

Tesis de Posgrado

Variabilidad genética y antigénica del virus de la fiebre aftosa, serotipo O, entre aislamientos recuperados durante la replicación del virus en animales persistentemente infectados, y entre cepas de campo

Malirat, Viviana

1996

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:

Malirat, Viviana. (1996). Variabilidad genética y antigénica del virus de la fiebre aftosa, serotipo O, entre aislamientos recuperados durante la replicación del virus en animales persistentemente infectados, y entre cepas de campo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2819_Malirat.pdf
Malirat, Viviana. "Variabilidad genética y antigénica del virus de la fiebre aftosa, serotipo O, entre aislamientos recuperados durante la replicación del virus en animales persistentemente infectados, y entre cepas de campo". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1996.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2819_Malirat.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Tesis para optar al título de Doctor en Biología de la
Universidad de Buenos Aires

Título:

"VARIABILIDAD GENÉTICA Y ANTIGÉNICA DEL VIRUS DE LA FIEBRE
AFTOSA, SEROTIPO O, ENTRE AISLAMIENTOS RECUPERADOS DURANTE
LA REPLICACIÓN DEL VIRUS EN ANIMALES PERSISTENTEMENTE
INFECTADOS Y ENTRE CEPAS DE CAMPO"

Tesista:

Viviana Malirat

Directora de Tesis:

Dra. Ingrid Evelyn Bergmann

Co-director:

Dr. Moisés Burachik

Lugar de trabajo:

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, OPS/OMS

Río de Janeiro, Brasil.

Cátedra de Biotecnología - Departamento de Ciencias
Biológicas Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA.

1996

0101
52

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ingrid E. Bergmann, por la dirección de este trabajo, por la formación y los conocimientos que de ella he recibido, y por la amistad y el apoyo brindados incondicionalmente.

Al Dr. Moisés Burachik por la colaboración prestada en todo momento.

A los Drs. Raúl Casas Olascoaga y Vicente Astudillo por haber permitido la realización del presente trabajo en el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa.

Al Dr. Ewald Beck, de la Universidad de Giessen, Alemania, por haber cedido los oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

A la Administración del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, en particular al Dr. Francisco Salazar, por haber facilitado los requerimientos solicitados para la ejecución de esta tesis.

A mis compañeros del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, con quienes comparto mis días de trabajo.

RESUMEN

VARIABILIDAD GENÉTICA Y ANTIGÉNICA DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA, SEROTIPO O, ENTRE AISLAMIENTOS RECUPERADOS DURANTE LA REPLICACIÓN DEL VIRUS EN ANIMALES PERSISTENTEMENTE INFECTADOS, Y ENTRE CEPAS DE CAMPO

La variación genética y antigénica en el virus de la fiebre aftosa, O₁ Campos Brasil 1/58 (O₁ C/58) se ha analizado en aislamientos consecutivos, recuperados durante un período de uno o dos años, a partir de cuatro bovinos con infección persistente, establecida en forma experimental. La comparación de los mapas bidimensionales de fragmentos resistentes a RNasa T₁, y de la secuencia de nucleótidos de la región que codifica para la proteína inmunogénica VP₁, revelaron un aumento irregular de las fijaciones de mutaciones a medida que la infección avanzaba. El grado de variación con respecto a la cepa O₁ C/58, usada originalmente para establecer la infección persistente, alcanzó valores máximos de 2,4% para el genoma total y de 1,4% para la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína VP₁. La mayoría de los cambios no eran conservados entre aislamientos consecutivos. Estos resultados, junto con los valores sustanciales de velocidad de variación genómica observados entre algunos pares de aislamientos recuperados con intervalos de tiempo muy cortos, indicaron la

coexistencia de poblaciones heterogéneas, que predominaban unas sobre las otras en períodos irregulares, y que evolucionaban independientemente entre sí. No se observaron padrones de variación relacionados entre los cuatro animales. También fue evaluada la diversificación genética de cepas representativas de brotes de campo, serotipo O, ocurridos en regiones endémicas del sudeste de Brasil y del centro-este de Argentina entre los años 1958 y 1983. En base a los análisis de mapas bidimensionales de fragmentos resistentes a RNasa T₁, los aislamientos mostraron diferencias respecto de la cepa O₁ C/58, con valores que fluctuaban entre 0,7% y 4,0% de variación, y los valores registrados en base a la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína VP₁, fluctuaron desde 1,0% hasta 17,2%. La variación genómica registrada era independiente del tiempo transcurrido entre los aislamientos, y los cambios no eran acumulativos. Estos resultados sugieren que las variantes no emergen sucesivamente en el campo, y que probablemente representan padrones independientes de evolución, donde podrían intervenir las infecciones persistentes.

Palabras clave: Infecciones Persistentes, Mapas T₁ bidimensionales (*fingerprinting*), Secuenciamiento de la proteína VP₁, Variabilidad genética y antigénica, Virus de la Fiebre Aftosa

ABSTRACT

GENETIC AND ANTIGENIC VARIABILITY OF FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS, SEROTYPE O, AMONG ISOLATES RECOVERED DURING VIRAL REPLICATION IN PERSISTENTLY INFECTED CATTLE, AND AMONG FIELD ISOLATES

Genetic and antigenic variation in foot-and-mouth disease virus O₁ Campos Brasil 1/58 (O₁ C/58) has been analyzed in consecutive isolates recovered over a one- or two-year period from four cattle with experimental persistent infections. Comparisons of RNase T₁ two-dimensional maps and nucleotide sequences of the VP₁-coding region revealed an oscillatory increase in the fixation of mutations as the infection progressed. The degree of variation with respect to the strain O₁ C/58 used originally to establish the persistent infection, reached values of up to 2,4% for the overall genome, and 1,4% for the nucleotide sequence of the VP₁-coding region. Most changes were not conserved in consecutive isolates. These results, together with the substantial rates of genomic variation observed between some pairs of strains recovered at close time periods, suggested the coexistence of heterogeneous populations in which variants predominate at irregular time intervals and evolve independently from each other. Furthermore, non-related patterns of variation were observed in

the four animals. Genetic diversification of representative strains from major serotype O outbreaks in endemic disease regions of southeastern Brazil and central-eastern Argentina between 1958 and 1983, was evaluated. On the basis of oligonucleotide fingerprinting, isolates showed variations, with respect to the early strain O₁ C/58, ranging between 0.7% and 4.0%, and values between 1.0% and 17.2% on the basis of nucleotide sequencing of part of the VP1-coding region. The extent of differences among the genomes was independent of the time elapsed between viral isolations. Moreover, changes did not accumulate in subsequent samples. These results suggested that variants did not emerge successively in the field, and probably represent independent patterns of evolution, where persistent infections might be involved.

Key words: Foot-and-mouth disease virus, Genetic and antigenic variability, Persistent infections, RNA fingerprinting, VP₁ Sequencing.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

A	adenosina o desoxiadenosina
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
ARN	ácido ribonucleico
BHK-21	células de riñón de cría de hamster
C	citidina o desoxicitidina
CAP	7-metil guanidina trifosfato
CF50%	fijación del complemento al 50% de hemólisis
Ci	curie; unidad radioactiva de medida que corresponde a $2,2 \times 10^{12}$ desintegraciones por minuto
cpm	cuentas por minuto
dNTP	desoxirribonucleósido trifosfato
DPI	días post-infección
EDTA	ácido etilendiamino tetracético
EITB	ensayo inmunoenzimático de electrotransferencia
EPP	expectativa porcentual de protección
FA	fiebre aftosa
FR	forma replicativa
G	guanosina o desoxiguanosina
IBRS-2	células de riñón de cerdo
IDGA	inmunodifusión en gel de agarosa
IR	intermediario replicativo
IRES	sitio interno de entrada al ribosoma
MEM	medio esencial mínimo de Eagle
n	nucleótido
oligo (dG)	ácido oligodeoxiguanidílico
oligo (U)	ácido oligouridílico
OP	esofágico-faríngeo
PBS	solución salina fosfatada
pi.	post-infección
poli(A)	ácido polirriboadenílico

poli(C)	ácido polirribocitidílico
poli(U)	ácido poliuridílico
RF	forma replicativa
RNasa	ribonucleasa
rpm	revoluciones por minuto
S	Svedberg, unidad de velocidad de sedimentación
SDS	sodio dodecil sulfato
SN	seroneutralización
T	desoxitimidina
TEMED	N,N,N', N'-tetrametilendiamina
TPB	triptose phosphate broth
Tris	tri-(hidroximetil) aminometano
U	uridina
ufp	unidad formadora de placa
V	voltios
VFA	virus de la fiebre aftosa
VIAA	antígeno asociado a la infección viral
VP	proteína viral

Las abreviaturas utilizadas han sido nuevamente aclaradas en el texto cuando se mencionan por primera vez.

INDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. LA FIEBRE AFTOSA.....	2
1.1. Distribución.....	2
1.2. Presentación de la enfermedad.....	3
1.3. Aspectos epidemiológicos.....	5
1.4. Diagnóstico.....	6
1.5. Control de la enfermedad.....	8
2. EL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA.....	11
2.1. Clasificación.....	11
2.2. Tipos inmunológicos.....	13
2.3. Estructura viral.....	14
2.3.1. Estructura de la cápside.....	15
2.3.2. Inmunogenicidad.....	18
2.3.3. Estructura genómica.....	20
2.4. Ciclo de replicación viral.....	23
2.4.1. Adsorción.....	23
2.4.2. Penetración y desnudamiento.....	24
2.4.3. Síntesis de ARN.....	25
2.4.4. Síntesis de proteínas virales.....	29
2.4.5. Empaquetamiento del ARN viral.....	35
3. VARIABILIDAD DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA.....	37
3.1. Variabilidad genómica.....	38
3.2. Variabilidad antigénica.....	40

3.3. Generación de variantes en distintos sistemas.	41
3.4. Mecanismos de variación.....	42
4. PERSISTENCIA DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA.....	46
4.1. Establecimiento y detección del estado persistente.....	46
4.2. Características fenotípicas, genéticas y antigénicas de los virus persistentes.....	49
4.3. Infección persistente en otros huéspedes.....	52
4.4. Establecimiento de infecciones persistentes en cultivos celulares.....	54
4.5. Mecanismo de persistencia <i>in vivo</i>	56
4.6. Transmisión.....	57
5. OBJETIVO DEL TRABAJO.....	59
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	60
1. MODELO EXPERIMENTAL EN BOVINOS.....	61
2. CÉLULAS.....	62
3. VIRUS.....	62
4. CARACTERIZACIÓN SEROLÓGICA MEDIANTE FIJACIÓN DEL COMPLEMENTO AL 50% DE HEMÓLISIS.....	64
5. MAPAS BIDIMENSIONALES DE FRAGMENTOS DE ARN RESISTENTES A RNasa T ₁ (<i>FINGERPRINTS</i>).....	65
5.1. Infección de monocapas, marcación con ³² P, extracción, purificación y digestión con	

RNasa T ₁ del ARN viral.....	65
5.2. Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida, de los fragmentos de ARN resistentes a RNasa T ₁	67
6. SECUENCIAMIENTO DE NUCLEÓTIDOS DE LA REGIÓN QUE CODIFICA PARA LA PROTEÍNA INMUNOGÉNICA VP ₁	69
6.1. Infección y purificación del ARN viral.....	69
6.2. Secuenciamiento del ADNc.....	71
7. ENSAYO DE NEUTRALIZACIÓN EN MICROPLACA.....	72
III. RESULTADOS.....	74
1. VARIACIÓN GENÉTICA Y ANTIGÉNICA DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA, SEROTIPO O, DURANTE SU REPLICACIÓN EN ANIMALES PERSISTENTEMENTE INFECTADOS.....	75
1.1. Modelo y diseño experimental.....	75
1.2. Variación genómica del VFA durante su replicación en bovinos persistentemente infectados.....	78
1.3. Alteraciones genómicas en la región que codifica para la proteína inmunogénica VP ₁	105
2. COMPARACIÓN DE CEPAS DEL VFA, SEROTIPO O, REPRESENTATIVAS DE BROTES RELEVANTES OCURRIDOS EN BRASIL Y ARGENTINA ENTRE 1958 Y 1983.....	114
2.1. Caracterización serológica de las cepas	

de campo aisladas entre 1958 y 1983.....	115
2.2. Variaciones genómicas entre las cepas correspondientes a aislamientos de campo analizadas en base a sus mapas bidimensionales.	117
2.3. Comparación de las secuencias de nucleótidos y las deducidas de aminoácidos de una porción del gen que codifica para la proteína VP ₁	122
3. NEUTRALIZACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS DE CAMPO Y DE LOS RECUPERADOS DE ANIMALES PERSISTENTEMENTE INFECTADOS CON UN BANCO DE SUEROS DE ANIMALES VACUNADOS Y REVACUNADOS CON LA CEPA PROTOTIPO O ₁ C/58.....	129
IV. DISCUSIÓN.....	131
BIBLIOGRAFÍA.....	140
ANEXO.....	172

INTRODUCCIÓN

1. LA FIEBRE AFTOSA

La fiebre aftosa (FA) es una enfermedad viral, altamente contagiosa, que ocasiona grandes pérdidas económicas a la producción pecuaria. Afecta a animales biungulados, tanto domésticos como salvajes (rumiantes y no rumiantes), principalmente bovinos, ovinos, porcinos, caprinos, llamas, búfalos y venados (revisión en Bachrach, 1977; Sangar, 1979; Pereira, 1981). En total conforman más de 70 especies dentro de 20 familias susceptibles a la infección natural o experimental (Callis y cols., 1968).

1.1. Distribución

El primer registro de esta enfermedad data de un brote ocurrido en el norte de Italia en el siglo XVI (Frasicatorri, 1545; Bulloch, 1927). En la actualidad es endémica en la mayoría de los países de Asia y África (OIE, 1995). En el continente europeo, declarado libre de la enfermedad desde 1992, se han registrado brotes esporádicos en Italia en 1993, y en Grecia en 1994 (OIE, 1994 y 1995). En el continente americano, se encuentran libres de la enfermedad los países de Norteamérica, Centroamérica e Islas del Caribe, Guyana, la Guayana francesa, Surinam, Chile, así como la Patagonia

Argentina (al sur del paralelo 42°) y la región norte del Chocó en Colombia (PANAFTOSA, 1995). Los planes de erradicación vigentes en América del Sur han conseguido grandes logros en los últimos años. Uruguay no registra focos desde 1990 y en julio de 1995 ha cumplido un año desde la suspensión de la vacunación. Asimismo, se registra ausencia clínica de la enfermedad en todo el territorio de la República Argentina desde abril de 1994 y en Paraguay desde septiembre de ese mismo año (PANAFTOSA, 1995).

1.2. Presentación de la enfermedad

La principal vía de infección es el tracto respiratorio, por inhalación de aerosoles conteniendo el virus (Hyslop, 1970). La faringe es la vía inicial de replicación, subsecuentemente el virus se distribuye en el organismo, encontrándose en sangre, leche, vagina, recto, etc. (Burrows y cols., 1971). El período de viremia en ganado oscila entre tres y cinco días (Cottral y Bachrach, 1968). La sintomatología de la enfermedad se caracteriza por un período febril inicial (40-41°C), apatía, anorexia, escalofríos y disminución de la producción láctea. Posteriormente se produce el establecimiento de lesiones vesiculares las cuales, de acuerdo a su ubicación en mucosas bucales y de la nariz, espacios interdigitales y

epitelio de los pezones, producen salivación y dificultad al caminar, interfiriendo en la alimentación y pudiendo conducir a la postración del animal. Todo esto resulta en un enflaquecimiento y en una reducción de la producción de leche. Asimismo, las hembras infectadas en estado de gestación pueden abortar (Shahan, 1962). La tasa de mortalidad es considerable en terneros (Bacharach, 1968; Pereira, 1981), pero raramente la infección con el virus de la fiebre aftosa (VFA) causa muerte de animales adultos. La recuperación lleva por lo general de dos a tres semanas. Ovinos y caprinos presentan una sintomatología más benigna, con predominancia de lesiones en las patas (Shahan, 1962).

Los títulos de infectividad alcanzan niveles altos a tiempos tempranos de la infección, y declinan en forma gradual simultáneamente con la aparición de anticuerpos neutralizantes. Sin embargo, el virus puede persistir por períodos prolongados en animales recuperados, constituyendo un potencial mecanismo de mantenimiento y diseminación viral (Van Bekkum, y cols., 1959; Burrows, 1966).

La transmisión puede ocurrir principalmente por contacto directo con el animal infectado durante el período febril o de viremia, a través de secreciones (saliva, lágrimas, leche,

semen) y excreciones (heces, orina, sudor), o por contacto indirecto con materiales contaminados. La enfermedad también puede transmitirse por la carne refrigerada y por la leche y sus derivados (Bachrach, 1968). Asimismo, el virus está presente en el aire exhalado por el animal infectado y en el ambiente aéreo que rodea al ganado infectado hasta dos semanas después de terminada la enfermedad (Hyslop, 1970).

1.3. Aspectos epidemiológicos

El comportamiento epidemiológico del virus depende de la interrelación de un gran número de factores que, aunque se encuentran estrechamente ligados entre sí, pueden separarse en aquellos que dependen del virus, del huésped, o del medio ambiente:

- a) dependientes del virus: se pueden resumir en la alta variabilidad antigénica, la virulencia restringida a ciertos huéspedes, la capacidad de diseminación, y la resistencia a la inactivación fuera del animal (revisión en Hyslop, 1970);
- b) dependientes del huésped: el factor más importante es el estado inmunitario del animal; otros factores son la raza (Beaton, 1958; Saito y Vittoz, 1958), la densidad de población

de los rebaños (Hugh-Jones, 1972), la coexistencia de diferentes especies (Sellers y Parker, 1969), la edad de los animales y su estado nutricional (Menges, 1948; Saito y Vittoz, 1958);

c) dependientes del medio ambiente: factores geográficos (barreras físicas, como mares, ríos, cadenas montañosas, etc.), factores climáticos, especialmente en relación a la diseminación por aerosoles (Fogedby y cols., 1960; Davies y cols., 1968), factores biológicos como la presencia de animales que actúen como vectores, y factores socio-económicos como el desarrollo económico de la región, los sistemas de producción, los flujos de comercio y el movimiento de animales (Obiaga y cols., 1979).

1.4. Diagnóstico

El diagnóstico de la FA se basa en observaciones clínicas, epidemiológicas y de laboratorio. El mismo debe ser rápido y confiable, a fin de implementar medidas de control efectivas. El diagnóstico clínico se basa en la observación de presencia de lesiones vesiculares en las mucosas de la boca y pezuñas (Henderson, 1960). La confirmación de este diagnóstico se realiza mediante el análisis de laboratorio, el cual implica la

detección del virus o de sus antígenos, o bien la detección de anticuerpos específicos contra antígenos virales. La muestra empleada para la detección viral se obtiene preferentemente de lesiones vesiculares intactas. Si esto no es posible, pueden emplearse muestras de saliva o de fluido esofágico-faríngeo (OP) (Burrows, 1966). Este último es principalmente usado en la detección de animales con infección persistente. Para la detección de anticuerpos específicos son empleadas muestras de suero.

Las técnicas utilizadas para la detección y tipificación viral son el aislamiento en cultivo de células de riñón de cría de hamster (BHK-21), y de riñón de cerdo (IBRS-2), la tipificación por fijación del complemento al 50% (Alonso, 1986), y recientemente la tipificación por el test de ELISA (Alonso y cols., 1992). Cuando se precisa una caracterización más fina del agente viral, pueden emplearse técnicas moleculares como el *fingerprinting* y el secuenciamiento (Bergmann y Malirat, 1993).

Para la detección de anticuerpos específicos en áreas libres no sometidas a vacunación, se emplean las técnicas de seroneutralización (Ferreira, 1976), seroprotección (Cunha, 1957), y ELISA (Hamblin y cols., 1986), que detectan

anticuerpos estructurales. En áreas endémicas bajo vacunación sistemática, es necesario el empleo de técnicas que detecten anticuerpos no estructurales como la inmunodifusión en gel de agarosa (IDGA), usando como sonda serológica un complejo antigénico de naturaleza bioquímica no completamente definida, denominado VIAA (antígeno asociado a la infección viral) (Mc Vicar y Sutmöller, 1970), y más recientemente el ensayo inmunoenzimático de electrotransferencia (EITB), que utiliza un conjunto de cinco proteínas no estructurales recombinantes, altamente purificadas (Neitzert y cols., 1991; Bergmann y cols., 1993).

1.5. Control de la enfermedad

En las áreas libres de la enfermedad las medidas de control se dirigen principalmente a la prevención, mediante la imposición de restricciones al ingreso de animales o sus productos derivados, provenientes de las áreas afectadas. En las zonas endémicas las medidas de control se basan en la vacunación sistemática y en la implementación de un sistema de vigilancia epidemiológica eficiente, especialmente orientado a la caracterización de los ecosistemas, al control del movimiento de animales y a la atención de focos.

Vacunación: desde las primeras vacunas desarrolladas contra la FA (Waldmann y cols., 1937), obtenidas a partir de virus procedente de las vesículas linguales de bovinos previamente inoculados, se han logrado avances significativos, en primer lugar mediante el cultivo del virus en gran escala sobre lonjas de epitelio vivo procedente de bovinos recién sacrificados (Frenkel, 1950), hasta las vacunas utilizadas en la actualidad, en las cuales el antígeno se produce en células BHK-21 (Mowat y Chapman, 1962), multiplicadas en cultivos en suspensión (Capstick y cols., 1962). El antígeno es inactivado por medio de etileneimina binaria. El reemplazo del clásico adyuvante de hidróxido de aluminio-saponina por el de tipo oleoso confirió una inmunidad más efectiva y de mayor duración (Olascoaga y cols., 1991). La frecuencia de la vacunación varía desde una hasta tres aplicaciones anuales en los diferentes países. Es importante el control de calidad efectuado a los lotes para su aprobación, que incluyen pruebas de masa antigénica, identidad del tipo viral, potencia, e inocuidad (Olascoaga y cols., 1991).

En la actualidad, se están estudiando estrategias para producir vacunas experimentales que no requieren de producción viral en gran escala. Estas estrategias han incluido péptidos sintéticos (Bittle y cols., 1982; Pfaff y cols., 1982; DiMarchi

y cols., 1986; Francis y cols., 1991), y tecnología de ADN recombinante (Kleid y cols., 1981; Clarke y cols., 1987; Bergmann y cols 1988a; Kit y cols., 1991; Kitson y cols., 1991, Usha y cols., 1993). Los resultados obtenidos favorecen el desarrollo de una nueva generación de vacunas. Dentro sus ventajas, se mencionan: a) evitan el problema del uso de virus difíciles de cultivar; b) no se trabaja con agentes patógenos, por lo cual, no se requiere de laboratorios de alta contención biológica; c) no hay riesgos de inactivación incompleta. La desventaja es la menor capacidad inmunogénica demostrada hasta el presente en relación a la obtenida con vacunas producidas con el virión completo.

Sistema de vigilancia epidemiológica: en el campo de la atención veterinaria, el sistema de vigilancia se define como un conjunto de componentes (personal, equipos, recursos y procedimientos) que tienen por finalidad producir, en forma adecuada y oportuna, información para los usuarios de los sistemas de atención veterinaria. El trabajo de vigilancia epidemiológica precisa de una base de datos que incluya el perfil de la ganadería, las actividades de atención veterinaria y la estructura social del área en cuestión (Astudillo, 1991).

2. EL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA

2.1. Clasificación

El VFA es el único representante del género aftovirus, dentro de la familia Picornaviridae. Una nueva organización taxonómica de esta familia, incluye los cinco géneros siguientes: 1) aftovirus (VFA); 2) cardiovirus (virus de la encefalomiocarditis, Mengovirus, virus de Theiler, virus de Maus Elberfeld, virus Columbia, etc); 3) hepatovirus (virus de la hepatitis A); 4) reterovirus, que agrupa a los géneros anteriormente denominados enterovirus (Poliovirus, virus de Coxackie A y B, Ecovirus y Enterovirus), y rinovirus (virus del resfrío común); y 5) un nuevo género con un único representante: ecovirus 22 (Rodrigo y Dopazo, 1995). Generalmente, los miembros de estos cinco géneros no pueden distinguirse entre sí mediante el empleo del microscopio electrónico (Rueckert, 1990). Sin embargo, pueden diferenciarse serológicamente en base a la capacidad que poseen los antisueros específicos de neutralizar solamente al virus homólogo (Melnick, 1983). Algunas de las propiedades que posee el género aftovirus se describen en la tabla 1.

Tabla 1. Características generales de los Aftovirus

Aftovirus	
Miembros (Serotipos)	Virus de la Fiebre Aftosa (7)
Rango de Huéspedes	Amplio
Propiedades del virión	
Diámetro (nm)	23-25
Estabilidad al pH	Lábiles a pH 6,5
Densidad en ClCs (g/cm ³)	1.43-1.45
Coficiente de Sedimentación*	142-145S
% ARN	31,5

* En gradientes de Sacarosa (Fuerza iónica 0,04-0,15, pH 7.3-7.6).

2.2. Tipos inmunológicos

Se han identificado siete tipos con propiedades antigénicas e inmunológicas diferentes (Brooksby, 1982) (Tabla 2). Estas diferencias son de tal magnitud que animales convalescientes de la enfermedad causada por un tipo, o vacunados con virus de un tipo, no están protegidos contra otro. Dentro de cada tipo han sido reconocidos grupos de virus inmunológicamente relacionados, a los que se llama subtipos, los cuales aún perteneciendo al mismo tipo no son capaces de conferir una sólida inmunidad frente a otros subtipos del mismo tipo (Pereira, 1977, y 1981; Bacharach, 1968).

Tabla 2. Tipos inmunológicos del virus de la fiebre aftosa

Tipo	Descubridor y año	Continente afectado
O	Vallé y Carré (1922)	Europa*, Asia, África y Sudamérica
A	Vallé y Carré (1922)	Europa*, Asia, África y Sudamérica
C	Waldmann Trautmein (1926)	Europa*, Asia, África y Sudamérica
SAT-1	Galloway y Brooksby (1948)	África y Asia
SAT-2	Galloway y Brooksby (1948)	África
SAT-3	Galloway y Brooksby (1948)	África
ASIA	Brooksby y Rogers (1957)	Asia

* Actualmente erradicada

2.3. Estructura viral

En la partícula viral, de $8,4 \times 10^6$ daltons, el ARN se encuentra rodeado por una cubierta proteica icosaédrica, de aproximadamente 22 nm de diámetro (Vazquez y cols., 1978), constituida por 60 copias de cada una de las cuatro proteínas estructurales: VP_4 , VP_2 , VP_3 , y VP_1 . De acuerdo a la nueva nomenclatura, las mismas se denominan: 1A, 1B, 1C y 1D, respectivamente (Rueckert y Wimmer, 1984). Dentro del virión se localizan, además, dos proteínas minoritarias (de una a dos copias): VP_0 , precursora de VP_2 y VP_4 , (Vande Woude y cols., 1972; Bacharach, 1977; Beck y cols., 1983) y 3D, polimerasa viral (Newman y cols., 1994), la cual se ha sugerido que estaría relacionada con la ribonucleasa localizada internamente en los viriones del VFA, descrita por Denoya y cols., en 1978.

El virión nativo tiene un coeficiente de sedimentación de 140S. Cuando el pH es menor que 6,0-6,5, o cuando se aumenta la temperatura por encima de 56°C , el virión se disocia en las partículas 12S, las cuales están compuestas por cinco copias de cada una de las proteínas VP_1 , VP_2 y VP_3 (Burroughs y cols., 1971; Vazquez y cols., 1978).

2.3.1. Estructura de la cápside

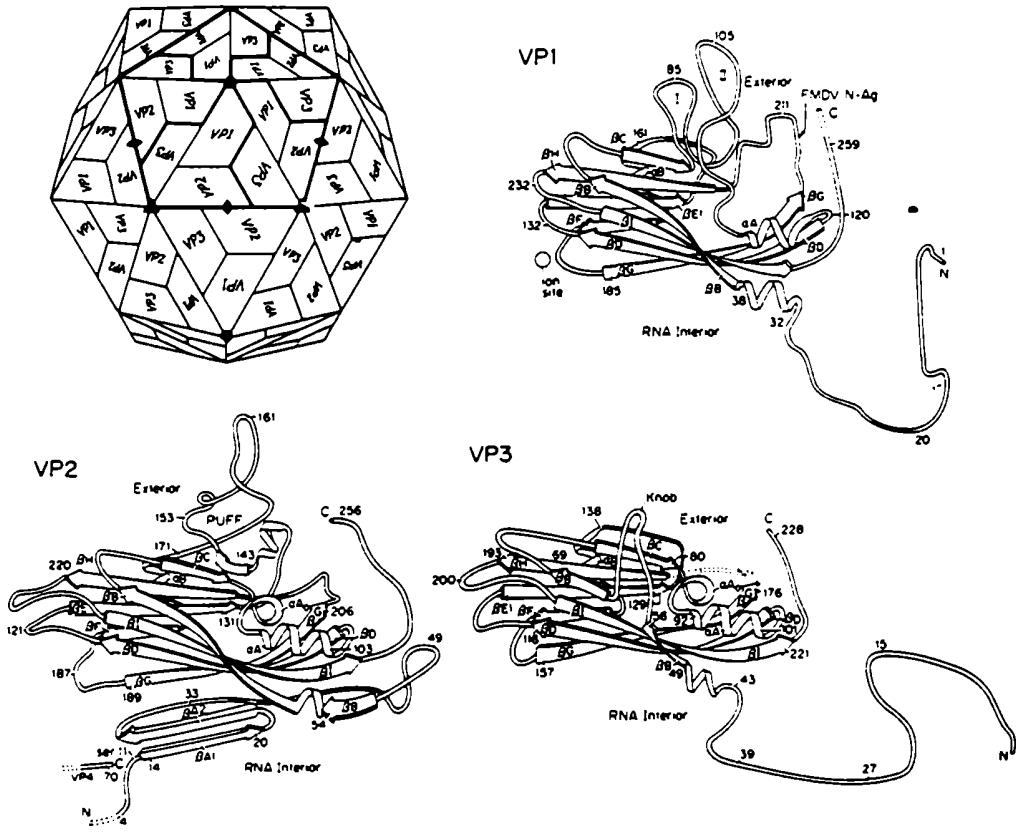
La estructura tridimensional del VFA tipo O ha sido determinada por difracción de rayos-X con una resolución de 2,9 Å (Acharya y cols., 1989). En líneas generales, la misma muestra similitudes con las estructuras que presentan otros géneros de la familia Picornaviridae (Rossman y cols., 1985; Hogle y cols., 1985; Luo y cols., 1987).

La forma general del virión es la de una cubierta esférica que comienza a una distancia radial de 100 Å (a partir del centro de la partícula) y se extiende hasta un radio externo de 150 Å. La superficie externa es relativamente lisa y a diferencia de los otros picornavirus (Rossman y cols., 1985; Hogle y cols., 1985; Luo y cols., 1987), el VFA no posee "cañones" ni "agujeros" (Acharya y cols., 1989). Asimismo, debido a que las proteínas VP_{1,3} en este género son menores, la cápside es generalmente mas fina. La estructura de dichas proteínas es básicamente similar entre todos los miembros de la familia Picornaviridae (Fox y cols., 1987; Luo y cols., 1988). Cada una de ellas muestra una estructura básica (core) topológicamente semejante, compuesta por ocho segmentos antiparalelos con una estructura secundaria tipo lámina β y dos segmentos laterales del tipo hélice α (Figura 1). La VP₄, que

se encuentra confinada al interior de la cápside, es la más variable entre los miembros de la familia, y en el caso del VFA presenta una porción bien definida de hélice con tres vueltas.

Con respecto al sitio de unión a la célula, el modelo del "cañón", que se ha descrito para rinovirus (Rossman y cols., 1985), poliovirus (Hogle y cols., 1985) y mengovirus (Luo y cols., 1987), propone que el mismo se encuentra en una depresión, oculto del sistema inmune. El VFA no se ajusta a este modelo, y en este caso el sitio que interviene en la unión del virus a la célula forma parte de la porción más inmunogénica de la cápside (Baxt y Becker, 1990). Esta forma una protrusión desordenada (*loop G-H*) (Acharya y cols., 1989), que en el tipo 0 se encuentra entre los residuos 134-160 de la proteína VP₁, y que aparece expuesta en la superficie del virión (Fox y cols., 1989). El *loop G-H* incluye a las posiciones 145-147 compuestas por los aminoácidos Arg-Gly-Asp (RGD) (Fox y cols., 1989), los cuales se sugiere que están directamente involucrados en la unión al receptor celular (Baxt y Becker, 1990). Estos residuos son altamente conservados entre todos los tipos y subtipos analizados. Excepcionalmente en el caso del subtipo A₁₀61 esta secuencia está constituida por los aminoácidos Arg-Ser-Gly-Asp (Fox y cols., 1989).

Figura 1. Representación diagramática de la cápside icosaohédrica en Picornavirus (arriba, izquierda). El contorno remarcado de las unidades VP₁, VP₂ y VP₃, corresponde al protómero (VP₁-VP₃-VP₀), y el pentadecámero, al pentámero 14S observado en experimentos de ensamble. Cada proteína VP₁, VP₂ y VP₃, tiene la misma proporción cuneiforme, 8 cadenas β antiparalelas, pero difieren por las deleciones e inserciones, generalmente en el final de la cadena β. (*)



(*) Tomado de Luo y cols, 1988.

La estructura tridimensional del VFA de serotipo C ha mostrado una gran similitud en la conformación general del virión, con respecto a la del serotipo O. La disposición de las proteínas en la cápside, así como el plegamiento de las láminas β en las tres proteínas VP₁, VP₂ y VP₃ son indistinguibles de los observados para el serotipo O (Lea y cols., 1994).

2.3.2. Inmunogenicidad

Probablemente, el elemento más importante de la respuesta inmune del huésped contra los picornavirus sea la producción de anticuerpos neutralizantes, específicos contra las proteínas estructurales, lo que ocurre luego de la infección o de la inmunización con vacunas. Esto es también lo que se observa en el caso del VFA.

La proteína VP₁ contiene los principales determinantes antigénicos implicados en la neutralización. Es la única de las cuatro proteínas estructurales del virus para la cual se ha demostrado inducción de anticuerpos neutralizantes y protectores al ser administrada a animales en forma purificada (Laporte y cols., 1973; Bachrach y cols., 1975). Sin embargo, esta inducción alcanza niveles bajos si se los compara con los obtenidos con la partícula 140S entera, lo cual sugiere que la

estructura tridimensional juega un papel importante en la exposición de los determinantes antigénicos.

Dentro de la VP₁, formando parte del *loop G-H*, se ubica el sitio inmunogénico más importante, que se denomina sitio A (Acharya y cols., 1989; Fox y cols., 1989). Varias evidencias sugieren que la alta inmunodominancia del mismo puede deberse a su localización accesible y a su flexibilidad estructural (revisión en Brown, 1990). Se ha sugerido que el triplete RGD, localizado dentro de este sitio, está directamente involucrado en la unión con anticuerpos neutralizantes (Verdaguer y cols., 1995). En el serotipo C este sitio contiene varios (al menos 11) epitopes continuos, distinguibles, y parcialmente superpuestos (Mateu y cols., 1988, 1989 y 1990), y en el serotipo O algunos epitopes de este sitio parecen ser más complejos, involucrando inclusive otras regiones de la cápside (Parry y cols., 1989 y 1990).

Un segundo sitio inmunogénico ha sido localizado en el extremo carboxi-terminal de la VP₁ (Strohmaier y cols., 1982; Acharya y cols., 1989).

Se han identificado otros sitios antigénicos, de menor relevancia, y de naturaleza discontinua para los serotipos O

(Kitson y cols., 1990), A (Thomas y cols., 1988; Baxt y cols., 1989; Saiz y cols., 1991), y C (Mateu y cols., 1990). En todos los casos, estos sitios antigénicos se localizan en *loops* expuestos en las proteínas VP₁, VP₂, y VP₃.

2.3.3. Estructura genómica

El genoma del VFA consiste en un ARN monocatenario, de polaridad positiva, con coeficiente de sedimentación de 35S, y peso molecular de $2,7 \times 10^6$ Daltons, que corresponde a un tamaño de aproximadamente 8200 nucleótidos (n) (Carroll y cols., 1984; Forss y cols., 1984).

En su extremo 3' contiene una región de ácido poliadenílico, poli(A), cuyo tamaño varía entre 40 y 100 n (Chatterjee y cols., 1976; Fellner, 1979). El mismo está genéticamente determinado (Porter y cols., 1978), sin embargo se comprobó que puede ocurrir también una adición postranscripcional (Spector y Baltimore, 1974). Aunque el rol del poli(A) no está claramente establecido, los estudios para poliovirus sugieren que podría estar involucrado en la infectividad (Spector y Baltimore, 1974). Para el VFA serotipo C, ha sido demostrado que las fracciones de ARN que se unen a oligo(dT)-celulosa muestran una infectividad específica mayor

que aquellas que no se unen. Sin embargo, esto no se ha confirmado para los serotipos O y A (Baxt y cols., 1979).

Con respecto al extremo 5', y a diferencia de lo que ocurre en la mayor parte de los ARN celulares y virales, el ARN de los picornavirus no posee grupo CAP ($m^7G(5')pppG(5')-Np$) (Fernández-Muñoz y Darnell, 1976). En dicho extremo se encuentra unida covalentemente una proteína de bajo peso molecular (26 Kd), denominada VPg (Lee y cols., 1977; Hruby y Roberts, 1978; Golini y cols., 1978; Sangar y cols., 1977b). En el caso particular del VFA, y a diferencia de lo encontrado para otros géneros, el análisis de la secuencia genómica identificó tres genes repetidos que codifican para tres VPgs, de 23 ó 24 aminoácidos cada una, las cuales presentan una substancial homología entre ellas y con la VPg de poliovirus (King y cols., 1980). El posible papel de VPg en la síntesis de ARN será discutido más adelante.

Otra característica del VFA, compartida con los cardiovirus, es la presencia de 100 a 200 residuos de ácido citidílico [poli(C)] cercanos al extremo 5' (Harris y Brown, 1976; Black y cols., 1979). La longitud del poli(C) es variable, dependiendo de las cepas de virus analizadas (Black y cols., 1979; Costa Giomi y cols., 1984). La digestión del ARN

con RNasa H en presencia de ácido oligodeoxiguanidílico [oligo(dG)], degrada al poli(C) dando origen a dos fragmentos de ARN: uno corto (S) hacia el extremo 5', de aproximadamente 400 n de extensión, y que contiene a la VPg, y el otro largo (L) hacia el extremo 3', de aproximadamente 7600 n de longitud. El fragmento L no es infectivo, lo cual sugiere que el poli(C), el fragmento S, o ambos tienen roles en la infectividad con el VFA. La función precisa del poli(C) es desconocida. Harris y Brown, en 1977, han sugerido que aquellos virus que presentan un tracto de poli(C) corto son menos virulentos. Estudios posteriores, sin embargo, indican que no hay relación entre el tamaño del poli(C) y la virulencia (Costa Giommi y cols., 1984 y 1988; Parisi y cols., 1985).

El marco de lectura abierto del VFA, de ≈ 6900 n, comienza en el codón de iniciación 11^o ó 12^o (Cao y cols., 1995), aproximadamente a 1200 n del extremo 5', y termina aproximadamente a 100 n del extremo 3' (Beck y cols., 1983; Kühn y cols., 1990). Se desconoce la función de las secuencias no codificantes situadas en ambos extremos. Existe una alta conservación de las estructuras primaria y secundaria del extremo 5' del genoma entre diferentes cepas (Pilipenko y cols., 1989a y b). En esta región se localizan señales de importancia para la regulación de la iniciación de la

traducción (Belsham y Brangwyn, 1990; Kühn y cols., 1990). En el caso del extremo 3', ha sido sugerido para poliovirus que el mismo tiene un rol en la síntesis de la cadena negativa de ARN (Sarnow y cols., 1986).

2.4. Ciclo de replicación viral

El proceso de replicación viral tiene lugar en el citoplasma de la célula huésped (Arlinghaus y Polatnick, 1967), y ocurre a través de una serie de eventos comunes, en términos generales, a otras infecciones virales.

2.4.1. Adsorción

El primer evento de la infección de los picornavirus implica la unión del virus a receptores específicos localizados en la membrana plasmática de la célula (revisión en Racaniello, 1990). Esta etapa es de particular interés ya que representa un importante determinante de la susceptibilidad celular a la infección, cumpliendo un rol significativo en el tropismo y la patogenia del virus (Crowell y Landau, 1979).

En el caso del VFA, las células contienen distintos receptores para los serotipos O, A, C, y SAT, sin embargo es

posible que ocurran interacciones por lo menos con algún receptor común (Baxt y Bachrach, 1980; Sekiguchi y cols., 1982).

La unión a la célula se realiza por medio de un sitio en la cápside del virión, el cual, como fuera mencionado anteriormente, se localiza en la proteína VP₁ (Brown y cols., 1963; Wild y cols., 1969; Cavanagh y cols., 1978; Baxt y cols., 1984). Los residuos Arg-Gly-Asp (RGD), correspondientes a las posiciones 145 a 147 de dicha proteína, están directamente involucrados en la unión (Baxt y Becker, 1990). Estos residuos son conservados entre los siete serotipos. El VFA ha sido el primer virus para el cual se ha sugerido que su sitio de unión reconoce receptores de la familia de las integrinas (Geysen y cols., 1985), y existen evidencias de que los residuos RGD tienen una importancia particular en el reconocimiento de dicha familia de receptores (revisión en Ruoslahti y Pierschbacher, 1987). También se ha sugerido la intervención de la región de aminoácidos 203-213 de la VP₁ en la unión al receptor, (Fox y cols., 1989).

2.4.2 Penetración y desnudamiento

Luego de la adsorción de las partículas virales sobre la

membrana plasmática se produce la internalización de los viriones. Seguidamente tiene lugar el procesamiento de las cápsides virales, que conduce a la liberación del genoma hacia el citoplasma celular (desnudamiento).

A diferencia de lo que ocurre en reterovirus, en aftovirus y cardiovirus no se ha demostrado la presencia de ningún tipo de intermediario del proceso de internalización (Hall y Rueckert, 1971; Cavanagh y cols., 1978; Baxt y cols., 1984). La entrada del VFA se realiza aparentemente a través de un mecanismo endocítico, y seguidamente se produce el desnudamiento, mediante un proceso que ocurre en un solo paso y que resulta en la conversión de la partícula 140S a subunidades proteicas 12S y ARN en un proceso intracelular (Cavanagh y cols., 1978; Baxt y Bachrach, 1980; Baxt y Bachrach, 1982). El desnudamiento depende de pH bajo, y tiene lugar en los lisosomas. Agentes lisosomotrópicos son capaces de elevar el pH de los lisosomas previniendo el desnudamiento y bloqueando la infectividad viral (Baxt, 1987).

2.4.3. Síntesis de ARN

La similitud en la estructura genómica de los picornavirus, como así también la gran homología de la

secuencia primaria de algunos productos virales que participan en la replicación, sugieren que el proceso de replicación podría llevarse a cabo mediante mecanismos semejantes en todos los miembros de dicha familia. Los estudios sobre el proceso de replicación viral están más avanzados para poliovirus, por lo cual los mismos son en general la base para su extensión a otros géneros (Forss y cols., 1984).

Luego de la entrada a la célula, el ARN viral infectivo, de polaridad (+), dirige la síntesis de las proteínas virales, entre las cuales se encuentran las que serán utilizadas para su propia replicación. El proceso de replicación tiene lugar en el citoplasma celular (Franklin y Baltimore, 1962), e involucra la síntesis de un intermediario de ARN (-) complementario, cuya subsecuente transcripción dará origen a nuevas cadenas (+) susceptibles de ser traducidas, encapsidadas o utilizadas como templado de más moléculas de ARN. La síntesis del ARN de polaridad (+) se lleva a cabo a través de una estructura denominada intermediario replicativo (IR), que consiste en una cadena de ARN(-), con aproximadamente seis a ocho cadenas hijas, de polaridad (+) en proceso de síntesis (Baltimore y Girard, 1966). El IR es predominantemente simple cadena, con cortas regiones apareadas en la vecindad de la polimerasa (Baltimore, 1968; Richards, 1984). También se han observado

moléculas de ARN doble cadena denominadas formas replicativas (FR), cuya función se desconoce (Baltimore, 1968).

Los complejos de replicación, aislados de células infectadas con poliovirus, contienen ARN templado endógeno, proteínas virales tales como 3D, 2B, 2C y formas precursoras de VPg, y tal vez polipéptidos adicionales y factores esenciales para la síntesis de ARN (revisión en Richards y Ehrenfeld, 1990). Estos complejos replicativos se encuentran asociados a membranas lisas (Lazarus y Barzilai, 1974; Butterworth y cols., 1976). La principal proteína viral purificada de estos complejos es la polimerasa 3D (de una actividad de poli(A)-oligo(U)-poli(U)- polimerasa templado-dependiente) (Van Dyke y Flanegan, 1980; Baron y Baltimore, 1982a). Este polipéptido cataliza la síntesis del ARN(-) complementario al templado cadena (+), sin embargo solo posee actividad de elongación y no de iniciación. Experimentos *in vitro* demuestran la necesidad de la adición de un *primer* o iniciador oligo(U) para la iniciación (Van Dyke y Flanegan, 1980; Baron y Baltimore, 1982a). La purificación de un factor del huésped con actividad de uridil transferasa terminal sugiere la intervención de dicho factor en la iniciación *in vivo* (Dasgupta y cols., 1980; Baron y Baltimore, 1982b; Dasgupta, 1983; Andrews y Baltimore, 1986). El modelo propuesto es que la polimerasa puede catalizar la

síntesis de ARN usando el extremo 3' como templado. El segmento corto de U (cinco residuos) generado por el factor del huésped, es capaz de aparearse al poli(A) y formar una estructura de horquilla que la polimerasa puede emplear como iniciador (Young y cols., 1985). Varios observadores sugieren que la VPg (o su precursor 3AB) está involucrada en esta etapa de la replicación del ARN, aunque su rol preciso no está claro (Morrow y Dasgupta, 1983).

Poco se conoce sobre los requerimientos para la síntesis de la cadena (+) usando como templado la cadena (-). Posiblemente los mecanismos de iniciación de síntesis de cadenas (+) y (-) son diferentes ya que las secuencias 3' sobre estos templados son diferentes. La estrategia usada para dilucidar el mecanismo de síntesis de cadenas (+) fue aislar complejos de replicación crudos, que fueran capaces de sintetizar ARN viral (Mc Donnel y Levintow, 1970; Takegami y cols., 1983). El ARN sintetizado por estos complejos es predominantemente de polaridad (+) (Caliguri y Tamm, 1970; Etchison y Ehrenfeld, 1981). Takeda y cols., en 1986, describen que en estos sistemas se sintetizan las nucleotidil proteínas VPg-pU y VPg-pU-pU las cuales son elongadas y dan un oligonucleótido correspondiente al extremo 5'. Se postula que VPg-pU funciona como iniciador para la síntesis de ARN cadena

(+) en estos complejos. Virus de Coxackie, recuperados luego de transfección de células con mutantes de ADN copia (ADNc) infectivo sin las 2U terminales, contienen la mencionada estructura VPg-pU-pU en su extremo 5' terminal, sugiriendo que también *in vivo* VPg-pU-pU actuaría como iniciador (Klump y cols., 1990).

2.4.4. Síntesis de proteínas virales

El mecanismo de iniciación de la traducción del ARN de los picornavirus difiere del usado en la mayoría de las células eucariotas (Kozak, 1989), ya que no depende de grupo CAP, y la síntesis comienza en un codón AUG interno (Pelletier y cols., 1988; Trono y cols., 1988; Pelletier y Sonenberg, 1989; Kühn y cols., 1990). Existe evidencia de la presencia de una región interna cercana al extremo 5' del ARN, que dirige la iniciación de la síntesis de proteínas. Esta región se denomina IRES (sitio interno de entrada al ribosoma) (Sonenberg, 1990; Belsham y Brangwyn, 1990).

Este mecanismo diferencial permite a los picornavirus iniciar la síntesis de sus propios productos genómicos, mientras que se produce la inhibición de la síntesis de ARN y de proteínas celulares (Lucas-Lenard, 1979). Para el VFA, la

inhibición de la síntesis celular, la cual se sugiere que está mediada por la proteína L/L' (Devaney y cols., 1988), coincide con la aparición de los primeros productos virales identificables, aproximadamente a los 90 minutos postinfección, en un ciclo replicativo de 7-8 hs.

Como los polipéptidos virales están codificados en un único producto monocistrónico, los picornavirus precisan de un procesamiento post-transcripcional para la obtención de las proteínas funcionales. El producto completo de la traducción del genoma de los picornavirus, de aproximadamente 250 Kd, es de difícil detección, dado que durante la síntesis del mismo ya se producen los primeros clivajes originándose cuatro proteínas precursoras primarias (Jacobson y Baltimore, 1968; Butterworth y cols., 1971; Forss y cols., 1984). Estas, a través de clivajes secundarios mediados por proteasas virales, dan origen a las proteínas estructurales y no estructurales.

Inicialmente, se estableció el orden de los genes así como las relaciones precursor-producto del VFA por medio del uso de la pactamicina, que inhibe la iniciación de la traducción, sin interferir en la elongación o terminación (Lodish y cols., 1971), en experimentos de *pulse and chase* (Sangar y cols., 1977a; Doel y cols., 1978; Sangar, 1979). El mapa de

procesamiento se completó mediante el empleo de sistemas de traducción *in vitro* e inmunoprecipitación con antisueros contra proteínas específicas virales (Grubman y Baxt, 1982; Grubman y cols., 1984; Strebel y cols., 1986). Las proteínas precursoras se encuentran dispuestas de acuerdo al orden de traducción 5'-3': P0 (L/L'), P1 (1ABCD-2A), P2 (2BC), y P3 (3ABCD). La figura 2 muestra el mapa de clivaje de la poliproteína viral.

La nomenclatura de las proteínas es la adoptada en el III° Encuentro del Grupo Europeo de Estudio Sobre la Biología Molecular de los Picornavirus, sistema denominado L-4', 3', 4 (Rueckert y Wimmer, 1984).

El precursor P0 contiene dos productos proteicos finales, denominados L y L'. Estas dos proteínas se originan a partir de la traducción de los codones de iniciación 11° y 12° respectivamente (Cao y cols., 1995). Debido a que ambos codones de iniciación se encuentran en el mismo marco de lectura, la proteína L difiere de la L' únicamente en los 28 aminoácidos adicionales de su extremo N-terminal (Sangar y cols., 1980; Beck y cols., 1983; Kühn y cols., 1990). Estas proteínas tienen una función proteolítica (Strebel y Beck, 1986; Medina y cols., 1993), y se ha sugerido que intervendrían en la inhibición de la síntesis de proteínas celulares (Devaney y cols., 1988).

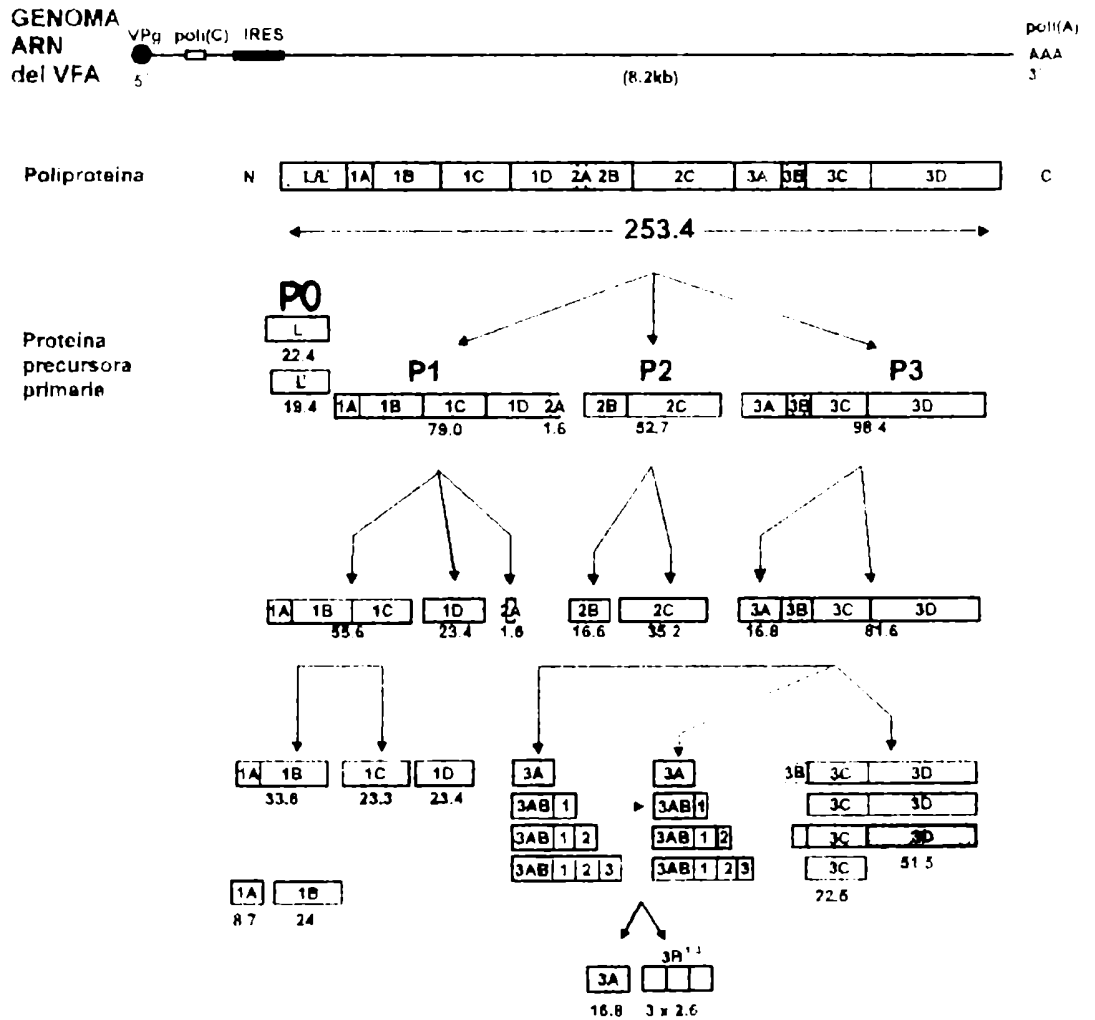
El precursor P1 (1ABCD-2A) se encuentra compuesto por las cuatro proteínas de la cápside: 1D (VP₁), 1B (VP₂), 1C (VP₃) y 1A (VP₄), las que se encuentran ordenadas NH₂-VP₄-VP₂-VP₃-VP₁-COOH (Sangar y cols., 1977b; Sangar y cols., 1980). Este ordenamiento posibilita que, después de ser procesadas, las mismas permanezcan asociadas entre sí facilitando su posterior ensamble con unidades similares para constituir la cápside viral (Grubman, 1984). También forma parte de este precursor el pequeño polipéptido 2A, de solo 16 aminoácidos, el cual se ha sugerido que posee un rol proteolítico, tal vez mediante una reacción intramolecular (Vakharia y cols., 1987; Clarke y Sangar, 1988; Ryan y cols., 1991).

La región P2 incluye a las proteínas 2B y 2C. Con respecto a la función de esas proteínas virales, se ha descrito que mutaciones en el gen que codifica para la proteína 2C explican la resistencia del virus a la guanidina (Saunders y King, 1982). Para poliovirus se ha sugerido que la proteína 2C podría estar involucrada en la formación del complejo de replicación (Richards y Ehrenfeld, 1990).

Con respecto al precursor P3 (3ABCD), en su extremo carboxiterminal se ubica la ARN polimerasa ARN-dependiente (3D). Las tres copias de la proteína VPg (3B) también se

Figura 2. Diagrama del procesamiento de la poliproteína del VFA.

PROCESAMIENTO DE LA POLIPROTEÍNA DEL VFA



encuentran dentro de este mismo precursor. Con respecto a la proteína 3A situada en el extremo N-terminal, ha sido sugerido que las regiones hidrofóbicas presentes en la misma servirían en el anclaje del complejo de replicación a las membranas (Bernstein y Baltimore, 1988). La proteína 3C es la proteasa viral responsable por la mayoría de los clivajes (Klump y cols., 1984).

Procesamiento de la poliproteína: en el procesamiento de los precursores primarios, que tiene lugar al finalizar la primera ronda de traducción, intervienen proteasas codificadas por el virus, las cuales llevan a cabo los clivajes secundarios (Grubman y Baxt, 1982; Burroughs y cols., 1984).

En 1982, Grubman y Baxt, mapean la principal actividad proteolítica del VFA cerca del extremo 3'. Posteriormente, empleando ADNc de diferentes tamaños expresados en sistemas bacterianos, e inmunoprecipitando los extractos obtenidos, se demuestra la actividad proteolítica de la proteína 3C (Klump y cols., 1984).

Burroughs y cols., en 1984 observan para el VFA, que la liberación de L/L' se produce independientemente de la inhibición de los otros clivajes primarios (P1-P2) y (P2-P3),

lo que demuestra que en el procesamiento primario de la poliproteína se encuentran involucradas más de una proteasa. En este sentido Strebel y Beck en 1986, y Medina y cols., en 1993, demostraron que la proteína L/L' tiene una actividad proteolítica capaz de catalizar su propia liberación de la cadena naciente.

Experimentos con sistemas de traducción *in vitro* involucran también a la proteína 2A en un rol proteolítico, que produce su propio clivaje de la proteína 2B, generando el precursor P1 (1ABCD-2A) (Vakharia y cols., 1987; Clarke y Sangar, 1988).

Las uniones entre las proteínas estructurales 1ABCD son clivadas por la proteasa 3C (Grubman y Baxt, 1982; Burroughs y cols., 1984), excepto el clivaje entre 1A y 1B (VP₄ y VP₂), el cual se ha sugerido que es autoproteolítico (Rossmann y cols., 1985), y que ocurre tardíamente en la infección, una vez formada la cápside viral y durante el empaquetamiento del ARN (Jacobson y cols., 1970).

2.4.5. Empaquetamiento del ARN viral

Poco se conoce del mecanismo de empaquetamiento del ARN

viral. Para polivirus (Jacobson y Baltimore, 1968) se ha propuesto el modelo de la procápside, en el cual el último paso de la morfogénesis es la asociación del ARN con una cápside preformada. Esta se origina por la asociación de protómeros conteniendo una copia de VP0, VP1 y VP3 para formar pentámeros. Doce de estos pentámeros originarán a la procápside (Rueckert, 1990).

El ensamble de la cápside con el ARN viral se ha explicado de dos formas: 1) el ARN se inserta en la partícula proteica vacía o 2) el ARN modifica la estructura de la procápside permitiendo así su internalización y catalizando luego los clivajes de maduración de la VP0. Se han propuesto otros modelos que implican el empaquetamiento a partir de dos medias cápsides o el armado a partir de subunidades capsoméricas sobre un núcleo de ARN condensado (Lee y Colter, 1979). Evidencias experimentales han relacionado al empaquetamiento con la replicación del ARN. La síntesis del ARN podría dar la energía necesaria para la inserción del mismo en la procápside o para la formación de un núcleo de ARN (Rueckert, 1990).

3. VARIABILIDAD DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA

La variabilidad genética es una propiedad general de todos los sistemas vivos, y constituye la base de su evolución. Los virus, particularmente los a ARN, no son ajenos a este fenómeno (revisión en Holland y cols., 1992). Evidencias recientes demuestran que la mayoría de los virus a ARN forman complejas "quasiespecies", las cuales pueden evolucionar rápidamente, debido a las altas frecuencias de mutación observadas en sus genomas (que generalmente se encuentran en el orden de 10^{-4} - 10^{-5}). El término "quasiespecie" fue introducido por Eigen y Schuster en 1979 para referirse a las diversas poblaciones de ARN que se postulan como las primeras formas de vida en la Tierra, que competían y evolucionaban rápidamente. Los principios que estos autores elaboraron para la evolución de las "quasiespecies" (Eigen y cols., 1981; Eigen y Biebricher, 1988; revisión en Eigen, 1993) se aplican a muchas poblaciones de virus a ARN, tales como el virus de la estomatitis vesicular, el poliovirus, el virus de la influenza, el virus del síndrome de la inmunodeficiencia humana adquirida, y también al VFA. Estas evidencias han sido revisadas en diversos artículos (Holland y cols., 1982, 1989, 1990, 1991; Domingo y cols., 1985; Coffin, 1986, 1990; Steinhauer y Holland, 1987; Domingo y Holland, 1988; Eigen y Biebricher,

1988; Smith y Palese, 1988).

En términos poblacionales, se considera que el VFA está compuesto por una mezcla heterogénea de genomas relacionados, y existe evidencia de que los mismos se comportan como una estructura de tipo "quasiespecie" (Domingo y cols., 1985), donde la proporción de cada una de las mutantes no sólo depende de la frecuencia con la que esta aparece, sino también de su comportamiento competitivo con respecto a las otras mutantes presentes en ese momento en la población (González y cols., 1991; Martínez y cols., 1991a).

3.1. Variabilidad genómica

Las primeras comparaciones entre los genomas del VFA se llevaron a cabo por ensayos de hibridación competitiva de ácidos nucleicos. El análisis de las secuencias de los ARNs de virus de serotipos O, A, y C muestra una homología del 44-65% (Dietzshold y cols., 1971). En 1977, también mediante ensayos de hibridación competitiva, Robson y cols. describen que los siete serotipos del VFA pueden clasificarse en dos grupos. Uno de ellos comprende los tipos O, A, C y Asia 1 y el otro, los tres tipos sudafricanos (SAT 1, 2, y 3). La homología observada entre ambos grupos es de 25-40%, mientras que entre serotipos

pertenecientes a un mismo grupo dicha homología alcanza valores de 65% o mayores.

Posteriormente, se utilizó el mapeo bidimensional de oligonucleótidos resistentes a RNasa T₁, para analizar la variabilidad existente en el VFA. Se registran diferencias considerables entre los tipos O, A, C, SAT 1, y SAT 2 (Robson y cols., 1980; Anderson y cols., 1985; Augé de Mello y cols., 1986; Bergmann y cols., 1992), sin embargo las variaciones encontradas entre los ARNs de diferentes serotipos son de tal magnitud que superan la capacidad del método para realizar una cuantificación de las mismas. Estas variaciones no se limitan a virus de diferentes tipos y subtipos. Domingo y cols., 1980, han analizado aislamientos procedentes de una misma epizootia y de un área geográfica limitada, indistinguibles por ensayos de fijación del complemento, detectando que los cambios afectan 0,7-2,2% de los nucleótidos del ARN viral.

Experimentos de hibridación cuantitativa del ARN viral a sondas de ADNc muestran que existe una menor homología en la zona que codifica para las proteínas estructurales que la que se observa en la que codifica para las proteínas no estructurales (Marquardt, 1982). Esta diferencia se ha confirmado por secuenciamiento de nucleótidos. La zona que

codifica para la VP₁ muestra los mayores porcentajes de variación entre dos virus de distinto tipo O, A, o C (30-40% de los nucleótidos); y las regiones que codifican para las proteínas VP₂ y VP₃ muestran valores de aproximadamente 25-30% (Beck y cols., 1983; Villanueva y cols., 1983; Martínez-Salas y cols., 1985). La variación en la zona que codifica para las proteínas no estructurales es considerablemente menor que la correspondiente a las proteínas estructurales, con valores entre 2-7% (Beck, 1988).

3.2. Variabilidad antigénica

La diversidad genética observada se manifiesta en una amplia variabilidad antigénica que se produce como resultado de las sustituciones en los aminoácidos de los dominios que interaccionan con los componentes del sistema inmune. Dentro del género aftovirus se describe la existencia de siete tipos inmunológicos que incluyen más de 65 subtipos reconocidos por el Laboratorio Mundial de Referencia (Pereira, 1977). Las cepas derivadas de estos subtipos alcanzan varios cientos. Esta amplia variabilidad antigénica tiene importantes implicancias epidemiológicas. Entre los tipos no se manifiesta inmunidad cruzada e incluso se ha observado que la inmunidad generada por un subtipo no siempre protege contra la infección de otro

subtipo perteneciente al mismo tipo (Pereira, 1981). Esto sugiere que la diversidad antigénica tiene gran significado en el control de la enfermedad y se ha propuesto que la misma debe ser considerada en la selección de las cepas utilizadas en las vacunas (Bergmann y cols., 1992).

El uso de anticuerpos monoclonales neutralizantes o no, reveló que aislados contemporáneos del mismo origen geográfico o inclusive clones virales derivados de un único aislado, pueden ser antigénicamente diferentes (Rowlands y cols., 1983; Mateu y cols., 1987, 1988 y 1989). Estudios con variantes antigénicas del serotipo C, han mostrado que virus de un mismo serotipo muy divergentes antigénicamente, pueden surgir en el campo a partir de diferencias genómicas limitadas, que ocurren en algunos pocos residuos claves de cada sitio antigénico (Mateu y cols., 1994).

3.3. Generación de variantes en distintos sistemas

La generación de variantes se observa *in vitro* cuando cepas virales son sometidas a pasajes en cultivos celulares tanto en presencia de anticuerpos (Hyslop, 1965; Carrillo y cols., 1989), como en ausencia de los mismos (Sobrino y cols., 1983; Bolwell y cols., 1989; Diez y cols., 1989), y en cultivos

celulares persistentemente infectados (Diez y cols., 1990).

Asimismo, *in vivo*, se aíslan variantes durante pasajes sucesivos en bovinos parcialmente inmunes (Hyslop y Fagg, 1965; Fagg y Hyslop, 1966), o durante la infección persistente de bovinos inoculados en forma experimental (Gebauer y cols., 1988). Asimismo, Carrillo y cols., 1990, describen la presencia de variantes durante la etapa aguda de la enfermedad en porcinos. Rowlands y cols., 1983, demuestran la heterogeneidad genómica de un mismo aislado obtenido de bovinos.

A nivel de campo, se detectan variaciones genómicas y en el comportamiento antigénico de cepas aisladas durante episodios (Barei y cols., 1976; Rweyemamu y Pay, 1978; Abu Elzein y cols., 1980; King y cols., 1981; Espinoza y Knowles, 1983; Rweyemamu y cols., 1984; Belwal y cols., 1986; Bergmann y cols., 1988b; Knowles y Sharma, 1990), inclusive entre cepas recuperadas del mismo brote (Domingo y cols., 1980; Mateu y cols., 1987).

3.4. Mecanismos de variación

La gran distribución de secuencias que se observa en las poblaciones del VFA es el resultado de un proceso complejo que

involucra la generación de mutantes y la posterior selección de algunas de ellas.

La generación de genomas mutantes durante la replicación viral es consecuencia inevitable de la naturaleza de la ARN polimerasa (revisión en Holland y cols., 1992). Las tasas de mutación considerablemente altas que se observan durante la replicación de los picornavirus garantizan el surgimiento de mutantes viables en cada célula infectada (Eggers y Tamm, 1965; Heinz y cols., 1989; de la Torre y cols., 1990). Sin embargo una mutación particular puede verse favorecida o no (Holland y cols., 1992). Debido a ello debe distinguirse la tasa de mutación, que se refiere al evento bioquímico en que interviene la polimerasa durante la replicación, de la frecuencia de mutación, definida como la proporción que alcanza una mutante en una dada población. Esta proporción no solo depende de la tasa de mutación, sino que es también el resultado de la competición entre una mutante y todas las otras variantes.

Además de la competición entre mutantes, la evolución a largo plazo puede estar influenciada por eventos de selección al azar, como por ejemplo la transmisión de una o unas pocas partículas desde un animal infectado hacia uno susceptible (revisión en Domingo y Holland, 1993), así como por fuerzas de

selección positivas y negativas que actúan sobre la mayoría de los genomas mutantes (Domingo y Holland, 1988; Coffin, 1990). En este sentido, se ha responsabilizado a la presión inmunológica por la selección de mutantes que no son neutralizadas efectivamente en animales inmunes o convalescientes, y que dan inicio a la reaparición de la enfermedad en el rebaño (Cowan y cols., 1974; McCahon, 1981). Asimismo, la selección inmunológica puede verse facilitada por la existencia de ganado no vacunado o protegido parcialmente y por la existencia de huéspedes susceptibles salvajes situados en las cercanías (Brooskby, 1982).

En líneas generales se observa que la aparición de mutantes antigénicas es considerablemente alta. Esto sugiere que las mismas no están sujetas a una intensa selección negativa, lo cual podría deberse a que sustituciones en los sitios antigénicos serían toleradas posiblemente debido a que los *loops* expuestos son flexibles, y por lo tanto oponen débiles restricciones estructurales (Diez y cols., 1989, 1990). Un modelo alternativo para explicar la alta frecuencia de sustituciones en estos dominios antigénicos propone que la ARN polimerasa del VFA mostraría una fidelidad disminuida cuando copia la secuencia del ARN que codifica para estos sitios, posiblemente debido a que la estructura secundaria del ARN, u

otros efectos de la secuencia primaria, afecten la fidelidad de la ARN polimerasa viral (Wedell y cols., 1985). Sin embargo las evidencias que sostienen este último modelo no son sólidas (Eigen y Biebricher, 1988; Holland y cols, 1992).

Otro mecanismo que ha sido sugerido es el de la recombinación genética. De hecho, en el VFA ha sido detectada la ocurrencia de recombinación entre dos moléculas parentales diferentes (King y cols., 1982). Existen varios sitios de recombinación en el genoma del VFA, tal vez con preferencia en las regiones genómicas más conservadas (King y cols., 1985). Asimismo ha sido descrita la obtención de recombinantes tanto homotípicos como intertípicos entre cepas virulentas y atenuadas de diferentes serotipos del VFA (Giraud y cols., 1987 y 1988). Genomas menos relacionados (por ejemplo, pertenecientes a distintos serotipos) presentan una menor frecuencia de recombinación que la encontrada entre aislamientos relacionados genéticamente (Mc Cahon y cols., 1985).

4. PERSISTENCIA DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA

Como fuera mencionado en la Sección 1.2., una característica importante que presenta el VFA es su capacidad de establecer infecciones persistentes en ciertos huéspedes. La posible existencia de infección persistente con el VFA había sido sugerida entre los años 1898 y 1956, basada en eventos epidemiológicos, careciéndose sin embargo de evidencias experimentales (Waldmann y cols., 1931; Ramon, 1956). La primera confirmación obtenida en el laboratorio de la existencia de este tipo de infección fue registrada por Van Bekkum y cols., en 1959.

4.1. Establecimiento y detección del estado persistente

Durante el estado persistente es posible recuperar virus infectivo de la región OP (Van Bekkum y cols., 1959; Sutmöller y Gaggero, 1965; y Sutmöller y cols., 1967).

Las muestras utilizadas para la detección de virus en animales persistentemente infectados se colectan de la faringe y de la porción anterior del esófago, por la técnica del *probang* (Burrows, 1966; Sutmöller y cols., 1967; Sutmöller y cols., 1968). El material colectado consiste de mucosa,

material celular y secreción de saliva. Los sistemas celulares usados para la detección y titulación del virus son monocapas de cultivos primarios de células de riñón bovino o porcino (Snowden, 1966), y de cultivos de líneas celulares tales como BHK-21 e IBRS-2. La optimización del método de detección se consiguió mediante un paso adicional de tratamiento con triclorotrifluoretano, que disgrega los complejos antígeno-anticuerpo y elimina contaminantes tipo bacterias y hongos (Van Bekkum y cols., 1966 y Sutmöller y Cottral, 1967). Desde entonces, se han registrado varios informes acerca de la duración del estado persistente. Virus serotipos SAT 1 y SAT 3 han sido recuperados hasta 7 y 12 meses post-infección (p.i.) (Hedger, 1968 y 1970); serotipo A hasta 8 meses p.i. (Augé de Mello y cols., 1970), y 9 meses p.i. (Khukhorov y cols., 1973); serotipo C hasta 8 meses p.i. (Augé de Mello y cols., 1970), 24 meses p.i. (Straver y cols., 1970), y 18 meses p.i. (Gebauer y cols., 1988); serotipo O hasta 9 meses p.i. (Khukhorov y cols., 1973 y Kaaden y cols., 1970) y 22 meses p.i. (Bergmann y cols., 1993); y serotipo Asia 1 hasta 1 y 5 meses p.i. (Prasad y Kumar, 1981, Prasad 1981).

Sin embargo, el tiempo máximo de permanencia del virus en animales persistentemente infectados es difícil de ser evaluado. La recuperación de virus a partir del fluido OP de

animales individuales no es continua durante todo el estado persistente (Gebauer y cols., 1988, Bergmann y cols., 1993). La detección de secuencias virales en otros órganos del animal, cuando la recuperación viral de fluidos OP era negativa, sugiere que la replicación en dicha región puede ser temporaria, aunque no deben excluirse problemas técnicos del método de *probang* (Bergmann y cols., 1995).

El número de animales persistentemente infectados decrece con el tiempo. Los registros muestran una reducción a la mitad del número de animales con recuperación positiva luego de cuatro meses (Straver y cols., 1970), y luego de seis meses del inicio de la infección (Hedger, 1970). También ocurre una disminución gradual en el título de recuperación viral durante el estado persistente (Burrows, 1966; Rossi y cols., 1988).

Es posible establecer una infección persistente en animales vacunados (Sutmöller y cols., 1968; Kaaden y cols., 1970; Prasad y Kumar, 1981; y Prasad y cols., 1981), obteniéndose una recuperación viral con títulos semejantes a los encontrados para animales no vacunados (Mc Vicar y Sutmöller, 1969). Asimismo, la vacunación no tiene influencia significativa en la duración del estado persistente (Hedger, 1970). Sin embargo, cuando se compara la prevalencia del VFA en

áreas endémicas vacunadas y no vacunadas, se encuentran valores mayores en las áreas sin vacunación que en las áreas vacunadas (Anderson y cols., 1974). La menor incidencia de persistencia en las áreas con vacunación no significa que la misma previene al estado persistente. La vacunación previene o reduce drásticamente la diseminación del virus en la población, disminuyendo así la probabilidad de infección de cada animal individual, y por ello tiene un efecto indirecto en el establecimiento del estado persistente.

También es posible establecer el estado persistente luego de la inoculación con vacunas producidas con virus vivo atenuado (Augé de Mello y cols., 1966), y se ha observado la existencia simultánea de dos serotipos (Augé de Mello y cols., 1970). Sin embargo, no se ha podido confirmar la persistencia del virus atenuado tipo SAT 1 en ganado (Hedger, 1968).

4.2. Características fenotípicas, genéticas y antigénicas de los virus persistentes

Durante la replicación del VFA en animales persistentemente infectados, el virus sufre modificaciones. Las primeras evidencias de dicha variación se registraron a nivel fenotípico. Aislamientos virales recuperados de animales

persistentemente infectados pierden su habilidad de crecer a 42°C y pueden volverse resistentes al calor y al tratamiento con ácido (Fellowes y Sutmöller, 1970; Straver y cols., 1970 y 1972). Virus persistentes de tipo O presentan una aumentada susceptibilidad al interferón, un período de incubación más prolongado en ratón lactante y producen miniplacas en cultivos de células (Kaaden y cols., 1970). El desarrollo de miniplacas se ha observado a 37°C, y a 40°C (Ahl y Straub, 1986).

Existen evidencias de que puede ocurrir recombinación genética entre cepas que replican durante la infección persistente. Fellowes y Sutmöller, en 1970, inocularon con virus del serotipo O, animales persistentemente infectados con el serotipo A. No fue posible detectar virus A en fluidos OP, sin embargo encontraron que el virus O aislado era neutralizado parcialmente por antisuero anti A. Los intentos realizados para aislar virus serotipo A en cultivo de células fallaron, a pesar del uso de antisuero anti O para suprimir este serotipo.

Además de los cambios fenotípicos, los virus recuperados de animales persistentemente infectados presentan diferencias genéticas y antigénicas con respecto a sus respectivos parentales. Pueden detectarse diferencias entre las bases del ARN de virus persistentemente infectados, pertenecientes al

serotipo O, respecto del virus original, por medio de hibridación (Dietzschold y cols., 1972).

Asimismo, se observa heterogeneidad en el tracto del poli(C) y en las proteínas de la cápside de virus persistentes del serotipo C (Costa Giomi y cols., 1988; Gebauer y cols., 1988). El virus recuperado en etapas tardías de la infección experimental (539 días p.i.), muestra mutaciones puntuales en la secuencia de nucleótidos de la principal proteína inmunogénica VP₁, las cuales resultan en sustituciones de aminoácidos en el 59% de los casos (Gebauer y cols., 1988). Estas diferencias a nivel genómico se reflejan en una variación antigénica, manifestada en una reducción de la reactividad de ciertos aislamientos contra un panel de anticuerpos monoclonales, en algunos casos neutralizantes.

Otros estudios con animales persistentemente infectados en forma experimental sostienen, sin embargo, que no hay evidencia de que en los aislamientos virales alguno de los epitopes reconocidos por anticuerpos monoclonales neutralizantes haya mutado de tal forma que permita un "escape" del reconocimiento por el monoclonal adecuado (Salt, 1993).

4.3. Infección persistente en otros huéspedes

La infección persistente puede establecerse en ovejas, y existen varios informes acerca de la duración del estado persistente en este huésped, en los que se describe el aislamiento de virus infectivo a partir de fluido OP hasta un mes (Tewari y Singh, 1975), tres meses (Khukorov, 1973), cinco meses (Burrows, 1968), siete meses (Sharma y cols, 1982), y nueve meses (Mc Vicar y Sutmöller, 1968) luego de la infección. El título de virus recuperado durante la persistencia disminuye con el tiempo, desde 150 unidades formadoras de placa (ufp) por muestra de fluido OP a las 2 semanas, hasta 20 ufp/muestra a las 20 semanas (Burrows, 1968). También es posible establecer la infección subclínica en ovejas vacunadas por contacto con otras persistentemente infectadas. Sin embargo, no pudo demostrarse transmisión hacia el ganado bovino (Bauer y cols., 1977). El estado persistente en cabras es bastante similar al de ovejas (Mc Vicar y Sutmöller, 1968; Sharma y cols, 1982). La importancia epizootica de la infección persistente en estos huéspedes no parece ser relevante. A pesar de la alta proporción de ovejas y cabras seropositivas encontradas en algunas regiones endémicas, la recuperación de virus infectivo no fue posible entre ovejas, y fue solo ocasional entre cabras (Anderson y cols., 1976).

El búfalo es otra especie de la cual ha sido recuperado VFA de la mucosa de la faringe hasta 18 meses p.i., y hasta dos años y cuatro meses p.i. (Hedger, 1972, Condy y Hedger, 1974; Bengis y cols., 1986). En un estudio realizado en Botswana con 411 búfalos, se registró infección persistente en el 58% de los mismos (Dräger y cols., 1974). En Egipto la incidencia registrada es de 29,8% en áreas endémicas y de 0,8% en áreas no endémicas (Tantawi y cols., 1984). Existen registros que atribuyen el surgimiento de brotes entre ganado bovino a la transmisión a partir de búfalos persistentemente infectados (Hedger y Condy, 1985).

En general se considera que no se establece infección persistente con el VFA en cerdos. No fue posible detectar virus en saliva o amígdalas de 10 cerdos, a 48 y 51 días p.i., y entre 27 y 30 días luego de la reinoculación (Wittmann y Eisener, 1966), ni durante la epidemia de Malta, en 1975, entre cerdos vacunados en áreas de alto riesgo a exposición (Garland, 1981). Tampoco fue posible detectar secuencias genómicas del VFA en diversos órganos de cerdos sacrificados a 15 y 28 días p.i. (Bergmann y cols., 1995). Solyom y Horvath, en 1974, informan resultados contradictorios, ya que no consiguen detectar virus en 20 cerdos recuperados de infección con VFA, entre 16 y 18 meses p.i., y dos años y medio p.i., pero sí en

cinco cerdas infectadas a 26 días p.i., a 50 días p.i., y a 57 días p.i. En contraposición, Cunliff, en 1962, registró la recuperación viral a partir de cerdos infectados a los 128 días p.i.

4.4. Establecimiento de infecciones persistentes en cultivos celulares

El establecimiento de la infección persistente con VFA en cultivo de células luego del tratamiento con suero hiperinmune fue descrito por primera vez por Dinter y cols, en 1959. El establecimiento de esta infección se correlaciona con la producción de interferón por parte de las células (Philipson y Dinter, 1963). Los virus recuperados de los subcultivos de este tipo de infección, inducen placas de menor tamaño, y presentan una patogenicidad disminuída para ratón y para bovino (Seibold y cols., 1964).

Asimismo, el virus infectivo recuperado del medio luego de 65 pasajes del cultivo celular muestra, además de un tamaño de placa reducido, una menor replicación a 42°C, y variaciones genómicas en el ARN, evaluadas por *fingerprinting*. Luego de 96 pasajes del cultivo celular, cuando ya no es posible aislar virus infectivo, las células continúan expresando antígenos

virales y ARN viral, el cual presenta deleciones de hasta 3 kb (de la Torre y cols., 1985).

Durante la infección persistente *in vitro*, ocurre una co-evolución del cultivo de células BHK-21 y de la cepa clonada C-S8c1 (de la Torre y cols., 1988). Se registran varios cambios genéticos y fenotípicos tanto en el virus como en las células. Estas últimas se tornan resistentes a la re-infección con el virus original, posiblemente por un mecanismo en el que intervienen proteínas celulares actuando en "trans" (de la Torre y cols., 1989b). El análisis de 248 clones derivados de dicha línea celular, documenta una diversidad fenotípica extremadamente elevada de estas células (de la Torre y cols., 1989a). Con respecto a las modificaciones encontradas en el virus recuperado de los cultivos persistentemente infectados, el mismo se vuelve más virulento para células BHK-21, lo cual le permite superar parcialmente el bloqueo celular (de la Torre y cols., 1988), pero menos virulento para ratón y bovinos (Diez y cols., 1990). Estudios moleculares realizados por Escaramís y cols., 1992, en uno de los virus mutantes aislados, muestran variaciones en la región de los IRES, que no afectan la estructura secundaria del ARN, así como en el poli (C), el cual contiene 420 citidinas (125 más que el virus parental), y se encuentra interrumpido por algunos pocos uracilos.

En resumen, estos estudios sugieren que, junto con la heterogeneidad genética viral, la diversidad celular puede ser un elemento importante en la supervivencia a largo plazo de los sistemas de células persistentemente infectadas.

4.5. Mecanismo de persistencia *in vivo*

El mecanismo de persistencia viral no se conoce con profundidad. Las modificaciones mencionadas anteriormente, sugieren que el mismo podría estar mediado por cambios en el virus, que incluyen la producción de partículas defectivas interferentes (DI), mutantes termosensibles, recombinación, integración y la infección y alteración de las funciones de las células del sistema inmune. Alternativamente, pueden estar involucrados factores de la célula huésped, como los que se observan en los sistemas *in vitro*, o la falta de enzimas necesarias para la replicación viral. Finalmente, la persistencia puede estar mediada por mecanismos inmunes que pueden incluir la modulación antigénica del virus, inducida por anticuerpos, selección inmunológica, factores bloqueantes, y la generación de interferon (Salt, 1993).

4.6. Transmisión

Los intentos de transmitir virus por contacto de animales persistentemente infectados con bovinos y cerdos susceptibles no han sido exitosos (Van Bekkum y cols., 1959; Weyhe, 1966; Sutmöller y cols., 1967; Khukhorov y cols., 1973; Bauer y cols., 1977), inclusive en casos en que se realizaron lesiones artificiales en la piel de las patas, o se aplicaron dosis masivas de huevos de ácaros (Sutmöller y McVicar, 1972). Tampoco fue posible activar la transmisión por infección de los animales persistentemente infectados con IBR, ni por inyección con corticosteroides (Sutmöller y McVicar, 1972; Mc Vicar y cols., 1976).

Uno de los motivos que podría explicar esta falta de transmisión sería una disminuída virulencia de los virus recuperados durante la persistencia. En este sentido la bibliografía es contradictoria. La inoculación de virus recuperado de animales persistentemente infectados directamente en lengua y patas, resultó patogénica para bovinos, aunque con virulencia reducida y causando lesiones localizadas solo en lengua, sin observarse generalización (Van Bekkum y cols., 1959; Sutmöller y cols., 1967; Sutmöller y McVicar, 1972; Kothmann y cols., 1973). Por otro lado, Ahl y Straub, 1986,

informaron que un clon aislado de un virus persistente A, Bernbeuren era totalmente virulento para bovinos cuando era inoculado intranasalmente, no siendo posible, sin embargo, determinar si esto era una característica de este clon, o si la patogenicidad era más pronunciada por esta ruta. El virus recuperado de animales persistentemente infectados es virulento para cerdos luego de inoculación directa (Sütmoller y cols., 1967; Kaaden y cols., 1970; Khukhorov y cols., 1973). Luego de un pasaje en cerdos, el virus recobra su virulencia para bovinos (Kaaden y cols., 1970).

A pesar de la falta de evidencia experimental de la transmisión (tal vez debida a la dificultad de reproducir lo que ocurre en el campo), se cuenta con evidencias circunstanciales de transmisión de virus de animales persistentemente infectados hacia animales susceptibles, que resultan en la ocurrencia de un nuevo brote (Bureau of Animal Industry, 1947-50). Asimismo se ha propuesto que el movimiento de animales recuperados de la infección ha sido responsable por la aparición de focos en Suiza (Olitsky, 1927), y en México (Van Bekkum, 1973). En el caso de búfalos las evidencias sostienen que existe transmisibilidad en el campo, entre rebaños de búfalos (Bengis y cols., 1986) y experimental, hacia ganado bovino (Hedger y Condy, 1985; Dawe y cols., 1994).

5. OBJETIVO DEL TRABAJO

Por lo que ha sido presentado en las secciones anteriores, es evidente que, si bien el rol que los animales persistentemente infectados con el VFA tienen en la epidemiología de la enfermedad no está claramente establecido, es posible que los mismos constituyan una fuente de variantes, las cuales podrían explicar la gran variabilidad encontrada entre los virus representativos de focos encontrados en áreas endémicas. Es por ello que el tipo y grado de variación del virus durante la replicación en animales persistentemente infectados es de gran relevancia.

Con este objetivo se ha diseñado un modelo experimental para analizar la variación a lo largo del tiempo, en los virus recuperados de cuatro animales persistentemente infectados con el VFA, serotipo O, por medio de mapas bidimensionales de fragmentos resistentes a RNasa T₁, y por secuenciamiento de nucleótidos. Asimismo se han encarado estudios de caracterización viral de seis aislados relevantes de campo pertenecientes al serotipo O, ocurridos en Argentina y Brasil entre los años 1958 y 1983.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MODELO EXPERIMENTAL EN BOVINOS

En este trabajo fueron utilizados cuatro bovinos de 12 meses de edad, híbridos de cruce Holstein-Zebú, no vacunados, provenientes de una estancia libre de fiebre aftosa (FA) en las inmediaciones de Río de Janeiro, Brasil. Los animales fueron seleccionados previo examen seronegativo de anticuerpos neutralizantes para las cepas O₁ Campos Br 1/58, A₂₄ Cruzeiro Br 1/55 y C₃ Indaial Br 1/71.

Se estableció una infección persistente con el virus de la fiebre aftosa (VFA), cepa O₁ Campos Br 1/58 clonada (O₁ C/58), por inoculación intranasal de 10⁵ dosis infectivas al 50% en los bovinos 1, 2 y 4, y por contacto con estos en el animal 3. A partir del 7° día post-infección (DPI) se colectaron secuencialmente con intervalos de 7 días, muestras de fluido esofágico-faríngeo (OP) y de suero de los cuatro animales. La prevalencia de anticuerpos contra antígenos de replicación (no estructurales) se determinó por medio del ensayo inmunoenzimático de electrotransferencia (EITB), y fue descrita en trabajos anteriores (Neitzert y cols., 1991 y Bergmann y cols., 1993), y la determinación de anticuerpos contra proteínas estructurales se realizó mediante el ensayo de seroneutralización (SN) descrito por Ferreira, 1976.

2. CÉLULAS

Se utilizaron dos líneas celulares, una de riñón de cría de hamster (Baby Hamster Kidney), BHK-21, clon 13, y la otra de riñón de cerdo, IBRS-2, clon 17, cultivadas en monocapa en frascos de plástico tipo *Falcon*, botellas de vidrio tipo *Roller*, o en microplacas de plástico de 96 pocillos.

El medio de crecimiento utilizado fue medio esencial mínimo (MEM) de Eagle (Glasgow), suplementado con TPB (Tryptose Phosphate Broth, Difco) 2,95 g/l; NaHCO_3 2,5 g/l; penicilina 100 U/ml; estreptomina 0,1 mg/ml; fungizone 2,5 $\mu\text{g/ml}$ y suero bovino 10% (Anexo).

3. VIRUS

A lo largo de este trabajo se utilizaron las siguientes cepas virales:

- a) Aislamientos recuperados del fluido OP de los bovinos experimentalmente infectados. Las muestras fueron obtenidas por medio de la técnica de *probang* (Sutmöller y Gaggero, 1965) y procesadas para el aislamiento de virus, como fuera descrito anteriormente (Gebauer y

cols., 1988). Brevemente, la suspensión de fluido OP se mezcló en forma vigorosa con siete volúmenes de triclorotrifluoretano y se centrifugó a 1000 rpm por 30 min. Con el sobrenadante clarificado fue inoculada una monocapa de células BHK-21. Se consideró el aislamiento negativo cuando no se observó efecto citopático luego de tres pasajes sucesivos en monocapas de células. El material obtenido no fue clonado previo o posteriormente a su crecimiento en cultivo celular.

- b) Cepas representativas de brotes de campo del VFA, serotipo O, ocurridos en Argentina y Brasil entre los años 1958 y 1983. Estos virus se obtuvieron de la colección de cepas del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa.

Los virus fueron replicados mediante tres o cuatro pasajes en células BHK-21, hasta obtener la cantidad que rindiera suficiente material para los estudios. El medio de infección utilizado fue el mismo medio de crecimiento celular, pero sin agregado de suero bovino (Anexo).

4. CARACTERIZACIÓN SEROLÓGICA MEDIANTE FIJACIÓN DEL COMPLEMENTO AL 50% DE HEMÓLISIS

La caracterización serológica de las cepas virales se realizó utilizando la prueba de fijación de complemento al 50% de hemólisis (CF50%), como fuera descrito anteriormente (Alonso y cols., 1986). Se titularon los sueros hiperinmunes, preparados en cobayo, incubando diluciones sucesivas en base dos, frente al antígeno homólogo y a los heterólogos, en la dilución que contenía 2,5 unidades fijadoras de complemento 50%, en un volumen de 200 μ l durante 30 min a 37°C. Luego se adicionaron 400 μ l del sistema hemolítico, conteniendo cuatro unidades hemolíticas. El título de fijación del complemento 50% se calcula por el método de Spearman-Kärber. Las relaciones serológicas se establecieron calculando la proporción entre la recíproca del título del suero hiperinmune frente al antígeno homólogo y la recíproca del título del suero hiperinmune frente al antígeno heterólogo.

5. MAPAS BIDIMENSIONALES DE FRAGMENTOS RESISTENTES A RNasa T₁ (FINGERPRINTS)

5.1. Infección de monocapas, marcación con ³²P, extracción, purificación y digestión con RNasa T₁ del ARN viral

Estos procedimientos se llevaron a cabo según metodología descrita por Costa Giomi y cols., 1984, con las modificaciones introducidas por Augé de Mello y cols., 1986, y por Bergmann y cols., 1989. Monocapas de células BHK-21 crecidas en frascos tipo Falcon de 75 cm² conteniendo aproximadamente $2,2 \times 10^7$ células, se lavaron una vez con PBS (NaCl 0,15M; KCl 0,003M; Na₂PO₄ 0,008M; KH₂PO₄ 0,0015M), y dos veces con medio de infección (Anexo). Luego se infectaron con 1 ml de suspensión viral a alta multiplicidad de infección. El virus se dejó adsorber por 45 min a 37°C, luego de lo cual las monocapas se lavaron con medio sin fosfato (Anexo), realizándose tres cambios de medio durante los siguientes 45 min. Luego del último lavado se adicionó medio sin fosfato, conteniendo 5 µg/ml de actinomicina D. Luego de 30 min, cuando se cumplieron dos horas post-infección, se adicionó ³²P (Phosphoric acid -³²P HCl-free - New England Nuclear, NEX053) en una concentración final de 200 µCi/ml. Se dejó continuar la infección hasta observar efecto citopático en la mayoría

de las células, lo que ocurrió entre cinco y siete horas post-infección. El medio de infección se descartó y las monocapas se congelaron a -20°C . Posteriormente se resuspendieron y trataron con *buffer* NET (Tris-HCl 0,05M, pH 7,5; NaCl 0,1M y EDTA, 0,001M), conteniendo 0,05% de Tritón X-100, y los núcleos y restos celulares se separaron mediante centrifugación a 1000 rpm durante cinco min a 4°C . Se agregó a los sobrenadantes dodecil sulfato de sodio (SDS) en concentración final de 1% y se extrajo el ARN viral dos veces con fenol [neutralizado al 80% (p/p) en NET]:cloroformo (1:1). Luego, se precipitó el ARN de la fase acuosa por agregado de 2,5 volúmenes de etanol, manteniéndola a -20°C por lo menos por cuatro horas. El ARN fue recogido por centrifugación durante 40 min a 3000 rpm en centrífuga refrigerada, y resuspendido en *buffer* acetato de sodio (AcONa) 0,3 M pH 5,0. Luego se agregó un volumen igual de cloruro de litio (LiCl) 4,4 M, se dejó en baño de hielo durante 3 hs, y se centrifugó en microcentrífuga Eppendorf durante 30 min a 4°C . Al sedimento, conteniendo el ARN simple cadena se lo volvió a resuspender en AcONa y LiCl, y se repitió la extracción, como fuera descripto en el paso anterior. Finalmente, el precipitado de esta última purificación se disolvió en AcONa 0,3 M pH 5,0, y se precipitó con dos volúmenes de etanol a -20°C durante toda la noche. Luego de la centrifugación (20-25 min a 10.000 rpm),

el material se lavó dos veces con etanol 70%, se secó al vacío y posteriormente se resuspendió en buffer TE (Tris-HCl 0,02M, pH 7,5; EDTA 0,002M), y se digirió durante 1 h con RNasa T₁ (Pharmacia P-L Biochemicals) en una relación enzima/sustrato de 1U/5µg de ARN. Al ARN digerido se le adicionó un volumen igual de buffer muestra (urea 6M; sacarosa 50%; azul de bromofenol 0,2% y xilene-cianol 0,2%).

5.2. Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida, de los fragmentos de ARN resistentes a RNasa T₁

La electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Augé de Mello y cols., 1986, con las modificaciones introducidas por Bergmann y cols., 1989. La composición del gel de la primera dimensión fue de 10% de poliacrilamida (poliacrilamida/N,N'-metilenbisacrilamida, 40/1,3 p/p), 6M urea, 0,025M ácido cítrico, pH 3,2. El buffer de corrida estuvo compuesto por ácido cítrico 0,025M, pH 3,2. El gel se armó de 1,5 mm de espesor, dejando polimerizar la poliacrilamida entre vidrios de 19x35 cm por medio de la adición de 1 µg/ml de sulfato ferroso, 0,36 mg/ml de ácido ascórbico y 0,0012% peróxido de hidrógeno. La electroforesis se realizó de cátodo a ánodo a 50 mA

constantes durante aproximadamente tres horas, tiempo en el cual el colorante azul de bromofenol migró 15 cm desde la siembra. Finalizada la corrida de la primera dimensión, se cortaron las calles del gel correspondientes a cada muestra (tiras de 22 x 3 cm), y se lavaron dos veces con *buffer* TBE (Tris-HCl 0,1M, pH 8,3; ácido bórico 0,1M; EDTA 0,002M), antes de colocarlas a 5 cm de la base inferior de los vidrios en los que se armó la segunda dimensión. El gel de la segunda dimensión, de 1,5 mm de espesor, estuvo compuesto de 25% de poliacrilamida (poliacrilamida/N,N'-metilenbisacrilamida, 40/2,6) en *buffer* TBE. Para la polimerización de la poliacrilamida entre vidrios de 30 x 34 cm, se añadieron persulfato de amonio al 0,05%, y N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina (TEMED) al 0,05%. La electroforesis se realizó de cátodo a ánodo (migración en sentido superior) a 14 mA y se interrumpió cuando el azul de bromofenol migró 21 cm desde la tira (aproximadamente 15 hs).

Luego, los geles se fijaron con una solución de 50% metanol-7,5% ácido acético, se cubrieron con una envoltura plástica y se expusieron dentro de un cassette Dupont con un Fuji X-ray y una pantalla amplificadora Cronex. La exposición se realizó a -70°C. Las muestras que contenían 800.000 cpm presentaron un perfil claramente visible luego de exposición por 17 hs.

6. SECUENCIAMIENTO DE NUCLEÓTIDOS DE LA REGIÓN QUE CODIFICA PARA LA PROTEÍNA INMUNOGÉNICA VP₁

6.1. Infección y purificación del ARN viral

Se emplearon monocapas de células BHK-21 crecidas en botellas tipo Roller (aproximadamente $2,2 \times 10^8$ células), las cuales fueron lavadas una vez con PBS y una vez con medio de infección. Las células se infectaron a una multiplicidad de infección de cinco a diez unidades formadoras de placa por célula con cada una de las cepas estudiadas, y fueron incubadas durante 45 min a 37°C. Luego de la adsorción viral la monocapa se lavó con medio de infección, se adicionaron 15 ml del mismo y se incubó a 37°C hasta observarse efecto citopático generalizado (en general esto se observó alrededor de ocho horas luego de la inoculación). El VFA fue purificado por ultracentrifugación a través de un colchón de sacarosa (Mateu y cols., 1987; Martínez y cols., 1988). Brevemente, la suspensión viral obtenida luego de la infección se clarificó por centrifugación a 4000 rpm durante 20 min. Luego se trató con 10% de triclorotrifluoretano y se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 min a 4°C. El sobrenadante se trató con Tris HCl 0,05M, pH 7,6; EDTA 0,005M y sarcosil 0,5M, y se dejó en baño de hielo durante 15 min. Se armó el colchón de sacarosa al 20% en *buffer* NET y a través del mismo se centrifugó la

suspensión viral a 28.000 rpm durante 2,5 hs a 4°C. El pellet obtenido se resuspendió en *buffer* NET, se adicionó SDS a una concentración final de 0,5%, y se extrajo dos veces con fenol [neutralizado al 80% (p/p) en NET]:cloroformo:alcohol isoamílico (50:49:1). La fase acuosa, recuperada por centrifugación a 3000 rpm durante 10 min a 4°C, se precipitó por adición de dos volúmenes de etanol durante toda la noche a -20°C. El ARN obtenido luego de la centrifugación en microcentrífuga Eppendorf, se repurificó precipitándolo por agregado de AcONa pH 5,0 a una concentración de 0,3M, y adicionando dos volúmenes de etanol. Luego de la centrifugación, el ARN repurificado se secó al vacío, y posteriormente se resuspendió en agua. Para sintetizar el ADN copia (ADNc) se llevó a cabo la transcripción reversa del ARN purificado. Los iniciadores seleccionados fueron oligonucleótidos complementarios a las secuencias más conservadas entre los distintos serotipos, a distancias de 200 a 300 nucleótidos en el genoma viral. Se emplearon tres oligonucleótidos iniciadores, que eran complementarios a las posiciones 213 n a 231 n y 478 n a 500 n de la región que codifica para la proteína VP₁ y 34 n a 54 n de la que codifica para la proteína 2A. Los iniciadores fueron marcados radioactivamente en su extremo 5' con polinucleótido quinasa (0,4U/pmol de ADN, Promega Biotec), y [γ -³²P]ATP (3000 mCi/ μ mol, New England Nuclear, NEG0345). La transcripción

reversa del ARN se obtuvo por incubación de 3 pmoles del oligonucleótido iniciador marcado con aproximadamente 10 μ g de ARN en 50 μ l de Tris-HCl 0,05M, pH 8,3; KCl 0,06M; MgCl₂ 0,006M; 0,5 mM de cada uno de los cuatro deoxinucleósidos trifosfato, ditiotreititol 0,01M y 10U de transcriptasa reversa del virus de la mioblastosis aviaria (Promega Biotec), durante 40 min a 42°C. La reacción fue detenida por el agregado de 2 μ g/ μ l de RNasa A, libre de DNasa, incubando por otros 15 min a 37°C. El ADNc fue seleccionado de acuerdo a su tamaño en geles de agarosa al 1% (Beck y cols., 1987), de forma tal que únicamente las moléculas mayores de aproximadamente 800 nucleótidos fueron usadas para determinar la secuencia.

6.2 Secuenciamiento de ADNc

Las secuencias fueron determinadas aplicando el método químico de Maxam-Gilbert (Maxam y Gilbert, 1980) al ADN complementario. Se llevaron a cabo las reacciones específicas de base para G: dimetil sulfato; G+A: ácido fórmico; T+C: hidrazina y C: hidrazina + 1,5M NaCl, con los tiempos y temperaturas de incubación recomendados en el trabajo original. La reacción de la piperidina se llevó a cabo durante 30 min a 90°C. Las muestras se resuspendieron en formamida al 80%; EDTA 0,001M; NaOH 0,01M y azul de

bromofenol/xilene cianol 0,12%. Alícuotas de 1,5 μ l conteniendo aproximadamente 10.000 cpm se aplicaron en geles de acrilamida al 8%; N,N'-metilenbisacrilamida 0,2%; urea 7M; en *buffer* TBE; de 0,3mm de espesor, armados en placas de 35 x 40 cm, como se describe en el trabajo original. La electroforesis se llevó a cabo durante dos a cuatro horas a 2000 V. La resolución de los productos de ADNc de mayor peso molecular fue controlada realizando un segundo gel, en el cual la aplicación de la muestra se realizó cuando el primer gel había alcanzado 2/3 de la longitud total de la placa. Al finalizar la corrida, los geles fueron fijados en una solución de ácido acético al 10% durante 10 min, secados a 80°C por una hora, expuestos a placas de rayos X, y revelados luego de 48 hs de exposición. Ambos autoradiogramas combinados permitieron la lectura de aproximadamente 250-300 nucleótidos comenzando desde el iniciador.

7. ENSAYO DE NEUTRALIZACIÓN EN MICROPLACA

La neutralización de la infectividad se probó *in vitro* por un ensayo de neutralización en microplaca, descrito anteriormente (Ferreira, 1976). La prueba se llevó a cabo en microplacas de 96 pocillos conteniendo 9×10^5 células IBRS-2 por pocillo. Se utilizaron sueros de 30 días post-

revacunación correspondientes a un grupo de 16 bovinos inmunizados y reinmunizados con un mismo lote de vacuna trivalente oleosa preparada con los virus O₁ Campos Br 1/58, A₂₄ Cruzeiro Br 1/55 y C₃ Indaial Br 1/71. Se prepararon mezclas de virus-suero conteniendo 100 dosis infectivas en cultivos de células de cada cepa viral en 0,5 ml de diluciones seriadas al cuarto del suero (1:32, 1:128, 1:512 y 1:2048) en medio de infección. Estas se incubaron a 37° C durante una hora luego de lo cual se distribuyeron en 6 pocillos de la microplaca, 0,1 ml de cada mezcla . A continuación las microplacas se cubrieron con una tapa de vidrio que permitía el intercambio de aire, y se incubaron durante 48 horas a 37° C en una atmósfera húmeda conteniendo CO₂ al 5%. Finalizada la incubación, se descartó el medio y las placas se sumergieron durante 15 minutos en una solución acuosa conteniendo 5% de formol y 0,1% de cristal violeta. La lectura se realizó mediante la observación directa de las microplacas, luego de ser enjuagadas con agua corriente. Los títulos de neutralización viral, definidos como la recíproca de la dilución del suero que protegió al 50% de las monocapas, se calcularon por el método de Spearman-Kärber.

RESULTADOS

1. VARIACIÓN GENÉTICA Y ANTIGÉNICA DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA, SEROTIPO O, DURANTE SU REPLICACIÓN EN ANIMALES PERSISTENTEMENTE INFECTADOS

Hemos comentado en la Introducción, que si bien no está claramente establecido cuál es el rol que los animales persistentemente infectados con el virus de la fiebre aftosa (VFA) tienen en la epidemiología de la enfermedad, es posible que los mismos constituyan una fuente de variantes. Es por ello que el análisis del grado y tipo de variación que sufre el virus durante su replicación en animales persistentemente infectados es de gran relevancia. En este sentido se ha encarado el estudio de las modificaciones que sufre una población del VFA, serotipo O, durante su replicación en bovinos persistentemente infectados en forma experimental.

1.1. Modelo y diseño experimental

Para la realización de este trabajo se infectaron experimentalmente cuatro bovinos con la cepa O₁ Campos Brasil 1/58 (O₁ C/58), como fuera descripto en la sección de Materiales y Métodos.

Luego del período agudo característico de la enfermedad, se estableció un estado persistente de infección viral, el cual pudo corroborarse en los cuatro bovinos mediante el aislamiento ocasional en cultivos de células, de virus infectivo a partir del fluido esofágico-faríngeo (OP). Asimismo fue posible detectar hasta los tiempos más tardíos de la infección, la presencia de anticuerpos específicos contra proteínas estructurales y no estructurales de VFA detectados por medio del ensayo de neutralización (SN) y del ensayo inmunoenzimático de electrotransferencia (EITB), respectivamente (Neitzert y cols., 1991 y Bergmann y cols., 1993) (Figura 3).

En la Figura 3 se esquematiza el diagrama experimental y se detallan los resultados obtenidos para el aislamiento viral en muestras de material (OP) y para la determinación de anticuerpos contra proteínas estructurales (SN) y no estructurales (EITB) en suero. Las muestras fueron recolectadas de los cuatro bovinos con intervalos de una semana durante un período de 742 días a partir de la inoculación, tiempo en el cual los animales fueron sacrificados.

Asimismo, se indican los aislamientos en los cuales se llevaron a cabo estudios para evaluar la variabilidad surgida en las muestras recuperadas por medio de aislamiento en cultivo

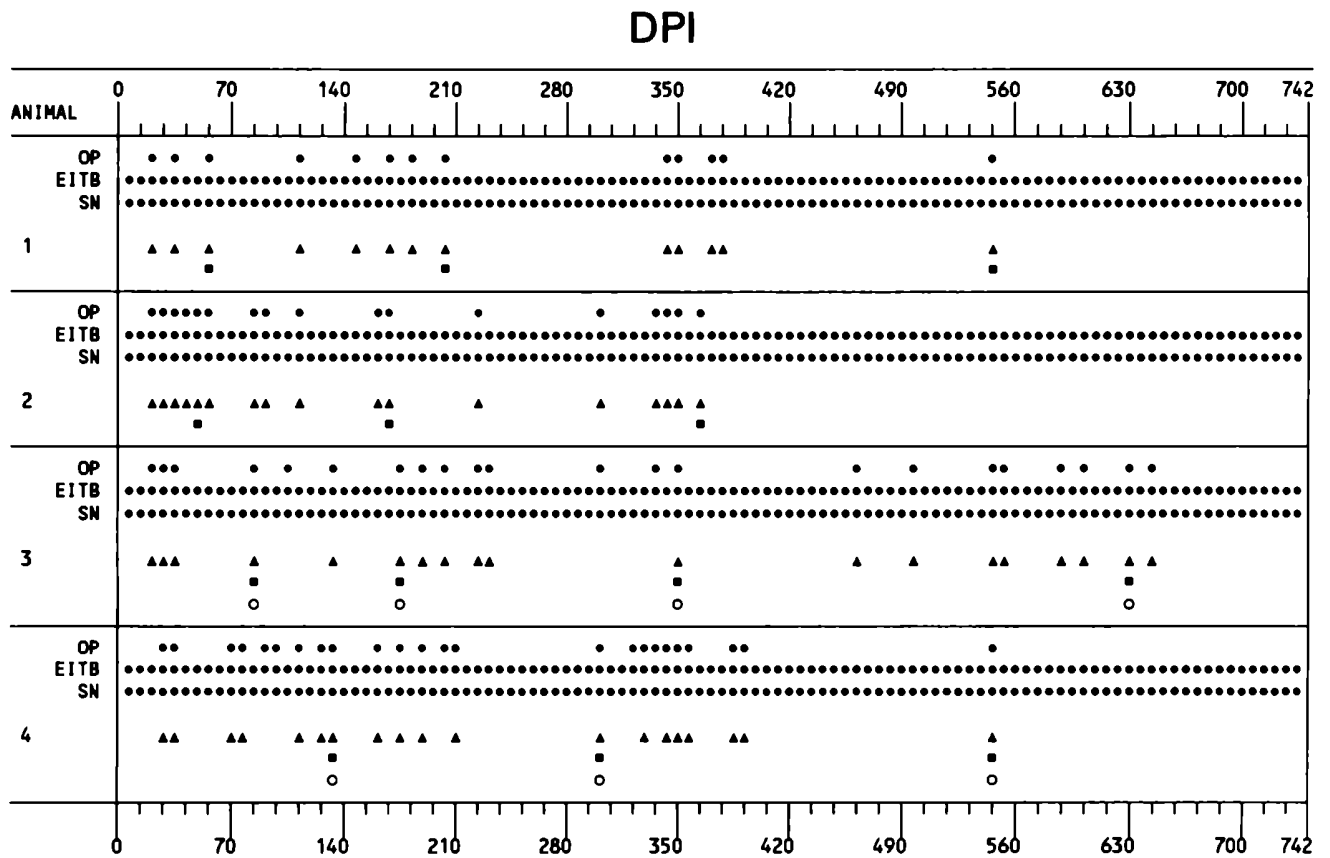


Figura 3. Diagrama experimental y reconocimiento de las infecciones persistentes establecidas en cuatro bovinos experimentalmente infectados con el VFA O₁ C/58.

Muestras de fluido esofágico-faríngeo (OP) y de suero fueron obtenidas de cada animal a intervalos de 7 días. A partir de las muestras de fluido OP se testeó el aislamiento de virus en cultivos de células, como fuera descrito en Materiales y Métodos. Se llevó a cabo para cada muestra de suero la detección de anticuerpos contra proteínas de replicación mediante el ensayo inmunoenzimático de electrotransferencia (EITB), y la determinación de anticuerpos estructurales mediante el método de seroneutralización en microplaca (SN). Aislamientos virales positivos (OP) y determinaciones positivas de anticuerpos contra proteínas no estructurales (EITB) o contra proteínas estructurales (SN) se indican por medio de un punto.

Otros estudios que se llevaron a cabo en los distintos aislamientos: triángulos (Δ), aislamientos analizados por mapas bidimensionales (*fingerprinting*); cuadrados (\blacksquare), muestras de las cuales se secuenció la proteína inmunogénica VP₁; y círculos blancos (o), muestras estudiadas por neutralización con un banco de sueros de animales inmunizados con la cepa O₁ C/58.

DPI:días post-infección.

celular del material extraído del fluido OP. La mayoría de las muestras que habían resultado positivas por aislamiento en cultivo celular, se analizaron por medio de mapas bidimensionales de oligonucleótidos resistentes a ARNasa T₁ (*fingerprints*). Al menos tres aislamientos (uno correspondiente a etapas tempranas, otro a intermedias, y otro a tardías de la infección) fueron seleccionados de cada bovino para estudiar la secuencia de nucleótidos correspondiente a la principal proteína inmunogénica (VP₁) (Figura 3).

Para simplificar la nomenclatura hemos asignado a cada aislamiento un rótulo compuesto por un número correspondiente al del bovino experimental, separado por una barra de otro número, que representa los días post-infección (DPI) a los cuales se obtuvo la muestra. Así, por ejemplo, el virus 1/35 corresponde al aislamiento obtenido del animal 1 a 35 DPI.

1.2. Variación genómica durante la replicación del virus en bovinos persistentemente infectados

Con el fin de estudiar las variantes genómicas del VFA que surgen durante la replicación del virus en animales persistentemente infectados, así como evaluar la magnitud y los padrones de la variación genómica, se analizaron los mapas

bidimensionales de los fragmentos de ARN resistentes a RNasa T₁ (*fingerprints*). Se llevó a cabo la marcación del ARN viral con ³²P, la extracción del mismo, y la electroforesis bidimensional de los fragmentos resultantes de la digestión con RNasa T₁, para la mayoría de los aislamientos obtenidos secuencialmente a lo largo de la infección de los cuatro animales durante un período de 742 días a partir de la inoculación. Dichos mapas bidimensionales se compararon con el correspondiente a la cepa original O₁ C/58, utilizada para establecer la infección. Esta técnica fue seleccionada ya que permite analizar con precisión las diferencias existentes entre genomas muy relacionados, que presentan aproximadamente 90-95% de homología (Aaronson y cols., 1982).

El ARN heteropolimérico viral contiene una secuencia específica de ribonucleótidos, y su digestión enzimática con ribonucleasa T₁, que hidroliza al ARN en la unión 5' fosfato de residuos guanósina, produce oligonucleótidos de diferentes tamaños y composición de bases. Los oligonucleótidos pequeños, que corresponden a aproximadamente un 90% del genoma son comunes en la mayoría de los genomas, inclusive entre ARNs muy diferentes (Bishop, 1983). Es por ello que en este método el análisis se restringe a los oligonucleótidos grandes, que representan aproximadamente un 10% del genoma total (Clewley y

Bishop, 1982). Cuando estos son sometidos a un campo electroforético, las diferencias de tamaño y de carga se reflejan en una movilidad única para cada oligonucleótido diferente. El número de oligonucleótidos grandes producidos se encuentra en estrecha relación con el tamaño y composición de bases del ARN. El hecho de que existen oligonucleótidos grandes únicos para cada especie de ARN, permite caracterizar cada uno de estos ARNs a partir de los productos obtenidos de la digestión por ribonucleasa.

De esta forma, las diferencias genómicas respecto de la cepa original que puedan surgir en los aislamientos recuperados durante la replicación del virus en el animal, pueden ser evidenciadas en los distintos perfiles de las electroforesis bidimensionales de los respectivos ARNs. Se supone que los cambios observados en las regiones que reproducen los oligonucleótidos únicos, están igualmente distribuidos en el resto del genoma, y así se hace la proyección para la variación genómica total.

El análisis de los *fingerprints* estudiados señala que se han encontrado variaciones entre los ARNs de los aislamientos recuperados de los cuatro bovinos persistentemente infectados. En las figuras 4, 5, 6, y 7 se muestran los mapas de los

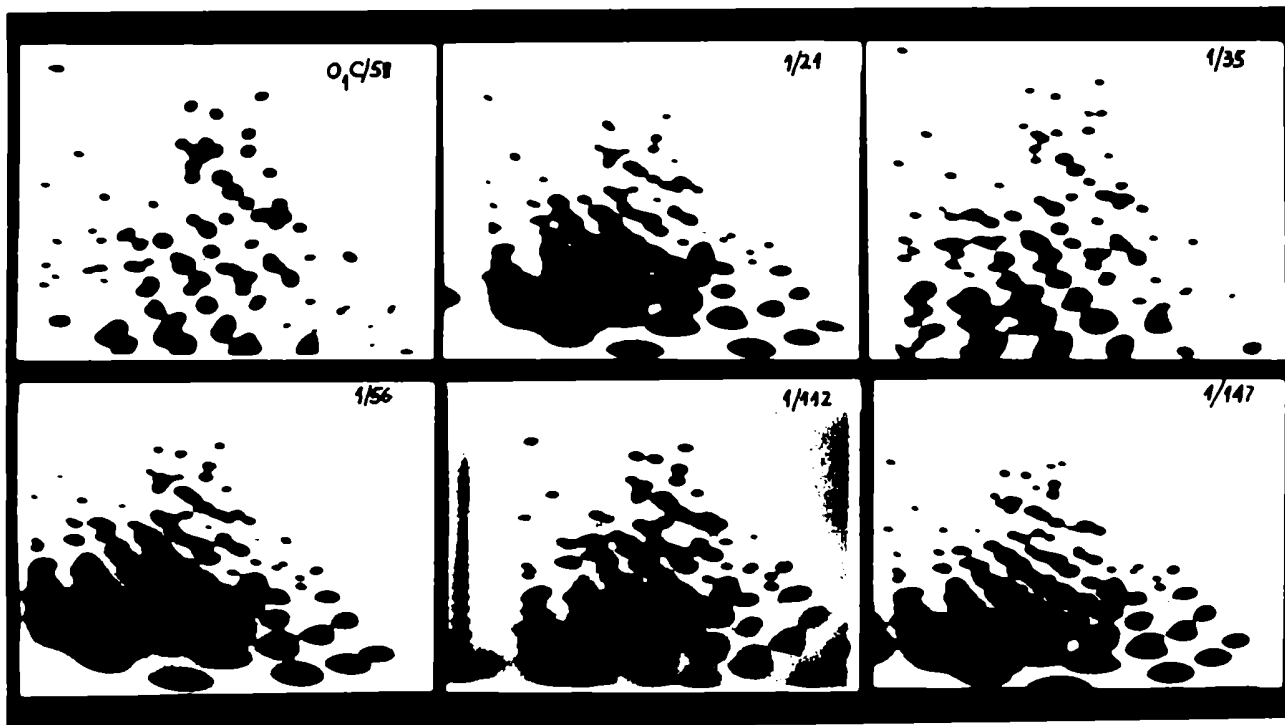


Figura 4. Mapas bidimensionales de los distintos aislamientos recuperados del animal 1.

Autoradiografía de la electroforesis bidimensional de los ARN resistentes a la RNasa T₁ de las cepas indicadas. Las condiciones de marcación y digestión del ARN viral, y las de la electroforesis bidimensional se describen en Materiales y Métodos. Nomenclatura: el número a la izquierda de la barra representa el número del animal; el número a la derecha se refiere a los días post-infección a los cuales se obtuvo la muestra.

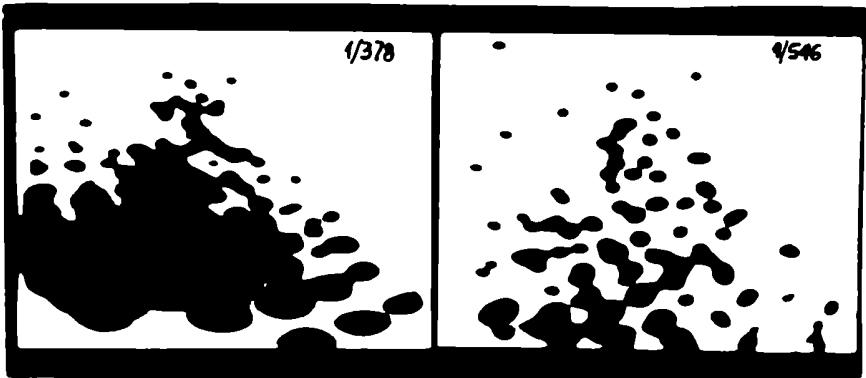
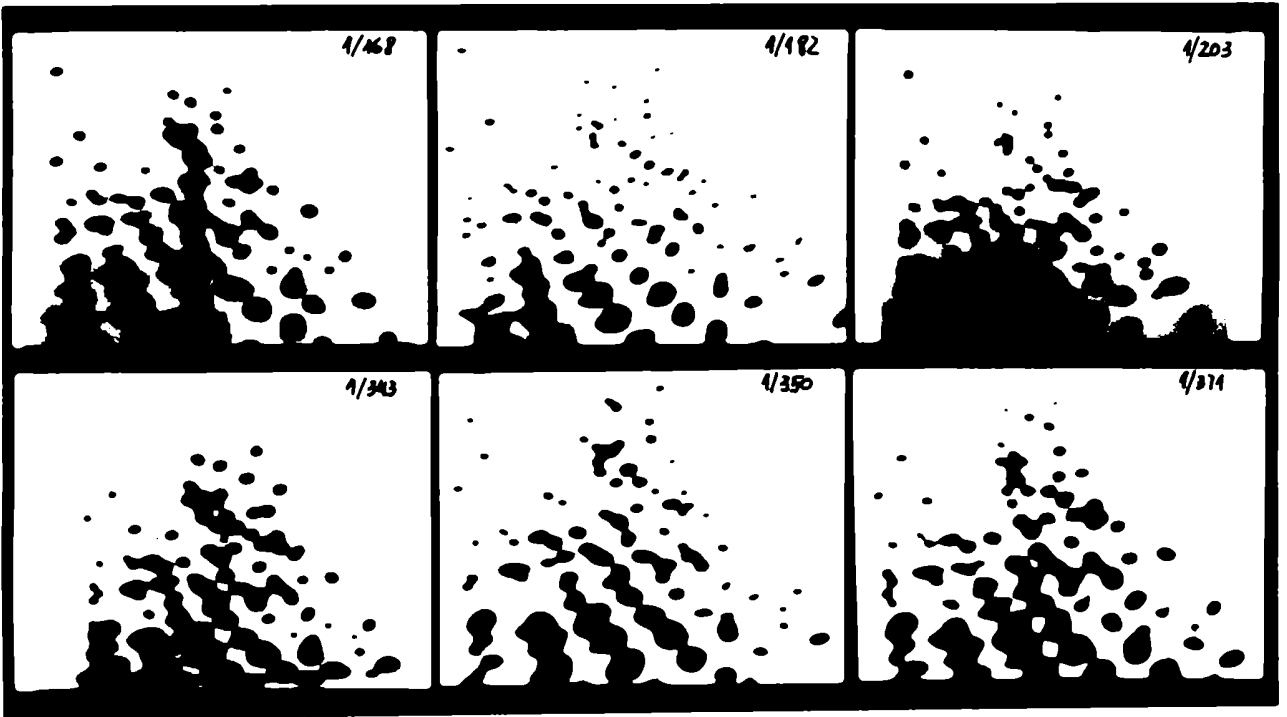


Figura 4. (Cont.)

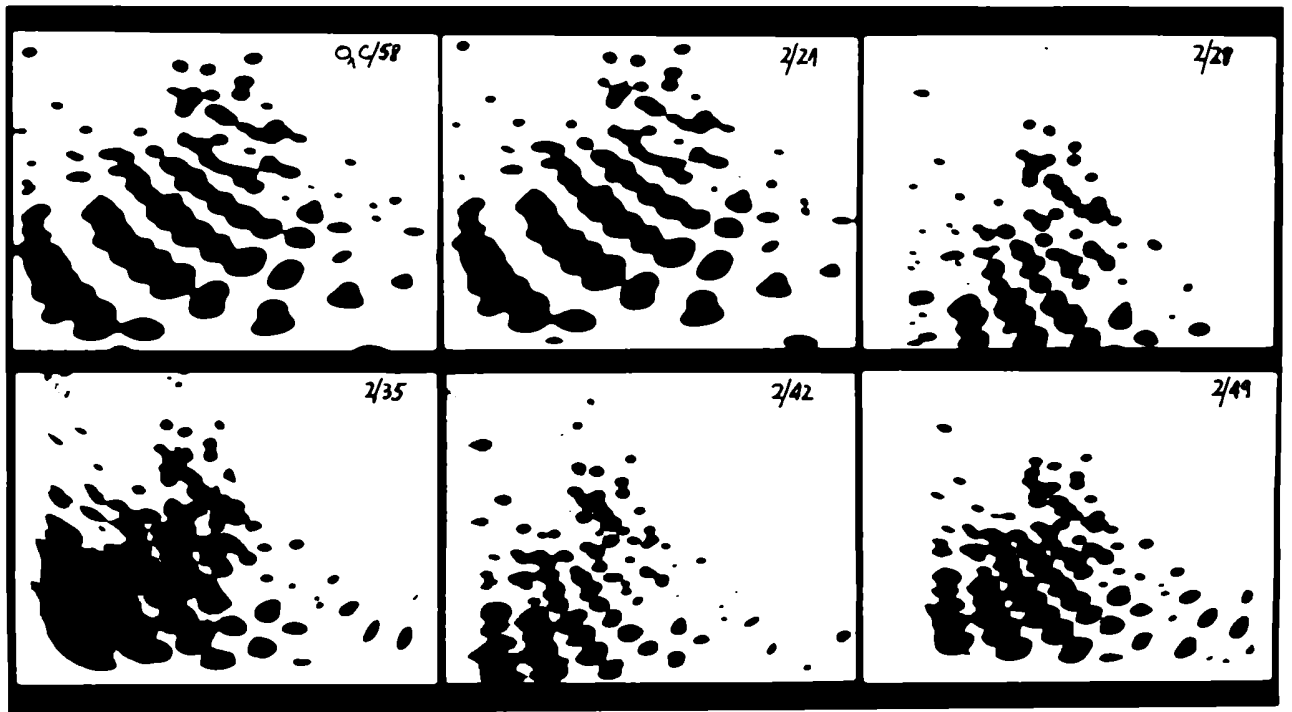


Figura 5. Mapas bidimensionales de los distintos aislamientos recuperados del animal 2.

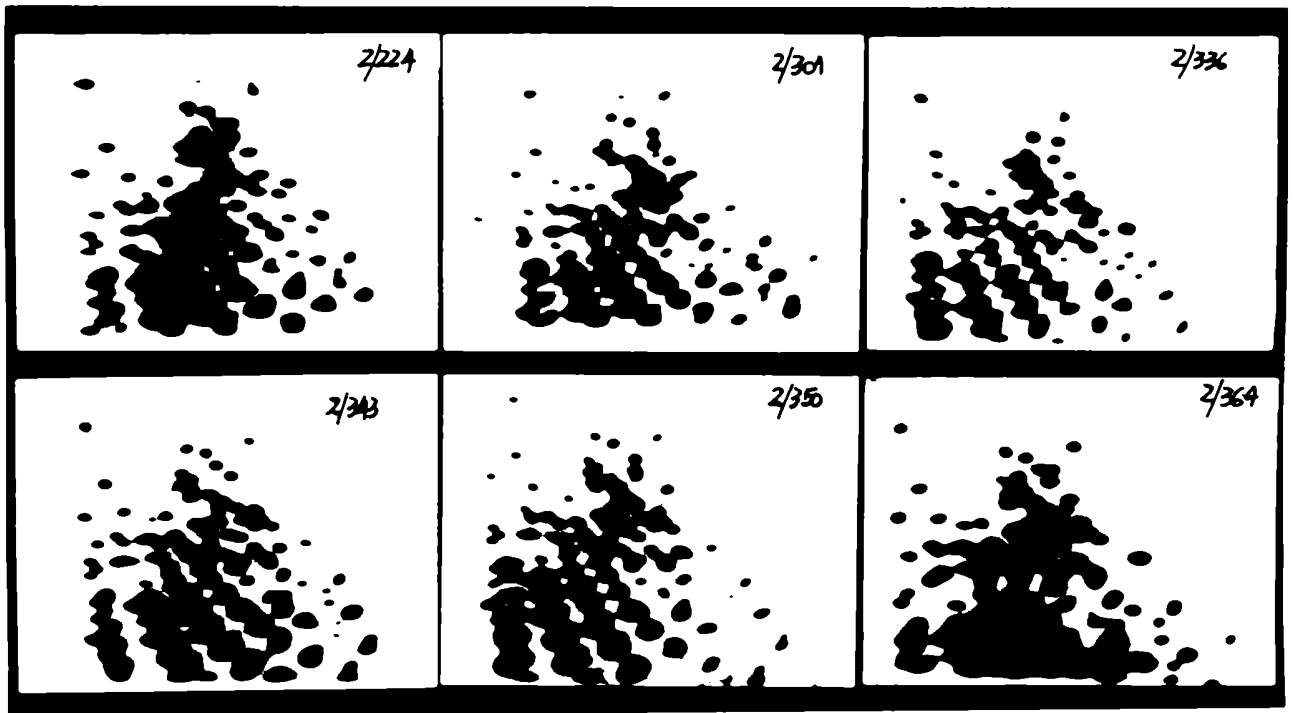
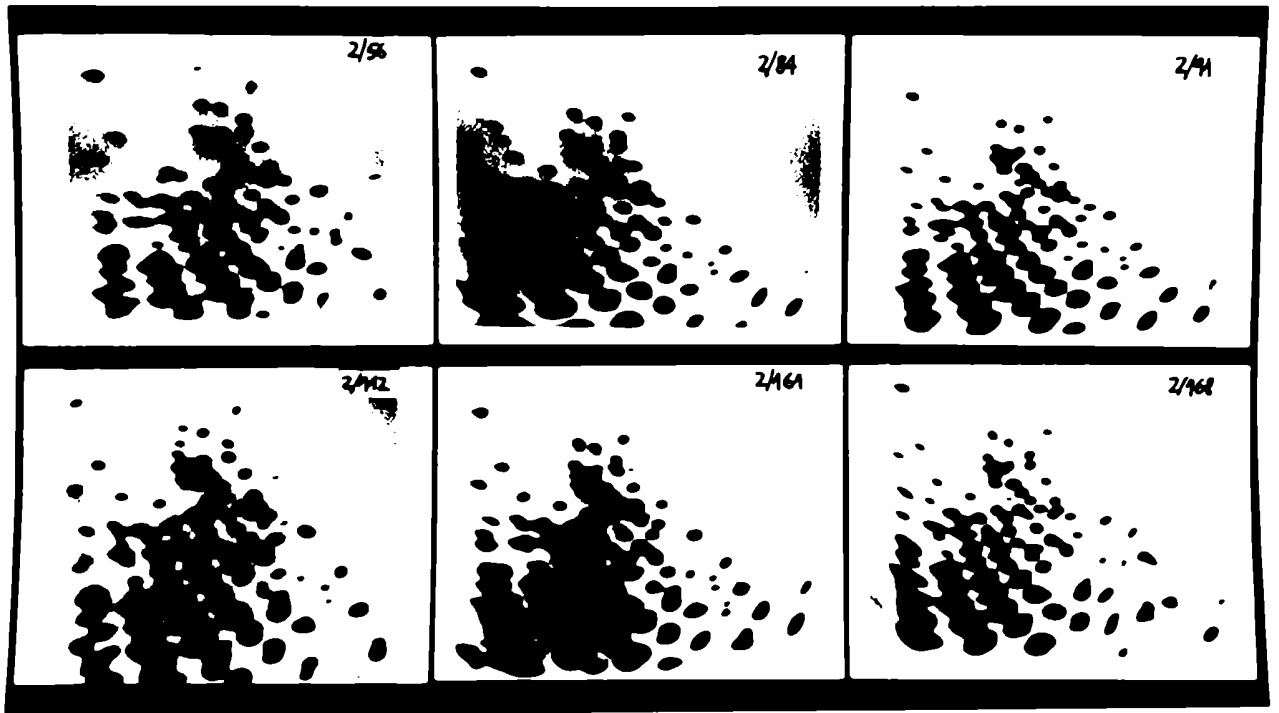


Figura 5. (Cont.)

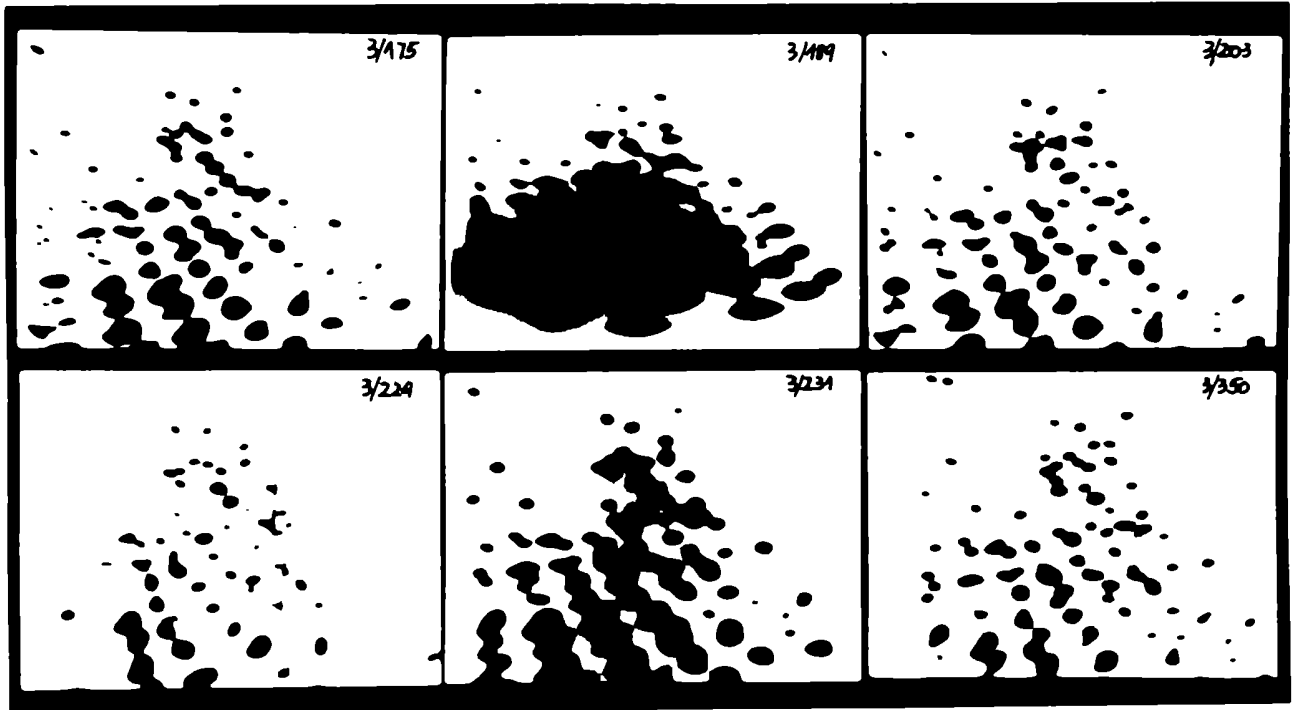
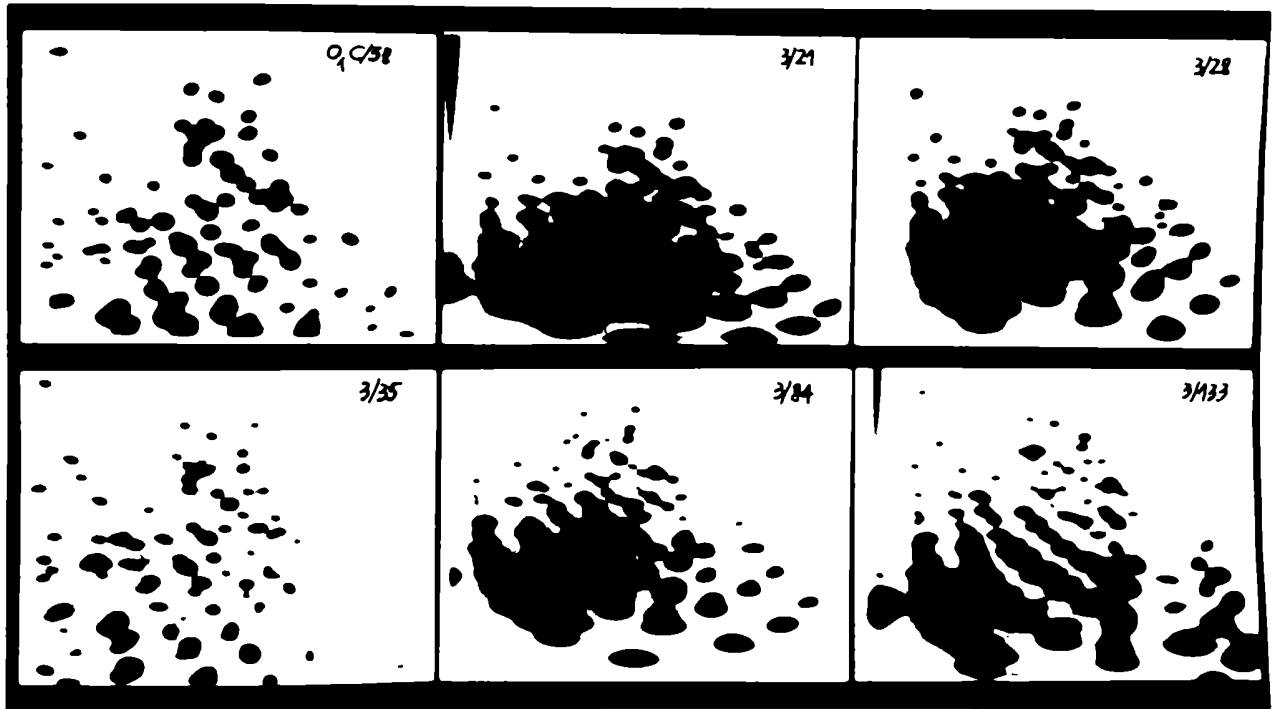


Figura 6. Mapas bidimensionales de los distintos aislamientos recuperados del animal 3.

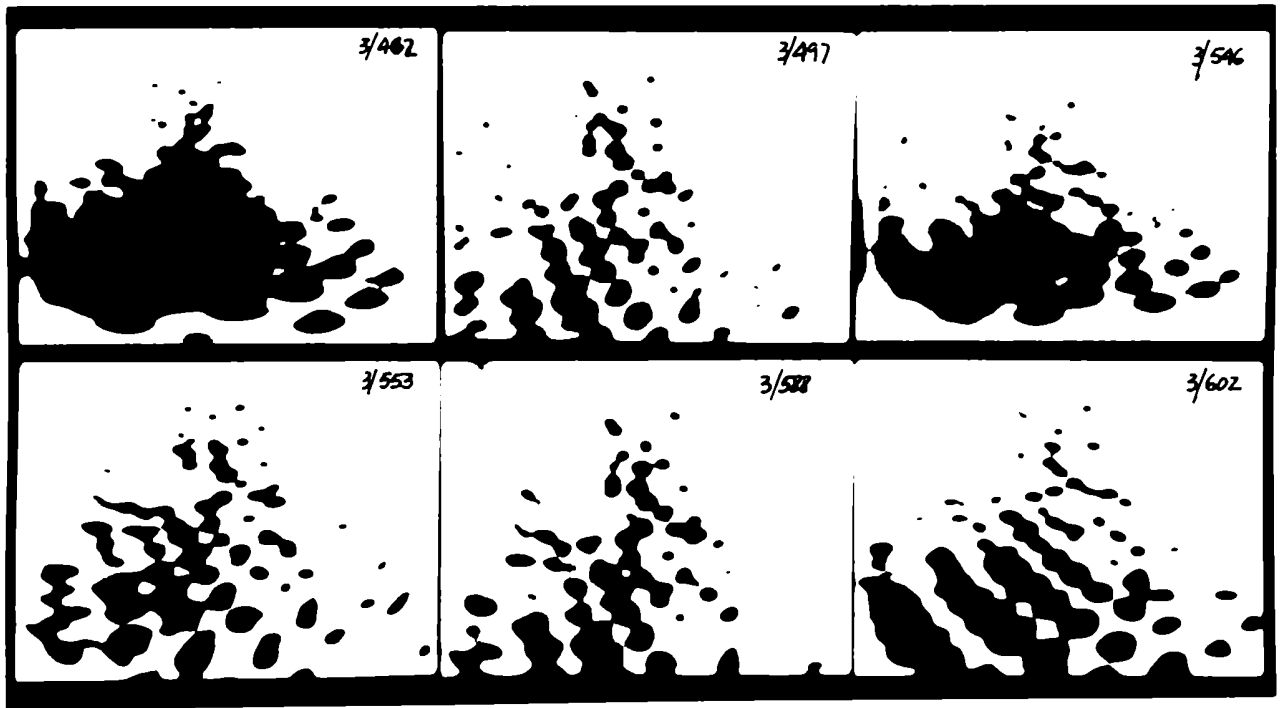


Figura 6. (Cont.)

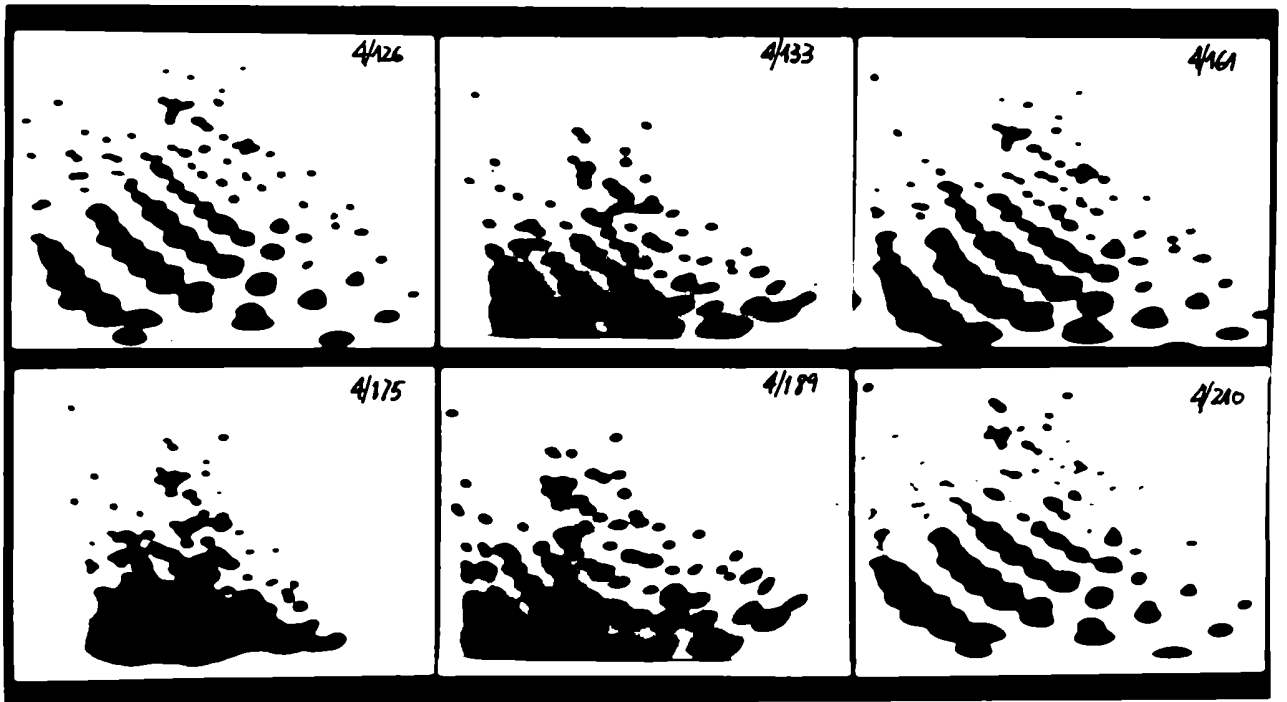
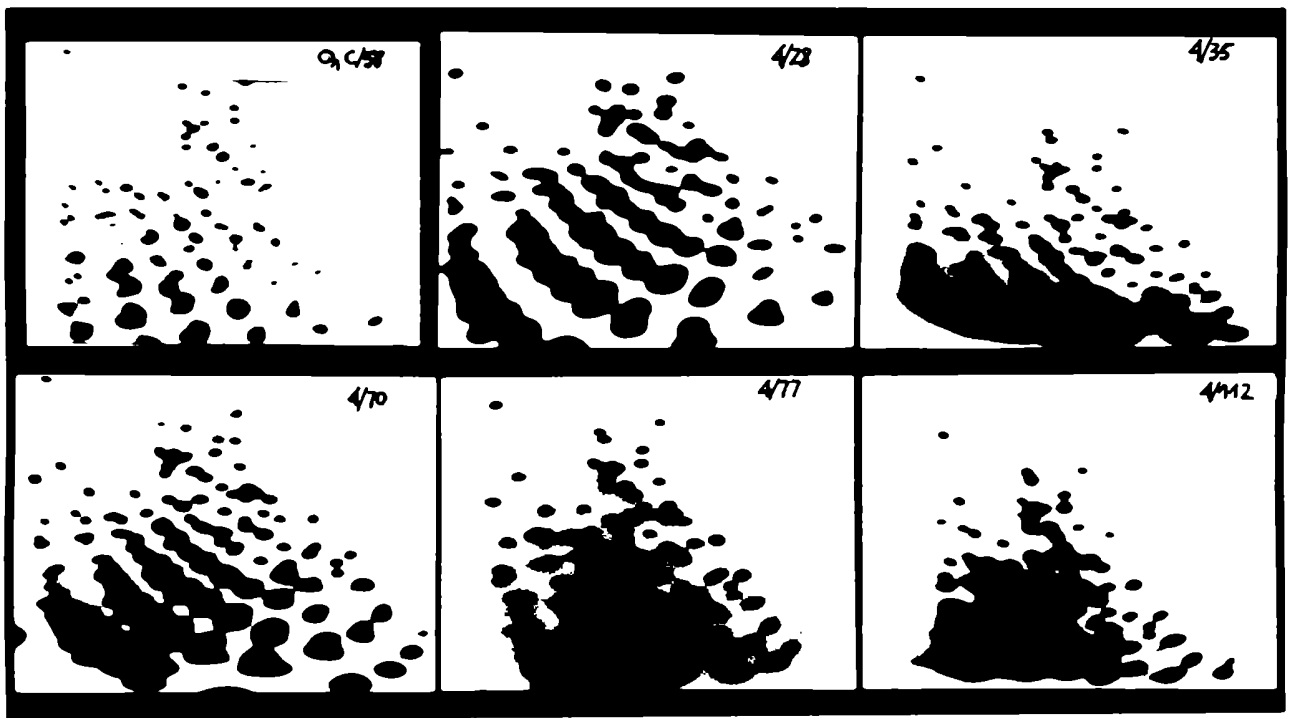


Figura 7. Mapas bidimensionales de los distintos aislamientos recuperados del animal 4.

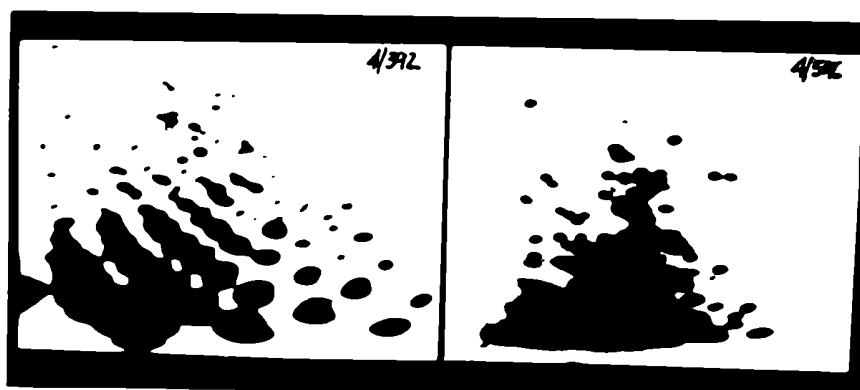
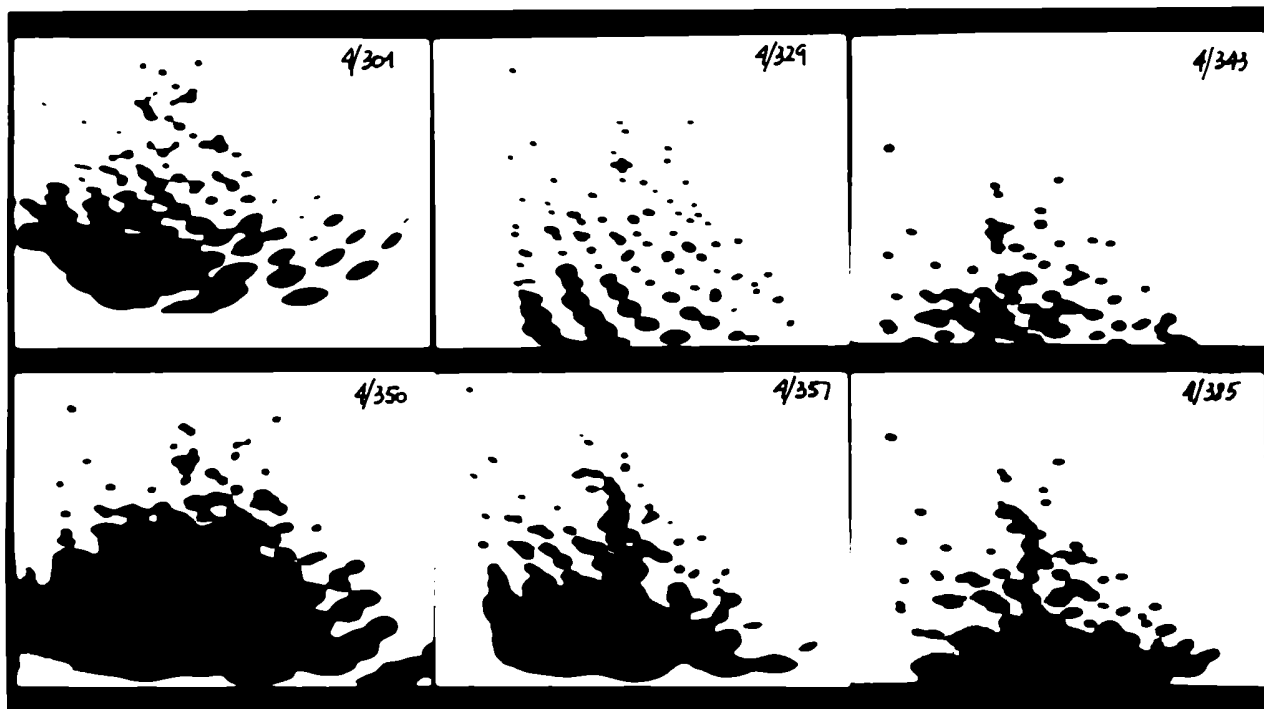


Figura 7. (Cont.)

oligonucleótidos resistentes a la RNasa T₁ de los aislamientos correspondientes a los bovinos 1, 2, 3 y 4 respectivamente, obtenidos secuencialmente a tiempos crecientes luego de la infección.

Los padrones de oligonucleótidos resultantes en cada *fingerprint* fueron comparados con el de la cepa inicial O₁ C/58 y en base a los resultados obtenidos, se construyeron las tablas comparativas que muestran el número de oligonucleótidos adicionales y faltantes, y los porcentajes de variación de cada aislamiento respecto de la cepa inicial (Tablas 3, 4, 5 y 6). También se realizaron los mapas esquemáticos (Figura 8) donde se localizan los oligonucleótidos adicionales y faltantes en los aislamientos correspondientes a cada bovino, detallados en las respectivas tablas. De los 64 oligonucleótidos de la cepa O₁ C/58 considerados para los análisis, 58%, 59%, 64% y 64% permanecieron conservados en todos los aislamientos recuperados de los animales 1, 2, 3 y 4 respectivamente.

Para estimar el mínimo número de cambios de bases de un aislamiento con respecto a la cepa original con la cual fuera inoculado el animal, se ha considerado que una única mutación genómica puede reflejarse en una única modificación en el padrón de oligonucleótidos, ya sea adicional o faltante.

Tabla 3. Catálogo de oligonucleótidos adicionales y faltantes, y porcentaje de variación con respecto a la cepa original O₁ C/58, de los aislamientos recuperados del animal 1.

Oligonucleótidos adicionales

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
1/21																													
1/36																													
1/56																													
1/112																													
1/147																													
1/168																													
1/182																													
1/203																													
1/343																													
1/360																													
1/371																													
1/378																													
1/546																													

Oligonucleótidos faltantes

	1	2	3	5	7	8	9	10	12	14	15	16	16	19	21	22	25	27	30	31	36	39	40	41	47	69	63	(+)	(-)	T	% Var	
1/21																													1	1	1,6	0,2
1/36																													1	1	1,6	0,2
1/56																													0	4	4,0	0,6
1/112																													2	6	7,9	0,9
1/147																													4	4	6,0	0,7
1/168																													2	4	6,0	0,6
1/182																													6	3	6,6	0,8
1/203																													3	6	6,6	0,8
1/343																													6	3	6,6	0,8
1/360																													4	6	8,0	1,0
1/371																													9	6	12,0	1,6
1/378																													4	9	11,0	1,3
1/546																													14	12	20,0	2,4

Se incluyeron sólo los oligonucleótidos en que se registran diferencias. Ver figura 8 para la identificación de oligonucleótidos.

Los cuadrados negros identifican cambios registrados en un único aislamiento, los cuadrados grises muestran cambios que ocurren en más de un aislamiento. Cuadrados blancos: sin modificación.

(+): total de oligonucleótidos adicionales para cada aislamiento

(-): total de oligonucleótidos faltantes para cada aislamiento

T: mínimo número de cambios totales en cada aislamiento, estimado según criterios en Nakajima y cols., 1978.

%Var: porcentaje de variación de cada aislamiento (suponiendo que se analiza un 10% del genoma y que los oligonucleótidos grandes son representativos del genoma completo de 8200 bases. Ver texto para el detalle de cálculos).

Tabla 4. Catálogo de oligonucleótidos adicionales y faltantes con respecto a la cepa original O₁ C/58, en los aislamientos recuperados del animal 2.

Oligonucleótidos adicionales

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	
2/21																																	
2/28																																	
2/35																																	
2/42																																	
2/49																																	
2/56																																	
2/84																																	
2/91																																	
2/112																																	
2/161																																	
2/168																																	
2/224																																	
2/301																																	
2/336																																	
2/343																																	
2/350																																	
2/364																																	

Oligonucleótidos faltantes

	1	2	3	6	8	9	11	12	13	14	16	17	18	24	26	27	28	29	30	32	36	38	41	44	47	49	(+)	(-)	T	% Var
2/21																											0	1	1,0	0,1
2/28																											0	2	2,0	0,2
2/35																											0	2	2,0	0,2
2/42																											2	2	3,0	0,4
2/49																											2	1	2,5	0,3
2/56																											2	3	4,0	0,5
2/84																											2	3	4,0	0,5
2/91																											2	3	4,0	0,5
2/112																											4	2	5,0	0,6
2/161																											4	4	6,0	0,7
2/168																											3	4	5,5	0,7
2/224																											9	7	12,5	1,5
2/301																											8	8	12,0	1,5
2/336																											7	6	10,0	1,2
2/343																											6	7	10,0	1,2
2/350																											6	6	9,0	1,1
2/364																											7	4	9,0	1,1

Tabla 5. Catálogo de oligonucleótidos adicionales y faltantes con respecto a la cepa original O₁ C/58, en los aislamientos recuperados del animal 3.

Oligonucleótidos adicionales

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	
3/21																													
3/28																													
3/36																													
3/84																													
3/133																													
3/176																													
3/189																													
3/203																													
3/224																													
3/231																													
3/360																													
3/462																													
3/497																													
3/546																													
3/553																													
3/566																													
3/602																													
3/630																													
3/644																													

Oligonucleótidos faltantes

	2	4	5	6	8	9	10	11	12	14	18	19	21	22	25	26	27	28	31	34	41	42	63	(+)	(-)	T	% Var	
3/21																									0	0	0	0
3/28																									0	1	1.0	0.1
3/36																									2	2	3.6	0.4
3/84																									3	3	4.5	0.5
3/133																									3	3	4.5	0.5
3/176																									3	2	4.0	0.5
3/189																									4	6	7.0	0.9
3/203																									4	0	4.0	0.5
3/224																									4	4	6.0	0.7
3/231																									4	4	6.0	0.7
3/360																									6	1	6.6	0.7
3/462																									7	9	12.6	1.5
3/497																									6	8	10.6	1.3
3/546																									4	7	9.0	1.1
3/553																									4	6	8.0	1.0
3/566																									6	6	6.6	1.0
3/602																									6	7	10.0	1.2
3/630																									9	9	13.6	1.8
3/644																									8	8	12.0	1.5

Tabla 6. Catálogo de oligonucleótidos adicionales y faltantes con respecto a la cepa original O₁ C/58, en los aislamientos recuperados del animal 4.

Oligonucleótidos adicionales

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
4/28																							
4/36																							
4/70																							
4/77																							
4/112																							
4/126																							
4/133																							
4/161																							
4/175																							
4/189																							
4/210																							
4/301																							
4/329																							
4/343																							
4/350																							
4/367																							
4/385																							
4/392																							
4/546																							

Oligonucleótidos faltantes

	2	4	5	9	11	12	13	14	19	21	22	23	25	29	30	34	37	38	41	43	48	49	56	
4/28																								
4/36																								
4/70																								
4/77																								
4/112																								
4/126																								
4/133																								
4/161																								
4/175																								
4/189																								
4/210																								
4/301																								
4/329																								
4/343																								
4/350																								
4/367																								
4/385																								
4/392																								
4/546																								

(+)	(-)	T	% Var
0	0	0	0
2	2	3.0	0.4
3	1	3.6	0.4
2	3	4.0	0.5
4	5	7.0	0.9
3	2	4.0	0.5
3	4	6.6	0.7
3	2	4.0	0.5
3	4	6.6	0.7
3	2	4.0	0.5
3	5	6.6	0.6
6	5	6.6	1.0
3	6	7.6	0.9
6	5	7.6	0.9
4	7	9.0	1.1
5	7	9.0	1.2
6	9	12.0	1.5
5	9	11.6	1.4
4	6	6.0	1.0

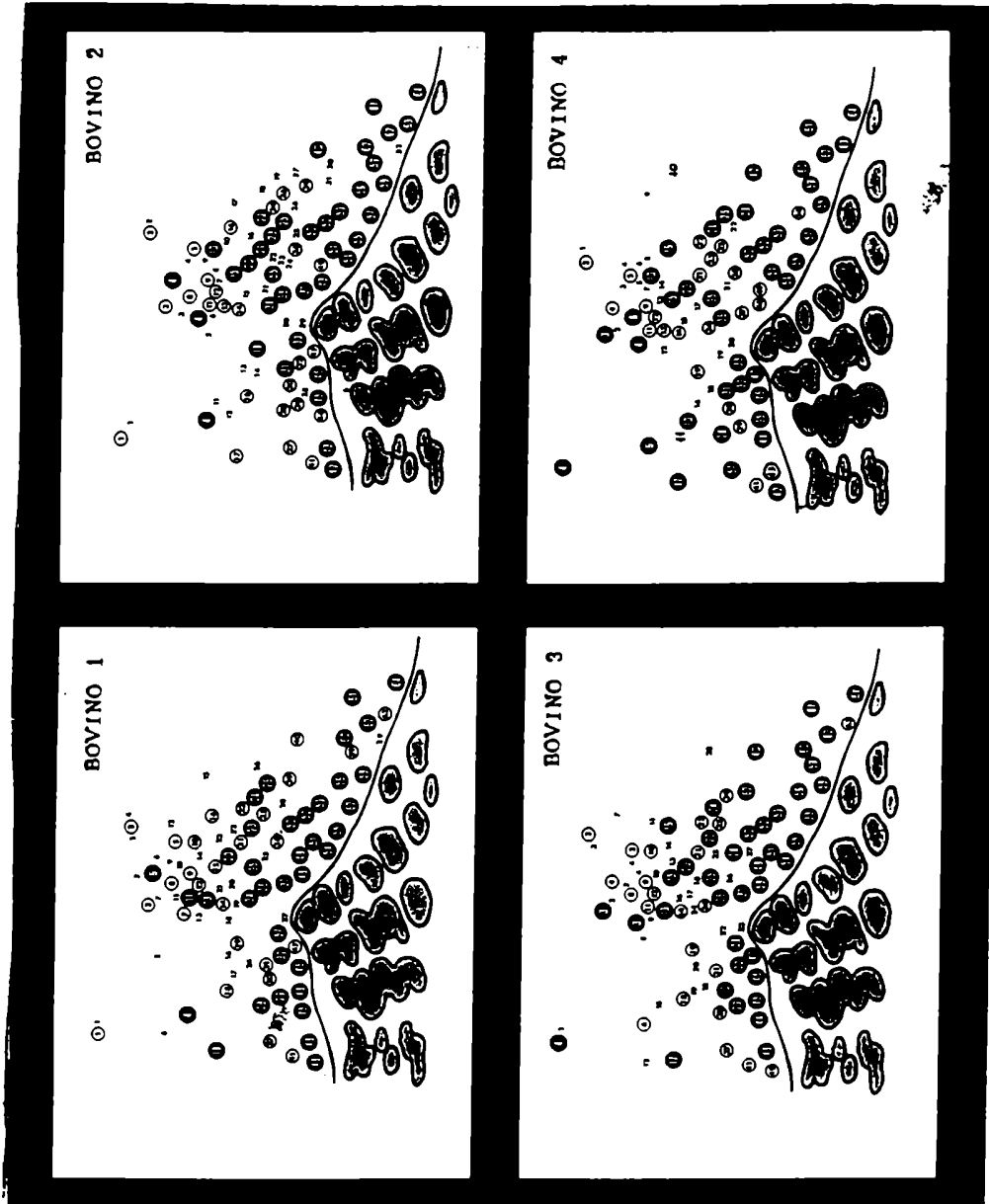


Figura 8. Identificación de oligonucleótidos conservados y variantes en los aislamientos recuperados de los cuatro bovinos

Esquema comparativo de los oligonucleótidos conservados, adicionales y faltantes, detallados en las tablas 3, 4, 5 y 6, correspondientes a los aislamientos obtenidos de los cuatro bovinos respecto de la cepa original O₁ C/58. La identidad de las manchas en los distintos mapas bidimensionales fue confirmada por co-electroforesis de mezclas conteniendo cantidades equivalentes de digestos de RNasa T₁. Para el análisis fueron considerados solamente los oligonucleótidos que se encuentran por encima de la línea negra (64 en la cepa original O₁ C/58). Los círculos negros representan oligonucleótidos invariables presentes en todos los aislamientos. Los círculos blancos corresponden a oligonucleótidos presentes en la cepa O₁ C/58 pero ausentes en al menos uno de los aislamientos del bovino. Los números sin círculo señalan oligonucleótidos adicionales en alguno de los aislamientos. Para la identificación, se asignaron números arbitrarios a cada oligonucleótido, que corresponden a los mostrados en las tablas 3, 4, 5, y 6. Los criterios de análisis fueron aquellos descriptos en Costa Giomi y cols., 1984.

Alternativamente, una mutación puede dar lugar a dos modificaciones simultáneas dadas por un oligonucleótido adicional apareado con uno faltante (Nakajima y cols., 1978). Por lo tanto el número máximo de oligonucleótidos que teóricamente pueden estar apareados (o sea, el menor número entre los valores de oligonucleótidos adicionales o faltantes) se multiplicó por un factor de 1,5, suponiendo que el 50% de los cambios son apareados y se deben a una única mutación, y el otro 50% a dos mutaciones independientes. Al valor así obtenido se le sumó el número de cambios no apareados (o sea, la diferencia entre oligonucleótidos adicionales y faltantes). Considerando que estos cambios representan un 10% del genoma viral (Domingo y cols., 1980), se estima la variación total, suponiendo que los mismos se distribuyen en forma homogénea a lo largo del genoma. El porcentaje de variación se calcula considerando un genoma de 8200 bases.

Como puede observarse en las figuras 4, 5, 6 y 7 , así como en las tablas 3, 4, 5 y 6, los genomas virales no sufrieron mutaciones masivas, sino de un número discreto de oligonucleótidos. En general, se observó que existe una relación directa entre el grado de variación observado y el tiempo transcurrido desde el inicio de la infección, lo que sugiere una continua y gradual modificación de la población

durante el estado persistente. Esto se resume en el gráfico del porcentaje de variación en función del tiempo, en la Figura 9. Para el bovino 1 se observa un rango de variación respecto de la cepa O₁ C/58 con valores que oscilan entre 0,2% y 2,4%. Para los otros animales estos valores se extendieron desde 0,1% hasta 1,5% (bovino 2), desde 0% hasta 1,6% (bovino 3) y desde 0% hasta 1,5% (bovino 4).

A pesar de que en general se observa un aumento en el porcentaje de variabilidad a medida que aumenta el tiempo postinfección, frecuentemente se observaron fluctuaciones como muestra el ejemplo del aislamiento 3/546, el cual, a pesar de recuperarse 49 días más tarde que el aislamiento 3/497, presenta un porcentaje de variación menor (1,3% el 3/497, y 1,1% el 3/546). Este y otros ejemplos semejantes pueden observarse en la Figura 9.

A partir del valor de variación total obtenido para cada aislamiento, se calcularon los valores de sustitución por nucleótido por año (st/n/a) respecto de la cepa original O₁ C/58, suponiendo que el valor total de cambios (calculado según fuera descrito anteriormente) refleja mutaciones puntuales. Los resultados muestran, en general, mayores valores de tasa de mutación en las fases tempranas de la persistencia,

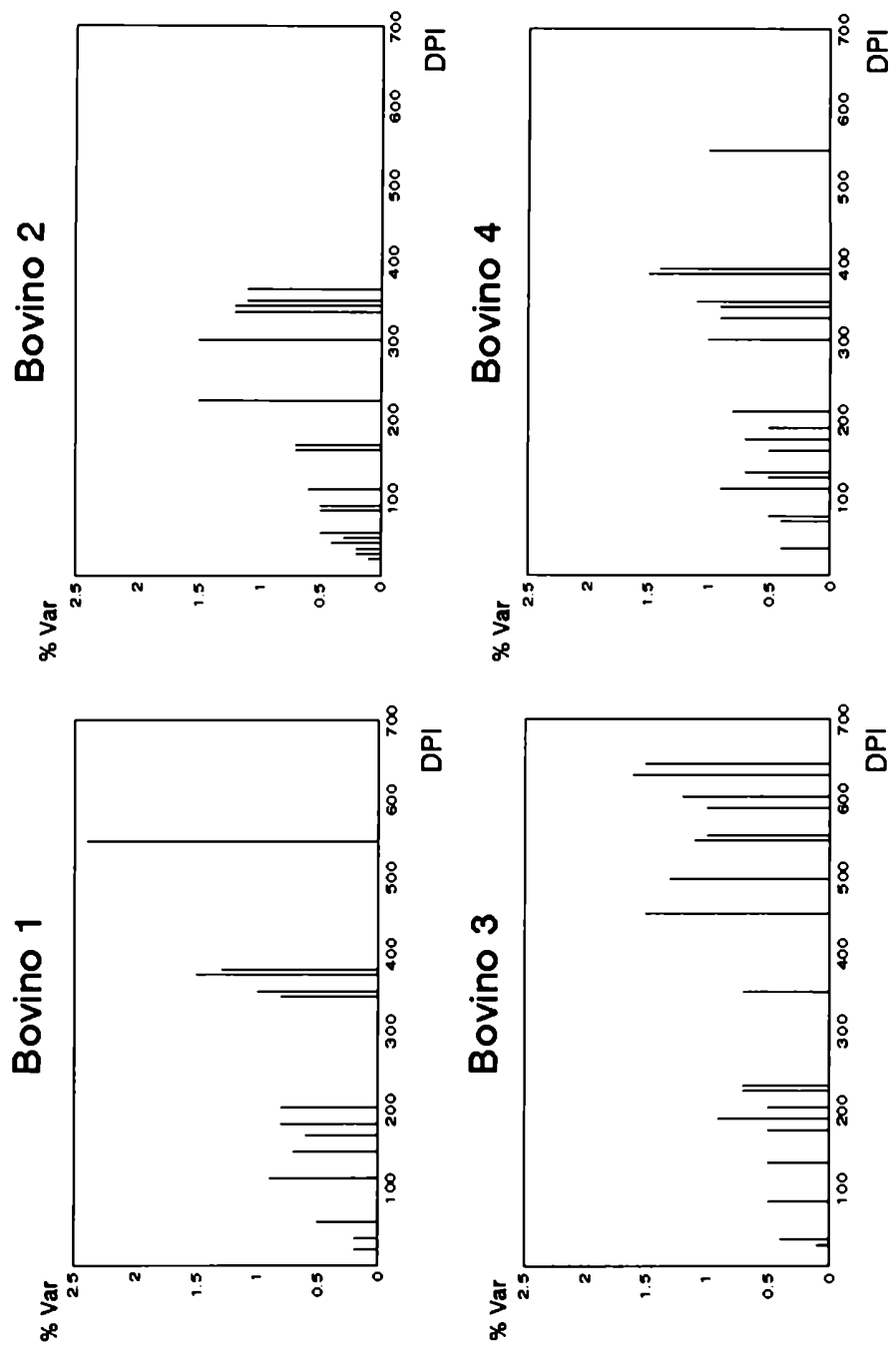


Figura 9. Porcentaje de variación de los distintos aislamientos correspondientes a cada animal con respecto a la cepa O₁ C/58, en función del tiempo.

Los valores de porcentaje de variación (% Var) son los calculados en las tablas 3, 4, 5, y 6 para cada bovino. DPI: días post-infección.

posiblemente debido a una mayor replicación viral y/o selección de mutantes durante estas fases (Tabla 7).

El análisis de los padrones de mutación reveló un número sustancial de cambios únicos. De hecho, 46%, 52%, 43% y 44% de las modificaciones registradas en los animales 1, 2, 3 y 4, respectivamente, ocurrieron en un único aislamiento correspondiente a cada animal. Algunas alteraciones se repetían, aunque con poca frecuencia en muestras consecutivas. Inclusive, cuando aparecían cambios conservados en aislamientos subsecuentes, raras veces los mismos se mantenían en todos ellos (tablas 3, 4, 5, y 6). Estos resultados sugieren que las poblaciones virales presentes en los fluidos OP fluctúan durante la infección y no parecen surgir a partir de cambios conservados acumulados en el tiempo.

Esto se ilustra mejor en las comparaciones apareadas entre todos los aislamientos recuperados de un mismo animal (tablas 8, 9, 10 y 11). En los virus obtenidos de los cuatro bovinos puede observarse que el porcentaje de variación registrado entre dos genomas, no es siempre proporcional al tiempo transcurrido entre los dos aislamientos. Por ejemplo, los aislamientos 1/343 y 1/350, recuperados con un intervalo de una semana, difieren entre sí en un porcentaje de variación de

Tabla 7. Valores de sustituciones de nucleótido por año (st/n/a), calculados a partir de los mapas bidimensionales correspondientes a los aislamientos indicados

BOVINO 1		BOVINO 2		BOVINO 3		BOVINO 4	
aislam.	st/n/a	aislam.	st/n/a	aislam.	st/n/a	aislam.	st/n/a
1/21	3.5 10 ⁻²	2/21	1.7 10 ⁻²	3/21	0	4/28	0
1/35	2.1 10 ⁻²	2/28	2.6 10 ⁻²	3/28	1.3 10 ⁻²	4/35	4.2 10 ⁻²
1/56	3.3 10 ⁻²	2/35	2.1 10 ⁻²	3/35	4.2 10 ⁻²	4/70	2.1 10 ⁻²
1/112	2.9 10 ⁻²	2/42	3.5 10 ⁻²	3/84	2.2 10 ⁻²	4/77	2.4 10 ⁻²
1/147	1.7 10 ⁻²	2/49	2.2 10 ⁻²	3/133	1.4 10 ⁻²	4/112	2.9 10 ⁻²
1/168	1.3 10 ⁻²	2/56	3.3 10 ⁻²	3/175	1.0 10 ⁻²	4/126	1.4 10 ⁻²
1/182	1.6 10 ⁻²	2/84	2.2 10 ⁻²	3/189	1.7 10 ⁻²	4/133	1.9 10 ⁻²
1/203	1.4 10 ⁻²	2/91	2.0 10 ⁻²	3/203	0.9 10 ⁻²	4/161	1.1 10 ⁻²
1/343	0.9 10 ⁻²	2/112	2.0 10 ⁻²	3/224	1.1 10 ⁻²	4/175	1.5 10 ⁻²
1/350	1.0 10 ⁻²	2/161	1.6 10 ⁻²	3/231	1.1 10 ⁻²	4/189	1.0 10 ⁻²
1/371	1.5 10 ⁻²	2/168	1.5 10 ⁻²	3/350	0.7 10 ⁻²	4/210	1.4 10 ⁻²
1/378	1.3 10 ⁻²	2/224	2.4 10 ⁻²	3/462	1.2 10 ⁻²	4/301	1.2 10 ⁻²
1/546	1.6 10 ⁻²	2/301	1.8 10 ⁻²	3/497	1.0 10 ⁻²	4/329	1.0 10 ⁻²
		2/336	1.3 10 ⁻²	3/546	0.7 10 ⁻²	4/343	1.0 10 ⁻²
		2/343	1.3 10 ⁻²	3/553	0.7 10 ⁻²	4/350	1.1 10 ⁻²
		2/350	1.1 10 ⁻²	3/588	0.6 10 ⁻²	4/357	1.2 10 ⁻²
		2/364	1.1 10 ⁻²	3/602	0.7 10 ⁻²	4/385	1.4 10 ⁻²
				3/630	0.9 10 ⁻²	4/392	1.3 10 ⁻²
				3/644	0.9 10 ⁻²	4/546	0.7 10 ⁻²

1,4%, mientras que la variación observada entre el 1/21 y el 1/343 (0,8%) resulta mucho menor, a pesar de haber sido recuperados con una diferencia de 46 semanas. Ejemplos semejantes pueden observarse entre los pares 2/336:2/343 (una semana, 2,1% de variación) y 2/42:2/336 (42 semanas, 1,1% de variación) en el bovino 2; los pares 3/462:3/497 (cinco semanas, 2,0% de variación) y 3/224:3/462 (34 semanas, 1,3% de variación) en el bovino 3 y los pares 4/301:4/329 (cuatro semanas, 1,7% de variación) y 4/35:4/329 (42 semanas, 0,5% de variación) en el bovino 4. Asimismo, la estimación de la tasa de mutación resultó extremadamente alta en algunas ocasiones en que el cálculo se realizó entre dos aislamientos correspondientes a tiempos muy cercanos. Por ejemplo, se obtuvo un valor de 1,2 st/n/año cuando se compararon las muestras 1/371 y 1/378, recuperadas con una semana de diferencia. Otros ejemplos son: las muestras 2/336 y 2/343 (1,1 st/n/año) en el bovino 2, las muestras 3/546 y 3/553 (0,6 st/n/año) en el bovino 3, y las muestras 4/385 y 4/392 (0,5 st/n/año) en el bovino 4. Estas observaciones sugieren que las variaciones observadas entre dos genomas consecutivos, no surgen de la acumulación sucesiva de cambios.

Los porcentajes de variación máxima registrada entre muestras recuperadas de un mismo animal fueron de 2,9% para el

Tabla 8. Comparaciones apareadas entre los mapas bidimensionales de todos los aislamientos correspondientes al bovino 1.

	01C/58	1/21	1/35	1/56	1/112	1/147	1/168	1/182	1/203	1/343	1/350	1/371	1/378	1/546
01C/58		0.2	0.2	0.5	0.9	0.7	0.6	0.8	0.8	0.8	1.0	1.5	1.3	2.4
1/21	1.5		0.2	0.5	0.9	0.7	0.6	0.8	0.8	0.8	1.0	1.5	1.5	2.6
1/35	1.5	1.5		0.5	0.9	0.7	0.6	0.8	0.8	0.8	1.0	1.5	1.5	2.6
1/56	4.0	4.0	4.0		0.5	1.0	0.8	0.9	1.0	1.1	1.2	1.8	1.2	2.9
1/112	7.0	7.0	7.0	4.0		1.0	1.2	0.9	0.8	1.5	1.2	2.0	1.6	2.9
1/147	6.0	6.0	6.0	8.5	8.5		1.0	0.8	0.8	1.2	1.5	1.5	1.9	2.8
1/168	5.0	5.0	5.0	6.5	9.5	8.0		1.0	0.9	0.9	1.1	1.5	1.5	2.5
1/182	6.5	6.5	6.5	7.5	7.5	6.5	8.5		0.7	0.9	1.6	1.6	1.6	2.9
1/203	6.5	6.5	6.5	8.0	6.5	6.5	7.5	5.5		1.0	1.5	1.7	1.5	2.7
1/343	6.5	6.5	6.5	9.0	12.0	9.5	7.0	7.5	8.5		1.4	1.4	2.0	2.4
1/350	8.0	8.0	8.0	9.5	9.5	12.5	9.0	13.0	12.0	11.5		2.1	2.2	2.7
1/371	12.0	12.0	12.0	14.5	16.0	12.0	12.5	13.0	14.0	11.5	17.0		2.3	2.3
1/378	11.0	12.5	12.5	10.0	13.0	15.5	12.0	13.0	12.0	16.0	18.0	18.5		2.7
1/546	20.0	21.5	21.5	24.0	24.0	23.0	20.5	24.0	22.0	19.5	22.0	19.0	22.0	

Nota: el mínimo número de cambios totales (inferior-izquierda) así como el porcentaje de variación (superior-derecha) entre los aislamientos se calcularon como fuera detallado en el texto y en la tabla 3.

Tabla 9. Comparaciones apareadas entre los mapas bidimensionales de todos los aislamientos correspondientes al bovino 2.

	01C/58	2/21	2/28	2/35	2/42	2/49	2/56	2/84	2/91	2/112	2/161	2/168	2/224	2/301	2/336	2/343	2/350	2/364
01C/58		0.1	0.2	0.2	0.4	0.3	0.5	0.5	0.5	0.6	0.7	0.7	1.5	1.5	1.2	1.2	1.1	1.1
2/21	1.0		0.1	0.1	0.3	0.2	0.4	0.4	0.4	0.6	0.7	0.6	1.5	1.4	1.2	1.1	1.0	1.2
2/28	2.0	1.0		0.2	0.4	0.4	0.5	0.5	0.5	0.7	0.8	0.7	1.6	1.5	1.3	1.2	1.2	1.3
2/35	2.0	1.0	1.5		0.4	0.4	0.5	0.5	0.5	0.7	0.8	0.7	1.6	1.5	1.3	1.2	1.2	1.3
2/42	3.0	2.5	3.5	3.5		0.3	0.5	0.7	0.7	0.8	0.9	0.9	1.7	1.5	1.1	1.2	1.1	1.3
2/49	2.5	2.0	3.0	3.0	2.5		0.4	0.6	0.6	0.5	0.9	0.8	1.6	1.4	1.4	1.2	1.2	1.2
2/56	4.0	3.0	4.0	4.0	4.0	3.5		0.7	0.7	0.9	1.0	0.9	1.8	1.4	1.6	1.3	1.4	1.4
2/84	4.0	3.0	4.0	4.0	5.5	5.0	6.0		0.6	0.9	0.9	0.7	1.8	1.8	1.6	1.5	1.4	1.6
2/91	4.0	3.0	4.0	4.0	5.5	5.0	6.0	4.5		0.7	0.7	0.6	1.6	1.6	1.4	1.1	1.2	1.6
2/112	5.0	4.5	5.5	5.5	6.5	4.0	7.5	7.5	6.0		1.0	0.9	1.5	1.7	1.5	1.5	1.3	1.4
2/161	6.0	5.5	6.5	6.5	7.5	7.0	8.5	7.0	5.5	8.0		0.9	1.5	1.3	1.5	1.4	1.3	1.5
2/168	5.5	4.5	5.5	5.5	7.0	6.5	7.5	6.0	4.5	7.5	7.0		1.5	1.8	1.6	1.1	1.0	1.4
2/224	12.5	12.0	13.0	13.0	14.0	13.0	15.0	15.0	13.5	12.0	12.5	2.0		2.1	2.3	1.5	1.5	1.8
2/301	12.0	11.5	12.5	12.5	12.0	11.5	11.5	14.5	13.0	14.0	10.5	4.5	17.0		2.4	1.6	1.3	2.0
2/336	10.0	11.0	12.0	12.0	10.0	12.0	14.0	14.0	12.5	13.0	13.0	4.0	19.0	20.5		2.1	1.8	1.9
2/343	10.0	9.0	10.0	10.0	10.0	9.5	10.5	12.0	9.0	12.0	11.5	9.0	12.0	13.0	18.5		0.9	1.0
2/350	9.0	8.5	9.5	9.5	9.0	10.0	11.5	11.5	10.0	11.0	10.5	8.5	12.5	10.5	16.0	7.0		1.5
2/364	9.0	10.0	11.0	11.0	10.5	9.5	11.5	13.0	13.0	11.5	12.0	1.5	14.5	15.5	15.5	6.5	11.0	

Nota: el mínimo número de cambios totales (inferior-izquierda) así como el porcentaje de variación (superior-derecha) entre los aislamientos se calcularon como fuera detallado en el texto y en la tabla 3.

Tabla 10. Comparaciones apareadas entre los mapas bidimensionales de todos los aislamientos correspondientes al bovino 3.

	01C/58	3/21	3/28	3/35	3/84	3/133	3/175	3/189	3/203	3/224	3/231	3/350	3/462	3/497	3/546	3/553	3/588	3/602	3/630	3/644
01C/58	0	0.1	0.4	0.5	0.5	0.5	0.5	0.9	0.5	0.7	0.7	0.7	1.5	1.3	1.1	1.0	1.0	1.2	1.6	1.5
3/21	0	0.1	0.4	0.5	0.5	0.5	0.5	0.9	0.5	0.7	0.7	0.7	1.5	1.3	1.1	1.0	1.0	1.2	1.6	1.5
3/28	1.0	1.0	0.3	0.5	0.5	0.6	0.7	0.6	0.9	0.9	0.8	1.6	1.3	1.2	0.9	1.1	1.3	1.6	1.4	
3/35	3.0	3.0	2.5	0.7	0.5	0.9	1.0	0.7	1.1	1.1	1.0	1.7	1.6	1.5	1.2	1.4	1.6	1.8	1.5	
3/84	4.5	4.5	4.0	6.0	0.9	1.0	1.2	1.0	1.3	1.3	1.2	1.9	1.6	1.5	1.3	1.4	1.6	1.8	1.6	
3/133	4.5	4.5	4.0	4.5	7.5	0.9	1.0	0.7	0.9	0.9	1.0	1.5	1.8	1.5	1.2	1.4	1.8	2.0	1.6	
3/175	4.0	4.0	5.0	7.0	8.5	7.0	1.2	0.5	0.7	0.7	0.5	1.5	1.2	1.2	0.9	1.0	1.2	1.6	1.6	
3/189	7.0	7.0	6.0	8.5	10.0	8.5	9.5	1.0	1.4	1.4	1.3	1.8	1.3	1.7	1.2	1.6	1.6	1.6	1.6	
3/203	4.0	4.0	5.0	5.5	8.5	5.5	4.5	8.0	0.9	0.9	0.5	1.6	1.6	1.4	1.1	1.3	1.5	1.8	1.6	
3/224	6.0	6.0	7.0	9.0	10.5	7.5	5.5	11.5	7.0	0	0.9	1.3	1.5	1.3	1.2	1.2	1.4	1.8	1.6	
3/231	6.0	6.0	7.0	9.0	10.5	7.5	5.5	11.5	7.0	0	0.9	1.3	1.5	1.3	1.2	1.2	1.4	1.8	1.6	
3/350	5.5	5.5	6.5	8.5	10.0	8.5	4.5	11.0	4.5	7.0	7.0	1.3	1.4	1.2	1.1	1.2	1.3	2.0	1.4	
3/462	2.5	12.5	13.0	14.0	15.5	12.5	12.0	14.5	13.5	11.0	11.0	10.5	2.0	1.8	1.8	1.8	2.1	2.6	2.3	
3/497	0.5	10.5	11.0	13.5	13.5	15.0	10.0	11.0	13.0	12.0	12.0	11.5	16.0	0.7	1.4	0.6	0.8	1.1	0.9	
3/546	9.0	9.0	9.5	12.0	12.0	12.0	10.0	14.0	11.5	10.5	10.5	10.0	14.5	6.0	1.2	0.2	0.8	1.3	0.7	
3/553	8.0	8.0	7.0	9.5	11.0	9.5	7.5	10.0	9.0	9.5	9.5	9.0	15.0	11.5	10.0	1.2	1.6	1.7	1.5	
3/588	8.5	8.5	9.0	11.5	11.5	11.5	8.0	13.5	11.0	10.0	10.0	9.5	14.5	5.0	2.0	10.0	0.7	1.2	0.9	
3/602	10.0	10.0	10.5	13.0	13.0	14.5	9.5	13.5	12.5	11.5	11.5	11.0	17.5	6.5	6.5	13.0	6.0	1.4	0.9	
3/630	13.5	13.5	13.0	15.0	15.0	16.5	13.0	13.0	14.5	15.0	15.0	16.0	21.5	9.0	10.5	14.0	10.0	11.5	1.1	
3/644	12.0	12.0	11.5	12.0	13.5	13.5	13.0	13.0	13.0	13.5	13.5	11.5	18.5	7.5	6.0	12.5	7.0	7.0	9.0	

Nota: el mínimo número de cambios totales (inferior-izquierda) así como el porcentaje de variación (superior-derecha) entre los aislamientos se calcularon como fuera detallado en el texto y en la tabla 3.

Tabla 11. Comparaciones apareadas entre los mapas bidimensionales de todos los aislamientos correspondientes al bovino 4.

	01C/58	4/28	4/35	4/70	4/77	4/112	4/126	4/133	4/161	4/175	4/189	4/210	4/301	4/329	4/343	4/350	4/357	4/385	4/392	4/546
01C/58	0	0.4	0.4	0.5	0.9	0.5	0.7	0.5	0.7	0.5	0.8	1.0	0.9	0.9	1.1	1.2	1.5	1.4	1.1	
4/28	0	0.4	0.4	0.5	0.9	0.5	0.7	0.5	0.7	0.5	0.8	1.0	0.9	0.9	1.1	1.2	1.5	1.4	1.1	
4/35	3.0	3.0	0.4	0.1	0.5	0.5	0.3	0.5	0.3	0.8	0.4	1.4	0.5	0.5	0.7	0.8	1.1	1.0	1.1	
4/70	3.5	3.5	3.5	0.6	0.9	0.5	0.7	0.5	0.7	0.9	0.9	1.4	1.0	1.0	1.0	1.2	1.5	1.3	1.5	
4/77	4.0	4.0	1.0	4.5	0.6	0.6	0.4	0.6	0.4	1.0	0.5	1.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.2	1.1	1.2	
4/112	7.0	7.0	4.0	7.5	4.5	1.0	0.6	1.0	0.4	1.3	0.5	1.9	0.8	0.9	1.2	1.2	1.2	1.5	1.5	
4/126	4.0	4.0	4.0	4.0	5.0	8.0	0.8	0.6	0.8	0.9	0.9	1.5	1.0	1.0	1.2	1.1	1.6	1.3	1.6	
4/133	5.5	5.5	2.5	6.0	3.0	4.5	6.5	0.8	0.6	1.0	0.7	1.5	0.6	0.9	0.8	1.0	1.2	1.1	1.2	
4/161	4.0	4.0	4.0	4.0	5.0	8.0	4.5	6.5	0.8	0.9	0.9	1.5	1.0	1.0	1.3	1.3	1.4	1.5	1.4	
4/175	5.5	5.5	2.5	6.0	3.0	3.0	6.5	4.5	6.5	1.0	0.1	1.5	0.4	0.7	0.8	0.9	0.8	1.1	1.3	
4/189	4.0	4.0	7.0	7.0	8.0	11.0	7.5	8.0	7.5	8.0	1.1	1.1	1.2	1.2	1.4	1.5	1.8	1.7	1.4	
4/210	6.5	6.5	3.5	7.0	4.0	4.0	7.5	5.5	7.5	1.0	9.0	1.6	0.5	0.8	0.9	0.9	0.9	1.2	1.4	
4/301	8.5	8.5	11.5	11.5	12.5	15.5	12.0	12.5	12.0	12.5	9.0	13.5	1.6	1.8	1.8	2.0	2.1	1.9	1.4	
4/329	7.5	7.5	4.5	8.0	5.0	6.5	8.5	5.0	8.5	3.5	10.0	4.0	13.0	0.6	0.4	0.7	0.6	0.7	0.9	
4/343	7.5	7.5	4.5	8.0	5.5	7.0	8.5	7.0	8.5	5.5	10.0	6.5	14.5	4.5	0.6	0.6	1.1	0.9	1.3	
4/350	9.0	9.0	6.0	8.0	6.5	9.5	10.0	6.5	10.0	6.5	11.5	7.0	14.5	3.0	4.5	0.7	0.9	0.5	1.1	
4/357	9.5	9.5	6.5	10.0	7.0	10.0	9.0	8.5	10.5	7.0	12.0	7.5	16.5	5.5	5.0	5.5	0.7	0.6	1.4	
4/385	12.0	12.0	9.0	12.5	9.5	9.5	13.0	9.5	11.5	6.5	14.5	7.0	17.5	4.5	9.0	7.5	5.5	1.0	1.5	
4/392	11.5	11.5	8.5	10.5	9.0	12.0	11.0	9.0	12.5	9.0	14.0	9.5	15.5	5.5	7.0	4.0	5.0	8.5	1.4	
4/546	9.0	9.0	9.0	12.5	9.5	12.5	13.0	9.5	11.5	11.0	11.5	11.5	11.5	7.5	10.5	9.0	11.5	12.0	11.5	

Nota: el mínimo número de cambios totales (inferior-izquierda) así como el porcentaje de variación (superior-derecha) entre los aislamientos se calcularon como fuera detallado en el texto y en la tabla 3.

bovino 1, 2,4% para el bovino 2, 2,6% para el animal 3 y 2,1% para el animal 4 (Tablas 8, 9, 10 y 11).

No se observó un patrón predecible de variación entre los cuatro animales experimentalmente infectados estudiados, a pesar de que todos ellos habían recibido el mismo inóculo viral inicial. Esto sugiere nuevamente que la variación del genoma del VFA durante la infección persistente ocurre al azar.

1.3. Alteraciones genómicas en la región que codifica para la proteína estructural VP₁

Para estudiar el grado en que las variaciones genéticas se reflejaban en la región que codifica para la principal proteína inmunogénica VP₁, se compararon las secuencias de nucleótidos correspondientes a esta región con las de la cepa original O₁ C/58, para aislamientos seleccionados de cada uno de los animales.

Se seleccionó para cada animal, un aislamiento próximo a la fecha de la inoculación, un aislamiento correspondiente a etapas tardías de la infección, y algunos aislamientos intermedios a estos.

La comparación de la secuencia de nucleótidos de la proteína VP₁ de cada aislamiento individual con la de la cepa O₁ C/58, mostró que existían diferencias respecto del virus inicial, las cuales se limitaban a mutaciones puntuales, no observándose inserciones ni deleciones (Figura 10). En general, y como ocurría en el caso de los mapas bidimensionales, se observó una fijación de mutaciones progresiva con el tiempo, aunque, nuevamente, se observaron fluctuaciones. Los valores de porcentaje de variación abarcaban un rango desde 0,3%, en los aislamientos 1/56, 3/84 y 3/175, hasta 1,4% en las muestras 2/336, 3/630 y 4/546 (Tabla 12).

Así como se había observado en el caso del análisis por *fingerprints*, se registró una velocidad de fijación de sustituciones por nucleótido por año mayor en los aislamientos correspondientes a etapas tempranas de la infección. Los valores de sustituciones por nucleótido por año obtenidos para cada aislamiento se muestran en la tabla 12.

A partir de las secuencias de nucleótidos, se dedujeron las secuencias de aminoácidos, y así se determinaron las diferencias en las mismas entre cada uno de los aislamientos estudiados y la cepa original O₁ C/58 (Figura 11, Tabla 13). En general, de los cambios de bases registrados, un 34% resultó en

O₁ C/58 ACCACTTCTGCGGGCAGT CAGCGGATCCTGTCACCGCCACTGTTGAAAAC TACGGTGGCGAAACACAGATCCAGAGGCCCAACACACGGACGTCTCGTTCATCATGGA
 1/56
 1/528
 2/49
 2/181
 2/336
 3/84
 3/175
 3/350
 3/624
 4/133
 4/301
 4/526

O₁ C/58 CAGATTTGTGAAAGT GACACCGCAAACCAATTAACATTTTGGACCTCATGCAGATTCATCACACACTTTGGTGGGAGCGCTCTACGCGCTCCACTTACTACTTCT
 1/56
 1/528
 2/49
 2/181
 2/336
 3/84
 3/175
 3/350
 3/624
 4/133
 4/301
 4/526

O₁ C/58 CTGACTTGGAGATAGCAGTAAACACGAGGGAGACCTCACCTGGGTTCCAATGGAGCGCTGAAAAGCGTTGGACAACACCACCAACCACTGCTTACCACAAGGCA
 1/56
 1/528
 2/49
 2/181
 2/336
 3/84
 3/175
 3/350
 3/624
 4/133
 4/301
 4/526

O₁ C/58 CCACTCACCGGCTGCCCTGCCCTACACCGGCCCCACCGGTTGGCAACCGGTACAACGGTGAGTGCAGGTACAGCAGAAATGCTGTGCCAACGTGAGAGGTGA
 1/56
 1/528
 2/49
 2/181
 2/336
 3/84
 3/175
 3/350
 3/624
 4/133
 4/301
 4/526

O₁ C/58 CCTTCAGGTGTGGCTCAAAGGTGGCAGCGCTGCCTACCTCCTCAACTACGGTGCATCAAAGCGACCCGGGTACCGAGTGTGTTACCGGATGAAGAGGGCC
 1/56
 1/528
 2/49
 2/181
 2/336
 3/84
 3/175
 3/350
 3/624
 4/133
 4/301
 4/526

O₁ C/58 AAACATACTGTCCAAGGCCCTGTCTGGCAATCCACCCAAGTGAAGCCAGACACAACAGAAAATGTGGCACCGGTGAACAGACTTTG
 1/56
 1/528
 2/49
 2/181
 2/336
 3/84
 3/175
 3/350
 3/624
 4/133
 4/301
 4/526

Figura 10. Secuencia de nucleótidos que codifican para la proteína VP₁, de aislamientos seleccionados de los animales 1, 2, 3, y 4. La secuencia del virus original O₁ C/58 se muestra completa, y se señalan las diferencias encontradas para los aislamientos. No se encontraron diferencias entre la secuencia del virus O₁ C/58 estudiada y la secuencia publicada anteriormente (Cheung y cols., 1983).

Tabla 12. Porcentaje de variación en la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína VP₁ entre los distintos aislamientos y la cepa original O₁ C/58.

Aislamiento	Nº total de cambios	% de variación	st/n/año
1/56	2	0,3	2,0 10 ⁻²
1/203	5	0,8	1,4 10 ⁻²
1/546	6	0,9	0,6 10 ⁻²
2/49	4	0,6	4,7 10 ⁻²
2/161	5	0,8	1,8 10 ⁻²
2/336	9	1,4	1,5 10 ⁻²
3/84	2	0,3	1,4 10 ⁻²
3/175	2	0,3	0,7 10 ⁻²
3/350	6	0,9	1,0 10 ⁻²
3/630	9	1,4	0,8 10 ⁻²
4/133	5	0,8	2,2 10 ⁻²
4/301	4	0,6	0,8 10 ⁻²
4/546	9	1,4	0,9 10 ⁻²

cambios de aminoácidos. En la tabla 13 se detalla el porcentaje de nucleótidos que resultaron en sustituciones de aminoácidos para cada aislamiento. La diferencia máxima en la composición de aminoácidos de la proteína VP₁ respecto de la cepa original O₁ C/58 se registró en el aislamiento 1/546 (0,9%), para el animal 1; aislamientos 2/49 y 2/161 (0,9%), para el animal 2; aislamientos 3/350 y 3/630 (1,4%), para el animal 3 y aislamiento 4/546 (1,4%) recuperados del animal 4 (Tabla 13). La mayoría de las variaciones registradas (70%) se encontraban localizadas entre los residuos 133 y 158 de la proteína VP₁ (Figura 11, Tabla 13), los cuales forman parte del loop G-H, involucrado en la interacción con anticuerpos neutralizantes.

La mayoría de los cambios tanto de nucleótidos como de aminoácidos eran únicos. Las comparaciones entre pares, de las variaciones de nucleótidos y de aminoácidos registradas entre los aislamientos entre sí, revelaron que el grado de variación no siempre era proporcional al tiempo transcurrido entre dos aislamientos (Tabla 14). Por ejemplo, el porcentaje de variación de nucleótidos entre los virus 1/546 y 1/203 (1,7%), recuperados con 49 semanas de diferencia es mayor que el valor observado entre los aislamientos 1/546 y 1/56 (1,3%), recuperados con 70 semanas de diferencia. Un ejemplo semejante se observa entre los aislamientos 2/336 y 2/161, con respecto

	* * * * *	TTSAGESADPVTATVENYGGETQIQRRQHTDVSFIMDRFVKVTPQMQINILDLNQPISHTLVGALLRASTYYFSDLEIAVKNEGDLTWVPNGAPEKALDNTTNPATYHKA
0 ₁ C/58		
1/56		---T-----
1/203		-----
1/546		-----V-----P-----
2/49		-I-----
2/161		-----
2/336		-----
3/84		-----
3/175		-----
3/350		-----V-----
3/630		-----
4/133		-----D-----
4/301		-----
4/546		-----
	* * * * *	PLTRLALPYTAPHRVLTAVYNGECRYSRNAVPHVRGDLQVLAQKVARTLPTSFNYGAIKATRVTELLYRMKRAETYCPRPLLAIHPTEARHKQKIVAPVKQTL
0 ₁ C/58		
1/56		-----
1/203		-----A-----
1/546		-----
2/49		-----V-----
2/161		-----A-----R-----
2/336		-----A-----
3/84		-----
3/175		-----K-----
3/350		-----G-K-----
3/630		-----G-K-S-----
4/133		-----Q-----
4/301		-----G-K-----
4/546		-----G-K-S-----

Figura 11. Secuencia de aminoácidos de la proteína VP₁, deducida de la secuencia de nucleótidos, de los aislamientos seleccionados de los animales 1, 2, 3, y 4.

Tabla 13. Porcentaje de variación en la secuencia de aminoácidos, deducida de la secuencia de nucleótidos, de la proteína VP₁ entre los distintos aislamientos y la cepa original O₁ C/58.

Aislamiento	Cambios totales en aminoácidos	% de cambios en nucleótidos que dan cambios en aminoácidos	% de variación de aminoácidos	Nº de cambios en la región 133-158* (porcentaje)
1/56	1	50	0,5	0 (0%)
1/203	1	20	0,5	1 (100%)
1/546	2	33	0,9	0 (0%)
2/49	2	50	0,9	1 (50%)
2/161	2	40	0,9	2 (100%)
2/336	1	11	0,5	0 (0%)
3/84	-	0	0	-
3/175	1	50	0,5	1 (100%)
3/350	3	50	1,4	2 (67%)
3/630	3	33	1,4	3 (100%)
4/133	2	40	0,9	1 (50%)
4/301	2	50	0,9	2 (100%)
4/546	3	33	1,4	3 (100%)

* Región dentro del loop G-H, involucrada en la neutralización

al par 2/336 y 2/49. También se observaron situaciones similares entre algunas comparaciones apareadas del porcentaje de variación de aminoácidos, como por ejemplo los aislamientos 2/49 y 2/161 (16 semanas, 1,9%) con respecto a 2/161 y 2/336 (25 semanas, 1,4%).

A pesar de la observación de que la mayoría de los cambios no era conservada entre los distintos aislamientos, fue posible registrar que existían sitios puntuales de preferencia de aparición de cambios, inclusive entre diferentes animales (por ejemplo los aminoácidos 137 y 139 de la proteína VP₁).

Los datos de secuenciamiento corroboraban la observación obtenida de los mapas bidimensionales, que registraban que las variantes virales surgidas durante la persistencia en los cuatro animales no derivaban de cambios acumulados en el genoma, sugiriendo una vez más la existencia de heterogeneidad genética en las poblaciones virales, así como una rápida fluctuación y selección de secuencias del ARN genómico.

Tabla 14. Comparaciones apareadas de las diferencias entre las secuencias de nucleótidos y las deducidas de aminoácidos de la proteína VP₁ entre los aislamientos analizados para cada animal.

A) Comparaciones apareadas del número total de cambios (inferior-izquierda), y del porcentaje de variación (superior-derecha), entre las secuencias de nucleótidos correspondientes a los aislamientos referidos para cada animal

ANIMAL 1					ANIMAL 2				
	O ₁ C/58	1/56	1/203	1/546		O ₁ C/58	2/49	2/161	2/336
O ₁ C/58	-	0,3	0,8	0,9	O ₁ C/58	-	0,6	0,8	1,4
1/56	2	-	1,1	1,3	2/49	4	-	1,4	1,7
1/203	5	7	-	1,7	2/161	5	9	-	2,2
1/546	6	8	11	-	2/336	9	11	14	-

ANIMAL 3					ANIMAL 4					
	O ₁ C/58	3/84	3/175	3/350	3/630		O ₁ C/58	4/133	4/301	4/546
O ₁ C/58	-	0,3	0,3	0,9	1,4	O ₁ C/58	-	0,8	0,6	1,4
3/84	2	-	0,6	0,9	1,7	4/133	5	-	1,3	2,0
3/175	2	4	-	0,9	1,4	4/301	4	8	-	1,6
3/350	6	6	6	-	1,4	4/546	9	13	10	-
3/630	9	11	9	9	-					

B) Comparaciones apareadas del número total de cambios (inferior-izquierda), y del porcentaje de variación (superior-derecha), entre las secuencias de aminoácidos correspondientes a los aislamientos referidos para cada animal

ANIMAL 1					ANIMAL 2				
	O ₁ C/58	1/56	1/203	1/546		O ₁ C/58	2/49	2/161	2/336
O ₁ C/58	-	0,5	0,5	0,9	O ₁ C/58	-	0,9	0,9	0,5
1/56	1	-	0,9	1,4	2/49	2	-	1,9	1,4
1/203	1	2	-	1,4	2/161	2	4	-	1,4
1/546	2	3	3	-	2/336	1	3	3	-

ANIMAL 3					ANIMAL 4					
	O ₁ C/58	3/84	3/175	3/350	3/630		O ₁ C/58	4/133	4/301	4/546
O ₁ C/58	-	0	0,5	1,4	1,4	O ₁ C/58	-	0,9	0,9	1,4
3/84	0	-	0,5	1,4	1,4	4/133	2	-	1,9	2,3
3/175	1	1	-	0,9	0,9	4/301	2	4	-	0,5
3/350	3	3	2	-	0,9	4/546	3	5	1	-
3/630	3	3	2	2	-					

2. COMPARACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA, SEROTIPO O, REPRESENTATIVAS DE BROTES IMPORTANTES OCURRIDOS EN BRASIL Y ARGENTINA ENTRE 1958 Y 1983

En la sección anterior hemos descripto la variabilidad generada en el VFA durante su replicación en animales persistentemente infectados. Con el fin de comparar la diversidad viral surgida en el VFA bajo condiciones naturales de infección, con la observada experimentalmente, se analizaron seis aislamientos del VFA representativos de brotes relevantes ocurridos en el centro-este de Argentina y en el sudeste de Brasil a lo largo de 25 años. A seguir se resumen la fecha y lugar de aislamiento de dichas cepas

Cepas estudiadas	Designación	Lugar de origen	
		Localidad, Provincia/Estado, País	Fecha de aislamiento
O ₁ Campos Br 1/58	O ₁ C/58	Campos, Rio de Janeiro, Brasil	01/1958
O ₁ Caseros Arg 1/67	O ₁ Cas/67	Caseros, Buenos Aires, Argentina	01/1967
O ₁ Brasil/70	O ₁ Br/70	Bagé, Rio Grande do Sul, Brasil	09/1970
O ₁ Argentina/77	O ₁ Arg/77	No registrado, Argentina	11/1977
O ₁ Brasil/80	O ₁ Br/80	Dom Pedrito, Rio Grande do Sul, Brasil	06/1980
O ₁ Irigoyen/83	O ₁ Iri/83	Hipólito Irigoyen, Buenos Aires, Argentina	09/1983

De los virus analizados, el aislamiento más antiguo, obtenido en el año 1958, correspondió a la cepa O₁ C/58, que es la misma con la cual se había inoculado a los animales del modelo experimental utilizado para estudiar la variación

durante la persistencia. Esta cepa O₁ C/58 se utiliza en la actualidad como semilla para la producción de vacunas en todos los laboratorios de producción sudamericanos (Argentina, Brasil, Colombia, Ecuador, Paraguay, Perú y Venezuela).

En esta sección se presenta la comparación de las relaciones serológicas, de los mapas bidimensionales de oligonucleótidos resistentes a RNasa T₁ y de las secuencias de nucleótidos que codifican para la proteína inmunogénica VP₁, y la deducida de aminoácidos para los diferentes virus.

2.1. Caracterización serológica de las cepas de campo aisladas entre 1958 y 1983.

En la figura 12 se muestra una comparación de las relaciones serológicas establecidas por fijación del complemento al 50% de hemólisis, de cada aislamiento con su suero homólogo y con los heterólogos. Como puede observarse, las mismas revelaron un amplio espectro de relaciones serológicas entre las cepas, las cuales no eran proporcionales al tiempo transcurrido entre los aislamientos. Esto se ejemplifica particularmente en la relativa similitud del virus O₁ C/58 con las cepas O₁ Arg/77 y O₁ Iri/83, aisladas con una diferencia de 19 y 25 años respectivamente, en contraposición

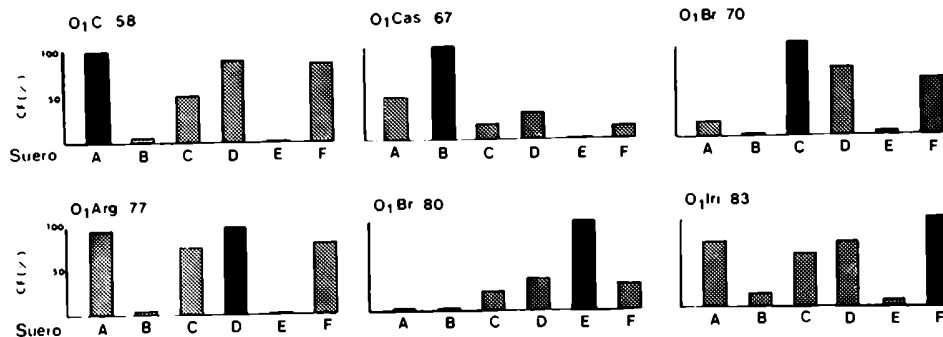


Figura 12. Análisis serológico de los virus indicados

Las relaciones serológicas se estudiaron por fijación del complemento al 50% de hemólisis (CF50%) con los siguientes sueros: A: O₁ C/58; B: O₁ Cas/67; C: O₁ Br/70; D: O₁ Arg/77; E: O₁ Br/80; F: O₁ Iri/83.

a la marcada diferencia entre las cepas O₁ Cas/67 y O₁ Br/70, recuperadas con 3 años de diferencia.

2.2. Variaciones genómicas entre las cepas correspondientes a aislamientos de campo, analizadas en base a sus mapas bidimensionales

Para cuantificar las variaciones genéticas entre los aislados naturales de modo preciso se han estudiado las mismas mediante mapas bidimensionales. Nuevamente, y como fuera mencionado para el caso de los virus recuperados de animales persistentemente infectados, las comparaciones se llevaron a cabo mediante la observación visual de ambos mapas individuales correspondientes a las cepas involucradas, así como de un único mapa en donde se realizó la electroforesis conjunta de una mezcla equivalente de oligonucleótidos resultantes de la digestión con RNasa T₁ de los ARNs correspondientes a ambas cepas a ser comparadas.

Como se observa en la figura 13, cada aislamiento presentó un mapa de oligonucleótidos resistentes a T₁ único que lo diferencia de los demás. Los mapas bidimensionales de los fragmentos de ARN resistentes a RNasa T₁ correspondientes a cada virus se compararon con el de la cepa temprana O₁ C/58,

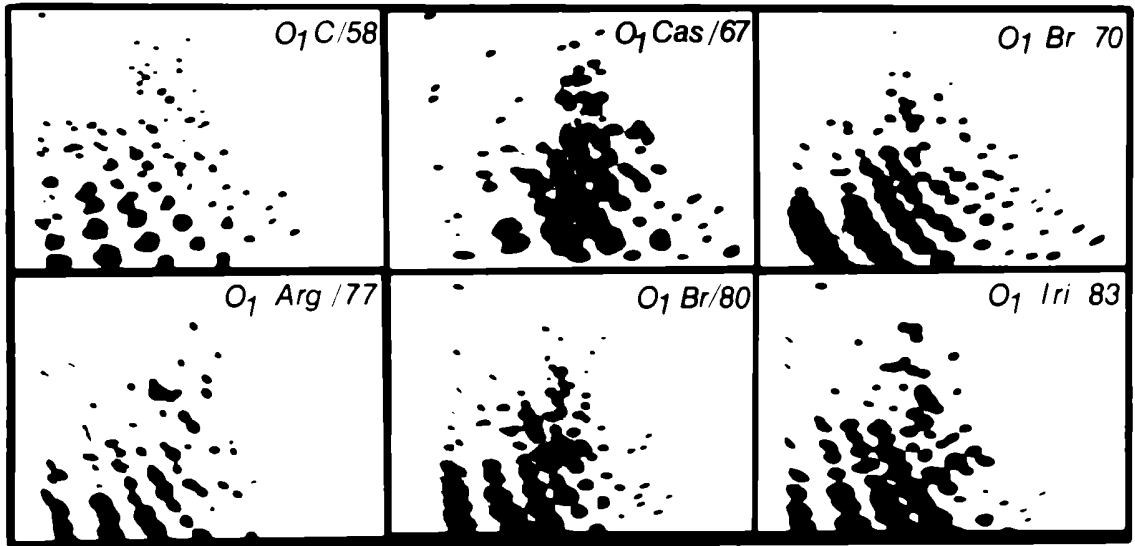


Figura 13. Autoradiografías de los mapas bidimensionales de los oligonucleótidos resistentes a ARNasa T₁ de las cepas indicadas.

para establecer el grado de homología de los mismos con respecto al brote más antiguo, y el detalle de los oligonucleótidos adicionales y faltantes para cada cepa se muestra en la tabla 15. Asimismo, las diferencias encontradas entre dichos mapas bidimensionales se esquematizaron en el compósito que se muestran en la figura 14.

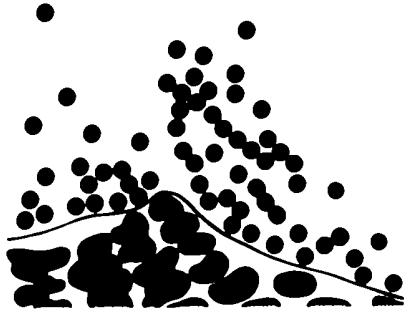
Los resultados de estas comparaciones revelaron padrones de mapas T_1 para cada aislamiento individual que diferían en varios oligonucleótidos respecto de la cepa O_1 C/58. En el caso del virus O_1 Arg/77, el mapa registrado resultó bastante similar al de la cepa temprana, mostrando solamente cuatro oligonucleótidos adicionales y cuatro faltantes. Los cambios observados han permitido una estimación del número de variaciones existente entre los genomas obtenidos de aislamientos del sudeste de Brasil y centro-este de Argentina entre los años 1958 y 1983, que se efectuó de la forma en que fuera descrito en la sección 1.2 para los aislamientos recuperados de animales persistentemente infectados.

El resumen cuantitativo de los porcentajes de variación respecto de la cepa O_1 C/58, deducidos a partir de los mapas de la figura 13, indicó que la homología genética fue siempre superior a 96% (Tabla 15). Así como ocurría en el análisis

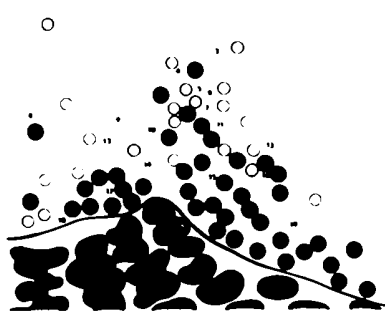
Tabla 15. Porcentajes de variación calculados entre los mapas bidimensionales de los referidos virus y el de la cepa temprana O₁ C/58.

VIRUS	OLIGONUCLEÓTIDOS ADICIONALES	OLIGONUCLEÓTIDOS FALTANTES	TOTAL	% de VARIACIÓN
O ₁ Cas/67	19	22	31,5	3,8
O ₁ Br/70	16	25	33	4,0
O ₁ Arg/77	4	4	6	0,7
O ₁ Br/80	20	17	28,5	3,5
O ₁ Iri/83	19	22	31,5	3,8

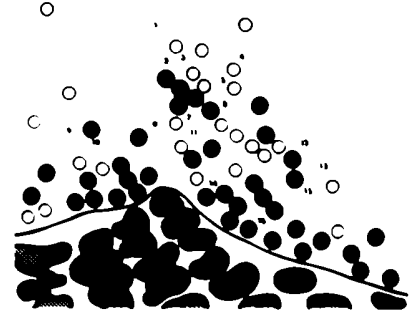
O₁ C 58



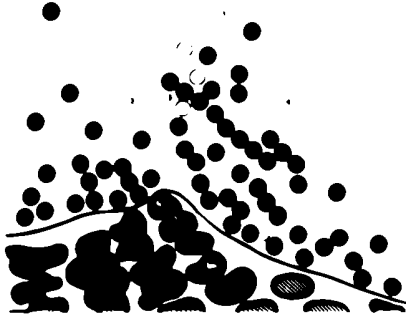
O₁ Cas/ 67



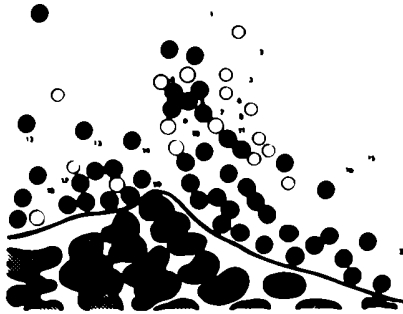
O₁ Br/ 70



O₁ Arg/77



O₁ Br/ 80



O₁ Iri/ 83

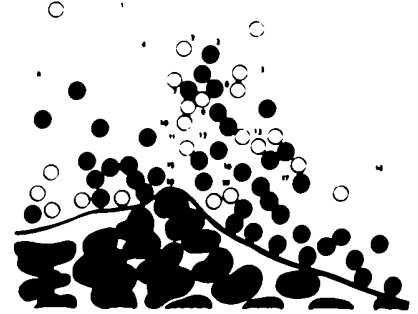


Figura 14. Comparaciones esquemáticas de los mapas T₁ de las cepas indicadas con respecto a la cepa temprana O₁ C/58.

Los criterios del análisis son los mismos que se describieron anteriormente. Las diferencias se determinaron mediante el análisis de electroforesis de muestras individuales o conteniendo cantidades equivalentes de ambos digeridos de T₁ sujetos a comparación. Los círculos negros corresponden a oligonucleótidos comunes a ambas cepas; círculos vacíos corresponden a oligonucleótidos del virus O₁ C/58 ausentes en el aislamiento comparado; y los números sin circular representan manchas ausentes en la cepa temprana O₁ C/58, pero presentes en la muestra comparada.

serológico, el grado de variación observado entre los aislamientos y la cepa temprana O₁ C/58 no fue proporcional al tiempo transcurrido entre aislamientos. Por ejemplo, la variación observada para el virus O₁ Cas/67 (3,8%), recuperado con 9 años de diferencia respecto de la cepa temprana, era significativamente mayor que la observada para la cepa O₁ Arg/77 (0,4%), obtenida con un intervalo de 19 años.

2.3. Comparación de las secuencias de nucleótidos y de las deducidas de aminoácidos de una porción del gen que codifica para la proteína VP₁

Para estudiar cómo se reflejaban las diferencias encontradas por los estudios anteriormente mencionados en la principal proteína inmunogénica, se determinaron las secuencias de nucleótidos y las deducidas de aminoácidos de parte del gen que codifica para la proteína VP₁ (residuos 250 a 639 y 84 a 213, respectivamente), y se compararon con aquellas correspondientes a la cepa temprana O₁ C/58 .

Como se muestra en la figura 15, solo se observaron mutaciones puntuales, pero no inserciones o deleciones. El análisis de las secuencias de nucleótidos comparadas con la correspondiente a la cepa temprana O₁ C/58, mostró que el

A

O ₁ C/58	GGAGACCTCACCTGGGTTCCAAATGGAGCGCCTGAAAAGCGGTTGGACAACACCACCAACCCAAGTGTACCACAAGGCACCCTCACCCGGCTTGCCTGCCCTACACC
O ₁ Cas/67	-----T-----G-C-G-----T-C-----GA-----G-C-T-AA-G-----A-C-----G
O ₁ Br/70	-----A-----G-C-G-----G-----A-C-----G-----T-----
O ₁ Arg/77	-----C-----
O ₁ Br/80	-----A-----G-C-G-----CC-C-----G-A-C-----GT-----A-A-A-----G
O ₁ Iri/83	---A---T---C-G-C-G---C-G---A-C---G-GA-T-T---T---A

O ₁ C/58	GCGCCCCACCGGTTGGCAACCGTGTACAACGGTGAGTGCAGGTACAGCAGAAATGCTGTGCCAACGTGAGAGGTGACCTTCAGGTGTGGCTCAAAAGGTGGCAGG
O ₁ Cas/67	--A-G---T-----C---T-AA---T-G---T-----CA-T---AA---C---
O ₁ Br/70	---A---AGC---AC-CC---A---T---A---C-AAC-C---A-C---G---
O ₁ Arg/77	-----CG-----A---
O ₁ Br/80	--A-A---T---C-T-----CAGT-----G-TG-CGGCG-C---G---A---C-A-AC-A-C---C-G---
O ₁ Iri/83	---T---G-T---T---G-T---AC-C---C---T-T---A---A---A-G---CA-G---

O ₁ C/58	GACGCTGCCTACCTCCTTCAACTACGGTGCCATCAAAGCGACCCGGTACCAGGTGCTTTACCGGATGAAGAGGGCCGAAACATACTGTCCAAGGCCCTTGCTGGCAA
O ₁ Cas/67	-----A-T---T-A-----A-----G-----C---C---
O ₁ Br/70	-T-A---C---T---T---T---C-----G---C-C---C---C---
O ₁ Arg/77	-----TG---AG-T-CA-----C-----C-C-A-C---C---
O ₁ Br/80	-C-----T---TG---AG-T-CA-----C-----C-C-A-C---C---
O ₁ Iri/83	AC---C-----T---A---C---C-----C-C---TC-T---C---

O ₁ C/58	TCCACCAACTGAAGCCAGACACAAACAGAAAATTGTGGCACCAGGTGAAACAGACTTTG
O ₁ Cas/67	-----C-----A--C--
O ₁ Br/70	-T---G-A---G-T---G---G---C-----GT-C--
O ₁ Arg/77	-----
O ₁ Br/80	-T-G-G-T---A-G-----A-----
O ₁ Iri/83	-T-T-GT---T---G---G---T---A-C---

B

O ₁ C/58	GDLTWVPNGAPEKALDNTTNPTAYHKAPLRLALPYTAPHRLATVYNGECRYSRNAVNPVNRGDLQVLAQKVARTLPTSFNYGAIKATRVTELLYRMKRAETYP
O ₁ Cas/67	-----VQ-G-----Y-K-----K-SK-----N-E-A-----
O ₁ Br/70	-----S---NT-----T---A-S-----
O ₁ Arg/77	-----R-----T-----
O ₁ Br/80	-----T-----F-----S---S---GGCRA-S-----A-P-----V-A-I-----
O ₁ Iri/83	-N-----R-----I-----G---N-A-----A-P-----

O ₁ C/58	LLAIHPTEARHKQKIVAPVKQL
O ₁ Cas/67	-----D-----
O ₁ Br/70	-----N-----V-----
O ₁ Arg/77	-----
O ₁ Br/80	-----SD-----
O ₁ Iri/83	-----S-----

Figura 15. Comparación de las secuencias de nucleótidos (A), y de las deducidas secuencias de aminoácidos (B) de aislamientos de campo del VFA.

La secuencia superior corresponde al aislamiento temprano O₁ C/58. En el caso de las otras cepas, solo se muestran las diferencias encontradas con respecto a esta secuencia. El análisis incluyó los nucleótidos 250 al 639, que codifican para los residuos de aminoácidos 84 a 213. La secuencia de la cepa O₁ Cas/67 ya se había reportado previamente (Bergmann y cols., 1992), y difiere de la previamente reportada por Rieder Rojas y cols., 1992, en las posiciones indicadas (v).

Tabla 16. Porcentajes de variación en la secuencia de nucleótidos que codifica para parte de la proteína VP₁ (residuos 250 a 639), entre los distintos aislamientos de campo y la cepa temprana O₁ C/58.

Aislamiento	Nº total de cambios	% de variación	st/n/año
O ₁ Cas/67	43	11,0	1,2 10 ⁻²
O ₁ Br/70	51	13,1	1,1 10 ⁻²
O ₁ Arg/77	4	1,0	0,05 10 ⁻²
O ₁ Br/80	67	17,2	0,8 10 ⁻²
O ₁ Iri/83	58	14,9	0,6 10 ⁻²

porcentaje de variación no se correlacionaba con el tiempo transcurrido entre los aislamientos, y que los valores fluctuaban entre 1,0% y 17,2% (Tabla 16). En general, los valores de sustitución por nucleótido por año registrados se encuadraron dentro de los valores obtenidos con los aislamientos recuperados de animales persistentemente infectados, excepto para el caso del virus O₁ Arg/77, el cual registró un valor significativamente menor (tabla 16).

Las secuencias de aminoácidos deducidas indicaron que un porcentaje de 16% para las muestras O₁ Br/70 y O₁ Iri/83, 28% para O₁ Cas/67, 25% en el O₁ Br/80 y 50% en el caso de O₁ Arg/77 de las mutaciones registradas llevaban a una sustitución de aminoácidos. Estos cambios resultaron en porcentajes de variación en aminoácidos de la proteína VP₁ con respecto a la cepa temprana O₁ C/58 de 9,2% para el virus O₁ Cas/67, 6,2% para O₁ Br/70, 1,5% para O₁ Arg/77, 13,1% para O₁ Br/80 y 6,9% para O₁ Iri/83. Nuevamente, y como había sido registrado en los aislamientos de virus persistentes, la mayoría de las sustituciones de aminoácidos se localizaban en la región inmunogénica (Tabla 17).

La mayoría de las mutaciones se encontraban solo una vez entre todos los aislamientos, y por lo tanto eran únicas. Las

Tabla 17. Porcentaje de variación en parte de la secuencia de aminoácidos (residuos 84 a 213), deducida de la secuencia de nucleótidos, de la proteína VP₁ entre los distintos aislamientos de campo y la cepa temprana O₁ C/58.

Aislamiento	Cambios totales en aminoácidos	% de cambios en nucleótidos que dan cambios en aminoácidos	% de variación de aminoácidos	Nº de cambios en la región 133-158* (porcentaje)
O ₁ Cas/67	12	28	9,2	6 (50%)
O ₁ Br/70	8	16	6,2	6 (75%)
O ₁ Arg/77	2	50	1,5	2 (100%)
O ₁ Br/80	17	25	13,1	9 (53%)
O ₁ Iri/83	9	16	6,9	5 (56%)

* Región dentro del *loop* G-H, involucrada en la neutralización

comparaciones apareadas indicaron que el grado de variación era independiente del momento en que el virus había sido aislado, como puede verse principalmente entre los virus O₁ Br/80 y O₁ Iri/83, recuperados con solo 3 años de diferencia, y que muestran un porcentaje de variación considerablemente mayor (18,7%) que el observado entre los virus O₁ C/58 y O₁ Arg/77 (1,0%), recuperados con 19 años de diferencia. El grado de variación entre los genes de VP₁ de todos los aislamientos fluctuó entre valores de 1,0% a 18,7% de sustituciones de nucleótidos y de 1,5% a 16,9% de cambios de aminoácidos (Tabla 18).

Tabla 18. Comparaciones apareadas de las diferencias en las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos del gen de VP₁ entre aislamientos de campo del VFA

	O ₁ C/58	O ₁ Cas/67	O ₁ Br/70	O ₁ Arg/77	O ₁ Br/80	O ₁ Iri/83
O ₁ C/58	°°	43 (11,0%)	51 (13,1%)	4 (1,0%)	67 (17,2%)	58 (14,9%)
O ₁ Cas/67	12 (9,2%)	°°	17 (67,2%)	45 (11,5%)	70 (17,9%)	69 (17,7%)
O ₁ Br/70	8 (6,2%)	16 (12,3%)	°°	53 (13,6%)	59 (15,1%)	56 (14,4%)
O ₁ Arg/77	2 (1,5%)	14 (10,8%)	10 (7,7%)	°°	69 (17,7%)	60 (15,4%)
O ₁ Br/80	17 (13,1%)	22 (16,9%)	17 (13,1%)	19 (14,6%)	°°	73 (18,7%)
O ₁ Iri/83	9 (6,9%)	17 (13,1%)	10 (7,7%)	11 (8,5%)	14 (10,8%)	°°

Nota: las diferencias apareadas (% de diferencias) entre las secuencias de nucleótidos (superior-derecha) y las deducidas de aminoácidos (inferior-izquierda) de la proteína VP₁. Los nucleótidos 1-249 y los aminoácidos 1-83 se excluyeron de los análisis (Figura 14).

3. NEUTRALIZACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS DE CAMPO Y DE LOS RECUPERADOS DE ANIMALES PERSISTENTEMENTE INFECTADOS, CON UN BANCO DE SUEROS DE ANIMALES VACUNADOS Y REVACUNADOS CON LA CEPAS PROTOTIPO Q C/58

Para determinar si las modificaciones observadas en los aislamientos recuperados del campo y de animales con infección persistente afectaban la neutralización de infectividad, se llevaron a cabo ensayos de microneutralización en placa de todos los aislamientos de campo y de algunos seleccionados de animales persistentemente infectados contra sueros de animales inmunizados con vacunas preparadas con la cepa O₁ C/58 (Tabla 19).

A pesar de las diferencias observadas en el promedio de los títulos neutralizantes entre las diferentes variantes, es posible predecir, a partir de los cálculos de expectativa porcentual de protección (EPP) encontrados para todas las cepas, que una buena vacuna producida contra el virus O₁ C/58, protegería en forma satisfactoria contra el desafío con cualquiera de estas variantes (Sutmöller y cols, 1984).

Tabla 19. Neutralización de aislamientos de virus persistentes y de cepas de campo con suero hiperinmune contra la cepa prototipo C/58 .

Virus	TN°	EPP°°
O ₁ C/58	3,5 ± 0,2	93,9
O ₁ Cas/67	3,1 ± 0,3	91,0
O ₁ Br/70	2,9 ± 0,4	85,4
O ₁ Arg/77	2,3 ± 0,4	75,2
O ₁ Br/80	2,8 ± 0,5	81,0
O ₁ Iri/83	3,3 ± 0,3	91,2
3/84	2,3 ± 0,4	75,0
3/350	2,3 ± 0,4	74,8
3/630	3,4 ± 0,3	92,0
4/133	3,4 ± 0,3	92,9
4/301	3,4 ± 0,3	91,9
4/546	3,2 ± 0,2	91,1

° Promedio de los títulos de seroneutralización (TN) correspondiente al ensayo con 19 sueros diferentes. Los sueros se obtuvieron a los 30 días de su revacunación, administrada 120 días después de la vacunación inicial con el antígeno O₁ C/58.

°° Promedio de la expectativa porcentual de protección (EPP) estimada para valores individuales de TN, como fuera descrito por Sutmoller y cols., 1984.

DISCUSIÓN

Desde la primera descripción del establecimiento de infecciones persistentes con el virus de la fiebre aftosa en ciertos huéspedes, por Van Bekkum y cols. en 1959, varios estudios han mostrado que los animales persistentemente infectados serían un importante reservorio viral (Augé de Mello y cols., 1970; Neto y cols., 1972; Sutmöller y Gaggero, 1965 y Sutmöller y cols., 1968). Los mecanismos que rigen el establecimiento y mantenimiento de la infección persistente con VFA no son conocidos, y existen varios informes sobre su duración (revisión en Woodbury, 1995).

En la infección experimental con virus subtipo O₁ C/58, que se describe en este trabajo, fue observada recuperación viral positiva a partir de fluidos OP hasta 644 días luego de la inoculación, registrándose una disminución de la frecuencia de aislamientos positivos con el tiempo. Los resultados obtenidos confirman que las infecciones persistentes pueden ser reservorio de virus, y también demuestran su capacidad como fuente continua de variantes.

El análisis genómico de los aislamientos virales recuperados secuencialmente de un mismo animal a lo largo del tiempo provee evidencia directa de que poblaciones del VFA del subtipo O₁ fluctúan durante la replicación del virus en el

animal persistentemente infectado. Estas, y otras observaciones que se detallan más abajo, sugieren la coexistencia de variantes heterogéneas que evolucionan independientemente entre sí, concordando así con las teorías que sostienen que la evolución del VFA involucra la co-existencia de genomas relacionados ("quasiespecies"), en vez de un genoma único y homogéneo. El término "quasiespecie" describe distribuciones complejas de moléculas replicantes sujetas a mutación y a selección competitiva (revisión en Eigen, 1993).

Los mapas bidimensionales de los oligonucleótidos resistentes a RNasa T₁ y las secuencias de nucleótidos correspondientes a la proteína inmunogénica VP₁, mostraron un aumento irregular en la variación genómica y una selección de mutantes del VFA durante su replicación en el animal persistentemente infectado. Los cálculos de velocidad de mutación, mostraron, para algunos casos, valores extremadamente altos cuando la cuantificación se realizaba entre dos aislamientos obtenidos con un corto intervalo de tiempo. Además, los cambios observados entre aislamientos consecutivos, resultaron no acumulativos, sugiriendo la presencia de una mezcla de variantes que evolucionaban independientemente unas de otras.

No fue posible establecer un padrón de variación predecible para los cuatro animales experimentales, a pesar de que los mismos habían recibido el mismo inóculo. Esto sugirió que, al menos para el serotipo 0, durante el desarrollo de una infección persistente puede generarse una compleja mezcla de genotipos. Estos resultados difieren de los datos disponibles sobre otras infecciones persistentes, como por ejemplo con virus Visna, donde se observaron padrones de variantes evolutivas similares entre sí (Clements y cols., 1982), pero concuerdan con los resultados observados para el virus de la anemia infecciosa equina (Payne y cols., 1987) y para el virus de la inmunodeficiencia humana adquirida (Hahan y cols., 1986).

Aunque las alteraciones observadas eran generalmente no acumulativas, aislamientos subsecuentes de los animales 3 y 4 mostraron las mismas sustituciones de nucleótidos en las posiciones 137 y 139 de la VP₁ (Ver Fig.11). También pudieron observarse cambios conservados en aislamientos recuperados durante la infección experimental con VFA del subtipo C₃ (Gebauer y cols., 1988), así como en aislamientos del VFA serotipo 0 provenientes de episodios agudos de la enfermedad (Fig.15; Beck y Strohmaier, 1987). Dichas observaciones sugieren o bien que algunas mutaciones ocurren a una frecuencia mayor que otras, o, más probablemente, que ciertas alteraciones comprometen la viabilidad del virus. De hecho, las

sustituciones en las dos primeras posiciones del codón ocurrieron con menos frecuencia que en la tercera (esta última con una frecuencia de 66%). Se observaron resultados semejantes para los aislamientos de campo. Estas observaciones sugieren que los cambios no sinónimos en VP₁ están sujetos a una selección negativa, así como ha sido observado para el serotipo C (Martinez y cols., 1992) y para muchos otros sistemas evolutivos (Nei, 1983; Kimura y cols., 1983; Buonaugurio y cols., 1985).

Varias sustituciones de aminoácidos se localizaban dentro de la secuencia involucrada en la interacción del VFA con anticuerpos neutralizantes (Figura 11), sugiriendo que los virus persistentes podrían variar, en parte, debido a presiones selectivas del sistema inmune del hospedador. De hecho, en trabajos previos (Francis y cols., 1983, Mc Vicar y Suttmöller, 1974, Gebauer y cols., 1988) se observó que los fluidos OP de animales persistentemente infectados presentaban actividad neutralizante. Estos resultados indican que durante las infecciones persistentes pueden generarse mutantes que escapen al espectro inmunológico, que podrían ser de significado epidemiológico.

La comparación entre los aislamientos del VFA de regiones endémicas mostró una sustancial diversidad genética. Los

padrones de variación que se deducen de los *fingerprints* (Figuras 13 y 14, y Tabla 15) así como de la secuencia de nucleótidos de la región que codifica para la VP₁ (Figura 15, Tabla 16) parecen indicar una no conservación de cambios en cepas aisladas durante casi tres décadas. Más aún el grado de variación fue independiente del tiempo transcurrido entre la aparición de dos de tales cepas. Considerando estos resultados en conjunto, se sugiere que los aislamientos originados de brotes de campo representarían fluctuaciones de poblaciones heterogéneas que varían independientemente unas de otras, y que pueden ser seleccionadas bajo ciertas situaciones epidemiológicas. Será preciso acumular una mayor cantidad de datos para una respuesta definitiva a esta cuestión.

La considerable variabilidad encontrada entre las cepas de campo estudiadas, contrasta con la correspondiente a las cepas de campo europeas, las cuales son notoriamente más homogéneas entre sí (Beck y Strohmaier, 1987; Carrillo y cols., 1990). La estabilidad genética del virus se ha observado luego de varios pasajes del virus en cultivos celulares, tanto a alta como a baja multiplicidad de infección (González y cols., 1991, Rieder Rojas y cols., 1992). En base a ello, se ha sugerido que la mayor estabilidad de los aislamientos de campo en Europa se debe a la reintroducción regular de cepas

vacunales en el campo, a partir de vacunas inactivadas inadecuadamente , o a escapes de laboratorio (Beck y Strohmaier, 1987).

La razón para la existencia de un mayor grado de diversidad genética observado en Sudamérica (Bergmann y cols., 1988) y en otras regiones endémicas (Anderson y cols., 1985; Martínez y cols., 1992), cuando se lo compara con Europa no es muy clara, así como tampoco lo son los mecanismos para el mantenimiento y transmisión del virus en estas áreas endémicas. Considerando que los genomas a ARN del VFA generan una sustancial heterogeneidad durante la infección persistente experimental, este tipo de proceso podría explicar la diversidad genética observada en regiones de actividad viral endémica. La vacunación continua, así como una exposición previa al virus podrían incrementar dicha diversidad. De hecho, cuando se compararon los aislamientos de campo con la cepa temprana O₁ C/58, se pudo observar: una mayor proporción de sustituciones de nucleótidos en VP₁ (Tabla 16) que en el genoma completo (Tabla 15) y una cantidad considerable de sustituciones de aminoácidos cerca de epitopes neutralizantes conocidos (Figura 15), sugiriendo una presión selectiva del sistema inmune del hospedador en la evolución de este virus. En este sentido se ha observado una disminuída reactividad de

estas cepas con anticuerpos monoclonales (inclusive algunos neutralizantes-protectores), obtenidos contra el virus O₁ C/58, (Bergmann, comunicación personal).

Sorprendentemente, los resultados obtenidos por microneutralización en placa mostraron que podría esperarse una protección efectiva para todas las variantes estudiadas, tanto las de campo como las generadas durante la infección persistente, con una vacuna potente preparada con la cepa prototipo (Tabla 17). Estos resultados sugieren la posibilidad de que un brote pueda surgir a partir de una variante generada durante ciertas condiciones de campo, que también llevaron a una disminuída inmunidad de la población bovina.

Este trabajo indica claramente que los animales persistentemente infectados, además de actuar como reservorios de virus, representan también una fuente importante de variantes virales. Se han registrado evidencias circunstanciales en el campo de la transmisión de virus de animales persistentemente infectados hacia animales susceptibles, que resultan en la ocurrencia de nuevos brotes (Bureau of Animal Industry, 1947-1950; Olitsky y cols., 1927). Durante la infección persistente tienen lugar variaciones continuas del genoma viral y la selección de virus mutantes. Estos hechos podrían ser responsables por la generación

de mutantes de relevancia epidemiológica. De todas formas, para probar definitivamente si bajo circunstancias adecuadas podrían ser capaces de iniciar un nuevo episodio, se requerirá de más información experimental y epidemiológica.

Vuabrat

Burach

Lupus pupu

BIBLIOGRAFÍA

Aaronson RP, Young JF, y Palese P. 1982. Oligonucleotide mapping: evaluation of its sensitivity by computer-simulation. *Nucleic Acids Res.* 10: 237.

Abu Elzein EME, Newman BJ, Crowter JR. 1980. Subtyping of strains of foot-and-mouth disease virus types A and SAT₁ in the Sudan, 1967-1977. *Bull. off. int. Epiz.* 92. 3-4: 141-146.

Acharya R, Fry EL, 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.* 337: 709-716.

Ahl R, y Straub OC. 1987. Infectivity of foot-and-mouth disease carrier virus and virus population characteristics during infection. Rpt. Sess. Res. Gp. Stand Comm. Eur. Comm. Control FMD. Lyons, France. pp. 66-72.

Alonso A. 1986. Diagnóstico de las enfermedades vesiculares. PANAFIOSA/HPV/OPS/OMS. Serie de manuales didácticos N°15.

Alonso A, Martins MA, Gomes MPD, Allende R, Sondahl MS. 1992. Foot-and-Mouth Disease Virus typing by complement fixation and enzyme-linked immunoadsorbent assay using monovalent and polyvalent antisera. *J.Vet. Diag. Invest.* 4:249-253.

Anderson EC, Doughty WJ, Anderson J. 1974. The effect of repeated vaccination in an enzootic foot-and-mouth disease area on the incidence of virus carrier cattle. *J. Hyg.* 73: 229-235.

Anderson EC, Doughty WJ, Anderson J. 1976. The role of sheep and goat in the epizootiology of foot-and-mouth disease in Kenya. *J. Hyg.* 76: 395-402.

Anderson EC, Doughty WJ, Anderson J, Underwood BO, and Brown F. 1985. Variation in foot-and-mouth disease virus isolates in Kenya: an examination of field isolates by T₁ oligonucleotide fingerprinting. *Vet. Microb.* 10: 409-423.

Andrews NC, Levin D, Baltimore D. 1985. Poliovirus replicase stimulation by terminal uridylyl transferase. *J. Biol. Chem.* 260:7628-7635.

Andrews NC, Baltimore D. 1986. Purification of a terminal uridylyltransferase that acts as factor in the *in vitro* poliovirus replicase reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 83: 221-225.

Arlinghaus RB, y Polatnik J. 1967. A detergent solubilized foot-and-mouth disease virus ribonucleic acid polymerase. *Science*. 158: 1320-1322.

Astudillo VM. 1991. Fortalecimiento de la atención veterinaria y de los sistemas de información y vigilancia a nivel local. *Boletín del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa*. 57: 74-84.

Augé de Mello P, Honigman MN, Fernández MV. 1966. Supervivencia en bovinos del virus modificado de la fiebre aftosa. *Bull. Off. Int. Epiz.* 65: 2091-2106.

Augé de Mello P, Honigman MN, Fernández MV, and Gomes I. 1970. Further information on the survival of modified foot-and-mouth disease virus in cattle. *Bull. Off. Int. Epizoot.* 73: 489-505.

Augé de Mello P, Olascoaga RC, Costa Giomi MP, Alonso FA, Scodeller EA, La Torre JL, and Bergmann IE. 1986. RNA fingerprinting of South American prototype aphthovirus strains. *Vaccine*. 4: 105-110.

Bachrach HL. 1968. Foot-and-mouth disease virus. *Annu. Rev. Microbiol.* 22: 201-244.

Bachrach HL, Moore DM, McKercher PD, Polatnick J. 1975. Immune and antibody responses to an isolated capsid protein of foot-and-mouth disease virus. *J. Immunol.* 115: 1636-1641.

Bachrach HL. 1977. Foot-and-mouth disease virus. Properties, Molecular Biology and Immunogenicity. En: Romberg, JA, (eds.) *Beltville Symposia in Agri. Res. I. Virol. in Agriculture*, Allanheld, Osmun, Montclair, pp. 3-32.

Baltimore DG, Girard M. 1966. An intermediate in the synthesis of poliovirus RNA. *Proc. Natl. Acad. Scie. U.S.A.* 56: 741-748.

Baltimore DG. 1968. Structure of the poliovirus replicative intermediate RNA. *J. Mol. Biol.* 32: 359-368.

Barei S, Pereira HG, Nardelli L, Panina G, De Simone F. 1976. Data on a FMD virus of type "A" isolated in Italy in 1975. *International Symposium on foot-and-mouth disease, Lyon, Develop. biol. Standard.* 35: 175-178.

Baron MH, Baltimore D. 1982a. *In vitro* copying of viral positive strand RNA by poliovirus replicase. *J. Biol. Chem.*

257: 1259-1266.

Baron MH, Baltimore D. 1982b. Purification and properties of a host cell protein required for poliovirus RNA replication *In vitro*. *J. Biol. Chem.* 1251-1258.

Bauer K, Müller H, Eisener G. 1977. Untersuchungen zur epidemiologischen Bedeutung von Maul-und-Klauenseuche-(MKS). *Virusdauer ausscheidern. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 90: 1-5.

Baxt B, Grubman MJ, Bachrach HL. 1979. The relation of poly(A) length to specific infectivity of viral RNA: a comparison of different types of foot-and-mouth disease virus. *Virology.* 98: 480-483.

Baxt B, Bachrach HL. 1980. Early interactions of foot-and-mouth disease virus with culture cells. *Virology.* 104: 42-55.

Baxt B, Bachrach HL. 1982. The adsorption and degradation of FMDV by isolated BHK-21 cell plasma membranes. *Virology.* 116: 391-405.

Baxt B, Morgan DO, Robertson BH, Timpone CA. 1984. Epitopes on foot-and-mouth disease virus outer capsid protein VP1 involved in neutralization and cell attachment. *Journal of virology.* 51: 298-305.

Baxt B. 1987. Effects of Lysosomotropic compounds on early events in foot-and-mouth disease virus replication. *Virus Research.* 7: 257-271.

Baxt B, Vakharia V, Moore DM, Franke AJ, Morgan DO. 1989. Analysis of neutralizing antigenic sites on the surface of type A₁₂ foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 61: 2143-2151.

Baxt B y Becker H. 1990. The effect of peptides containing the Arginine-Glycine-Aspartic acid sequence on the adsorption of foot-and-mouth disease virus to tissue culture cells. *Virus Genes.* 4: 73-83.

Beaton WG. 1958. L'epizootiologie regionale comparée de la fièvre aphteuse (Afrique au Sud du Sahara). *Bulletin de l'office International des Epizooties.* 50: 473-481.

Beck E, Forss S, Strebel K, Cattaneo R, Feil G. 1983.

Structure of the FMDV translation initiation site and of the structural proteins. *Nucleic Acids. Res.* 11: 7873-7885.

Beck E, y Strohmaier K. 1987. Subtyping of European FMDV outbreak strains by nucleotide sequence determination. *J. Virol.* 61: 1621-1629.

Beck E. 1988. Genetic variation of foot and mouth disease virus. En: *Virus disease in laboratory and captive animals.* Matinus Darai (eds). Nighoff Publishers Boston. pp 521-533.

Belsham GJ, y Brangwyn JK. 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 proteinase in translational control. *J. Virol.* 64: 5389-5395.

Belwal LM, Palanisamy R, Nagaiah K, Kalanidhi AP, Jagannatha HM, Ramanna BC, Srinivasan VA. 1986. Serological study of foot-and-mouth disease virus type A in India. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 5: 723-730.

Bengis RG, Thomson GR, Hedger RS, de Vos P, y Pini A. 1986. Foot-and-mouth disease in the African buffalo (*Syncercus caffer*). I. Carriers as a source of infection for cattle. Onderstepoort. *J. Vet. Res.* 53: 69-73.

Bergmann IE, Augé de Mello P, Scodeller EA, La Torre JL. 1988a. Perspectives of genetic engineering vaccines against foot-and-mouth disease. *Mem. Inst. Butantan* 50: 21-30.

Bergmann IE, Tiraboschi B, Mazzuca G, Fernández E, Michailoff CA, Scodeller EA, y La Torre JL. 1988b. Serological and biochemical analysis of foot-and-mouth disease virus (serotype C₃) isolated in Argentina between 1981 and 1986. *Vaccine.* 6: 245-253.

Bergmann IE, Tiraboschi BH, Affonso Boller MA, Malirat V, Pereira PJV, y Augé de Mello P. 1989. Development of a more rapid and simple procedure for two-dimensional oligonucleotide analysis of foot-and-mouth disease virus: RNA minifingerprinting. *Bol. Cent. Panam. Fiebre Aftosa* 55: 39-42.

Bergmann IE, Malirat V, Pereira PJ. 1992. Molecular characterization of foot-and-mouth disease virus strains used

for vaccine production in South America. Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa. 58: 109-127.

Bergmann IE, Augé de Mello P, Neitzert E, Beck E, Gomes I. 1993. Diagnosis of persistent aphthovirus infection and its differentiation from vaccination response in cattle by use of enzyme-linked immunoelectrotransfer blot analysis with bioengineered nonstructural viral antigens. Am. J. Vet. Res. 54: 825-831.

Bergmann IE, y Malirat V. 1993. Molecular approaches to laboratory diagnosis of persistent foot-and-mouth disease virus infection: a review. Boletín del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. 59: 166-177.

Bergmann IE, Malirat VM, Augé de Mello P y Gomes I. 1995. Detection of foot-and-mouth disease viral sequences in various fluids and tissues during persistent infection in cattle. Am. Jour. of Vet. Res. 80: 1-4.

Bernstein HD, Baltimore D. 1988. Poliovirus mutants that contain a cold-sensitive defect in viral RNA synthesis. J. of Virol. 62: 2922-2928.

Bishop DHL. 1983. The application of RNA fingerprinting and sequency to viral diagnosis. Current topics in Microb. and Immunology 104: 259-271.

Bittle JL, Houghten RA, Alexander H, Shinnick TM, Sutcliffe LG, Lerner RA, Rowlands DJ, y Brown F. 1982. Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. Nature 298: 30-33.

Black DN, Stephenson P, Rowlands DJ. 1979. Sequence and location of the poly c tract in aphtho and cardiovirus RNA. Nucleic Acids. Res. 6: 2381-2390.

Bolwell C, Brown AL, Barnett PV, Campbell RO, Clarke BE, Parry NR, Ouldbridge EJ, Brown F, Rowlands DJ. 1989. Host cell selection of antigenic variants of foot-and-mouth disease virus. J. gen. Virol. 70: 45-57.

Brooksby JB. 1982. Portraits of viruses: foot-and-mouth disease. *Intervirology* 18: 1-23.

Brown F, Hyslop NStG, Crick J. 1963. The use of acethylethylenimine in the production of inactivated foot-and-mouth disease vaccines. *J. Hyg. Camb.* 61: 37-344.

Brown F. 1990. Picornaviruses. In: Van Regenmortel MHV, Neurath AR (eds) *Immunochemistry of viruses II. The basis for serodiagnosis and vaccines.* Elsevier, Amsterdam, pp 153-159.

Bulloch W. 1927. FMD in the sixteenth century. *Journal of comparative Pathology and Therapeutics.* 40: 75-76.

Buonagurio DA, Nakada S, Desselberger U, Krystal M, y Palese P. 1985. Noncumulative sequence changes in the hemagglutinin genes of influenza C virus isolates. *Virology* 146: 221-232.

Bureau of Animal Industry USDA ARS. 1947-1950. Summary of developments in the Mexican outbreak of foot- and- mouth disease with supplementary information on US cooperation in control measures.

Burroughs JN, Rowlands D, Sangar DV, Talbot P y Brown F. 1971. Further evidence for multiple proteins in the Foot-and-Mouth Disease Virus particle. 13: 73-84.

Burroughs JN, Sangar DV, Clarke VE, Rowlands DJ, Billiau A, y Collen D. 1984. Multiple proteases in foot-and-mouth disease replication. *J. Virol.* 50: 878-883.

Burrows R. 1966. Studies on the carrier state of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus. *J. Hyg.* 64: 81-90.

Burrows R. 1968. Persistence of foot-and-mouth disease virus in sheep. *Journal of Hygiene.* 66: 633-640.

Burrows R, Mann JA, Greig A, Chapman WG, y Goodridge D. 1971. The growth and persistence of foot-and-mouth disease virus in the bovine mammary gland. *Journal of Hygiene, Cambridge.* 69: 307-321.

Butterworth BE, Hall L, Stoltzfus CM, Rueckert RR. 1971. Virus specific proteins synthesized in encephalomyocarditis virus-infected HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 3083-3087.

Butterworth BE, Shimshick EJ, Yin FH. 1976. Association of the polioviral RNA polymerase complex with phospholipid membranes. *J. Virol.* 19: 457-466.

Callis JJ, McKerber PD, Graves JH. 1968. Foot-and-mouth disease: a review. *J. Am. Veterinary Medical Association.* 153, 12: 1798-1802.

Caliguri LA, Tamm I. 1970. Characterization of poliovirus specific structures associated with cytoplasmatic membranes. *Virology.* 42: 112-122.

Cao X, Bergmann IE, Füllkrug R, y Beck E. 1995. Functional analysis of the two alternative translation initiation sites of foot-and-mouth disease virus. *J. of Virol.* 69: 560-563.

Capstick PB, Telling RC, Chapman WG, Stewart DL. 1962. Growth of a cloned strain of hamster kidney cells in suspended cultures and their susceptibility to the virus of foot-and-mouth disease virus. *Nature. London.* 195: 1163-1164.

Carrillo CE, Rieder Rojas E, Cavallaro L, Schiappacassi M, Campos R. 1989. Modification of foot-and-mouth disease virus after serial passages in the presence of antiviral polyclonal sera. *Virology.* 171: 599-601.

Carrillo C, Plana J, Mascarella R, Bergada J, y Sobrino F. 1990a. Genetic and phenotypic variability during replication of foot-and-mouth disease virus in swine. *Virology.* 179: 890-892.

Carrillo C, Dopazo J, Moya A, Gonzalez M, Martinez MA, Saiz JC, Sobrino F. 1990b. Comparison of vaccine strains and the virus causing the 1986 foot-and-mouth disease outbreak in Spain: epizootiological analysis. *Virus research.* 15: 45-56.

Carroll AR, Rowlands DJ, Clarke BE. 1984. The complete nucleotide sequence of the RNA coding for the primary translation product of foot-and-mouth disease virus. *Nucleic Acid Research.* 12: 2461-2472.

Cavanagh D, Rowlands DJ, Brown F. 1978. Early events in the interaction between FMDV and primary kidney cells. *J. Gen. Virol.* 41: 255-264.

Chatterjee NK, Bachrach HL, Polatnick J. 1976. Foot-and-mouth

disease virus RNA. Presence of 3' terminal Polyriboadenylic acid absence of aminoacid binding ability. *Virology*. 69: 369-377.

Cheung A, DeLamarter J, Stephen W, y Küpper H. 1983. Comparison of the major antigenic determinants of different serotypes of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 48: 451-459.

Clarke BE, Newton SE, Carroll AR, Francis MJ, Appleyard G, Syred AD, Highfield PE, Rowlands DJ, y Brown F. 1987. Improved immunogenicity of a peptide epitope after fusion to epatitis B core protein. *Nature*. 330: 381-384.

Clarke, BE, Sangar, DV. 1988. Processing and assembly of foot-and-mouth disease virus proteins using genomic RNA. *J. Gen. Virol.* 69: 2313-2335.

Clements JE, D'Antonio N, y Narayan O. 1982. Genomic changes associated with antigenic variation of visna virus. II. Common nucleotide sequence changes detected in variants from independent isolations. *J. Mol. Biol.* 158: 415-434.

Clewley JP, y Bishop DHL. 1982. Olingonucleotide fingerprinting of viral genomes. *New Developments in Practical Virology*. pp 231-277.

Coffin JM. 1986. Genetic variations in AIDS viruses. *Cell*. 46: 1-4.

Coffin JM. 1990. Genetic variation in retroviruses. En: Kurstak E, Marusyk RG, Murphy FA, Van Regenmortel MHV. (eds). *Applied virology research*. Vol. 2. Plenum, N.Y. pp 11-33.

Condy JB, y Hedger RS. 1974. The survival of foot-and-mouth disease virus in african buffalo with non-transference infection to domestic cattle. *Research in veterinary science*. 16: 182-185.

Costa Giomi MP, Bergmann IE, Scodeller EA, Augé de Mello P, Gomes I, y La Torre JL. 1984. Heterogeneity of the polyribocytidylic acid tract in aphthovirus: biochemical and biological studies of viruses carrying polyribocytidylic acid tracts of different lengths. *J. Virol.* 51: 799-805.

Costa Giomi MP, Gomes I, Tiraboschi B, Augé de Mello P, Bergmann IE, Scodeller EA, y La Torre JL. 1988. Heterogeneity of the polyribocytidilic acid tract in aphthovirus: changes in the size of the poly(C) of viruses recovered from persistently infected cattle. *Virology*. 162: 58-64.

Cottral GE, y Bachrach HL. 1968. Foot-and-mouth disease viremia. *Proc 72nd Ann. Meet. US Anim. Htl. Assoc.* pp 383-399.

Cowan KM, Errol N, Whitehead AP. 1974. Heterogeneity of type Asia 1 foot-and-mouth disease virus in BHK-21 cells and relationship to vaccine preparation. *Bull. Off. Int. Epizoot.* 81: 1271-1298.

Crowell R, y Landau BJ. 1979. Receptors as determinants of cellular tropism in picornavirus infection. In *receptors and human disease*. Bean AG, Chopin P. (es) Jos. Macy Fdn. N.Y. pp 1-33.

Cunha RG, Baptista Junior JA, Serrao UM, Torturella I. 1957. El uso de los ratones lactantes en la evaluación de anticuerpos contra el virus de la fiebre aftosa y su significación inmunológica. *Gac. Vet. Buenos Aires*. 19 (110): 243-267.

Cunliff HR. 1962. Antibody response in a group of swine after infection with foot-and-mouth disease virus. *Canad. J. Comp. Med.* 26: 182-185.

Dasgupta A, Zabel P, Baltimore D. 1980. Dependence of the activity of the poliovirus replicase on a host cell protein. *Cell*. 19: 423-429.

Dasgupta A. 1983. Purification of a host factor required for "in vitro" transcription of poliovirus RNA. *Virology*. 128: 245-251.

Davies WK, Lewis GB, y Randall HA. 1968. Some distributional features of the foot-and-mouth epidemic. *Nature, London*. 219: 121-125.

Dawe PS, Sorensen K, Ferris NP, Barnett ITR, Armstrong RM, Knowles NJ. 1994. Experimental transmission of foot-and-mouth disease virus from carrier African buffalo (*Syncerus caffer*) to

cattle in Zimbabwe. Vet. Rec. 139: 211-215.

de la Torre JC, Dávila M, Sobrino F, Ortín J, y Domingo E. 1985. Establishment of cell lines persistently infected with foot-and-mouth disease virus. Virology. 145: 24-35.

de la Torre JC, Martinez-Salas E, Diez J, Villaverde A, Gebauer F, Rocha E, Dávila M, y Domingo E. 1988. Coevolution of cells and viruses in a persistent infection of foot-and-mouth disease virus in cell culture. J. Virol. 62: 2050-2058.

de la Torre JC, De la Luna L, Diez J, Domingo E, 1989a. Resistance to FMDV is mediated by trans-acting cellular products. J. Virol. 63: 2385-2387.

de la Torre JC, Martinez-Salas E, Diez J, Domingo E. 1989b. Extensive cell heterogeneity during persistent infection with foot-and-mouth disease virus. J. Virol. 63: 59-63.

de la Torre JC, Wimmer E, Holland JJ. 1990. Very high frequency reversion to guanidine resistance in clonal pools of guanidine-dependent type 1 poliovirus. J. Virol. 64: 664-671.

Denoya CD, Scodeller E, Vásquez C, y La Torre J. 1978. Foot-and-mouth disease virus II: Endoribonuclease activity within purified virus. Virology 89:67-64.

Devaney MA, Vakharia VN, Loyd RE, Ehrenfeld E, y Grubman MJ. 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.

Dietzschold B, Kaaden OR, Tokni T, y Bohm O. 1971. Polynucleotide sequence homologies among the RNAs of FMV types A, C and O. J. Gen. Virol. 13: 1-7.

Dietzschold B, Kaaden OR, y Ahl R. 1972. Hybridization studies with subtypes and mutants of foot-and-mouth disease virus type O. J. Gen. Virol. 15: 171-174.

Diez J, Mateu MG, y 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, Dávila M, Escarmís C, Mateu MG, Dominguez J, Pérez JJ, Giralt E, Melero JA, y Domingo E. 1990. Unique amino acid substitutions in the capsid proteins of foot-and-mouth disease virus from a persistent infection in cell culture. *J. Virol.* 64: 5519-5528.

DiMarchi R, Brooke G, Gale C, Cranknell V, Doel T, y Mowat N. 1986. Protection of cattle against foot-and-mouth disease by a synthetic peptide. *Science.* 132: 639-641.

Dinter Z, Phillipson L, Wesslen T. 1959. Persistent foot-and-mouth disease infections of cells in tissue culture. *Virology.* 8: 542-544.

Doel TR, Sangar DV, Rowlands DJ, Brown F. 1978. A reappraisal of the biochemical map of foot-and-mouth disease virus RNA. *J.Gen. Virol.* 41:395-404.

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

Domingo E, Martínez-Salas E, Sobrino F, de la Torre JC, Portela A, Ortín J, Lopez-Galindez C, Perez-Brena P, Villanueva N, Najera R, Vandepol S, Steinhauer D, De Polo N, y Holland JJ. 1985. The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: Biological relevance. A Review. *Gene.* 40: 1-8.

Domingo E, Holland JJ. 1988. High error rates, population equilibrium and evolution of RNA replication systems. En: Domingo E, Holland JJ, Ahlquist P, (eds). *RNA genetics*, Vol. 3. CRC, Boca Raton, pp 3-36.

Domingo E, Mateu MG, Martínez MA, Dopazo J, Moya A, y Sobrino F. 1990. Genetic variability and antigenic diversity of foot-and-mouth disease virus. En: "Applied Virology Research," Virus variability, epidemiology and control (E. Kurstak, R.G. Marusyk, F.A. Murphy, and M.H.V. Van Regenmortel, Eds.). Vol. 2. Plenum Press, New York. pp 233-266.

Domingo E, y Holland JJ. 1993. Mutation rates and rapid evolution of RNA viruses. En: *The evolutionary biology of viruses..* S. Morse (ed.). Raven Press, NY. pp 161-184.

Dräger N. 1974. Immobilisation von afrikanischen Büffeln im

Rahmen der Maul-und-Klauenseuchebekämpfung im Botswana. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 87: 328-330.

Eggers HJ, y Tamm I. 1965. Coxackie A9 virus: mutation from drug dependence to drug resistance. Science. 148: 97-98.

Eigen M, Biebricheer CK. 1988. Sequence space and quasispecies distribution. En: Domingo E, Holland JJ, Ahlquist P, (eds). RNA genetics, Vol. 3. CRC, Boca Raton, pp 211-245.

Eigen M, Schuster P. 1979. The hypercycle. A principle of natural self-organization. Springer, Berlin, Heidelberg, N.Y.

Eigen M, Gardner W, Schuster P, Winkler-Oswatitsch R. 1981. The origin of genetic information. Sci. Am. 244: 88-188.

Eigen M. 1993. Viral Quasispecies. Sci. Amer. N°7. pp.32-39.

Escarmís C, Toja M, Medina M, Domingo E. 1992. Modification of the 5' untranslated region of foot-and-mouth disease virus after prolonged persistence in cell culture. Vir. Res. 26: 113-126.

Espinoza AM, Knowles NJ. 1983. A serological and biochemical study of new field isolates of foot-and-mouth disease virus type a in Peru from 1975 to 1981. Veterinary Microbiology. 8: 555-562.

Etchison D, Ehrenfeld E. 1981. Comparison of the replication complexes synthesizing poliovirus RNA. Virology. 111: 34-46.

Fagg RH, y Hyslop NSTG. 1966. Isolation of a variant strain of foot-and-mouth disease virus (type O) during passage in partly immunized cattle. J. Hyg. 64: 397-404.

Fellner P. 1979. General organization and structure of picornaviruses genome. En: The Molecular Biology of Picornaviruses. ed. Perez-Bercoff , R., Plenum, NY. pp 25-47.

Fellowes ON, y Sutmöller P. 1970. Foot-and-mouth disease virus: biological characteristics of virus from bovine carriers. Arch. Gesamte Virusforsch. 30: 173-180.

Fernandez-Muñoz R, Darnel JE. 1976. Structural difference between the 5' termini of viral and cellular mRNA in poliovirus-infected cells: possible basis for the inhibition of host protein syntesis. J. Virol. 126: 719-726.

Ferreira MEV. 1976. Prueba de microneutralización para estudios de anticuerpos de la fiebre aftosa. Bol. Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. 21-22:17-20.

Fogedby EG, Malmquist WA, Osteen OL, y Johnson ML. 1960. Airborne transmission of foot-and-mouth disease virus. Nordisk Veterinarmedicin. 12: 490-498.

Forss S, Strebel K, Beck E, Schaller H. 1984. Nucleotide sequence and genome organization of foot-and-mouth disease virus. Nucleic Acid Res. 12: 6587-6601.

Fox G, Stuart D, Ravindra Acharya K, Fry E, Rowlands D, Brown F. 1987. Crystallization and preliminary x-ray diffracction analysis of foot-and-mouth disease virus. J. Mol. Biol. 196: 591-597.

Fox G, Parry NR, Barnett PV, McGinn B, Rowlands D, Brown F. 1989. The cell attachment site on foot-and-mouth disease virus includes the aminoacid sequence RGD (Arginine-Glycine-Aspartic acid). J. Gen. Virol. 70: 625-637.

Francis MJ, Ouldrige EJ, y Black L. 1983. Antibody response in bovine pharyngeal fluid following foot-and-mouht disease vaccination and/or exposure to live virus. Res. Vet. Sci. 35: 206-210.

Francis MJ, Hastings GZ, Brown F, Mc Dermid J, Lu YA, y Tamm JP. 1991. Immunological evaluation of the multiple antigen peptide (MAP) system using the major immunogenic site of foot-and-mouth disease virus. Immunology 73: 249-254.

Franklin RM. y Baltimore D. 1962. Patterns of macromolecular syntheses in normal and virus-infected mammalian cells. Cold Spring Harbour Symp. Quant Biol. 27: 175-198.

Frascatorri H. 1545 (Traducción). En: Wright, W., C., eds. Contagion, contagious diseases and their treatment. London, Putnams.

Frenkel HS. 1950. Research on foot-and-mouth disease. II. The cultivation of the virus in explanations of tongue epithelium of bovine animals. Am. J. Vet. REs. 11:371-373.

Garland AJM, Baber B, Hamblin C, Rowe L, Barnett IJR, Pinto AA, Collen T y Donaldson A. 1981. The 1975 foot-and-mouth epidemic in Malta. II. The detection of carriers and inapparent

infection. Brit. Vet. J. 137: 381-387.

Gebauer F, de la Torre JG, Gomes I, Mateu MG, Barahona H, Tiraboschi B, Bergmann I, Augé de Mello P, y 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.

Geysen HM, Barteling SJ, y Mueloen RH. 1985. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 178-182.

Giraud AT, Gomes I, Augé de Mello P, Beck E, La Torre JL, Scodeller EA. 1987. Isolation and characterization of recombinants between attenuated and virulent aphthovirus strains. *J. Virol.* 61: 419-425.

Giraud AT, Gomes I, Augé de Mello P, Beck E, La Torre JL, Scodeller E, y Bergmann IE. 1988. Behaviour of intertypic recombinants between virulent and attenuated aphthovirus strains in tissue culture and cattle. *J. Virol.* 62: 3789-3794.

Golini F, Nomoto A, Wimmer E. 1978. The genome-linked proteins of picornavirus IV. Difference in the VPgs of encephalomyocarditis virus and poliovirus as evidence that genome-linked proteins are virus-coded. *Virology.* 89: 112-118.

Gonzalez MJ, Saiz JC, Laor O, y Moore DM. 1991. Antigenic stability of foot-and-mouth disease virus variants on serial passage in cell culture. *J. Virol.* 65: 3949-3953.

Grubman MJ, y Baxt B. 1982. Translation of foot-and-mouth disease virion RNA and processing of the primary cleavage products in a rabbit reticulocyte lysate. *Virology.* 116: 19-30.

Grubman MJ, Robertson BH, Morgan DO, Moore DM, Dowbenko D. 1984. Biochemical map of polypeptides specified by foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 50: 579-586.

Grubman MJ. 1984. *In vitro* morphogenesis of foot-and-mouth disease virus. *J. Gen. Virol.* 49: 760-765.

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

Hall L, Rueckert R. 1971. Infection of mouth fibroblast by cardioviruses. Premature uncoating and its prevention by elevated pH and magnesium Chloride. Virology 43: 152-165.

Hamblin C, Barnett ITR, y Crowther JR. 1986. A new enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus. II. Application. J. Immunol. Methods. 93: 123-129.

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

Harris TJR, y Brown F. 1977. Biochemical analysis of a virulent and an avirulent strain of foot-and-mouth disease virus. J.Gen. Virol. 34: 87-105.

Hedger RS. 1968. The isolation and characterization of foot-and-mouth disease virus from clinically normal herds of cattle in Botswana. J. Hyg. 66: 27-36.

Hedger RS. 1970. Observations on the carrier state and related antibody titres during an outbreak of foot-and-mouth disease. J. Hyg. 68: 53-60.

Hedger RS. 1972. Foot-and-mouth disease virus and the african buffalo (*syncerus caffer*). Journal of comparative pathology. 82: 19-28.

Hedger RS, y Condy JB. 1985. Transmission of foot-and-mouth disease from African buffalo virus carriers to bovines. Vet. Rec. 117: 205.

Heinz BV, Rueckert RR, Shepard DA, Dutko FJ, McKinlay MA, Faucher M, Rossman MG, Berger J, Smith TJ. 1989. Genetic and molecular analyses spontaneous mutants of human rhinovirus 14 that are resistance to an antiviral compound . J. Virol 63: 2476-2485.

Henderson WM. 1960. Foot-and-Mouth disease and related vesicular diseases. Adv. Vet. Sci. 6: 19-77.

Hogle JM, Chow M, Filman DJ. 1985. The three dimensional structure of poliovirus at 2.9 A Resolution. Science 229: 1358

Holland JJ, Spindler K, Horodyski, F, Grabau E, Nichol S, y

Vandepol S. 1982. Rapid evolution of RNA genomes. *Science*. 215: 1577-1585.

Holland JJ, de la Torre JC, Steinhauer DA, Clarke D, Duarte E, Domingo E. 1989. Virus mutation frequencies can be greatly underestimated by monoclonal antibody neutralization of virions. *J. Virol.* 63: 5030-5036.

Holland JJ, Domingo E, de la Torre JC, Steinhauer DA. 1990. Mutation frequencies at defined single codon sites in vesicular stomatitis virus can be increased only slightly by chemical mutagenesis. *J. Virol.* 64: 3960-3962.

Holland JJ, de la Torre JC, Clarke DK. 1991. Quantitation of relative fitness and great adaptability of clonal populations of RNA viruses. *J. Virol.*

Holland JJ, de la Torre JC, Steinhauer DA. 1992. RNA virus populations as quasispecies. En: *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 176: 1-20.

Hruby DE, Roberts WK. 1978. Encephalomyocarditis virus RNA. III. Presence of a genome associated protein. *J. of Virology*. 25: 413-415.

Hugh-Jones ME. 1972. Epidemiological studies on the 1967/68 foot-and-mouth disease epidemic: Attack rates and cattle density. *Research in Veterinary Science*. 13: 411-417.

Hyslop NStG. 1965. Isolation of variant strains from foot-and-mouth disease virus in cell culture containing antiviral sera. *J. Hyg., Camb.* 41: 135-142.

Hyslop NStG, y Fagg RH. 1965. Isolation of variants during passage of a strain of foot-and-mouth disease virus in partly immunized cattle. *J. Hyg.* 63: 357-368.

Hyslop NStG. 1970. The epizootiology and epidemiology of foot-and-mouth disease. *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine*. 14: 261-307.

Jacobson M, y Baltimore D. 1968a. Polypeptide cleavages in the formation of poliovirus proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 61: 77-84.

Jacobson M, y Baltimore, D. 1968b. Morphogenesis of poliovirus. I. Association of the viral RNA with the coat protein. *J.Mol. Biol.* 22:369-378.

Jacobson MF, Asso J, y Baltimore D. 1970. Further evidence on the formation of poliovirus proteins. *J. Mol. Biol.* 49: 657-669

Kaaden OR, Eissner G, Böhm HO. 1970. Untersuchungen über Maul- und Klauenseuche (MKS)-Virusdauer ausscheider bei vakzinierten und experimentell infizierten Rindern. *Zbl. Vet. Med. B.* 17: 485-496.

Khukhorov VM, Pronin NA, Sarkisyan RA, Potapova AF y Onufriev VP. 1973. Virus carriers amongst animals recovered from foot-and-mouth disease. *Veterinarya (Moscow)*. N° 9, 44-46. (en ruso). *Cit. Coopers FMD Bull.* 13, abstr. 74/36, 1974.

Kimura M. 1983. The neutral theory of molecular evolution. In "Evolution of Genes and Proteins: (M. Nei and R.K. Koehn, eds.), pp. 208-233. Sinauer Assoc., Sunderland, Mass.

King AMQ, Sangar DV, Harris TJR, y Brown F. 1980. Heterogeneity of the genome linked protein of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 34: 627-634.

King AMQ, Underwood BO, McCahon D, Newman JW, y Brown F. 1981. Biochemical identification of viruses causing the 1981 outbreaks of foot-and-mouth-disease in the UK. *Nature* Vol. 293: 479-480.

King AMQ, McCahon D, Slade F, Newman JW. 1982. Biochemical evidence of recombination within the unsegmented RNA genome of aphthovirus. *J. of. Virol.* 41: 66-77.

King AMQ, McCahon B, Saunders K, Newman JW, Slade WR. 1985. Multiple sites of recombination within the RNA genome of foot-and-mouth disease virus. *Vir. Res.* 3: 373-384.

Kit M, Kit S, Little SP, DiMarchi RD y Gale C. 1991. Bovine herpes virus I (infectious bovine rhinotracheitis virus)-based viral vector which expresses foot-and-mouth disease epitopes. *Vaccine.* 9: 564-572.

Kitson JD, McCahon D, Belsham GJ. 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 JD, Burke KL, Pullen LA, Belsham GJ, y Almond JW. 1991. Chimeric polioviruses that include sequences derived from two independent antigenic sites of foot-and-mouth disease virus (FMDV) induces antibodies against FMDV in guinea pigs. *J. Virol.* 65: 3068-3075.

Kleid DG, Yansura D, Small B, Dowbwnko D, Moore DM, Grubman MJ, McKercher PD, Morgan DO, Robertson BH, y Bachrach HL. 1981. Cloned viral protein vaccine for foot-and-mouth disease: responses in cattle and swine. *Science*. 214: 1125-1129.

Klump WM, Marquardt O, y Hofschneider PH. 1984. Biologically active protease of FMDV is expressed from cloned viral cDNA in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 81: 3251-3255.

Klump WM, Bergmann IE, Muller BC, Detlev A, y Kandolf R. 1990. Complete nucleotide sequence of infectious coxsackievirus B3 cDNA: Two initial 5' uridine residues are regained during plus strand RNA synthesis. *J. of Virology*. 64: 1573-1583.

Knowles NJ, y Sharma GK. 1990. A study of antigenic variants of foot-and-mouth disease virus type A in India between 1977 and 1985. *Rev. Sci.tech. Off. int. Epiz.* 9: 1157-1168.

Kothmann G, Kaaden OR, y Eissener G. 1973. Isolierung eines Maul-und-Klauenseuche Dauerausscheidervirus Typ A aus dem Rind. *Deut. Tierärztl. Wschr.* 80: 269-271.

Kozak M. 1989. The scanning model for translation, an update. *J. of Cell Biology*. 108: 229-241.

Kühn R, Luz N, y Beck E. 1990. Functional analysis of the internal translation initiation site of Foot-and-Mouth Disease Virus. *J. Virol.* 64: 4625-4631.

Laporte J, Grosclaude J, Wantyghen J, Bernard S, y Rouze P. 1973. Neutralisation in culture cellulaire du pouvoir infectieux du virus de la fièvre aphteuse par des sérums provenant de soros immuniss à l'aide d' une protéine viral purifiée. *C. R. Acad. Sci. SEr D*. 276: 3399-3402.

Lazarus LH, y Barzilai R. 1974. Association of foot-and-mouth disease virus replicase with RNA template and cytoplasmatic membrane. *J. Gen. Virol.* 23: 213-218.

Lea S, Hernández J, Blakemore W, Brocchi E, Curry S, Domingo E, Fry E, Abu Ghazaleh R, King A, Newman J, Stuart D, y Mateu MG. 1994. The structure and antigenicity of the type C foot-and-mouth disease virus. *Structure.* 2: 123-139.

Lee YF, Nomoto A, Detjen BM, y Wimmer E. 1977. A protein covalently linked to poliovirus genome RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 59-63.

Lee PWK, Colter JS. 1979. Further characterization of mengo subviral particles: A new hypothesis for picornavirus assembly. *Virology* 97: 266-274.

Lodish HF, Houseman D, y Jacobson M. 1971. Initiation of haemoglobin synthesis. Specific inhibition by antibiotic and bacteriophage ribonucleic acid. *Biochemistry.* 10: 2348-2356.

Lucas-Lenard, JM. 1979. Inhibition of cellular protein synthesis after virus infection. In: *The molecular biology of Picornaviruses*, edites by Perez-Bercoff. pp. 73-79. Cambridge University Press. New York.

Luo M, Vried G, Kamer G, Minor I, Arnold E, Rossmann MG, Boege V, Scraba DG, Duke GM, Palmember AC. 1987. The atomic structure of mengo virus at 3.0 A Resolution. *Science* 235: 182-191.

Luo M, Rossmann MG, Palmemberg AC. 1988. Prediction of three-dimensional models for foot-and-mouth disease virus and hepatitis A virus. *Virology.* 166: 503-514.

Marquardt O. 1982. Three strains of foot-and-mouth disease virus are highly conserved in the 3' termini and highly variable in the genes of two capsid proteins. *J. Gen. Virol.* 59: 283-294.

Martínez MA, Carrillo C, Plana J, Mascarella R, Bergada J, Palma EL, Domingo E, y Sobrino F. 1988. Genetic and immunogenic variations among closely related isolates of foot-and-mouth disease virus. *Gene* 62: 75-84.

Martínez MA, Carrillo C, González-Candelas F, Moya A, Domingo

E, y Sobrino F. 1991a. Fitness alteration of foot-and-mouth disease virus mutants: measurement of adaptability of viral quasispecies. *J. Virol.* 65: 3954-3957.

Martínez MA, Hernández J, Piccone ME, Palma EL, Domingo E, Knowles N, y Mateu MG 1991b. Two mechanisms of antigenic diversification of foot-and-mouth disease virus. *Virology.* 184: 695-706.

Martínez MA, Dopazo J, Hernández J, Mateu MG, Sobrino F, Domingo E, y Knowles 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.

Martínez-Salas E, Ortín J, y Domingo E. 1985. Sequence of viral replicase gene from Foot-and-Mouth disease virus C1 Santa Pau (C-58). *Gene.* 35: 55-61.

Mateu MG, Rocha E, Vicente O, Vayreda F, Navalpotro C, Andreu D, Pedroso E, Giralt E, Emjuanes L, y Domingo E. 1987. Reactivity with monoclonal antibodies of viruses from an episode of foot-and-mouth disease. *Virus Res.* 8: 261-274.

Mateu MG, da Silva JL, Rocha E, de Brum DL, Alonso A, Enjuanes L, Domingo E, y Barahona H. 1988. Extensive antigenic heterogeneity of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *Virology.* 167: 113-124.

Mateu MG, Martínez MA, Rocha E, Andreu D, Parejo J, Giralt E, Sobrino F, y 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 MG, Martinez MA, 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 MG, Hernández J, Martínez MA, Feigelstock D, Lea S, Pérez JJ, Giralt E, Stuart D, Palma EL, y 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.

Maxam AM, y Gilbert W. 1980. Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods. Enzymol.* 65: 499-559.

McCahon D. 1981. The genetics of aphthovirus. *Arch. Virol.* 69: 1-23.

McCahon D, King AMQ, Roe D, Slade WS, Newman JWI, Cleary AM. 1985. Isolation and biochemical characterization of intertypic recombinants of foot-and-mouth disease virus. *Vir. Res.* #: 87-100.

McDonnel JP, y Levintow L. 1970. Kinetics of appearance of the products of poliovirus-induced RNA polymerase. *Virology.* 42: 999-1006.

McVicar, J.W., and Sutmöller, P., 1968. Sheep and goat as foot-and-mouth disease carriers. *Proc. Natl. Livestock Sanit. Ass.* 72: 400-406.

McVicar JW, y Sutmöller P. 1969. The epizootiological importance of foot-and-mouth disease carriers. II. The carrier status of cattle exposed to foot-and-mouth disease following vaccination with an oil adjuvant inactivated virus vaccine. *Arch. Ges. Virus Forsch.* 26: 217-224.

McVicar JM, y Sutmoller P. 1970. Foot-and-mouth disease: The agar gel diffusion precipitin test for antibody to virus-infection-associated (VIA) antigen as a tool for epizootiologic surveys. *Am J. Epidemiol.* 92: 273-278.

McVicar JW, y Sutmöller P. 1974. Neutralizing activity in the serum and oesophageal-pharyngeal fluid of cattle after exposure to foot-and-mouth disease virus and subsequent re-exposure. *Archiv. Gesamte Virusforsch.* 44: 173-176.

McVicar JW, McKercher PD, y Graves JH. 1976. The influence of infectious rhinotracheitis virus on foot-and-mouth disease carrier state. *Proc. U.S. Anim. Hlth. Ass.* 80: 254-261.

Medina M, Domingo E, Brangwyn J, Belsham GJ. 1993. The two species of the foot-and-mouth disease virus leader proteins

expressed individually exhibit the same activities. *Virology*. 194: 355-359.

Melnick JL. 1983. Portraits of viruses: the picornaviruses. *Inervirology* 20: 61-100.

Menges RW. 1948. Cyclic variations in prevalence of foot-and-mouth disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 113: 432-447.

Morrow CD, y Dasgupta A. 1983. An antibody to a synthetic nonapeptide corresponding the NH₂-terminal of poliovirus VPg reacts with native VPg and inhibits *in vitro* replication of poliovirus RNA. *J. of Virol.* 48: 429-439.

Mowat GM, Chapman WG. 1962. Growth of foot-and-mouth disease virus in a fibroblastic cell line derived from hamster kidneys. *Nature, London*. 194: 253-255.

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

Nei M. 1983. Genetic polymorphism and the role of mutation in evolution. In "Evolution of Genes and Proteins" (M. Nei and R.K. Koehn, eds.), pp. 165-190. Sinauer Assoc. Sunderland, Mass.

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

Newman JFE, Piatti PG, Gorman BM, Burrage TG, Ryan MD, Flint M, y Brown F. 1994. Foot-and-mouth disease particles contain replicase protein 3D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91: 733-737.

Obiaga JA, Rosemberg FJ, Astudillo VM, y Goic MR. 1979. Las características de la producción pecuaria como determinantes de los ecosistemas de la fiebre aftosa. *Boletín del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa*, N° 33-34: 33-42.

OIE, 1994. Informe final de la 62° Sesión General. Informe de

la Reunión de la Comisión de la OIE para la Fiebre Aftosa y otras Epizootias.

OIE, 1995. Informe final de la 63° Sesión General. Informe de la Reunión de la Comisión de la OIE para la Fiebre Aftosa y otras Epizootias.

Olascoaga RC, Augé de Mello P, Abaracón D, Gomes I, Alonso AF, Mezquita JA, Darsie GC, Pinkoski DI, Deak GJ, Gubel JG, y Barbosa JR. 1991. Producción y control de vacunas antiaftosa con adjuvante oleoso, en el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa y en el Laboratorio Regional de Apoyo Animal del Ministerio de Agricultura y Reforma Agraria, Brasil. Boletín del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, N° 56.

Olitsky PK. 1927. Summary of observations of the Commission to study foot-and-mouth disease. J. Am. Vet. Med. Ass. 70: 926-955

PANAFTOSA 1995. Situación de los programas de control de la fiebre aftosa. América del Sur, 1994. OPS/OMS/Centro Panamericano de Fiebre Aftosa.

Parisi JM, Costa Giomi P, Grigera P, Augé de Mello P, Bergmann IE, La Torre JL, Scodeller E. 1985. Biochemical characterization of an aphthovirus type O₁ strain Campos attenuated for cattle by serial passages in chicken embryos. Virology 147: 61-71.

Parry NR, Barnett PV, Ouldrige EJ, Rowlands DJ, Brown F. 1989. Neutralizing epitopes of type O foot-and-mouth disease virus. II. Mapping three conformational sites with sintetic peptide reagents. j Gen Virol 70: 1493-1503.

Parry NR, Fox G, Rowlands D, Brown F, Fry E, Acharya R, Logan D, Stuart D, 1990. Structural and serological evidence for a novel mechanism of antigenic variation in foot-and-mouth disease virus. Nature 347: 569-572.

Payne SL, Salinovich O, Nauman SM, Issel CJ, y Montelaro RC. 1987. Course and extent of variation of equine infectious anemia virus during parallel persistent infections. J. Virol.

61: 1266-1270.

Pelletier J, Kaplan G, Racaniello VR, Sonenberg N. 1988. Cap-independent translation of poliovirus mRNA is conferred by sequence elements within the 5' noncoding region. *Mol. Cell. Biol.* 8:1103-1112.

Pelletier J y Sonenberg N. 1989. Internal binding of eucaryotic ribosomes on Poliovirus RNA: translation in HeLa cell extracts. *J. Virol.* 63: 441-444.

Pereira HG. 1977. Subtyping of foot-and-mouth disease virus. *Develop. biol. Standard.* Vol. 35: 167-174.

Pereira HG. 1981. Foot-and-mouth disease. In E.P.G. Gibbs (ed.). *Virus diseases of food animals*, Vol. 2, pp 333-363. Academic Press, Inc., New York.

Pfaff E, Mussgay M. Boehm HO, Schulz GE, Schaller H. 1982. Antibodies against a preselected peptide recognize and neutralize Foot-and-Mouth disease virus. *EMBO J.* 1: 869-874.

Philipson L, Dinter Z. 1963. The role of interferon in persistent infection with foot-and-mouth disease virus. *Gen Microbiol.* 32: 277-285.

Pilipenko EV, Blinov VM, Chernov VK, Dimitrieva TM, y Agol VI. 1989a. Conservation of the secondary structure elements of the 5' untranslated region of cardio-and aphtovirus RNAs. *Nucl. Acid Reaserch*

Pilipenko EV, Blinov VM, Romanova LI, Sinyakov AN, Maslova AV, y Agol VI. 1989b. Conserved structural domains in the 5' untranslated region of picornaviral genomes: an analysis of the segments controlling translation and neurovirulence. *Virology.* 168: 201-209.

Porter AG, Fellner P, Black DN, Rowlands DJ, Harris TJ, Brown F. 1978. 3'terminal nucleotide sequences in the genome RNA of picornaviruses. *Nature.* 276: 298-301.

Prasad S, y Kumar S. 1981. Persistence of foot-and-mouth disease virus type Asia 1 isolates in the secretions and excretions of experimentally infected cattle. *Indian J. Anim.*

Sci. 51: 834-837.

Prasad S, Ahuja KL, Sharma VK. 1981. A note on the isolation of foot-and-mouth disease virus from recovered animals. Indian J. Anim. Hlth. 12: 159-160.

Raccaniello R. 1990. Cell receptors for Picornaviruses. En: Current Topics in Microbiology and Immunology. 161: 1-22.

Ramon G. 1956. Carriers and vectors of microbial germs. Bull. Off. Int. Epiz. 45: 51-91.

Richards OC, Martins SC, Jense HG, y Ehrenfeld E. 1984. Structure of poliovirus replicative intermediate RNA. Electron Microscope analysis of RNA cross-linked in vivo with psoralen derivative. J. Mol. Biol. 173: 325-340.

Richards OC, y Ehrenfeld E. 1990. Poliovirus RNA replication. En: Current Topics in Microbiology and Immunology. 161: 90-119.

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

Robson KJH, Harris TJR, y Brown F. 1977. An assessment by competition hybridization of the sequence homology between the RNAs of the seven serotypes of FMDV. J. Gen. Virol. 37: 271-276.

Robson KJH, Doel TR, Gorman BM, y Brown F. 1980. Biochemical aspects of variation in foot-and-mouth disease virus. J. Ge. Virol. 46: 179-193.

Rodrigo MJ, y Dopazo J. 1995. Evolutionary analysis of the Picornavirus family. J. Mol. Evol. 40: 362-371.

Rossi MS, Sadir AM, Schudel AA, Palma EL. 1988. Detection of foot-and-mouth disease virus with DNA probes in bovine esophageal-pharyngeal fluids. Arch. Virol. 99: 67-74.

Rossmann MG, Arnold E, Erickson JW, Frankenberger EA, Griffith JP, Hecht J, Johnson JE, Kramer G, Luo M, Mosser AG, Rueckert RR, Sherry B, y Vriend G. 1985. Structure of a human common cold virus and functional relationship to other picornaviruses. Nature (London). 317: 145-153.

Rowlands DJ, Clarke BE, Carroll AR, Brown F, Nicholson BH, Bittle JL, Houghten RA, y Lerner RA. 1983. Chemical basis of antigenic variation in foot-and-mouth disease virus. *Nature* (London) 306: 694-697.

Rueckert RR. 1990. Picornavirus and their replication, In B.N. Fields et al. (ed.), *Virology*, pp 705-735. Raven Press, New York.

Rueckert RR, y Wimmer E. 1984. Systematic nomenclature of picornavirus proteins. *J.Gen. Virol.* 50: 957-959.

Ruoslathi E, y Pierschbacher MD. 1987. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science.* 238: 491-497.

Rweyemamu MM, Pay TWF. 1978. Studies on Foot-and-Mouth disease virus strain A Morocco 5/77. *Bull. Off, Int. Epiz.* 89: 861-875.

Rweyemamu MM, Ouldrige EJ, Head M, Purse F. 1984. Evaluation of the antigenic variation within type A foot and mouth disease virus isolates from Asia. *Jornal of Biological Standardization*, 12: 191-194.

Rweyemamu MM, 1984. Antigenic variation in foot-and-mouth disease: studies based on the virus neutralization reaction. *Journal of Biological Standardization.* 12: 323-337.

Ryan MD, King AMQ, y Thomas. 1991. Cleavage of foot-and-mouth disease polyprotein is mediated by residues located within a 19 aminoacids sequence. *J. Gen. Virol.* 72: 2727-2732.

Saito K, y Vittoz R. 1958. Epizootiologie regionale comparée de la fièvre aphteuse en Asie. *Bulletin de l'office International des Epizooties.* 50: 501.

Saiz JC, Gonzalez MJ, Borca MV, Sobrino F, y Moore DM. 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.

Salt JS. 1993. The carrier state in foot-and-mouth disease an immunological review. *Br. Vet. J.* 149: 207-223.

Sangar DV, Black DM, Rowlands DJ, Brown F. 1977a. Biochemical mapping of the foot-and-mouth disease virus genome. *J. Gen. Virol.* 35: 281-297.

Sangar DU, Rowlands DJ, Harvis TJR, Brown F. 1977b. A protein covalently linked to foot and mouth disease virus RNA. Nature (London) 268: 648-650

Sangar DU. 1979. The replication of Picornaviruses. J.gen. Virol. 45: 1-13.

Sangar DV, Blac ND, Rowlands DJ, Harris TRJ, Brown F. 1980. Location of the initiation site for protein synthesis on Foot-and-Mouth disease virus RNA by in vivo translation of defined fragments of RNA. J. Virol. 33: 59-68.

Sarnow P, Bernstein HD, y Baltimore, D. 1986. A poliovirus temperature-sensitive RNA synthesis mutant located in a non-coding region of the genome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83: 533-543.

Saunders K, y King AMQ. 1982. Guandine-resistant mutants of aphthovirus induce the syntesis of an altered nonstructural polypeptide, P34. J. Virol. 42: 389-394.

Seibold HR, Cottral GE, Patty RE, Gailiunas P. 1964. Apparent modification op foot-and-mouth disease virus after prolonged residence in surviving cells. Am. J. Vet. Res. 25: 806-814.

Sekiguchi K, Franke, AJ, Baxt, B. 1982. Competition for cellular receptor sites among selected aphthoviruses. ARch. Virol. 74: 53-64.

Sellers RF, Parker J. 1969. Airborne excretion of foot-and-mouth disease virus. Journal of Hygiene. Cambridge. 67:671-677.

Shahan MS. 1962. The virus of foot-and-mouth disease. Ann. of the New York Academy of Sciences. Vol. 101, No. 2: 444-454.

Sharma SK, Singh PP, y Murty DK. 1982. Biological properties of carrier strains of foot-and-mouth disease virus type O isolated from sheep and goat. Indian J. Anim. Sci. 52: 30-34.

Smith FI, Palese P. 1988. Influenza virus: high rates of mutation and evolution. En: Domingo, E., Holland, J.J., Ahlquist, P., (eds). RNA genetics, Vol. 3. CRC, Boca Raton, pp 123-135.

Snowden WA. 1966. The growth of foot-and mouth disease virus in monolayer cultures of calf thyroid cells. Nature, London. 210:

1079-1080.

Sobrino F, Dávila M, Ortín J, y 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 EL, Beck E, Dávila M, de la Torre JC, Negro P, Villanueva N, Ortín J, y Domingo E. 1986. Fixation of mutations in the viral genome during an outbreak of foot-and-mouth disease: heterogeneity and rate variation. *Gene*. 50: 149-159.

Sobrino F, Martínez MA, Carrillo C, y Beck E. 1989. Antigenic variation of foot-and-mouth disease virus of serotype C during propagation in the field is mainly restricted to only one structural protein (VP1). *Virus Res*. 14: 273-280.

Solyom F, y Horvath Z. 1974. Persistence of foot-and-mouth disease virus in pigs. *Nag. Allatrv. Lap.* 29: 6-9. (en húngaro). *Cit. Coopers FMD Bull.* 13, abstr. 74/105, 1974.

Sonenberg N. 1990. Poliovirus translation. En: *Picornaviruses. Current topics in Microbiology and Immunology*. 161: 23-47.

Spector DH, Baltimore D. 1974. Requirement of 3'-terminal poly (adenylic acid) for the infectivity of poliovirus RNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 71: 2983-2987.

Stainhauer DA, y Holland JJ. 1987. Rapid evolution of RNA viruses. *Annu. Rev. Microbiol.* pp. 409-433.

Straver PJ, Bool PH, Claessens AMJM, y Van Bekkum JG. 1970. Some properties of carrier strains of foot-and-mouth disease virus. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 29, 113-126.

Straver PJ, y Van Bekkum J.G. 1972. Plaque production by carrier strains of foot-and-mouth disease virus in BHK monolayers incubated at different temperatures. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 37: 12-18.

Strebel K, y Beck E. 1986. A second protease of foot-and-mouth disease virus. *J. of Virol.* 58: 893-899.

Strebel K, Beck E, Strohmaier K, y Schaller H. 1986.

Characdtterization of foot-and-mouth disease virus gene products with antisera against bacterially synthesized fusion proteins. J. Gen. Virol. 57: 983-991.

Strohmaier K, Franze R, y Adam KH. 1982. Location and characterization of the antigenic portion of the FMDV immunizing protein. J. Gen. Virol. 59: 295-306.

Sutmöller P, y Gaggero A. 1965. Foot-and-mouth disease carriers. Vet. Rec. 77: 968-969.

Sutmöller P. y Cottral GE. 1967. Improved techniques for detection of foot-and-mouth disease virus in carrier cattle. Arch. Ges. Virus Forsch. 21: 170-177.

Sutmöller P, Cottral GE, y McVicar JW. 1967. A review of the carrier state in foot-and-mouth disease. Proc. 75th Ann. Meet. U.S. Livestock Sanit. Ass. 386-395.

Sutmöller P, McVicar JW, and Cottral GE. 1968. The epizootiological importance of foot-and-mouth disease carriers. I. Experimentally produced foot-and-mouth disease carriers in susceptible and immune cattle. Arch. Gesamte Virusforsch. 23: 227-235.

Sutmöller P, y Mc Vicar JM. 1972. The epizootiological importance of foot-and-mouth disease carriers. III. Exposure of pigs to bovine carriers. Arch. Gesamte Virusforsch. 31: 78-84.

Sutmöller P, Gomes I, y Astudillo V. 1984. Potency estimation of foot-and-mouth desease vaccines according to antibody assay results. Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa, 49-50: 31-34.

Takeda N, Kuhn RJ, Yang CF, Takegami T, Wimmer E. 1986. Initiation of poliovirus plus-strand syntesis in a membrane complex of infected Hela cells. J. Virol. 60: 43-53.

Takegami T, Semler BL, Anderson CW, Wimmer E. 1983. Membrane franctions active in poliovirus RNA replication contain VPg precursor polypeptides. Virology. 128: 33-47.

Tantawi HH, Moussa AAM, Omar A. 1984. Detection of foot-and-mouth disease virus carriers among farm animals in Egypt. Assuit. Vet. Med. J. 13: 66-79. Cit. Coopers FMD Bull. 24 : abstr. 86-79, 1986.

Tewari SC, y Singh IP. 1975. Isolation of foot-and-mouth disease virus from recovered animals. *Ind. Vet. J.* 52: 853-856.

Thomas AAM, Woortmeijer RJ, Puijk W, Barteiling SJ. 1988. Antigenic sites of foot-and-mouth disease virus type A₁₀. *J Virol* 62: 2782-2789.

Trono D, Pelletier J, Sonenberg, N y Baltimore, D. 1988. Translation in mammalian cells of a gene linked to the poliovirus 5' noncoding region. *Science.* 241: 445-448.

Usha R, Rohll JB, Spall VE, Shanks M, Maule AJ, Johnson JE, y Lomonsoff GP. 1993. Expression of an animal virus antigenic site on the surface of a plant virus particle. *Virology* 197: 336-374.

Vakharia VN, Devaney MA, Moore DM, Dunn JJ, y Grubman MJ. 1987. Proteolytic processing of foot-and-mouth disease virus polyproteins expressed in a cell-free system from clone-derived transcripts. *J. Virol.* 61: 3199-3207.

Van Bekkum JG, Frenkel HS, Frederiks HHJ, y Frenkel S. 1959. Observations on the carrier state of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus. *Tijdschr. Diergeneeskd.* 84, 1159-1164.

Van Bekkum JG, Straver PJ, Bool PH, y Frenke S. 1966. Further information on the persistence of infective foot-and-mouth disease virus in cattle exposed to virulent virus strains. *Bull. Off. Int. Epizoot.* 65: 1949-1965.

Van Dyke TA, y Flanagan JB. 1980. Identification of poliovirus polypeptide P₆₃ as a soluble RNA dependent RNA polymerase. *J. Virol.* 35: 732-740.

Vande Woude GF, Swaney JB, Bachrach HL. 1972. Chemical and physical properties of foot-and-mouth disease virus: a comparison with Maus Elberfeld virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 48, 1227-1229.

Vazquez C, Denoya CD, La Torre JL, y Palma E. 1978. Structure of foot-and-mouth disease virus capsid. *Virology.* 97: 195-200

Verdaguer N, Mateu MG, Andreu D, Giralt E, Domingo E y Fita I. 1995. Structure of the major antigenic loop of foot-and-mouth disease virus complexed to a neutralizing antibody. Direct involvement of the Arg-Gly-Asp motif in the interaction. *EMBO*

J. 14: 1690-1696.

Villanueva N, Dávila M, Outín J, Ortín J, Domingo E. 1983. Molecular cloning of cDNA from Foot-and-Mouth disease virus C₁ Santa Pau (C-58). Sequence of the protein VP1 coding segment. *Gene*. 23: 185-194.

Waldmann O, Trautwein K, Pyl F. 1931. Die persistenz des maul und klauenaeuchenvirus im korper durch geseuchter tiere und seine ausecheidung. *Zentralblatt f. Bakt. Par. U. Infekkr.*, 121:19-32.

Waldmann O, Kobe K, Pyl G. 1937. Die aktive immunisierung des Rindes gegen Maul-und-Klauenseuche mittles formolimpfstoff. *Zbl. Bakt. I.*, (orig) 138: 401-412.

Weddell G, Yansura D, Dowbewnko D, Hoatlin M, Grubman M, Moore D, Kleid D. 1985. Sequence variation in the gene for the immunogenic capsid protein VP₁ of foot-and-mouth disease virus type A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 68 : 2618-2622.

Weyhe D. 1966. Zur Ausscheidung des Maul-und-Klauenseuche Virus durch vakzinierte nach experimenteller Infektion immune Rinder. *Arch exp. Vet. Med.* 20: 1325-1337.

Wild T, Burroughs J, y Brown F. 1969. Surface structure of foot-and-mouth disease virus. *J. Gen. Virol.* 4: 313-320.

Wittmann G. y Eissener G. 1966. Die Ausscheidung des Maul-und-Klauenseuche (MKS)-Virus durch MKS-krankte Rinder sowie durch immune Rinder und Schweine nach experimenteller Neuinfektion *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 79: 105-109.

Xie QC, McCahon D, Crowther JR, Belsham GJ, y McCullough KC . 1987. Neutralizaiton of foot-and-mouth disease virus can be mediated through any of at least three separate antigenic sites. *J. Gen. Virol.* 68, 1637-1647.

Young, D., C., Tuschall, D., M., Flanagan, J., B., 1985. Poliovirus RNA-dependent RNA polymerase and host cell protein synthesize product RNA twice the size of poliovirion RNA *in vitro*. *J. Virol.* 54: 256-264.

ANEXO

Medio de crecimiento:

Medio de cultivo	900 ml
Suero de ternera (Gibco)	100 ml
Fungizone 1000 X	1 ml
Antibióticos 1000 X	1 ml

Medio de cultivo:

MEM (Gibco, MEM Powder Nº 410-1100)	8,82 g
Tryptose Phosphate Broth (TPB)	2,95 g
Glucosa anhidra	3,15 g
Vitaminas sol. 250 X	1,8 ml
Nitrato férrico (solución 1%)	90 µl
Bicarbonato de sodio	2,47 g
H ₂ O bidestilada c.s.p.	1000 ml

Burbujear el medio con CO₂ hasta alcanzar pH 7,2; filtrar por membrana millipore de 0,22 µm.

Vitaminas stock 250 X:

Colina.HCl	0,5 g
Acido fólico	0,5 g
Nicotinamida	0,5 g
D-(Ca ⁺⁺)Pantotenato	0,5 g
Piridoxal.HCl	0,5 g
Tiamina.HCl	0,5 g
Riboflavina 5%	10 ml
H ₂ O bidestilada c.s.p.	1000 ml
Filtrar por placa esterilizante	

Fungizone 1000 X:

Fungizone	1,25 g
H ₂ O bidestilada c.s.p.	500 ml

Filtrar por membrana millipore Q22µm

Antibióticos 1000 X:

Penicilina (1666 UI/ml)	6,3 g
Estreptomicina	10 g
H ₂ O bidestilada c.s.p.	100 ml

Filtrar por membrana millipore 0,22 μm.

PBS:

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ . 12 H ₂ O	2,9 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
H ₂ O bidestilada c.s.p.	1000 ml

Filtrar por membrana millipore 0,22 μm.

Medio sin fosfatos:

Solución A	100 ml
Solución B	100 ml
Aminoácidos 10 X	10 ml
Vitaminas 250 X	4 ml
i-Inositol 10 X	10 ml
L-Metionina 10 X	10 ml
Rojo fenol 1%	1,5 ml
H ₂ O bidestilada c.s.p.	1000 ml

Ajustar a pH 7,7 con 10 ml de *buffer* HEPES, y filtrar en placa esterilizante

Solución A:

Glicosa anhidra	45 g
NaHCO ₃	27,5 g
NaCl	64 g
KCl	4 g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	2 g

Fe(NO ₃) ₃ · 9 H ₂ O	0,001 g
H ₂ O bidestilada c.s.p.	1000 ml

Solución B:

CaCl ₂	2 g
H ₂ O c.s.p.	1000 ml

Solución de aminoácidos 10 X:

L-arginina	0,42 g
L-cisteína	0,42 g
L-glutamina	2,92 g
L-histidina HCl	0,21 g
L-isoleucina	0,524 g
L-leucina	0,524 g
L-lisina HCl	0,731 g
L-fenilalanina	0,33 g
L-treonina	0,476 g
L-triptofano	0,08 g
L-tirosina	0,362 g

L-valina	0,468 g
L-metionina	0,015 g

Solución de i-Inositol 10 X:

i-Inositol	0,036 g
H ₂ O bidestilada c.s.p.	100 ml