

Tesis de Posgrado

Epidemiología molecular del virus de la Fiebre Aftosa serotipo C

Feigelstock, Dino Ariel

1995

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

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

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

Cita tipo APA:

Feigelstock, Dino Ariel. (1995). Epidemiología molecular del virus de la Fiebre Aftosa serotipo C. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2739_Feigelstock.pdf

Cita tipo Chicago:

Feigelstock, Dino Ariel. "Epidemiología molecular del virus de la Fiebre Aftosa serotipo C". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1995.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2739_Feigelstock.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Dr. Eduardo L. Palma

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DEL VIRUS DE LA FIEBRE
AFTOSA SEROTIPO C**

Dino Ariel Feigelstock

Director de Tesis: Dr. Eduardo L. Palma

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

**Instituto de Biotecnología
Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria**

1995

"Cuántas son tus creaciones, D's" (Salmos 104, 24).

Agradecimientos

No es fácil recordar a todos aquellos que me acompañaron en estos años, durante los cuales, entre otras cosas, traté de formarme en la vida de investigación. Las instituciones, como la Facultad de Agronomía y la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, el INTA, y el CONICET, que me proporcionaron el ambiente y medios para mi formación.

Recuerdo al Ing. Agr. Goldenberg y al Dr. Pedro Acha, que me incentivaron a introducirme en el campo de la biología molecular. Ambos que en paz descansen.

La Ing. Agr. Nora Fraissinet, que también me apoyó en este campo.

La gente de las cátedras de Virología, Biología Molecular e Inmunoquímica, de la Dirección de Alumnos, Graduados y de la Secretaría de Biología de FCEyN-UBA, que me atendieron muy amablemente.

Maria Elisa Piccone, que me enseñó las primeras técnicas de laboratorio, y compartimos ideas y momentos juntos.

Gerardo Kaplan, una gran persona e investigador, a quien tuve el gran gusto de conocer y compartir temas generales y de investigación.

Todos los integrantes del IB, y en especial Cecilia, Erica, Paula y Oscar, mis compañeros integrantes del grupo "Aftosa". Cuanto tiempo juntos!

Lela, que te ocupaste de leer esta Tesis, y hacer correcciones.

Seba, que me ayudaste con la parte de computación.

Oswaldo y Teresa, que me proveyeron de células.

Ani y Martha, que tantas veces me ayudaron en la secretaría.

Perla, por tu simpatía, y Eva, comunicándome con quien necesité.

Estela y Marcela, en la biblioteca.

El Dr. Sergio Duffy, que me proporcionó datos epidemiológicos muy amablemente.

El Dr. Esteban Domingo y Mauricio, de España, con quienes tuvimos charlas sobre el tema de esta Tesis, y me proporcionaron la información que les pedí en tantas oportunidades.

Muy especialmente al Dr. Esteban Hopp, que fué y es mi consejero de estudios.

También muy especialmente al Dr. Oswaldo Rossetti, que me ayudó en temas generales, técnicos y científicos, a pesar que me quejé bastante...

El Dr. Eduardo Palma, mi director, a quien agradezco sinceramente el haberme guiado en mi formación para la investigación, siguiéndome en buenos y no tan buenos momentos. Muchas gracias!

Lily, que estuviste conmigo.

Mi abuela, mi hermana, que sé que desde lejos me acompaña, al igual que Magda.

Finalmente, los mas queridos, mis padres. No existen palabras para expresar lo que siento hacia ellos.

A D's.

Buenos Aires, Junio de 1995.

Abreviaturas.

aa: aminoácido.

AcM: anticuerpo monoclonal.

ADN: ácido desoxiribonucleico.

BHK-21 clon 13: línea celular de riñón de hamster lactante clon 13.

dNTPs: desoxiribonucleótidos trifosfato.

ddNTPs: dideoxiribonucleótidos trifosfato.

D.O.: densidad óptica.

DTT: ditioneitol.

EDTA: ácido etilendiamino tetraacético.

F.A.: fiebre aftosa.

hepes: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico.

MEM-G: medio mínimo esencial de Eagle modificado por Dulbecco.

m.o.i.: multiplicidad de infección.

p/p: peso en peso.

TEMED: N,N,N',N'-tetrametilendiamina.

Tris: trishidroximetilaminometano.

VFA: virus de la fiebre aftosa.

1. INTRODUCCION	1
1.1. La fiebre aftosa.....	1
1.1.1. Breve reseña histórica.....	1
1.1.2. Importancia económica y distribución geográfica	1
1.1.3. Hospedantes y síntomas producidos.....	3
1.1.4. Vectores y transmisión del VFA.....	3
1.2. El Virus de la Fiebre Aftosa	4
1.2.1. La partícula viral	4
1.2.2. El genoma del VFA	6
1.2.3. Ciclo de replicación viral.....	8
1.3. Variabilidad genética del VFA.....	9
1.3.1. Mecanismos de generación de variabilidad genética	9
1.3.2. Las poblaciones del VFA son cuasiespecies.....	10
1.3.3. Serotipos y grupos evolutivos del VFA.....	11
1.3.4. Métodos de estudio de la variabilidad	15
1.4. Sitios antigénicos del VFA.....	17
1.4.1. Los sitios antigénicos en los distintos serotipos	17
1.4.2. Variabilidad en sitios antigénicos	18
1.4.3. Base molecular de la variabilidad antigénica.....	19
1.5. El control de la Fiebre Aftosa	20
1.5.1. La lucha contra el Virus de la Fiebre Aftosa.....	20
1.5.2. Serotipos y cepas actuantes en Argentina.....	23
1.5.3. Seguimiento epidemiológico.....	26
1.6. Objetivos del presente Trabajo de Tesis.....	29
2. MATERIALES Y METODOS	30
2.1. Virus	30
2.2. Células	31
2.3. Anticuerpos monoclonales	31
2.4. Obtención de virus para su caracterización antigénica.....	33
2.4.1. Clonado viral	33
2.4.2. Producción viral.....	33
2.4.3. Concentración y purificación viral.....	33
2.5. Caracterización genómica del VFA por secuenciación de ácidos nucleicos	34
2.5.1. Extracción del ARN viral.....	34
2.5.2. Extracción del ARN de células infectadas.....	34
2.5.3. Secuenciación directa del ARN viral.....	35
2.5.3a. Reacciones de secuenciación	35
2.5.3b. Geles de poliacrilamida para secuenciación.....	36
2.5.4. Secuenciación por amplificación lineal.....	37

2.5.4a. Amplificación de regiones del genoma viral por PCR.....	37
2.5.4b. Purificación de fragmentos obtenidos por PCR.....	38
2.5.4c. Secuenciación de fragmentos de PCR por amplificación lineal.....	39
2.6. Caracterización viral con anticuerpos monoclonales.....	39
2.6.1. Ensayo de "inmunodot" enzimático.....	39
2.6.2. Ensayo electroinmunoenzimático de las proteínas virales.....	40
2.7. Medios de cultivo.....	41
2.8. Soluciones.....	41
3. Resultados.....	44
3.1. Situación epidemiológica del VFA serotipo C hasta el año 1984.....	44
3.1.1. Líneas evolutivas actuantes.....	44
3.1.2. Caracterización genómica de las proteínas estructurales de las cepas actuantes.....	44
3.1.3. Variabilidad en sitios antigénicos.....	46
3.1.4. Caracterización antigénica con anticuerpos monoclonales y su correlación con las secuencias aminoacídicas.....	46
3.1.5. Permanencia en el campo.....	48
3.2. Situación epidemiológica del VFA serotipo C desde el año 1985 hasta 1991.....	49
3.2.1. Aislamientos virales representativos.....	49
3.2.2. Caracterización de la proteínas de la cápside de las cepas actuantes.....	49
3.2.3. Variabilidad en sitios antigénicos.....	51
3.2.3a. Comparación del virus C3 Argentina/85 con el virus C3 Resende Br/55.....	51
3.2.3b. Comparación del virus aislado en Salto en el año 1991 (GELAB/SENASA N 37724) con el virus C3 Argentina/85.....	52
3.2.4. Caracterización antigénica con anticuerpos monoclonales y su correlación con las secuencias aminoacídicas.....	53
3.2.4a. Comparación del virus C3 Argentina/85 con el virus C3 Resende Br/55.....	55
3.2.4b. Comparación del virus aislado en Salto en el año 1991 (GELAB/SENASA 37724), con el virus C3 Argentina/85 y C3 Resende Br/55.....	56
3.2.5. Permanencia en el campo.....	57
3.3. Situación epidemiológica del VFA serotipo C desde el año 1992 hasta 1994.....	58
3.3.1. Líneas evolutivas actuantes.....	58
3.3.2. Virus pertenecientes al "grupo a".....	60
3.3.2a. Caracterización de las proteínas de la cápside.....	60
3.3.2b. Variabilidad en sitios antigénicos.....	62
3.3.2c. Comparación de la secuencia de los sitios antigénicos con la reactividad de un panel de anticuerpos monoclonales dirigidos a tales sitios antigénicos.....	62
3.3.3. Virus pertenecientes al "grupo b".....	64
3.3.3a. Caracterización de las proteínas de la cápside.....	64
3.3.3b. Variabilidad en sitios antigénicos.....	68

3.3.3c. Comparación de la secuencia de los sitios antigénicos con la reactividad de un panel de anticuerpos monoclonales dirigidos a tales sitios antigénicos	69
3.3.4. Virus pertenecientes al "grupo c".....	73
3.3.4a. Caracterización de las proteínas de la cápside	73
3.3.4b. Variabilidad en sitios antigénicos.....	76
3.3.4c. Comparación de la secuencia del "sitio C" con la reactividad de dos anticuerpos monoclonales dirigidos a tal sitio antigénico	78
3.3.5. Permanencia en el campo.....	80
4. DISCUSION	81
4.1. Epidemia de fiebre aftosa del año 1984: virus C3 Argentina/85	81
4.1.1. Introducción y establecimiento en la Argentina de una nueva línea evolutiva del VFA a partir del año 1984.....	81
4.1.2. Cocirculación de variantes	82
4.2. Brotes del año 1984 causados por la cepa C3 Argentina/84: importancia de los distintos sitios antigénicos en la variabilidad antigénica del VFA serotipo C	83
4.2.1. Importancia del "sitio A".....	83
4.2.2. Importancia del "sitio D".....	83
4.2.3. Importancia del "sitio III".....	85
4.3. Brotes de fiebre aftosa en el período 1992-1994: pocas sustituciones aminoacídicas pueden llevar a un gran cambio antigénico.....	85
4.3.1. "Sitio A"	85
4.3.2. "Sitio D"	87
4.4. Evolución del VFA en el campo durante 30 años: conservación de secuencias en el tiempo y variabilidad.....	88
4.4.1. Capacidad del VFA de conservar secuencias nucleotídicas por largos períodos de tiempo.....	88
4.4.2. Permisibilidad moderada del VFA serotipo C para la generación de la diversidad genética	90
4.4.3. Variabilidad del VFA bajo situaciones de distinta presión inmune.....	93
4.4.4. Mecanismos operantes en el campo bajo distinta presión inmune.....	94
5. CONCLUSIONES	97
6. BIBLIOGRAFIA.....	99

INTRODUCCION

1. INTRODUCCION

1.1. La fiebre aftosa

1.1.1. Breve reseña histórica

Uno de los primeros registros sobre fiebre aftosa, se remonta al año 1514, cuando Fracastorius describió un brote de una enfermedad en bovinos en Italia cuyas características eran semejantes a las de esta enfermedad (Fracastorius, 1546). Los animales afectados rehusaban alimentarse, y presentaban vesículas en la boca que luego descendieron a las patas. En general, tales animales se recuperaban. La enfermedad se diseminó desde el lugar en la cual fue detectada hacia otros distritos, llegando incluso a Francia e Inglaterra; la diseminación inicial se la atribuyó al efecto del viento, aunque no fueron descartados otros factores. En América se comprueba por primera vez la existencia de la enfermedad en el año 1870, afectando a bovinos en la Argentina.

En el año 1897, Loeffler y Frosch demostraron que el agente causal de la fiebre aftosa era capaz de pasar a través del filtro de Berkfeld (Loeffler and Frosch, 1897), con lo cual resultaba que era mucho más pequeño que otros microorganismos transmisores de enfermedades. De esta manera, el VFA es el primer virus animal reconocido.

El virus se ha diseminado por varias regiones del mundo, pero ha sido erradicado en distintos países gracias a eficientes medidas de control.

1.1.2. Importancia económica y distribución geográfica

La fiebreancia económica. Esto se debe a su gran difusión, su alta contagiosidad, y al efecto perjudicial que produce en los animales infectados. Mundialmente, se utilizan cerca de dos mil millones de dosis por año para controlar la enfermedad.

Las mermas en la producción animal se deben a que los animales afectados no se alimentan correctamente (tienen vesículas en la boca y en las patas), lo cual los lleva a una pérdida de peso corporal y a una menor producción de leche. Esta se haya, en ciertos casos, asociada a mastitis crónicas, generadas como consecuencia de la infección. La mortalidad es baja, excepto en animales jóvenes (Moore, 1983).

Pero el factor más importante que sumado a la menor productividad genera pérdidas económicas, es la restricción impuesta por los países libres de la enfermedad a la

importación de productos de origen animal provenientes de países en los cuales la enfermedad es endémica.

Estas restricciones son de distintos tipos; Estados Unidos, Japón y otros países como Canadá, México, Filipinas, Corea del Sur, etc., solo han permitido la importación de carnes que han sufrido un proceso de cocción (llamada política de riesgo cero). Aquí se incluyen carnes enlatadas (en las cuales la cocción se obtiene durante los procesos de preparación que requieren esterilidad de los preparados) y carne cocida congelada (en la cual, la cocción debe llegar a 80°C en todo el tejido muscular). Es de destacar que, sin embargo, los Estados Unidos han disminuido sus exigencias y comenzaron a utilizar la política de riesgo mínimo.

Los países europeos han sido tradicionalmente menos exigentes, adoptando esta última política. Permiten la importación de carnes enfriadas deshuesadas, aunque las menudencias deben ser cocidas. En todos los casos los precios son severamente castigados. La Comunidad Económica Europea ha dejado de vacunar contra el VFA desde 1993, y en consecuencia a restringido la comercialización de carnes provenientes de países pertenecientes al circuito aftósico.

De esta forma, se ha estimado que las pérdidas a nivel país producidas por la Fiebre Aftosa son de 360 millones de dólares por año. El 70% se debe al menor precio percibido. Un 20% a los costos de vacunación y un 10% a pérdidas físicas de producción (Biondolillo, comunicación personal). Una comparación con otro país exportador como Australia permite tener una idea del impacto de la Fiebre Aftosa en el comercio argentino: la Argentina exportó cuatro veces más carne vacuna de lo que exportaba Australia, y hoy este país exporta cuatro veces más que el nuestro. O el caso de Nueva Zelandia, que con la dimensión de la provincia de Santa Cruz, exporta tres veces más carne que la Argentina (De las Carreras, 1993).

Dada la gran facilidad que tiene el virus para diseminarse y su elevada contagiosidad, la fiebre aftosa se haya ampliamente distribuida en el mundo. En Sudamérica tiene carácter endémico excepto en Chile, en una zona libre en Argentina al sur del río Colorado, y desde hace muy pocos años en Uruguay, al que se ha reconocido como país libre con vacunación. No ha sido detectada en Centroamérica. En Norteamérica, los últimos brotes publicados ocurridos en Estados Unidos, Canadá y México se registraron en los años 1929, 1952 y 1953 respectivamente. En cuanto a Europa, los países Escandinavos se consideran libres de la enfermedad; en otros países tales como Francia, Inglaterra, Alemania y España se encuentra controlada y en vías de desaparición. En Africa y parte

de Asia la enfermedad toma carácter endémico. Por último, en Australia se detectó por última vez en el año 1872, y nunca se presentó en Nueva Zelanda.

1.1.3. Hospedantes y síntomas producidos

La fiebre aftosa afecta a una gran variedad de animales; entre ellos se destacan los de pezuña partida como bovinos, ovinos, porcinos y caprinos dada su importancia como productores de alimentos. También son susceptibles especies como llamas, antílopes, ciervos, jabalíes y otros, cuya importancia reside en el hecho de poder portar y transmitir el virus a los animales domésticos. En cuanto al hombre, se han reportado dos casos en los que se confirmó el diagnóstico clínico por aislamiento del virus y pruebas inmunológicas (un paciente bebió leche cruda proveniente de una vaca infectada, y el otro ordeñó una vaca infectada)(Salazhov et al., 1970).

En cuanto a la sintomatología, los animales afectados entran en un estado febril y presentan vesículas en las mucosas de la boca, nariz y espacios interdigitales; en vacas lecheras, o que amamantan, se pueden presentar tales vesículas en las ubres y epitelio de los pezones. En la necropsia, se observan con frecuencia lesiones en el rumen y en el corazón. Producen una abundante secreción de saliva y no se alimentan correctamente. Las lesiones en las patas, frecuentemente invadidas por bacterias, les producen rengueras, todo lo cual influye en su menor producción (Shahan, 1962).

1.1.4. Vectores y transmisión del VFA

El animal infectado es el principal vector transmisor del VFA. Durante la fase aguda de la enfermedad, al virus se lo encuentra en sangre, todos los órganos, tejidos, secreciones y excreciones. La diseminación entre animales en proximidad se puede dar a través del virus contenido en las lesiones podales, ya que éstas permanecen infecciosas luego de la infección (Scott et al., 1966). La infección se puede dar por inhalación, por ingestión, o por penetración de partículas infecciosas a través de lesiones en la piel. Muy pocas unidades infecciosas son suficientes para iniciar el proceso infeccioso, una de las razones de la gran facilidad de contagio. Durante la infección natural, la puerta de entrada más común parece ser el tracto respiratorio superior (Mc Vicar and Suttmoller, 1976; Suttmoller and Mc Vicar, 1976; Burrows et al., 1981). Hyslop (1965) halló virus en saliva, y Cottral et al. (1968) demostraron la presencia de virus en el semen.

Luego de la infección, si bien en general los animales se recuperan completamente, algunos de ellos pueden permanecer en estado de portadores. El estado de portador puede durar desde pocas semanas hasta años, y se puede producir incluso sin

sintomatología previa. También puede generarse como resultado de una vacunación con un virus atenuado (Sutmoller and Gaggero, 1965; Sutmoller et al., 1968). La existencia de este estado se sospechó cuando se observaba que los rebaños se infectaban luego de la introducción de animales sanos que habían padecido la enfermedad (Olitsky et al., 1928). Van Bekkum publica en 1959 el aislamiento de virus aftoso en animales recuperados (Van Bekkum et al., 1959). La importancia del estado portador radica no solo en el hecho de la permanencia del virus como fuente de inóculo, sino también en la posibilidad del virus de variar durante la replicación en estos animales. Cambios en la virulencia de virus proveniente de animales portadores fueron reportados por Sutmoller et al. (1967, 1968); así también fueron reportadas variaciones en la antigenicidad (Fagg and Hyslop, 1966; Gebauer et al., 1988).

El VFA puede ser transmitido por mamíferos, pájaros silvestres, como así también por intermedio de productos cárneos; de allí las restricciones impuestas por los países libres de la enfermedad a la importación de productos animales provenientes de países donde la enfermedad es endémica. Durante la maduración de la carne, si bien el pH desciende en el músculo (Cottral et al., 1960) hasta valores que inactivan al VFA (Henderson and Brooksby, 1948), en los nódulos linfáticos, coágulos de sangre y médula ósea no se alcanza un descenso suficiente del pH (Cottral et al., 1960), habiéndose aislado en esos tejidos virus infeccioso (Cox et al., 1961).

Por último, el virus puede permanecer infeccioso en restos animales, en el heno, en la tierra, sangre seca y otros objetos, siendo posible su diseminación a través de equipos agrícolas, personas, etc. (Shahan, 1962; Mholer and Traum, 1942).

1.2. El Virus de la Fiebre Aftosa

1.2.1. La partícula viral

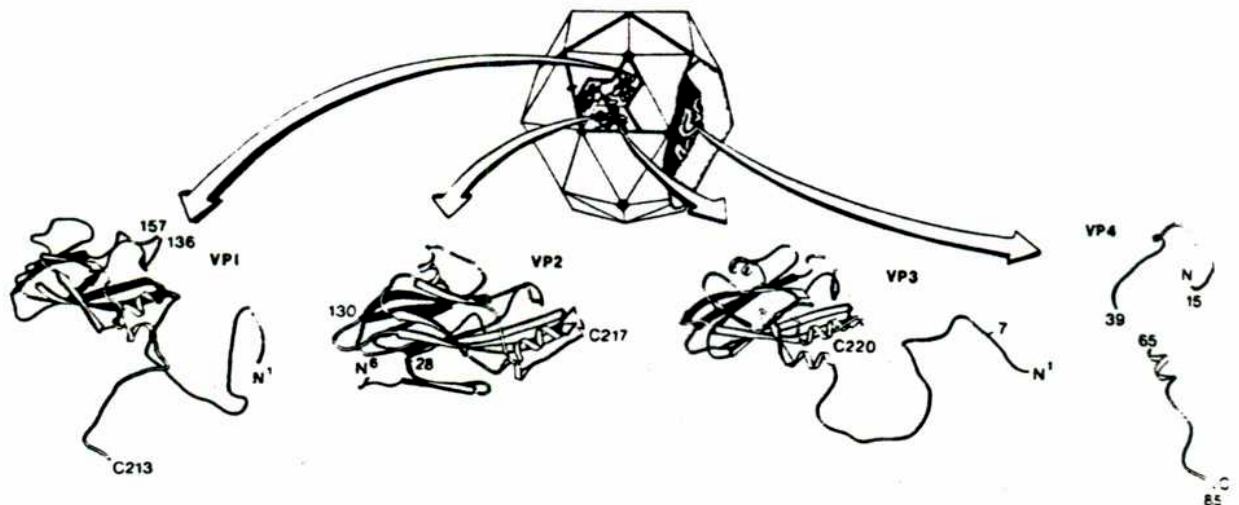
El VFA pertenece a la familia Picomaviridae, género Aftovirus. La partícula viral es de forma icosaédrica, con un diámetro de 22 nm (Vásquez et al., 1979). Tiene un coeficiente de sedimentación de 146S y una alta densidad en cloruro de cesio (1.43-1.45 g/cm³). Es inestable a pH ácido y a alta temperatura. Esta compuesta por una sola molécula de ARN que actúa como mensajero y una cubierta proteica sin envoltura lipídica.

La cápside esta compuesta por cuatro polipéptidos principales, llamados VP1, VP2, VP3 y VP4, con sesenta copias de cada uno de ellos y una copia de la replicasa viral (Newman et al., 1994). Las proteínas VP1, VP2 y VP3 tienen un peso molecular entre 27.000 y 30.000 y están fosforiladas. La proteína VP4 tiene un peso molecular entre 9.000 y

10.000, y se encuentra minustilada. También se encuentran una o dos copias del polipéptido VP0, que es precursor de VP2 y VP4 (Forss et al., 1984). Una copia de VP1, una de VP2 y una de VP3 constituyen un protómero; cinco protómeros se agrupan para formar un pentámero, que es la subunidad 12S (Vasquez et al., 1972). Estas, en número de doce, forman la cara externa de la partícula viral mientras que la proteína VP4 se halla en el interior de la misma, asociada al ARN (Chow et al., 1987).

Las proteínas VP1, VP2 y VP3 tienen una configuración espacial tridimensional similar (Figura 1). Cada una de ellas se pliega sobre si misma, varias veces, dando una estructura constituida por ocho cadenas polipeptídicas (llamada barril β); los lugares donde se pliega la proteína se llaman "loops", se encuentran expuestos, y tienen un importante papel en el contacto del virus con el medio externo. Cada pliegue recibe el nombre de una letra (A, B, C, etc.), y a los "loops" se los denomina por los pliegues que conecta (el "loop" GH de la proteína VP1 conecta los pliegues G y H)(Acharya et al., 1989). En este Trabajo de Tesis se seguirá esta nomenclatura al considerar la estructura tridimensional del VFA.

Figura 1: Representación esquemática de la partícula del VFA, mostrando la disposición de las proteínas estructurales VP1, VP2, VP3 y VP4

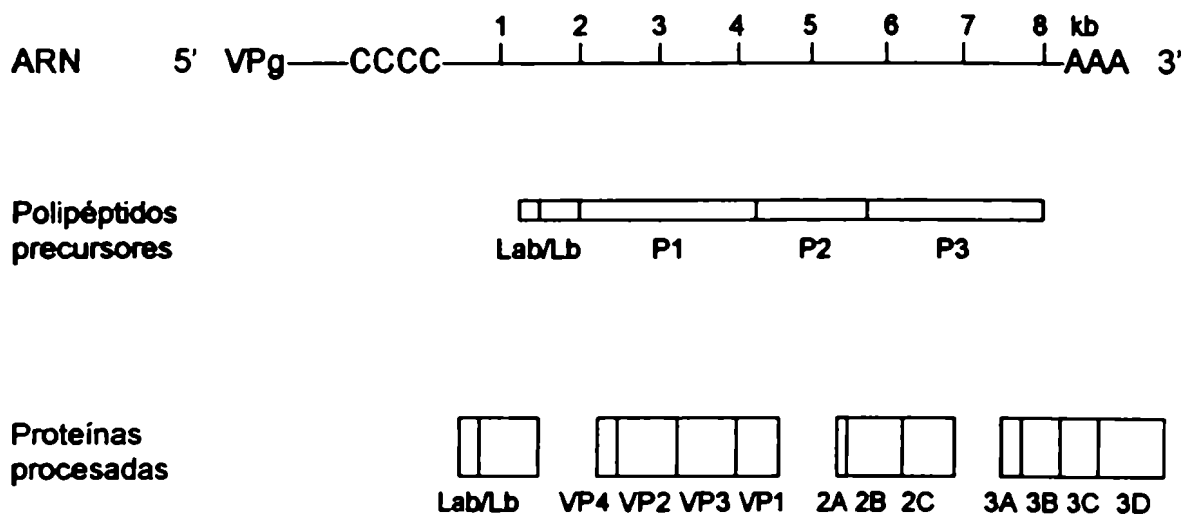


Acharya et al., 1989. Nature (London) 337, p. 711.

1.2.2. El genoma del VFA

El ARN del VFA tiene una longitud aproximada de 8.400 nucleótidos, con un peso molecular de 2.7×10^6 (Forss et al., 1984; Robertson et al., 1985). Posee un coeficiente de sedimentación de 35S. El extremo 5' se encuentra covalentemente unido a una proteína llamada VPg (Sangar et al., 1977; Grubman, 1980), la cual está codificada en el genoma viral como tres genes en tándem (Forss et al., 1984); esta parece tener una importante función en la iniciación de la replicación del ARN viral en poliovirus (Crawford and Baltimore, 1983). Es clivada en el citoplasma, previamente a la iniciación de la traducción (Ambros et al., 1978; Nomoto et al., 1976). En la Figura 2 se muestra un esquema del genoma del VFA y sus productos de expresión.

Figura 2: Esquema del ARN y proteínas del VFA



Domingo et al., 1990. Applied Virology Research 2, p. 237.

Unida covalentemente a la proteína VPg se encuentra una región no codificante de unos 1.300 nucleótidos de longitud. Esta región puede ser dividida en tres partes. Se desconoce la función de la primera de ellas, de una longitud de unas 400 bases a partir del extremo 5'. Luego se encuentra un tracto de citidinas (poliC) de una longitud que oscila entre 100 y 200 nucleótidos (Rowlands et al., 1978); este poliC parece formarse por un mecanismo de recombinación (Rieder et al., 1993). La delección del mismo no tuvo efectos en la eficiencia de la traducción en experimentos "in vitro" (Sangar et al., 1980). Rieder et al. (1993) han

demostrado que virus con trectos de poliC de longitud mayor a 75 bases tienen ventaja para la replicación en cultivos celulares. Por otro lado, transcritos con poliC de distintas longitudes, incluyendo unos tan cortos como de dos residuos, fueron igualmente virulentos en ratones.

Hacia el extremo 3' del poliC se encuentra una región de unos 700 nucleótidos, que tiene varios tripletes AUG que no se traducen. En esta región se encuentra el sitio de unión de los ribosomas (Belsham and Brangwyn, 1990; Kuhn et al., 1990). La iniciación de la traducción en ciertos miembros de la familia Picornaviridae, no parece darse por un mecanismo de rastreo ("scanning"), sino por el pegado directo de la subunidad ribosomal a este sitio. Estudios realizando mutagénesis dirigida sobre este sitio, han mostrado que mutaciones puntuales pueden llevar a un incremento de la traducción *in vivo* (Martínez-Salas et al., 1993), la cual puede explicar la mayor virulencia de ciertas cepas virales en células BHK-21.

A continuación de la región no traducida sigue la región traducida, la cual codifica para una poliproteína de PM 250.000, codificada por un único marco de lectura. Esta es clivada durante la traducción, por lo cual normalmente no alcanza a completar su longitud total. La región traducida se puede dividir en cuatro segmentos. La región L, ubicada en el extremo 5', que codifica para un polipéptido líder. Este puede comenzar en cualquiera de dos codones de iniciación (AUG) separados por 84 nucleótidos (Belsham, 1992), resultando en una proteína de PM 23.000 (Lab), o en una proteína de PM 16.000 (Lb). Ambas tienen la misma secuencia carboxilo terminal. La proteína L tiene actividad proteolítica; se autocliva del extremo amino terminal del precursor de las proteínas de la cápside, entre una lisina y una glicina (Medina et al., 1993; Palmenberg, 1990).

Luego se encuentra la región P1 que codifica para las proteínas de la cápside, en el orden VP4, VP2, VP3 y VP1. Sigue la región P2, que codifica para un precursor de PM 56.000, que es clivado para dar polipéptidos cuya función no está del todo dilucidada. Mutagénesis de la subregión 2B o 2C en poliovirus, produjo una fuerte disminución en la síntesis del ARN viral (Johnson and Samow, 1991; Li and Baltimore, 1988). La región P3, que codifica para las tres moléculas de VPg (3B), para la proteasa viral (3C) y para la polimerasa viral (3D, también llamado antígeno VIA, antígeno asociado a la infección viral) (Polatnik et al., 1967; Polatnik, 1980; Forss and Schaller, 1982; Grubman and Baxt, 1982; Klump et al., 1984; Doel et al., 1978; Robertson et al., 1983; Rueckert and Wimmer, 1984).

El extremo 3' del ARN se encuentra poliadenilado, con unas 60-80 adenosinas por molécula (Chatterjee et al., 1976). Moléculas con poliA cortos parecen tener una menor infectividad específica (Hruby et al., 1976).

1.2.3. Ciclo de replicación viral

En un primer evento, el virus se adsorbe a la membrana plasmática de la célula hospedadora (Brown et al., 1962; Baxt and Bachrach, 1982). Para la adsorción del virus a células BHK-21, es esencial la secuencia *Arg Gly Asp* en el "loop" G-H de la proteína VP1, aunque el virus puede penetrar también formando complejos antígeno-anticuerpo utilizando el receptor Fc en la superficie de la célula a infectar (Mason et al., 1994). Recientemente se ha observado que el receptor en células LLC-MK2, es una integrina (que actúa normalmente como receptor de la vitronectina), aunque no se puede desechar la posibilidad de que el virus use otros receptores celulares (Berinstein et al., 1995).

La penetración del virus a la célula hospedante se produce por fagocitosis, durante la cual se produce la pérdida de la proteína VP4 y la liberación del genoma viral al citoplasma (Baxt and Bachrach, 1980, 1982; Cavanagh et al., 1978). El ARN viral es traducido en una poliproteína, para lo cual utiliza la maquinaria biosintética de la célula hospedadora. Esta poliproteína es rápidamente clivada por proteasas celulares o por procesos autocatalíticos en subproductos hasta dar las proteínas finales (Grubman and Baxt, 1982; Vakharia et al., 1987).

La replicación del genoma viral se produce en el citoplasma (Arlinghaus and Polatnick, 1969) por la acción de una ARN polimerasa viral ARN dependiente, la cual sintetiza cadenas complementarias (de polaridad negativa) que sirven como templados para la síntesis de cadenas de polaridad positiva (Sangar, 1979). De estas últimas, algunas funcionan como templado para amplificar el genoma viral; estos mensajeros no tienen la proteína VPg (Nomoto et al., 1976; Hewlett et al., 1976). Las otras cadenas de polaridad positiva son empaquetadas para formar los viriones. La producción de estos lleva finalmente a la lisis celular, luego de la cual son liberados al medio para reiniciar el ciclo.

El ciclo de replicación viral tiene una duración que varía entre 5 y 10 horas, dependiendo de la cepa viral, hospedante, y variables relacionadas con el ambiente (temperatura, pH, multiplicidad de infección y estado nutricional de las células) (Baltimore et al., 1966). Durante el mismo se produce un aumento del ARN viral y una marcada disminución de la síntesis de las proteínas celulares (Lucas-Lenard, 1979). Esta última se puede deber a la acción de la proteasa L, que cataliza el clivaje de p220, un componente del complejo proteico de unión al "cap" (Devaney et al., 1988).

1.3. Variabilidad genética del VFA

1.3.1. Mecanismos de generación de variabilidad genética

La gran variabilidad fenotípica existente en los organismos vivos en la naturaleza, ha sido observada desde tiempos antiguos. En la Biblia se pueden leer ciertos conceptos al respecto en el relato de la creación y luego de la misma (Génesis, 1); más tarde el rey David demuestra su asombro ante la diversidad y organización que observa (Salmos 104).

Los avances en el estudio de la Biología en general han permitido comprender las bases de la gran variabilidad observada. Los ácidos nucleicos son las moléculas responsables de transmitir los caracteres hereditarios, y las variaciones en estas moléculas, junto con las influencias ambientales, son las responsables de la diversidad.

Los estudios realizados a nivel molecular permitieron entender como se genera la variabilidad en los ácidos nucleicos. Estos se deben replicar para ser transmitidos, y tanto en el ADN como en el ARN se hallaron enzimas responsables de su copia. Las ADN polimerasas se caracterizan por su alta fidelidad para el copiado del ADN; ésta se debe a un poder muy alto de selección de nucleótidos correctos, y a la posibilidad de remover nucleótidos incorrectamente incorporados, por medio de la actividad de exonucleasas. Ambos mecanismos se evidenciaron en estudios que utilizaron la ADN polimerasa del fago T4, ya que enzimas derivadas de cepas con fenotipo mutador mostraron diferente actividad (en cuanto a fidelidad de copia) con respecto a enzimas derivadas de cepas con fenotipo antimutador (Muzyczka et al., 1972; Lo and Bessman, 1976; Reha-Krantz and Bessman, 1981). La ADN polimerasa I de *Escherichia coli*, durante la síntesis del ADN, remueve nucleótidos incorrectos y recopia la información (Kornberg, 1980). De esta forma, incorpora un nucleótido falso por cada 10^9 nucleótidos copiados (Eigen et al., 1977). También las ADN polimerasas de mamíferos controlan la síntesis correcta de ADN por estos mecanismos (Murray and Holliday, 1981; Chan and Becker, 1979). Así es como en la replicación del ADN cromosomal los errores producidos varían entre 10^{-8} y 10^{-11} nucleótidos incorrectos por nucleótido incorporado.

Tal mecanismo de corrección no ha sido reportado para ARN polimerasas; además la tasa de error intrínseca de estas enzimas es mayor (Steinhauer and Holland, 1986). Se ha calculado que estas enzimas tienen un error que varía entre 10^{-3} y 10^{-4} nucleótidos incorrectos por nucleótido incorporado (Eigen and Schuster 1977; Eigen et al. 1981). De esta forma es como se observa una mayor variabilidad genética en virus cuyo genoma es ARN con respecto a virus cuyo genoma es ADN. También los ARN virus, al replicarse, pueden evolucionar mucho más rápidamente que sus hospedantes eucariotas.

Otro mecanismo responsable de la alta variabilidad genética de los virus a ARN, es el de la recombinación. Evidencia de recombinación ha sido obtenida para distintos ARN virus. En el VFA, se ha evidenciado la recombinación en experimentos llevados a cabo mediante la replicación de diferentes cepas en cultivos celulares; en tales experimentos se utilizaron marcadores inmunológicos y otros tales como inhibición por guanidinio, habilidad de replicar a elevadas temperaturas, e inactivación térmica (Pringle, 1965). Luego se hicieron mapas de recombinación para el VFA (Lake et al., 1975; Mc Cahon et al., 1977); King y colaboradores hallaron evidencia bioquímica de recombinación en el VFA (King et al., 1982) y notaron múltiples sitios de recombinación en su genoma (King et al., 1985).

A las mutaciones y a la recombinación, los virus fragmentados suman su poder de generar variabilidad mediante el reordenamiento de fragmentos genómicos (Palese, 1984).

1.3.2. Las poblaciones del VFA son cuasiespecies

La variabilidad genética del VFA ha sido ampliamente estudiada. Estudios comparando genomas, utilizando la técnica de competencia a la hibridación, determinaron entre 44 y 70% de homología entre genomas de distintos serotipos, y una homología mayor al 70% entre genomas de subtipos pertenecientes a un mismo serotipo. Mediante la técnica del mapeo de oligonucleótidos producidos luego de la digestión con la ribonucleasa T1 (T1 oligonucleotide fingerprinting), se estimó que los ARNs de virus aislados durante un brote de fiebre aftosa diferían entre sí entre 0.7% y 2.2% en su composición nucleotídica (Domingo et al., 1980; King et al., 1981; Anderson et al., 1985). Luego, mediante la técnica de secuenciación de ácidos nucleicos, se observaron distintos grados de variabilidad entre aislamientos. Aislamientos diferentes provenientes de una onda epidémica, diferían en 60 a 100 sustituciones por genoma; aislamientos contemporáneos diferían en 2 a 20 sustituciones por genoma, y genomas individuales de un mismo aislamiento difirieron en 0.6 a 2 sustituciones (Domingo et al., 1992).

La variabilidad genómica en segmentos que codifican para las proteínas de la cápside ha sido ampliamente documentada en el serotipo A (Piccone, 1989), en el serotipo O (Sáiz et al., 1993), y en el serotipo C (Piccone et al., 1988; Feigelstock et al., 1992; Mateu et al., 1994), habiéndose hallado una mayor variabilidad entre cepas del serotipo A que entre cepas de serotipos O y C.

Se realizaron estudios de variabilidad mediante el establecimiento de infecciones persistentes en animales y células, y el análisis de los virus recuperados a través del tiempo. Partiendo de virus clonados, se establecieron dos subpoblaciones genómicas con

tractos de poliC de distintas longitudes, indicando la heterogeneidad genética de una población viral replicando en un animal (Costa Giomi et al., 1988). Así también, virus recuperados de animales persistentemente infectados mostraron cambios en la carga de sus proteínas estructurales VP1, VP2 y VP3, cambios en la secuencia de las proteínas VP1 y VP3 a través del tiempo, y cambios en la antigenicidad (Gebauer et al., 1988). Luego de 30 pasajes seriados en células de virus clonados, se obtuvieron progenies virales que diferían entre ellas entre 14 y 57 nucleótidos de la secuencia (Sobrino et al., 1983).

Estas observaciones han llevado al concepto que las poblaciones del VFA (y de los virus a ARN en general) se comportan como cuasiespecies (Domingo et al., 1980). Los aislamientos naturales son poblaciones virales genéticamente heterogéneas, compuestas por múltiples genomas con secuencias únicas, que se agrupan alrededor de una secuencia consenso. Esta distribución de secuencias se mantiene en equilibrio hasta que algún factor rompe el equilibrio. Durante la replicación (natural o promovida experimentalmente), se generan constantemente variantes genotípicas. Estas se mantienen con muy bajas frecuencias, a menos que fuerzas selectivas actúen sobre ellas. Si adquirieron mutaciones que las favorecen (en la capacidad replicativa, estabilidad de las partículas, capacidad de diseminarse entre células, etc.), puede ocurrir un cambio en el equilibrio de la población, como resultado del cual la nueva secuencia predominará.

Otra forma de promover el desequilibrio, es mediante cambios ambientales, que favorecen secuencias que en las condiciones anteriores eran desplazadas. Estos cambios pueden ser presiones ejercidas por el sistema inmune en animales infectados, o cambios en las condiciones de cultivo en infecciones de cultivos celulares, como ser distintas temperaturas, acidez del medio, etc. (Domingo et al., 1990). Las mutaciones seleccionadas por presiones inmunológicas, llevan a la detección de variantes antigénicas; sin embargo, estas últimas pueden ser generadas sin haberse ejercido tal presión. Por ejemplo, en el virus de la influenza, sustituciones que afectaron la replicación afectan también la antigenicidad, habiéndose producido cambios antigénicos sin presión inmune (Domingo et al., 1993). Sin embargo, la frecuencia de aparición de variantes antigénicas, es mayor cuando la población viral esta sujeta a una presión selectiva con anticuerpos.

1.3.3. Serotipos y grupos evolutivos del VFA

El VFA presenta una gran variabilidad en cuanto a su antigenicidad. Basándose en la prueba de fijación de complemento se lo ha clasificado en siete serotipos, llamados A, O

(Valée and Carreé, 1922), C (Waldmann and Trautwein, 1926), Sat1, Sat2, Sat3 y Asia1 (Brooksby and Rogers, 1957; Brooksby, 1958). Dentro de cada serotipo se han aislado diferentes subtipos. Animales recuperados de la enfermedad provocada por un virus de un serotipo (o vacunados contra un serotipo), son susceptibles a la infección por virus pertenecientes a otro serotipo. Incluso dentro de un mismo subtipo, puede observarse baja protección cruzada, especialmente en animales primovacunados (Bergmann et al., 1988; Falczuk et al., 1993)¹.

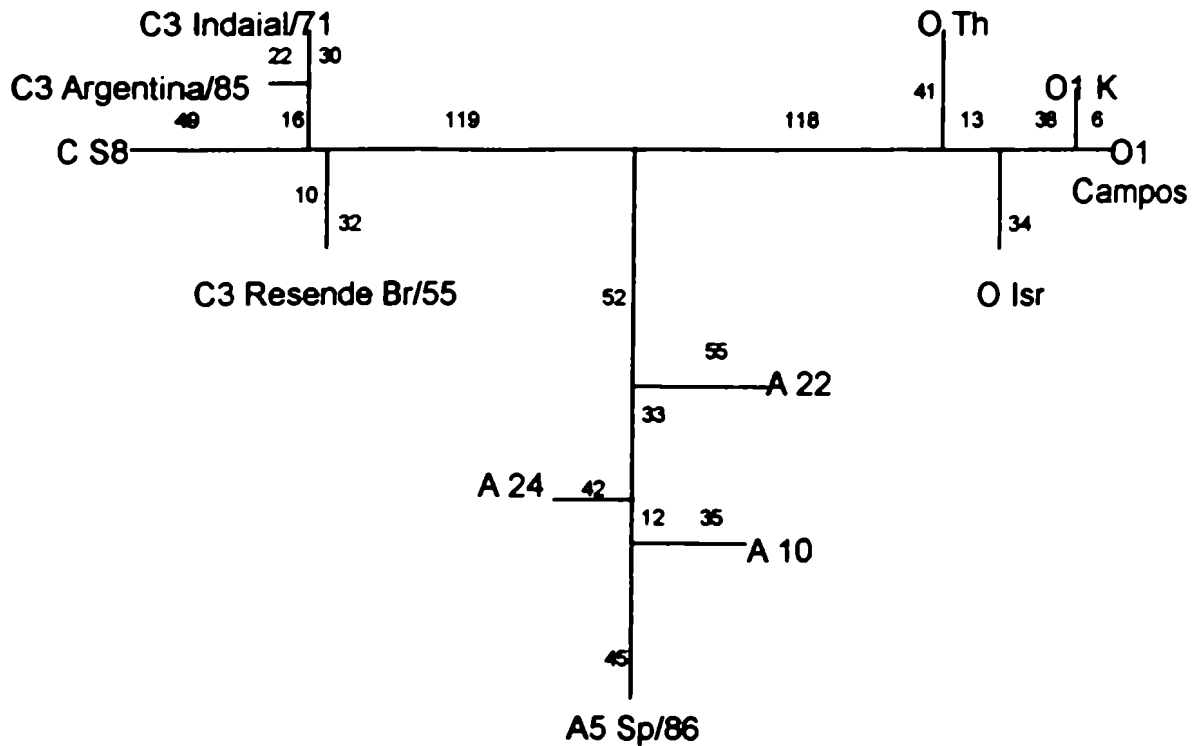
En cuanto a la distribución geográfica de los diferentes serotipos, el serotipo Asia1 ha sido aislado en Asia, los virus pertenecientes a los serotipos Sat se encuentran en África, y los virus pertenecientes a los serotipos A, O, y C se encuentran distribuidos en Sudamérica, Europa, Asia y África.

En la Argentina, se han aislado los serotipos A, O y C. Como en esta Tesis Doctoral se estudia la epidemiología de cepas de serotipo C actuantes en Argentina, se pondrá énfasis en esta introducción en tal serotipo.

Basándose en la secuencia nucleotídica de la proteína VP1 de 22 aislamientos de serotipos A, O y C, se han construido árboles filogenéticos (Dopazo et al., 1988). En la Figura 3 se muestra uno de ellos (se ha elegido la proteína VP1 dada su importancia, ya que presenta importantes determinantes antigénicos; 1.4). El estudio indica que los aislamientos poseen secuencias similares, aunque no idénticas, y se agrupan en tres, de acuerdo con los serotipos. La variabilidad observada para el serotipo A, es mayor que la observada para los serotipos O y C; esto hizo sugerir que el serotipo A sería el ancestro de los serotipos O y C. Antigénicamente, el serotipo A es también más variable que los otros dos serotipos, teniendo en cuenta el número de variantes aisladas.

¹ Se recuerda que la clasificación por subtipos se ha dejado de usar; la denominación de una nueva cepa debe incluir el serotipo, lugar y año de aislamiento según lo establecido por el Laboratorio Mundial de Referencia. Sin embargo, en este Trabajo de Tesis, como en otros trabajos de investigación publicados en estos años, se usa la terminología tradicional dada la familiarización que tenemos con la misma, lo cual permite una comprensión rápida de los virus y grupos de virus de los cuales se habla.

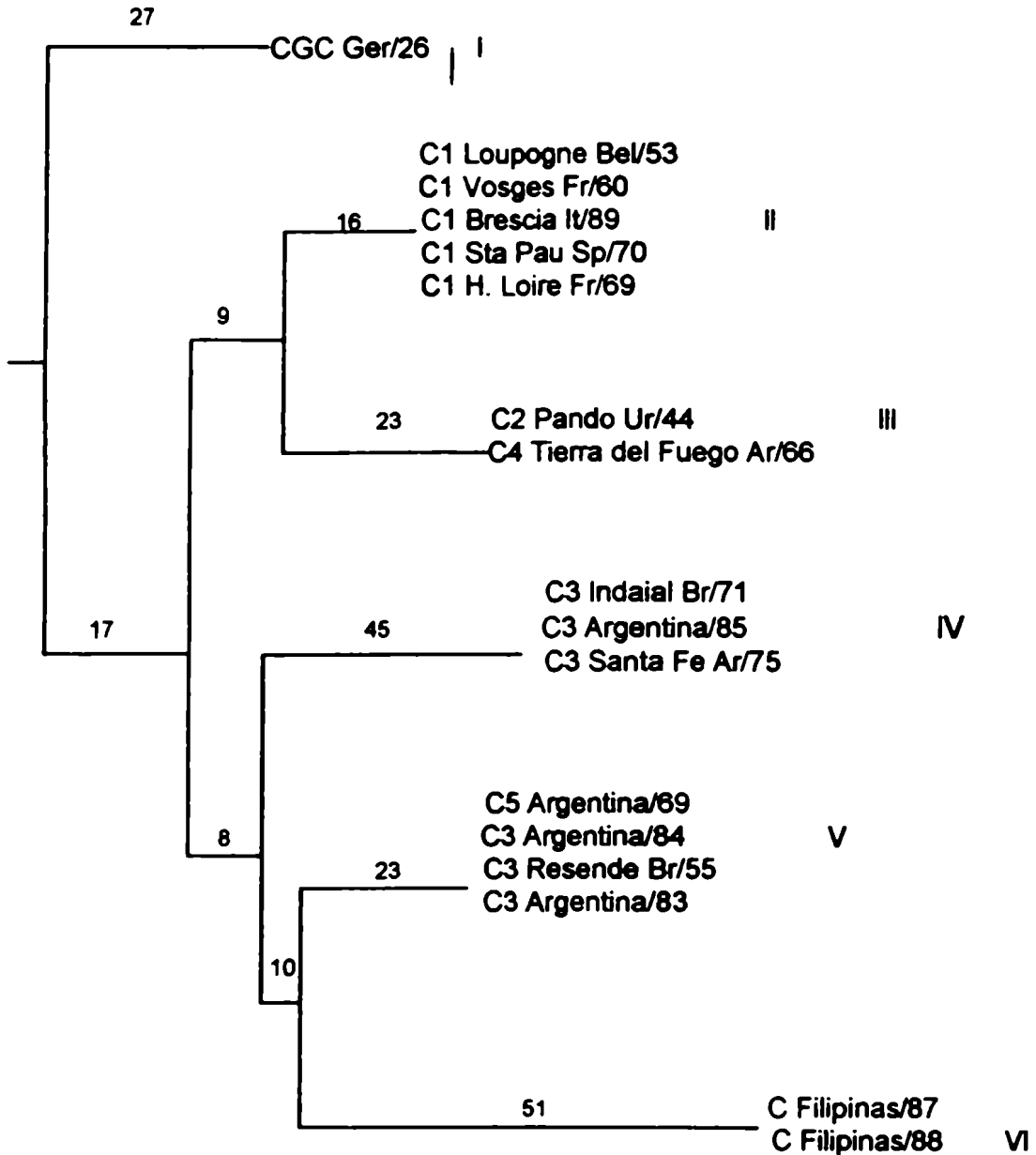
Figura 3: Arbol filogenético de aislamientos del VFA pertenecientes a los serotipos A, O y C



Domingo et al., (1990). Applied Virology Res. 2, p. 239 (con modificaciones).

La genética y antigenicidad en el serotipo C ha sido ampliamente estudiada. Se ha construido un árbol filogenético en base la secuencia nucleotídica de la proteína VP1 de 26 aislamientos de serotipo C, provenientes de distintas partes del mundo (Figura 4) (Martínez et al., 1992).

Figura 4: Arbol filogenético de aislamientos de VFA serotipo C



Martínez et al., (1991). J. Virol. 66, p. 3559 (con modificaciones).

Este árbol muestra que los aislamientos se agrupan en 6 grupos evolutivos. El grupo I está compuesto por un aislamiento, el más antiguo disponible (CGC Ger/26), que se considera hoy extinto. Al grupo II pertenecen los aislamientos europeos, de subtipo C1. Los grupos III, IV y V están compuestos por aislamientos sudamericanos, pertenecientes a los serotipos C2, C3, C4 y C5. El grupo VI, lo compone un par de aislamientos de la Islas

Filipinas. Es de destacar que los aislamientos europeos se agrupan juntos en un solo grupo evolutivo (y en un solo subtipo), mientras que los aislamientos sudamericanos se encuentran distribuidos en tres grupos evolutivos (y en cuatro subtipos), reflejando diferencias en la epidemiología entre los dos continentes (Martínez et al., 1992). Un árbol genealógico hecho en base a la secuencia nucleotídica de las cuatro proteínas de la cápside (región P1), tomando ocho aislamientos, revela las mismas relaciones entre los diferentes virus (Martínez et al., 1992).

También para el serotipo O se han obtenido este tipo de árboles filogenéticos. En base a la secuencia nucleotídica de la proteína VP1 se definieron cuatro grupos, tres de los cuales se correlacionan con el área geográfica de aislamiento. Los virus que circularon en Argentina, O1 Caseros/67 y O1 Yrigoyen/82, se sitúan en un mismo grupo evolutivo. Sin embargo el virus O1 Campos Brasil/58, se encuentra dentro de uno de los grupos de virus europeos, indicando que probablemente han ocurrido intercambios de virus entre los dos continentes (Sáiz et al., 1993). Por último, otro grupo evolutivo está integrado por virus aislados en el norte de África, en el Medio Oriente y en Europa.

1.3.4. Métodos de estudio de la variabilidad

Se han utilizado distintos métodos para el estudio de la variabilidad en el VFA, algunos basados en técnicas serológicas e inmunológicas, y otros basados en técnicas bioquímicas.

Un método antiguo que se sigue utilizando es la prueba de fijación de complemento (Traub and Mohlmann, 1943). Se basa en la capacidad que tiene éste de lisar glóbulos rojos de camero sensibilizados con anticuerpos de conejo (anti-glóbulos rojos de camero). Sin embargo, el complemento pierde esta capacidad en presencia de complejos antígeno-anticuerpo, ya que estos últimos lo "fijan". De esta forma, la lisis de glóbulos rojos indica la falta de formación de complejos, mientras que la falta de lisis pone de manifiesto la formación de éstos complejos. Comparando el grado de unión de un suero hiperinmune frente a un antígeno homólogo y un antígeno heterólogo, se puede medir el parentesco entre los distintos virus analizados. Este fue el método establecido por el Laboratorio Mundial de Referencia para clasificar al VFA.

La seroprotección en ratón lactante (Cunha et al., 1957) mide la protección brindada por distintos virus al ser usados como vacunas, frente a la descarga con virus vivo. Estos animales son muy sensibles al VFA, ya que mueren al ser infectados. Así también, en el ensayo de seroneutralización en células (Arbelaez et al., 1979) se observa el efecto citopático causado sobre cultivo de células, por virus previamente incubado con sueros

provenientes de animales vacunados con virus homólogo o heterólogo. La comparación del grado de neutralización brindada da una idea de la afinidad antigénica de los virus analizados. Para evaluar la capacidad protectora de una vacuna en bovinos, se los vacuna con la misma y luego se los descarga con virus homólogo. Cuando se utiliza virus heterólogo, se puede medir el parentesco entre los virus usados.

El test de ELISA (Hamblin et al., 1986) se está utilizando extensivamente en el VFA, con anticuerpos mono y policlonales. Permite tipificar virus, y determinar grados de homología antigénica. También se lo usa para caracterizar isotipos de anticuerpos producidos contra el VFA, con lo cual se puede estudiar y comparar la respuesta producida por animales frente a la infección y frente a la vacunación con distintos tipos de vacunas. Recientemente se ha desarrollado un test de ELISA en fase líquida para el VFA, que permite estimar el grado de protección que brindará una cepa al ser usada como vacuna en bovinos (según el título de anticuerpos producidos por los animales, sin necesidad de realizar la descarga).

Otros métodos semejantes son los ensayos de "inmunodot" e inmunoelectrotransferencia de proteínas que se describen en Materiales y Métodos de esta Tesis Doctoral.

Otro método que se ha utilizado en el VFA es el mapeo de oligonucleótidos (La Torre et al., 1982). Consiste en digerir los genomas de las cepas a analizar con nucleasas específicas, y separar los oligonucleótidos resultantes mediante electroforesis en geles bidimensionales de poliacrilamida. Estos geles separan oligonucleótidos según longitud y composición. Luego se observa el patrón de manchas radioactivas desarrollado por cada cepa, y se compara entre las distintas cepas.

Finalmente, la secuenciación de ácidos nucleicos permite ver diferencias existentes a nivel de nucleótidos. Las secuencias nucleotídicas permiten trazar parentescos y determinar orígenes y grupos evolutivos de los virus, mientras que las secuencias aminoacídicas permiten observar diferencias estructurales, que pueden afectar la antigenicidad. En la sección Materiales y Métodos de esta Tesis Doctoral, se describe esta técnica en mayor detalle.

1.4. Sitios antigénicos del VFA

1.4.1. Los sitios antigénicos en los distintos serotipos

Con el uso de anticuerpos monoclonales, mutantes virales resistentes a la neutralización por tales anticuerpos monoclonales y péptidos sintéticos, se han identificado sitios antigénicos en el VFA, en los serotipos A (Baxt et al., 1989; Saíz et al., 1991; Thomas et al., 1988), O (Kitson et al., 1990; Xie et al., 1987; Parry et al., 1985, 1989a) y C (Mateu et al., 1989, 1990; Lea, Hernández et al., 1994). Estos estudios se basan en la secuenciación de variantes antigénicas, que escapan a la neutralización ejercida por anticuerpos monoclonales neutralizantes, como así también, en ensayos de competencia en la reactividad con anticuerpos monoclonales entre virus y péptidos sintéticos que mimetizan segmentos de la partícula viral.

Tales sitios antigénicos se hallan distribuidos en tres de las cuatro proteínas estructurales. El considerado de mayor importancia, llamado "sitio A" (Strohmaier et al., 1982), se encuentra en la proteína VP1; en el serotipo C, este sitio está comprendido entre los aminoácidos 137 y 151. Estudios previos habían mostrado que el clivaje de la proteína VP1 con tripsina disminuía la inmunogenicidad de las partículas virales (Wild et al., 1969); luego se aislaron segmentos de esta proteína los cuales demostraron inducir anticuerpos neutralizantes y protección parcial (Laporte et al., 1973; Bachrach et al., 1975, 1979). Péptidos sintéticos que mimetizaron esta región, indujeron anticuerpos neutralizantes en animales de laboratorio (Bittle et al., 1982; Pfaff et al., 1982). En el serotipo C, dicho sitio está compuesto por al menos once epitopos neutralizantes continuos, parcialmente superpuestos (Mateu et al., 1988, 1989, 1990). Estudios de cristalografía y difracción de rayos X, han revelado que este sitio se encuentra en un "loop" (el "loop" GH de la proteína VP1) protruyente y móvil (Acharya et al., 1989; Lea, Hernández et al., 1994).

En el extremo carboxilo terminal de la proteína VP1 se halla otro sitio antigénico, el "sitio C". Si bien en el serotipo C este sitio es independiente del "sitio A", en el serotipo O, el "sitio C" forma con el "sitio A" un solo sitio discontinuo, llamado "sitio I".

El sitio antigénico "D" definido para el serotipo C, es un sitio discontinuo que implica más de una proteína. En los serotipos A, O y C se encuentra formado por parte de las proteínas VP2 (el "loop" BC, aminoácidos 70 a 80) y VP3 (el "knob" BB, aminoácidos 58 a 61) y sería el equivalente a los sitios "II" y "IV", definidos para el serotipo O. En el serotipo C, participa del mismo parte de la proteína VP1 (alrededor del aminoácido 193). En el serotipo O, el "loop" EF de la proteína VP2 (aminoácidos 131 a 134), también participa en este sitio antigénico.

Por último, en el serotipo O, se ha identificado otro sitio antigénico en el "loop" BC de la proteína VP1 (aminoácidos 43 a 48), llamado "sitio III". Se ha encontrado que algunas sustituciones en este sitio pueden alterar la antigenicidad del "sitio A" (Parry et al., 1990). En el serotipo A, un sitio equivalente a éste sería el hallado en el "loop" HI (alrededor del aminoácido 170), de la misma proteína.

Es de destacar que la superficie de la partícula del VFA es lisa, con pocas protrusiones. Por ello, a pesar de la definición de los mencionados sitios antigénicos, si se extendieran los estudios con mayores paneles de anticuerpos monoclonales, probablemente se demostraría que todas las regiones expuestas de la cápside viral serían antigénicas (Lea, Hernández et al., 1994).

1.4.2. Variabilidad en sitios antigénicos

La secuenciación de los genes que codifican para las proteínas de la cápside de diferentes cepas virales correspondientes a los serotipos A, O y C, ha mostrado zonas de mayor variabilidad. Estas corresponden mayormente a los aminoácidos que comprenden los sitios antigénicos "A", "C" y "III", en la proteína VP1.

En el serotipo C, la variabilidad en los sitios antigénicos ha sido ampliamente descrita (parte de tales estudios corresponden a los resultados mostrados en esta Tesis Doctoral). Estos conocimientos se han logrado mediante la secuenciación nucleotídica de la región del genoma que codifica para las proteínas de la cápside de diferentes aislamientos virales (correspondientes a las distintas líneas evolutivas), y mediante ensayos en los cuales se cuantificó la reactividad de tales aislamientos con anticuerpos monoclonales dirigidos a los sitios antigénicos.

Una gran diferencia se ha encontrado al medir la reactividad de los diferentes aislamientos con anticuerpos monoclonales neutralizantes, con respecto a los no neutralizantes. Los epitopos reconocidos por estos últimos están ampliamente conservados entre las diferentes cepas estudiadas, mientras que los reconocidos por anticuerpos monoclonales neutralizantes muestran una gran variación. Esta diferencia puede deberse a la falta de selección ejercida sobre los epitopos no neutralizantes, o a impedimentos estructurales en las regiones que comprenden tales epitopos, que impiden la generación de variabilidad (Mateu et al., 1988).

En cuanto al "sitio A", algunos de los epitopos donde mapean los anticuerpos monoclonales dirigidos a este sitio se hallan conservados, mientras que otros presentan gran variabilidad entre los distintos aislamientos. Algunos aislamientos estudiados no

reaccionaron con ninguno de los anticuerpos monoclonales testeados; otros han reaccionado con todos. Los epitopos donde mapean los anticuerpos monoclonales dirigidos al "sitio C", se hallan ampliamente conservados entre los aislamientos estudiados. En general se puede observar que, teniendo en cuenta la reactividad, las cepas europeas (pertenecientes a las líneas evolutivas I y II) pueden agruparse en un grupo, y las cepas sudamericanas (pertenecientes a las líneas evolutivas III, IV y V) en otro, más heterogéneo (Mateu et al., 1989; Martínez et al., 1991).

Estudios recientes han permitido describir la variabilidad antigénica en el "sitio D". Tales estudios han mostrado una variación similar en este sitio al compararlo con el "sitio A". También han mostrado que los virus se pueden agrupar (teniendo en cuenta la reactividad del "sitio D") de la misma forma que se agrupaban en base a la reactividad del "sitio A". Se observa una mayor variación entre aislamientos sudamericanos que entre aislamientos europeos. Estos últimos presentan un patrón de reactividad muy similar con los distintos anticuerpos monoclonales testeados.

Estos estudios han permitido dar una explicación a ciertas discrepancias entre resultados serológicos y reactividad con anticuerpos monoclonales. Los virus C1 Haute Loire Fr/69 y C5 Argentina/69 difieren marcadamente en su reactividad en el "sitio A" con respecto a otros virus emparentados (europeos y sudamericanos, respectivamente). Han modificado todos los epitopos de este sitio. Sin embargo, serológicamente, C1 Haute Loire Fr/69 es muy parecido a los demás virus europeos C1, mientras que C5 Argentina/69 es tan diferente a los demás virus sudamericanos que fue clasificado como un nuevo subtipo. Tal discrepancia se puede entender considerando la reactividad de ambos virus en el "sitio D"; el virus francés es muy similar en este sitio a los demás virus europeos, mientras que el virus argentino se puede diferenciar (también en este sitio) de los demás virus sudamericanos. Estos resultados han mostrado la importancia del "sitio D" en la generación de la variabilidad antigénica del VFA en el serotipo C (Mateu et al., 1994).

1.4.3. Base molecular de la variabilidad antigénica

La secuenciación de diferentes cepas virales dentro del serotipo C, ha permitido comprender la base molecular de la variabilidad antigénica observada. Tal variabilidad se genera por sustituciones aminoacídicas dentro del segmento peptídico del sitio antigénico. En el "sitio A", dos mecanismos de variación antigénica han sido descritos: uno mediado por la acumulación sucesiva de sustituciones aminoacídicas y otro por mutaciones puntuales, en posiciones críticas, dentro del sitio antigénico (Martínez et al., 1991). El "sitio A" consta de un segmento constante, que incluye la secuencia RGD, responsable de la

adsorción del virus a la célula, rodeado a ambos lados por una región hipervariable. Sustituciones en tales posiciones hipervariables llevan a la modificación gradual de epitopos. Las posiciones 145 y 146, por otro lado, han demostrado tener un efecto drástico en la antigenicidad de este sitio. Sustituciones en ese residuo han causado la modificación de la mayoría de los epitopos. Tales sustituciones las poseen los virus mencionados en la sección anterior (1.4.2), C1 Haute Loire Fr/69 y C5 Argentina/69 (Mateu et al., 1990; Mateu et al., 1994).

En el "sitio D" también se ha encontrado que ciertas posiciones parecen ser claves en el reconocimiento antigénico, ya que en mutantes resistentes a anticuerpos monoclonales dirigidos a este sitio, y en cepas de campo provenientes de animales infectados (algunos de ellos vacunados), se han encontrado repetidamente sustituciones en posiciones específicas. Tales posiciones son los residuos 74 de la proteína VP2, 58 de la proteína VP3 y 193 de la proteína VP1 (Mateu et al., 1994; Lea, Hernández et al., 1994).

Al comparar secuencias de aislamientos virales en los sitios "A" y "D", se observa que el primero es mucho más variable que el segundo (a pesar que antigénicamente ambos poseen un grado de variabilidad similar, 1.4.2). Se ha sugerido que esta diferencia en variabilidad se puede deber a una mayor tolerancia a la variación por parte del segmento peptídico incluido en el "sitio A", debida a la estructura del mismo, ya que éste es un "loop" flexible, razón por la cual estaría menos expuesto a restricciones estructurales. Por otro lado, el discontinuo "sitio D", formado por la interacción de tres proteínas, podría tener una menor aceptación de cambios, lo cual explicaría su menor variabilidad (Mateu et al., 1994).

Esta hipótesis concuerda con la que propone que la variabilidad se genera por cambios debidos a la baja fidelidad en la replicación del genoma por parte de la ARN polimerasa, que no están sujetos a una selección negativa (Díez et al., 1989, 1990). Otra hipótesis sugiere que en las zonas más variables, la enzima tiene una menor fidelidad en la copia, ya sea por la estructura secundaria que posee el ARN en esa zona, u otros efectos debidos a la secuencia (Weddell et al., 1985).

1.5. El control de la Fiebre Aftosa

1.5.1. La lucha contra el Virus de la Fiebre Aftosa

Varios son los factores que dificultan el control de la fiebre aftosa. Entre ellos se encuentran la gran contagiosidad de la enfermedad, la complejidad de la respuesta inmunológica, la variación antigénica experimentada por el virus, la diversidad de

hospedantes y la existencia de portadores sanos. En países como el nuestro se suman otros tipos de problemas, relacionados con el manejo de la hacienda y vacunación. Los lugares donde se cría a los animales, en muchas ocasiones no coinciden con los campos de engorde; además, la hacienda se vende en mercados que pueden estar lejos de los campos de producción. De esta forma, se generan movimientos de animales vivos que pueden trasladar el agente infeccioso entre distintos partidos, provincias y regiones. El manejo extensivo de la hacienda, con la consiguiente necesidad de reunir a todo el ganado, impide muchas veces la vacunación de todo el rodeo; la prolongada época de parición, provocaba que los terneros no sean vacunados en el momento oportuno.

Sin embargo, varios países han logrado eliminar la fiebre aftosa utilizando severas medidas de control. En la Argentina se está llevando a cabo un plan nacional de erradicación que está dando resultados muy satisfactorios, a tal punto que desde el mes de abril del año 1994 hasta el momento de escribir esta Tesis no se han registrado brotes de fiebre en todo el territorio nacional. Las autoridades sanitarias han pronosticado que a más tardar en 1997, la Argentina estaría en condiciones de convertirse en un país libre de aftosa con vacunación.

En los países libres de la enfermedad, como los Estados Unidos, al aparecer un brote se procede a aplicar la medida del "rifle sanitario" (Bruner and Gillespie, 1966). Esta consiste en el sacrificio de los animales infectados y los que estuvieron en contacto con ellos; los cadáveres son enterrados en el lugar o incinerados, y se procede a la desinfección del campo afectado. Luego de treinta días, se colocan en el lugar animales susceptibles, y si luego de treinta días estos no desarrollan síntomas asociados con la enfermedad, el ganadero comienza a adquirir ganado gradualmente. Los ganaderos son instruidos en el sentido de declarar la aparición de focos, y son indemnizados por el gobierno por los gastos ocasionados (Bachrach, 1968).

En países como el nuestro, donde la enfermedad es endémica, se vacuna periódicamente a todo el ganado mediante planes de vacunación previamente concebidos, para protegerlo de posibles infecciones e impedir la diseminación viral (Alonso Fernández et al., 1981). Se ha atribuido a la vacunación sistemática el decrecimiento de brotes de fiebre aftosa en bovinos en Europa (Brooksby, 1967; van Bekkum et al., 1963).

Las vacunas utilizadas para combatir al VFA son a virus inactivado, y muy raramente a virus atenuado. Esta última se ha utilizado en Venezuela; se basa en que al multiplicar el virus seriadamente en cultivos celulares o hospedantes no naturales, el mismo pierde parte de su infecciosidad, siendo inofensivo para el animal pero capaz de montar una respuesta inmunológica. Si bien el replicar en el hospedante (a diferencia de las vacunas

inactivadas) tiene la ventaja de presentar más antígenos y despertar una respuesta celular (muchas vacunas utilizadas en seres humanos solo han podido lograrse mediante la atenuación), el uso de este tipo de vacunas tiene el inconveniente que éstas pueden no alcanzar una total atenuación para los distintos hospedantes e incluso revertir a su forma infecciosa (Polacino et al., 1985).

La inactivación del virus para la preparación de vacunas a virus inactivado, se logra con agentes químicos como formaldehído o acetiltilenimina; si bien tal tratamiento puede influir en la antigenicidad de las proteínas de la cápside, las vacunas así preparadas dan buena protección. Tienen el inconveniente de la necesidad de ser mantenidas en frío, lo cual es un problema en sistemas de producción extensivos como el nuestro. La inmunidad conferida por tales vacunas es de corta duración, mucha menor a la conferida luego de la infección natural. Además, puede quedar virus residual activo, y durante el proceso de producción pueden generarse escapes de virus. En Europa, donde la enfermedad se encuentra controlada, brotes aparecidos entre los años 1968 y 1981 fueron atribuidos a una insuficiente inactivación viral y a fugas de las plantas productoras (King et al., 1981).

Para aumentar la respuesta inmune de las vacunas, se agrega al antígeno sustancias llamadas adyuvantes. En el caso de la vacuna contra el VFA, se ha usado hidróxido de aluminio, ya que además de cumplir con tal propósito, no es tóxica para los animales. Se le agrega también saponinas, pues con ellas se observó un mayor título de anticuerpos en sueros de animales vacunados. De esta forma, el animal vacunado queda protegido por un período de tres a cuatro meses, luego del cual debe ser revacunado. Con los adyuvantes oleosos se ha logrado aumentar el tiempo de protección a seis meses en animales primovacunados, y hasta un año en animales revacunados (Rivenson, 1979). Están compuestos por un aceite mineral, un detergente que facilita la formación de la emulsión y una sustancia antiespumante. Estos adyuvantes son los que se utilizan actualmente en la campaña de vacunación en Argentina, con los cuales se logró disminuir de tres a dos las dosis anuales.

El nivel y duración de la inmunidad generado por las vacunas, depende de varios factores. Entre ellos, la calidad de la vacuna; es decir, la concentración de antígeno en estado óptimo (partículas 146S). También, el número de vacunaciones recibido por el animal, ya que una segunda vacunación induce una respuesta secundaria, habiéndose observado distintos grados de protección en animales primovacunados que en animales revacunados. Por parte de los animales, la variación individual debido a diferencias genéticas o de alguna otra índole, producen variabilidad en la respuesta inmunológica. Así

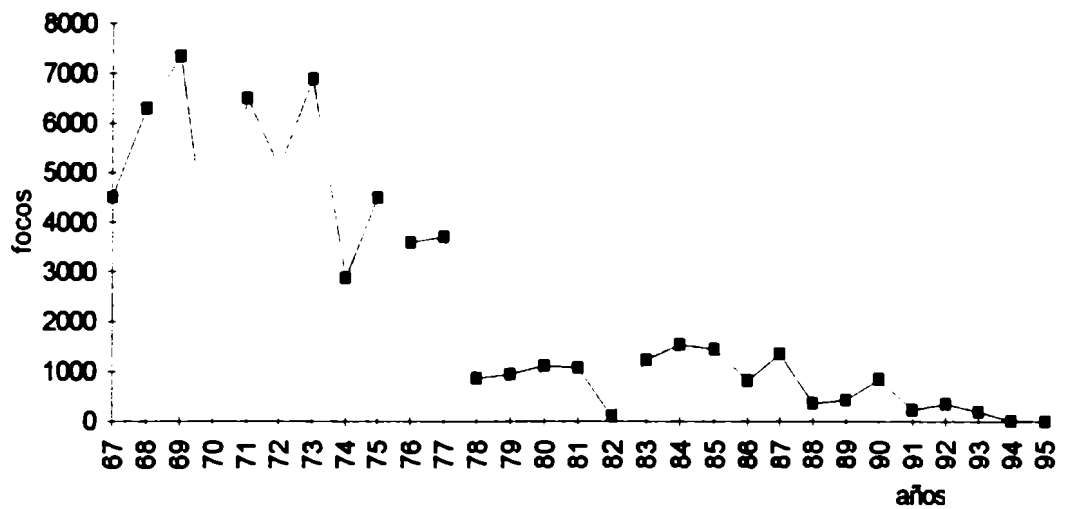
también, la edad de los animales puede afectar la respuesta; en animales jóvenes, los anticuerpos maternos pueden interferir con el antígeno (Domingo et al., 1990).

Dados los inconvenientes que presentan las vacunas clásicas, y con el advenimiento de la tecnología de la ingeniería genética, se están probando actualmente nuevas vacunas. Algunas de ellas consisten en fragmentos antigénicos del VFA, expresados como proteínas de fusión; para ello, se realizan las construcciones deseadas y para expresarlas se usan diversos sistemas, como ser bacterias, baculovirus-células de insectos, virus vaccinia, etc. También las nuevas vacunas pueden consistir en péptidos sintéticos, libres (Bittle et al., 1982; Di Marchi et al., 1986) o unidos a proteínas "carrier" (Clarke et al., 1987). Otra alternativa es la producción de cápsidas vacías, que tendrían la ventaja de presentar epitopos discontinuos, difíciles de mimetizar con péptidos sintéticos (Lewis et al., 1991). Este tipo de vacunas está en etapa de experimentación, esperándose resultados en poco tiempo.

La importancia de estas vacunas radica en ser seguras, y su mayor vida útil sin necesidad de mantenerlas en frío. El uso de las mismas puede ser beneficioso especialmente en países como el nuestro, donde, al haber disminuido en forma muy importante los brotes naturales de fiebre aftosa, los escapes de plantas productoras, como demás factores asociados a manipulación de virus activo en gran escala, pueden transformarse en un problema mayor. Especialmente teniendo en cuenta la decisión de dividir al país en zonas de distinto estatus: zonas libres, zonas de transición y zonas endémicas.

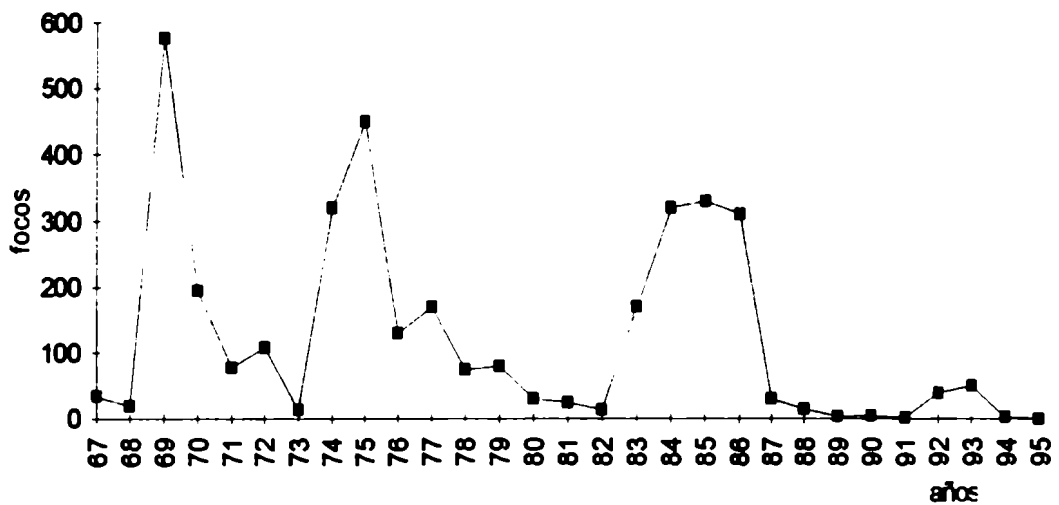
1.5.2. Serotipos y cepas actuantes en Argentina

En los siguientes gráficos, se muestra el número de focos de fiebre aftosa en bovinos totales y los causados por cepas de serotipo C, desde el año 1967.



Fuente: Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias (CICV), INTA.

Gráfico 2: Focos de Fiebre Aftosa registrados en Argentina desde 1967 causados por cepas de serotipo C.



Fuente: Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias(CICV), INTA.

En la Argentina, los serotipos actuantes fueron O, A y C con predominancia de cepas de serotipo O y A. Las cepas actuantes de serotipo O fueron O1 Campos Brasil/58 y O1

Caseros Argentina/67 (antigénicamente similares), y cepas relacionadas, como la O1 Yrigoyen/82.

En cuanto al serotipo A, en Argentina predominó hasta el año 1976 la cepa A24 Argentina/68, aislada en bovinos vacunados, y relacionada con la cepa A24 Cruzeiro Brasil/55. Fue usada como cepa vacunal hasta el año 1981. En el año 1979 se aísla la cepa A Argentina/79, distinta genética y antigénicamente de la anterior (Alonso Fernández et al., 1981), y luego de dos años se introduce en la preparación comercial de la vacuna. Luego es reemplazada por la cepa A Argentina/81, genéticamente distinta a la cepa que le precedió (Piccone, 1989). En el año 1987 volvieron a aparecer focos de fiebre aftosa en distintos lugares del país, causados por cepas de serotipo A. Se aisló la cepa A Argentina/87, que luego de un año reemplazó a la anterior como cepa vacunal, y que presentó homología con la cepa A Argentina/81.

En la última década se notó un mayor número de focos causados por cepas de serotipo C. Dentro de este serotipo, han actuado distintos subtipos. Hasta el año 1984, el virus predominante fué C3 Resende Br/55. Este virus era el usado en la preparación comercial de la vacuna. Sin embargo, en los años 1969-1970 se aisló un virus muy diferente serológicamente al virus vacunal (Arrowsmith, 1975) y fue clasificado como un nuevo subtipo, C5 Argentina/69 (Pereira, 1977). Luego se observó que este virus era genéticamente muy parecido al virus vacunal, C3 Resende Br/55, solo que poseía mutaciones importantes en sus sitios antigénicos (Mateu et al., 1994; 1.4). En los años 1974-1975 se aísla una variante, C3 Santa Fe Argentina/75, y se determina en 1989 que tiene como origen un virus brasileño, C3 Indaial Br/78 (Piccone, resultados no publicados). Este virus tuvo poca difusión a nivel de campo.

Entre los años 1983 y 1986, se nota un incremento en el número de focos de fiebre aftosa causados por cepas de serotipo C (Gráfico 2). Se aíslan las cepas C3 Argentina/83 y C3 Argentina/84, notándose un gran parecido de las mismas con el virus vacunal, C3 Resende Br/55, en la proteína VP1 (Piccone et al., 1988) (los resultados obtenidos con respecto al resto de las proteínas de la cápside, se describen en ésta Tesis Doctoral, 3.1). También se aísla la cepa C3 Argentina/85; ésta demuestra pertenecer a la línea del virus C3 Indaial Br/78 (Piccone et al, 1988).

Los virus C3 Resende Br/55 y C3 Argentina/85, se diferencian en la proteína VP1 no solo en mutaciones puntuales, sino también en la delección de un codón entero: el virus C3 Resende Br/55 presenta una glutamina en el codón 48, mientras que en el virus C3 Argentina/85 falta ese codón. Además, el extremo carboxilo terminal de la misma proteína está constituido por una leucina en el virus C3 Argentina/85, como en la mayoría de los

virus estudiados correspondientes a los distintos serotipos; mientras que en el virus C3 Resende Br/55, esta posición es ocupada por una serina. El brote es controlado mediante la introducción de la cepa C3 Argentina/85 como cepa vacunal, en lugar de la cepa C3 Resende Br/55. Esa cepa se sigue usando hasta hoy como cepa vacunal contra virus de serotipo C.

1.5.3. Seguimiento epidemiológico

El éxito de las campañas de erradicación de la fiebre aftosa basadas en la vacunación preventiva de la población de animales susceptibles, depende en gran medida de la cobertura inmunológica brindada por las vacunas, de la calidad de las mismas, y de la continuidad de la campaña.

La elección de la o las cepas a incluir en la vacuna, dependerá de la presencia de las mismas en el campo, y su importancia. Para ello se deben caracterizar los virus circulantes, y determinar su grado de importancia epidemiológica. Esto se logra mediante la tipificación y subtipificación rutinaria de todos los focos. Una vez lograda esta caracterización, se eligen las cepas más representativas, y se prueba la capacidad de replicación que tienen éstas en los sistemas que se utilizarán para la producción de antígenos, como así también su resistencia a la degradación durante los procesos de elaboración (Alonso Fernández et al., 1976). Finalmente se debe definir su cobertura inmunológica, en relación a las demás cepas circulantes en el campo. La importancia de la cobertura radica no solo en la protección que puede brindar frente a nuevas cepas, sino que una vacuna con un amplio espectro antigénico, disminuye en sí la posibilidad de aparición de nuevas variantes (Alonso Fernández et al., 1973).

Como no existe inmunidad cruzada entre serotipos, por cada serotipo actuante en la región a cubrir, se debe incluir uno en la vacuna. Si la cobertura brindada por la cepa representativa del serotipo no es suficiente para todas las cepas de ese serotipo, se deberá incluir más de una cepa de ese serotipo. En la Argentina, por ejemplo, se utiliza actualmente una vacuna cuativalente, a pesar de circular solo tres serotipos. Esta vacuna esta compuesta por dos cepas del serotipo A (A Argentina/79 y A Argentina/87), una cepa de serotipo C (C3 Argentina/85) y una cepa de serotipo O (O1 Caseros Ar/67).

Sin embargo, dada la variabilidad del VFA, se debe realizar un continuo seguimiento de las cepas circulantes. Para ello, se toman muestras de virus provenientes de nuevos focos, y se las caracteriza antigénicamente. Una vez caracterizadas, para conocer el riesgo que éstas pueden generar a la población bajo control, se establece la cobertura inmunológica de la cepa utilizada en la preparación de la vacuna frente a las mismas. La

cobertura inmunológica se puede establecer obteniendo el índice de seroprotección (ISP, basado en pruebas de seroprotección en ratón lactante), la expectativa porcentual de protección (EPP, basada en ensayos de microseroneutralización), o pruebas de protección en bovinos. Se debe determinar la cobertura en animales revacunados y en animales primovacunados (temeros de 1 año).

Una vez obtenidos los resultados, se los analiza detenidamente para establecer las medidas a tomar frente a la presencia de la nueva variante antigénica. Estas incluyen el aislamiento del lugar geográfico en cuanto a entradas y salidas de ganado, la revacunación de los rodeos circundantes al lugar de aparición del foco, la preparación preventiva de una nueva vacuna basada en la nueva cepa, la vacunación con esta nueva vacuna, y hasta el reemplazo de la cepa convencional por la nueva.

Las técnicas clásicas utilizadas para la tipificación y subtipificación de nuevos aislamientos, fueron las utilizadas rutinariamente para el diagnóstico. Sin embargo, no brindan una información totalmente precisa acerca del origen de los brotes, ni tampoco sobre la relación antigénica entre los nuevos aislamientos y las cepas vacunales. La secuenciación de ácidos nucleicos ha permitido establecer el origen de varios brotes de fiebre aftosa en distintos lugares. Mediante la secuenciación de la proteína VP1 de aislamientos europeos, causantes de brotes en Italia y Dinamarca en los años 1984 y 1985, se determinó el origen vacunal de los mismos; en cambio, en ese mismo trabajo, se determinó que los brotes menores ocurridos en la República Federal de Alemania fueron introducidos de otro lugar (Beck and Strohmaier, 1987). Estos autores han sugerido el uso del análisis de secuencias nucleotídicas como método estándar de diagnóstico, ya que comparada con otras técnicas, revela más claramente el origen y curso de las epizootias.

En Argentina también se determinó el origen de brotes de fiebre aftosa en los serotipos A (ocurridos en el año 1987), C (ocurridos entre los años 1983 y 1985) (Piccone, 1989, esta Tesis Doctoral) y O (ocurridos en los años 1993 y 1994) (Feigelstock, resultados no publicados) por medio de la secuenciación de la proteína VP1. Por otro lado, los inmunoensayos con anticuerpos monoclonales (si se dispone de un panel amplio), permiten realizar una comparación antigénica rápida entre los nuevos brotes virales y las cepas vacunales.

Ambas herramientas se han comenzado a utilizar en el Laboratorio Mundial de Referencia (en Pirbright, Gran Bretaña), para la caracterización de aislamientos virales. En conjunto con las técnicas clásicas de diagnóstico, permiten realizar un seguimiento epidemiológico rápido y preciso. Además, la caracterización a nivel molecular de regiones inmunogénicas, permite determinar las zonas a utilizar en el diseño de vacunas a subunidades.

En este Trabajo de Tesis se llevó a cabo un seguimiento epidemiológico de cepas de VFA de serotipo C aparecidas entre los años 1984 y 1994 en la Argentina, mediante la caracterización genómica y antigénica de las cepas vacunales (C3 Resende Br/55, C3 Argentina/84 y C3 Argentina/85), y variantes relacionadas. La caracterización genómica se realizó mediante la secuenciación nucleotídica de las proteínas de la cápside (todas o fragmentos de ellas), y la caracterización antigénica mediante el estudio de la reactividad de los virus con paneles de anticuerpos monoclonales dirigidos a distintos sitios antigénicos.

1.6. Objetivos del presente Trabajo de Tesis

El objetivo primordial de este Trabajo de Tesis Doctoral, fue obtener una formación científica que me permita generar y llevar a cabo trabajos de investigación en el campo de la biología.

En cuanto al tema específico en sí, fue realizar un seguimiento epidemiológico de los virus de serotipo C actuantes en el campo en la Argentina, entre los años 1984 y 1994.

Establecer la importancia relativa de los diferentes sitios antigénicos en la generación de la variabilidad antigénica global, y relacionarla con la protección.

Determinar la posibilidad de interacción de distintos sitios antigénicos entre sí.

Determinar los orígenes de las variantes aparecidas.

Determinar si existe más de una línea evolutiva actuando en un brote de fiebre aftosa, en una determinada región.

Determinar la importancia de distintas posiciones aminoacídicas dentro de los sitios antigénicos establecidos.

Comprender la base molecular de la variabilidad antigénica en las cepas circulantes en el campo.

Establecer y confirmar zonas importantes de la cápside para el diseño de vacunas a subunidades.

MATERIALES Y METODOS

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Virus

Los virus utilizados en este trabajo fueron provistos por GELAB/SENASA, y fueron obtenidos de epitelio lingual bovino. Se amplificaron en células BHK-21 clon 13 no realizando más de tres pasajes.

En la Tabla 1 se mencionan los virus utilizados, con algunas de sus características.

Tabla 1: Virus utilizados

Virus	Lugar y fecha de aislamiento	Características
C3 Resende Br/55	Resende, Brasil; 1955	Usado como cepa vacunal en Argentina hasta 1985
C3 Argentina/84	Gral. Roca, Córdoba; 1984	Usado como cepa vacunal en Argentina en 1985
C3 Argentina/85	Marcos Juárez, Córdoba; diciembre de 1984	Usado como cepa vacunal en Argentina desde 1985 hasta la fecha
GELAB/SENASA 37724	Salto, Buenos Aires; abril de 1991	
GELAB/SENASA 38355	Gral. Villegas, Buenos Aires; enero de 1993	Es el denominado "C White"
GELAB/SENASA 38395	Gral. Villegas, Buenos Aires; febrero de 1993	Aislado en el mismo establecimiento que el "C White"
GELAB/SENASA 38400	Gral. Roca, Córdoba; febrero de 1993	
GELAB/SENASA 38440	Rivadavia, Buenos Aires; marzo de 1993	
GELAB/SENASA 38448	Gral. Roca, Córdoba; marzo de 1993	
GELAB/SENASA 38726	San Cristóbal, Santa Fe; abril de 1994	
GELAB/SENASA 38727	Rivadavia, Buenos Aires; abril de 1994	

2.2. Células

Se utilizó la línea celular BHK-21 clon 13 (Stoker and Mc Pherson, 1964), provista por el Centro Panamericano de Zoonosis (CEPANZO), Buenos Aires, Argentina. Las células se propagaron en monocapas (Mowat and Chapman, 1962), para lo cual se utilizaron tubos de 10ml, frascos de 50ml o rollers de 2 l. Se utilizó como medio de cultivo medio mínimo esencial de Eagle (MEM-Eagle), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 10% de tampón triptosa fosfato (TFB). Se agregó gentamicina 50µg/ml, como agente antibiótico. Como soluciones reguladoras del pH se utilizó Hepes 25mM pH 7.4. La temperatura de incubación fue de 37 °C.

2.3. Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales utilizados han sido cedidos por el Centro de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid, España; por el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, Brasil; por M. Lombard, Rhône Merieux, Lyon, Francia; por el Plum Island Animal Disease Center, USDA, Estados Unidos, y por el Instituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia, Italia.

El panel consta de 25 anticuerpos monoclonales neutralizantes, de los cuales 11 están dirigidos al "sitio A", 2 están dirigidos al "sitio C", 10 están dirigidos al sitio "D" y dos sin determinar donde mapean (8E8 y 7DF10). Además se utilizó un anticuerpo monoclonal no neutralizante (7BH11) como control, ya que reconoce un epítipo discontinuo, que esta conservado en todas las cepas de VFA de serotipos A, O y C testeadas. Excepto el anticuerpo monoclonal 6EE2 que fue inducido por un virus de serotipo A, los demás anticuerpos monoclonales fueron inducidos por virus de serotipo C, algunos C1 y otros C3.

En la Tabla 2 se resumen las principales características de los anticuerpos monoclonales utilizados. Los datos fueron extraídos de Mateu et al., 1987, 1990; y Capucci et al., 1984.

Tabla 2: Características de los anticuerpos monoclonales utilizados

Anticuerpo monoclonal	Virus inductor	Isotipo	Reactividad con virus homólogo		Neutralización de virus homólogo	Sitio
			ELISA	EITB		
SD6	C S8 cl	IgG1	+	VP1	+	A
5A2	C1 Brescia It/64	IgG2a	+	VP1	+	A
4G3	C S8 cl	IgG1	+	VP1	+	A
4C4	C1 Brescia It/64	N.D.	+	-	+	A
6D11	C1 Brescia It/64	IgG1	+	VP1	+	A
7C611	C3 Indaial Br/71	IgG1	+	VP1	+	A
7JD1	C3 Indaial Br/71	IgG1	+	VP1	+	A
7FC12	C3 Indaial Br/71	IgG1	+	VP1	+	A
7AH1	C3 Indaial Br/71	N.D.	+	VP1	+	A
7EE6	C3 Indaial Br/71	IgG3	+	VP1	+	A
7AB5	C3 Indaial Br/71	IgG3	+	VP1	+	A
7JA1	C3 Indaial Br/71	IgG2b	+	VP1	+	C
6EE2*	A12 119ab	IgG2a	+	VP1	-	C
1G5	C1Brescia It/64	IgG2b	+	-	+	D
3G11	C1Brescia It/64	IgG1	+	-	+	D
2A12	C1Brescia It/64	IgG3	+	-	+	D
2A10	C1Brescia It/64	IgA	+	-	+	D
2E5	C1Brescia It/64	IgG1	+	-	+	D
4D7	C1Brescia It/64	IgG1	+	-	+	D
4F4	C1Brescia It/64	IgG1	+	-	+	D
5H10	C1Brescia It/64	N.D.	+	-	+	D
5C4	C1Brescia It/64	IgG2b	+	-	+	D
3E9	C1Brescia It/64	IgG2b	+	-	+	D
8E6	C1 Vosges Fr/60	N.D.	+	-	+	N.D.
7DF10	C3 Indaial Br/71	IgG1	+	-	+	N.D.
7BH11	C3 Indaial Br/71	IgG2b	+	-	-	N.D.

N.D.: no determinado

* El anticuerpo monoclonal 6EE2 es débilmente neutralizante con virus homólogo, y no neutralizante con virus de serotipo C.

2.4. Obtención de virus para su caracterización antigénica

2.4.1. Clonado viral

Se realizó el clonado de la cepa GELAB/SENASA 38355/93 por la técnica de dilución a punto final. Se realizaron diluciones al décimo del inóculo e infectaron células contenidas en tubos de 10 ml (cuatro tubos por cada dilución); se incubó 48 horas a 37 °C. Se seleccionaron para amplificar las células infectadas con las mayores diluciones que dieron efecto citopático. Este proceso se repitió dos veces.

2.4.2. Producción viral

Las células se infectaron previo lavado con solución de Hank's, a una multiplicidad igual a 1 ($moi=1$). Se incubaron en medio MEM-G (Eagle, 1959; Dulbecco and Freeman, 1959) durante una hora a 37°C para permitir la adsorción viral. Se eliminó el inóculo, se agregó MEM-G y se dejó incubar a 37°C hasta observar efecto citopático total. La suspensión viral obtenida se centrifugó a 1.000xg durante 10' a 4°C y congeló a -70°C.

2.4.3. Concentración y purificación viral

Los sobrenadantes de las infecciones se clarificaron por centrifugación a 15.000xg durante 30' a 4°C.

La concentración viral se realizó mediante ultracentrifugación en rotor Beckman 60Ti a 145.000xg, durante 90' a 4°C, a través de un colchón de sacarosa 20% en tampón NET. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 500µl de solución NET o PBS.

Para obtener ARN para secuenciación directa, se purificó por ultracentrifugación en un gradiente lineal de sacarosa 10-30% en tampón NET, en un rotor Beckman SW40 a 200.000xg durante 75' a 4°C (Firpo and Palma, 1979). El gradiente se fraccionó en alícuotas de 500µl y se midió la absorción de cada fracción a 260nm. Se juntaron las fracciones correspondientes al pico viral.

2.5. Caracterización genómica del VFA por secuenciación de ácidos nucleicos

2.5.1. Extracción del ARN viral

Todas las manipulaciones realizadas con ARN se efectuaron con materiales y soluciones esterilizados o tratados con dietilpirocarbonato (DEP). La separación del ARN de las proteínas virales se llevó a cabo empleando fenol. Se realizaron tres extracciones fenólicas (un volumen de fenol por un volumen de suspensión viral) y luego tres extracciones con éter saturado en agua-DEP. Se precipitó el ARN añadiendo acetato de sodio a una concentración 0.3 M final, y dos volúmenes de etanol 100%; se dejó a -20°C toda la noche, a -70°C durante una hora, o a -130°C durante 20'. Luego se centrifugó a 15.000xg durante 20' a 4°C, se lavó con etanol 70% en agua-DEP, se secaron las muestras y se resuspendió el ARN en 50µl de agua-DEP. Se determinó la concentración de ARN por absorbancia a 260nm. Los ARNs así obtenidos se mantuvieron a -70°C.

2.5.2. Extracción del ARN de células infectadas

Alternativamente, se utilizó otro método para secuenciar el ARN viral basado en una extracción del ARN intracelular con tiocianato de guanidinio (Chomczynski and Sacchi, 1987), de modo de evitar los pasos de concentración y purificación viral, y acelerar el método.

Luego de la infección, al observar 90% de efecto citopático, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 10ml de solución D (tiocianato de guanidinio 4M, citrato de sodio 25mM pH 7, N-laurilsarcocina 0.5%, 2-mercaptoetanol 0.1M) por cada 10⁸ células. Se recuperaron las células pegadas con rastrillo y se centrifugó a baja velocidad. Se agregó al sobrenadante 0.1 volúmenes de acetato de sodio 2M pH 4, se mezcló, y se agregó un volumen de fenol. Se mezcló y se agregaron 0.2 volúmenes de cloroformo-alcohol isoamílico en relación 49:1. La suspensión se dejó reposar en hielo durante 15'. Se centrifugó a 15.000xg durante 20' a 4°C y se recuperó la fase acuosa que fue tratada con dos volúmenes de etanol 100%. Se mezcló y se dejó una hora a -20°C; se centrifugó a 15.000xg durante 20' a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el ARN en 350µl de solución D; se agregaron 35µl de acetato de sodio 2M pH 4 y dos volúmenes de etanol 100%. Se mezcló y se dejó una hora a -20°C; se centrifugó a 15.000xg durante 10' a 4°C, se lavó con etanol 70% y se secó. El ARN así obtenido se resuspendió en 50µl de agua-DEP.

2.5.3. Secuenciación directa del ARN viral

2.5.3a. Reacciones de secuenciación

Las reacciones de secuenciación se basan en el método de extensión del iniciador y terminación de la elongación con dideoxinucleótidos (Zimmern and Kaesberg, 1978). En este método, la reacción se realiza en dos pasos: uno de hibridación y otro de elongación. Primero se hibridizó el ARN cuya secuencia se deseaba obtener con un oligonucleótido sintético complementario, que mapea en la zona deseada. Los oligonucleótidos se sintetizaron por el método de las fosforamiditas (Caruthers, 1982); algunos fueron sintetizados en el Instituto de Biología Molecular, INTA, otros fueron provistos por el Centro de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid, España, y otros fueron adquiridos en Estados Unidos a firmas comerciales. En la Tabla 3 se resumen las características de los oligonucleótidos utilizados

Para cada reacción se utilizaron 3µg de ARN viral (obtenido por cualquiera de los dos métodos descritos) que se hibridizó con 0.5µg del oligonucleótido iniciador en presencia de 15µg de ARNt ("carrier") en tampón TNEd 1X final. Se agregaron dos volúmenes de etanol 100%, y se dejó toda la noche a -20°C o una hora a -70°C. Se centrifugó a 15.000xg durante 20' a 4°C, se descartó el sobrenadante, se lavó el precipitado obtenido con etanol 70%, y se secó. Se resuspendió el ARN en 9µl de RTB 0.5X, y se transfirió el ARN hibridizado a un tubo que contenía 50 µCi del radioisótopo ³⁵S-dATP. Se prepararon cuatro tubos marcados "G", "A", "T" y "C", que contenían 1µl de RTB 5X, 1µl de una mezcla a una concentración 250mM de cada uno de los deoxinucleótidos dGTP, dTTP y dCTP, 1µl del dideoxinucleótido correspondiente (ddGTP, 100mM; ddATP, 10mM; ddTTP, 150mM y ddCTP, 100mM) y 4 unidades de la enzima transcriptasa reversa (AMV reverse transcriptase, Life Sciences LME 704). Se agregó a estos tubos 2µl del ARN hibridizado con el iniciador, y se incubó a 42°C durante 30'. Previo a la siembra en geles de poliacrilamida, se resuspendió el producto de las reacciones en 4µl de tampón de siembra (2.8). Para impedir la formación de estructura secundaria en las nuevas cadenas sintetizadas por la enzima RT, se utilizó un análogo del trifosfato de guanosina, el 7-deazo deoxiguanosina trifosfato (Mizusawa et al., 1986). Cuando las indeterminaciones se debían a fallas en la síntesis, se realizó la reacción con la enzima RT a temperaturas de incubación mayores, de 45°C y 50°C.

Tabla 3: Oligonucleótidos utilizados

Denominación	Polaridad	Secuencia 5'-3'	Ubicación *
Pr5	-	GGAGGGCCCAGGGTTCTC	2B, nc. 6
Pr6	-	GGCCCGTTTCATGCGCAC	VP1, nc. 559
Pr9	-	GACCTTCACAAACCGGTC	VP1, nc. 125
E7	-	GGGGCACCGTTGGGCACC	VP1, nc. 260
VP1-16	-	GACCTTCACAAACCGG	VP1, nc. 125
A-MAS	+	CGTACACTGGTACAACG	VP1, nc. 389
1R1	+	GCGCCACACCGTGTGTT	VP1, nc. 360
3R2	+	CCTGTGGACGCTAGACA	VP3, nc. 552
C3-EPF1	-	GCATATTGTGTGTAATACTGAGCC	VP3, nc. 305
ED-VP3	-	CAGTTGTCACCATGTTGCC	VP3, nc. 51
VP3-1	-	CACACAGACCCATCCCTG	VP3, nc. 562
VP3-2	-	GTA CTGTGTGTAGTACTG	VP3, nc. 300
VP3-3	-	GTTTGTGAACCGCCCCGG	VP3, nc. 129
JH2	-	GGGTTGATGAACTGGTGGGG	VP2, nc. 448
VP2-1	-	TGGGTTGATGAACTGGTG	VP2, nc. 449
VP2-2	-	ATAGACACCTTTCGGGTC	VP2, nc. 187
2R1	+	CTAGAGACGCGCGTTC	VP2, nc. 153
2+FIN	+	GCCAACATAGCCCCGACCAACG	VP2, nc. 600
C3-4D1	-	AACCAGTCATTGTTCTGTGTG	VP4, nc. 203
4D1	-	AACCAGTCGTTGTTCTGG	VP4, nc. 203
4R1	+	CACTGGCAGCATAATTAAC	VP4, nc. 49
LR2	+	GGACAGGAACACGCTGTCT	L, nc. 433

* proteína, y nucleótido que coincide con el extremo 3'.

2.5.3b. Geles de poliacrilamida para secuenciación

Los geles lineales (Garoff and Sorge, 1981) para secuenciación se prepararon usando dos vidrios, separados por espaciadores de 0.4 mm. Se preparó la solución de acrilamida y bisacrilamida (en proporción 20:1 p/p) en tampón TBE1X, a la cual se agregó urea hasta 42% como agente desnaturalizante. En ciertos casos se agregó también formamida en hasta 40% (Martin, 1987), para impedir la formación de estructuras secundarias en las nuevas cadenas sintetizadas por la enzima RT, que provocan una incorrecta corrida electroforética. Para la polimerización se agregó persulfato de amonio (0.05%) y TEMED

(0,005%), y se volcó la solución entre los dos vidrios. Como tampón de corrida se usó TBE 0.5X en la cuba superior (cátodo), y TBE 1X en la cuba inferior (ánodo). Las muestras a correr se desnaturalizaron a 90°C durante dos minutos, y se enfriaron rápidamente en baño a 0°C. Se sembraron 2µl de cada muestra, y se aplicaron 55 watts. El tiempo de corrida dependió de la región del genoma que se deseó secuenciar; cuanto más lejana del oligonucleótido usado como iniciador, mayor fue el tiempo de corrida. Estos geles permiten realizar más de una siembra, con lo que se logró leer zonas del genoma de hasta 500 bases. Se usaron colorantes como indicadores del lugar del genoma en el cual se encuentran las muestras; el azul de bromofenol migra con los fragmentos de 26 nucleótidos de longitud y el xilencianol migra con los de 106 nucleótidos de longitud, en geles de poliacrilamida al 6%.

Finalizada la corrida electroforética, se separaron los vidrios y se sumergió el gel en un baño de ácido acético al 5% y metanol al 5% durante 20 minutos; se secaron los geles y se expusieron sobre una placa autorradiográfica durante 24 o 48 horas. Luego se procedió a la lectura de las secuencias.

2.5.4. Secuenciación por amplificación lineal

2.5.4a. Amplificación de regiones del genoma viral por PCR

En un primer paso, se llevó a cabo la síntesis de ADNc (ADN complementario) mediante una reacción de transcripción reversa, ya que el genoma del VFA esta compuesto de ARN. Para ello, se tomaron 500ng de ARN viral (extraído de virus purificado, semipurificado, o de células infectadas), 200ng del oligonucleótido iniciador (de polaridad opuesta a la del ARN, polaridad negativa), y se los incubó en tampón RTB1X en presencia de los cuatro deoxinucleótidos a una concentración de 0.5mM y 10 unidades de la enzima transcriptasa reversa (Life Sciences, LME 704), en un volumen final de 50µl. Previo a añadir la enzima, se calentó la mezcla a 90°C por un minuto, y se dejó enfriar a temperatura ambiente. La reacción se llevó a cabo a 42°C durante una hora.

Para la reacción de amplificación (PCR), se seleccionaron los oligonucleótidos correspondientes según la región que se deseó amplificar. Un oligonucleótido de polaridad opuesta a la del ARN (que muchas veces fue el mismo que el usado para la reacción de transcripción reversa), y un oligonucleótido de igual polaridad. Se tomaron 10µl del ADNc, 100ng de cada oligonucleótido, 2.5 unidades de la enzima Taq DNA Polimerasa (Promega, cat. M186) en tampón de la enzima Taq DNA Polimerasa (Promega, cat. M188), en presencia de los cuatro deoxinucleótidos a una concentración

de 0.2mM, en un volumen final de 100 μ l. La reacción se cubrió con 50 μ l de aceite mineral (Sigma) para evitar la evaporación. Luego se incubó la reacción en un termociclador (Biometra Trio Thermoblock TB1). Las temperaturas y tiempos de cada ciclo fueron los siguientes: un minuto de desnaturalización a 94°C, un minuto de anillado a temperatura variable según los oligonucleótidos utilizados, aunque en general se usaron temperaturas de 42°C a 55°C, y dos minutos de extensión a 72°C. Este ciclo se repitió 35 veces. Luego se incubó la reacción a 72°C durante 10 minutos. La verificación de la obtención del fragmento de ADN deseado, se realizó corriendo 5 μ l de la reacción en un gel de agarosa 1% en tampón TAE 1X, con bromuro de etidio. Las bandas se visualizaron exponiendo el gel a una fuente de luz ultravioleta.

Para asegurar que las bandas obtenidas eran producto de la amplificación del ADNc deseado, y no una contaminación, se hicieron paralelamente controles negativos, los cuales consistieron en reacciones en las que se pusieron todos los reactivos excepto el ADNc. También, al amplificar nuevos ADNcs, se incluyó un control positivo, el cual consistió en una reacción en la que se colocaron todos los reactivos, y en lugar del nuevo ADNc, se puso un ADNc ya probado.

2.5.4b. Purificación de fragmentos obtenidos por PCR

Los fragmentos de distinta longitud obtenidos por PCR, se purificaron por un gel de agarosa de bajo punto de fusión (Langridge et al., 1980). Los geles se hicieron al 1.1%, en tampón TAE 1X, y se tiñeron con bromuro de etidio. Como tampón de corrida se utilizó TAE 1X. Se realizó la corrida electroforética aplicando 5 watts. Luego de un tiempo de corrida de una a dos horas (según la longitud del fragmento a purificar), se visualizó la banda de ADN con luz ultravioleta, y se la cortó con un bisturí. La banda obtenida se calentó a 75°C durante 15 minutos, se la extrajo tres veces con fenol, tres veces con éter saturado en agua, y se precipitó agregando acetato de sodio 0.3M final y dos volúmenes de etanol. Se dejó a -130°C durante 20 minutos, se centrifugó a 15.000xg durante 20 minutos a 4°C, se lavó con etanol 70% en agua, y se secó. El ADN se resuspendió en 20 μ l de agua bidestilada. Para verificar la obtención del ADN, y para su cuantificación, se corrieron 2 μ l en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio. Se visualizó exponiendo el gel a una fuente de luz ultravioleta. La cuantificación también se realizó midiendo la adsorción de luz en espectrofotómetro, a 260nm.

2.5.4c. Secuenciación de fragmentos de PCR por amplificación lineal

La secuencia de los fragmentos obtenidos en la reacción de PCR, se obtuvo utilizando el método de amplificación lineal, para lo cual se usó el "fmol DNA Sequencing System" de Promega (cat. Q4.100). Se tomaron entre 1 y 2 picomoles de ADN doble cadena purificado por gel de agarosa de bajo punto de fusión (equivalente a 150ng para fragmentos de 200 pares de bases; para fragmentos más largos se agrega mayor cantidad, en forma proporcional), 10 pmoles del oligonucleótido iniciador (50ng), 25 μ Ci del radioisótopo ^{35}S -dATP, 5 unidades de la enzima Sequencing Grade Taq DNA Polimerasa, en tampón para la enzima y una mezcla de deoxinucleótidos y dideoxinucleótidos (en cuatro tubos diferentes) provistos por el sistema. Se colocaron los cuatro tubos en el termociclador (Biometra Trio Thermoblock TB1), y se los sometieron a 35 ciclos consistentes en: 30 segundos de desnaturalización a 94°C, 30 segundos de anillado a temperatura que varió entre 42°C y 55°C, y 1 minuto de extensión a 70°C.

Uno de los problemas para la determinación de las secuencias, aparte de los inconvenientes causados por la formación de estructuras secundarias en las cadenas nuevas (2.5.3a), es la generación de errores por parte de la enzima durante la síntesis. Estos errores se refieren a la terminación de las cadenas en forma inespecífica, y no por el agregado de un dideoxinucleótido. De esta forma, se puede observar más de una banda en las autorradiografías, a una misma altura, imposibilitando la determinación de la base correcta. Para superar estos inconvenientes, se usó la enzima transferasa terminal (TdT, Promega cat. M187), que incorpora deoxinucleótidos en extremos 3' de ADNs de simple cadena, en forma inespecífica. Para ello, se agregó a las reacciones (luego de haber completado los ciclos en el termociclador) 2 unidades de la enzima TdT en 1 μ l de tampón de TdT (2.8) y se las incubó durante 30 minutos a 37°C (De Borde et al., 1986). De esta forma se lograron resolver una gran cantidad de indeterminaciones.

2.6. Caracterización viral con anticuerpos monoclonales

2.6.1. Ensayo de "inmunodot" enzimático

Para la caracterización de los virus mediante ensayos enzimáticos con anticuerpos monoclonales (Mateu et al., 1987), se utilizó virus semipurificado a través de un colchón de sacarosa 20% en PBS o en NET (2.4.3). Se utilizaron iguales cantidades de cada virus.

Los virus se fijaron en membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad, Blotting grade) previamente estabilizadas con PBS, por filtración a través de la misma. Se utilizaron iguales cantidades

de cada cepa viral, y tres diluciones por cepa. Las membranas se bloquearon con BSA 3% en PBS durante toda la noche a 4°C. Luego se incubaron con las diluciones de trabajo de los anticuerpos monoclonales correspondientes, durante 2 horas a temperatura ambiente. Se lavaron 2 veces, 15 minutos cada vez, con 0.05% de Tween-20 en PBS. Se incubaron con un segundo anticuerpo de cabra antiratón, unido a peroxidasa (Bio-Rad), en una dilución 1:1000 en PBS, durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron como en el paso anterior y se revelaron con una solución de revelado (2.8) preparada en el momento de uso. Se detuvo la reacción lavando las membranas con agua, y se cuantificó la reactividad.

2.6.2. Ensayo electroinmunoenzimático de las proteínas virales

Este ensayo consta de un primer paso, en el que se corren las proteínas en un gel desnaturizante de poliacrilamida (Laemmli, 1970) que contiene urea 8M, y luego se transfieren las proteínas a una membrana de nitrocelulosa por medio de una corriente eléctrica. Luego se procede al ensayo enzimático en sí, donde se incuban las proteínas transferidas con los anticuerpos.

Se agregó un volumen de tampón desnaturizante para geles de proteínas (2.8) a cantidades iguales de los distintos virus. Los virus se cuantificaron corriendo diluciones de los mismos en un gel de proteínas, que luego se tiñeron con azul de Coomassie 0.25% en metanol-acético-agua, en proporción 5:1:5. Luego se destiñó el gel sumergiéndolo en un baño de metanol al 50% y ácido acético al 10%. Para los ensayos, se tomaron las diluciones de los distintos virus que mostraron en el gel igual cantidad de la proteína VP1. En cada ensayo se usaron 0.7µg de antígeno. Se corrieron las proteínas desnaturizadas en un gel de poliacrilamida 12% con SDS 0.1% y urea 8M, durante 12 a 18 horas, a 50 voltios. Luego de la corrida electroforética, se equilibró el gel en Tris-HCl 25mM pH 8.3, glicina 192 mM, metanol 20% durante una hora a temperatura ambiente. Se transfirió luego a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) en un aparato de electrotransferencia, por medio de una corriente eléctrica de 250mA, durante 5 horas a 4°C, en el mismo tampón (Towbin et al., 1979). Para controlar que no quedaron proteínas en el gel, luego de la electrotransferencia se tiñó el gel con azul de Coomassie.

Las nitrocelulosas se bloquearon con BSA 3% en PBS toda la noche a 4°C, y luego se incubaron durante 1.5 horas a temperatura ambiente con la dilución apropiada del anticuerpo monoclonal correspondiente, ajustado con BSA 1%. Las membranas se lavaron dos veces con 0.05% de Tween-20 en PBS, y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con un anticuerpo de cabra antiratón unido a peroxidasa (Bio-Rad)

en una dilución 1:1.000 en PBS. Se lavaron las membranas dos veces como en el paso anterior, y se revelaron incubándolas en solución de revelado (2.8). La reacción se detuvo lavando las membranas con agua, y se cuantificó la reactividad obtenida.

2.7. Medios de cultivo

Medio MEM-Eagle para células eucariotas: Se utilizó el medio mínimo esencial de Eagle (Eagle, 1959) modificado por Dulbecco (Dulbecco and Freeman, 1959); fue preparado siguiendo la formulación de Gibco, catálogo 21. Se suplementó con suero fetal bovino 10% (Gibco) y se agregó 50 mg/ml de gentamicina como agente antibiótico. Se esterilizó por filtración.

2.8. Soluciones

NET 1X: Tris-HCl 50mM pH 7, NaCl 100 mM, EDTA 1mM.

TE 1X: Tris-HCl 10mM pH 8.0, EDTA 1 mM.

PBS 1X: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄.

Agua-DEP: 100µl de dietilpirocarbonato (DEP) por cada 100 ml de agua bidestilada. Se agitó 5 horas, se calentó hasta disminuir el volumen un 10%, y se autoclavó.

Fenol: se destiló el fenol y se trató varias veces con Tris-HCl 1M pH 8 hasta que el pH de la fase acuosa fue de 7.6. Se dejó en Tris-HCl 0.1M pH 8.

TAE1X: Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM.

TBE 1X: Tris-Borato 90 mM, EDTA 1 mM.

RTB 5X: Tris-HCl 250mM pH 8.3, MgCl₂ 50 mM, KCl 150 mM, Ditiotreitól 50 mM.

TNEd 10X: NaCl 2.5 M, Tris-HCl 1M pH8.3, EDTA 20 mM.

Tampón para Taq DNA Polimerasa 10X (Promega): KCl 500mM, Tris-HCl 100mM pH 9, Tritón X-100 0.1%.

Tampón para TdT: deoxinucleótidos 1mM en tampón para Taq DNA Polimerasa y MgCl₂ 1.5mM.

Solución D: tiocianato de guanidinio 4M, citrato de sodio 25mM pH 7, N-laurilsarcosina 0.5%, 2-mercaptoetanol 0.1M.

Tampón de siembra para geles de agarosa 10X: glicerol 50%, azul de bromofenol 0.25% en TAE 10X.

Geles de agarosa 1%: agarosa 1% en TAE 1X.

Tampón de siembra de geles de secuencia: formamida deionizada 80%, NaOH 10 mM, EDTA 1 mM, Xilencianol 0.2%, Azul de bromofenol 0.2%.

Geles de secuenciación: acrilamida 6%, bisacrilamida 0.3%, urea 42% en TBE 0.5X. Se agregó persulfato de amonio 0.05% y TEMED 0.005%, para la polimerización.

Geles de secuenciación con formamida: acrilamida 6%, bisacrilamida 0.3%, urea 42%, formamida 40% en TBE 0.5X. Se agregó persulfato de amonio 0.05% y TEMED 0.015% para la polimerización.

Tampón de siembra desnaturalizante para geles de proteínas: Tris-HCl 80 mM pH 6.3, SDS 10%, Urea 8M, 2-mercaptoetanol 1.2M, glicerol 18%, azul de bromofenol 0.02%.

Geles de proteínas: gel inferior: acrilamida 11%, bisacrilamida 0.29%, urea 8M, SDS 0.1%, en Tris-HCl 0.375M pH 8.8. Se agregó persulfato de amonio 0.021% y TEMED 0.033% para la polimerización. Gel superior: acrilamida 2.7%, bisacrilamida 0.19%, Urea 8M, SDS 0.1%, en Tris-HCl 0.25M pH 6.3. Se agregó persulfato de amonio 0.005% y TEMED 0.01% para la polimerización.

Tampón de corrida para geles de proteínas: Trizma base (Sigma) 0.25M, glicina 2M, SDS 0.1%.

Solución de revelado de inmunoensayos: H₂O₂ 0.015%, 4-Cloro 1-Naftol 0.5mg/ml (Sigma Chem. Co.), metanol 20%, en PBS.

RESULTADOS

3. Resultados

En la descripción de los resultados, y en la discusión, los distintos aislamientos estudiados se nombran por su lugar de origen para facilitar la comprensión. La nomenclatura de los mismos se da en la Tabla 1, en Materiales y Métodos.

3.1. Situación epidemiológica del VFA serotipo C hasta el año 1984

3.1.1. Líneas evolutivas actuantes

Hasta el año 1984 los principales brotes de fiebre aftosa fueron causados por cepas de los serotipos A y O. En ese año comienza una importante epidemia, durante la cual se aísla el virus C3 Argentina/84. Este demostró ser serológica y antigénicamente diferente al virus C3 Resende Br/55 (Alonso Fernández et al, 1986; Bergmann et al, 1988; Piccone et al, 1988; Piccone 1989), usado como vacunal en ese entonces. Además, bovinos vacunados en pruebas experimentales con virus C3 Resende Br/55, no fueron totalmente protegidos frente a la descarga del virus C3 Argentina/84 (Bergmann et al, 1988).

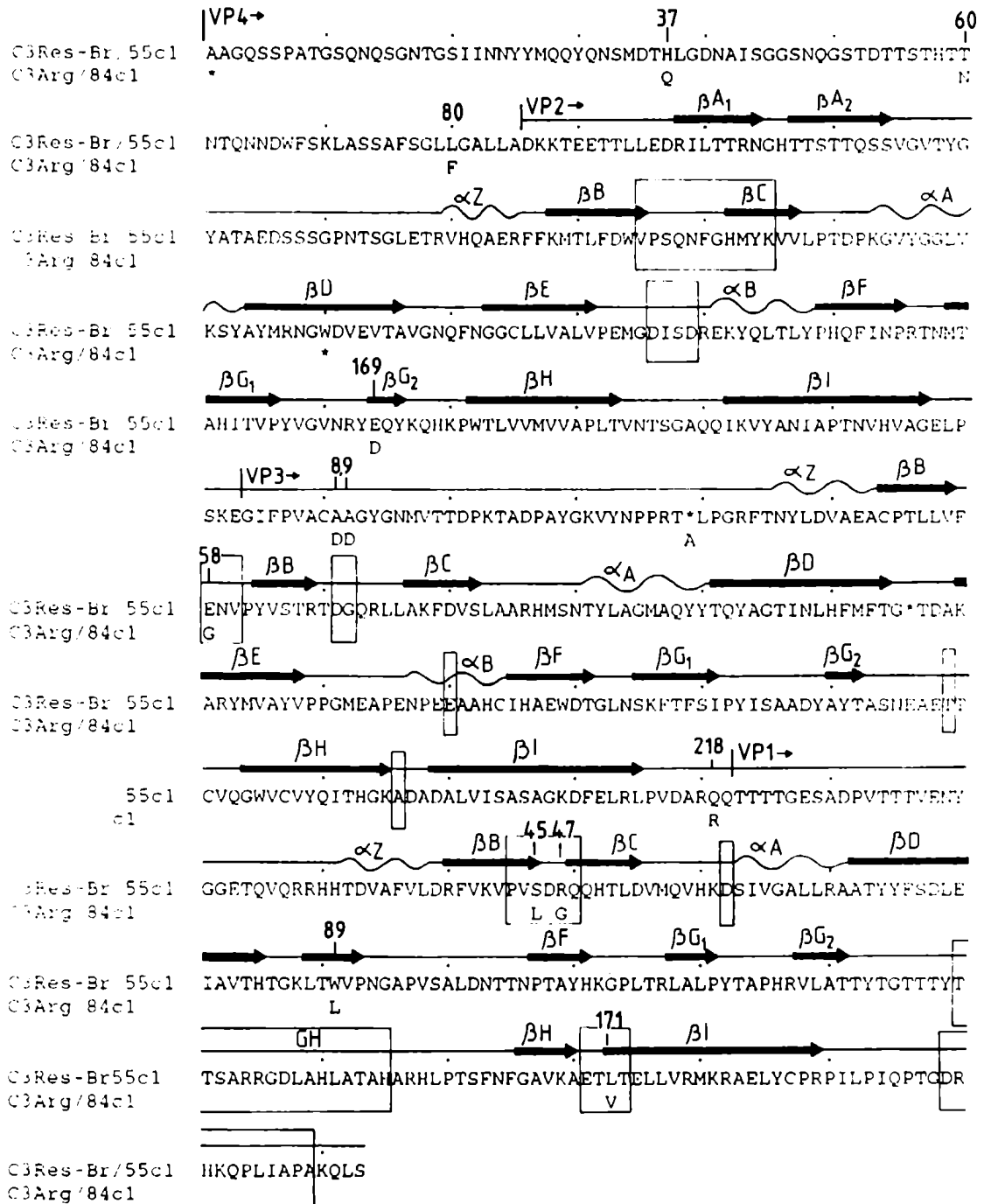
A finales de ese mismo año se detecta una segunda cepa, de distinto origen a la anterior, denominada C3 Argentina/85. De esta forma se verificaba la cocirculación de dos líneas evolutivas de distinto origen (1.5.2). La inclusión de las cepas C3 Argentina/84 y C3 Argentina/85 en la vacuna, en lugar de la cepa C3 Resende Br/55, disminuyó drásticamente el número de focos de fiebre aftosa (Bergmann et al., 1988).

3.1.2. Caracterización genómica de las proteínas estructurales de las cepas actuantes

Como en el sitio antigénico "A", y en el "sitio C" de la proteína VP1, las cepas C3 Resende Br/55 y C3 Argentina/84 no habían mostrado diferencias de aminoácidos (Piccone et al, 1988), se esperaba que las diferencias serológicas y antigénicas se corresponderían con cambios en otros sitios antigénicos. Se procedió entonces a determinar la secuencia nucleotídica de todas las proteínas de la cápside de ambos virus.

En la Figura 5 se muestran las secuencias aminoacídicas deducidas de las secuencias nucleotídicas, de las proteínas de la cápside de estas dos cepas. La comparación de las secuencias de las dos cepas, C3 Resende Br/55 y C3 Argentina/84, revela la presencia de 36 sustituciones de nucleótidos, de las cuales 12 se tradujeron en cambios de aminoácidos. Esto significa una homología mayor al 98% (tanto en nucleótidos como en aminoácidos).

Figura 5: Secuencia de aminoácidos de las proteínas de la cápside de los virus C3 Resende Br/55 y C3 Argentina/84



Se utiliza el código de una letra para indicar los aminoácidos. Para el virus C3 Argentina/84 se indican los aminoácidos que difieren del virus C3 Resende Br/55. Asteriscos representan aminoácidos no definidos. Arriba de las secuencias se indica la estructura secundaria, asumiendo que se corresponde con la hallada para el virus O1 BFS (Acharya et al., 1989). Los símbolos son: líneas finas, extremos aminos y carboxilos terminales, y "loops"; flechas, hojas plegadas β; líneas onduladas, α hélices. Las regiones donde mutaciones han conferido resistencia a virus de serotipos A, O y/o C a la neutralización con anticuerpos monoclonales, se delimitan con rectángulos.

Fue posible estimar la localización espacial aproximada de cada sustitución, en base a la estructura tridimensional determinada para los virus C1 Santa Pau y O1 BFS (Lea, Hernández et al, 1994.; Acharya et al., 1989).

3.1.3. Variabilidad en sitios antigénicos

De las 12 sustituciones, cinco (posiciones 37, 60 y 80 de la proteína VP4 y posiciones 8 y 9, en el extremo amino terminal de la proteína VP3) están localizadas internamente, y otras tres (posición 169 de la proteína VP2, 218 de la proteína VP3, y 89 de la proteína VP1) están en sitios que hasta el presente no fueron identificados como antigénicos, por lo cual tales sustituciones probablemente no son relevantes antigénicamente.

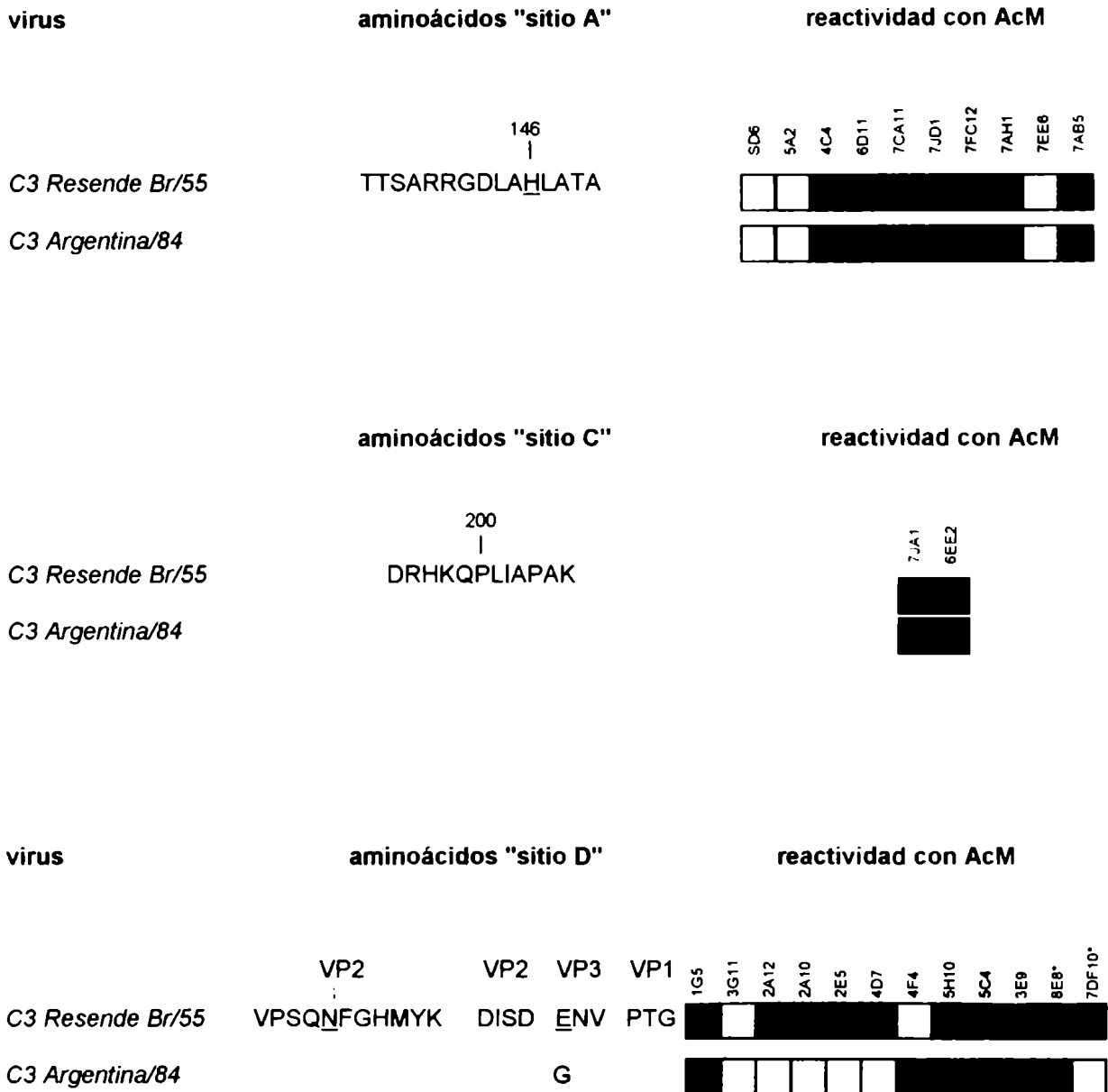
El resto de las sustituciones aminoacídicas observadas se encuentran en zonas antigénicamente relevantes. La sustitución en el aminoácido 58 de la proteína VP3 (*gly* por *glu*), localizado en el B-B "knob" de la misma proteína, forma parte del sitio antigénico "D" en el serotipo C (Lea, Hernández et al, 1994), y del sitio antigénico "IV" en el serotipo O (Kitson et. al., 1990). Otras dos sustituciones (*leu* por *ser* en aminoácido 45 y *gly* por *arg* en aminoácido 47) están localizadas en el B-C loop de la proteína VP1, identificado como parte del sitio antigénico "III" (Kitson et al, 1990), en el serotipo O. Por último la sustitución en la posición 171 (*val* por *leu*) de la proteína VP1, esta localizada en el H-I loop de la misma proteína, el cual ha sido encontrado como relevante antigénicamente en el serotipo A (Thomas et al, 1988).

Los resultados indican que una de estas cuatro sustituciones, o una combinación de las mismas, son las responsables de las diferencias antigénicas entre los virus C3 Resende Br/55 y C3 Argentina/84. La sustitución 58 de la proteína VP3, por ser la única posición encontrada como relevante antigénicamente en el serotipo C (Lea, Hernández et al., 1994), tendría un rol principal en la variación antigénica.

3.1.4. Caracterización antigénica con anticuerpos monoclonales y su correlación con las secuencias aminoacídicas

En la Figura 6 se comparan las secuencias aminoacídicas de los sitios antigénicos "A", "C" y "D", con la reactividad de los virus frente a un panel de anticuerpos monoclonales neutralizantes dirigidos a tales sitios antigénicos.

Figura 6: Secuencia de aminoácidos y reactividad con anticuerpos monoclonales de los sitios antigénicos "A", "C" y "D", de los virus C3 Resende Br/55 y C3 Argentina/84.



Para cada virus, se indican las reactividades con anticuerpos monoclonales que reconocen distintos epitopos en los sitios "A", "C" y "D" o sitios no identificados, a continuación de la secuencia aminoacídica correspondiente al sitio antigénico. Las reactividades con los AcM que reconocen los sitios "A" y "C" fueron obtenidas en ensayos inmunoenzimáticos de las proteínas virales, mientras que las reactividades con los AcM que reconocen el sitio "D" y sitios no identificados fueron obtenidas en ensayos de inmunodot enzimáticos. Para cada AcM, la reactividad relativa frente al virus usado para generar el AcM se da como , positiva (reactividad similar observada); , intermedia; , débil, o negativa. Los aminoácidos críticos para el reconocimiento antigénico se muestran subrayados.

* AcM no mapeados.

El "sitio A" comprende los aminoácidos 137-150, correspondiendo a la primer arginina la posición 140a (esta nomenclatura corresponde a la utilizada por Martínez et al., 1991).

Para los sitios "A" y "C", ninguno de los once anticuerpos monoclonales que reconocen diferentes epitopos continuos dentro de este sitio logró diferenciar a los dos virus en estudio, lo cual muestra una clara correlación entre la secuencia determinada (igual para las dos cepas) y la antigenicidad de los sitios "A" y "C".

Sin embargo, se observaron seis diferencias significativas en reactividad, cuando se utilizó un panel de quince anticuerpos monoclonales que reconocen al menos 12 epitopos discontinuos. Cinco de ellos están ubicados en el "sitio D". En este caso, la sustitución en el aminoácido 58 de la proteína VP3, es probablemente la responsable de la variación antigénica observada, ya que mutantes resistentes a estos anticuerpos monoclonales poseen sustituciones en este aminoácido (Mateu et. al., 1994).

Estos resultados permiten concluir que las diferencias serológicas y de nivel de protección entre la cepa C3 Argentina/84 y la cepa vacunal C3 Resende Br/55 se corresponderían con variaciones genómicas observadas en otras regiones fuera del sitio antigénico "A", destacando la importancia de las distintas regiones de la cápside en la antigenicidad del VFA, en el serotipo C.

3.1.5. Permanencia en el campo

La gran similitud entre las secuencias nucleotídicas de los dos virus en estudio, C₃ Resende Br/55 y C3 Argentina/84, tanto en la proteína VP1 (Piccone et al, 1988) como en todas las proteínas estructurales, indica la capacidad del VFA de conservar secuencias por largos períodos de tiempo (estos aislamientos están separados por un intervalo de 29 años) (Piccone et al 1988).

El alto grado de mutaciones durante la replicación del VFA no debe llevar necesariamente a su evolución, ya que esta dependerá de presiones selectivas externas (presión inmunológica, por ejemplo), como de impedimentos estructurales propios que hacen a la viabilidad del VFA. Sin embargo, queda la posibilidad que la aparición del virus C3 Argentina/84 se haya debido a una reintroducción accidental por intermedio de la vacuna en uso (Piccone et al, 1988); este punto se discutirá en las secciones 3.3.5 y 4.4.1.

3.2. Situación epidemiológica del VFA serotipo C desde el año 1985 hasta 1991

3.2.1. Aislamientos virales representativos

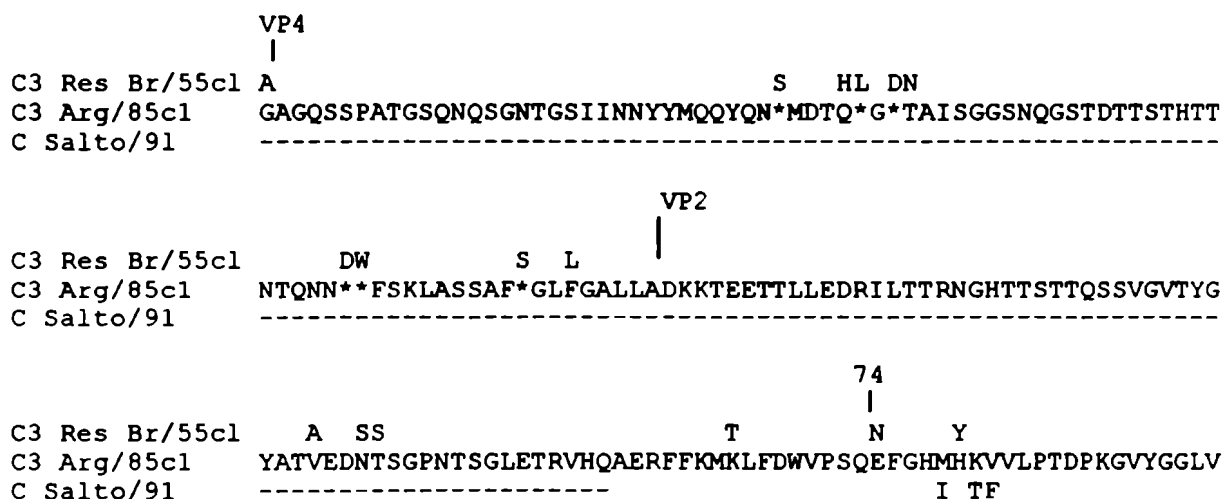
Durante este período, la cepa representativa de los virus actuantes de serotipo C, fue la denominada C3 Argentina/85, cuyo comportamiento antigénico fue significativamente diferente con respecto al virus vacunal C3 Resende Br/55 utilizado hasta ese momento (Bergman et al., 1988). En la vacuna, a partir del año 1986, se utilizó solo la cepa C3 Argentina/85 como representativa de este serotipo (se eliminó la cepa C3 Resende Br/55 de la preparación comercial). En Salto, provincia de Buenos Aires, se aisló en el año 1991 el virus numerado por GELAB/SENASA 37724.

Dada la importancia de estos aislamientos, se analizó la cepa C3 Argentina/85 en relación con la cepa vacunal C3 Resende Br/55, y también la cepa aislada en Salto en el año 1991, en relación con la cepa vacunal de entonces, C3 Argentina/85.

3.2.2. Caracterización de la proteínas de la cápside de las cepas actuantes

Se secuenciaron las proteínas estructurales de la cepa vacunal C3 Argentina/85 y del aislamiento ocurrido en Salto. En la Figura 7 se muestran las secuencias aminoacídicas, deducidas de las secuencias nucleotídicas, de estas dos cepas. Se incluye la cepa C3 Resende Br/55, con fines comparativos.

Figura 7: Secuencia de aminoácidos de las proteínas de la cápside de los virus C3 Resende Br/55, C3 Argentina/85 y C Salto/91



C3 Res Br/55cl M
 C3 Arg/85cl KSYAYMRNGWDVEVTAVGNQFNGGCLLVALVPE*GDISDREKYQLTLYPHQFINPRTNMT
 C Salto/91 * A A *

C3 Res Br/55cl E K
 C3 Arg/85cl AHITVPYVGVNRYDQYKQHRPWTLLVMMVVAPLTVNTSGAQQIKVYANIAPTENVHVAGELP
 C Salto/91 K

VP3
 |
 C3 Res Br/55cl AA F * V
 C3 Arg/85cl SKEGIFPVACTDGYGNMVTDDPKTADPAYGKVVNPPRTALPGRFTNYLDVAEACPTLLMF
 C Salto/91 * L

58
 |
 C3 Res Br/55cl R M *
 C3 Arg/85cl ENVPYVSTRTDGQRL LAKFDVSLAAKHMSNTYLAGLAQYYTQYAGTINLHFMFTGPTDAK
 C Salto/91 * T *

C3 Res Br/55cl E N
 C3 Arg/85cl ARYMVAYVPPGMEAPDNPEEAAHCIHAEWDTGLNSKFTFSIPYISAADYAYTASSEAETT
 C Salto/91 **

VP1
 |
 C3 Res Br/55cl C I Q T
 C3 Arg/85cl SVQGWVCVYQITHGKADADALVVSASAGKDFELRLPVDARPQTATGESADPVTTTVENY
 C Salto/91 Q

C3 Res Br/55cl V P DRQ V D GA Y
 C3 Arg/85cl GGETQIQRRHHTDVAFLVDRFVKVQVSGN.QHTLDVMQAHKNSIV**LLRAATY*FSDLE
 C Salto/91 T N V D GA Y

C3 Res Br/55cl T T
 C3 Arg85/cl IAVTHTGKLTWVPNGAPVVSALDNTTNPAYHKGPLTRLALPYTAPHRVLATTYTGTAYS
 C Salto/91 A

146
 |
 C3 Res Br/55cl TSA T L I I T
 C3 Arg/85cl AGVRRGDLAHLAAAHARHLPTSFNFGAVKAETITELLVVMKRAELYCPRVLPVQPSGDR
 C Salto/91 SA R

C3 Res Br/55cl H S
 C3 Arg/85cl YKQPLIAPAKQLL
 C Salto/91 H

Se utiliza el código de una letra para indicar los aminoácidos. Para los virus C3 Resende Br/55 y C Salto/91 se indican los aminoácidos que difieren del virus C3 Argentina/85 cl. Los segmentos no secuenciados se indican con guiones; asteriscos representan aminoácidos no definidos. La delección del codón 47 de la proteína VP1 se indica con un punto. La numeración es de acuerdo a la utilizada en Mateu et al., 1994.

En la Figura 7 se observa que el virus C3 Argentina/85 tiene una delección en el codón 48 de la proteína VP1, y el aminoácido del extremo carboxilo terminal (209) es leucina; el virus C3 Resende Br/55 (y otras cepas relacionadas) presenta, en cambio, características únicas en esas posiciones: la posición 48 es el aminoácido glutamina, y el extremo carboxilo terminal es el aminoácido serina.

Estas diferencias hacen pensar que el virus C3 Argentina/85 derivó de un virus distinto al virus C3 Resende Br/55, actuante hasta entonces. Al comparar la secuencia nucleotídica de la proteína VP1 con otros virus circulantes en Sudamérica, se observa que posee 43 sustituciones nucleotídicas con respecto al virus brasileño C3 Indaial Br/78, y 71 en relación al virus C3 Resende Br/55 (Piccone et al., 1988).

Del análisis de la Figura 7 se desprende que la cepa C3 Argentina/85 presenta un 94 % de homología con respecto al virus C3 Resende Br/55. Se diferencian en 41 aminoácidos, de los cuales 23 están dentro o muy cercanos a sitios antigénicos.

El virus aislado en Salto en el año 1991 mostró pertenecer a la línea evolutiva del virus C3 Argentina/85, ya que además de presentar un mayor porcentaje de homología (97%) que con el virus C3 Resende Br/55 (94%), presenta en la proteína VP1 en las posiciones mencionadas, las características del virus C3 Argentina/85. De las sustituciones que posee con respecto a C3 Argentina/85, 6 se encuentran en sitios antigénicos, y el resto fuera de ellos (estos valores se obtuvieron sin considerar la secuencia de la proteína VP4 y el extremo amino terminal de la proteína VP2, que no han sido secuenciados en la cepa de Salto).

3.2.3. Variabilidad en sitios antigénicos

3.2.3a. Comparación del virus C₃ Argentina/85 con el virus C₃ Resende Br/55

Tal como se mencionó anteriormente, de los 41 aminoácidos que diferencian estas dos cepas, 12 se encuentran dentro de sitios antigénicos, y otros 11 en posiciones muy cercanas a ellos.

En el "sitio A", si bien la posición crítica (146 de la proteína VP1, 1.4.3) es igual para ambas cepas, estas se diferencian en varias posiciones (137, 138, 139 140 y 149).

En el "sitio D", por el contrario, se observan muy pocas diferencias, pero una de ellas (aminoácido 74 de la proteína VP2, *glu* por *asn*) parece ser de suma importancia para el reconocimiento de este sitio (1.4.3; Mateu et al. 1994). O sea que la divergencia

antigénica entre ambas cepas se debe: en el "sitio A" a una acumulación sucesiva de sustituciones en posiciones no críticas, mientras que en el "sitio D", a pocas sustituciones en posiciones críticas.

Los sitios "C" y "III", en la proteína VP1, también presentan variaciones en secuencia entre ambas cepas. La importancia de estas sustituciones sobre la antigenicidad del "sitio III" no ha sido posible deducirla por falta de anticuerpos monoclonales contra dicho sitio. En cuanto al "sitio C", los dos anticuerpos monoclonales disponibles no lograron diferenciar a ambas cepas (Figura 8), a pesar del cambio de secuencia que presentan (posición 197, *tyr* por *his*). Si bien no es clara todavía la influencia de este sitio, el mismo debe ser considerado, ya que péptidos que representan este sitio junto con el sitio A, han protegido vacunos frente a la descarga de virus homólogo para el serotipo O (Di Marchi et. al., 1986).

La cepa C3 Argentina/85, aparecida a finales del año 1984, mostró ser serológica y antigénicamente divergente con respecto a las cepas C3 Resende Br/55 y C3 Argentina/84. Sólo su inclusión en la vacuna permitió la disminución del número de brotes de fiebre aftosa, ocurridos durante la onda epidémica 1984-1986 (Bergman et al 1988; Martínez et al, 1991). Estas diferencias fueron evidenciadas a nivel genético, ya que el virus C3 Argentina/85 mostró una mayor distancia genética respecto a C3 Argentina/84 y C3 Resende Br/55, que la distancia genética entre estas dos cepas entre sí. Así también la sustitución en el extremo carboxilo terminal y la delección del codón 48 de la proteína VP1, muestran que el virus C3 Argentina/85 pertenece a una diferente línea evolutiva (1.5.2).

El análisis de las sustituciones encontradas, sugiere que las diferencias en los sitios "A" y "D" han contribuido a la diversificación antigénica e inmunológica observada en el virus C3 Argentina/85.

3.2.3b. Comparación del virus aislado en Salto en el año 1991 (GELAB/SENASA N° 37724) con el virus C3 Argentina/85

En la Figura 7 se observa que de un total de 17 sustituciones de aminoácidos encontradas entre ambos virus, 6 se hallan en sitios antigénicos, y otras 6 en posiciones cercanas a ellos. Las 5 sustituciones restantes se encuentran en sitios no relacionados hasta el momento con antigenicidad (aminoácidos 24 y 102 de la proteína VP1, 175 de la proteína VP2, 101 y 218 de la proteína VP3).

El "sitio A" presenta solo 2 sustituciones (en posiciones 139, ser por gly, y 140, ala por val, de la proteína VP1), que parecen tener cierto grado de relevancia antigénica, ya que aislamientos naturales con mutaciones en tales posiciones han cambiado epitopos reconocidos por anticuerpos monoclonales dirigidos a este sitio antigénico (Martínez et al., 1991).

En cuanto al "sitio D", las diferencias aminoacídicas encontradas (en posiciones 78, 80 y 134 de la proteína VP2), no se localizan en posiciones críticas antigénicamente. Si bien se encuentran dentro del sitio antigénico, las mutantes resistentes a anticuerpos monoclonales neutralizantes que mapean en este sitio, como así también distintos aislamientos de campo, no presentaron mutaciones en tales posiciones, que demuestren que provocaron el escape a la neutralización (Mateu et al., 1994; Lea, Hernández et al., 1994).

El "sitio C", presenta una sustitución en el aminoácido 197 (his por tyr); de todas formas, la relevancia de esta sustitución (como así también las encontradas en aminoácidos cercanos al "sitio III") no ha podido ser dilucidada (3.2.3a.).

En conclusión, la cepa aislada en Salto en el año 1991 mostró una gran homología genética con la cepa vacunal usada entonces (C3 Argentina/85). Las diferencias encontradas, si bien en algunos casos afectaron sitios antigénicos, fueron pocas y ubicadas fuera de posiciones esenciales. Estas pudieron haber provocado una pequeña variación antigénica (3.2.4), que se tradujo en un brote de fiebre aftosa, debido a una baja inmunidad por parte de los animales susceptibles.

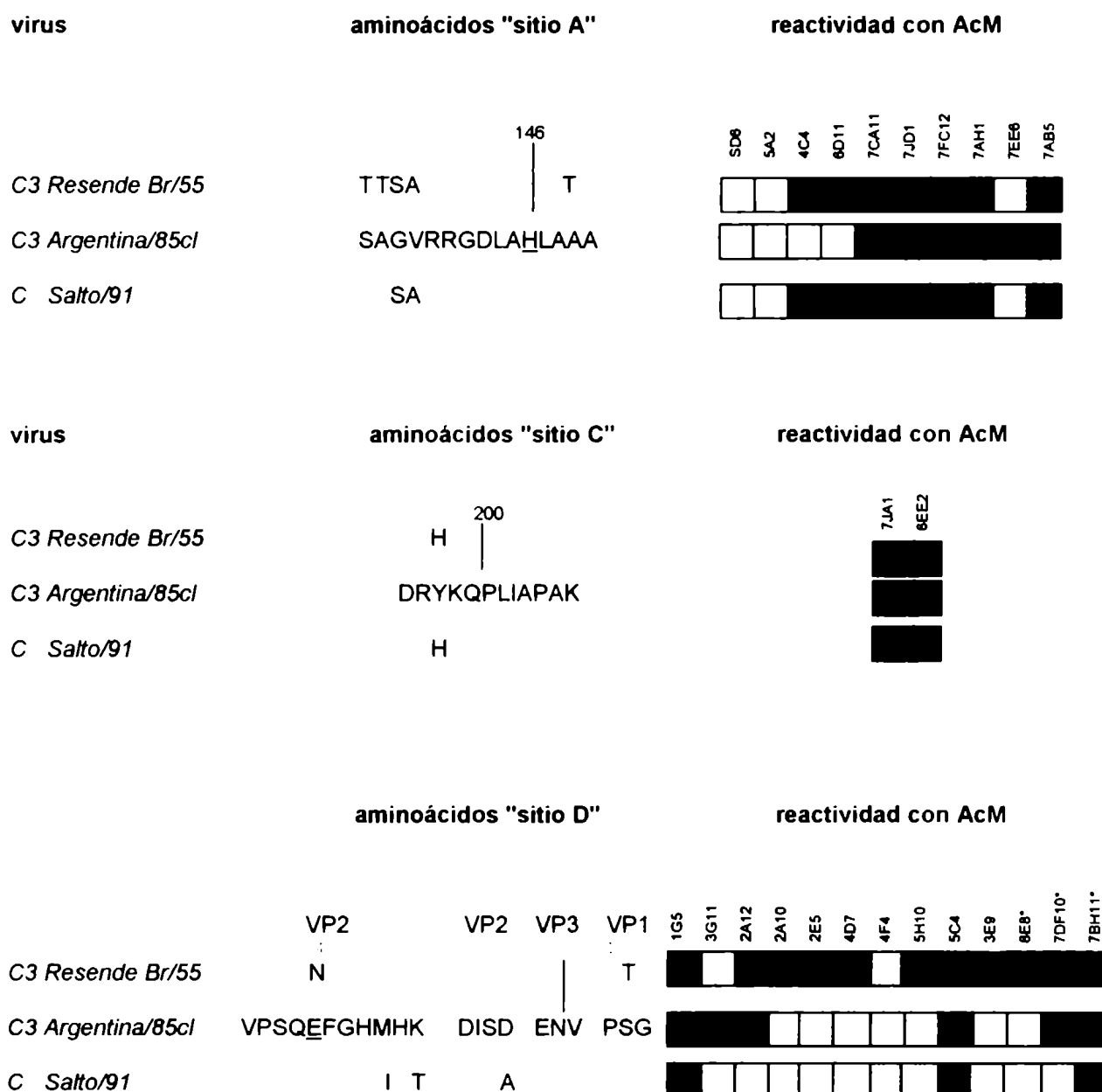
La revacunación de los rodeos afectados, como así también de los circundantes, impidió una mayor diseminación del virus.

El análisis de las secuencias de aminoácidos de estas dos cepas, es un ejemplo de distanciamiento antigénico gradual debido a una variación antigénica mediada por acumulación de mutaciones alrededor de posiciones críticas.

3.2.4. Caracterización antigénica con anticuerpos monoclonales y su correlación con las secuencias aminoacídicas

En la Figura 8 se comparan las secuencias aminoacídicas de los sitios antigénicos "A", "C" y "D", con la reactividad de los virus frente a un panel de anticuerpos monoclonales neutralizantes dirigidos a tales sitios antigénicos.

Figura 8: Secuencia de aminoácidos y reactividad con anticuerpos monoclonales de los sitios antigénicos "A", "C" y "D", de los virus C3 Resende Br/55, C3 Argentina/85 y C Salto/91.



Para cada virus, se indican las reactividades con anticuerpos monoclonales que reconocen distintos epítopos en los sitios "A", "C" y "D" o sitios no identificados, a continuación de la secuencia aminoacídica correspondiente al sitio antigénico. Las reactividades con los AcM que reconocen los sitios "A" y "C" fueron obtenidas en ensayos inmunoenzimáticos de las proteínas virales, mientras que las reactividades con los AcM que reconocen el sitio "D" y sitios no identificados fueron obtenidas en ensayos de inmunodot enzimáticos. Para cada AcM, la reactividad relativa frente al virus usado para generar el AcM se da como , positiva (reactividad similar observada); , intermedia; , débil o negativa. Los aminoácidos críticos para el reconocimiento antigénico se muestran subrayados.

* AcM no mapeados.

El "sitio A" comprende los aminoácidos 137-150, correspondiendo a la primera arginina la posición 140a (esta nomenclatura corresponde a la utilizada por Martínez et al., 1991).

3.2.4a. Comparación del virus C3 Argentina/85 con el virus C3 Resende Br/55

En la Figura 8, se observa que las cepas C3 Resende Br/55 y C3 Argentina/85 se diferencian antigénicamente en los sitios "A" y "D", mientras que los dos anticuerpos monoclonales dirigidos contra el "sitio C" no las han podido diferenciar.

En el "sitio A", los anticuerpos monoclonales que discriminan entre ambas cepas son 4C4, 6D11 y 7EE6. Las reactividades de 4C4 y 6D11 se correlacionan con las sustituciones aminoacídicas observadas, ya que se ha visto que las posiciones 139 y 140 afectan la unión de estos anticuerpos monoclonales al antígeno (Mateu et. al, 1990); y es justamente en estas posiciones donde estas dos cepas difieren (*gly* por *ser* y *val* por *ala*, respectivamente). En cuanto a 7EE6, no ha sido determinado el lugar preciso donde mapea dentro del "sitio A". Por otra parte, la reactividad de ambos virus frente a los anticuerpos monoclonales 7CA11, 7JD1 y 7FC12 fue idéntica. Este resultado es coherente, ya que estos anticuerpos están dirigidos hacia la región carboxilo terminal adyacente a la secuencia conservada RGDLA (Mateu et al, 1990), donde las secuencias de estos dos virus son iguales, excepto en la posición 149 (*ala* por *thr*). Sin embargo, esta posición (149) no afecta la reactividad de los anticuerpos monoclonales citados (Mateu et al., 1990; comparar virus C3 Indaial Br/71 y C3 Resende Br/55 en Martínez et al., 1991).

En cuanto al "sitio C", los anticuerpos monoclonales dirigidos contra este sitio, 7JA1 y 6EE2, no lograron diferenciar antigénicamente las cepas, que presentan una sustitución en el aminoácido 197 (*tyr* por *his*); por lo cual se puede concluir que o bien los anticuerpos no mapean en tal posición (197), o tal sustitución no afecta la unión de los anticuerpos al antígeno.

Por último, en el "sitio D", varios anticuerpos monoclonales discriminan entre los dos virus, a pesar que difieren en solo dos aminoácidos. La sustitución en el aminoácido 74 de la proteína VP2 (*glu* por *asn*), parece tener gran influencia en las diferencias antigénicas encontradas, ya que se ha observado que varios anticuerpos monoclonales mapean alrededor de esa posición (2E5, 4D7, 5H10, 5C4 y 3E9)(Lea, Hernández et. al., 1994). Así también esta posición ha sido encontrada sustituida en mutantes resistentes a la neutralización por anticuerpos monoclonales dirigidos a este sitio, y en cepas de campo provenientes de infecciones agudas (Mateu et. al., 1994). En cuanto a la sustitución en el aminoácido 193 de la proteína VP1 (*ser* por *thr*), parece haber tenido efecto sobre la reactividad de 3G11, aunque no sobre 2A12 y 1G5, tres anticuerpos monoclonales que mapean alrededor de dicha posición (Lea, Hernández et. al., 1994). De todas formas es difícil atribuir para cada anticuerpo monoclonal la sustitución responsable de la pérdida de

su reactividad, ya que todos los epitopos del "sitio D" parecen estar conectados (Lea, Hernández et. al., 1994).

3.2.4b. Comparación del virus aislado en Salto en el año 1991 (GELAB/SENASA 37724), con el virus C3 Argentina/85 y C3 Resende Br/55

De la Figura 8, se observa que el aislamiento de Salto se puede diferenciar de los otros dos virus, tanto en el "sitio A" como en el "sitio D".

En el "sitio A", tal aislamiento presenta mayor homología antigénica con el virus C3 Resende Br/55 que con el virus C3 Argentina/85, a pesar que la secuencia de aminoácidos en este sitio presenta tres sustituciones con respecto al virus C3 Resende Br/55 (posiciones 137, 138 y 149), y dos frente al virus C3 Argentina/85 (posiciones 139 y 140). Los aminoácidos antigénicamente críticos 139 y 140 no han variado respecto del virus C3 Resende Br/55, lo cual explica la reactividad de los anticuerpos monoclonales 4C4 y 6D11. Por otro lado, las sustituciones ser por thr en posición 137 y ala por thr en las posiciones 138 y 149, no parecen afectar la antigenicidad del "sitio A", ya que las reactividades del virus C3 Resende/Br 55 y del aislamiento de Salto son muy semejantes. Los anticuerpos monoclonales 7CA11, 7JD1 y 7FC12 no distinguen al aislamiento de Salto de los otros dos virus, por mapear hacia el extremo carboxilo terminal de la secuencia conservada RGDLA (3.2.4a.). Se deduce entonces la importancia de observar cuales son las posiciones afectadas, más que el número total de sustituciones, en la determinación de las relaciones antigénicas entre distintos virus. Así también, la necesidad de complementar los datos de secuenciación con los de reactividad con anticuerpos monoclonales.

En el "sitio C", el aislamiento de Salto no se diferencia del virus C3 Resende Br/55, como es de esperar por la similitud de secuencia, mientras que frente a C3 Argentina/85, caben las mismas consideraciones hechas en la comparación de este último virus con C3 Resende Br/55 (3.2.4a.).

En cuanto al "sitio D", el aislamiento de Salto presenta una mayor homología con el virus C3 Argentina/85 (anticuerpos monoclonales 2A10, 2E5, 4D7, 5H10, 5C4 y 3E9), que con el virus C3 Resende Br/55. Estos datos son consistentes con las secuencias halladas, ya que en las posiciones críticas 74 de la proteína VP2 y 193 de la proteína VP1 (donde se diferencian C3 Argentina/85 de C3 Resende Br/55: glu por asn, y ser por thr), la cepa de Salto presenta los mismos aminoácidos que el virus C3 Argentina/85. La falta de reactividad frente a los anticuerpos monoclonales 3G11 y 2A12 se puede explicar por las sustituciones en los residuos 78 (ile por met), 80 (thr por lys) 81 (phe por val) y 134 (ala

por asp) de la proteína VP2, que si bien no afectan posiciones críticas, la acumulación de las mismas pudo haber llevado a una modificación de tales epitopos.

Los resultados de reactividad con anticuerpos monoclonales muestran que el aislamiento de Salto presenta mayor homología con el virus C3 Resende Br/55 en el "sitio A", mientras que en el "sitio D" la homología es mayor con el virus C3 Argentina/85. Estos resultados se correlacionan con las secuencias aminoacídicas. La secuencia nucleotídica permitió determinar que el aislamiento de Salto perteneció a la línea evolutiva del virus C3 Argentina/85. Los datos arrojados por experimentos clásicos de serología probablemente hubieran sido confusos, dada la dualidad antigénica de este aislamiento. Si bien no se ha caracterizado serológicamente a este aislamiento (en relación a los dos virus mencionados), sería interesante obtener tales resultados, ya que se podría relacionar la importancia de distintos sitios antigénicos con la inmunogenicidad.

3.2.5. Permanencia en el campo

El período considerado (1985-1991) comienza con la introducción en el campo argentino del virus C3 Argentina/85. Durante el mismo, aparecen brotes causados por virus de serotipo C, aunque en forma más esporádica, ya que prevalece en estos años una onda epidémica causada por virus de serotipo A (virus A Argentina/87, en Buenos Aires, Santa Fe y La Pampa; Piccone, 1989). Luego de seis años se aísla una cepa de serotipo C en Salto, provincia de Buenos Aires, numerada por GELAB/SENASA 37724. El hecho que el virus más relacionado a esta cepa es el C3 Argentina/85, su gran homología con el mismo (mayor al 95 % a nivel de nucleótidos) y el no poseer los marcadores moleculares de la línea del virus C3 Resende Br/55, indican que este aislamiento (Salto/91, GELAB/SENASA 37724) deriva por mutación genética del virus C3 Argentina/85, en coincidencia con la prevalencia del virus C3 Argentina/85 en el campo, durante este período.

3.3. Situación epidemiológica del VFA serotipo C desde el año 1992 hasta 1994

3.3.1. Líneas evolutivas actuantes

A finales del año 1992, se detectaron brotes de fiebre aftosa causados por cepas de serotipo C, en el noroeste de la provincia de Buenos Aires y en el sur de la provincia de Córdoba. La aparición de estos focos alertó a las autoridades sanitarias, dado el avance que se estaba verificando en cuanto al control de la fiebre aftosa, debido a la aplicación en forma efectiva del Plan Nacional de Erradicación.

Como ejemplo, un muestreo de la población bovina del partido de General Villegas, mostró que de 19.657 animales, 1.572 presentaron síntomas clínicos. Estos valores representan un porcentaje de morbilidad del 8%. La importancia de la región en la producción se desprende rápidamente de su población ganadera, que es de 644.866 animales.

Con el fin de determinar la importancia epidemiológica de los virus causantes de tales brotes, se determinó la secuencia de los genes que codifican para las proteínas estructurales de un aislamiento del partido de General Villegas, y la secuencia de los sitios antigénicos de otros aislamientos relacionados epidemiológicamente. También se realizó una caracterización antigénica de los nuevos aislamientos, analizando su reactividad con un panel de anticuerpos monoclonales dirigidos a los sitios antigénicos "A", "C" y "D". Las secuencias y reactividades se compararon con las correspondientes a la cepa vacunal en uso, C3 Argentina/85.

Todos los aislamientos demostraron pertenecer a la línea evolutiva del virus vacunal, ya que el porcentaje de homología de ellos con distintos virus previamente estudiados, revela que están relacionados a C3 Argentina/85 más que a otros virus pertenecientes a las distintas líneas evolutivas (Tabla 4). Además, todos los aislamientos poseen en la proteína VP1 el aminoácido leucina en el extremo carboxilo terminal, y la delección del codón 48 (ambos como los virus de la línea del C3 Argentina/85, a diferencia del virus C3 Resende Br/55 y sus variantes).

Tabla 4: Porcentaje de homología entre cepas de VFA aisladas durante el período 1992-1994 en Argentina con virus pertenecientes a las distintas líneas evolutivas

Virus N° de GELAB	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V	Grupo VI
38448/93	84.04	86.88	85.78	97.30	89.25	80.39
38355/93	84.04	86.72	86.70	91.42	87.95	82.18
38395/93	84.20	86.88	86.72	91.46	87.99	81.09
38400/93	84.20	86.88	86.72	91.46	87.99	81.09
38726/94	83.25	87.51	86.41	90.68	87.67	82.36
38440/93	83.41	84.36	84.20	93.36	88.78	82.54
38727/94*	78.94	78.50	81.14	91.22	85.08	80.63

Los grupos son de acuerdo a Martínez et al., 1992.

La numeración de los aislamientos corresponde a la utilizada por GELAB/SENASA.

Los porcentajes de homología se obtuvieron teniendo en cuenta la secuencia nucleotídica de la proteína VP1.

* Los porcentajes de homología correspondientes al aislamiento 38727/94 se obtuvieron teniendo en cuenta los 226 nucleótidos del extremo carboxilo terminal de la proteína VP1.

Los distintos aislamientos analizados se pueden agrupar, para facilitar la comprensión del análisis realizado, en: a) comprende el aislamiento de General Roca del año 1993 (GELAB/SENASA 38448), que fue el que mayor homología presentó con respecto a la cepa vacunal; b) comprende los dos aislamientos de General Villegas y el de General Roca (GELAB/SENASA 38400) del mismo año y el de San Cristóbal del año 1994. Estos aislamientos se caracterizan por poseer una sustitución crítica en el aminoácido 146 de la proteína VP1 (*gln* por *his*), y c) comprendido por los aislamientos de Rivadavia de los años 1993 y 1994, con la misma sustitución, pero distantes genéticamente de los virus del "grupo b".

Es de destacar la cocirculación de variantes (comparar aislamientos 38400 y 38448) dentro de una misma localidad (General Roca) en un intervalo acotado de tiempo (febrero-marzo de 1993).

La revacunación de los rodeos afectados, y el mantenimiento de una estricta barrera sanitaria alrededor de las zonas involucradas por parte de las autoridades oficiales encargadas del control de la enfermedad, impidieron la diseminación del virus.

3.3.2. Virus pertenecientes al "grupo a"

3.3.2a. Caracterización de las proteínas de la cápside

Tal como se mencionó previamente, el aislamiento de este grupo es el que mayor homología presenta con la cepa vacunal C3 Argentina/85 (Tabla 4): se diferencia en 6 aminoácidos en la proteína VP1, y en solo 1 aminoácido en la proteína VP3. Las sustituciones halladas se encuentran en posiciones cercanas a los sitios antigénicos "C" y "III", y en el extremo carboxilo terminal de la proteína VP3. También en la proteína VP2 (tomando en cuenta una pequeña región secuenciada) presenta dos sustituciones, una de ellas en el sitio antigénico "D" (Figura 9). El 97.3% de homología en aminoácidos y nucleótidos respecto de la cepa vacunal, se ha considerado teniendo en cuenta las diferentes regiones secuenciadas. Los porcentajes de homología de este aislamiento respecto al aislamiento de General Villegas del año 1993 y C3 Resende Br/55, son 90.36% y 89.25% respectivamente.

Figura 9: Secuencia de aminoácidos de las proteínas de la cápside de los virus C3 Resende Br/55, C3 Argentina/85 y C G. Roca/93 (GELAB/SENASA 38448)



3.3.2b. Variabilidad en sitios antigénicos

La significación epidemiológica de las sustituciones de aminoácidos se deduce del análisis de los diferentes sitios antigénicos.

El aislamiento de General Roca/93, mostró una única sustitución en el "sitio A", al compararlo con la cepa vacunal. Esta única sustitución (aminoácido 140, ala por val), también se encontró en poblaciones heterogéneas (no clonadas) de la cepa vacunal (Martínez et al., 1991), por lo que es altamente improbable que tal sustitución sea responsable de la ruptura de inmunidad producida por esta variante.

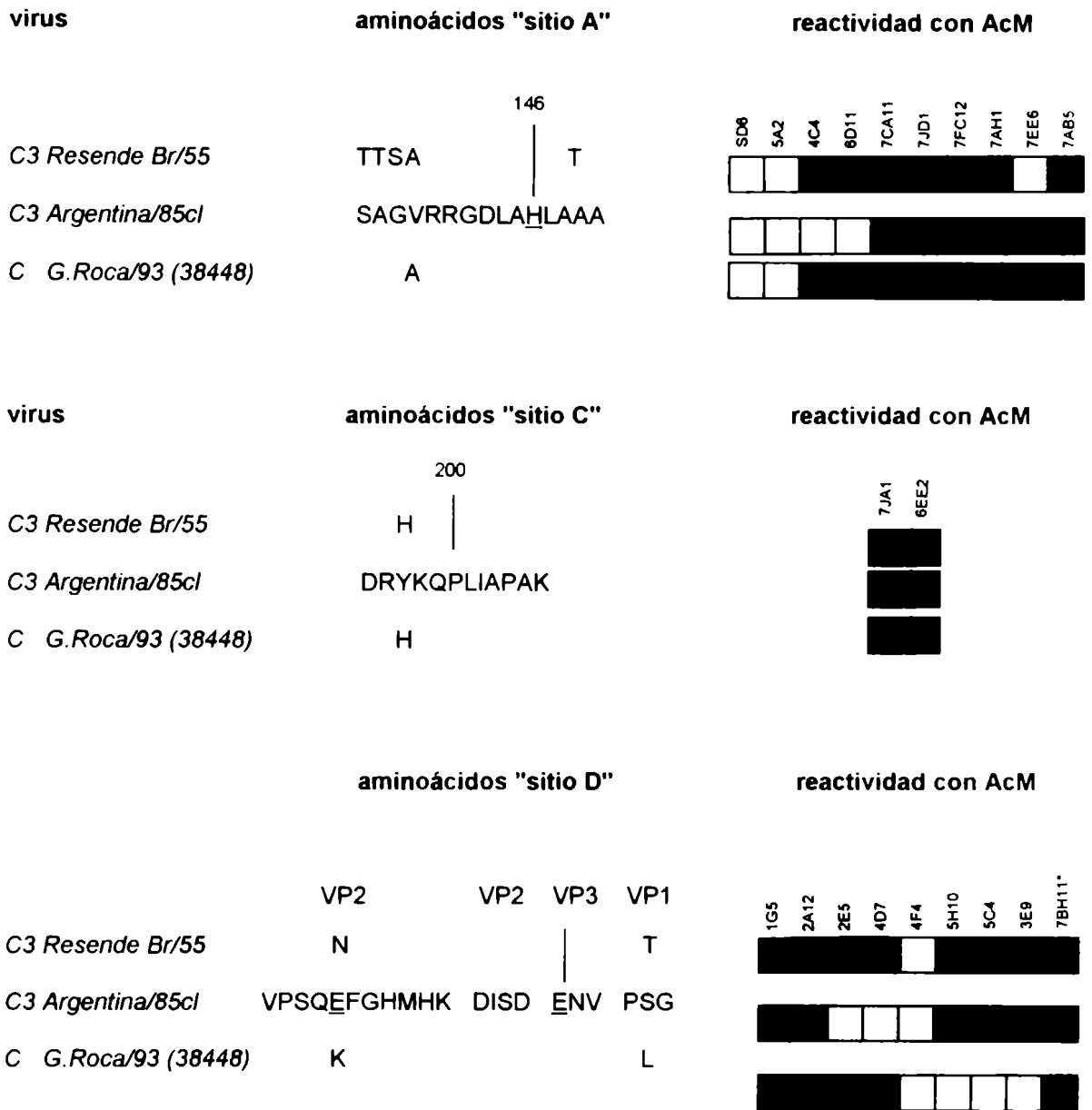
Por el contrario, presenta sustituciones con respecto a la cepa vacunal en el "sitio D" y cerca de los sitios antigénicos "C" y "III". En el extremo carboxilo terminal de la proteína VP1, presenta el aminoácido histidina típico en la posición 197, y el aminoácido leucina en la posición 193, que forma parte del sitio discontinuo "D"; leucina en tal posición no ha sido hallada en otros virus estudiados. El aminoácido 190 es fenilalanina, igual a los aislamientos de Rivadavia del "grupo c". En las proximidades del "sitio III", se diferencia de la cepa vacunal en los aminoácidos 56 (thr por ala) y 59 (asp por asn). En cuanto al "sitio D", presenta una sustitución en el aminoácido crítico 74 (lys por glu).

La aparición de esta variante se pudo haber debido a que el ganado se encontraba en un estado de escasa o nula inmunidad. Si por el contrario se tratara de animales con un nivel de inmunidad medianamente aceptable (como podrían ser animales primovacunados), esta variante nos indicaría nuevamente la importancia de otros sitios antigénicos fuera del "sitio A" como responsables de la protección (3.1.4). No se han realizado estudios serológicos y experimentos de protección cruzada de esta cepa con la cepa vacunal, que permitan confirmar esta posibilidad.

3.3.2c. Comparación de la secuencia de los sitios antigénicos con la reactividad de un panel de anticuerpos monoclonales dirigidos a tales sitios antigénicos

El aislamiento de General Roca, mostró una reactividad muy parecida en el "sitio A" a la del virus vacunal C3 Argentina/85 (Figura 10). Este resultado correlaciona muy bien con las secuencias aminoacídicas, ya que ambos virus poseen una secuencia muy similar. Las diferencias en la reactividad frente a los anticuerpos monoclonales 4C4 y 6D11, se pueden explicar por la sustitución en el aminoácido 140, (ala por val). Se ha hallado que mutaciones en esta posición, afectan la reactividad con estos anticuerpos monoclonales (Mateu et al., 1990).

Figura 10: Secuencia de aminoácidos y reactividad con anticuerpos monoclonales de los sitios antigénicos "A", "C" y "D", de los virus C3 Resende Br/55, C3 Argentina/85 y C G.Roca/93 (GELAB/SENASA 38448).



Para cada virus, se indican las reactividades con anticuerpos monoclonales que reconocen distintos epítomos en los sitios "A", "C" y "D" o sitios no identificados, a continuación de la secuencia aminoacídica correspondiente al sitio antigénico. Las reactividades con los AcM que reconocen los sitios "A" y "C" fueron obtenidas en ensayos inmunoenzimáticos de las proteínas virales, mientras que las reactividades con los AcM que reconocen el sitio "D" y sitios no identificados fueron obtenidas en ensayos de inmunodot enzimáticos. Para cada AcM, la reactividad relativa frente al virus usado para generar el AcM se da como , positiva (reactividad similar observada); , intermedia; , débil, o negativa. Los aminoácidos críticos para el reconocimiento antigénico se muestran subrayados.

* AcM no mapeados.

El "sitio A" comprende los aminoácidos 137-150, correspondiendo a la primera arginina la posición 140a (esta nomenclatura corresponde a la utilizada por Martínez et al., 1991).


```

                                     74
                                     |
C3 Res Br/55cl           A  SS                               T       N       Y
C3Arg/85cl              YATVEDNTSGPNTSGLETRVHQAERFFKMKLFDWVPSQEFGHMHKVVLP TDPKGVYGGGLV
C G.Villegas/93         T  S                               L  D  K       Y  A  G
C White/93              -----
C G.Roca/93             T  S      *           *           **    L  D  *  K       Y  A  G
C S.Cristóbal/94       T  S                               L  N  K      *   IA

```

```

                                     M
C3 Res Br/55cl
C3Arg/85cl              KSYAYMRNGWDVEVTA VGNQFNGGCLLVALVPE*GDISDREKYQLTLYPHQFINPRTNMT
C G.Villegas/93
C White/93              A
C G.Roca/93             *           *           *           * -----
C S.Cristóbal/94       *           *           AS      *      * -----

```

```

                                     E       K
C3 Res Br/55cl
C3Arg/85cl              AHITVPYVGVNRYDQYKQHRPWLTVVMVAPLTVNTSGAQQIKVYANIAPT NVHVAGELP
C G.Villegas/93         Q           *           H  E
C White/93              -----
C G.Roca/93             -----
C S.Cristóbal/94       -----

```

```

          VP3
          |
C3 Res Br/55cl           AA F                               *                               V
C3Arg/85cl              SKEGIFPVACTDGYGNMVT TDPKTADPAYGKVYNPPRTALPGRFTNYLDVAEACPTLLMF
C G.Villegas/93         L
C White/93              -----
C G.Roca/93             ---          *           *           *                               L
C S.Cristóbal/94       ---          V                               S

```

```

          58
          |
C3 Res Br/55cl
C3Arg/85cl              ENVPYVSTR TDGQRL LAKFDVSLAAKHMSNTYLAGLAQYYTQYAGTINLHFMTGPTDAK
C G.Villegas/93         DD
C White/93              -----
C G.Roca/93             DD           **           * -----
C S.Cristóbal/94       DD           R                               M-----

```

```

                                     E                               N
C3 Res Br/55cl
C3Arg/85cl              ARYMVAYVPPGMEAPDNPEEAAHCIHA EWD TGLNSKFTFSIPYISAADYAYTASSEAETT
C G.Villegas/93         G
C White/93              -----
C G.Roca/93             -----
C S.Cristóbal/94       -----

```


La homología entre el virus de General Villegas/93 representativo de este grupo, y el virus C3 Argentina/85 a nivel de nucleótidos, es del 91.46% (mayor al 87.99% existente entre el virus de General Villegas y C3 Resende Br/55). A nivel de aminoácidos presenta 37 sustituciones, lo cual representa un 5% de los residuos. De estas sustituciones, 25 corresponden a aminoácidos expuestos, según cálculos de accesibilidad (Mateu et al., 1994). Por último, 12 de estos se hallan dentro de sitios antigénicos. Algunas de las sustituciones encontradas en este aislamiento se produjeron en posiciones no encontradas hasta la fecha como variables. Tal es el caso de los aminoácidos 157 (ala) de la proteína VP1, 67 (leu) y 82 (ala) de la proteína VP2, y 193 (thr) de la proteína VP3.

En cuanto al otro aislamiento de General Villegas del mismo año y al otro aislamiento de General Roca (38400), no presentan sustituciones de aminoácidos con respecto al virus representativo del grupo en las regiones secuenciadas (Figura 11). Se diferencian entre ellos en uno o dos nucleótidos. Esta gran similitud se puede explicar por la proximidad (en tiempo y lugar) en que fueron aislados: los aislamientos de General Villegas provienen de un mismo establecimiento; el de General Roca, si bien pertenece a otra localidad, fue aislado al día siguiente al de General Villegas (Tabla 1).

El virus aislado en el año 1994 en San Cristóbal (GELAB/SENASA 38726) mostró una gran homología con los aislamientos del año anterior, 1993. La cápside del virus de San Cristóbal, en la región secuenciada, presenta una homología a nivel de nucleótidos del 97.7% con la del aislamiento de General Villegas, mayor a la que presenta frente a otros virus (90.68% frente a C3 Argentina/85, y 87.67% frente a C3 Resende Br/55). Las sustituciones halladas (con respecto al virus de General Villegas) se encuentran en su mayoría fuera de la proteína VP1 (Figura 11). En esta, presenta un cambio en el "sitio A", en la posición 137 (arg por ser) y una sustitución en el extremo carboxilo terminal, dentro del "sitio C", en la posición 202 (val por ile). Ese aminoácido, valina, es típico para esa posición en los virus de serotipo C europeos, mientras que la isoleucina es común en los sudamericanos (Mateu et al., 1994).

En la proteína VP2, las 5 sustituciones (aminoácidos 70, asn por asp; 79, his por tyr; 81, ile por val; 86, asp por gly; y 130, ser por gly) se encuentran dentro o cerca del sitio antigénico "D". Con respecto a las cuatro sustituciones encontradas en la proteína VP3, dos se encuentran cerca del sitio antigénico "D" (aminoácido 56, ser por leu; y 70, arg por gln; esta última posición, no había sido encontrada hasta ahora como variable). Las otras dos sustituciones son: valina por alanina, en el aminoácido 25 y metionina por leucina, en el aminoácido 90 (ambas también posiciones no encontradas como variables).

3.3.3b. Variabilidad en sitios antigénicos

De la Figura 11, se observa que los aislamientos de este grupo poseen sustituciones con respecto a la cepa vacunal C3 Argentina/85 en todos los sitios antigénicos. La cepa de General Villegas numerada por GELAB/SENASA 38355, es igual a ellos en los sitios "A", "C" y "III"; la secuencia del "sitio D" no fue determinada.

En el "sitio A", poseen sustituciones en las regiones más variables dentro de este sitio (Martínez et al., 1991): en los aminoácidos 139 (thr por gly) y 140 (ser por val), hacia el extremo amino terminal de la secuencia conservada RGDLA, y en el aminoácido 150 (thr por ala), hacia el extremo carboxilo terminal de dicha secuencia. También alrededor del sitio considerado aparecen sustituciones; algunas de ellas no muy frecuentemente encontradas en aislamientos de campo, como el aminoácido alanina en posición 129 (solo observado en virus C aislados en las islas Filipinas en los años 1987-1988) o en posición 157 (no observado todavía).

Pero lo más destacable de estos aislamientos es la sustitución hallada en la posición 146, glutamina en lugar de histidina. Esta posición ha sido identificada como antigénicamente crítica para el "sitio A" (1.4.3.)

En cuanto al "sitio D", las cepas de este grupo del año 1993 han acumulado varias mutaciones: tres en la proteína VP2 (posiciones 70 asp por val; 74 lys por glu; y 79 tyr por his), dos en la proteína VP3 (58 asp por glu; y 59 asp por asn) y una en la proteína VP1 (193 thr por ser). También se han encontrado sustituciones en aminoácidos circundantes a este sitio. Comparaciones de secuencia con reactividad frente a anticuerpos monoclonales (Figura 12 y Mateu et al., 1994) sugieren que las sustituciones en las posiciones 74 de la proteína VP2 y 58 de la proteína VP3 pueden tener un rol preponderante en la divergencia antigénica de estos virus con respecto a la cepa vacunal, C3 Argentina/85.

En el "sitio C", estos virus tienen el aminoácido histidina en la posición 197, el más común observado en esta posición entre todos los virus estudiados. Los dos anticuerpos monoclonales disponibles no lograron diferenciarlos de la cepa vacunal. Este resultado es esperable, ya que esa sustitución en otros virus (comparar C3 Resende Br/55 y el aislamiento de Salto, con C3 Argentina/85, Figura 8; 3.2.4a) no afectó su reactividad frente a tales anticuerpos.

En cuanto al "sitio III", también tienen una sustitución con respecto al virus vacunal, en el aminoácido 46 (asp por gly). Los dos aminoácidos fueron repetidamente encontrados en

esta posición, tanto en cepas sudamericanas como en cepas europeas. También, otros dos aminoácidos cercanos a este sitio (56 y 59), que aparecen como variables al comparar distintos virus (Martínez et al., 1991), se encuentran sustituidos en estos virus. Como se mencionó en 3.2.3a., aún no se ha esclarecido la importancia de estos dos sitios antigénicos para el reconocimiento viral por parte del huésped.

El virus perteneciente a este mismo grupo aislado en San Cristóbal un año después, mostró una gran homología con los virus de General Villegas y General Roca del año 1993, al comparar las cápsides en su conjunto; también sus sitios antigénicos mostraron homología, aunque se observó cierta variabilidad, especialmente en el "sitio D" (Figura 11). En este sitio, si bien las posiciones críticas (aminoácido 74 de la proteína VP2 y 58 de la proteína VP3) se mantuvieron (donde se diferencia de la cepa vacunal), en otras posiciones ha acumulado algunas mutaciones respecto a aquellos, muy poco frecuentemente observadas. Tal es el caso de los aminoácidos asparagina en la posición 70, isoleucina en la posición 81 y serina en la posición 130 de la proteína VP2, y el aminoácido serina en la posición 56 de la proteína VP3.

En el "sitio A" se conservan todas las sustituciones determinadas en el aislamiento de General Villegas con respecto a la cepa vacunal (incluyendo la sustitución crítica, gln por his, en el aminoácido 146), y acumula una más, la arginina en la posición 137 (no observada todavía en los virus estudiados).

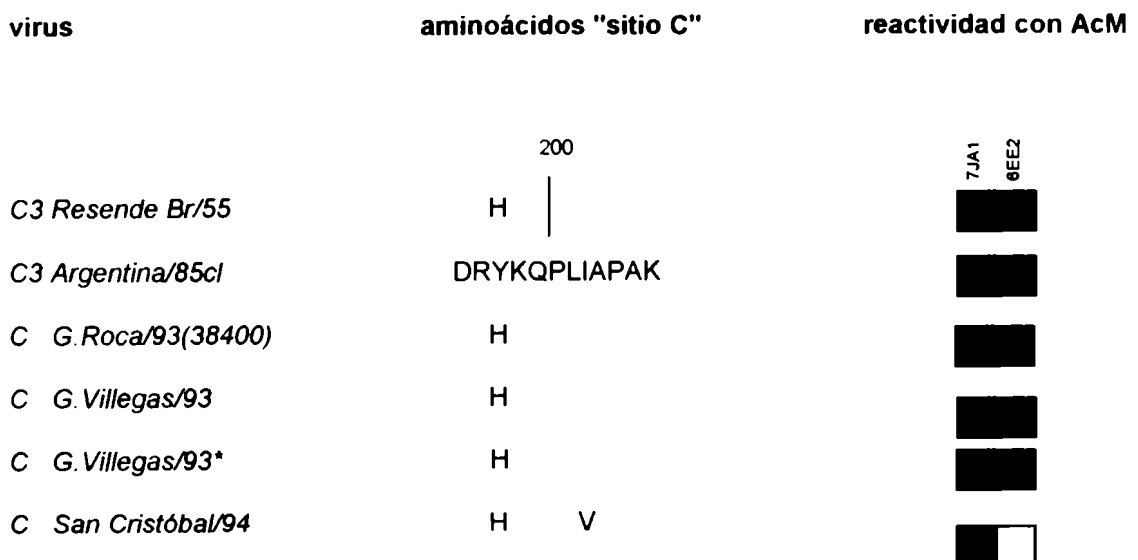
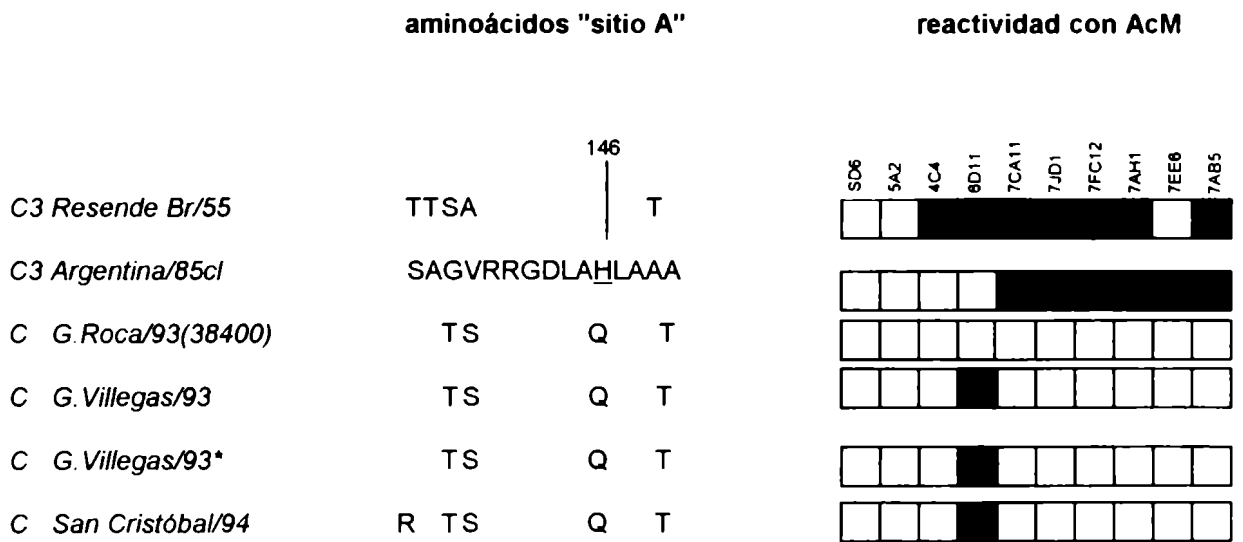
En el sitio "C" también acumula una sustitución más en el aminoácido 202 (val por ile) y el "sitio III" se mantiene igual.

Es decir que los virus aislados por primera vez en General Villegas, acumularon una serie de mutaciones (especialmente en sus sitios antigénicos) hasta aparecer en San Cristóbal un año después.

3.3.3c. Comparación de la secuencia de los sitios antigénicos con la reactividad de un panel de anticuerpos monoclonales dirigidos a tales sitios antigénicos

En la Figura 12 se comparan las secuencias aminoacídicas de los sitios antigénicos "A", "C" y "D", con la reactividad de los virus frente a un panel de anticuerpos monoclonales neutralizantes dirigidos a tales sitios antigénicos.

Figura 12: Secuencia de aminoácidos y reactividad con anticuerpos monoclonales de los sitios antigénicos "A", "C" y "D", de distintas cepas del VFA.



	aminoácidos "sitio D"					reactividad con AcM												
	VP2	VP2	VP3	VP1		1G5	3G11	2A12	2A10	2E5	4D7	4F4	5H10	5C4	3E9	8E8*	7DF10*	7BH11*
<i>C3 Resende Br/55</i>	N	Y		T		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>C3 Argentina/85cl</i>	VPSQ	<u>E</u> FGHMHK	DISD	<u>ENV</u>	PSG	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>C G.Roca/93(38400)</i>	D	K	Y	DD	T	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>C G.Villegas/93</i>	D	K	Y	DD	T	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>C G.Villegas/93*</i>	*****	*****	***	T		■	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	■
<i>C San Cristóbal/94</i>	N	K		DD	T	■	■	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	■

* C G. Villegas/93, es el aislamiento GELAB/SENASA 38355.

Para cada virus, se indican las reactividades con anticuerpos monoclonales que reconocen distintos epítomos en los sitios "A", "C" y "D" o sitios no identificados, a continuación de la secuencia aminoacídica correspondiente al sitio antigénico. Las reactividades con los AcM que reconocen los sitios "A" y "C" fueron obtenidas en ensayos inmunoenzimáticos de las proteínas virales, mientras que las reactividades con los AcM que reconocen el sitio "D" y sitios no identificados fueron obtenidas en ensayos de inmunodot enzimáticos. Para cada AcM, la reactividad relativa frente al virus usado para generar el AcM se da como ■ , positiva (reactividad similar observada); ■ , intermedia; □ débil , o □ negativa. Los aminoácidos críticos para el reconocimiento antigénico se muestran subrayados.

* AcM no mapeados

El "sitio A" comprende los aminoácidos 137-150, correspondiendo a la primera arginina la posición 140a (esta nomenclatura corresponde a la utilizada por Martínez et al., 1991).

En el "sitio A", los virus de General Villegas y General Roca han cambiado casi todos los epitopos que tenía el virus vacunal, C3 Argentina/85 (Figura 12). Si bien son varios los aminoácidos en que difieren, la sustitución glutamina por histidina en el aminoácido 146 se perfila como la más probable de ser la responsable de este cambio en la antigenicidad, ya que como se dijo, esa única sustitución causó la pérdida de reactividad frente a estos anticuerpos monoclonales en virus del subtipo C1 (Mateu et al., 1990). Recientes experimentos utilizando péptidos sintéticos que mimetizan el "sitio A" de estos virus, con y sin la sustitución en el aminoácido 146, han demostrado que también en el contexto de los virus bajo estudio (virus de la línea C3 Argentina/85), esta sustitución es crítica para el reconocimiento antigénico (Feigelstock et al., enviado para publicación).

Las diferencias en el grado de reactividad entre los aislamientos numerados por GELAB/SENASA 38395 y 38400 con los anticuerpos monoclonales 6D11 y 7CA11 (a pesar de tener idéntica secuencia) son muy pequeñas, y se pueden deber al error inherente del experimento. La reactividad positiva del anticuerpo monoclonal 6D11 (más notable en 38395), se puede deber a la modificación de un epitopo por medio de la acumulación de sustituciones (Mateu et al., 1992).

El aislamiento de San Cristóbal, presentó una reactividad muy parecida a la observada con los virus de General Villegas. Este resultado era esperable, dada la gran similitud de secuencia entre estos virus. Este aislamiento también tiene el aminoácido glutamina en la posición 146 de la proteína VP1, en lugar del aminoácido histidina, más común. En cuanto al aminoácido arginina en posición 137 (en este aminoácido se diferencia de los otros virus), no afectó la reactividad, en el sentido de generar algún epitopo o provocar el cambio de otro.

En el "sitio C", los dos anticuerpos monoclonales disponibles no diferenciaron a los aislamientos del año 1993 de este grupo de la cepa vacunal, ya que la única sustitución existente (*his* por *tyr* en el aminoácido 197) no es suficiente para cambiar en forma importante la reactividad de 7JA1 y 6EE2 frente a los virus estudiados (3.2.4a). En cambio, la posición 202 sí parece tener un efecto más importante en la reactividad del anticuerpo monoclonal 6EE2, ya que el aislamiento de San Cristóbal, que posee una sustitución en esa posición (*val* por *ile*), presenta una reactividad débil con este anticuerpo. Así también los virus europeos, que tienen la misma secuencia (*val* en posición 202), tienen disminuida la reactividad con 6EE2 (Martínez et al., 1991).

En el "sitio D", nuevamente los virus de este grupo del año 1993 cambiaron varios epitopos con respecto al virus vacunal, como ser los reconocidos por los anticuerpos monoclonales 3G11, 2A12 y 5C4; así también, se ha modificado el epitopo reconocido por

En el "sitio A", los virus de General Villegas y General Roca han cambiado casi todos los epitopos que tenía el virus vacunal, C3 Argentina/85 (Figura 12). Si bien son varios los aminoácidos en que difieren, la sustitución glutamina por histidina en el aminoácido 146 se perfila como la más probable de ser la responsable de este cambio en la antigenicidad, ya que como se dijo, esa única sustitución causó la pérdida de reactividad frente a estos anticuerpos monoclonales en virus del subtipo C1 (Mateu et al., 1990). Recientes experimentos utilizando péptidos sintéticos que mimetizan el "sitio A" de estos virus, con y sin la sustitución en el aminoácido 146, han demostrado que también en el contexto de los virus bajo estudio (virus de la línea C3 Argentina/85), esta sustitución es crítica para el reconocimiento antigénico (Feigelstock et al., enviado para publicación).

Las diferencias en el grado de reactividad entre los aislamientos numerados por GELAB/SENASA 38395 y 38400 con los anticuerpos monoclonales 6D11 y 7CA11 (a pesar de tener idéntica secuencia) son muy pequeñas, y se pueden deber al error inherente del experimento. La reactividad positiva del anticuerpo monoclonal 6D11 (más notable en 38395), se puede deber a la modificación de un epitopo por medio de la acumulación de sustituciones (Mateu et al., 1992).

El aislamiento de San Cristóbal, presentó una reactividad muy parecida a la observada con los virus de General Villegas. Este resultado era esperable, dada la gran similitud de secuencia entre estos virus. Este aislamiento también tiene el aminoácido glutamina en la posición 146 de la proteína VP1, en lugar del aminoácido histidina, más común. En cuanto al aminoácido arginina en posición 137 (en este aminoácido se diferencia de los otros virus), no afectó la reactividad, en el sentido de generar algún epitopo o provocar el cambio de otro.

En el "sitio C", los dos anticuerpos monoclonales disponibles no diferenciaron a los aislamientos del año 1993 de este grupo de la cepa vacunal, ya que la única sustitución existente (*his* por *tyr* en el aminoácido 197) no es suficiente para cambiar en forma importante la reactividad de 7JA1 y 6EE2 frente a los virus estudiados (3.2.4a). En cambio, la posición 202 sí parece tener un efecto más importante en la reactividad del anticuerpo monoclonal 6EE2, ya que el aislamiento de San Cristóbal, que posee una sustitución en esa posición (*val* por *ile*), presenta una reactividad débil con este anticuerpo. Así también los virus europeos, que tienen la misma secuencia (*val* en posición 202), tienen disminuida la reactividad con 6EE2 (Martínez et al., 1991).

En el "sitio D", nuevamente los virus de este grupo del año 1993 cambiaron varios epitopos con respecto al virus vacunal, como ser los reconocidos por los anticuerpos monoclonales 3G11, 2A12 y 5C4; así también, se ha modificado el epitopo reconocido por

el anticuerpo monoclonal 7DF10, no mapeado. Cuatro anticuerpos monoclonales con los cuales el virus C3 Argentina/85 reaccionaba débilmente, dejaron de reaccionar con estos dos virus (2E5, 4D7, 5H10 y 3E9). Nuevamente aquí, las sustituciones en los aminoácidos 74 de la proteína VP2 y 58 de la proteína VP3 que poseen estos virus frente al vacunal, pueden ser responsables de la falta de reactividad observada (3.3.3a.).

El aislamiento de San Cristóbal del año 1994, presenta una reactividad muy similar a los aislamientos del año anterior, lo cual se explica porque a pesar de tener diferencias en la secuencia, lleva las sustituciones críticas en los aminoácidos 74 y 58 de las proteínas VP2 y VP3, respectivamente. La conservación del epitopo donde mapea el anticuerpo monoclonal 2A12, se puede deber a ciertas posiciones en las cuales no ha mutado, como ser el aminoácido 56 de la proteína VP3, o a que la sustitución val por asn en la posición 70 de la proteína VP2 no modifica la estructura como lo hace la sustitución val por asp, o a alguna otra sustitución compensatoria.

Se observa de esta forma una correlación entre la secuencia de los virus analizados (muy evidente en el "sitio A"), y su reactividad frente a los anticuerpos monoclonales dirigidos a los distintos sitios antigénicos.

3.3.4. Virus pertenecientes al "grupo c"

3.3.4a. Caracterización de las proteínas de la cápside

El grupo esta compuesto por los aislamientos de Rivadavia de los años 1993 y 1994. La secuencia de las proteínas de la cápside del primero de ellos lo reveló como un virus con características particulares, comparado con los hasta ahora estudiados (Figura 13). En cuanto a su parecido a otros virus, presentó una homología frente al virus C3 Argentina/85 (93.4% a nivel de nucleótidos, tomando en cuenta la proteína VP1) mayor que frente a otros virus: 88.6% con el de General Villegas del año 1993 y 88.8% con C3 Resende Br/55.

Figura 13: Secuencia de aminoácidos de las proteínas de la cápside de distintas cepas del VFA

	VP4						
C3 Res Br/55c1	A		S	HL	DN		Q
C3Arg/85c1	GAGQSSPATGSQNQSGNTGSI	INNYYMQQYQN*	MDTQ*	G*	TAISGGSNQ	GSTD	TTSTHTT
C G.Villegas/93*			S	L	DN		E
C Rivadavia/93	-----	**	**	*	*		*
C Rivadavia/94	-----						

VP2

C3 Res Br/55cl	DW	S	L						
C3Arg/85cl	NTQNN**FSKLASSAF*GLFGALLADKKTEETLLEDRI								
C G.Villegas/93	DW	S							
C Rivadavia/93			*						
C Rivadavia/94	-----								

74

C3 Res Br/55cl	A	SS		T		N	Y		
C3Arg/85cl	YATVEDNTSGPNTSGLETRVHQAEERFFKMKLFDWVPSQEF								
C G.Villegas/93	T	S			L	D	K	Y	A
C Rivadavia/93	-			T			K	YT	KE
C Rivadavia/94	-----								

C3 Res Br/55cl					M				
C3Arg/85cl	KSYAYMRNGWDVEVTAVGNQFNGGCLLVALVPE*GDISDREKYQLT								
C G.Villegas/93					A				
C Rivadavia/93			*		A	*			
C Rivadavia/94	-----								

C3 Res Br/55cl		E		K					
C3Arg/85cl	AHITVPYVGVNRYDQYKQHRPWTLVVMVVAPLTVNTSGAQQIKVYANI								
C G.Villegas/93			Q		*		H	E	
C Rivadavia/93	-----								
C Rivadavia/94	-----								

VP3

C3 Res Br/55cl		AA	F			*			V
C3Arg/85cl	SKEGIFPVACTDGYGNMVTDDPKTADPAYGKVYNPPRTALPGRFTNYLDVAEACPTLLMF								
C G.Villegas/93	---						F		L
C Rivadavia/93								F	
C Rivadavia/94	-----								

58

C3 Res Br/55cl				R		M			*
C3Arg/85cl	ENVPYVSTRTDGQRLAKFDVSLAAKHSNTYLAGLAQYYTQYAGTINLHFMFTGPTDAK								
C G.Villegas/93	DD								
C Rivadavia/93	D		R	V					
C Rivadavia/94	-----								

C3 Res Br/55cl		E							N
C3Arg/85cl	ARYMVAYVPPGMEAPDNPEEAHCIIHAEWDTGLNSKFTFSIPYISAADYAYTASSEAETT								
C G.Villegas/93									G
C Rivadavia/93		D	E						
C Rivadavia/94	-----								

Un análisis de las sustituciones que posee, muestra que varias de ellas no han sido encontradas en ninguna cepa de VFA serotipo C estudiado hasta la fecha. En el "loop" EF (1.2.1) de la proteína VP1, las posiciones 100, 101 y 102 se encuentran ocupadas por los aminoácidos tirosina, isoleucina y alanina respectivamente, todos ellos no hallados hasta ahora. Lo mismo para las posiciones 47 (*glu*), 56 (*val*), 59 (*gly*) de la proteína VP1, dentro o cerca del sitio antigénico "III", y 190 (*phe*), 193 (*thr*) y 200 (*gln*) en el extremo carboxilo terminal de la misma proteína. En cuanto a la proteína VP3, en el extremo amino terminal, en la posición 44, se halla el aminoácido fenilalanina; las posiciones 72 y 74 se hallan ocupadas por los residuos arginina y valina, respectivamente. Estas tres posiciones, además de nunca haberlas observado ocupadas por tales aminoácidos, tampoco han sido observadas como variables: por el contrario, los únicos aminoácidos allí encontrados son tirosina, leucina y alanina respectivamente (Mateu et al., 1994). El encontrar nuevas posiciones variables, o aminoácidos nuevos en posiciones ya encontradas como variables, indica la capacidad por parte del VFA de tolerar cambios en distintas posiciones dentro de la cápside (4.4.2).

En cuanto al virus aislado en Rivadavia en el año 1994, se determinó la secuencia del extremo carboxilo terminal de la proteína VP1 (Figura 13). Dado que la región analizada es pequeña, e incluye a la región hipervariable (aminoácidos 135-160), no se pueden obtener datos certeros sobre homologías con las distintas cepas. Sin embargo, se observa claramente que no presenta ningún cambio con respecto al virus aislado un año antes en la misma localidad. A nivel de nucleótidos, de 228 determinados presenta solo 4 sustituciones lo cual representa un 98.2% de similitud.

3.3.4b. Variabilidad en sitios antigénicos

La homología que reveló el virus aislado en Rivadavia en el año 1993 frente a otros virus al comparar la cápside en su conjunto (3.3.4a.), se refleja también en sus sitios antigénicos (Figura 13). Así como la cápside mostraba similares grados de homología al compararla con tres virus distintos (C3 Resende Br/55, C3 Argentina/85 y General Villegas/93) pertenecientes a dos líneas evolutivas diferentes (grupos V y IV, Martínez et al., 1992), así también en los sitios antigénicos se observa que en ciertos residuos se parece a un virus, mientras que en otros residuos del mismo sitio se parece a otro.

En el "sitio A", tiene la sustitución en la posición crítica (aminoácido 146, *gln* por *his*) igual que en los virus del "grupo b". Las posiciones 137, 138 y 140 se conservan como en el virus C3 Resende Br/55, mientras que los residuos 135, 139 y 149 son como en el virus C3 Argentina/85. Los aminoácidos en posiciones 150 (*ser*) y 151 (*arg*) son muy poco

frecuentes: el primero de ellos solo fue observado en virus aislados en las islas Filipinas en los años 1987-1988, mientras que el segundo solo se observó en un aislamiento europeo, de otro subtipo: C1 Obertbayern Ger/60. Por último, alrededor del "sitio A", los aminoácidos 154 y 157 (*his* y *thr*) se conservan como en los virus C3 Argentina/85 y C3 Resende Br/55, a diferencia del virus de General Villegas.

En el "sitio C", posee el aminoácido histidina en la posición 197 (como la mayoría de los virus) e incorpora una glutamina en una posición muy poco variable, el aminoácido 200. Se comienza a observar de esta forma variabilidad a nivel de secuencia (en los virus de serotipo C aparecidos en los últimos años) en una nueva posición dentro del "sitio C". Esta variabilidad se va a mantener por un año (Rivadavia, 1994) y se extenderá a otro aminoácido (*val* 202, San Cristóbal, 1994).

En el "sitio III", y alrededor del mismo, incorpora mutaciones con respecto al virus vacunal y a los aislamientos de General Villegas del año 1993 en posiciones variables dentro del VFA serotipo C; tales aminoácidos no se habían encontrado todavía en dichas posiciones. Es el caso del ácido glutámico en la posición 47, y el aminoácido glicina en posición 59 de la proteína VP1.

En el "sitio D", se diferencia del virus vacunal C3 Argentina/85 en las posiciones que parecen ser críticas para la antigenicidad: aminoácidos 74 de la proteína VP2, y 58 de la proteína VP3 (3.3.3b). También el aminoácido 193 de la proteína VP1 se halla sustituido. Los residuos que posee en estas posiciones son los mismos que poseía el virus de General Villegas (aminoácidos *lys*, *asp* y *thr*, respectivamente). En otras posiciones dentro de este sitio, o alrededor del mismo, se parece al virus vacunal (aminoácidos *phe*, *val* y *val* en posiciones 67, 70 y 82 de la proteína VP2; y *met* en posición 56 de la proteína VP3). En una posición se parece al virus C3 Resende Br/55 (65 de la proteína VP2, *thr*), y en otras posiciones posee sustituciones que no poseen ninguno de los tres virus: 80 *thr*, 85 *lys* y 86 *glu* de la proteína VP2; 54 *phe* de la proteína VP3; y 190 *phe* de la proteína VP1. De esta forma, "el sitio D" de este virus posee una secuencia inusual, pero como se dijo previamente, tiene las sustituciones que parecen ser críticas para el reconocimiento antigénico.

El otro aislamiento de Rivadavia del año 1994, mantiene la misma secuencia de aminoácidos que el aislado un año antes en la misma localidad, en los sitios antigénicos "A" y "C" (conservando los nuevos aminoácidos que tenía su predecesor: *ser*, *arg*, *phe*, y *gln* en posiciones 150, 151, 190 y 200; así también la crítica sustitución 146, *gln* por *his*, en posición 146; Figura 13).

3.3.4c. Comparación de la secuencia del "sitio C" con la reactividad de dos anticuerpos monoclonales dirigidos a tal sitio antigénico

Los aislamientos de este grupo poseen una sustitución muy poco frecuente en el "sitio C", en la posición 200 (gln por pro). Con el objeto de determinar la influencia de este aminoácido en el reconocimiento de los anticuerpos monoclonales 7JA1 y 6EE2, se midió la reactividad de estos con tales aislamientos (y con el virus vacunal C3 Argentina/85), en un ensayo inmunoenzimático (Figura 14).

El resultado indica que la sustitución mencionada (gln por pro), no afectó la reactividad de 7JA1, y solo ligeramente la reactividad de 6EE2. Al comparar la reactividad de estos anticuerpos con otros virus (Figura 14; los datos de los virus C2 Pando Ur/44, C4 Tierra del Fuego Ar/66 y C Filipinas/88 fueron extraídos de Martínez et al., 1991), se observa que el virus de Filipinas es el único que no reconoce a ambos anticuerpos. La sustitución en la posición 205 (glu por ala) no parecen haber sido la responsable de la falta de reactividad con 7JA1, ya que los virus C2 Pando Ur/44 y C4 Tierra del Fuego Ar/66 reaccionaron a pesar de tener la misma sustitución. La sustitución en la posición 202 (val por ile) podría haber sido responsable de la falta de reactividad con 6EE2 (como ocurre con el aislamiento de San Cristóbal), pero no de la falta de reactividad con 7JA1. La falta de reactividad del virus de Filipinas con 7JA1 se puede deber o a que tiene algunas sustituciones en los aminoácidos no determinados (201 y 206), o a una combinación de las sustituciones mencionadas, que individualmente no serían suficientes para provocar el efecto descrito, o a la sustitución en la posición 200 (leu por pro). En este último caso, el tipo de sustitución estaría afectando la reactividad, ya que el aminoácido prolina (virus de Rivadavia) no estaría teniendo el mismo efecto que el aminoácido leucina en esa posición.

Figura 14: Secuencia de aminoácidos y reactividad con anticuerpos monoclonales del "sitio C", de distintas cepas del VFA.

virus	sec. aminoácidos "sitio C"	reactividad con
	200 	
<i>C3 Resende Br/55</i>	DRHKQPLIAPAK	7JA1 8EE2 ■
<i>C3 Argentina/85cl</i>	Y	■
<i>C G. Villegas/93</i>		■
<i>C San Cristóbal/94</i>	V	■ □
<i>C Rivadavia/93</i>	Q	■
<i>C Rivadavia/94</i>	Q	■
<i>C2 Pando Ur/44</i>	E	■
<i>C4 Tierra del Fuego Ar/66</i>	E	■
<i>C Filipinas/88</i>	L*V E*	□ □

Para cada virus, se indican las reactividades con anticuerpos monoclonales que reconocen distintos epítopos en el sitio "C", a continuación de la secuencia aminoacídica correspondiente al sitio antigénico. Las reactividades fueron obtenidas en ensayos inmunoenzimáticos de las proteínas virales. Para cada AcM, la reactividad relativa frente al virus usado para generar el AcM se da como ■, positiva (reactividad similar observada); ■, intermedia; □, débil, o □, negativa. Las secuencias y reactividades con anticuerpos monoclonales de los virus C2 Pando Ur/44, C4 Tierra del Fuego Ar/66 y C Filipinas/88 fueron tomadas de Martínez et al., 1991. *Virology* 184, 695-708.

3.3.5. Permanencia en el campo

Los virus aparecidos a finales del año 1992, se mantuvieron en el campo hasta el año 1994, casi un año y medio después de haber sido detectados. Del análisis de la secuencia de dos aislamientos de serotipo C registrados en el año 1994, se observa que el de San Cristóbal sigue acumulando algunas mutaciones, especialmente en sitios antigénicos (3.3.3b). El virus de Rivadavia del año 1994 se mantuvo más estable (homólogo en la secuencia de aminoácidos al virus de Rivadavia aislado un año antes).

Durante este período, aparecieron en el campo variantes antigénicamente distantes del virus vacunal C3Argentina/85. Si bien han acumulado una serie de sustituciones en todos los sitios antigénicos, algunas de ellas son las responsables del cambio antigénico observado. Se da de esta forma una situación similar a la ocurrida a fin de la década del 60, cuando aparecía el virus C5 Argentina/69 (1.5.2). A pesar de pertenecer éste a una línea evolutiva diferente, las mismas sustituciones halladas ahora fueron las responsables de la divergencia antigénica de ese virus con respecto al vacunal de entonces, C3 Resende Br/55.

Es destacable la gran similitud a nivel de secuencia de nucleótidos observada entre los dos aislamientos de Rivadavia (98.2 % de homología). Los dos se produjeron en la misma localidad con un intervalo de tiempo de 13 meses (Tabla 1). La observación de la capacidad de conservación de secuencias por amplios períodos de tiempo (contrastante con la gran variabilidad observada en los virus a ARN) fue sugerida al comparar los virus C3 Resende Br/55 y C3 Argentina/84 (Piccone et al., 1988); sin embargo cabía en ese caso la posibilidad de una reintroducción accidental del virus, ya que la cepa C3 Resende Br/55 era la usada como vacunal entonces. Esta posibilidad se descarta en este caso, ya que estos virus no se usaron en la preparación comercial de la vacuna. Si bien el período es muy corto (13 meses), la observación refuerza la hipótesis (4.4.1).

DISCUSSION

4. DISCUSION

4.1. Epidemia de fiebre aftosa del año 1984: virus C3 Argentina/85

4.1.1. Introducción y establecimiento en la Argentina de una nueva línea evolutiva del VFA a partir del año 1984

En cuanto a la epidemiología del VFA en la Argentina, la mayor variabilidad antigénica y las rupturas de inmunidad, se produjeron por cepas pertenecientes a los serotipos A y O (Introducción 1.5.2, Gráficos 1 y 2).

En el serotipo C, la cepa actuante durante 20 años y usada como vacunal, fue la C3 Resende Br/55 (Alonso Fernández et al., 1981), excepto en dos ocasiones. En 1969 se aisló el virus C5 Argentina/69 que, a pesar de poseer sustituciones críticas en los sitios antigénicos (Mateu et al, 1994), pudo ser controlado con la vacunación que se efectuó con la cepa vacunal, sin necesidad de introducir la nueva variante en la vacuna. Se puede deducir que tal cepa no tuvo ventajas replicativas como para reemplazar a la anterior, C3 Resende Br/55, y que la protección brindada por C3 Resende Br/55 fue suficiente para neutralizar al virus C5 Argentina/69. La otra cepa de un linaje distinto que actuó fue la denominada C3 Sta. Fe Argentina/75; sin embargo también se eliminó su circulación en el campo, sin necesidad de incluirla en la vacuna.

A finales de 1984 se detectó en el campo la cepa C3 Argentina/85, la cual tenía el mismo origen filogenético que la cepa C3 Sta. Fe Argentina/75. Con la aparición del virus en el campo, se produce un gran cambio en cuanto a la circulación de cepas de virus de serotipo C en la Argentina. Este cambio no se da por mutaciones de la cepa de campo, sino por la introducción de una cepa proveniente de otro ecosistema (Brasil?, Paraguay?). En este sentido, los virus de origen brasileño C3 Indaial Br/71 y C3 Indaial Br/78, presentan una gran homología a nivel de nucleótidos con el virus C3 Argentina/85 (Piccone et al., 1988). Cabe preguntarse si la aparición del virus C3 Argentina/85 se debió a una reintroducción proveniente de un país vecino, o si provino de la primera introducción en el año 1975.

Este tipo de introducciones no es frecuente. Dentro de un mismo país se dan interrelaciones entre regiones debido a movimientos de ganado, tanto para producción (zonas de engorde distintas a las zonas de cría) como para consumo final. Sin embargo, entre países las restricciones son mayores, por lo cual los intercambios son menos comunes.

Al introducirse un virus nuevo se establece una competencia entre la nueva cepa y las cepas nativas; la habilidad competitiva de aquel determinará si permanecerá, e incluso dominará sobre las cepas anteriores. La nueva cepa puede verse favorecida, ya que los anticuerpos que poseen los animales ejercen una presión inmune en contra de las cepas actuantes hasta ese tiempo (inmunizados naturalmente o por medio de la vacunación).

La habilidad competitiva de un virus dependerá de la eficacia con la cual realiza los procesos bioquímicos de su ciclo replicativo en un ambiente determinado (Domingo et al., 1993). Estos procesos incluyen la replicación del genoma, la síntesis y procesamiento de las proteínas virales, el ensamblaje de las partículas, la liberación de las células y la estabilidad de las partículas fuera de la célula, entre otros. También influirá sobre la posibilidad de diseminación de la nueva cepa la habilidad para infectar nuevos huéspedes y la capacidad de mantenerse fuera de los huéspedes naturales. Es el caso del virus C3 Argentina/85, que reemplazó como cepa predominante a la cepa predecesora C3 Resende Br/55 y permaneció en el campo desde su introducción (fin del año 1984) hasta la fecha (3.1-3.3).

En resumen, se pueden definir dos períodos teniendo en cuenta las cepas de serotipo C: el período del virus C3 Resende Br/55 hasta el año 1984 y el del virus C3 Argentina/85, a partir de ese año hasta la fecha.

4.1.2. Cocirculación de variantes

En el año 1984, cuando comenzaba la epidemia de fiebre aftosa, se aisló una cepa, que se denominó C3 Argentina/84. Esta cepa se incluyó en la vacuna; sin embargo, el brote no fue controlado sino hasta que se incluyó en la vacuna otra cepa aislada unos meses después, la cepa C3 Argentina/85.

El análisis de los virus que originaron los focos de fiebre aftosa durante el año 1993, vuelve a mostrar que variantes distintas han circulado en una misma época (Resultados 3.3.1). En este caso, la vacunación con la cepa vacunal fue suficiente para el control.

La cocirculación de variantes diferentes verificada en este trabajo, demuestra la importancia de no asignar el origen de un brote en una zona a un solo aislamiento. Se tiende a relacionar la aparición de un brote con un aislamiento particular, cuando puede haber más de una cepa viral circulando. En tal sentido, en el año 1984 cuando se incluyó la cepa C3 Argentina/84 en la vacuna, puede ser que se haya elegido la cepa incorrecta. Este probable error fue solucionado un año después con la introducción en la vacuna del virus C3 Argentina/85.

4.2. Brotes del año 1984 causados por la cepa C3 Argentina/84: importancia de los distintos sitios antigénicos en la variabilidad antigénica del VFA serotipo C

4.2.1. Importancia del "sitio A"

Las diferencias antigénicas entre cepas del VFA se han atribuido generalmente a cambios producidos en el "sitio A". Resultados que muestran la importancia de este sitio se han obtenido con los tres serotipos presentes en América y Europa.

a) Péptidos que representan el "sitio A" han imitado las características antigénicas del serotipo, del subtipo, y de variantes antigénicas, observadas en el virión entero (Bittle et al., 1982; Clarke et al., 1983; Rowlands et al., 1983; Mateu et al., 1989, 1992).

b) La secuenciación de variantes en el serotipo C1 que fallaron en conferir protección cruzada en cerdos, mostró que la mayoría de las sustituciones en dominios expuestos ocurrieron dentro del "sitio A" (Sobrino et al., 1989).

c) Vacunas basadas en péptidos que representan los sitios "A" y "C" fueron capaces de generar anticuerpos neutralizantes y de conferir protección homóloga y heteróloga tanto en animales de laboratorio como en bovinos (Di Marchi et al., 1986; Parry et al., 1989b; Doel et al., 1990).

Estos resultados mostraron al "sitio A" como principal sitio inmunogénico para el VFA. Esta afirmación generalizada entre los grupos de investigación, fue modificada luego de nuevas investigaciones realizadas durante los últimos cinco años, principalmente en este laboratorio.

4.2.2. Importancia del "sitio D"

El estudio realizado con el virus C3 Argentina/84, aislado durante un brote de fiebre aftosa en el año 1984, con la cepa vacunal entonces en uso C3 Resende Br/55, y la comparación de ambos, revela la importancia de regiones de la cápside fuera del "sitio A" en la generación de la variabilidad antigénica del VFA en el serotipo C.

La secuenciación de las proteínas de la cápside de los virus C3 Resende Br/55 y C3 Argentina/84, ha mostrado que ambos virus presentan igual secuencia nucleotídica en el "sitio A", diferenciándose en el "sitio D" (3.1.3). Así también, un panel de anticuerpos monoclonales dirigidos al "sitio A" no diferenció a ambos virus; éstos presentaron diferencias en la reactividad con anticuerpos dirigidos al "sitio D" (3.1.4). Estos resultados permiten deducir que las diferencias serológicas y la protección cruzada sólo parcial

observadas entre ellos, se las debe atribuir a variabilidad en regiones de la cápside fuera del sitio antigénico principal, "sitio A".

Como se mencionó previamente (3.1.3) de las doce sustituciones aminoacídicas encontradas entre los dos virus, siete de ellas se encuentran en posiciones expuestas de la cápside, de las cuales solo cuatro coinciden con sitios identificados como antigénicos. La sustitución hallada en el aminoácido 58 de la proteína VP3 (*gly* por *glu*) dentro del sitio antigénico "D", parece ser la responsable de las diferencias antigénicas en tal sitio y explicar la falta de una total protección cruzada entre ambos virus (es la única que se ha encontrado relevante en el serotipo C).

En los últimos años, se han publicado otros resultados que apoyan los obtenidos en esta Tesis, en cuanto a la importancia de sitios antigénicos fuera del "sitio A", en la generación de variabilidad antigénica.

a) El virus C4 Tierra del Fuego Ar/66, fue clasificado como un nuevo subtipo respecto del virus C3 Resende Br/55 (entonces actuante y usado como vacunal) del cual difiere en solo dos aminoácidos no críticos en el "sitio A", por lo cual no se esperaba el distanciamiento serológico observado. Sin embargo, en el resto de los sitios antigénicos se observan 12 sustituciones de aminoácidos, que justificarían el distanciamiento serológico (Martínez et al., 1991, 1992).

b) La tipificación dentro del subtipo C1 del virus C1 Haute Loire Fr/69 junto a otros aislamientos europeos, a pesar de poseer sustituciones críticas en el "sitio A", se pudo explicar por la gran homología en el resto de los sitios antigénicos.

c) En el serotipo O, ciertas variantes antigénicas mostraron idéntica secuencia en el "sitio A" (Ouldrige et al., 1986).

d) Giavedoni et al. (1991) encontraron en nuestro laboratorio que una vacuna recombinante basada en los sitios "A" y "C" ("sitio I" según Kitson et al., 1990) del virus O1 Campos, no protegió cobayos frente a la descarga del virus O1 Caseros, mientras que la vacunación con la partícula viral entera de O1 Campos, sí logró la protección cruzada, a pesar que ambas cepas son serológicamente muy semejantes por fijación de complemento y por ensayos de protección cruzada.

El hallar que no solo el "sitio A" es responsable de la variabilidad antigénica y de la protección, tiene importantes implicancias en el seguimiento epidemiológico y en el diseño de vacunas. No es suficiente caracterizar las variantes según las características del "sitio A" (sea por secuencia y/o por reactividad con anticuerpos monoclonales) sino se debe estudiar toda la cápside. Así también, el diseño de vacunas cuyo objeto es generar una

respuesta humoral que cubra la posible aparición de variantes, debe enfocarse hacia la producción de antígenos que representen los distintos sitios antigénicos.

4.2.3. Importancia del "sitio III"

El "loop" BC de la proteína VP1 ha sido identificado como una segunda zona hipervariable del VFA en los serotipos A, O y C (Weddell et al., 1985; Beck and Strohmaier, 1987; Carrillo et al., 1989; Piccone, 1989; Pfaff et al., 1988; Sobrino et al., 1986; Martínez et al., 1988; Piccone et al., 1988).

En el serotipo O también se lo detectó como constituyente de un sitio antigénico ("sitio III"; Kitson et al., 1990), mientras que en el serotipo A tendría su equivalente en el "loop" HI, alrededor del residuo 170 (Baxt et al., 1989).

En cepas virales pertenecientes al serotipo O, se ha encontrado que sustituciones aminoacídicas dentro de este segmento afectaron su interacción con anticuerpos e indujeron cambios topológicos en el "sitio A" (Kitson et al., 1990, 1991; Parry et al., 1990; Minor, 1990).

De la comparación de los virus C3 Resende Br/55 y C3 Argentina/84, se determinó que las sustituciones encontradas en el "loop" BC de la proteína VP1 (*leu* por *ser* y *gly* por *arg* en los aminoácidos 45 y 47 respectivamente), o en el cercano "loop" HI de la misma proteína (*val* por *leu*, en el aminoácido 171) (Figura 5), no afectaron la reactividad de ninguno de los 11 anticuerpos monoclonales que reconocen 11 epitopos distintos, continuos, dentro del "sitio A" (Figura 6). De esta forma, no se observó evidencia de interacción entre el "loop" BC y el "sitio A" en los virus de serotipo C estudiados.

4.3. Brotes de fiebre aftosa en el periodo 1992-1994: pocas sustituciones aminoacídicas pueden llevar a un gran cambio antigénico

4.3.1. "Sitio A"

Los estudios realizados sobre la variación antigénica en el "sitio A", han mostrado que tal variabilidad se genera por mutaciones en posiciones dentro del sitio antigénico (Introducción 1.4.3). Tales mutaciones pueden ocurrir en posiciones críticas que afectan drásticamente la antigenicidad, o en posiciones que producen cambios graduales (Martínez et al., 1991).

Dentro de la línea evolutiva del virus C3 Resende Br/55, el C5 Argentina/69 tenía un comportamiento serológico diferente a la cepa vacunal de entonces (C3 Resende Br/55), y se lo clasificó como un nuevo subtipo (Pereira, 1977). También antigénicamente tenían un comportamiento muy diferente (C5 Argentina/69 tenía modificados respecto a C3 Resende Br/55 ocho epitopos). Sin embargo la secuencia aminoacídica de las proteínas de la cápside eran muy similares (97 % de homología, Mateu et al., 1994). Las sustituciones halladas correspondieron a las posiciones 146 (*gln* por *his*) y 149 (*ala* por *thr*) de la proteína VP1; esta última (posición 149) no mostró afectar la reactividad en virus que llevan esta única sustitución, por lo cual la pérdida de reactividad observada se atribuyó a la sustitución en el aminoácido 146.

Los virus aislados durante los años 1993 y 1994, corroboran la importancia del aminoácido 146 de la proteína VP1 en cuanto a la antigenicidad del "sitio A". Como se observa en la Figura 12, los anticuerpos monoclonales dirigidos al "sitio A" que reconocen al virus C3 Argentina/85, dejaron de reconocer a los aislamientos de General Villegas, General Roca (GELAB/SENASA 38400) y San Cristóbal. Si bien estos cuatro virus tienen varias sustituciones en dicho sitio, la sustitución en el aminoácido 146 (*gln* por *his*) parece ser la responsable de la pérdida de reactividad observada, ya que otros virus con sustituciones en tales posiciones (y sin la sustitución en la posición 146) no han sufrido una modificación tan drástica de epitopos (Mateu et al., 1994). Además, recientes estudios usando péptidos sintéticos que mimetizan el "sitio A" del virus C3 Argentina/85, del aislamiento de General Villegas, y del virus C3 Argentina/85 con una única sustitución en el aminoácido 146 (*gln* por *his*), demuestran que la sustitución en el aminoácido 146 es suficiente para producir la pérdida de reactividad observada en el virus de General Villegas (Feigelstock et al., enviado a publicación). De esta manera se extiende a la línea evolutiva del virus C3 Argentina/85, la importancia del aminoácido 146 para el reconocimiento antigénico del "sitio A", y el mecanismo de variación antigénica a través de sustituciones en posiciones críticas, dentro de sitios antigénicos.

Por otro lado, el virus aislado en Salto tiene algunas sustituciones en el "sitio A" al compararlo con la cepa vacunal, C3 Argentina/85 (Figura 8). Ellas se encuentran en los aminoácidos 139 (*ser* por *gly*) y en el aminoácido 154 (*arg* por *his*), mientras que el aminoácido crítico 146 se mantiene invariable (*his*). Correlativamente, la reactividad del mismo frente al panel de anticuerpos monoclonales dirigidos al "sitio A", es semejante a la del virus C3 Argentina/85 (los distingue los anticuerpos monoclonales 4C4 y 6D11)(Figura 8). Se observa de esta manera para este aislamiento viral, una divergencia antigénica gradual, mediada por sustituciones en posiciones no críticas.

4.3.2. "Sitio D"

Para el "sitio D", se pueden hacer algunas consideraciones en cuanto a la importancia de los distintos aminoácidos que componen el mismo, aunque no tan consistentes como las realizadas con el "sitio A". Nuevamente, el caso del virus C5 Argentina/69 (Mateu et al., 1994) reveló información al respecto. Este virus con solo tres sustituciones aminoacídicas en el sitio antigénico (aminoácidos 74 glu por asn y 133 asn por ser de la proteína VP2, y 58 gly por glu de la proteína VP3) presenta modificaciones en forma total o parcial en la mayoría de los epitopos que tiene el virus C3 Resende Br/55 (el único que se conserva es el reconocido por el anticuerpo monoclonal 1G5, el cual está conservado en todos los virus estudiados hasta el momento).

De los virus analizados en este trabajo, los aislamientos de General Villegas y relacionados, si bien han modificados la mayoría de los epitopos del "sitio D", tienen varias sustituciones (Figura 12), por lo cual no se puede estimar el efecto producido por cada una de ellas en la reactividad de cada anticuerpo monoclonal.

El virus C3 Argentina/85 y el virus de Salto/91 tienen varios epitopos modificados respecto del virus C3 Resende Br/55 (aunque no todos como el C5 Argentina/69), y poseen una sustitución en el aminoácido 74 (glu por asn)(Figura 8). Las diferencias en la antigenicidad entre ambos se pueden atribuir a sustituciones en otras posiciones dentro del sitio antigénico (aminoácidos 78 y 80 de la proteína VP2 y 56 de la proteína VP3). Por otro lado, el aislamiento de General Roca (38448), mantiene la reactividad con los anticuerpos monoclonales 2A12, 2E5 y 4D7 a pesar de la sustitución que posee en la misma posición (lys por asn)(Figura 10). Parece entonces que el aminoácido 74 de la proteína VP2 influye en la reactividad de los anticuerpos monoclonales 5H10, 5C4 y 3E9 (comparar también virus C4 Tierra del Fuego Ar/66 en Mateu et al., 1994).

En el virus C3 Argentina/84 la posición 58 de la proteína VP3 es la única sustitución con respecto al virus C3 Resende Br/55, por lo cual parece incidir en la reactividad con los anticuerpos monoclonales 2A12, 2A10, 2E5 y 4D7 (Figura 6).

De esta forma es que se observa, en ciertos casos, una falta de correlación entre distancia genética y diversidad antigénica. Virus muy parecidos genéticamente entre sí, pueden presentar una marcada variabilidad antigénica si poseen pocas sustituciones en posiciones críticas. Por el contrario, virus que conservan homología en sus sitios antigénicos se podrán presentar antigénicamente similares, a pesar de diferir marcadamente en otras regiones de la cápside. Este último es el caso del virus C GC Ger/26, el cual es un aislamiento perteneciente a una línea evolutiva del VFA

probablemente extinguida (Martínez et al., 1992). Se diferencia de la secuencia consenso de la cápside de los virus europeos de subtipo C1 en 46 aminoácidos. Sin embargo la reactividad del mismo frente a paneles de anticuerpos monoclonales dirigidos a tres sitios antigénicos independientes es muy similar a la de aquellos (Mateu et al., 1988; Mateu et al., 1994). Ocurre que de las 46 sustituciones, solo seis se encuentran dentro de sitios antigénicos; las restantes se encuentran distribuidas en regiones de la cápside no relacionadas con la antigenicidad.

4.4. Evolución del VFA en el campo durante 30 años: conservación de secuencias en el tiempo y variabilidad

4.4.1. Capacidad del VFA de conservar secuencias nucleotídicas por largos períodos de tiempo

Paralelamente a la variación observada en el VFA en nuestro laboratorio (Piccone et al., 1988), al analizar las secuencias nucleotídicas de las proteínas VP1 de los virus C3 Resende Br/55 y C3 Argentina/84 (aislados en un intervalo de 29 años), se determinó la existencia de un 98.1% de homología entre ellos, lo que indicaría una situación de conservación de secuencias nucleotídicas en el tiempo.

La secuencia nucleotídica completa de todas las proteínas de la cápside de ambos virus y su comparación (3.1), permite extender el análisis, y obtener así un dato más consistente. Al considerar la cápside en su conjunto, se observa que tal porcentaje de homología se mantiene (incluso aumenta levemente, siendo mayor al 98.3 %), confirmando la hipótesis acerca de la capacidad de conservación de secuencias por parte del VFA.

Por otra parte, no se puede descartar la posibilidad que la aparición del virus C3 Argentina/84 se haya debido a un escape vacunal, ya que el virus C3 Resende Br/55 era utilizado en aquel entonces como cepa representativa del serotipo C en la preparación de la vacuna, y no a la conservación de secuencias en el tiempo.

Sin embargo, resultados de las cepas analizadas en esta Tesis, aportan más información sobre la posible conservación de secuencias.

El aislamiento de General Roca del año 1993 (GELAB/SENASA 38448) constituye un nuevo caso de gran homología entre dos virus, aislados con un intervalo de tiempo de ocho años. Al compararlo con la cepa vacunal C3 Argentina/85, difiere en 29 nucleótidos en las proteínas VP1, VP2 y VP3 (3.3.2). Estos valores dan un porcentaje de homología de 97.9 %. Pero en este caso, como en el anterior, la homología es con la cepa vacunal

usada en el momento del aislamiento, por lo cual no se puede descartar la posibilidad de un escape vacunal.

Un caso diferente surge de la comparación de las secuencias nucleotídicas de la proteína VP1 de los virus aislados en Rivadavia (38440/93 y 38727/94). Se determinó una gran homología entre dos cepas (98.2 %) (3.3.4). Estos virus fueron aislados en un intervalo mayor de un año, en una misma localidad. Si bien es pequeña la región secuenciada, ésta incluye la zona hipervariable, donde es de esperar una mayor acumulación de mutaciones. En este caso, a diferencia de los anteriores, se descarta la posibilidad de una reintroducción vacunal, ya que estos virus no fueron usados como vacunales. Si bien se utilizó el virus C "White" para revacunar con vacuna monovalente en la zona de General Villegas, Córdoba y La Pampa luego de los brotes del año 1993, este virus presenta una baja homología (88.6%, 3.3.4a) con los virus de Rivadavia. El caso en cuestión, refuerza la hipótesis del potencial de conservación de secuencias genómicas en el tiempo por parte del VFA, en función de la presión selectiva a la que haya estado sometido y posibles reservorios de virus.

Otros casos de conservación de secuencias en el VFA han sido observados en nuestro laboratorio. Tal como se mencionó anteriormente, en el año 1975 se aisló en la provincia de Santa Fe la cepa C3 Sta. Fe Argentina/75, que no tuvo gran importancia epidemiológica. Sin embargo, luego de 10 años se aisló un virus emparentado con él, el virus C3 Argentina/85, que causó una gran epidemia en el año 1985. Este ejemplo no es concluyente, ya que existe la posibilidad que o bien el virus permaneció en el campo por ese período de tiempo sin manifestarse, o dicho virus se eliminó por vacunación y el brote de 1984-1985 se debió a una introducción de otro país, como se mencionó en 4.1.1.

En el serotipo A, los virus A Argentina/87 Buenos Aires, y A Argentina/87 Santa Fe, mostraron ser muy similares en la secuencia nucleotídica de la proteína VP1 a la cepa A Argentina/81, aislada seis años antes (32 y 35 sustituciones, respectivamente). Aquí se descartó la posibilidad de un escape vacunal, ya que la cepa A Argentina/81 había sido eliminada de la vacuna en el año 1984 (Piccone, 1989). Este ejemplo indicaría nuevamente la capacidad de conservación de secuencias.

Al intentar explicar la conservación de secuencias observada en virus que se caracterizan por su gran variabilidad, se puede pensar que los nuevos virus aislados se han mantenido en algún reservorio natural replicando en forma normal, en forma muy lenta, o incluso quizás sin replicación. En cuanto a esta última posibilidad, se ha documentado que el VFA puede sobrevivir en reses muertas, en sangre seca, sobre heno, madera, tierra y otros objetos durante largos períodos de tiempo, y ser reservorio de infección (Shahan, 1962).

La conservación de secuencias durante el tiempo, ya sea por el mantenimiento del virus en forma latente, o replicando, debe ser considerada en las decisiones a tomar a nivel epidemiológico, ya que una cepa aislada años anteriores, y que dejó de actuar, puede mantenerse en el tiempo. Si luego se hubiere reemplazado la cepa vacunal por otra considerada más representativa de las variantes actuantes, que no protegiera suficientemente frente a una descarga con la cepa original, ésta podría reaparecer favorecida por la falta de inmunidad de los animales frente a ella. Por ello es recomendable prestar especial atención a cepas que fueron muy virulentas, a pesar de haberlas controlado en su momento de acción y no haberlas vuelto a aislar.

Las observaciones realizadas sobre la evolución del VFA durante 30 años en el campo, han permitido aprender muchos aspectos de este agente infeccioso. Estos conocimientos se discuten en este trabajo de Tesis Doctoral, y en otras publicaciones científicas aparecidas en los últimos años.

Sin embargo, las mismas observaciones plantean interrogantes todavía no resueltos. Uno de ellos se refiere a la dualidad observada por parte del VFA, en lo referente a conservación y variabilidad de secuencias nucleotídicas. En un mismo intervalo de tiempo, en una misma región, bajo la misma situación de presión inmunológica (la cual es un agente muy importante en la evolución del VFA debido a su presión selectiva), se observa conservación y variabilidad genética simultáneamente.

- i) En que reservorios naturales se mantiene el VFA, que en ciertas situaciones se observa que permanece latente por largos períodos de tiempo?
- ii) Que factores hacen que en tales reservorios el virus varíe o se conserve? Depende acaso del hospedador donde el virus replica? O para la conservación, el virus debe mantenerse sin replicar?

Experimentos posteriores a realizarse en nuestro laboratorio orientarán para dar respuesta a estas preguntas.

4.4.2. Permisibilidad moderada del VFA serotipo C para la generación de la diversidad genética

Al alinear las secuencias de las proteínas de la cápside de distintos virus pertenecientes al serotipo C y también al comparar con otros serotipos, se observa que existen zonas de mayor variabilidad que otras. Tal es el caso de los "loops" GH y BC de la proteína VP1 (sitios antigénicos "A" y "III", respectivamente), que se presentan como hipervariables. Sin embargo, Martínez et al. (1991) calcularon que tanto en el "loop" GH de la proteína VP1,

como en el extremo carboxilo terminal de la misma proteína ("sitio C"), se ha aprovechado un mínimo de la variación potencial (incluso considerando los residuos más variables). Por otro lado, los "loops" que conforman el "sitio D" presentan una menor variabilidad.

Dada la importancia de la respuesta inmune humoral como mecanismo de defensa frente a la infección con el VFA, es esperable que las zonas de la cápside que hacen contacto con los anticuerpos estén sujetas a mayores variaciones estructurales. Estas se llevan a cabo mediante sustituciones de residuos aminoacídicos involucrados en la interacción con los anticuerpos. Si bien, dada la importancia del "sitio A" a nivel antigénico es de esperar gran variabilidad en este sitio, la observada puede no sólo deberse a la generada por la presión inmunológica.

La cristalización y los estudios de difracción de rayos X realizados tanto sobre virus de serotipo O (Acharya et al., 1989), como de serotipo C (Lea, Hernández et al., 1994) permitió determinar la estructura tridimensional del VFA. La zona más variable en secuencia de aminoácidos (el "loop" GH de la proteína VP1) tiene una gran flexibilidad, y por ello la estructura exacta de esta región ha sido difícil de establecer. Por otro lado, el sitio discontinuo "D", formado por la interacción de residuos de las proteínas VP1, VP2, y VP3, aparece más rígido en la estructura cristalográfica. Una zona flexible debe estar menos sujeta a restricciones estructurales (y por lo tanto más permisiva a variaciones), que una zona rígida, que interacciona con otras zonas para mantener una estructura estable. Excepto que los aminoácidos involucrados en el "loop" cumplan otra función, como es el caso de la secuencia RGD en el "loop" G-H del VFA, que media la adsorción del virus a la célula (4.4.2).

Estas diferencias estructurales permiten suponer que la mayor variabilidad observada en el "sitio A" puede deberse, no solo a la selección operada por la presión inmune, sino a la tolerancia a cambios (ocurridos estos al azar, independientemente de presiones selectivas) por parte del mismo, dada su gran flexibilidad. Por otro lado, el "sitio D", al estar formado por la interacción de tres proteínas, puede tener una menor tolerancia a sustituciones aminoacídicas.

Las secuencias de los virus aislados durante los años 1991-1994, muestra que ellos presentan nuevas mutaciones hasta ahora no encontradas; estas se refieren tanto a posiciones previamente observadas como variables (donde los virus estudiados presentan aminoácidos no detectados), como incluso en posiciones no observadas como variables (donde los virus estudiados presentan variabilidad). En los Cuadros 1 y 2 se da un resumen de las nuevas mutaciones encontradas. En ellos se observa que once posiciones que se mantenían constantes en los virus de serotipo C estudiados hasta el

momento, aparecen sustituidas en uno o más de los nuevos aislamientos estudiados; así también, otras once posiciones que si bien fueron encontradas como variables, se encuentran sustituidas por aminoácidos no detectados aún en otras cepas. El hecho de encontrar estas nuevas mutaciones, sugiere una mayor tolerancia general por parte del VFA a sustituciones aminoacídicas.

Cuadro 1: Posiciones de la cápside encontradas variadas en los virus aislados durante los años 1991-1994, que se han mantenido constantes en aislamientos previos

Aminoácido pos. proteína	Sustitución	Aislamiento	Estructura secundaria
101 VP1	Y x N	38440	E-F LOOP *
102 VP1	I x T	38440	E-F LOOP *
157 VP1	A x T	38440 y 37724	G-H LOOP *
67 VP2	L x F	38395 y 38400	B β strand
80 VP2	T x K	38440 y 37724	C β strand *
81 VP2	F/I x V	37724/ 38726	C β strand *
82 VP2	A x V	38395 y 38726	C β strand *
44 VP3	F x Y	38440	α Z
72 VP3	R x L	38440	B-C LOOP *
74 VP3	V x A	38440	C β strand *
193 VP3	T x A	38395	H-I LOOP *

*aminoácidos expuestos en superficie (Mateu et al., 1994)

Cuadro 2: Posiciones de la cápside variables, encontradas con aminoácidos no detectados en los virus previamente estudiados

Aminoácido pos. proteína	Sustitución	Aislamiento	Estructura secundaria
47 VP1	E	38440	B-C LOOP *
56 VP1	T	38448	C-D LOOP *
59 VP1	G	38440	C-D LOOP *
190 VP1	F	38440 y 38727	COOH terminal *
193 VP1	L	38448	COOH terminal *
200 VP1	Q	38440 y 38727	COOH terminal *
70 VP2	N	38726	β strand *
85 VP2	K	38440	C-D LOOP *
86 VP2	G	38395 y 38400	C-D LOOP *
130 VP2	S	38726	E-F LOOP *
56 VP3	S	38726	B-B KNOB *

*aminoácidos expuestos en superficie (Mateu et al., 1994)

Sin embargo, un análisis de los elementos estructurales en los cuales se hallan estas mutaciones, revela que la mayoría de ellas se encuentran en "loops", y son por lo tanto más tolerantes a sustituciones. De las otras mutaciones halladas, algunas se encuentran en el extremo carboxilo terminal de la proteína VP1, el cual también tiene una mayor movilidad, y otras en regiones expuestas en la superficie, algunas de ellas encontradas sustituidas en mutantes resistentes a la neutralización por anticuerpos monoclonales. Las sustituciones quizás menos esperadas son las ocurridas en los aminoácidos 67 de la proteína VP2, y 44 de la proteína VP3. La primera de ellas se encuentra en la "β strand B"; entre dos aminoácidos hidrofóbicos (leucina y fenilalanina), pero de distinto tamaño. La otra sustitución se encuentra en la "α hélice Z"; aquí el tipo de sustitución se produce entre un aminoácido hidrofóbico y uno hidrofílico (fenilalanina por tirosina), aunque de tamaño similar.

Si bien los nuevos aislamientos estudiados presentan algunos aminoácidos nuevos, éstos en general se hallan en posiciones flexibles. Parece ser que el VFA está sujeto a cierta presión en cuanto al mantenimiento de su estructura, que le impide aprovechar su potencial de variación. Se sugiere entonces que la presión inmunológica, los cambios azarosos y la tolerancia a la variación participan en definir la variabilidad observada.

4.4.3. Variabilidad del VFA bajo situaciones de distinta presión inmune

Una de las características de los virus a ARN, entre ellos el VFA, es su gran variabilidad genética (Holland et al., 1982). Esta, es el resultado del alto grado de error producido por la replicasa durante la replicación viral, seguida de la selección de las variantes generadas en ese proceso (Domingo et al., 1993). En este sentido, las mutaciones que implican alguna desventaja replicativa son seleccionadas negativamente, mientras que otras mutaciones pueden mantenerse e incluso prevalecer en la población. De esta manera, las poblaciones del VFA se describen como cuasiespecies (Domingo et al., 1990, 1992), donde uno de los distintos genomas virales que integran la población se encuentra en mayor proporción, dando a la población en su conjunto una secuencia consenso.

Entre los factores que afectan el equilibrio de las poblaciones virales, se encuentra la presión ejercida por los anticuerpos generados por los animales. En situaciones donde el VFA está sujeto a una presión inmune parcial (animales parcialmente inmunizados), es esperable detectar más mutaciones dentro de los sitios antigénicos.

Teniendo en cuenta el nivel de inmunidad de la población susceptible, se pueden distinguir tres períodos en la historia del país, que se correlacionan con la variabilidad observada.

Un período donde la eficacia de las campañas que se llevaron a cabo fue muy baja. Aquí, la muy baja presión inmune permitió que los brotes de fiebre aftosa fueran producidos por cepas virales muy relacionadas a la cepa vacunal C3 Resende Br/55.

Un segundo período, a partir del año 1989-1990, donde se comienza a implementar en forma más generalizada la vacunación, generando un mayor nivel de anticuerpos en los animales.

Por último, a partir del año 1992, la población ganadera alcanza un alto nivel de inmunidad. Esto se debe a la aplicación efectiva del Plan Nacional de Erradicación. Este llevó a que la mayoría del rodeo nacional sea vacunado y se utilice la vacuna con adyuvante oleoso en forma generalizada. La variación antigénica en este período es muy importante, ya que se producen sustituciones en todos los sitios antigénicos, en posiciones críticas que afectan en forma muy notable la antigenicidad (Resultados 3.3). O sea que los virus que logran escapar a la protección brindada por los anticuerpos son variantes lejanas antigénicamente.

De esta forma es que no se pueden extrapolar los resultados de las campañas entre distintos países, incluso en distintas épocas dentro de un mismo país. Aquellos son afectados en especial por el nivel de inmunidad alcanzado por los animales, y otras variables como ser el tráfico de ganado.

Al depender la selección de variantes de la presión inmunológica, se destaca nuevamente la importancia del desarrollo de tecnologías que no utilizan virus activo para el seguimiento epidemiológico (y para el diagnóstico y elaboración de las vacunas) en países donde se esta en las etapas finales de erradicación. En estos casos, los brotes generados por escapes vacunales o escapes de plantas productoras toman mayor importancia; especialmente luego de dejar de vacunar, ya que los animales poseen un nivel de inmunidad bajo o nulo, que permite la introducción de virus de otros países y la aparición de variantes que pueden provocar grandes brotes.

4.4.4. Mecanismos operantes en el campo bajo distinta presión inmune

Los virus aislados durante los años 1993 y 1994, si bien son similares genéticamente al virus vacunal C3 Argentina/85, poseen una gran proporción de sustituciones en posiciones expuestas, dentro de sitios antigénicos (Figuras 10, 12 y 14). En especial, en el sitio antigénico "A", poseen una sustitución en el aminoácido 146 que produce una pérdida de reactividad frente a todos los anticuerpos monoclonales ensayados (Figura 12). Estas sustituciones han sido repetidamente encontradas en variantes generadas en

el laboratorio resistentes a anticuerpos poli y monoclonales (Mateu et al., 1990; Borrego et al., 1993; Lea, Hernández et al., 1994). Sin embargo, este tipo de variantes no fueron aisladas corrientemente en animales infectados en el campo; los casos documentados son el virus C5 Argentina/69 y unos aislamientos de las islas Filipinas, con la misma sustitución, y el virus C1 Haute Loire Fr/69 con una sustitución en el aminoácido 145 (va/ por a/a) que produce un efecto similar, aunque no tan drástico (Mateu et al., 1994).

El hecho de encontrar estas variantes en este período (aislamientos de General Villegas, Rivadavia y San Cristóbal), conjuntamente con una mayor eficiencia en la aplicación del plan de vacunación, sugiere que la presión inmune ha tenido un rol importante en la emergencia de las mismas. La población vacunal se encuentra en su conjunto con un buen nivel de inmunidad, alcanzando un "promedio" mayor al histórico. Bajo estas circunstancias, los animales presentan gran resistencia a la infección del VFA, y éste solo puede infectar animales no inmunizados o parcialmente inmunizados. La existencia de estos es inevitable, ya que siempre pueden quedar animales en este tipo de estado; animales que por su temprana edad han recibido una sola vacunación, animales que genéticamente son poco respondedores, o animales que por un deficiente estado sanitario no responden bien a la vacunación. Así es como las variantes distantes antigénicamente con respecto a la cepa vacunal, tienen la posibilidad de persistir. Sin embargo, el buen estado inmunológico general de la población, junto con medidas sanitarias como la revacunación de la población de riesgo, impide la diseminación del virus.

Otra interpretación acerca de la no diseminación de las nuevas variantes aisladas, sería suponer que ellas tienen alguna desventaja adaptativa. La aparición de éstas (en animales vacunados) se habría debido a su divergencia antigénica con respecto a la cepa vacunal; sin embargo, su menor viabilidad les habría impedido su diseminación.

Borrego et al. (1993) documentaron que si bien tanto en presencia como en ausencia de presión inmune se aislaron variantes de VFA del serotipo C en cultivo de células, sólo fueron aisladas variantes con la sustitución glutamina por histidina en el aminoácido 146 de la proteína VP1 bajo presión de anticuerpos mono y policlonales. Los autores sugieren que dichas variantes tendrían una desventaja adaptativa; y que las mismas sólo se pueden detectar bajo presión inmunológica. Al medir el título infeccioso alcanzado por estas variantes luego de infectar monocapas celulares (en ausencia de anticuerpos), éste era menor al alcanzado por variantes sin esa sustitución, lo cual reforzaba la idea de la menor adaptación. Sin embargo, luego de varios pasajes por cultivos de células, las variantes recuperaban la capacidad de generar alto título, a pesar de mantener la

sustitución en el aminoácido 146. Por lo cual, la observada pérdida de adaptación se debió a otras sustituciones no detectadas ya que en aquellos experimentos se secuenció solo la proteína VP1. Estos resultados indican que: a) la sustitución en el aminoácido 146, no habría sido responsable de la disminución de la infectividad; b) que esa sustitución fue responsable de la menor capacidad infecciosa de las variantes, pero durante los sucesivos pasajes posteriores otras sustituciones neutralizaron el efecto que produjo la misma, que llevaron al virus a una mejor adaptación, y c) que la falta de detección de estas variantes en ausencia de anticuerpos no se debió a que éstas no se encontraban en la población viral, sino a un problema estadístico: si se hubieran secuenciado suficientes clones, probablemente se hubiera encontrado que algunos de ellos poseían la referida sustitución.

Si bien es raro pensar que una sustitución en una región flexible como lo es el "loop" G-H de la proteína VP1 (Acharya et al., 1989; Lea, Hernández et al., 1994) puede producir un efecto importante en la capacidad adaptativa del virus (la movilidad observada en tal región y el no estar involucrada en la interacción con otras proteínas sugiere cierta flexibilidad por parte de la cápside viral en cuanto a las sustituciones permitidas), se debe tener en cuenta que en ese mismo "loop", se encuentra la secuencia conservada RGD (aminoácidos 141, 142, 143), la cual es necesaria para la unión del VFA al receptor celular en cultivos celulares (Mason et al., 1994). Rieder et al. (1994) demostraron que, en virus de serotipo A, ciertas sustituciones cerca de esta secuencia provocan una disminución en la capacidad de unión del VFA a células BHK. Esta característica se podría traducir en una menor adaptación general de los virus que poseen este tipo de sustituciones.

La aparición de las variantes estudiadas en momentos de una mayor cobertura vacunal, sugiere que la sustitución de aminoácidos en posiciones críticas dentro de sitios antigénicos, puede ser un mecanismo de por parte del VFA.

Este mecanismo tiene gran importancia en la ruptura de la inmunidad, bajo condiciones de baja presión inmune; pero en condiciones de amplia cobertura inmunitaria, si bien puede ocurrir la aparición de variantes, la diseminación de las mismas es mas fácilmente controlable. En estos casos, el alto nivel inmunitario de la población y la aplicación de medidas como la "revacunación en anillo" con vacunas preparadas con las nuevas variantes, pueden ser suficientes para controlar la enfermedad.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

El Virus de la Fiebre Aftosa (VFA) presenta una gran variabilidad, lo cual es uno de los inconvenientes para el éxito de las campañas de lucha. El estudio de tal variabilidad a nivel molecular permite caracterizar sitios antigénicos inmunodominantes, y realizar un seguimiento epidemiológico de las cepas actuantes en el campo. La caracterización de sitios antigénicos es imprescindible para el diseño de vacunas, mientras que un correcto seguimiento epidemiológico lo es para la elección de las cepas (o secuencias) a incluir en las mismas.

El trabajo realizado consistió en la caracterización molecular de las cepas de VFA pertenecientes al serotipo C actuantes en el país en el período 1984-1994. Para ello, se seleccionaron las cepas vacunales y aislamientos virales provenientes de bovinos infectados y se los analizó en cuanto a su reactividad frente a un panel de anticuerpos monoclonales neutralizantes dirigidos contra distintos sitios antigénicos. Por otro lado se procedió a la secuenciación del ARN que codifica para las proteínas de la cápside (VP1, VP2, VP3 y VP4).

Se obtuvieron las secuencias genómicas y aminoacídicas, y los mapas antigénicos de las cepas utilizadas. De esta forma se logró un panorama ampliado de la situación epidemiológica del VFA serotipo C en la Argentina.

La caracterización molecular de las cepas C3 Argentina/84 y C3 Resende Br/55, permitió establecer la importancia de regiones de la cápside fuera del sitio antigénico principal ("sitio A") en la generación de la variabilidad antigénica y la protección. Así también, permitió ampliar el estudio sobre la interacción de regiones distantes de la partícula viral, como mecanismo de generación de variabilidad antigénica.

El estudio de la cepa vacunal C3 Argentina/85 y aislamientos posteriores, permitió probar la cocirculación de variantes y el establecimiento de una nueva línea evolutiva del VFA que reemplazó a la actuante hasta su aparición.

La caracterización antigénica y la secuencia de aminoácidos de las cepas aisladas entre los años 1992 y 1994, permitió identificar aminoácidos críticos en la antigenicidad del VFA, y contribuir a la decisión de aplicar una vacuna monovalente en zonas de riesgo teniendo en cuenta la distancia antigénica de las cepas emergentes respecto a la vacunal.

Así también, los estudios genéticos mostraron la conservación de secuencias en el tiempo.

La relación observada entre la variabilidad antigénica y los niveles de inmunidad de la población susceptible, permitió establecer la importancia de la variabilidad antigénica en cuanto a posibilidades de escapes vacunales y niveles de protección, en relación al nivel de anticuerpos.

Las nuevas secuencias aminoacídicas obtenidas, permitieron ampliar la información acerca de los impedimentos estructurales del VFA que moderan la capacidad de variación que tiene este agente infeccioso.



Dr. Eduardo L. Palma



Dino A. Feigelstock

Los resultados de esta Tesis fueron publicados en:

Journal of General Virology 73, 3307-3311 (1992): "Extensive antigenic diversification of foot-and-mouth disease virus by amino acid substitutions outside the major antigenic site". Feigelstock, D., Mateu, M.G., Piccone, M.E, F., Brocchi, E., Domingo, E. & Palma, E.L.

Journal of Virology 68, 1407-1417 (1994): "Antigenic heterogeneity of a foot-and-mouth disease virus serotype in the field is mediated by very limited sequence variation at several antigenic sites". Mateu, M.G., Hernández, J., Martínez, M.A., Feigelstock, D., Lea, S., Perez, J.J., Giralt, E., Stuart, D., Palma, E.L. & Domingo, E.

Vaccine (enviados a publicar): "Emerging foot-and-mouth disease virus variants with antigenically critical amino acid substitutions predicted by model studies". Feigelstock, D., Mateu, M.G., Luz Valero, M., Andreu, D, Domingo, E. & Palma, E.L.(1995).

BIBLIOGRAFIA

6. BIBLIOGRAFIA

- ACHARYA, R., FRY, E., STUART, D., FOX, G., ROWLANDS, D. & BROWN, F. (1989). The three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution. *Nature (London)* 337, 709-716.
- ALONSO FERNANDEZ, A., GOMES, I & SONDAHL, M.S. (1976). Serological and immunological relationship among type A foot and mouth disease strains in South America. *Dev. Biol. Stand.* 35, 231-235.
- ALONSO FERNANDEZ, A., CASAS OLASCOAGA, R., AUGÉ DE MELLO, P., FERNANDEZ, G., & MAZZUCA, G (1986). The evolution of the FMDV C3 Argentina in the field. Report of the session of the research group of the standing technical committee of the European commission for the control of foot and mouth disease, pp. 42-48. Berman-Unipub, Lanham, MD.
- ALONSO FERNANDEZ, A., AUGÉ DE MELLO, P. y FEDERER, K.E. (1973). Diagnóstico y referencia en la fiebre aftosa. *Bol. Centro Panamericano de Fiebre Aftosa*, 11, 1-12.
- ALONSO FERNANDEZ, A., VIANNA FILHO, Y.L., DURINI, L.A.E. & SUTMOLLER, P. (1981). Foot and mouth disease viruses used in vaccine production and control in South America. *Bol. Centro Panamericano de Fiebre Aftosa*, 43-44, 21-28.
- AMBROS, V. & BALTIMORE, D. (1978). Protein is linked to the 5' end of poliovirus RNA by a phosphodiester linkage to tyrosine. *J. Biol. Chem.* 253, 5263-5266.
- ANDERSON, E.C., UNDERWOOD, B.O., BROWN, F. & NGICHABE, C.K. (1985). Variations in foot and mouth disease virus isolated in Kenya: an examination of field isolates by T1 Oligonucleotide fingerprinting. *Vet Microbiol.* 10, 409-423.
- ARBELAEZ, G., DE BUSTOS, M., DE GERARDINO, A., LOBO, C.A., ESTUPIÑAN, J. & BARRERAS, J. (1979). Estandarización de la técnica de microneutralización por anticuerpos de virus de fiebre aftosa. *Rev. ICA, Bogotá*, 14 (2), 87-92.
- ARLINGHAUS, R., B., & POLATNICK, J. (1969). The isolation of two enzyme ribonucleic acid complexes involved in the synthesis of foot and mouth disease virus ribonucleic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 62, 821-829.

- ARROWSMITH, A.E.M. (1975). Further data on FMD type C in Jersey. In Report of the twenty first session of the European Commission for the control of foot and mouth disease. Appedix I: WRL informaion sheet number 24, 65-66. FAO Rome.
- BACHRACH, H.L., MORGAN, D.O. & MOORE, D.M. (1979). Foot and mouth disease virus immunogenic capsid protein VP1: N-terminal sequences and immunogenic peptides obtained by CNBr and triptic cleavage. *Inervirology* 12, 65-72.
- BACHRACH, H.L. (1968). Foot and Mouth disease virus. *Annu. Rev.Microbiol.*22, 201-244.
- BACHRACH, H.L., MOORE, D.M., Mc KERCHER, P.D. & POLATNICK, J. (1975). Immune and antibody responses to an isolated capsid protein of foot and mouth disease virus. *J.Immunol.* 115, 1636-1641.
- BALTIMORE, D., GIRARD, M. & DARNELL, J.E. (1966). Aspects of the synthesis of poliovirus RNA and the formation of virus particles. *Virology* 29, 179.
- BAXT, B., VAKHARIA, V., MOORE, D.M., FRANKE, A.J. & MORGAN, D. (1989). Analysis of neutralizing antigenic sites on the surface of type A12 foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 63, 2143-2151.
- BAXT, B. & BACHRACH, H.L. (1980). Early interaction of FMDV with cultured cells. *Virology* 104, 42-55.
- BAXT, B. & BACHRACH, H.L. (1982). The adsorption and degradation of foot and mouth disease virus isolated BHK-21 cell plasma membranes. *Virology* 116, 391-405.
- BECK, E. & STROHMAIER, K. (1987). Subtyping of european foot and mouth disease virus strains by nucleotide sequence determination. *J. Virol.* 61, 1621-1629.
- BELSHAM, G.J. (1992). Dual initiation sites of protein synthesis on foot and mouth disease virus RNA are selected following internal entry and scanning of ribosomes in vivo. *EMBO J.* 11, 1105-1110.
- BELSHAM, G.J. & BRANGWYN, J.K. (1990). A region of the 5' non coding 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.* 65, 5828-5838.

- BERGMANN, I.E. , TIRABOSCHI, B., MAZZUCA, G., FERNANDEZ, E., MICHAÏLOFF, C.A., SCODELLER, E.A. & LA TORRE, J.L. (1988). Serological and biochemical analysis of foot-and-mouth disease virus (serotype C3) isolated in Argentina between 1981 and 1986. *Vaccine* 6, 245-252.
- BERINSTEIN, A., ROIVAINEN, M., HOVI, T., MASON, P.W. & BAXT, B. (1995). Antibodies to the vitronectin receptor (integrin $\alpha\beta 3$) inhibit binding and infection of foot and mouth disease virus to cultured cells. *J. Virol.*(in press).
- BIONDOLILLO, A. (1993). Instituto de Economía y Sociología Rural, INTA.
- BITTLE, J.L., HOUGHTEN, R.A., ALEXANDER, H., SHINNICK, T.M., SUTLIFF, J.G., LERNER, R.A., ROWLANDS, D.J. & BROWN, F. (1982). Protection against foot and disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. *Nature (London)* 298, 30-33.
- BOLWELL, C., CLARKE, B.E., PARRY, N.R., OULDRIDGE, E.J., BROWN, F. & ROWLANDS, D.J. (1989). Epitope mapping of foot-and-mouth disease virus with neutralizing monoclonal antibodies. *J.Gen.Virol.* 70, 59-68.
- BORREGO, B., NOVELLA, I.S., ANDREU, D., GIRALT, E.& DOMINGO, E. (1993). Distinct repertoire of antigenic variants in the presence or absence of immune selection. *J. Virol.* 67, 6071-6079.
- BROOKSBY, J.B. & ROGERS, J. (1957). In methods of typing and cultivation of foot and mouth disease viruses, OEEC, Paris.
- BROOKSBY, J.B. (1958). The virus of foot and-mouth-disease. *Adv. virus res.* 5, 1-37.
- BROOKSBY, J.B. (1967). FMD a world. *Nature* 213, 120-122.
- BROOKSBY, J.B. (1982). Portraits of viruses: foot and mouth disease virus. *Intervirology* 18, 1-23.
- BRUNER, B.W. & GILLESPIE, J.H. (1966). Hagen's infectious diseases of domestic animals, chap. 44, 791-809. (Cornell Univ. press, Ithaca, N.Y.)
- BROWN, F., CARTWRIGHT, B. & STEWARD, D.L. (1962). Further studies on the infection of pig kidney cells by foot and mouth disease virus. *Biochem. biophys. Acta* 55, 768-774.

- BURROWS, R., MANN, J.A., GARLAND, A.J.M., GREIG, A. & GOODRIDGE, D. (1981). The pathogenesis of natural and simulated natural foot and mouth disease infection in cattle. *J. Comp. Pathol.* 91, 599.
- CAMARERO, J., ANDREU, D., CAIRO, J.J., MATEU, M.G., DOMINGO, E. & GIRALT, E. (1993). Cyclic disulfide model of the major antigenic site of serotype C foot-and-mouth disease virus. *FEBS Letters*, 328, 159-164.
- CAPUCCI, L., BROCCHI, E., DE SIMONE, F. & PANINA, G.F. (1984). Characterization of monoclonal antibodies produced against foot and mouth disease virus. In Report of Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of Foot and Mouth Disease, 32-39. Brescia. Foot and Agriculture Organization of the United Nations.
- CARREÑO, C., ROIG, X., CAIRO, J., CAMARERO, J., MATEU, M.G., DOMINGO, E., GIRALT, E. & ANDREU, D. (1992). Studies on antigenic variability of C strains of foot-and-mouth disease virus by means of synthetic peptides and monoclonal antibodies. *Int. J. Peptide Protein Res.* 39, 41-47.
- CARRILLO, C., DOPAZO, J., MOYA, A., GONZALEZ, M., MARTINEZ, M.A., SAIZ, J.C. & SOBRINO, F. (1989). Comparison of the vaccine strains and the viruses causing the 1986 foot and mouth disease outbreak in Spain: an epizootiological analysis. *Virus Res.*
- CARUTHERS M. H. (1982). Chemical synthesis of oligonucleotides using the phosphite triester intermediates. In H.G. Gasser and A. Lang (ed), *Chemical and enzymatic synthesis of gene fragments: a laboratory manual*. Verlag-Chemie, Weinheim, Federal Republic of Germany. p.71 79
- CAVANAGH, D., ROWLANDS, D. & BROWN, F. (1978). Early events in the interaction between foot and mouth disease virus and primary kidney cells. *J. Gen. Virol.* 41, 255-264.
- CHAN, J.Y. & BECKER, F.F. (1979). Decreased fidelity of DNA polymerase activity during N-2-fluorenylacetamide heatocarcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 814-818..
- CHARTEJEE, N.K., BACHRACH, H.L. & POLATNIK, J. (1976). Foot and mouth disease virus RNA, presence of 3' terminal polyriboadenilic acid and absens of amino acid binding ability. *Virology* 69, 369-377.

- CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. (1987). Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- CHOW, M., NEUMAN, J.F.E., FILMAN, D., HOGLE, J.M., ROWLANDS, D.J. & BROWN, F. (1987). Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance. *Nature* 327, 482-486.
- CLARKE, B.E., NEWTON, S.E., CARROLL, A.R., FRANCIS, M.J., APPLEYARD, G., SYRED, A.D., HIGHFIELD, P.E., ROWLANDS, D.J. & BROWN, F. (1987). Improved immunogenicity of a peptide epitope after fusion to hepatitis B core proteins. *Nature* 330, 381-384.
- CLARKE, B.E., CARROLL, A.R., ROWLANDS, D.J., NICHOLSON, B.H., HOUGHTEN, R.A., LERNER, R.A. & BROWN, F. (1983). Synthetic peptides mimic subtype especificity of foot and mouth disease virus. *FEBS Letters* 157, 261-264.
- COSTA GIOMI, M.P., GOMES, Y., TIRABOSCHI, B., AUGÉ DE MELLO, P., BERGMANN, I.E., SCODELLER, E.A., LA TORRE, J.L. (1988). Heterogeneity of the polyribocytidylic acid tract in aphthovirus: changes in the size of the poly(C) of viruses recovered from persistently infected cattle. *Virology* 162, 58-64.
- COTTRAL, G.E., COX, B.F. & BALDWIN, D.E. (1960). The survival of foot and mouth disease virus in cured and uncured meat. *American Journal of Veterinary Research* 21, 288-297.
- COTTRAL, G.E., GAILIUNAS, P. & COX, B.F. (1968). Foot and mouth disease virus in the semen of bulls and its transmission by artificial insemination. *Archiv für die Gesamte Virusforschung* 23, 362-377.
- COX, D.F., COTTRAL, G.E. & BALDWIN, D.E. (1961). Further studies on the survival of foot and mouth disease virus in meat. *American Journal of Veterinary Research* 22, 224-226.
- CRAWFORD, N.M. & 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. USA* 80, 7452-7455.
- CUNHA, R.G., BAPTISTA Jr., J.A., SERRAO, U.M., TORTURELLA, I. (1957). El uso de los ratones lactantes en la evaluación de los anticuerpos contra el virus de la fiebre aftosa y su significación inmunológica. *Gac. Vet. B. Aires* 19 (110), 243-267.

- DE BORDE, D.C., NAEVE, C.W., HERLOCHER, M.L. & MAASSAB, H.F. (1986). Resolution of a common RNA sequencing ambiguity by terminal deoxynucleotidyl transferase. *Ana. Biochem.* 157, 275-282.
- DE LAS CARRERAS, A. (1993). *La fiebre aftosa en la Argentina. Un desafío competitivo.* Ed. Hemsferio Sur, Argentina.
- DEVANNEY, M.A., VAKHARIA, V.N., LLOYD, R.E., EHRENFELD, E. & GRUBMAN, M.J. (1988). Leader protein of foot and mouth disease virus is required for cleavage of the p220 component of the cap-binding protein complex. *J. Virol.* 62, 4407-4409.
- DIEZ, J., MATEU, M.G., DOMINGO, E. (1989). Selection of antigenic variants of foot and mouth disease virus in the absence of antibodies, as revealed by an in situ assay. *J. Gen. Virol.* 70, 3281-3289.
- DIEZ, J., DAVILA, M., ESCARMIS, C., MATEU, M.G., DOMINGUEZ, J., PEREZ, J.J., GIRALT, E., MELERO, J.A., DOMINGO, E. (1990). Unique amino acid substitutions in the capsid proteins of foot and disease virus from a persistent infection in cell culture. *J. Virol.* 64, 5519-5528.
- Di MARCHI, R., BROOKE, G., GALE, C., CRACKNELL, V., DOEL, T., & MOWAT, N. (1986). Protection of cattle against foot and mouth disease by synthetic peptide. *Science* 232, 639-641.
- DOEL, T.R., SANGAR, D.V., ROWLANDS, D.J. & BROWN, F. (1978). A re-appraisal of the biochemical map of foot and mouth disease virus RNA. *J. Gen. Virol.* 41, 395.
- DOEL, T.R., GALE, C., DO AMARAL, C.M.C.F, MULCAHY, G. & DI MARCHI, R. (1990). Heterotypic protection induced by synthetic peptides corresponding to three serotypes of foot and mouth disease virus. *J. Virol.* 64, 2260-2264.
- DOMINGO, E., DAVILA, M., ORTIN, J., (1980). Nucleotide sequence heterogeneity of the RNA from a natural population of foot and mouth disease virus. *Gene* 11, 333-346.
- DOMINGO, E., MATEU, M.G., MARTINEZ, M.A., DOPAZO, J., MOYA, A., & SOBRINO, F. (1990). Genetic variability and antigenic diversity of foot-and-mouth disease virus. In "Applied Virology Research" (E. Kurstak, R.G. Marusyk, F.A. Murphy and M.H.V. van Regenmortel, eds.), vol.2. pp 233-266. Plenum Press, New York.

- DOMINGO, E., ESCARMIS, C., MARTINEZ, M.A., MARTINEZ-SALAS, E. & MATEU, M.G. (1992). Foot and mouth disease virus populations are quasispecies. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 176, 33-47.
- DOMINGO, E., DIEZ, J., MARTINEZ, M.A., HERNANDEZ, J., HOLGUIN, A., BORREGO, B. & MATEU, M.G. (1993). New observations on antigenic diversification of RNA viruses. Antigenic variation is not dependent on immune selection. *J. Gen. Virol.* 74, 2039-2045.
- DOPAZO, J., SOBRINO, F., PALMA, E.L., DOMINGO, E., MOYA, A., (1988). Gene encoding capsid protein VP1 of foot and mouth disease virus: a quasispecies model of molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 6811-6815.
- DULBECCO, R. & FREEMAN, G. (1959). Plaque production by the polyoma virus. *Virology* 8, 396-401.
- EAGLE, H. (1959). Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science* 130, 432-437.
- EIGEN, M. & SCHUSTER, P. (1977). The hypercycle: a principle of natural self-organization, part A, emergence of the hypercycle; part B, the abstract hypercycle; part C, the realistic hypercycle. *Naturwissenschaften* 64, 541-565.
- EIGEN, M., GARDINER, W., SCHUSTER, P. & WINKELER-OSWATITSCH, R. (1981). The origin of genetics information. *Sci. Am.* 244, 71-118.
- FALCZUK, A., MAZZUCA, G., MARADEI, E., BIANCHI, T., SMITSAART, E., FONDEVILA, N., PERIOLO, O.H., SEKI, C., LA TORRE, J.L. & SCHUDEL, A. (1993). Estudios de cepas de virus de fiebre aftosa (FA) tipo C aisladas en la provincia de Buenos Aires y Córdoba. IV Congreso Argentino de Virología, Tucumán (abstr.)
- FAGG, R. & H., HYSLOP, N.S.G., (1966). Isolation of a variant strain of foot and mouth disease virus (type O) during passage in partly immunized cattle. *Hyg.* 64, 397-404.
- FEIGELSTOCK, D., MATEU, M.G., PICCONE, LUZ VALERO, M., ANDREU, D, DOMINGO, E. & PALMA, E.L.(1995). Emerging foot-and-mouth disease virus variants with antigenically critical amino acid substitutions predicted by model studies. Enviado a publicación.

- FEIGELSTOCK, D., MATEU, M.G., PICCONE, M.E., DE SIMONE, F., BROCCHI, E., DOMINGO, E. & PALMA, E.L.(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.
- FIRPO, E. & PALMA, E.L. (1979). Inhibition of foot and mouth disease virus and procapsid synthesis by zinc ions. *Arch. Virol.* 61, 175-181.
- FORSS, S., STREBEL, K., BECK, E. & SCHALLER, H. (1984). Nucleotide sequence and genome organization of foot and mouth disease virus. *Nucleic acids Res.* 12, 6587-6601.
- FORSS, S. & SCHALLER, H. (1982). A tandem repeat gene in a picornavirus. *Nucleic Acids Res.* 10, 6441-6445.
- FRACASTORIUS, H. (1546). *De contagione et contagiosis morbis et curatione.* Bk. 1 chap. 12. Venecia.
- GAROFF, H. & SORGE, W. (1981). Improvement of DNA sequencing gels. *Anal. Biochem.* 115, 450-457.
- GEBAUER, F., DE LA TORRE, J.C., GOMES, I., MATEU, M.G., BARAHONA, H., TIRABOSCHI, B., BERGMANN, I., AUGÉ DE MELLO, P. & DOMINGO, E.(1988). Rapid selection of genetic and antigenic variants of foot-and-mouth disease virus during persistence in cattle. *J. Virol.* 62, 2041-2049
- GIAVEDONI, L.D., KAPLAN, G., MARCOVECCHIO, F., PICCONE, M.E. & PALMA, E.L. (1991). Protection conferred by TrpE fusions proteins containing portions of the C terminal region of capsid protein VP1 of foot and mouth disease virus. *J.G.Virol* 72, 967-971.
- GRUBMAN, M.J. & BAXT, B. (1982). Translation of foot and mouth virion RNA and processing of the primary cleavage product in a rabbit reticulocyte lysate. *Virology* 116, 19-30.
- GRUBMAN, M.J. (1980). The 5' end of foot and mouth disease virion RNA contains a protein covalently linked to the nucleotide pUp. *Arch. Virol.* 63, 311-315.
- HAMBLIN, C., BARNETT, I., CROWTER, J.R. & HEDGER, R. (1986). A new enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies against FMDV. I. Development of a method for ELISA. *J. Immunol. Methods* 93, 193.

- HENDERSON, W.M. & BROOKSBY, J.B. (1948). The survival of foot and mouth disease virus in meat and offal. J. Hygiene 46, 394.**
- HERNANDEZ, J., MARTINEZ, M.A., ROCHA, E., DOMINGO, E. & MATEU, M.G. (1992). Generation of a subtype-specific neutralization epitope in foot-and-mouth disease virus of a different subtype. J.Gen.Virol., 73, 213-216.**
- HEWLET, M.J., ROSE, J.K. & BALTIMORE, D. (1976). 5' terminal structure of poliovirus polyribosomal RNA is pUp. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 327.**
- HOLLAND, J.J., SPINDLER, K., HORODYSKI, F., GRABAU, E., NICHOL, S. & VANDEPOL, S. (1982). Rapid evolution of RNA genomes. Science 215, 1577-1585.**
- HRUBY, D. & ROBERTS, W.K. (1976). Variations in polyadenylic acid content and biological activity. J. Virol. 19, 325-330.**
- HYSLOP, N.S.G. (1965). Isolation of variant strains from foot and mouth disease virus propagated in cell cultured containing antiviral sera. J. Gen. Microbiol. 41, 135-142.**
- JOHNSON, K.L. & SARNOW, P. (1991). Three poliovirus 2B mutants exhibits noncomplementable defects in viral RNA amplification and display dosage-dependent dominance over wild type poliovirus. J. Virol. 65, 4341-4349.**
- KAPLAN, G. (1986). Variabilidad genómica de la cepa C3 Resende del Virus de la Fiebre Aftosa por pasajes seriados en distintos sistemas celulares. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires.**
- KING, A.M.Q., UNDERWOOD, V.O., Mc CAHON, D., NEWMAN, J.W.I., BROWN, F. (1981). Biochemical identification of viruses causing the 1981 outbreak of foot and mouth disease in U.K. Nature 293, 497-480.**
- KING, A.M.Q., Mc CAHON, SLADE, W.R. & D., NEWMAN, J.W.I. (1982). Recombination in RNA. Cell 29, 921-928.**
- KING, A.M.Q., Mc CAHON, D., SAUNDERS, K., NEWMAN, J.W.I. & SLADE, W. (1985). Multiple sites of recombination within the RNA genome of foot and mouth disease virus. Virus Res. 3, 373-384.**

- KITSON, J.D.A., Mc CAHON, D. & BELSHAM, G.J. (1990). Sequence analysis of monoclonal antibody resistant mutants of type O foot-and-mouth disease virus: evidence for the involvement of the three surface exposed capsid proteins in four antigenic sites. *Virology* 179, 26-34
- KITSON, J.D.A., BURKE, K.L., PULLEN, L.A., BELSHAM, G.J. & ALMOND, J.W. (1991). Chimeric polioviruses that include sequences derived from two independent antigenic sites of foot and mouth disease virus (FMDV) induce neutralizing antibodies against FMDV in guinea pigs. *J. Virol* 65, 3068-3075.
- KLUMP, W., MARQUART, O. & HOFSCHEIDER, P.H. (1984). Biologically active protease of foot and mouth disease virus is expressed from cloned viral cDNA in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 3351-3355.
- KORNBERG, A. (1980). DNA replication. San Francisco: Freeman pp. 724.
- KUHN, R., LUZ, N. & BECK, E. (1990). Functional analysis of the internal translation initiation site of foot and mouth disease virus. *J. Virol.* 64, 4625-4631.
- KUPPER, H., KETTER, C., FORSS, S., SCHALLER, H., FRANZE, R., STROHMAIER, K., MARQUARDT, D., ZASLARKY, V.G. & HOFSCHEIDER, P.H. (1981). Cloning of cDNA of major antigen of foot and mouth disease virus and expression in *E. Coli*. *Nature* 289, 555-559.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227, 680-685.
- LAKE, J.R., PRISTON, R.A.J. & SLADE, W.R. (1975). A genetic recombination map of foot and mouth disease virus. *J. Gen. Virol.* 27, 355-367.
- LANGRIDGE, J., LANGRIDGE, P. & BERGQUIST, P.L. (1980). Extraction of nucleic acids from agarose gels. *Anal. Biochem.* 103, 264-271.
- LAPORTE, J., GROSCHAUDE, J., WANTYGHM, J., BERNARD, S. & ROUZE, P. (1973). Neutralization en culture cellulaire du pouvoir infectieux du virus de la fièvre aphteuse par des sérums provenant de porcs immunisés à l'aide d'une protéine virale purifiée. *C.R. Hebd. Séan. Acad. Sci. Paris* 276, 3399-3401.
- LA TORRE, J.L., UNDERWOOD, B.O., LEBENDIKER, M.A., GORMAN, B.M. & BROWN, F. (1982). Applications of RNase T1 one and two dimensional analyses to rapid identification of foot and mouth disease virus. *Infect. Immun.* 36, 143.

- LEA, S., HERNANDEZ, J., BLAKEMORE, W., BROCCHI, E., CURRY, S., DOMINGO, E., FRY, E., ABU-GHAZALEH, R., KING, A., NEWMAN, J., STUART, D. & MATEU, M.G. (1994). The structure and antigenicity of a serotype C foot-and-mouth disease virus. *Structure* 2, 123-139.
- LEWIS, S.A., MORGAN, D.O. & GRUBMAN, M.J. (1991). Expression, processing and assembly of foot and mouth disease virus capsid structures in heterologous systems: induction of a neutralizing antibody response in guinea pigs. *J. Virol.* 65, 6572-6580.
- LI, J.P. & BALTIMORE, D (1988). Isolation of poliovirus 2C mutants defective in viral RNA synthesis. *J. Virol.* 62, 4016-4021.
- LO, K.Y. & BESSMAN, M.J. (1976). An antimutator deoxyribonucleic acid polymerase. II. In vitro and in vivo studies of its temperature sensitivity. *J. Biol. Chem.* 251, 2480-2486.
- LOEFFLER, F. & FROSCH, P. (1897). Summarischer berisht uber die ergebnisse der unter suchungen der kommoission zur erforschun der maul-und-klamenseuche. *Zentralbl. Bacterial Parasitenkunden infektionskranich* 22, 257-259.
- LUCAS LENARD, J.M. (1979). "The molecular biology of picomaviruses". Perez-Bercoff, R. (de.) p.73, Cambridge Univ. press, N.Y.
- MARTIN R. (1987). Overcoming DNA sequencing artifacts: stop and comprssions. *Focus* 9 (1), 8-10.
- MARTINEZ, M.A., HERNANDEZ, J., PICCONE, M.E., PALMA, E.L., DOMINGO, E., KNOWLES, N. & MATEU, M.G. (1991). Two mechanisms of antigenic diversification of foot-and-mouth disease virus. *Virology* 184, 695-706.
- MARTINEZ, M.A., CARRILO, C., PLANA, J., MASCARELLA, R., BERGADA, J., PALMA, E.L., DOMINGO, E. & SOBRINO, F. (1988). Genetic and immunogenetic variations among closely related isolated of foot and mouth disease virus. *Gene* 62, 75-84.
- MARTINEZ, M.A., DOPAZO, J., HERNANDEZ, J., MATEU, M.G., SOBRINO, F., DOMINGO, E. & KNOWLES, N.J. (1992). Evolution of the capsid protein genes of foot-and-mouth disease virus: antigenic variation without accumulation of amino acid substitutions over six decades. *J. Virol.* 66, 3557-3565.

- MARTINEZ-SALAS, E., SAIZ, J.C., DAVILA, M., BELSHAM, G.G & DOMINGO, E. (1993). A single nucleotide substitution in the internal ribosome entry site of foot and mouth disease virus leads to enhanced cap independent translation in vivo. J. Virol. 67, 3748-3755.**
- MASON, P.W., RIEDER, E. & BAXT, B. (1994). RGD sequence of foot and mouth disease virus is essential for infecting cells via the natural receptor but can be bypassed by antibody-dependent enhancement pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. 91, 1932-1936.**
- MATEU, M.G., ROCHA, E., VICENTE, O., VAYREDA, F., NAVALPOTRO, C., ANDREU, D., PEDROSO, E., GIRALT, E. ENJUANES, L. & DOMINGO, E. (1987). Reactivity with monoclonal antibodies of viruses from an episode of foot-and-mouth disease. Virus Research 8, 261-274.**
- MATEU, M.G., DA SILVA, J.L., ROCHA, E., DE BRUM, D.L., ALONSO, A., ENJUANES, L., DOMINGO & BARAHONA, H. (1988). Extensive antigenic heterogeneity of foot-and-mouth disease virus of serotype C. Virology 167, 113-124.**
- MATEU, M.G., MARTINEZ, M.A., ROCHA, E., ANDREU, D., PAREJO, J., GIRALT, E., SOBRINO, F. & DOMINGO, E. (1989). Implications of a quasispecies genome structure: effect of frequent, naturally occurring amino acid substitutions on the antigenicity of foot-and-mouth disease virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 5883-5887.**
- MATEU, M.G., MARTINEZ, M.A., CAPUCCI, L., ANDREU, D., GIRALT, E., SOBRINO, F., BROCCHI, E. & 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.**
- MATEU, M.G., ANDREU, D., CARREÑO, C., ROIG, X., CAIRO, J.J., CAMARERO, J.A., GIRALT, E. & DOMINGO, E. (1992). Non-additive effects of multiple amino acid substitutions on antigen- antibody recognition. Eur. J. Immunol. 22, 1385-1389.**
- MATEU, M.G., HERNANDEZ, J., MARTINEZ, M.A., FEIGELSTOCK, D., LEA, S., PEREZ, J.J., GIRALT, E., STUART, D., PALMA, E.L. & DOMINGO, E. (1994). Antigenic heterogeneity of a foot-and-mouth disease virus serotype in the field is mediated by very limited sequence variation at several antigenic sites. J. Virol. 68, 1407-1417.**
- MC CAHON, D., SLADE, W.R., PRISTON, R.A.J. & LAKE, J.R. (1977). An extended genetic recombination map for foot and mouth disease virus. J. Gen. Virol. 35, 555-565.**

- MC VICAR, J.W. & SUTMOLLER, P. (1976). Growth of foot and mouth disease virus in the upper respiratory tract of non immunized, vaccinated and recovered cattle after intranasal inoculation. *J. Hyg. (Camb.)* 76, 467-481.
- MEDINA, M., DOMINGO, E., BRANGWIN, J.K. & BELSHAM, G.J. (1993). The two species of the foot and mouth disease virus leader protein, expressed individually, exhibit the same activities. *Virology* 194, 355-359.
- MINOR, P.D. (1990). Antigenic structure of picornaviruses. *Current Topics In Microbiology and Immunology* 161, 121-154.
- MIZUSAWA S., NISHIMURA, S. & SEELA, F. (1986). Improvement of the dideoxy chain termination method of DNA sequencing by use of deoxy-7-deazoguanosine triphosphate in place of dGTP. *Nucl. Acids Res.* 14, 1319-1324.
- MOORE, D.M. (1983). "Genetic engineering: applications to agriculture". Owens L.D. (ed) Rowman and Allanheld, Totowa.
- MOWAT, G.N. & CHAPMAN, W.G. (1962). Growth of foot and mouth disease virus in a fibroblastic cell line derived from hamster kidney. *Nature* 194, 253-255.
- MURRAY, V. & HOLLIDAY, R. (1981). Increased error frequency of DNA polymerases from senescent human fibroblasts. *J. Mol. Biol.* 146, 55-76.
- MUZYCZKA, N., POLAND, R.L. & BESSMAN, M.J. (1972). Studies on the biochemical basis of spontaneous mutation. I. A comparison of the deoxyribonucleic acid polymerases of mutator, antimutator, and wild type strains of bacteriophage T4. *J. Biol. Chem.* 247, 7116-7122.
- NEWMAN J.F.E., PIATTI, P.G., GORMAN, B.M., BURRAGE, T.G., RYAN, M.D., FLINT, M. & BROWN, F. (1994). "FMDV particles contain replicase protein 3D". *Proc. Natl. Acad. Sci* 91, 733-737.
- NOMOTO, A., LEE, Y.F. & WIMMER, E. (1976). The 5' end of poliovirus RNA is not capped with m7G (5') pppNp. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 375.
- OLITSKY, P.K., TRAUM, J., SCHOENING, H.W. (1928). U.S. Dept. Agr. Tech. Bul., 76.

- OULDRIDGE, E.J., PARRY, N.R., BARNETT, P.V., BOLWELL, C., ROWLANDS, D.J., BROWN, F., BITTLE, J.L., HOUGHTEN, R.A. & LERNER, R.A. (1986). Comparison of the structures of the major antigenic sites of foot and mouth disease viruses of two different serotypes. In Vaccines '86: New approaches to immunization, pp 45-50. Ed by F. Brown, R.M. Chanock & R.A. Lerner, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory.**
- PALESE, P. (1984). "Concepts in viral pathogenesis". Notkins, A.L. & Oldstone, M.B.A. (eds.) p.144. Spring-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo.**
- PALMENBERG, A.C. (1990). Proteolytic processing of picomaviral polyprotein. Annu. Rev. Microbiol. 44, 603-623.**
- PARRY, N.R., OULDRIDGE, E.J., BARNETT, P.V., ROWLANDS, D.J. & BROWN, F. (1989a). Neutralizing epitopes of type O foot-and-mouth disease virus. II. Mapping three conformational sites with synthetic peptide reagents. J.Gen.Virol. 70, 1493-1503.**
- PARRY, N.R., OULDRIDGE, E.J., BARNETT, P.V., CLARKE, B.E., FRANCIS, M.J., FOX, J.D., ROWLANDS & BROWN, F (1989b). Serological prospects for peptide vaccines against foot and mouth disease virus. J.G.Virol 70, 2919-2930.**
- PARRY, N.R., OULDRIDGE, E.J., BARNETT, P.V., ROWLANDS, BROWN, F, BITTLE J.L., HOUGHTEN, R.A. & LERNER, A (1985). Identification of neutralizing epitopes of foot and mouth disease virus. Vaccines 85, Cold Spring Harbord Lab., N.Y. 211-216**
- PARRY, N.R., FOX, G., ROWLANDS, D., BROWN, F., FRY, E., ACHARYA, R., LOGAN, D., STUART, D. (1990). Structural and serological evidence for a novel mechanism of antigenis variation in foot and mouth disease virus. Nature 347, 569-572.**
- PEREIRA, H.G. (1977). Subtyping of foot-and-mouth disease virus. In "Developments in Biological Standardization" (C. Mackowiak and R.H. regamey, eds.), vol. 35, pp. 167-174. Karger, Basel.**
- PEREIRA, H.G. (1981). Foot-and-mouth disease . In "Virus Diseases of Food Animals" (E.P.J. Gibbs, ed.), vol. 2, pp 333-363. Academic Press, New York.**
- PFAFF, E., MUSSGAY, M., BOHM, H.O., SHULTZ, G.E. & SCHALLER, H. (1982). Antibodies against a preselected peptide recognize and neutralize foot and mouth disease virus. EMBO J. 1, 869-874.**
- PFAFF, E., THIELL, H.J., BECK, E., STROHMAIER, K. & SCHALLER, H. (1988). Analysis of neutralizing epitopes of foot and mouth disease virus. J. Virol. 62, 2033-2040.**

- PICCONE, M.E., KAPLAN, G., GIAVEDONI, L., DOMINGO, E. & PALMA, E.L. (1988). VP1 of serotype C foot-and-mouth disease viruses: long-term conservation of sequences. *J. Virol.* 62, 1469-1473.
- PICCONE, M.E. (1989). Caracterización molecular de cepas del Virus de la Fiebre Aftosa actuantes en Argentina. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires.
- POLACINO, P., KAPLAN, G., & PALMA, E.D. (1985). Homologus interference by a foot and mouth disease virus strain attenuated for cattle. *Arch. Virol.* 86, 291-301.
- POLATNICK, J., ARLINGHAUS, R.B., GRAVES, J.H. & COWAN, K.M. (1967). Inhibition of cell-free foot and mouth disease virus ribonucleic acid synthesis by antibody. *Virology* 31, 609-615.
- POLATNICK, J. (1980). Isolation of a foot and mouth disease virus polyuridylic acid polymerase and its inhibitor by antibodies. *J. Virol.* 33, 774-779.
- PRINGLE, C.R. (1965). Evidence of genetic recombination in foot and mouth disease virus. *Virology* 25, 48-51.
- REHA-KRANTZ, L.J. & BESSMAN, M.J. (1981). Studies on the biochemical basis of mutation. VI. Selection and characterization of a new bacteriophage T4 mutator DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 145, 677-695.
- RIEDER, E., BUNCH, T., BROWN, F. & MASON, P.W. (1993). Genetically engineered foot and mouth disease viruses with poly(C) tracts of two nucleotides are virulent in mice. *J. Virol.* 67, 5139-5145.
- RIEDER, B., BAXT, B. & MASON, P.W. (1994). Animal derived antigenic variants of FMDV type A12 have low affinity for cells in culture. *Am. Soc. Virol.*, XIII annual meeting, Wisconsin, USA.
- RIVENSON, S. (1979). Las vacunas oleosas en medicina veterinaria. *Rev. Med. Vet.* 60, 1.
- ROBERTSON, B.H., GRUBMAN, M.J., WEDDELL, G.N., MOORE, D.M., WELSH, J.D., FISCHER, T., DOWBENKO, D., YANSURA, D., SMALL, B. & KLEID, D.G. (1985). Nucleotide and amino acid sequence coding for polypeptides of foot and mouth disease virus type A12. *J. Virol.* 54, 651-660.

- ROBERTSON, B.H., MORGAN, D.O., MOORE, D.M., GRUBMAN, M.J., CARD, J., FISCHER, T., WEDDELL, G., DOWBENKO, D. & YANSURA, D (1983). Identification of amino acid and nucleotide sequence of the foot and mouth disease virus RNA polymerase. *Virology* 126, 614-623.
- ROWLANDS, D.J., HARRIS, T.J.R. & BROWN, F. (1978). More precise location of the polycytidylic acid tract in foot and mouth disease virus RNA. *J. Virol.* 26, 335-343.
- ROWLANDS, D.J., CLARKE, B.E., CARROLL, A.R., BROWN, F., NICHOLSON, B.H., BITTLE, J.L., HOUGHTEN, R.A. & LERNER, R.A. (1983). Chemical basis of antigenic variation in foot-and-mouth disease virus. *Nature* 306, 694-697.
- RUECKERT, R.R. & WIMMER, E. (1984). Systematic nomenclature of picornavirus proteins. *J. Virol.* 50, 957-959.
- SAIZ, J.C., GONZALEZ, M.J., BORCA, M.V., SOBRINO, F. & MOORE, D.M. (1991). Identification of neutralizing antigenic sites on VP1 and VP2 of type A5 foot-and-mouth disease virus, defined by neutralization-resistant variants. *J. Virol.* 65, 2518-2524.
- SAIZ, J.C., SOBRINO, F. & DOPAZO, J. (1993). Molecular epidemiology of foot and mouth disease virus type O. *J. Gen. Virol.* 74, 2281-2285.
- SALAZHOV, E.L. et al. (1970). Texto en ruso, *Zh. Mikrobiol. Epid. Immunobiol.* 6, 87-90.
- SANGAR, D.V., ROWLANDS, D.J., HARRIS, T.J.R. & BROWN, F. (1977). A Protein covalently linked to foot and mouth disease virus RNA. *Nature (London)* 268, 648-650.
- SANGAR, D.V. (1979). The replication of picornaviruses. *J. Gen. Virol.* 45, 1-13.
- SANGAR, D.V., BLACK, D.M., ROWLANDS, D.J., HARRIS, T.R.J. & BROWN, F. (1980). Location of initiation site for protein synthesis on foot and mouth disease virus RNA by in vitro translation of defined fragments of RNA. *J. Virol.* 33, 59-68.
- SCOTT, F.W., COTTRAL, G.E. & GAILIUNAS, P. (1966). Persistence of FMD virus in external lesions and saliva of experimentally infected cattle. *American Journal of Veterinary Research* 27, 1531-1536.
- SHAHAN, M.S. (1962). The virus of foot and mouth disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 101, 444-454.

- SOBRINO, F., DAVILA, M., ORTIN J. & DOMINGO, E. (1983). Multiple genetic variants arise in the course of replication of foot and mouth disease virus in cell cultures. *Virology* 128, 310-318.
- SOBRINO, F., PALMA, E.L., BECK, E., DAVILA, M., DE LA TORRE, J.C., NEGRO, P. VILLANUEVA, N., ORTIN, J. & DOMINGO, E. (1986). Fixation of mutation in the viral genome during an outbreak of foot and mouth disease: Heterogeneity and rate variations. *Gene* 50, 149-150.
- SOBRINO, F., MARTINEZ, M.A., CARRILLO, C. & BECK, E. (1989). Antigenic variation of foot and muth disease virus of serotype C during propagation in the field is mainly restricted to only one structural protein (VP1). *Virus. Res* 14, 273-280.
- STEINHAUER, D.A. & HOLLAND, J.J. (1986). Direct method for quantitation of extreme polymeras error frequencies at selected single base sites in viral RNA. *J. Virol.* 57, 219-228.
- STOCKER, M. & MC PHERSON, I. (1964). Syrian hamster fibroblasts cell line and its derivaties. *Nature* 203, 1355-1357.
- STROHMAIER, K., FRANCE, R., ADAM, K.H. (1982). Location and characterization of the antigenic portion of the FMDV immunizing protein. *J.Gen.Virol.* 59, 295-306.
- SUTMOLLER, P. & GAGGERO, A. (1965). Foot and mouth disease carriers. *Vet. Rec.* 77, 968-969
- SUTMOLLER, P. & MC VICAR, J.W. (1976). Pathogenesis of foot and mouth disease: the lung as an additional portal of entry of the virus. *J. Hyg. (Camb.)* 77 (2), 235-243.
- SUTMOLLER, P., MC VICAR, J.W. & COTTRAL, G.E. (1968). The epizootical importance of foot and mouth disease carriers. Experimentally produced foot and mouth disease carriers in susceptible and immune cattle. *Arch. Gesampte Virus Frosch* 23, 227-235.
- THOMAS, A.A.M., WOORTMEIJER, R.J., PUIJK, W. & BARTELING, S.J. (1988). Antigenic sites on foot-and-mouth disease virus type A10. *J. Virol.* 62, 2782-2789.
- TOWBIN, H., STAEHELING, T. & GORDON, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets, procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354.

- TRAUB, E. & MOHLMANN, H. (1943). Typebestimmung bei Maul und Klauenseuche mit Hilfe der Komplementbindungprobe. I. Mitteilung. Versuche mit gereinigten und antigenen von Meerschweinchen. Zbl. Bakt. 150 (6), 289-300.
- VAKHARIA, V., DEVANEY, M., MOORE, D., DUNN, J. & GRUBMAN, M. (1987). Proteolytic processing of foot and mouth disease virus polyproteins expressed in a cell-free system from cloned derived transcripts. J. Virol. 61, 3199-3207.
- VALEE, H. & CARRE, H. (1922). Sur la pluralité du virus aphteux. Compt. Rend. hebdomad. Seanc. Acad. Sci. Paris 174, 1498.
- VAN BEKKUM, J.G., FRENKEL, H.S., FEDERIKS, H.H.J. & FRENKEL, S. (1959). Observations on the carrier state of cattle exposed to foot and mouth disease virus. Tijdschr. Diergeneesk 84, 1159-1164.
- VAN BEKKUM, J.G., FISH, R.C. & DALE, C.N. (1963). Immunogenic studies in Dutch cattle vaccinated with foot and mouth disease virus vaccines under field conditions. I. Neutralizing antibody response to O and A types. American Journal of Veterinary Research 24, 77-82.
- VASQUEZ, C., PALMA, E.L. & BARRANTES, J. (1972). Foot and mouth disease virus. 1. Capsid fine structure. J. Microsc. 14, 147-154.
- VASQUEZ, C., DENOYA, C.D., LA TORRE, J.L. & PALMA, E.L. (1979). Structure of foot and mouth disease virus capsid. Virology 97, 195-200.
- WALDMANN, O. & TRAUTWEIN, K. (1926). Berl. Munch. tierärztliche Wochenschr 42, 569-570.
- WEDDELL, G.N., YAMSURA, D.G., DOWBENKO, D.J., HOATLIN, M.E., GRUBMAN, M.J., MOORE, D.M., KLEID, D.G. (1985). Sequence variation in the gene of the immunogenic capsid protein VP1 of foot and mouth disease virus type A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 2618-2622.
- WILD, T., BURROUGHS, J. & BROWN, F. (1969). Surface structure of foot and mouth disease virus. J. Gen. Virol. 4, 313-320.
- XIE, Q. C., MC CAHON, D., CROWTER, J.R., BELSHAM, G.J. & MC CULLOUGH, 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.

-ZIMMERN D. & KAESBERG P. (1978). 3' terminal nucleotide sequence of encephalomyocarditis virus RNA determined by reverse transcriptase and chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4257-4261.