestra que la tasa de mutación para el gen de la NA del virus influenza A es significativamente mayor que la del gen VP1 de poliovirus tipo 1 (1.5x10-5 versus menos de 2.1x10-6 mutaciones/nucleótido/ciclo infeccioso). Las razones que explicarían estas diferencias no son claras y pueden incluir desde el resultado de una mayor fidelidad de la replicasa en la replicación de poliovirus como también el hecho de que tal vez el gen VP1 tolere mucho menos las mutaciones y por lo tanto, si éstas ocurren, la mayoría serían letales y por lo tanto no detectables por la metodología utilizada en este trabajo.

El virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1) constituye otro ejemplo interesante de la naturaleza variable de los virus ARN.

La familia Retroviridae, a la cual pertenece el HIV-1, es una familia de virus muy particular por el hecho de utilizar tres sistemas enzimáticos completamente diferentes para la replicación: la transcriptasa reversa, la cual sintetiza intermediarios virales; la ARN polimerasa II del huésped, responsable de la síntesis

de nuevos genomas y la DNA polimerasa celular, la cual replica el provirus junto con el DNA del huésped. Estas enzimas tienen frecuencias de error muy diferentes y por lo tanto van a contribuir en la tasa de mutación de acuerdo a como es replicado el virus en estudio, tanto *in vivo* como *in vitro* (Coffin, 1986).

En uno de los primeros estudios realizados, Hahn y colaboradores (1986) mostraron que virus aislados de forma secuencial de humanos infectados con HIV-1 habían evolucionado en el mismo individuo de forma paralela a partir de un ancestro común, es decir que la secuencia dominante al comienzo de la infección fue seguida por cambios aditivos con el paso del tiempo. Basados en sus datos, estimaron una tasa de evolución de entre 1.58x10-2 y 3.17x10-3 sustituciones/sitio/año para el gen que codifica la proteína de envoltura (env).

Recientemente, Wolfs y colaboradores (1991) presentaron un ejemplo más de la variabilidad del HIV-1 en muestras aisladas de un mismo individuo a lo largo del curso de la infección. Aunque no se calcularon tasas de mutación, los aislamientos hechos al tiempo de la seroconversión mostraron poblaciones virales altamente homogéneas. Con el paso del tiempo las sustituciones se acumulan, llevando a un drift de la secuencia consenso, la cual difiere de aquella hallada al principio.

Otro retrovirus puede servir como ejemplo de variación génica, en este caso la que se genera durante la infección persistente del virus de la anemia infecciosa equina (VAIE). La naturaleza recurrente de la enfermedad ha sido atribuída a la selección de variantes durante infecciones persistentes como resultado de la constante presión inmunológica. Montelaro et al (1984) demonstraron por ensayos de neutralización que los aislamientos virales realizados en cada episodio febril en un mismo poni experimentalmente infectado, consistían en cepas antigénicamente diferentes. Los resultados serológicos fueron confirmados a nivel bioquímico cuando se observaron cambios en los patrones electroforéticos de las proteínas de superficie de los viriones aislados.

La elevada tasa de error inherente a la síntesis de cualquier ARN le confiere a los virus con genomas ARN tasas de mutación extremadamente altas. Como consecuencia todas las poblaciones de virus ARN son cuasiespecies, una colección de genomas relacionados pero diferentes. Estas poblaciones altamente mutables pueden permanecer estables bajo ciertas condiciones de replicación. Si estas condiciones cambian, el equilibrio de la población es afectado, lo que resulta en una rápida evolución. Esta extrema variabilidad y la rápida evolución pueden causar grandes problemas, como lo es el diseño de vacunas efectivas para el control de enfermedades causadas por poblaciones virales ARN que evolucionan rápidamente.

I.5. Variabilidad del VFA

Una de las características más notables del VFA es su gran diversidad antigénica. Las primeras observaciones permitieron reconocer varios tipos serológicos. Los tipos A y O fueron identificados por Vallée y Carré en 1922, el tipo C por Waldmann y Trautwein en 1926, y posteriormente Brooksby y colaboradores (Brooksby and Rogers, 1957) diagnosticaron los serotipos Asia 1, SAT 1, 2 y 3. Infección o vacunación con un serotipo no confiere protección contra virus de otros serotipos. A través de tests de fijación de complemento y neutralización cruzada generalmente llevados a cabo con sueros de cobayos obtenidos contra cepas de referencia y de campo, se han podido identificar más de 65 subtipos que muestran un variado grado de relación serológica (Pereira, 1977).

Además de la utillización de los ensayos serológicos, el conocimiento de secuencias genómicas para un gran número de aislamientos naturales del VFA, ha dado prueba de la enorme variabilidad del virus. Este fenómeno es de tal magnitud,

que cada aislamiento de VFA secuenciado hasta el presente puede ser considerado genética y antigénicamente único.

L.5.1. Bases moleculares de la variación antigénica

Se ha sugerido que debido a que el segmento 140-160 de la proteína VP1 es el más heterogéneo entre serotipos y subtipos, éste pueda ser el determinante de la especificidad de tipo, mientras que la región 40-60 de VP1 conferiría especificidad de serotipo (Beck et al., 1983). El hecho de que parte de la diversidad antigénica del VFA es determinada por la secuencia y estructura del segmento 140-160 de VP1 es sugerido por la especificidad de los anticuerpos obtenidos contra péptidos sintéticos representando la secuencia de esta región de virus pertenecientes a diferentes serotipos y subtipos (Bittle et al., 1982; Clarke et al., 1983). Sin embargo, otras regiones de la cápside viral deben estar también involucradas. Por ejemplo, algunas cepas dentro del serotipo O (Ouldridge et al., 1986; Krebs et al., 1993) o dentro del serotipo C (Piccone et al., 1988; Feigelstock et al., 1992) son serológicamente diferentes a pesar de compartir la misma secuencia en la región 140-160.

Estudios con anticuerpos monoclonales bien caracterizados y aislamientos de campo del VFA indican una gran variabilidad en los epitopes involucrados en la neutralización del virus. Esto incluye tanto a epitopes continuos localizados dentro de la región 140-160 de VP1, como a los epitopes discontinuos que involucran otras regiones de la cápside viral.

La variabilidad en el VFA está bien documentada entre serotipos, subtipos (Grubman et al., 1987), entre diferentes representantes de un mismo subtipo (Stave et al., 1988), como también entre aislamientos virales realizados durante epidemias

o brotes de la enfermedad (Mateu et al., 1989). Durante el curso de la infección persistente establecida experimentalmente con virus del tipo C fueron seleccionadas mutantes con reactividad decreciente con anticuerpos monoclonales neutralizantes que definen epitopes en la región 140-160 (Gebauer et al., 1988).

Conocer los cambios aminoacídicos responsables de estos cambios antigénicos en virus obtenidos en aislamientos de campo es muy importante para el diseño de nuevas vacunas. Mateu y colaboradores (1989, 1990) detectaron una sustitución conservativa en las posiciones 137 y 147 a ambos lados de la secuencia RGD en aislamientos realizados durante el curso de una epidemia causada por un virus del serotipo C1. Estos cambios afectaron varios epitopes en el loop de VP1, viéndose reflejados en el cambio de la reactividad de estas variantes con anticuerpos monoclonales neutralizantes. En adición, se detectó otra mutación conservativa en la posición 146 de VP1 capaz de anular todos los epitopes del loop del virus C-S8 (Mateu et al., 1990). Martínez y colaboradores (1991) estudiaron los cambios en aminoácidos que acompañaron la diversificación del sitio antigénico A (residuos 138-150 de VP1) en virus del serotipo C en aislamientos naturales obtenidos desde 1926 hasta 1989. Aquí también se detectaron cambios puntuales (particularmente Ala 145 por Val 145 o bien His 146 por Gln 146) que causaron cambios antigénicos abruptos manifestándose en la pérdida de varios epitopes. Esto muestra que cambios genéticos muy modestos pueden resultar en un importante drift antigénico, y ésto puede explicar la extensiva heterogeneidad observada entre aislamientos naturales.

De estos estudios se desprende que sería poco probable que los serotipos y subtipos serológicos se correspondan con secuencias de aminoácidos definidas en cada sitio antigénico en particular de la cápside viral. Por el contrario, varias combinaciones de secuencias pueden dar como resultado el mismo comportamiento serológico "promedio". Algunos reemplazos de secuencia pueden eliminar uno o

varios epitopes definidos por anticuerpos monoclonales, mientras que otros pueden generar nuevos epitopes o no tener ninguna consecuencia aparente.

Para complicar los hechos aún más, cada población del VFA, tal como los aislamientos naturales, no es sólo genéticamente heterogénea pero probablemente también lo es a nivel antigénico (Rowlands et al., 1983; Mateu et al., 1989).

L6. Objetivos

La característica más sobresaliente de la región inmunodominate de VP1 es su alto grado de variabilidad entre distintos aislamientos tanto en secuencia como en antigenicidad, lo que permite utilizarla para estudiar las bases estructurales de esta variabilidad y correlacionarlas con las características antigénicas de las variantes en estudio.

El objetivo de este trabajo de tesis es utilizar seis variantes pertenecientes alserotipo A12 como un modelo interesante para el estudio de la variabilidad antigénica del VFA desde el punto de vista serológico y hacerlo extensivo al estudio de las bases estructurales de dicha variabilidad.

Para cumplir con el objetivo planteado se utilizaron las seis variantes detalladas a continuación:

Figura 5: Secuencia correspondiente a la región 141-160 de la proteína viral VP1 de cada una de las seis variantes antigénicas utilizadas en este trabajo.

Variante	141							148	3				153	1						160	
SL	G	S	G	V	R	G	D	S	G	S	L	A	L	R	V	A	R	G	L	P	
LP								L					P								
FP								F					P								
FL								F					L								
FS								F					S								
FQ								F					Q								

SL, LP: Variantes aisladas por Rowlands y colaboradores (1983).

FP: Virus utilizado por Kleid y colaboradores (1981).

FL: Variante derivada de FP (Cedida por el Dr. D. Moore, Plum Island)(Moore et al., 1989)

FS, FQ: Mutantes que escapan a la neutralización, derivadas de FP (Baxt et al., 1989).

Este trabajo de tesis está compuesto de dos partes:

- En la primera parte se analizan las variantes desde el punto de vista de la respuesta serológica obtenida en animales inmunizados con las variantes previamente inactivadas o con los péptidos representando la región 141-160 de VP1. Las técnicas elegidas fueron los ensayos de ELISA indirecto, radioinmunoprecipitación y seroneutralizacion.

- En la segunda parte, y como concecuencia de los resultados obtenidos en la primera con la variante SL, que indicaban la presencia de más de un virus en la semilla de dicha variante, se realiza un estudio de sus características antigénicas. Para ello se analiza la progenie de esta semilla cuando es crecida, por un lado, bajo la presión selectiva de suero policional anti-péptido, y por el otro, en ausencia de presión inmune, pero con diferentes multiplicidades de infección (m.o.i.). El análisis se realizó a través de la secuenciación de la región del genoma que codifica para VP1 y también a través de la seroneutralización de dicha progenie con sueros anti-péptidos.

II. MATERIALES Y METODOS

II.1. Células

Se utilizaron células BHK-21 propagadas en el laboratorio a partir de la semilla obtenida de ATCC (American Type Culture Collection). Las mismas fueron crecidas en monocapas en medio basal Eagle (BME) suplementado con 10% suero bovino (GIBCO), 10% caldo triptosa fosfato (DIFCO) y mezcla de antibióticos y antimicótico en dilución 1/100 (Penicilina, Estreptomicina y Anfotericina B, GIBCO).

II.2. Variantes utilizadas en este estudio

Las variantes pertenecen al serotipo A, subtipo 12 (Tabla 2). De las variantes analizadas, dos fueron obtenidas de epitelio lingual bovino obtenido de un animal enfermo en un brote ocurrido en el Reino Unido en 1953 (Rowlands et al., 1983). Estas son las variantes denominadas SL y LP y fueron aisladas por plaqueo en células BHK. Otras dos variantes fueron obtenidas luego del pasaje en presencia de anticuerpos monoclonales neutralizantes (Baxt et al., 1989) de la variante de Plum Island denominada FP. Estas variantes son FS (crecida en presencia del monoclonal B6FF.3) y FQ (crecida en presencia del monoclonal B7SF.3). El laboratorio de Pirbright cedió sobrenadante de cultivo de tejido luego del pasaje en células IBRS-2 de las variantes inglesas (SL y LP), así como de la variante americana FP en la

forma de suspensiones al 50% en glicerol que fueron conservadas a -20°C. Las semillas de las variantes resistentes a la neutralización por anticuerpos monoclonales y de FL fueron cedidas por el Dr. Barry Baxt del laboratorio de Plum Island, las cuales fueron pasadas una sola vez en células BHK-21 y conservadas como se mencionó anteriormemte.

La región del genoma que codifica para la proteína viral VP1 (en el caso de las variantes SL y FL) o bien la que codifica la región P1 (en el caso de las variantes FP, LP, FS y FQ) fueron secuenciadas y se encontró que las siete variantes sólo difieren en dos posiciones de la proteína viral VP1: los residuos 148 y 153.

Tabla 2: Variantes utilizadas en el estudio de variación antigénica. Las variantes se denominan de acuerdo a los aminoácidos en las posiciones 148 y 153 de la proteína de la cápside viral VP1.

AMINOACIDO EN POSICION

VARIANTE	148	153
SL	Serina	Leucina
LP	Leucina	Prolina
FP	Fenilalanina	Prolina
FL	Fenilalanina	Leucina
_ FS	Fenilalanina	Serina
FQ	Fenilalanina	Glutamina

II.3. Péptidos

Los péptidos utilizados tanto en la preparación de vacunas como en los ensayos de ELISA fueron sintetizados con la ayuda del sintetizador automático ABI 430A, con protocolos basados el la química del t-Boc, en The School of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, London, England. Los mismos fueron purificados a traves de HPLC semi-preparativa de fase reversa (Siligardi et al., 1991). Los péptidos fueron enviados al PIADC en forma de liofilizados. Se prepararon soluciones madres de 0.1 mg/ml en PBS que fueron guardadas a -20°C.

Los péptidos representan la secuencia de la región 141-160 de la proteína de la cápside viral VP1 de las variantes pertenecientes al serotipo A12 mencionadas anteriormente (Fig. 5), con la inclusión de una séptima secuencia, Leu148 Leu153, variante que fue encontrada posteriormente en un aislamiento natural del serotipo A12. Además de la secuencia nativa, una cisteína fue adicionada en el extremo C-terminal con el objetivo de utilizar este extremo para acoplar los péptidos a proteínas carriers.

II.3.1. Acople de los péptidos a las proteínas carriers seroalbúminabovina (SAB) y keyhole limpet haemocyanin (KLH).

Los péptidos fueron acoplados a proteínas carrier tanto para la preparación de las vacunas como para la preparación del antígeno para el test ELISA. Para la preparación de vacunas el péptido se acopló a SAB utilizando glutaraldehído (GA)

o bien, en una segunda instancia, utilizando SAB activada con el grupo heterobifuncional sulfo-SMCC [Sulfo-succinimidil4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato] (Pierce). Este grupo posee la propiedad de reaccionar covalentemente con haptenos que contengan grupos sulfhidrilos libres, que en el caso de los péptidos está aportado por el residuo cisteína agregado al extremo C-terminal . Los péptidos utilizados como antígeno del ensayo de ELISA fueron acoplados a KLH activada con el grupo sulfo-SMCC.

II.4. Animales

Cobayos machos de aproximadamente 500g de peso fueron utilizados para la obtención de los sueros inmunes. Los animales fueron sangrados por punción cardíaca y la sangre obtenida fué dejada a temperatura ambiente hasta la formación del cuágulo. Luego de una noche a 4°C, el suero fue separado de los glóbulos rojos por centrifugación a 3000rpm por 5 minutos. Los sueros fueron guardados a -20°C hasta el momento de su uso.

II.5. Vacunas

II.5.1. Vacunas a virus inactivado

El antígeno vacunal fué obtenido creciendo las correspondientes semillas almacenadas en glicerol en botellas rollers (m.o.i ~ 0.2). El virus cosechado luego de 18 horas (100 ml) fué precipitado con un volumen igual de una solución saturada de sulfato de amonio a 4°C por una hora. El precipitado se recogió centrifugando a 4000 rpm por 30 min y se resuspendió en 10 ml de buffer NET (50mM Tris-HCl, pH7.5, 0.2mM NaCl, 5 mM EDTA, pH final 7.6). El virus fué luego peleteado por centrifugación a 40000 rpm por 2 horas (Rotor SW28, Sorvall). El pellet se resuspendió en buffer fosfato 0.04M pH7.6 y se sembró en un gradiente de sacarosa 15-45% en buffer NET(50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 nM EDTA) luego de agregar SDS (concentración final 0.1%). Luego de centrifugar 3 horas a 40000 rpm, se recogió el gradiente en fracciones de 0.5 ml y se estableció el pico de virus midiendo la absorbancia a 260 nm. El virus purificado (pool de fracciones) fué inactivado con acetiletilenimina (AEI) (concentración final 0.05%).

Las vacunas se prepararon mezclando partes iguales de virus y gel de aluminio. Los cobayos recibieron 2 ml de vacuna por ruta subcutánea. Los sueros se recogieron a los 30 días de la inoculación.

II.5.2. Vacunas a péptidos

Para acoplar los péptidos a SAB a través de GA éstos se disolvieron en 0.8 ml de una solución de SAB de 4 mg/ml (Cantidades pesadas: SL: 0.85 mg; LP: 0.5 mg; FP: 0.9 mg; FL: 1.1 mg; FS: 0.85 mg; FQ: 0.75 mg y LL: 0.67 mg). Se llevó el volumen a 1 ml con agua destilada y se agregaron gota a gota 0.5 ml de una solución fresca de 0.25% de glutaraldehído (Sigma). Los péptidos se dejaron en la oscuridad por 4 horas. Se agregó luego adyuvante oleoso (dilución 1:5) y cada cobayo recibió 1/3 del total de péptido por la ruta subcutánea.

Para acoplar los péptidos a SAB activada con sulfo-SMCC se siguieron las instrucciones del fabricante (Pierce). Se pesaron las siguientes cantidades de péptido: SL: 1.32 mg; LP: 1.07 mg; FP: 1.28 mg; FL: 1.36 mg; FS: 1.49 mg; FQ: 1.44 mg y LL: 1.48 mg. Las vacunas fueron preparadas en adyuvante oleoso (dilución final 1:2). Cada cobayo recibió 1/9 de la cantidad de péptido pesada. Los sueros fueron obtenidos a los 30 días de la inoculación.

II.6. ELISA

El test de ELISA se llevó a cabo para analizar la antigenicidad de los antisueros provenientes de animales inmunizados tanto con las preparaciones de virus inactivado como con los péptidos 141-160 acoplados a la proteína carrier SAB. Para ello se realizó un test indirecto basado en el protocolo descripto por Murdin y colaboradores, 1987, con algunas modificaciones. (Ver la puesta a punto del ensayo de ELISA en la sección Resultados).

Placas de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc) fueron sensibilizadas por 18 horas a 4°C en cámara húmeda con 0.1µg por pocillo de péptido libre o bien acoplado a la proteína carrier KLH, en buffer carbonato/bicarbonato pH9.6 (15mM carbonato de sodio/35mM bicarbonato de sodio). Las placas se lavaron cuatro veces en buffer fosfato 0.04M, 0.05% Tween 20(buffer de lavado). El bloqueo se realizó durante una hora a 37°C en cámara húmeda, en buffer fosfato 0.04M, 3% gelatina (Bio Rad), 1% Tween, pH7.4. Luego de lavar las placas, se las incubó con diluciones al medio por duplicado de los antisueros en buffer fosfato 0.04M, 1% gelatina, 1% Tween 20 por una hora a 37°C. Luego de lavar las placas nuevamente, se las incubó por una hora a 37°C con una dilución 1/5000 de anticuerpo policional de cabra contra inmunoglobulina G de cobayo conjugado a fosfatasa alcalina (Kirkegaard and Perry Lab.) en buffer fosfato salino (PBS) 1% gelatina. El exceso de conjugado se removió lavando como se hizo anteriormente. La reacción final se realizó agregando el substrato p-nitrofphenyl phosphate disodium (PPD, Sigma), 1 mg/ml por 30 minutos a 37°C y otros 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción fue cortada adicionando NaOH 3N. La densidad óptica a 405 nm fue medida en un lector de ELISA (Molecular Devices).

Los títulos se expresan como el logaritmo de la inversa de la dilución que triplica la densidad óptica obtenida con el suero negativo (suero normal de cobayo) diluído 1/20 (mínima dilución probada para todos los antisueros en todos los casos).

II.7. Seroneutralización

El ensayo de seroneutralización se llevó a cabo en monocapas semiconfluentes (80%) de células BHK crecidas en microplacas de 96 pocillos (Costar). Se utilizó el método suero fijo-virus variable para determinar el índice seroneutralizante (ISN). El stock de virus utilizado para esta prueba proviene de pasar la semilla al 50% en glicerol una vez en células BHK.

Una dilución 1/50 de los antisueros inactivados por 30 minutos a 56°C en medio BME 1% suero bovino, fue mezclada con un volumen igual de diluciones al décimo de la suspensión viral de título conocido en el mismo medio. La mezcla fue incubada por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, 0.2 ml de esta mezcla fueron agregados por duplicado a los pocillos de las microplacas. Paralelamente se realizó la titulación del stock viral. Las placas fueron incubadas por dos a tres días a 37°C en atmósfera al 5% de CO₂ y teñidas con cristal violeta (0.1% en formaldehído al 20%).

Los ISN se determinaron por la fórmula:

ISN = Título virus - Título mezcla suero-virus

II.8. Radioinmunoprecipitación

II.8.1. Obtención y purificación de viriones marcados con ³⁵S Metionina

Para llevar a cabo el ensayo de inmunoprecipitación primeramente se procedió a obtener stocks virales marcados con ³⁵S-Metionina de las distintas variantes antigénicas. Para ello se creció la semilla al 50% en glicerol en monocapas de BHK. El sobrenadante se utilizó para realizar un infección con alta multiplicidad de infección nuevamente en monocapa de BHK. Se incubó el virus a ^{37°}C hasta que fue posible visualizar la aparición de efecto citopático (ECP). En ese momento se descartó el inóculo y la monocapa fue lavada tres veces con 10 ml de BME sin metionina conteniendo mezcla de antibióticos (Gibco). Se agregaron entonces 200μCi de ³⁵S-Metionina (New England Nuclear) y se prosiguió la infección en medio sin metionina hasta obtener ECP evidente en toda la monocapa y desprendimiento de la misma.

Para la purificación de los viriones se siguió el protocolo descripto por Brown y Cartwright, 1963. Los sobrenadantes celulares se clarificaron a 10.000 rpm por 10 minutos. Los viriones se pelletearon de estos sobrenadantes clarificados centrifugando a 40.000 rpm por una hora a 4°C (rotor SW41, Sorvall). El pellet fue resuspendido en 0.5 ml de buffer NET, sembrado sobre un gradiente 15-45% de sacarosa en buffer NET y centrifugado a 40.000 rpm por dos horas a 4°C. La ubicación del pico viral se realizó midiendo la radioactividad de una alícuota de 20 µl de cada fracción en contador de centelleo líquido (Beckman LS 5000TA). El virus así purificado fue alicuotado y congelado a -70°C con la adición de suero normal de cobayo para ayudar en su preservación.

II.8.2. Ensayo de inmunoprecipitación

Se siguió el protocolo descripto por Cartwright y colaboradores, 1982 con algunas modificaciones.

Se realizaron diluciones al medio de los antisueros en buffer NET 0.05% Nonident P40 (NETN) 0.05% suero normal de cobayo. Un volumen de 20 μl de cada dilución fue mezclado con una cantidad constante de virus (medida en cpm) y el volumen llevado a 250 μl con el mismo buffer. La mezcla fue incubada por dos horas a 37°C con agitación. Luego, 50 μl de una suspensión al 10% de S..aureus (The Enzyme Center) previamente lavada en NETN fue agregada y la mezcla incubada por una hora a 4°C. Los pellets fueron lavados tres veces con NETN 0.05% suero normal de cobayo y finalmente disueltos en una solución solubilizadora (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA) y la radioactividad medida en contador de centelleo líquido (Beckman LS 5000TA).

Los títulos se expresan como el logaritmo de la inversa de la dilución que precipita el 50% de las cuentas agregadas al medio de reacción.

II.9. Absorción de anticuerpos neutralizantes

El experimento fue realizado con el fin de eliminar los anticuerpos dirigidos hacia la región 141-160 de VP1 presentes en sueros de cobayo vacunados con virus inactivado y purificado o con péptido 141-160. Con este fin se acoplaron 19 mg de péptido correspondiente a la variante FP a un gel de agarosa (Affigel-10, Pharmacia). El gel fue lavado dos veces con agua destilada. Luego del lavado, se le agregó el

péptido disuelto en un volumen igual a 1:3 del volumen del gel en buffer Hepes 0.1M pH7.0 y se dejó reaccionando a 4°C por 18 hr con rotación continua. Luego de centrifugar por algunos segundos, se descartó el sobrenadante y se agregó etanolamida-HCl 1M pH8.0 (dilución final 1:10) por 1 hr a temperatura ambiente con el fin de bloquear aquellos sitios que no fueron ocupados por péptido. Para la reacción de absorción, se tomaron 0.25 ml del gel~péptido y se mezclaron con 1 ml de suero (dilución 1:50 para el suero anti-péptido FP y 1:100 para el suero anti-virus FP). Se los incubó una noche a 4C°en rotación. Como control, los mismos antisueros se incubaron con gel sin péptido acoplado (pero bloqueado).

III. RESULTADOS

Una de las características más notables del virus de la Fiebre Aftosa es su gran diversidad antigénica, hecho que se ve reflejado en la existencia de siete serotipos (A, O, C, SAT1, SAT2, SAT3, y ASIA1). En adición hay también considerable variación dentro de los serotipos (más de 65 subtipos identificados) como también variantes naturales y aquellas obtenidas en el laboratorio como lo son las mutantes que escapan a la neutralización por anticuerpos monoclonales.

Esta heterogeneidad genética y antigénica presenta grandes problemas en aquellos países en los que la vacunación de los animales susceptibles es el método elegido para el control de la enfermedad. Vacunas preparadas con virus de un serotipo no confieren protección contra la infección con virus pertenecientes a otro serotipo. Más aún, vacunas preparadas con virus de un aislamiento en particular pueden no proteger frente a la infección con virus del mismo serotipo.

Las vacunas utilizadas actualmente son preparadas con virus que ha sido crecido en cultivo de células y es luego químicamente inactivado. El principal inmunógeno presente en los sobrenadantes de cultivos celulares infectados es la partícula viral intacta, la cual posee el sitio inmunodominante en la proteína de la cápside VP1, sobre un bucle expuesto y altamente flexible. Esta región comprende 28 aminoácidos (132-159), y debido a su gran flexibilidad no ha podido ser resuelta por cristalografía de rayos X. Péptidos correspondientes a esta región de todos los siete serotipos son inmunogénicos y pueden otorgar protección en animales experimentales. Es ésta región la que presenta una alta variabilidad y la responseble de la no protección cruzada entre serotupos.

En un trabajo previo (Rowlands et al., 1983), se describe el aislamiento e identificación de tres variantes a partir de una muestra de virus perteneciente al

serotipo A subtipo 12 tomada de epitelio lingual bovino. El genoma de estas variantes fué secuenciado y se encontró que éstas solo diferían entre sí y de un stock derivado del mismo epitelio lingual y utilizado por Kleid y colaboradores (1981) en dos posiciones dentro de la región del bucle GH de VP1, las posiciones 148 y 153. Utilizando estas variantes, se analizaron las bases químicas de la variabilidad antigénica utilizando los viriones y los péptidos correspondientes a la región 141-160 de VP1.

Posteriormente y de forma independiente en el laboratorio de Plum Island, se aislan a partir del stock utilizado por Kleid y col. (1981) dos mutantes que escapan a la neutralización de dos anticuerpos monoclonales: 148Fen 153Ser y 148Fen 153Gln (Baxt et al., 1989) y una tercera variante natural del mismo stock, 148Fen 153Leu (Moore et al., 1989).

En la siguiente sección se detallan los resultados obtenidos en la caracterización antigénica de las seis variantes como parte del estudio que tiene como objetivo tratar de correlacionar las características antigénicas con las estructurales.

III.1. Estandarización de las técnicas de serología

Para el procesamiento de los sueros de cobayos inmunizados tanto con las vacunas a virus inactivado como con las vacunas a péptidos, se debieron estandarizar las pruebas serológicas elegidas para el estudio de las antigenicidad de las variantes.

III.1.1. Ensayo de ELISA

Para la prueba de ELISA (ver Materiales y Métodos) fué necesario determinar las concentraciones óptimas de antígeno para cubrir las placas de ensayo (péptido libre), la dilución adecuada del conjugado anti-cobayo unido a fosfatasa alcalina, y también el tiempo óptimo de sensibilización de las placas.

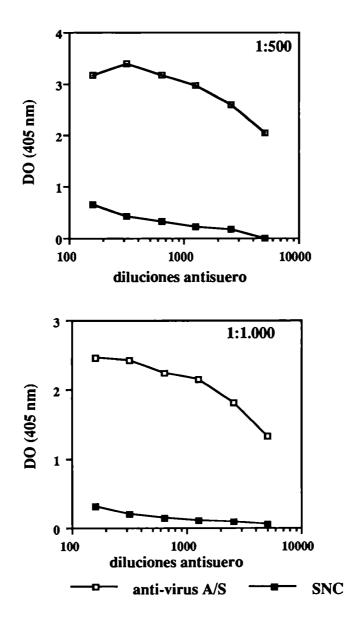
Para determinar la dilución óptima del conjugado, se utilizó 0.1µg/pocillo de virus purificado como antígeno. Antisuero anti-virus, proveniente de cobayos vacunados con virus A12 variante FP inactivado con AEI, fue utilizado como suero positivo. La dilución finalmente elegida fue aquella que presentó una amplia diferencia entre la reacción del suero positivo y la de un suero normal, además de permitir un buena reactividad con el antisuero positivo. Las curvas presentadas en las figuras 6a y 6b muestran los resultados obtenidos para las diluciones 1:500, 1:1.000, 1:5.000 y 1:10.000. La dilución de trabajo elegida fue 1:5.000.

Para determinar la cantidad óptima de péptido para cubrir las placas se utilizó péptido correspondiente a la variante FP sin unir a proteína carrier (péptido libre).

La figura 7 muestra las curvas obtenidas con 0.5; 0.2 y 0.1 µg de péptido/

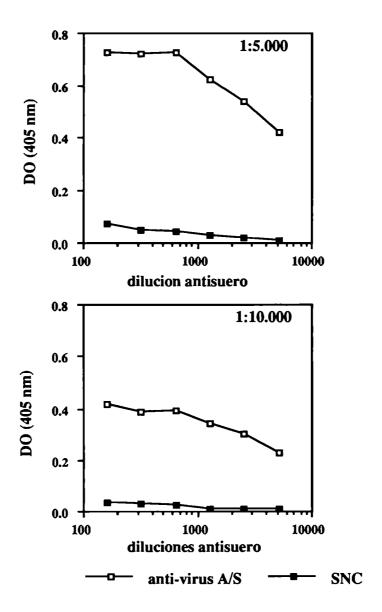
pocillo. De éstas se desprende que 0.1 μg/pocillo es suficiente para detectar la reacción con un antisuero específico, y no difiere mucho de las cantidades mencionadas en la literatura para ensayos de la misma naturaleza. La reactividad hallada luego de 24 6 48 horas de sensibilización de las placas con péptido no mostraron diferencias significativas, y en concecuencia, los ensayos se realizaron con 24 hs como tiempo de incubación.

Figura 6a: Determinación de la dilución de conjugado anti-cobayo para el ensayo de ELISA.



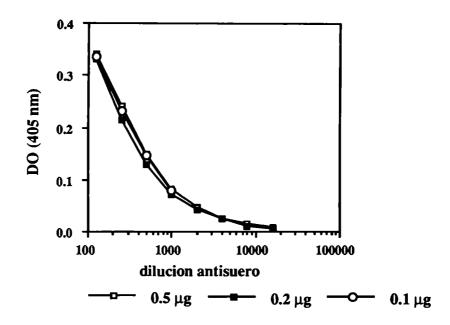
SNC: suero normal de cobayo, A/S: antisuero

Figura 6b : Determinación de la dilución de conjugado anti-cobayo para el ensayo de ELISA.



SNC: suero normal de cobayo, A/S: antisuero

Figura 7: Determinación de la dosis de péptido libre necesaria para sensibilizar las placas de ELISA.



III.1.2. Ensayo de radioinmunoprecipitación (RIP)

El protocolo elegido fue tomado de Cartwright y colaboradores, 1982 con algunas modificaciones. Para calcular los títulos, se graficaron las cpm precipitadas por cada una de las diluciones de antisuero (anti-péptido o anti-virus) versus el logaritmo de la inversa de las diluciones, y se calculó el punto final al 50% respecto de la totalidad de cuentas agregadas a la mezcla de reacción. En las Tablas presentadas en este trabajo los resultados se expresan como porcentaje de cuentas

precipitadas para cada antisuero, tomándose como 100% a la reacción homóloga (por ejemplo, título del suero anti-FP versus virus FP).

III.2. Perfil serológico de las variantes antigénicas del virus A12

Debido a que el análisis serológico de las variantes antigénicas aquí estudiadas se basa en gran parte en larespuesta inmune a los péptidos correspondientes al sitio inmunodominante de VP1, conocido también como el bucle GH, se creyó necesario preceder los resultados con un pequeño experimento introductorio que mostrara que los péptidos contienen los principales epitopes involucrados en la respuesta a las partículas virales intactas. En la presente sección se muestran los resultados obtenidos en dichos experimentos.

III.2.1. Evidencia de que el bucle GH en la proteína VP1 es el principal sitio inmunogénico

Trabajos llevados a cabo hace más de veinte años atrás han provisto evidencias que muestran que las características inmunogénicas de las partículas virales están asociadas con aquellas de la proteína de la cápside VP1. Wild y colaboradores (1969) demostraron la marcada reducción de la inmunogenicidad de algunas cepas del serotipo O luego de que éstas fueran tratadas con la proteasa tripsina. Posteriormente se conoce que el único cambio ocurrido luego del clivaje

con tripsina es el clivaje de la proteína VP1. Más aún, VP1 aislada y purificada era capaz de inducir anticuerpos neutralizantes y de conferir protección contra el desafío viral, mientras que las otras proteínas de la cápside no tenían ningún efecto (Laporte et al., 1973; Bachrach et al., 1975).

En base a estas observaciones, varias estrategias fueron utilizadas para poder identificar los sitios antigénicos en VP1 (Strohmaier et al., 1982; Bittle et al., 1982; Geysen et al., 1984; Xie et al., 1987). Todas ellas muestran claramente que la secuencia de aminoácidos 146-154 es el principal sitio inmunogénico, aunque no el único. De hecho, hay evidencias de la existencia de otros sitios en las proteínas VP2 y VP3 en adición a los encontrados en VP1 (Xie et al., 1987; Thomas et al., 1988; Stave et al., 1988; Mc Cahon et al., 1989).

En la Tabla 3 se describen resultados que demuestran que la región del bucle GH en VP1 es el sitio inmunodominante. Cuando suero policional proveniente de cobayos vacunados con virus de serotipo A12 (variante FP) es incubado con Affigel-10 al cual se ha acoplado péptido correspondiente a la región inmunodominante de la variante FP, el ISN disminuye al menos 1.5 logs. Cuando la reacción se realiza con suero anti-péptido, la reducción es más dramática (de 4.5 a 1.5 logs).

Tabla 3: Absorción de anticuerpos dirigidos contra el sitio inmunodominante de VP1 presentes en sueros anti-péptido y anti-virus

TRATAMIENTO

ANTISUERO (DILUCION)	GEL~PEPT.	GEL	CONTROL
anti-péptido FP (1:100)*	1.5	≥ 4.5	≥ 4.5
anti-virus FP (1:200)	1.0	≥ 2.5	≥ 2.5

Para cada tratamiento se indican los índices seroneutralizantes (ISN) obtenidos según se detalla en Materiales y Métodos. La columna control corresponde a los antisueros sin tratamiento con el gel.

* Este antisuero proviene de los mismos cobayos que se utilizan en este estudio, los cuales recibieron una segunda inoculación antes de sangrarlos a blanco.

Estos resultados destacan una vez más la importancia de la región 141-160 de VP1 en la generación de anticuerpos neutralizantes, el único tipo de anticuerpos responsables de la protección frente el desafío experimental o en el campo. Estos resultados, en conjunto con evidencias descriptas en la literatura, hicieron que fuera apropiado encarar el estudio de la variación antigénica en el VFA a través del estudio del perfil serológico de los péptidos representando la región 141-160 correspondientes a cada una de las variantes naturales derivadas de un aislamiento natural. También fueron utilizados para llevar a cabo el análisis estructural en condiciones que permiten realizar la correlación entre antigenicidad y estructura.

III.2.2. Caracterización antigénica de las variantes con antisueros anti-péptidos correspondientes a la región 141-160 de VP1

III.2.2.1. Inmunización con péptidos acoplados a SAB con glutaraldehído (GA)

El principal y más importante interrogante fué saber en qué medida las diferencias en secuencia entre las diferentes variantes eran reflejadas en su antigenicidad.

En una primera etapa, los péptidos que se utilizaron para inmunizar los cobayos fueron unidos a la proteína carrier SAB con GA como agente acoplante. Los antisueros obtenidos fueron analizados en ensayos de ELISA indirecto, donde se utilizó péptido libre o acoplado a KLH como antígeno en la fase sólida. Esta proteína carrier es diferente a la acoplada a los péptidos utilizados en la vacunación de los cobayos (SAB) para evitar generar anticuerpos que reaccionen con la proteína carrier y que enmascaren la reacción del péptido con sus anticuerpos específicos.

Los resultados son expresados como porcentajes respecto de la reacción homóloga, debido a que de esta manera se minimiza el efecto de cualquier suero que fuera pobre en su reactividad. En las Tablas 4 y 5 es posible observar las reactividades de cada uno de los antisueros frente a los péptidos SL, LP, FP, FL, FS y FQ.

A partir de los datos presentados en la Tabla 4 es posible agrupar a las variantes según su reactividad. Este agrupamiento confirma resultados previos con algunas de estas variantes (SL, LP, FP; Rowlands et al., 1983) y los amplía agregando otras (FL, FS, FQ).

Cuando péptido libre es utilizado como antígeno en ELISA, la separación en dos grupos es clara y nítida. Es posible agrupar las variantes en aquellas que poseen el residuo prolina en la posición 153 (LP y FP), y en aquellas sin prolina 153 (SL, FL, FS y FQ). Con la excepción de la reacción del antisuero FP con el péptido LP, todas las reacciones homólogas son siempre mejores que las heterólogas.

Tabla 4: Test de ELISA para antisueros anti-péptido~SAB

Péptido libre

				1 epuu			
ANTI	SUERO	148 Ser	Leu	Fen	Fen	Fen	Fen
148	153	153 Leu	Pro	Pro	Leu	Ser	Gln
SER	LEU	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LEU	PRO	ND	100	22	ND	ND	ND
FEN	PRO	ND	175	100	ND	ND	ND
FEN	LEU	ND	ND	ND	100	37	77
FEN	SER	ND	ND	ND	68	100	43
FEN	GLN	ND	ND	ND	41	39	100

Los resultados son el promedio de tres determinaciones (anti-FL son sólo dos). Los mismos se expresan como el pocentaje de reactividad tomando como 100% a la del suero con su péptido homólogo. ND: no detectable.

Con el objeto de permitir una mejor y más libre conformación espacial del péptido cuando es presentado sobre la placa de ELISA se repitió el mismo ensayo con péptido acoplado a la proteína carrier KLH. En estos resultados, el péptido LL es incluído como representante de una variante más. Aunque será explicado detalladamente más adelante, fué en este momento en que se hizo evidente que la semilla del virus SL era una mezcla de variantes y que una de ellas era LL. En consecuencia, se decidió incluir el péptido 141-160 de esta nueva variante en los ensayos realizados de aquí en adelante, aunque el virus LL no es incluído en ningúna prueba.

Debido tal vez a una diferente orientación espacial de los epitopes en le péptido pegado a la placa, el patrón de reactividades es diferente al observado en la Tabla 4. Aún así, es posible agrupar a las variantes de acuerdo a la presencia o ausencia del residuo prolina en la posición 153 (Tabla 5), con una superposición representada por la reacción de los sueros anti-FL, FS, FQ y LL con el péptido FP. Esta reactividad, sin embargo, no se da entre el antisuero anti-FP y los péptidos FL, FS, FQ y LL, lo cual hace que no pueda establecerse con certeza una similitud antigénica entre dichas variantes.

Una observación que se repite en ambos sistemas de ensayo (péptido libre y péptido~KLH) es la falta de reactividad del suero anti-SL. Cuando es presentado libre, el péptido SL no es reconocido por nigún antisuero, pero su reactividad se ve en parte restaurada cuando es presentado acoplado a KLH (reacción con anti-FS y anti-LL). Por otro lado el suero anti-LL reacciona, aunque en baja proporción, con todas las variantes. Estos hechos hicieron que no fuera posible incluir a estas dos variantes en ninguno de los dos grupos.

Tabla 5: Test de ELISA para antisueros anti-péptido~SAB

Péptido unido a KLH

ANTIS	UERO	148	Ser	Leu	Fen	Fen	Fen	Fen	Leu
148	153	153	Leu	Pro	Pro	Leu	Ser	Gln	Leu
SER	LEU		ND						
LEU	PRO		ND	100	153	ND	ND	ND	ND
FEN	PRO		ND	44	100	ND	ND	ND	ND
FEN	LEU		ND	ND	96	100	129	236	65
FEN	SER		19	ND	16	45	100	69	18
FEN	GLN		ND	ND	31	36	48	100	ND
LEU	LEU		15	9	6	9	17	15	100

Los resultados son el promedio de tres determinaciones (anti-FL son sólo dos; anti-LL son cuatro). Los mismos se expresan como el pocentaje de reactividad tomando como 100% a la del suero con su péptido homólogo. ND: no detectable.

Los mismos antisueros fueron analizados en ensayos de seroneutralización para estudiar la influencia que estas sustituciones en VP1 pudieran tener en los epitopes neutralizantes. Como se observa en la Tabla 6, el agrupamiento de las variantes no es tan definido como lo es en el ensayo de ELISA. Esto puede deberse a que existen epitopes neutralizantes que involucran residuos comunes a todas las variantes, dando como resultado una mayor reactividad cruzada entre las mismas.

Se observan reacciones heterólogas que son mejores que las correspondientes homólogas (por ejemplo, anti- péptido FL versus virus FS).

Tabla 6: Seroneutralización de las variantes con sueros anti-péptidos~SAB.

				Virus			
ANTISUERO		148 Ser	Leu	Fen	Fen	Fen	Fen
148 153		153 Leu	Pro	Pro	Leu	Ser	Gln
SER	LEU	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LEU	PRO	ND	100_	100	ND	ND	ND
FEN	PRO	<1	1	100	1	1	1
FEN	LEU	3	ND	100	100	320	32
FEN	SER	3	3	10	100	100	32
FEN	GLN	ND	3	320	100	320	100

Los porcentajes se calculan a partir de los índices seroneutralizantes expresados como DICT50%, tomando como 100% a la reacción homóloga.

ND: no detectable.

Una observación interesante es el hecho de que antisuero contra el péptido SL no neutraliza virus proveniente de pasar la semilla SL en glicerol una vez en células BHK. Más aún, también se observó que antisuero producido en respuesta a la vacunación con virus SL inactivado, neutraliza muy pobremente virus obtenido de pasar la misma semilla. Estos hechos hicieron que fuera necesario analizar esta semilla en detalle para poder determinar sus características antigénicas. Para este propósito se dedica la sección III.4 de este trabajo de tesis, en el que se detallan los procedimientos seguidos para caracterizar la semilla de la variante SL. Es debido a

esta incertidumbre en cuanto a la homogeneidad de la semilla SL que ésta no es incluída en los ensayos de seroneutralización o radioinmunoprecipitación.

El problema de la no reactividad del antisuero anti-péptido SL por un lado, y la del péptido SL por el otro, debía ser resuelto. Revisando la bibliografía con más detalle, se descubrió que la utilización de GA como agente acoplante podía explicar este problema. GA reacciona primariamente con los aminoácidos lisina y cisteína y con el grupo NH2 terminal de proteínas o péptidos (Habeeb and Hiramoto, 1968). Esto implica que los péptidos pueden unirse a la proteína carrier tanto por el extremo C-terminal (a través del residuo cisteína) como por el Nterminal. Dyrberg and Oldstone (1986) mostraron que antisueros contra un péptido de la cadena alfa perteneciente al receptor humano de acetilcolina, conjugado a través de los extremos N- o C-terminales, no reaccionaban de forma cruzada. Fué entonces necesario elegir otro agente acoplante, uno que fuera más selectivo y que por lo tanto diera una reacción de acople más fácil de controlar o predecir. Para ello, y aprovechando el hecho de que todos los péptidos habían sido sintetizados con una cisteína agregada en el extremo C-terminal, se eligió el grupo heterobifuncionalsulfo-SMCC[Sulfo-succinimidil4-(Nmaleimidometil)ciclohexano-1carboxilato] (Pierce, IL). Este grupo posee la propiedad de reaccionar covalentemente con haptenos que contengan grupos sulfhidrilos libres. En el caso particular de estos péptidos, este grupo es aportado únicamente por el residuo cisteína agregado al extremo C-terminal.

Con los detalles incluídos en la sección Materiales y Métodos, se preparó una nueva serie de vacunas a péptidos acoplados a SAB a través del grupo SMCC, y los antisueros obtenidos al mes de la primera inoculación fueron analizados por ELISA, RIP y seroneutralización.

III.2.2.2. Inmunización con péptidos acoplados a SAB a través del extremo C-terminal

Los resultados obtenidos con las vacunas a péptidos muestran claramente las características antigénicas de las variantes y permiten agruparlos de acuerdo a su reactividad en ELISA y seroneutralizaciones.

Con el objeto de obtener un producto final hapteno-carrier que fuera mejor inmunógeno, los siete péptidos fueron acoplados a través del residuo cisteína adicionado en el extremo C-terminal a SAB previamente unida al grupo sulfo-SMCC.

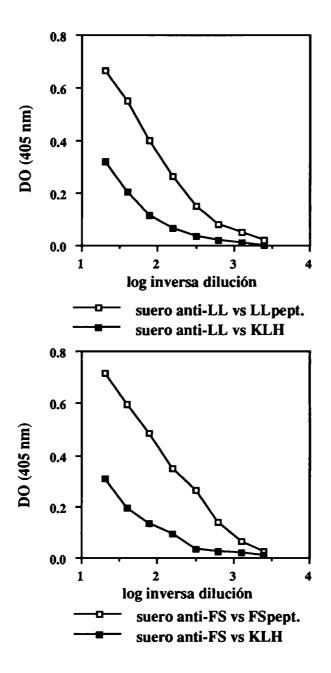
Para los ensayos de ELISA, los péptidos utilizados para sensibilizar las placas fueron aquellos sin conjugar a proteína carrier (péptidos libres). Esto fue necesario ya que ambas proteínas carriers son acopladas a los péptidos con el mismo agente acoplante y se esperaba obtener anticuerpos que reaccionaran con SMCC y que por lo tanto interfiriesen en la determinación de los anticuerpos específicos anti-péptidos.

La generación de anticuerpos que reaccionan con el grupo de acople está bien documentedo en la bibliografía. Briand y colaboradores (1985) lo demuestran claramente utilizando una serie de péptidos sintéticos correspondientes a histonas de eritrocitos de pollo, los que acoplan a diferentes proteínas carriers, a través de diferentes grupos de acople. Los datos indican que en los antisueros anti-péptidos no sólo hay anticuerpos que reaccionan fuertemente con la misma proteína carrier tratada con el agente acoplante en ausencia de péptido, sino también con otras no relacionadas que han sido tratadas con el mismo agente acoplante.

Fué interesante entonces, verificar este hecho con los antisueros anti-péptidos acoplados a SAB a través de SMCC. Para ello, se comparó la reactividad en ELISA

de un determinado antisuero anti-péptido en placas sensibilizadas con KLH activada con SMCC o con péptido libre. De las gráficas representadas en la Figura 8, tomando sólo dos antisueros como ejemplo, es clara la presencia de anticuerpos que reaccionan específicamente con el grupo SMCC, ya que la presencia de anticuerpos que reaccionen con KLH es virtualmente imposible.

Figura 8: Reactividad de dos antisueros anti-péptidos con sus péptidos homólogos y con KLH activada con el agente acoplante SMCC.



Utilizando entonces péptido libre para sensibilizar las placas de ELISA, en la Tabla 7 puede verse la reactividad de cada antisuero con las diferentes variantes.

Tabla 7: Esayo de ELISA con antisuero anti-péptido~SAB unido a través del grupo SMCC.

Péptido libre

ANTIS	SUERO	148	Ser	Leu	Fen	Fen	Fen	Fen	Leu
148	153	153	Leu	Pro	Pro	Leu	Ser	Gln	Leu
SER	LEU		100	55	6	81	105	178	2
LEU	PRO		14	100	8	10	12	17	11
FEN	PRO	_	25	126	100	15	17	34	13
FEN	LEU		141	25	11	100	74	166	95
FEN	SER		95	7	13	38	100	155	33
FEN	GLN		89	3	9	32	39	100	19
LEU	LEU		363	10	21	126	72	95	100

Los resulados se expresan como el pocentaje de reactividad tomando como 100% a la del suero con su péptido homólogo. ND: no detectable.

Aunque los resultados no son tan claros y definidos como los obtenidos previamente (Tablas 4 y 5), las variantes aún pueden ser divididas en dos grupos, distinguibles por la presencia o ausencia del residuo prolina en la posición 153. Los péptidos LP y FP, aunque diferentes uno del otro, forman un grupo serológicamente diferente de aquel que incluye a SL, FL, FQ y LL. La reactividad cruzada entre el antisuero anti-SL con los péptidos FL, FS y FQ es >80% respecto de la homóloga (en ambos sentidos), y la media es ~1.6 veces mayor que la reacción cruzada análoga entre el suero anti-LL y los mismos péptidos. Este resultado sugiere que el

péptido SL es muy similar a los péptidos FL, FS y FQ, mientras que el péptido LL no lo es tanto.

Con el propósito de determinar si estas diferencias en reactividad halladas en ELISA también reflejaban la configuración de la misma secuencia en la partícula viral, se realizaron radioinmunoprecipitaciones de las diferentes variantes marcadas con ³⁵S-metionina con los antisueros anti-péptido (Tabla 8). En este análisis no se incluyó la variante SL, por las razones ya explicadas (ver III.2.2.1.).

Tabla 8: Radioinmunoprecipitación de las variantes marcadas con ³⁵S-metionina con antisueros anti-péptido~SAB unido a través del grupo SMCC.

Virus marcado (35S)

ANTIS	UERO	148	Leu	Fen	Fen	Fen	Fen	
148	153	153	Pro	Pro	Leu	Ser	Gln	
LEU	PRO		100	50	2	2	2	
FEN	PRO		11	100	7	5	6	
FEN	LEU		8	3	100	45	63	
FEN	SER		4	≤1	32	100	155	
FEN	GLN		3	≤1	89	35	100	

Los resulados se expresan como el pocentaje de reactividad tomando como 100% a la del suero con su péptido homólogo. ND: no detectable.

Una vez más, las variantes FL, FS y FQ comprenden un grupo antigénicamente similar, siendo cada reacción heteróloga ≥32% de la homóloga.

En concordancia con el ensayo de ELISA, FP y LP parecen ser serológicamente diferentes a FL, FS y FQ, como lo son uno del otro. Aún así, el valor promedio para la reacción heteróloga entre FP y LP (~30%) es significantemente mayor que aquel para la reacción entre FP con FL, FS y FQ (~5%) o entre LP con FL, FS y FQ (~4%).

Para tener una idea más completa de la reactividad de los sueros anti-péptidos con las partículas virales, se llevaron a cabo ensayos de seroneutralización en

microplacas de células BHK. En la Tabla 9 se observan los resultados obtenidos. Es posible una vez más la separación de las variantes en dos grupos antigénicamente diferentes. La reactividad de las variantes FL, FS y FQ no es tan destacada como en los ensayos de ELISA o RIP, pero son claramente distinguibles de los miembros del otro grupo, LP y FP.

Tabla 9: Seroneutralización de las variantes con antisueros antipéptido~SAB unido a través del grupo SMCC.

	_	Virus						
ANTE	SUERO	148	Leu	Fen	Fen	Fen	Fen	
148	153	153	Pro	Pro	Leu	Ser	Gln	
LEU	PRO		100	10	≤1	≤1	≤1	
FEN	PRO		32	100	3	3	_ ≤1	
FEN	LEU		≤1	3	100	10	10	
FEN	SER_		≤1	10	32	100	32	
FEN	GLN		≤1	1	10	10	100	

A partir de los títulos en DICT50%, se calcularon los porcentajes de reactividad para cada antisuero, tomando como 100% a la reacción homóloga.

La caracterización serológica de las variantes realizada con antisueros antipéptidos hace posible agrupar dichas variantes de acuerdo a sus reactividades. Pero para tener una imagen más completa de la interrelación entre las variantes era necesario completar el análisis con la inclusión de antisueros obtenidos de animales vacunados con partículas virales intactas. Para ello se vacunaron cobayos con virus correspondientes a cada una de las variantes que fueron purificados en gradientes de sacarosa y posteriormente inactivados . La siguiente sección detalla los resultados obtenidos en la caracterización de las variantes con antisueros anti-virus.

III.2.3. Caracterización antigénica con antisueros anti-virus inactivado

Para completar el estudio de las propiedades antigénicas de las variantes, era necesario también el análisis de antisueros dirigidos contra viriones intactos.

Grupos de tres cobayos cada uno fueron inoculados con vacunas elaboradas con cada una de las seis variantes purificadas e inactivadas con AEI. Los sueros obtenidos luego de un mes de la primera inoculación fueron reunidos en un pool y analizados en ELISA indirecto utilizando péptido unido a KLH como antígeno de la fase sólida (Tabla 10).

Tabla 10: ELISA indirecto de los antisueros provenientes de animales vacunados con virus inactivado correspondiente a cada una de las seis variantes.

Péptido unido a KLH

	ANTISUERO		148 Leu	Fen	Fen	Fen	Fen	Leu
148	148_	153	153 Pro	Pro	Leu	Ser	Gln	Leu
	LEU	PRO	100	4	ND	ND	ND	ND
	FEN	PRO	89	100	ND	ND	ND	ND
	FEN	LEU	ND	135	100	42	34	ND
	FEN	SER	ND	168	85	100	52	ND
	FEN	GLN	ND	98	81	35	100	ND

Los resultados se expesan como porcentaje de reactividad respecto de la reacción homóloga para cada antisuero.

ND: No detectable.

Los resultados muestran que las variantes son distinguibles antigénicamente en base a la reactividad de los péptidos correspondientes a la región inmunodominante y los antisueros anti-virus. Se observa una superposición de los dos grupos representada por la reactividad de los antisueros anti-FL, FS y FQ con el péptido FP. La misma observación fué posible cuando se analizaron también por ELISA, antisueros anti-péptidos unidos a SAB através de GA con péptidos unidos a KLH (Tabla 5). Esto podría indicar que cuando el péptido está acoplado a la

proteína carrier puede adoptar una configuración que se asemeja a aquella adoptada por la misma secuencia cuando ésta forma parte de la partícula viral intacta.

Estos mismos antisueros fueron analizados por RIP y seroneutralización (Tablas 11 y 12). Debido al hecho de que las variantes comparten la mayoría de los epitopes que se encuentran en VP1 y la totalidad de los que se encuentran en el resto de la cápside, no fue posible diferenciarlas en base a su inmunoprecipitación con antisuero anti-virus. En la Tabla 11 se muestran los resultados con la variante FP como ejemplo.

Tabla 11: RIP de la variante ³⁵S-FenPro con antisueros provenientes de animales vacunados con virus inactivado correspondiente a cada una de las cinco variantes.

		Virus (³⁵ S)						
ANTISUERO		148	Fen					
148	153	153	Pro					
LEU	PRO	3.6						
FEN	PRO	3.8						
FEN	LEU	3.7						
FEN	SER	4	4 .1					
FEN	GLN	3	3.6					

Los resultados están expresados como el logaritmo de la inversa de la dilución correspondiente al 50% punto final. Los sueros corresponden a los 45 d.p.v.

Con respecto a las seroneutralizaciones (Tabla 12), aunque se esperaba cierta especificidad, (Rowlands et al., 1983), nuestros resultados no repiten el patrón de reactividad visto con el test de ELISA, y no es posible por lo tanto agrupar las variantes de acuerdo a su reactividad.

Tabla 12: Seroneutralización de las cinco variantes con antisueros provenientes de animales vacunados con virus inactivado.

		Virus					
ANTISUERO		148 Leu	Fen	Fen	Fen	Fen	
148	153	153 Pro	Pro	Leu	Ser	Gln	
LEU	PRO	2.0	2.5	2.5	2.5	2.0	
FEN	PRO	2.5	3.0	2.5	2.5	3.5	
FEN	LEU	2.0	2.0	2.0	2.5	3.5	
FEN	SER	2.5	2.5	3.0	3.0	4.5	
FEN	GLN	1.5	1.5	3.0	3.0	3.0	

Los resultados están expresados como índices seroneutralizantes: ISN = Título virus - Título mezcla suero-virus. Los títulos se calculan como DICT50%.

III.4. Estudio de las características antigénicas de la semilla de la variante SL

Antes de entrar en los detalles del estudio de la semilla de la variante SL, es necesario refrescar los conceptos relacionados con los orígenes y la historia de este virus, descriptos en parte en la sección Materiales y Métodos (II.2.).

Los orígenes de este virus se remontan al año 1982, cuando en el laboratorio del Instituto de Investigación de Enfermedades Animales, en Pirbright, Rowland y colaboradores analizaban las bases químicas de la variación antigénica del VFA (Rowland et al., 1983). Para ello utilizaron virus del serotipo A subtipo 12 proveniente de pasar material infeccioso (epitelio lingüal bovino) de un aislamiento de un brote ocurrido en Inglaterra en 1932, una sola vez en células BHK. A su vez, material proveniente de este mismo aislamiento fue utilizado en Plum Island para obtener la secuencia del ARN por métodos moleculares de clonado luego de pasarlo varias veces en diferentes cultivos de tejido (Kleid et al., 1981; referido aquí como variante FP).

Con sorpresa, Rowland y colaboradores vieron que anticuerpos inducidos por un péptido que comprendía los residuos 141-160 de VP1 y cuya secuencia correspondía a aquella deducida por Kleid, no neutralizaban su stock de virus A12 que, como se dijo, provenía del mismo aislamiento. En contraste, el virus utilizado para los estudios de secuencia, sí era neutralizado eficientemente por este suero anti-péptido (Rowland et al., 1983).

Fué entonces cuando se realizó la secuenciación del virus producido en Pirbright y se encontraron ambigüedades en las posiciones 148 y 153 de la proteína de la cápside viral, VP1. Esto era una indicación de la presencia de más de un virus en este stock. La secuenciación de virus crecidos a partir de diez placas aisladas en

células BHK confirmó esta sospecha. De los diez virus, tres variantes fueron identificadas, las cuales diferían entre sí y del virus secuenciado por Kleid en las posiciones 148 y 153 de VP1: Ser148 Leu153; Leu148 Pro153 y Ser148 Ser153 (además, todos los clones tenían Val171 comparado con Glu en esta posición en el virus de Kleid). Las secuencias del resto de las proteínas de la cápside eran idénticas.

Para la realización de este trabajo de tesis, las variantes SL, LP y FP (esta última variante es la utilizada por Kleid en los trabajos de secuenciación) fueron pasados una vez en células IBRS-2, y el virus cosechado se mezcló con glicerol para hacer suspenciones al 50%. Estas son las preparaciones referidas aquí como semillas para el estudio serológico desarrollado anteriormente, junto con el resto de las otras variantes.

Fué durante la producción de virus para inmunizar cobayos con el fin de obtener sueros anti-virus que se identificó un nuevo problema. La semilla SL fué pasada una vez en una botella roller conteniendo aproximadamente 10^8 células BHK a una m.o.i. de 0.01 con el propósito de producir la vacuna experimental. El antisuero producido en los cobayos en respuesta a esta vacuna neutralizó muy pobremente virus que habían sido crecido a partir de la misma semilla en células BHK a una m.o.i de 1.0. Más aún, anticuerpos contra el péptido 141-160 que contenía Ser148 Leu153 no neutralizaban la progenie de esta semilla (Tabla 6).

Estas observaciones llevaron a examinar la secuencia del virus utilizado en la preparación de la vacuna, la cual indicó que el aminoácido en la posición 148 y también aquel en la posición 153 era Leu (la secuenciación fué realizada por el Dr. P.W. Mason, cuya colaboración en esta etepa del proyecto es enormemente apreciada).

Con esto datos que señalaban casi inequívocamente que la semilla SL era una mezcla de al menos dos virus (SL y LL), se diseñaron una serie de experimentos

con el propósito de caracterizarla antigénicamente. Estos experimentos se resumen en:

- 1- Pasaje de la semilla a diferentes m.o.i.
- 2- Pasaje de la semilla en presencia de suero policional anti-péptido SL y LL
- 3- Estudio de las progenies obtenidas en los puntos 1 y 2 a través de ensayos de neutralización y secuenciación del ARN de la región que codifica VP1 (ésta última técnica fué realizada por el Dr Stuart Hassard, miembro del grupo de trabajo bajo la dirección del Dr. F. Brown).

III.4.1. Pasajes sucesivos del virus semilla a diferentes m.o.i. en ausencia de suero

En un primer experimento, la semilla almacenada en glicerol fue pasada tres veces sucesivas a una m.o.i de aproximadamente 0.01. En un segundo experimento, la m.o.i fue de 0.5 a 1.0 en cinco pasajes sucesivos. Alícuotas de cada pasaje fueron reservadas para realizar ensayos de seroneutralización y para la extracción del ARN y posterior secuenciación.

En la Tabla 13 se observan los resultados obtenidos al pasar la semilla bajo las dos diferentes condiciones de crecimiento.

Tabla 13: Caracterización serológica y secuenciación de la progenie obtenida de propagar el virus semilla SL bajo diferentes m.o.i.

VIRUS	HISTORIA	SEROLO	GIAa	SECU	ENCIAb
j		SL	LL	148	153
SEMILLA	Virus clonado por				
	plaqueo y propagado una				
	vez en células IBRS-2	2.5	ND	Ser	Leu
Alta m.o.i					
1X	Primer pasaje del virus				
	semilla, m.o.i 0.5-1.0	NE	NE	Ser	Leu
2X	Segundo pasaje del virus				
	semilla, m.o.i 0.5-1.0	2.0	ND	Ser	Leu
3X	Tercer pasaje del virus				
	semilla, m.o.i 0.5-1.0	1.5	2.0	Leu	Leu
Baja m.o.i			į		
1X a 5X	Cinco pasajes sucesivos				
	del virus semilla.				
	m.o.i 0.01	NE	NE	Leu	Leu*

^a Esta columna corresponde a los índices neutralizantes de los virus recobrados luego de cada uno de los pasajes, cuando son titulados con los sueros anti-péptido SL y LL.

b Aminoácidos codificados en las posiciones 148 y 153 de VP1 en los ARN correspondientes a cada uno de los virus aislados.

* Secuencia encontada en cada uno de los cinco pasajes.

NE: No estimado ND: No detectable

La secuencia obtenida para la semilla concuerda con la determinada originalmente, o sea Ser148 Leu153. Cuando se la analiza en ensayos de seroneutralización, la semilla es neutralizada por el antisuero anti-péptido SL, pero no por el anti-péptido LL.

Cuando se analiza la progenie del virus luego de haber sido pasado a una m.o.i de 0.5-1.0, se ve que es neutralizada mejor por el antisuero anti-péptido SL luego del segundo pasaje. Si se lo propaga una vez más, bajo las mismas condiciones, se obtiene una población que es neutralizada mejor por el suero anti-péptido LL y cuyo ARN codifica para Leu en las posiciones 148 y 153. Esta población es también neutralizada por el suero anti-péptido SL, de hecho la diferencia entre ambos índices neutralizantes cae dentro del error del método. Aún así, la secuenciación de esta progenie es clara y no deja lugar a dudas respecto de lo aminoácidos codificados para las posiciones 148 y 153. Esta ambigüedad puede deberse al hecho de que exista algo de reactividad cruzada entre estas dos variantes, que la semilla posea una tercer variante que cruza con SL y LL, o bien al hecho de que la progenie obtenida luego de tres pasajes sucesivos sea de hecho heterogénea, pero aquella variante presente en menor proporción (SL) no es detectada por las técnicas de secuenciación utilizadas (Ver Discusión).

Si la propagación de la semilla se realiza a una m.o.i mucho menor (~0.01), la progenie obtenida en cada uno de los cinco pasajes posee Leu en las posiciones 148 y 153. Es importante recordar lo que se mencionó anteriormente en la sección II.4., cuando se describió el hecho de que el virus crecido a una baja m.o.i a partir de esta misma semilla para preparar una vacuna experimental poseía esta misma secuencia.

Estos resultados parecen indicar que el virus semilla, el cual proviene de pasar una sola vez virus clonado por plaqueo en células IBRS-2, es de hecho una

población heterogénea, en la cual la variante Leu148 Leu153 se hace predominante bajo ciertas condiciones de crecimiento.

III.4.2. Crecimiento bajo la presión selectiva de suero policional anti-péptido

Para obtener progenie del virus semilla en presencia de antisuero anti-péptido, se realizaron ensayos de seroneutralización de la misma siguiendo el protocolo detallado en Materiales y Métodos. A las 48 horas, y a través de la inspección de las microplacas bajo el microscopio óptico, se determinó el punto final de la titulación (última dilución de virus que no es neutralizada por la dilución utilizada de antisuero). El virus progenie se toma del sobrenadante de los pocillos correspondientes a esta dilución. Para su posterior análisis por seroneutralización y secuenciación, esta progenie es pasada una vez en células BHK.

Cuando el virus progenie es el obtenido de la titulación de la semilla en presencia de suero anti-péptido SL (virus 1a), éste es neutralizado más eficientemente por el suero anti-péptido LL. Concordante con estos resultados, la secuencia del ARN muestra que las posiciones 148 y 153 están ocupadas por el aminoácido Leu (Tabla 13).

Si el antisuero utilizado en la titulación es anti-péptido LL, el ARN de la progenie (virus 1b) tiene la secuencia Ser148 Leu153, indicando que la variante LL presente en la semilla fué neutralizada por el antisuero, sin afectar a la variante SL.

Cuando el virus semilla es incubado con una mezcla de los antisueros anti-Sl y anti-LL antes de ser pasado, la sequencia del virus que se recupera en la dilución del punto final es predominantemente Ser148 Leu153, resultado que reafirma que

Resultados 79

este virus es la especie predominante en la mezcla; el virus LL, por su parte, habrá sido neutralizado completamente por su antisuero homólogo.

Tabla 14: Caracterización serológica y secuenciación de la progenie obtenida al propagar el virus semilla SL en presencia de suero policional anti-péptido.

VIRUS	HISTORIA	SEROLOG	JIAa	SECUENCIA ^b	
		SL	LL	148	153
1a	Virus cosechado en la				
	dilución del punto final				
	de la titulación de la				
	semilla con suero				
	anti-péptido SL y luego				
i	pasado una vez en células				
	внк.	≤0.5	2.5	Leu	Leu
1b	Virus cosechado en la				
	dilución del punto final				
	de la titulación de la				
	semilla con suero				
	anti-péptido LL y luego				
	pasado una vez en células				
1	внк.	NE	NE	Ser	Leu
1c	Virus cosechado en la				
	dilución del punto final				
	de la titulación de la				
	semilla con la mezcla de				
1	sueros anti-péptido SL y				
	LL.	≥2.5	1.5	Ser	Leu

^a Esta columna corresponde a los índices neutralizantes de los virus recobrados luego de cada uno de los pasajes, cuando son titulados con los sueros anti-péptido SL y LL.

^b Aminoácidos codificados en las posiciones 148 y 153 de VP1 en los ARN correspondientes a cada uno de los virus aislados. NE:No estimado.

IV. DISCUSION

La variabilidad antigénica del VFA es un ejemplo más de la gran diversidad que muestran los virus ARN. La bibliografía es abundante en casos que demuestran este hecho, con los primeros reportes aparecidos en 1922 (Valleé y Carré, 1922), cuando se describe por primera vez la existencia de distintos serotipos. Posteriormente, en 1927, Bedson y colaboradores (Bedson et al., 1927) demuestran que dos cepas pertenecientes al serotipo A podían ser diferenciadas por ensayos de neutralización cruzada. Menos de veinte años más tarde, la importancia que estas diferencias serológicas podían tener en el campo se haría clara durante un brote importante ocurrido en Méjico durante 1946-1954, en el cual cepas de campo que pertenecían al serotipo A rompieron la inmunidad inducida por una vacuna hecha con otra cepa del mismo serotipo (Galloway et al., 1948). Debido a la importancia económica que tiene la FA para muchos países donde es endémica, esta gran diversidad constituye el principal problema para su erradicación, y aún también para su control y diagnosis.

El principal problema encontrado en el control de la enfermedad a través de la vacunación es la ocurrencia de siete serotipos. Debido al hecho de que no existe protección cruzada entre los mismos, las vacunas son en general polivalentes, pero la existencia de variabilidad dentro de un mismo serotipo puede volver inefectivas las vacunas disponibles. En adición, la existencia de subtipos dentro de un serotipo también puede causar problemas si la antigenicidad de las variantes es suficientemente diferente. Como consecuencia, debe tenerse mucho cuidado en la selección de las cepas vacunales que serán apropiadas para contener un determinado brote. Aún más, también es necesario seleccionar virus que crezcan con altos rendimientos en cultivos de células, de forma de obtener suficiente masa

antigénica. Para lograr ésto último, generalmente se necesita pasar varias veces el virus aislado en el campo en el sistema de cultivo de células elegido para la producción de las vacunas. Esta adaptación tiene sus inconvenientes y esconde serios peligros, ya que es aparente que los aislamientos de campo no son entidades únicas, sino que pueden contener varios virus, los cuales difieren entre sí antigénicamente, siendo la adaptación a condiciones de crecimiento en gran escala un mecanismo de selección de una/s variante/s sobre otras.

Este trabajo de tesis describe el caso particular de un virus del serotipo A, subtipo 12 aislado de un brote ocurrido en Inglaterra en 1932. A partir de este virus, y por diferentes procedimientos, se han identificado hasta la fecha nueve variantes. Una característica interesante es que estas variantes difieren entre sí solamente en los residuos en las posiciones 148 y 153 de la proteína de la cápside viral VP1, siendo el resto de las proteínas de la cápside idénticas en secuencia.

El estudio serológico se ha concentrado en siete de las variantes: SL, LP, FP, FL, FS, FQ y LL, siendo el principal objetivo el poder establecer una correlación entre las características antigénicas que poseen dichas variantes y las propiedades estructurales del principal sitio inmunogénico (aminoácidos 141-160 de VP1), bajo condiciones que permiten definir su estructura.

El análisis serológico se llevó a cabo entonces utilizando para ello los antisueros contra el péptido 141-160 de VP1 representando la secuencia de cada una de las variantes, y también los antisueros contra los viriones intactos.

Si bien no es la única que genera anticuerpos neutralizantes, la región 141160 sí es inmunodominante y por lo tanto representativa de las características antigénicas de la partícula viral intacta. Además, como se mencionó anteriormente, estas variantes difieren entre sí solamente en la secuencia en las posiciones 148 y 153 de VP1, por lo tanto ésta sería la única región responsable de las características serológicas de las variantes. Esto hace que los sueros anti-péptidos y los péptidos

correspondientes a la región 141-160 sean herramientas válidas para el estudio de la variación antigénica. Por otro lado, los péptidos permitieron a su vez el estudio de las bases estructurales de las diferencias halladas a nivel serológico a través del análisis por dicroísmo circular (DC) y modelado molecular (MM). Este aspecto del estudio de la variación antigénica del virus A12 fue desarrollado por la Dra. Lee France, integrante del grupo de trabajo bajo la dirección del Dr. F. Brown.

En ELISA, ambos sistemas de ensayo descriptos (uso de péptido libre o acoplado a KLH como antígeno de la fase sólida) permiten distinguir entre aquellas variantes con el residuo prolina en la posición 153 (LP y FP) de aquellas sin prolina 153 (SL, FL, FS, FQ y LL). Aunque al separación en dos grupos en base a la presencia o ausencia de prolina 153 es clara, es importante señalar que las variantes LP y FP aunque más similares entre sí que con el resto de las variantes, pueden ser distinguibles serológicamente. Si bien la media de la reacción cruzada que involucra a estas dos variantes es alta (98% Tablas 4 y 5), la reacción ocurre en un solo sentido (anti-péptido FP vs péptido LP, en Tabla 4; o anti-péptido LP vs péptido FP, en Tabla 5).

De la observación de los datos presentados en las Tablas 4 y 7 se desprende que la forma en que el péptido es presentado en la formulación de las vacunas puede influir enormemente en las características de la respuesta inmune. Cuando los péptidos son acoplados a SAB con GA, la reacción puede ocurrir en varios puntos de la proteína carrier (extremo N-terminal, lisinas, cisteínas) y en dos puntos sobre el péptido (extremo N-terminal y cisteína del extremo C-terminal). Esto hace que el producto final hapteno-carrier no tenga una composición uniforme o predecible.

Aunque los resultados presentados en la Tabla 4 están por un lado de acuerdo con datos previos y por el otro apoyados por el análisis estructural, presentan el problema de la no reactividad del antisuero anti-SL, lo cual puede ser una

indicación de una orientación desfavorable para este péptido cuando es acoplado a SAB a través de GA.

Debido a que estos péptidos pueden unirse a SAB por cualquiera de sus extremos, la orientación adquirida cuando lo hacen a través del N-terminal puede ser no inmunogénica. Dyrberg y Oldstone (1986) describen su experiencia con un péptido correspondiente a la cadena alfa del receptor humano de acetilcolina unido a KLH a través de su extremo C o N-terminal (C-péptido o N-péptido). Lo interesante de la observación es el hecho de que los antisueros sólo reaccionan con el péptido homólogo, es decir suero anti-C-péptido no reconoce al N-péptido o al péptido libre en ELISA. Si en el caso del péptido SL, éste se une a SAB por el extremo N-terminal, es entonces posible que el anticuerpo correspondiente no reaccione en ELISA con péptido libre (Tabla 4) o con péptido acoplado a KLH por el extremo C-terminal (Tabla 5).

Aunque pareciera que éste es un problema particular del péptido SL, se decidió acoplar los péptidos a la proteína carrier utilizando un método más facilmente controlable. Fué así que se eligió SAB a la cual se le unió el grupo funcional SMCC, el cual a su vez reacciona solamente con el grupo SH- presente únicamente en la cisteína del extremo C-terminal de estos péptidos. Con estos conjugados se inmunizaron nuevos animales y los antisueros se analizaron por ELISA, RIP y SN.

Los resultados se presentan en las Tablas 7, 8 y 9. El agrupamiento de las variantes es establecido nuevamente por el residuo en la posición 153, aunque se observa una leve reactividad de los antisueros anti-LP y FP con los péptidos del otro grupo (media 13% para anti-LP y 21% para anti-FP) y la reactividad entre estas variantes es menor (67%) que la observada anteriormente (Tabla 7). De hecho la reacción entre el suero anti-LP con el péptido FP no es significativamente más alta a las observadas para este mismo antisuero con los péptidos del otro grupo,

apoyando el hecho de que LP y FP aunque diferentes de las otras variantes, también lo son entre sí. En los ensayos de RIP de estos mismos antisueros (Tabla 8) la media de la reacción heteróloga entre LP y FP es de un 30%, más alta que aquella entre anti-FP (5%) o anti-LP (4%) con los péptidos del otro grupo.

La presencia del residuo fenilalanina en la posición 148 parece influenciar la antigenicidad de las variantes cuando Pro no está presente en la posición 153. La reactividad cruzada entre FL, FS y FQ es notable y la variante SL parece estar más cerca de este grupo de lo que lo está LL si se toma en cuenta el hecho de que el promedio de las reacciones heterólogas que involucran a SL con FL, FS y FQ es aproximadamente 1.6 veces mayor que las que involucran LL con el mismo grupo (Tabla 7).

Cuando el análisis serológico se realizó utilizando antisueros provenientes de animales vacunados con virus inactivado (Tablas 10 y 11) la caracterización de las variantes fué posible únicamente a través de los ensayos de ELISA. Los resultados obtenidos con RIP eran los esperados de acuerdo a lo publicado por Rowlands y colaboradores (1983). Es difícil de explicar la imposibilidad de caracterizar las variantes en los ensayos de seroneutralización, ya que los antisueros sí son capaces de diferenciar a las variantes en ELISA. La existencia de epitopes comunes a todas las variantes puede ser el origen de una elevada reactividad cruzada que enmascara aquella dirigida a la región inmunodominante, que es aquella que contiene los cambios entre las variantes.

La similitud antigénica entre las variantes LP y FP puede explicarse a nivel estructural. Datos obtenidos por DC, cuando los siete péptidos son analizados en condiciones tales que se favorecen conformaciones biológicamente activas, indican que los mismos presentan diferente contenido de α-hélices. La presencia del residuo prolina en la posición 153 hace que este contenido sea menor para las variantes LP y FP debido al efecto terminador de α-hélices que caracteriza a

esteaminoácido. Los otros residuos presentes en la posición 153 parecen no tener influencia o efecto en las propiedades de formación de α-hélices de los péptidos en solución. Los estudios por MM también indican similitud en la estructura que posee la región 152-154 para LP y FP. Las diferencias serológicas, por otro lado, entre LP y FP también son el resultados de diferencias estructurales ocasionadas por fuerzas atractivas de van der Waals entre los residuos Leu148 y Leu151 en el péptido LP, las cuales no pueden establecerse entre Fen148 y Leu151 en FP.

Fué durante la caracterización antigénica de las variantes cuando surgió la necesidad de establecer con certeza la identidad de la semilla de la variante SL. El diseño y realización de los experimentos para llevarlo a cabo se describieron el la sección III.4. Los resultados obtenidos indicaron que el virus semilla SL, el cual proviene de purificar por plaqueo un aislamiento de campo y pasarlo una vez en células IBRS-2, es de hecho una mezcla en la cual el componente en menor proporción (virus LL) se hace predominante bajo ciertas condiciones de crecimiento. La ventaja que tiene el virus LL cuando la mezcla es propagada a baja m.o.i. puede deberse a que esta variante replique más rapidamente de lo que lo hace SL. Para comprobarlo se deben realizar curvas de crecimiento de ambas variantes en forma paralela.

Estas observaciones apuntan claramente a los problemas que pueden presentarse cuando el VFA es crecido a partir de material aislado de placas y aún luego de varias rondas de clonado o purificación por plaqueo. La existencia de variantes en este tipo de preparaciones ya fué descripta por Xie y colaboradores (Xie et al., 1987), cuando aíslan variantes resistentes a la neutralización a partir de un virus que había sido purificado por plaqueo tres veces.

Son varios los trabajos que reportan la detección de especies antigénicamente diferentes luego del pasaje seriado de VFA, tanto en presencia como en ausencia de presión inmunológica (Dinter et al., 1959; Mc Vicar and Sutmoller, 1972; Rieder

Rojas et al., 1992; Sobrino et al., 1983; Borrego et al., 1993). Bolwell y colaboradores (Bolwell et al., 1989) muestran que el pasaje en células BHK en suspensión de un virus purificado por plaqueo del serotipo A22 y crecido en monocapa de células BHK produce un virus con propiedades físico-químicas alteradas. No fué determinado, sin embargo, si este cambio era debido a mutación o a selección a partir de una población mixta en la placa. Aún así, enfatiza el hecho de que la purificación o clonado por plaqueo no garantiza el pedigree de un virus. Es posible que la variación exista en la población viral desde un principio y que la infección en el cultivo celular involucre un número considerable de diferentes genomas. El aislamiento o clonado por placas o la selección de variantes por cualquier método (resistencia a la neutralización, por ejemplo) de la progenie obtenida puede dar la impresión de que una población homogénea de virus ha mutado rápidamente, cuando en realidad la variabilidad existía en el material de partida.

La plasticidad del genoma del VFA también es ilustrada por las observaciones de González y colaboradores (González et al., 1991) con dos variantes resistentes a la neutralización aisladas de un virus del serotipo A5. Luego de someter las mutantes a varios pasajes sucesivos, la población viral que emerge es antigénica y genéticamente indistinguible de aquella población parental. Estas observaciones sugieren que una diminuta sub-población del virus parental sobrevivió en la población original de cada una de las mutantes. La co-replicación de variantes presentes en un aislamiento de campo fue demostrada recientemente para virus de los serotipos O1 y O3 (Leister et al., 1993).

La selección de variantes antigénicas como resultado del pasaje en cultivos celulares ha sido descripto para otros virus. Un ejemplo en relación a la producción de vacunas es ilustrado por las observaciones que indican que la propagación de virus influenza en huevos puede conducir al aislamiento de virus que difieren tanto

en sus características antigénicas como en la secuencia de aminoácidos de aquella progenie aislada luego de pasar el mismo virus en cultivo de células de mamíferos (Schild et at, 1983; Robertson et al., 1987; Rocha et al., 1993, Gubareva et al., 1994). Esto presenta un gran problema ya que el virus propagado en huevos es el utilizado en la preparación de las vacunas, y puede no ser representativo de aquél predominante en humanos. En el caso del virus influenza equino (H3N8), lo opuesto se ha demostrado recientemente y de los datos se desprende que el virus propagado en huevos es el preferido para la producción de antígeno vacunal debido a su baja heterogeneidad comparado con aquel propagado en células MDCK (Ilobi et al., 1994).

El ejemplo presentado en este trabajo de tesis también apunta al problema que puede surgir de la suposición que una población viral aislada por plaqueo es homogénea y la secuenciación de su ARN también indica que se trata de una población homogénea. Como se ha visto (Tablas 12 y 13) hay instancias en las cuales la secuencia obtenida para un determinado virus no coincide con el comportamiento esperado de éste en ensayos de seroneutralización (virus 3X, Tabla 13; virus 1c, Tabla 14). Es importante indicar que la secuenciación de éstos y el resto de los virus no presentó ambigüedades en las posiciones 148 y 153, y también que sólo fue secuenciada la región codificante para VP1, quedando la posibilidad de que existan mutaciones en otros puntos del genoma. Esta falta de correlación entre secuencia y serología puede también ser el resultado de los límites de detección propios de cada técnica, sobre todo si se tiene en cuenta que si estos virus son en realidad una mezcla de dos o más variantes, las propociones de unas u otras en la mezcla son desconocidas. En un artículo publicado recientemente, Wiesner y colaboradores remarcan los peligros de asumir que con la técnica de PCR competitiva, la acumulación de dos productos a partir de una mezcla conocida de secuencias similares, estará necesariamente en la misma proporción que la de la mezcla original (Wiesner et al., 1993). Aún más, en el Symposium on Genetic Stability and Recombinant Product Consistency (Horaud et al., 1993) se ha reportado que cuando DNA de una secuencia parental es mezclado con cantidades conocidas de DNA mutante conteniendo una mutación puntual, el límite de detección es ≥15% cuando se realiza secuenciación directa, y ≥25% cuando se introduce amplificación por PCR previo a la secuenciación (es esta última técnica la utilizada en este trabajo para la secuenciación de las variantes). De estos datos se concluye que la secuenciación de los productos obtenidos por RT-PCR es útil para asignar la secuencia de los productos predominantes en una mezcla de genomas.

Como consideración final, es interesante que en las nueve variantes que han sido descriptas para el virus A12, de las 18 posibilidades para las posiciones 148 y 153, cinco son ocupadas por Ser, cinco por Leu, cuatro por Fen y tres por Pro. Además, se tienen evidencias de que en el epitelio lingual original está presente una variante con Ser148 y Pro153 (Dr. P.Mason, comunicación personal). Los codones que codifican para estos cuatro aminoácidos (Ser, Leu, Fen y Pro) tienen todos una C o una U en la primera y segunda posición. Más aún, el codón que codifica para Ser148 es siempre UCG, y para Leu es siempre UUG en la posición 148, y CUG en la 153. Siendo la región donde se encuentran las sustituciones un elemento dominante en la unión del virus a células susceptibles, estas observaciones pueden ser significantes en términos de mejor adaptación y selección para el reconocimiento y unión del virus al receptor celular.

El propósito principal de investigar la correlación entre las características serológicas y las bases estructurales de la variación antigénica en un VFA de serotipo A12 fue el diseño de un péptido que pudiera inducir anticuerpos que reaccionaran de forma cruzada con diferentes variantes antigénicas. Para el VFA ha sido demostrado que sueros anti-péptido poseen una mayor reactividad cruzada que aquellos sueros anti-virus, y se ha propuesto que ésto es el resultado de la mayor

diversidad de conformaciones que un péptido puede adquirir en solución (Ouldridge et al., 1986; Geysen et al., 1985). Esto sugiere que el uso de vacunas a péptidos diseñadas de manera tal que sean capaces de inducir anticuerpos que reaccionen de forma cruzada con todos los virus, reemplazando la actual vacuna a virus inactivado, podría resolver el problema que presenta la existencia de una gran variación antigénica en el control y/o erradicación de la FA.

Las características estructurales de este péptido hipotético puedrían ser definidas a través de los datos serológicos detallados en este trabajo en conjunto con la información completa del análisis estructural (Lee et al., 1994).

V. RESUMEN

Son varios los factores que se combinan para hacer da la fiebre aftosa una de las más desvastadoras enfermedades infecciosas animales. Estos incluyen su extremo grado de contagio, amplia distribución geográfica, gran espectro de animales susceptibles, relativamente corta duración de inmunidad hacia un dado serotipo, el establecimiento del estado de portador en varias especies, y tal vez el más problemático de todos, la existencia de siete serotipos y más de 65 subtipos frente a los cuales no es posible desarrollar una inmunidad cruzada protectora.

La alta variabilidad antigénica en el VFA hace que el control y la erradicación de la enfermedad a través de la vacunación sea una tarea difícil, llegando al extremo de la necesidad de la producción de vacunas basadas en las cepas que surgen en los brotes cuando la divergencia antigénica entre éstas y las cepas vacunales es muy grande. Esta práctica puede acarrear serios problemas, ya que se ha hecho evidente que las cepas aisladas en el campo no siempre son entidades únicas, sino que podrían tratarse de poblaciones mixtas, siendo el proceso de obtención de masa antigénica para la fabricación de las vacunas, un proceso selectivo que favorece a cierta/s variante/s. Esto hace que el antígeno presente en las vacunas no sea representativo de lo aislado en el campo.

Este trabajo detalla el caso particular de un aislamiento de virus A12 (epitelio lingual bovino) obtenido en un brote ocurrido en Inglaterra en 1932. Hasta la fecha, nueve variantes, las cuales sólo difieren en la secuencia de las posiciones 148 y 153 de VP1, han sido detectadas por diferentes métodos.

El objetivo de este trabajo fue estudiar las características antigénicas de siete de estas variantes a través del análisis serológico utilizando para ello péptidos representando la región 141-160 de VP1, viriones inactivados, y los antisueros contra

estos dos antígenos obtenidos en cobayos. Los ensayos serológicos fueron ELISA indirecto, RIP y SN.

A través de estas pruebas, es posible diferenciar a las variantes de acuerdo a la reactividad serológica que expresan los antisueros correspondientes. Las variantes pueden ser de esta forma separadas en dos grupos principales, a través de la reactividad cruzada de sus antisueros específicos. Este agrupamiento reflejado en la serología está apoyado por, y se corresponde con la existencia de diferencias estructurales en los péptidos 141-160, diferencias que han sido analizadas por la Dra. L. France y completan el proyecto diseñado para el estudio de la variabilidad de este virus.

También se describen los procedimientos seguidos para tratar de definir la homogeneidad antigénica de la semilla de la variante SL. Los resultados indicaron que se trataba de una mezcla de al menos dos variantes (SL/LL), las cuales pueden ser seleccionadas bajo ciertas condiciones de crecimiento.

En conjunto, este trabajo de tesis tiene claras implicancias para la fabricación de vacunas contra la FA. Si el virus causante de un brote es una mezcla de variantes antigénicas, como lo es el virus descripto en este trabajo de tesis, y las diferencias antigénicas son importantes en términos de protección cruzada, es necesario asegurarse de que el virus utilizado para la producción de vacunas es suficientemente cercano antigénicamente al que ocaciona el brote, de forma de conferir protección. En la práctica ésto se hace determinando si los anticuerpos inducidos por la vacuna neutralizan la cepa de campo, idealmente, tan eficientemente como neutralizan el virus utilizado para la producción de la vacuna. Pero se ha visto aquí que cambios en las condiciones de crecimiento pueden llevar a la preponderancia de diferentes variantes presentes en la cosecha. En consecuencia, tanto la especificidad serológica como la habilidad de conferir protección contra la cepa de campo responsable del



brote, deben ser analizadas para cada preparación de virus que vaya a ser utilizada en la fabricación de vacunas.



VI. BIBLIOGRAFIA

ACHARYA, R., Fry, E., Stuart, D.I., Fox, G., Rowlands, D. and Brown, F. (1989). The three-dimentional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9Å. Nature, 337:709-716.

ACHARYA, R., Fry, E., Fox, G., Rowlands, D. and Brown, F. (1990). The structure of foot-and-mouth disease virus: implications for its physical and biological properties. Vet. Microbiol.23:21-34.

AGTERBERG, M., Adriaanse, H., Barteling, S.J., van Maanen, C. and Tommansen, J. (1990). Protection of guinea pigs against foot-and-mouth disease virus by immunization with a PhoE-FMDV hybrid protein. Vaccine, 8: 438-440.

ALEXANDER, H.C., Koch, G., Mountain, I.N., Sprunt, K. and Van Sanme, O. (1958). Infectivity of ribonucleic acid of poliovirus on HELA cells monolayers. Virology, 5: 172-173.

ARNOLD, E., Luo, M., Vried, G., Rossmann, M., Palmenberg, A., Parks, G., Nicklin, M. and Wimmer, E. (1987). Implications of the picornavirus capsid structure for polyprotein processing. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:21-25.

AUGE DE MELO, P. Honigman, M.N., Fernandes, M.V. and Gomes, I. (1970). Further information on the survival of modified foot-and-mouth disease virus in cattle. Bull. Off. int. Epiz.73: 489-505.

BACHRACH, H.L. (1968). Foot-and-mouth disease. Ann. Rev. Microbiol. 22:201-244.

BACHRACH, H.L., Moore, D.M., Mc Kercher, P.D., Polatnick, J. (1975). Immune and antibody response to an isolated capsid protein of foot-and-mouth disease virus. J. Immunol. 115: 1636-1641.

BACHRACH, H.L. (1977). Foot-and-mouth disease virus. Properties, molecular biology and immunogenicity. In Romberger, J.A.(ed). Beltsville Symposia in Agricultural Research.I. Virology in Agriculture. New Jersey. Allenheld, Osmun and Co. pp 3-32.

BAXT, B. and Bachrach, H.L. (1980). Early interactions of foot-and-mouth disease virus with cultured cells. Virology. 104:42-55.

BAXT, B. (1987). Effect of lysosomotropic compounds on early events in footand-mouth disease virus replication. Virus Research. 7:257-271.

BAXT, B., Vakaria, V., Moore, D.M., Franke, A.J. and Morgan, D.O. (1989). Analysis of neutralizing antigenic sites on the surface of type 12 foot-and-mouth disease virus. J. Gen. Virol. 63:2143-2151.

BEAN, W.J., Cox, N.J. and Kendal, A.P. (1980). Recombination of human influenza A viruses in nature. Nature. 284:638-640.

BECK, E., Feil, G. and Strohmaier, K. (1983). The molecular basis of the antigenic variation of foot-and-mouth disease virus. The EMBO Journal.2:555-559.

BEDSON, S.P., Maitland, H.B., Burbury, Y.M. (1927). Second report, foot-and-mouth disease research comitee, p.99 (HMSO, London).

BELSHAM, G.J. and Brangwyn, J.K. (1990). A region of the 5' noncoding region of foot-and-mouth disease virus RNA directs efficient internal initiation of protein synthesis within cells: involvement with the role of L protease in translational control. J. Virol. 64:5389-5395.

BERGER, H.-G., Straub, O., Ahl, R., Tesar, M. and Marquardt, O. (1990) Identification of foot-and-mouth disease virus replication in vaccinated cattle by antibodies to non-structural virus proteins. Vaccine, 8:213-216.

BERINSTEIN, A., Roivainen, M., Hovi, T., Mason, P. and Baxt, B. 13th Annual Meeting American Society for Virology. Madison, WI. July 9-13, 1994. p 155, abstract book.

BITTLE, J.L., Houghten, R.A., Alexander, H., Shinnick, T.M., Sutcliffe, J.G., Lerner, R.A. et al. (1982). Protection against foot-and-mouth disease virus by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. Nature. 198:30-33.

BLACK, D.N., Stephenson, P., Rowlands, D.J. and Brown, F. (1979). Sequence and location of the polyC tract in aphto- and cardiovirus RNA. Nucleic Acids Res. 6:2381-2390.

BOLWELL, C., Clarke, B.E., Parry, N.R., Oudridge, E.J., Brown, F. and Rowlands, D.J. (1989). Epitope maping of foot-and-mouth disease virus with neutralizing monoclonal antibodies. J.Gen. Virol. 70:59-68.

BOOTHROYD, J., Harris, T., Rowlands, D. and Lowe, P. (1982). The nucleotide sequence of cDNA coding for the structural proteins of foot-and-mouth disease virus. Gene. 17:153-161.

BORCA, M., Fernández, F., Sadir, A.M. and Schudel, A. (1984). Reconstitution of immunosuppressed mice with mononuclear cells from donors sensitized to footand-mouth disease virus (FMDV). Vet. Microbiol. **10**:1-11.

BORCA, M., Fernández, F., Sadir, A.M., Braun, M. and Schudel, A. (1986). Immune response to FMDV in a murine experimental model: effective thymus-independent primary and secondary reaction. Immunology. 59:261-267.

BORREGO, B., Novella, I.S., Giralt, E., Andreu, D. and Domingo, E. (1993). Distinct repertoire of antigenic variants of foot-and-mouth disease virus in the presence or absence of immune selection. J.Virol. 67:6071-6079.

BRAND, C. and Palese, P. (1980). Sequential passage of influenza virus in embryonated eggs or tissue culture: emergence of mutants. Virol. 107:424-433.

BRIAND, J.P., Muller, S. and Van Regenmortel, M.H.V. (1985). Synthetic peptides as antigens: Pitfalls of conjugation methods. J. Immunol. Methods. 78:59-69

BROEKHUIJSEN, M.P., van Rijn, J.M., Blom, A.J., Powels, P.H., Eugr-Valk, B.E., Brown, F. and Francis, M.J. (1987). Fusion proteins with multiple copies of the major antigenic determinants of foot-and-mouth disease virus protect both the natural host and laboratory animals. J. Gen. Virol. 68:3137-3143.

BROOKSBY, J.B., Rogers, J. (1957). In Methods of typing and cultivation of foot-and-mouth disease viruses. Project 208 of OEEC, Paris, p.31.

BROOKSBY, J.B. (1982). Portraits of viruses:Foot-and-mouth disease virus. Intervirology. 18:1-23.

BROWN, F., Cartwright, B. and Stewart, D. (1962). Further studies on the infection of pig kidney cells by foot-and-mouth disease virus. Biochem. Biophys. Acta. 55:768-774.

BROWN, F. and Cartwright, B. Purification of radioactive foot-and-mouth disease virus. (1963). Nature. 199:1168-1170.

BROWN, F. and Wild, T.F. (1966). The effect of heat on the structure of foot-and-mouth disease virus and the viral ribonucleic acid. Biochim. biophyc. Acta. 119:301-308.

BROWN, F. Review Lecture: Foot-and-mouth disease: one of the remaining great plagues. (1986). Proc. R. Soc. Lond. B. 229:215-226.

BUONAGURIO, D., Nakada, J., Parvin, M., Krystal, P., Palese, P. and Fitch, W. (1986). Evolution of human influenza A viruses over 50 years: rapid, uniform rate of change in NS gen. Science. 232:980-982.

BURROWS, R. (1966). Studies on the carrier state of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus. J.Hyg.Camb. 41:81-90.

BURNET, F.M. and Bull, D.R. (1943). Changes in influeza virus associated with adaptation to passage in chick embryo. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 21:55-69.

CARRILLO, E., Giachetti, C. and Campos, R. (1984). Effect of lysosomotropic agents on the foot-and-mouth disease virus replication. Virol. 135:542-545.

CARRILLO, E. (1985). Replicación del virus de la fiebre aftosa. Estudio del mecanismo de penetración. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia y Bioquímica. U.B.A.

CARTWRIGHT, B., Mowell, D.J. and Brown, F. (1982). Nature of the antibody response to the foot-and-mouth disease virus particle, its 12S protein subunit and the isolated immunizing polypeptide VP1. J. Gen. Virol. 63:375-381.

CHATTERJEE, N., Bachrach, H. and Polatnick, J. (1976). Foot-and-mouth disease virus RNA. Presence of 3' terminal polyriboadenylic acid and absence of amino acid binding ability. Virol. 69:369-377.

CHOW, M., Newman, J.F.E., Filman, D., Hogle, J.M., Rowland, D.J. and Brown, F. (1987). Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance. Nature. 327:482-486.

CLARKE, B.E., Carroll, A.R., Rowlands, D., Nicholson, B., Houghten, R., Lerner, R. and Brown, F. (1983). Synthetic peptides mimic subtype specificity of foot-and-mouth disease virus. FEBS Letters. 157:261-264.

CLARKE, B.E., Sangar, D.V., Burroughs, J.N., Newton, S.E., Carrol, A.R. and Rowlans, D. (1985). Two initiation sites for foot-and-mouth disease virus polyprotein "in vivo". J. Gen. Virol. 66:2615-2626.

CLARKE, B.E., Newton, S.E., Carrol, A.R., Francis, M.J., Appleyard, G., Syred, A.D. et al. (1987). Improved immunogenicity of a peptide epitope after fusion to hepatitis B core protein. Nature. 330:381-384.

COFFIN, J.M. (1986). Genetic variation in AIDS viruses. Cell. 46:1-4.

COLTER, J., Bird, H. and Brown, F. (1957). Infectivity of ribonucleic acid from ehrlich ascites tumor cells infected with mengo encephalitic. Virology. 5:172-173.

COOPER, P.D. et al. (1978). Picornaviridae: Second Report. Intervirology. 10:165-180.

COSTA GIOMI, M.P., Gomes, I., Tiraboschi, B., Auge de Melo, P., Bergmann, I.E., Schodeler, E.A. and La Torre, J.L. (1988). Heterogeneity of the polyribocytidilic acid tract in aphtovirus: changes in the size of poly(C) of viruses recovered from persistently infected cattle. Virology. 162:58-64.

COWAN, K. M. and Graves, J. H. (1966). A third antigenic component associated with foot-and-mouth disease infection. Virol. 30:528-540.

COWAN, K. M. (1973). Antibody response to viral antigens. Adv. Immunol. 17:195-254.

CRAWFORD, N.M. and Baltimore, D. (1983). Genome-linked protein VPg of poliovirus is present as free VPg and VPg-pUpU in poliovirus-infected cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:7452-7455.

CROWELL, R.L., Hsu, K-H.L., Schultz, M. and Landau, B.J. (1987). Cellular receptors in coxsackievirus infections in Positive-strand RNA virus, UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, New Series. Edited by M.A. Brinton and R.R. Rueckert. New York: Alan R. Liss. 54:453-466.

DENOYA, C., Scodeller, E., Vásquez, C. and La Torre, J.C. (1978a). Ribonuclease activities associated with purified foot-and-mouth disease virus. Arch. Virol. 57:153-159.

DENOYA, C., Scodeller, E., Vásquez, C. and La Torre, J.C. (1978b). Foot-and-mouth disease virus. II. Endonuclease activity within purified virus. Virol. 89:67-74.

DESSELBERGER, V., Nakajima, K., Alfino, P., Penderson, F.S., Hasetine, W. et al. (1978). Biochemical evidences that the "new" influenza virus strains in nature may arise by recombination (reassortment). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76:3341-3345.

DIMARCHI, R., Brooke, G., Gale, C., Cracknell, V., Doel, T. and Mowat, N. (1986). Protection of cattle against foot-and-mouth disease virus by a synthetic peptide. Science. 232:639-641.

DINTER, Z., Philipson, L. and Wesslén, T. (1959). Properties of foot-and-mouth disease virus in tissue culture. Archiv. f. Virusforch. 9:411-427.

DOMINGO, E., Sabo, D, Taniguchi, T. and Weissmann, C. (1978). Nucleotide sequence heterogeneity of an RNA phage population. Cell. 13:735-744.

DOMINGO, E. Dávila, M. and Ortín, J. (1980). Nucleotide sequence heterogeneity of the RNA from a natural population of foot-and-mouth disease virus. Gene. 11:333-346.

DOMINGO, E. Martínez-Salas, E., Sobrino, F., de la Torre, J.C., Portela, A. et al. (1985). The quasispecies (extremely heyerogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relavance - a review. Gene. 40:1-8.

DOMINGO, E., Díez, J., Martínez, M., Hernández, J., Holguín, A., Borrego, B. and Mateu, M. (1993). New observations on antigenic diversification of RNA viruses. Antigenic variation is not dependent in immune selection. J. Gen. Virol. 74:2039-2045.

DONALDSON, A.I., Gloster, J., Harvey, L.D.J. and Deans, D.H. (1982). Use of prediction models to forecast and analyse airborne spread during the foot-and-mouth disease outbreaks in Brittany, Jersey and the Isle of Wight in 1982. Vet. Rec. 110:53-57.

DRAKE, J.W. (1969). Spontaneous mutation. Nature. 221:1128-1132.

DUBRA, M.S., La Torre, J.L., Schodeler, E.A., Denoya, C.D. and Vazquez, C. (1981). Cores in foot-and-mouth disease virus. Virology. 116:349-353.

DYRBERG, T. and Oldstone, B.A. (1986). Peptides as antigens. Importance of orientation. J. Exp. Med. 164: 1344-1349.

EIGEN, M. (1971). Self-organization of matter and the evolution of macromolecules. Naturwiss. 58:465-523.

ESCARMIS, C., Toja, M., Medina, M. and Domingo, E. (1992). Modification of the 5' untranslated region of foot-and-mouth disease virus after prolonged persistence in cell culture. Virus Res. 26:113-125.

FALK, M.M., Sobrino, F. and Beck, E. (1992). VPg gen amplification correlates with infective particle formation in foot-and-mouth disease virus. J. Virol. 66:2251-2260.

FEIGELSTOCK, D., Mateu, M., Piccone, M.E., De Simone, F., Brocchi, E., Domingo, E. and Palma, E. (1992). Extensive antigenic diversification of foot-and-mouth disease virus by amino acid substitutions outside the major antigenic site. J. Gen. Virol. 73:3307-3311.

FELLOWES, O.N. and Sutmoller, P. (1970). Foot-and-mouth disease virus: Biological characteristics of virus from bovine carriers. Arch. Gesante Virusforsch. 30:173-180.

FERNANDEZ, F., Borca, M., Fondevila, N., Mayo, J. and Schudel, A. (1986). Foot-and-mouth disease experimental infection: susceptibility and immune response of adult mice. Vet. Microbiol. 12:15-24.

FERNANDEZ-TOMAS, C. and Baltimore, D. (1973). Morphogenesis of picornavirus. Demonstration of a new intermediate: the provirion. J. Virol. 12:1122-1130.

FLANEGAN, J.B., Petterson, R.F., Ambros, V., Hewlett, N.J. and Baltimore, D. (1977). Covalent linkage of a protein to a defined nucleotide sequence at the 5'-terminus of virion and replicative intermediate RNAs of poliovirus. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74:961-965.

FORSS, S. and Schaller, H. (1982). A tandem repeat in a picornavirus. Nucleic Acids Res. 10:6441-6450.

FOX, G., Stuart, D., Acharya, R.K., Fry, E., Rowlands, D. and Brown, F. (1987). Crystalization and preliminary X-ray diffraction analysis of foot-and-mouth disease virus. J. Mol. Biol. 196:591-597.

FOX, G., Parry, N.R., Barret, P.V., Mc Ginn, B., Rowlands, D. and Brown, F. (1989). The cell attachment site on foot-and-mouth disease virus includes the amino acid sequence R-G-D (Arginine-Glycine-Aspartic acid). J. Gen. Virol. 70:625-637.

FRACASTORIUS, H. (1546). De contagione et contagiosis morbis et curatione, libri iii.

FRANCIS, M.J., Hastings, G.Z., Syred, A.D., Giinn, B., Brown, F. and Rowlands, D.J. (1987). Non-responsiveness to a foot-and-mouth disease virus peptide overcome by addition of foreing helper T-cell determinants. Nature. 330:168-170.

FRY, E., Logan, D., Acharya, R., Fox, G., Rowlans, D., Brown, F and Stuart, D. (1990). Architecture and topology of an aphtovirus. Seminars in Virology. 1:439-451.

GALLOWAY, I.A., Henderson, W.M. and Brooksby, J.B.(1948). Strains of the virus of foot-and-mouth disease recovered from outbreaks in Mexico. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 69:57-63.

GEBAUER, F., de la Torre, J.C., Gomes, I., Mateu, M.G., Barahona, H., Tiraboschi, B., Bergmann, I., Augé de Mello, P. and Domingo, E. (1988). Rapid selection of genetic and antigenic variants of foo-and-mouth disease virus during persistence in cattle. J. Virol. 62:2041-2049.

GEYSEN, H.M., Meloen, R.H. and Barteling, S.J. (1984). Use of synthetic peptides to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single aminoacid. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81: 3998-4002.

GEYSEN, H.M., Barteling, S.J. and Meloen, R.H. (1985). Small peptides induce antibodies with a sequence and structural requirement for binding antigen comparable to antibodies raised against the native protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82:178-182.

GIAVEDONI, L.D., Kaplan, G., Marcovecchio, F., Piccone, M.E. and Palma, E.L. (1991). Protection conferred by TrpE fusion proteins containing portions of the c-terminal region of capsid protein VP1 of foot-and-mouth disease virus. J. Gen. Virol. 72:967-971.

GONZALEZ, M.J., Saiz, J.C., Laor, O. and Moore, D.M. (1991). Antigenic stability of foot-and-mouth disease virus variants on serial passages in cell culture. J.Virol. 65:3949-3953.

GREVE, J.M., Davis, G., Meyer, A.M., Forte, C.P., Yost, S.C., Marlor, C.W., Kamarck, M.E. and Mc Clelland, A. (1989). The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. Cell. **56**:839-847.

GRUBMAN, M.J., Robertson, B.H., Morgan, D.O., Moore, D.M. and Dowbenko, D. (1984). A biochemical map of the polypeptides specified by foot-and-mouth disease virus. J. Virol. **50**:579-583.

GRUBMAN, M.J., Zellner, M. and Wagner, J. (1987). Antigenic comparison of the polypeptides of foot-and-mouth disease virus serotypes and and other picornaviruses. Virol. 158:133-140.

GUBAREVA, L.V., Wood, J.M., Meyer, W.J., Katz, J.M., Robertson, J.S., Major, D. and Webster, R.G. (1994). Co-dominant mixtures of viruses in reference strains of influenza virus due to host cell variation. Virol. 199:89-97.

HABEEB, A.F.S.A. and Hiramoto, R. (1968). Reaction of proteins with glutaraldehyde. Archs. Biochem. Biophys. 126:16-26.

HAHN, B., Shaw, G., Taylor, M., Redfield, R., Markham, P., Salahuddin, S., Wong-Staal, F., Gallo, R., Parks, E. and Parks, W. (1986). Genetic variation in HTLV-III/LAV over time in patients with AIIDS or at risk for AIDS. Science. 232:1548-1553.

HARRIS, T.J. and Brown, F. (1976). The location of the poly(c) tract in the RNA of foot-and-mouth disease virus. J. Gen. Virol. 33:493-501.

HOGLE, J.M., Chow, M. and Filman, D.J. (1985). Three dimentional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. Science. 229:1358-1365.

HOLLAND, J., Spindler, K., Horodyski, F., Graban, E., Nichol, S. and VandePol, S. (1982). Rapid evolution of RNA genomes. Science. 215:1577-1585.

HOLLAND, J., De la Torre, J.C. and Steinhauer, D.A. (1992). RNA virus populations as quasispecies. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 176:1-20.

HORAUD, F., Lubiniecki, A.S. and Robertson, J.S. Meeting Report. IABS International Meeting on Genetic Stability and Recombinant Product Consistency. 8-9 July, 1993, Annecy, France. Developments in Biological Standarization, vol 83.

ILOBI, C.P., Henfrey, R., Robertson, J.S., Mumford, J.A., Erasmus, B.J. and Wood, J. (1994). Antigenic and molecular characterization of host cell-mediated variants on equine H3N8 influenza viruses. J.Gen. Virol. 75:669-673.

JANG, S.K., Kraüsslich, H-G., Nicklin, M.J., Duke, G.M., Palmemberg, A.C. and Wimmer, E. (1988). A segment of the 5' non-translated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during *in vitro* translation. J.Virol. **62**:2636-2643.

JACKSON, R.J., Howell, M.T. and Kaminski, A. (1990). The novel mechanism of initiation of picornavirus RNA translation. Trends Biol. Sci. 15:477-483.

KING, A.M., McCahon, D., Slade, W.R. and Newman, J.W. (1982). Recombination in RNA. Cell. 29:921-928.

KIRKEGAARD, K. and Baltimore, D. (1986). The mechanism of RNA recombination in poliovirus. Cell. 47:433-443.

KITAMURA, N., Sembler, B.L., Rothberg, P.G., Larsen, G.R., Adler, C.J., Dorner, A.J., Emini, E.A., Hanekac, R., Lee, J.J., van der Wert, S., Anderson, C.W. and Wimmer, E. (1981). Primary structure, gene organization and polypeptide expretion of polivirus RNA. Nature. 291:547-553.

KLEID, D.G., Yansura, D., Small, B., Dowbenko, D., Moore, D.M., Grubman, M.J. et al.(1981). Cloned viral protein vaccine for foot-and-mouth disease. Responses in cattle and swine. Science. 214:1125-1129.

KNUDSEN, R., Groocock, C. and Andersed, A. (1983). Protective role of foot-and-mouth disease virus antibody "in vitro" in guinea pigs. J. Gen. Virol. 64:341-348.

KORNBERG, A. (1980). DNA replication. San Francisco: Freeman. pp 724.

KREBS, O., Ahl, R., Straub, O.C. and Marquerdt, O. (1993). Amino acid changes outside the G-H loop of capsid protein VP1 of type O foot-and-mouth disease virus confer resistance to neutralization by antipeptide G-H serum. Vaccine. 11:359-362.

KÜHN, R., Luz, N. and Beck, E. (1990). Functonal analysis of the internal translation initiation site of foot-and-mouth disease virus. J. Virol. 64-4625-4631.

KUNKEL, L.O. (1947). Variation in phytopathogenic viruses. Ann. Rev. Microbiol. 1:85-100.

LAPORTE, J., Groslaude, J., Wantyghem, J., Bernard, S. and Rouze, P. (1973). Neutralisation en culture cellulaire du pouvoir infectieux du virus de la fievre aphteuse par des sérums provenant de porcs immunisés a l'aide d'une protéine virale purifiée. C.r. hebd. Séanc. Acad. Sci. Paris. 276:3399-3401.

LEA, S., Hernández, J., Blakemore, W., Broccho, E., Curry, S., Domingo, E., Fry, E., Abu-Ghazaleh, R., King, A., Newman, J., Stuart, D. and Mateu, M.G. (1994). The strucure and antigenicity of a type C foot-and-mouth disease virus. Structure. 2:123-139.

LEE, Y.F., Nomoto, A., Detjen, B.M. and Wimmer, E. (1977). The genome-linked protein of picornavirus. I. A protein covalently linked to poliovirus genome RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74:59-63.

LEE, L.F., Piatti, P.G., Newman, J.F.E., Toth, W.A., Gibbons, A. and Brown, F. (1994). Circular dichroism, molecular modeling and serology indicate that the structural basis of antigenic variation in foot-and-mouth disease virus is α-helix formation. Aceptado para su publicación en Proc. Natl. Acad. Sci.USA.

LEISTER, D., Adam, K-H. and Marquardt, O. (1993). Co-replication of several isotypes of foot-and-mouth disease virus. J. Gen. Virol. **74**:2753-2757.

LOEFFLER, F. and Frosh, P. (1897). Summarischer Bericht über der Ergebnisse der Untersuchngen zur Erforschung der Maul-und Klauenseuche. Zent Bl. Bakt. Parasitkde I. 22:257-259.

LOGAN, D., Abu-Ghazaleh, R., Blakemore, W., Curry, S., Jackson, T., King, A., Lea, S., Lewis, R., Newman, J., Parry, N., Rowlands, D., Stuart, D. and Fry, E. (1993). Structure of a major immunogenic site of foot-and-mouth disease virus. Nature. 362-566-568.

LUBECK, M.D., Shulman, J.L. and Palese, P. (1980). Antigenic variants of influenza viruses: marked differences in the frecuencies of variants selected with different monoclonal antibodies. Virol. 102:458-462.

LUO, M., Vriend, G., Kamer, G., Minor, I., Arnol, E., Rossman, M.G., Boege, V., Scraba, D.G., Duke, G.M. and Palmemberg, A. (1987). The atomic atructure of Mengo virus at 3.0 Å resolution. Science. 235:182-191.

MARTINEZ, M.A., Carrillo, C., Plana, J., Mascarella, R., Bergada, J., Palma, E.L., Domingo, E. and Sobrino, F. (1988). Genetic and immunogenetic variation among closely related isolates of foot-and-mouth disease virus. Gene. 62:75-84.

MARTINEZ, M.A., Hernández, J., Piccone, M.E., Palma, E., Domingo, E., Knowles, N. and Mateu, M. (1991). Two mechanisms of antigenic diversification of foot-and-mouth disease virus. Virology. 184:695-706.

MARTINEZ-SALAS, E., Ortín, J. and Domingo, E. (1985). Sequence of the viral replicase gene from foot-and-mouth disease virus C Santa Pau (C-58). Gene. 35:55-61.

MASON, P.W, Rieder, E. and Baxt, B. (1994). RGD sequence of foot-and-mouth disease virus is essencial for infecting cells via the natural receptor but can be bypassed by an antibody-dependent enhancement pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91:1932-1936.

MATEU, M., Martínez, M., Rocha, E., Andreu, D., Parejo, J., Giralt, E., Sobrino, F. and Domingo, E. (1989). Implications of a quasispecies genome structure: Effect of frecuent, naturally occurring amino acid substitutions on the antigenicity of foot-and-mouth disease virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:5883-5887.

MATEU, M., Martínez, M., Capucci, L., Andreu, D., Giralt, E., Sobrino, F., Brocchi, E. and Domingo, E. (1990). A single amino acid substitution affects multiple overlapping epitopes in the major antigenic site of foot-and-mouth disease virus of serotype C. J. Gen. Virol. 71:629-637.

McCAHON, D.D., Slade, W.R., Priston, R. A. and Lake, J.R. (1977). An extended genetic recombinat map of foot-and-mouth disease virus. J. Gen. Virol. 53:555-565.

McCAHON, D.D., Crowder, J.R., Belsham, G.J., Kitson, J.D.A., Duchesne, M., Have, P., Meloen, R.H., Morgan, D.O. and De Simone, F. (1989). Evidence of at least four antigenic sites on type O foot-and-mouth disease virus involved in neutralizacion, identification by single and multiple site monoclonal antibobyresistant mutants. J. Gen. Virol. 70:639-645.

McCULLOUGH, K., Crowther, J., Carpenter, W., Brocchi, E., Capucci, L., De Simione, F., Xie, Q. and McCahon, D. (1987). Epitopes on foot-and-mouth disease virus particles.I. Topography. Virol. 157:516-525.

McCULLOUGH, K., De Simione, F., Capucci, L., Crowther, J. and Kihm, V. (1992). Protective immune response against foot-and-mouth disease. J. Virol. 66:1835-1840.

Mc KERCHER, P.D., Moore, D.M., Morgan, D.O., Robertson, B., Callis, J.J, Kleid, D. et al. (1985). Dose-response evaluation of a genetically engineered foot-and-mouth disease virus polypeptide immunogen in cattle. Am. J. Vet. Res. 46:587-590.

Mc VICAR, J.W. and Sutmoller, P. (1972). Three variants of foot-and-mouth disease virus type O: Cell culture characteristics and antigenic differences. Am. J. Vet. Res. 33:1627-1633.

MEDINA, M., Domingo, E., Brangwym, J.K. and Belsham, G.J. (1993). The two species of the foot-and-mouth disease virus leader protein, expressed individually, exhibit the same activities. Virol. 194:355-359.

MELNICK, J.L. y otros 20. (1974). Picornaviridae. Intervirology. 4:303-316.

MENDELSOHN, C.L., Wimmer, E. and Racaniello, V.R. (1989). Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. Cell. 56:855-865.

MINOR, P.D. Picornaviridae. Classification and nomenclature of viruses: The fifth report of international committee on taxonomy of viruses. Francki, R.I.B., et al., eds, pp.320-326. Springer-Verlag.

MINOR, P.D., John, A., Ferguson, M. and Icenogle, J.P. (1986). Antigenic and molecular evolution of the vaccine strain of type 3 poliovirus during the period of excretion by a primary vaccine. J. Gen. Virol. 67:693.

MOLLA, A., Jang, S-K., Paul, A.V., Rener, Q. and Wimmer, E. (1992). Construction of dicistronic poliovirus: conclusive evidence for *in vivo* _ function of a picornavirus internal ribosomal entry site. Nature. **356**:255-257.

MONTELARO, R., Parekh, B., Orrego, A. and Issel, C. (1984). Antigenic variation during persistent infection by equine infectious anemia virus, a retrovirus. The J. Biol. Chem. 259:10539-10544.

MOORE, D.M., Vakharia, V.N. and Morgan, D.O. (1989) Identification of virus neutralizing epitopes on naturally occurring variants of type A12 of foot-and-mouth disease virus. Virus Res. 14:281-296.

MURDIN, A.D. and Doel, T.R. (1987). Synthetic peptide vaccines against footand-mouth disease. I. Duration of the immune response and priming in guinea pigs, rabbits and mice. J. Biol. Stand. 15:39-51.

NAKAJIMA, K., Desselberger, U. and Palese, P. (1978). Recent human influenza A (H1N1) viruses are closely related genetically to strains isolated in 1950. Nature. 274:334-339.

NEITZERT, E., Beck, E., Augé de Mello, P., Gomes, I. and Bergmann, I. (1991). Expression of the aphtovirus RNA polymerase gene in *Escherichia coli* and its use together with other bioengineered nonstructural antigens in detection of late persistent infections. Virol. **184**:799-804.

NEWMAN, J.F.E., Cartwright, B., Doel, T.L. and Brown, F. (1979). Purification and identification of the RNA-dependent RNA polymerase of foot-and-mouth disease virus. J. Gen. Vrol. 45:497-507.

NEWMAN, J.F.E., Piatti, P., Gorman, B., Burrage, T., Ryan, M., Flint, M. and Brown, F. (1994). Foot-and-mouth disease virus particles contain replicase protein 3D. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91:733-737.

NOMOTO, A., Detjen, B., Pozzatti, R.and Wimmer, E. (1977a). The location of the polio genome protein in RNAs and its implication for RNA synthesis. Nature. **268**:208-213.

NOMOTO, A., Kitamura, N., Golini, F. and Wimmer, E. (1977b). The 5'-terminal structures of poliovirus RNA and poliovirus mRNA differ only in the genome-linked protein VPg. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74:5345-5349.

O'BRIEN, R.L., Brinster, R.L. and Storb, V. (1987). Somatic hypermutation of an immunoglobulin transgene in k transgenic mice. Nature. 326:405-409.

OULDRIDGE, E., Parry, N., Barnett, P., Bolwell, C., Rowlands, D., Brown, F., Bittle, J., Houghten, R. and Lerner, R. (1986). Comparison of the structures of the major antigenic sites of foot-and-mouth disease virus of two different serotypes. En Vaccines '86: New Approaches to Immunization. Edited by F. Brown, R. Chanock and R. Lerner. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, NY, pp.45-49.

PALESE, P. and Young, J. (1982). Variation of influenza A, B and C viruses. Science. 215:1468-1474.

PALESE, P. (1986). Rapid evolution of human influenza viruses, p.53-68. In S. Karlin and E. Novo (ed), Evolutionary processes and theory. Academic Press, Inc. New York.

PARVIN, J.D., Moscona, A., Pan, W., Leider, J. and Palese, P. (1986). Measurement of the mutaton rates of animal viruses: influenza A virus and poliovirus type 1. J. of Virol. 59:377-383.

PELLETIER, J. and Sonemberg, N. (1988). Internal initiation of translation of eukariotic mRNA directed by a sequence from poliovirus RNA. Nature. 334:320-325.

PEREIRA, H. (1977). Subtyping of foot-and-mouth disease virus. In Developments in Biological Standarization, vol 35, pp.167-174. Edited by C. Marckowiak and R.H. Regamey. Basel: S. Karger.

PFAFF, E., Mussgay, H., Schulz, G. and Schaller, H. (1982). Antibodies against a preselected peptide recognize and neutralize foot-and-mouth disease virus. EMBO. 1: 869.

PIATTI, P., Berinstein, A., López, O., Borca, M., Fernández, F., Schudel, A. and Sadir, A. (1991). Comparision of the immune response elicited by infections and inactivated foot-and-mouth disease virus in mice. J. Gen. Virol. 72:1691-1698.

PICCONE, M.E., Kaplan, G., Giavadoni, L., Domingo, E. and Palma, E. (1988) VP1 of serotype C foot-and-mouth disease virus: long-term conservation of sequences. J. of Virol. 62:1469-1473.

PILIPENKO, E., Blinov, V., Chernov, B., Dmitrieva, T. and Agol, V. (1989). Conservation of the secondary structure elements of the 5'-unstranslated region of cardio-and aphtovirus RNAs. Nucl. Acid Res. 17:5701-5711.

POLATNICK, J. and Richmond, J. (1980). Characterization of foot-and-mouth disease virus mutant temperature sensitive for viral RNA synthesis. Arch. Virol. 63:191-201.

RACANIELLO, V. and Baltimore, D. (1981). Molecular cloning of poliovirus cDNA and determination of the complete nucleotide sequence of the viral genome. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:5889-5891.

RIEDER, E., Carrillo, E., Schiappacassi, M. and Campos R. (1992). Modification of foot-and-mouth disease virus O1 Caseros after serial passages in the presence of antiviral polyclonal sera. J. Virol. 66:3368-3372.

RIEDER, E., Bunch, T., Brown, F. and Mason, P. (1993). Genetically engineered foot-and-mouth disease viruses with poly(c) tracts of two nucleotides are virulent in mice. J. Virol. 67:5139-5145.

ROBERTSON, B.H., Morgan, D.O., Moore, D.M., Grubman, M.J., Card, J., Fischer, T., Weddell, G., Dowbenko, D. and Yansura, D. (1983). Identification of the amino acid and nucleotide sequence of the foot-and-mouth disease virus RNA polymerase. Virol. 126:614-623.

ROBERTSON, J.S., Bootman, J.S., Newman, R., Oxford, J.S., Daniels, R.S., Webster, R.G. and Schild, G.C. (1987). Structural changes in the haemagglutinin which accompany egg adaptation of an influenza A(H1N1) virus. Virol. **160**:31-37.

ROCHA, E., Xu, X., Hall, H., Allen, J., Regnery, H. and Cox, N. (1993). Comparison of 10 influenza A(H1N1 and H3N2) haemmaglutinin sequences obtain directly from clinical specimens to those of MDCK cell-and egg-grown viruses. J. Gen. Virol. 74:2513-2518.

ROIVAINEN, M., Piirainen, L., Heino, J., Hyypia, T. and Hovi, T. IXth International Congress of Virology. Glasgow, Scotland. August 8-13, 1993. p 267 abstracts.

ROSSI, M., Sadir, A., Schudel, A. and Palma, E. (1988). Detaction of foot-and-mouth disease virus with DNA probes in bovine esophageal-pharingeal fluids. Arch. Virol. **99**:67-74.

ROSSMAN, M.G., Arnold, E., Erickson, J. Frankelberger, E., Griffith, J., Hecht, H., Johnson, J., Kamer, G., Luo, M., Mosser, A., Rueckert, R., Sherry, B. and Vriend, G. (1985). Structure of a human common cold virus and functional relationship to other picornaviruses. Nature. 317:145-153.

ROWLANDS, D.J., Cartwright, B. and Brown, F. (1969). Evidence for an internal antigen in foot-and-mouth disease virus. J. Gen. Virol. 4:479-487.

ROWLANDS, D., Clarke, B., Carrold, A., Brown, F., Nicholson, B., Bittle, J., Houghten, R. and Lerner, R. (1983). Chemical basis of antigenic variation in footand-mouth disease virus. Nature. **306**:694-697.

RUECKERT, R. (1976). On the structure and morphogenesis of picornaviruses. In Comprenhensive Virology. Fraenkel-Conrat H. and Wagner R.R.(eds). Plenum, NY. Vol 6, pp 131-213.

RUECKERT, R. and Wimmer, E. (1984). Systematic nomenclature of picornavirus proteins. J. Virol. 50:957-959.

RUECKERT, R. (1985). Picornavirus and their replication. Virology. Raven Press. Nrw York. Chapter 32, pp 705-738.

SANGAR, D., Rowlands, D., Cavanagh, D. and Brown, F. (1976). Characterization of the minor polypeptides in the foot-and-mouth disease particles. J.Gen.Virol. 31:35-46.

SANGAR, D. (1979). The replication of Picornaviridae. J. Gen. Virol. 45:1-13.

SARNOW, P. (1989). Role of the 3' end sequence in infectivity of poliovirus transcripts made *in vitro*. J. Virol. **63**:467-470.

SCHILD, G.C., Oxford, J.S., de Jong, J.C. and Webster, R.G. (1983). Evidence for host-cell selection of influenza virus antigens variants. Nature, London, 303:706-709.

SEKIGUCHI, K., Franke, J. and Baxt, B. (1982). Competition for cellular receptors sites among selected aphtovirus. Arch. Virol. 74:53-64.

SIEKEVITZ, M., Kocks, C., Rajewsky, K. and Dildrop, R. (1987). Analysis of somatic mutation and class switching in naive and memory B cells generating adoptive primary and secondary responses. Cell. 48:757-770.

SILIGARDI, G., Drake, A., Mascagni, P., Rowlands, D., Brown, F. and Gibbons, W. (1991). Correlation between the conformations elucidated by CD spectroscopy and the antigenic properties of four peptides of the foot-and-mouth disease virus. Eur. J. Biochem. 199:545-551.

SOBRINO, F., Dávila, M., Ortín, J. and Domingo, E. (1983). Multiple genetic variants in the course of replication of foot-and-mouth disease virus in cell culture. Virol. 123:310-318.

STAUNTON, D., Merleezzi, V., Rothlein, R., Barton, R, Martin, S. and Springer, T. (1989). A cell adhesion molecule, ICAM-1, is the major surface receptor for rhinoviruses. Cell. **56**:849-853.

STAVE, J.W., Card, J.L., Morgan, D.O. and Vakharia, V.N. (1988). Neutralization of type O1 foot-and-mouth disease virus defined by monoclonal antibodies and neutralization-escape virus variants. Virol. 162:21-29.

STRAVER, P., Bool, P., Claessens, A. and van Bekkum, J. (1970). Some properties of carriers strains of foot-and-mouth disease virus. Asch. Gesaute Viruforsch. 29:113-126.

STROHMAIER, K., Franze, R. and Adam, K-H. (1982). Location and characterization of the antigenic portion of FMDV immunizing protein. J.Gen. Virol. 59:295-306.

SUTMOLLER, P. and Gaggero, A. (1965). Foot-and-Mouth Disease Carriers. The Veterinary Record. 77:968-969.

TAKEDA, N., Yang, C-F., Kuhn, R. and Wimmer, E. (1989). Uridylylation of the genome-linked protein of poliovirus *in vitro* is dependent upon an endogenous RNA template. Virus Res. 8:193-204.

TALBOT, P., Rowlands, D., Burroughs, J., Sangar, D. and Brown, F. (1973). Evidence for a group protein in foot-and-mouth disease virus particle. J. Gen. Virol. 19:369-380.

TESAR, M., Berger, H-G. and Marquardt, O. (1989). Serological probes for some foot-and-mouth disease virus nonstructural proteins. Virus Genes. 3:29-44.

THOMAS, A.A.M., Woortmeijer, R.J., Puijk, W. and Barteling, S.J. (1988). Antigenic sites on foot-and-mouth disease virus type A10. J. Virol. 62:2782-2789.

TOLSKAYA, E., Romanova, L., Kolesnikova, M. and Agol, V. (1983). Intertypic recombination in poliovirus: genetic and biochemical studies. Virol. 124:121-132.

TRONO, D., Pelletier, J., Sonenberg, N. and Baltimore, D. (1988). Translation in mammalian cells of a gene linked to the poliovirus 5" noncoding region. Science. 241:445-448.

VAKHARIA, V., Devaney, M., Moore, D., Dunn, J. and Grubman, M. (1987). Proteolytic processing of foot-and-mouth disease virus polyproteins expressed in a cell-free system from clone-derived transcripts. J. Virol. 61:3199-3207.

VALLEE, H. and Carré, H. (1922). Sur la pluralité du virus aphteux. C. r.hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris. 174:1498.

van BEKKUM, J., Frenkel, H., Frederiks, H. and Frenkel, S. (1959). Observations on the carrier state of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus. T. Diergeneesk. 84:1159-1163.

VAZQUEZ, C., Denoya, C.D., La Torre, J.L. and Palma, E.L. (1979). Structure of foot-and-mouth disease virus capside. Virol. 97:195-200.

WALDMANN, O. and Pape, J. (1920). Die künsteiche übertrazung der maulund klauenseuche auf das meerschweinchen. Berl. tierarztl.Wschr. 36:519-520.

WALDMANN, O. and Pape, J. (1921). Experimentele untersuchungen über maul-und klauenseuche.I. Der verlauf der experimentellen maul-und klauenseucheinfektion beim meerschweinchen. Berl. tierärztl. wschr. 37:449

WEBSTER, R.G., Laver, W., Air, G. and Schield, G. (1982). Molecular mechanisms of variation in influenza viruses. Nature. 296:115-121.

WEISSMANN, C., Billeter, M.A., Goodman, H.M., Hindley, J. and Weber, H. (1973). Structure and function of phage RNA. Annu. Rev. Biochem. 42:303-328.

WIESNER, R., Beinbrech, B. and Caspar Rüegg. (1993). Quantitative PCR. Nature, London, 366:416.

WILD, T.F., Burroughs, J.N. and Brown, F. (1969). Surface structures of foot-and-mouth disease virus. J. Gen. Virol. 4:313-320.

WOLFS, T., Zwart, G., Bakker, M., Valk, M., Kuiken, C. and Goudsmit, J. (1991). Naturally occurring mutations within HIV-1 V3 genomic RNA lead to antigenic variation dependent on a single amino acid substitution. Virol. 185:195-205.

XIE, Q-C., McCahon, D., Crowther, J.R., Belsham, G.J. and McCullough, K.C. (1987). Neutralization of foot-and-mouth disease virus can be mediated through any of at least three separate antigenic sites. J. Gen. Virol. 68:1637-1647.

YOUNG, J.F. and Palese, P. (1979). Evolution of human influenza A viruses in nature: recombination contributes to genetic variation of H1N1 strains. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76:6547-6551.

ZIBERT, A., Maass, G., Strebel, K., Falk, M.M. and Beck, E. (1990). Infectious foot-and-mouth disease virus derived from a cloned full-lengh cDNA. J. Virol. 64:2467-2473.

