

## Tesis de Posgrado

# Diagnóstico de fiebre aftosa basado en la detección de anticuerpos contra la proteína no estructural recombinante 3AB1 Diagnosis of foot-and-mouth disease based on the detection of antibodies against recombinant 3AB1 nonstructural protein

Silberteín, Erica M.

1997

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

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

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

**Cita tipo APA:**

Silberteín, Erica M. (1997). Diagnóstico de fiebre aftosa basado en la detección de anticuerpos contra la proteína no estructural recombinante 3AB1. Diagnosis of foot-and-mouth disease based on the detection of antibodies against recombinant 3AB1 nonstructural protein. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2912\\_Silberteín.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2912_Silberteín.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Silberteín, Erica M. "Diagnóstico de fiebre aftosa basado en la detección de anticuerpos contra la proteína no estructural recombinante 3AB1. Diagnosis of foot-and-mouth disease based on the detection of antibodies against recombinant 3AB1 nonstructural protein". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1997.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2912\\_Silberteín.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2912_Silberteín.pdf)

Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**DIAGNOSTICO DE FIEBRE AFTOSA BASADO EN LA  
DETECCION DE ANTICUERPOS CONTRA LA PROTEINA  
NO ESTRUCTURAL RECOMBINANTE 3AB1**

Trabajo de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas

**Autor: Lic. Erica M. Silberstein**

**Director: Dr. Eduardo L. Palma**

**1997**

Lugar de trabajo: Instituto de Biotecnología, CICV, INTA Castelar.

University of Buenos Aires  
School of Sciences

**DIAGNOSIS OF FOOT-AND-MOUTH DISEASE BASED ON  
THE DETECTION OF ANTIBODIES AGAINST  
RECOMBINANT 3AB1 NONSTRUCTURAL PROTEIN**

Thesis presented to obtain the PhD degree

**Author: Lic. Erica M. Silberstein**

**Director: Dr. Eduardo L. Palma**

**1997**

Institute of Biotechnology, CICV, INTA Castelar.

## **AGRADECIMIENTOS**

Durante los últimos 5 años me preguntaba todos los días si iba a poder terminar la tesis. Y por fin, pude alcanzar mi meta después de muchísimo esfuerzo y mil horas lectura y de pipeteo. Por eso, quisiera agradecer a todos aquellos que directa o indirectamente colaboraron para que esto fuera posible:

Al INTA, por haberme brindado la posibilidad de trabajar en el IB.

Al CONICET, por las becas de iniciación y perfeccionamiento.

A Eduardo Palma, por ser mi director de tesis, por sus valiosas opiniones, por haberme dedicado todo el tiempo que fue necesario para la discusión de resultados, y ...por su infinita paciencia!!!

A Gerardo Kaplan, por su entera disposición para guiarme e incluso pipetear conmigo los primeros experimentos y por todos los consejos y el apoyo que me brindó a pesar de la distancia.

A Oscar, por su amistad, por todos los momentos compartidos desde que éramos estudiantes, por haberse bancado todos mis rayes, por su ayuda incondicional en el laboratorio y porque es un " grande"!

A Lela, por su buena onda, por su invaluable colaboración durante los últimos años (incluyendo asesoramiento artístico), por haberme resuelto los problemitas cotidianos y por todas las veces que me facilitó el regreso a casa.

A Cecilia T., Paulita y Dino, también por su amistad, porque crecimos juntos en el laboratorio y por estar siempre disponibles para todo lo que necesité.

A Analía, por las ideas y consejos que recibí, especialmente durante la última etapa de mi trabajo.

A Osvaldo Rossetti y Esteban Hopp, por su excelente disponibilidad para responder a mis inquietudes y ocuparse del funcionamiento del IB.

A Angel, por su calidez , por todas las veces que me prestó el famoso device para "Western blot" y por todas las charlas que compartimos, más allá de la ciencia.

A Silvito, Laura B., Alicia Arese, Fabiana y Eleo, por ser tan buena gente, por sus múltiples y utilísimos consejos y por facilitarme una y mil veces todo lo que les solicitaba.

A la "dulce" Daniela, por su simpatía y nuestras recientes travesuras en la Internet.

A Jorge L., Daniel B. y Osvaldo Z., por su continua asistencia técnica.

A Nilda, porque siempre recibí sus palabras de aliento cuando nos cruzábamos en los pasillos del IB.

A Magda, Diego y Sebastián, por todo lo que me re-ayudaron con las computadoras.

A Alicia Alito, Alejandro E., Alejandro T., Ana Rosa, Carolina, Cecilia V., Dalia, Fernanda, Fernando, Juan Carlos, Laura M., Marcela, Mariana, Marisa, Mercedes, María Elisa y Susana M., porque con todos ellos conviví estos años de batalla y compartí divertidas charlas de café y mate.

A Ana, Eliana e Irene por haberme facilitado parte de los sueros utilizados en este trabajo.

A Mariano P., por enseñarme algunos de los secretos del ELISA.

A Any y Martha por su amable colaboración y por sacarme las fotocopias, aunque siempre se las solicitara a último momento.

A Berta, Fabián, Haydée, Isabel, Susana y Teresita, por haber preparado todo el material que necesité.

A Jorge Casal, Claudia V. y Norma, por su ayuda desinteresada.

A Eva y Perla, por comunicarme con el mundo.

A Carlos, Néstor y Alejandro, mis amigos de siempre, por haberme acompañado.

A Sonia, Mariano y Martín, porque los re-quiero.

A Clara y Eduardo, mis papis, por su comprensión, por su confianza y por su ayuda incondicional a pesar de estar convencidos que esto de ser bióloga, y además doctora, es una locura.

A mi queridísimo Heinz, por brindarme su cariño, por apoyar ciegamente mis proyectos, por su invaluable y continuo respaldo y porque "juntos" terminamos la tesis.

A todos, mil gracias!!!!

**INDICE**

<b>INDICE</b> .....	5
<b>RESUMEN</b> .....	9
<b>RESUMEN EN INGLES (ABSTRACT)</b> .....	10
<b>ABREVIATURAS</b> .....	12
<b>INTRODUCCION</b> .....	13
<b>1. La fiebre aftosa</b> .....	13
1.1 Reseña general.....	13
1.2 Impacto económico y distribución geográfica.....	13
1.3 Sintomatología, transmisión y estado portador.....	14
<b>2. El virus de la fiebre aftosa</b> .....	16
2.1 La partícula viral.....	16
2.2 El genoma del VFA.....	19
2.3 Ciclo de replicación viral.....	22
<b>3. El diagnóstico de la fiebre aftosa</b> .....	23
3.1 Aislamiento viral.....	24
3.2 Detección del genoma del VFA.....	24
3.3 Detección de anticuerpos contra el antígeno asociado a la infección viral o antígeno VFA.....	26
3.4 Detección de anticuerpos contra las proteínas no estructurales.....	27
<b>4. El control de la fiebre aftosa</b> .....	29
4.1 Inmunización contra el VFA.....	29
4.2 Situación actual de la fiebre aftosa en la Argentina.....	31
<b>5. Objetivos</b> .....	35

<b>MATERIALES Y METODOS</b> .....	36
<b>1. Cepas bacterianas</b> .....	36
<b>2. Células</b> .....	36
<b>3. Virus</b> .....	36
<b>4. Anticuerpos</b> .....	37
<b>5. Sueros</b> .....	37
<b>6. Enzimas de restricción</b> .....	37
<b>7. Vectores de clonado</b> .....	38
<b>8. Síntesis de "cDNA"</b> .....	38
<b>9. Clonado del gen 3AB1</b> .....	40
9.1 Construcción del plásmido pGEX-3AB1.....	40
9.2 Construcción del plásmido pVL1392-3AB1.....	41
<b>10. Secuenciación de ADN</b> .....	42
<b>11. Expresión de la proteína de fusión GST-3AB1</b> .....	43
11.1 Inducción de la síntesis de la proteína de fusión GST-3AB1.....	43
11.2 Purificación de la proteína de fusión GST-3AB1.....	43
<b>12. Obtención de baculovirus recombinantes por co-transfección</b> .....	44
<b>13. Preparación y titulación de "stocks" virales</b> .....	45
<b>14. Producción y purificación de la proteína recombinante 3AB1</b> .....	46
<b>15. ELISA</b> .....	47
<b>16. "Western blot"</b> .....	47
<b>17. Inmunodifusión en agar gel (ID-VIA)</b> .....	48
<b>RESULTADOS</b> .....	49
<b>1. Expresión de la proteína no estructural 3AB1 en bacterias</b> .....	49
1.1 Amplificación del gen 3AB1 por PCR.....	49



1.2 Clonado del gen 3AB1 en el plásmido de expresión pGEX-3X.....	49
1.3 Expresión de la proteína de fusión GST-3AB1.....	52
1.3.1 Inducción de la síntesis de las proteínas GST y GST-3AB1.....	52
1.3.2 Expresión de la proteína de fusión GST-3AB1 en diferentes cepas de <i>E. coli</i> .....	53
1.4 Purificación la proteína de fusión GST-3AB1.....	54
1.5 “Western blot” .....	55
1.6 ELISA.....	58
1.7 Validación de los ensayos de ELISA y “Western blot” para el diagnóstico diferencial.....	62
<b>2. Expresión de la proteína no estructural 3AB1 en el sistema     baculovirus-células de insecto.....</b>	<b>65</b>
2.1 Clonado de la proteína no estructural 3AB1 en el plásmido de transferencia pVL-1392.....	66
2.2 Obtención del baculovirus recombinante AcMNPV-3AB1 por co-transfección.....	69
2.3 Producción y purificación de la proteína 3AB1 a partir de células Sf9 infectadas.....	70
2.4 Evaluación de la capacidad de la proteína 3AB1 producida en células Sf9 para diferenciar animales vacunados de infectados con el VFA.....	75
2.5 Comparación de la especificidad del antígeno 3AB1 y el antígeno VIA para diferenciar animales vacunados de infectados.....	78
2.6 Aplicación de los ensayos de ELISA y “Western blot” en el estudio de muestras de campo.....	79
2.7 Detección de anticuerpos anti-3AB1 en sueros de bovinos portadores.....	80
<b>DISCUSION.....</b>	<b>82</b>

**CONCLUSIONES.....92**

**BIBLIOGRAFIA.....94**

## **Diagnóstico de fiebre aftosa basado en la detección de anticuerpos contra la proteína no estructural recombinante 3AB1**

### **RESUMEN**

Las vacunas contra la fiebre aftosa inducen anticuerpos contra las proteínas estructurales y contra algunas proteínas no estructurales presentes en dichas preparaciones. Con el objeto de diferenciar animales infectados con el VFA de vacunados, se desarrollaron ensayos inmunológicos capaces de detectar anticuerpos contra una proteína no estructural del VFA. La proteína no estructural 3AB1 fue expresada en bacterias y en células de insecto y posteriormente utilizada para la detección de anticuerpos anti-3AB1. Los estudios realizados por ELISA y "Western blot" mostraron que sueros de bovinos infectados reaccionan con la proteína no estructural 3AB1 mientras que sueros de bovinos vacunados, sueros de bovinos sin infectar y sueros de animales infectados con diferentes virus bovinos no reconocen dicha proteína. Sin embargo, se hallaron anticuerpos contra el antígeno VIA (antígeno asociado a la infección viral), tanto en animales vacunados como en infectados. La detección de anticuerpos anti-3AB1 en sueros de animales infectados experimentalmente entre los 7 y los 560 días post-infección indica que los ensayos basados en la utilización de la proteína no estructural 3AB1 pueden ser aplicados al diagnóstico de la fiebre aftosa.

Palabras clave: fiebre aftosa, proteína no estructural recombinante 3AB1, diagnóstico.

## **Diagnosis of foot-and-mouth disease based on the detection of antibodies against recombinant 3AB1 nonstructural protein**

### **ABSTRACT**

Foot-and-mouth disease (FMD) vaccines induce antibodies against structural and some nonstructural proteins present in vaccine preparations. To differentiate between FMDV-infected and vaccinated animals, we developed immunochemical assays capable of detecting antibodies against a FMDV nonstructural protein. Recombinant nonstructural 3AB1 protein was expressed in *E.coli* and in insect cells and used to detect anti-3AB1 antibodies. ELISA and Western blot analysis showed that sera from cattle infected with FMDV reacted with recombinant 3AB1 protein whereas sera from cattle which had been vaccinated against FMDV, mock-infected, or infected with different bovine viruses did not recognize the 3AB1 protein. In contrast, anti-virus infection associated antigen (VIAA) antibodies were present in both FMDV-infected and vaccinated animals. Detection of anti-3AB1 antibodies in sera of experimentally infected cattle obtained between 7 and 560 days postinfection indicated that immunological tests based on the detection of recombinant 3AB1 protein could be used for the diagnosis of FMDV infection.

**Key words:** Foot-and-mouth disease (FMD), recombinant nonstructural 3AB1 protein, diagnosis of FMDV infection.

Parte de los resultados presentados en esta tesis serán publicados en el siguiente artículo:

-Silberstein E, Kaplan G, Taboga O, Duffy S, Palma E (1997) Foot-and-mouth disease virus-infected but not vaccinated cattle develop antibodies against recombinant 3AB1 nonstructural protein.

Archives of Virology N° 142.

## ABREVIATURAS

3': río arriba.

5': río abajo.

AcNPV: virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica*.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ARN: ácido ribonucleico.

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

dNTPs: deoxinucleótidos trifosfato.

Da: dalton

DO: densidad óptica.

dpi: días post-infección.

dpv: post-vacunación

DTT: ditioneitol.

EDTA: ácido etilendiamino tetraacético.

IPTG: isopropil-b-D-galactósido.

Kb: kilobases.

KD: kilodalton.

pb: pares de bases.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

pi: post-infección.

pv: post-vacunación.

SDS: dodecil sulfato de sodio.

UFP: unidades formadoras de placas.

VFA: virus de la fiebre aftosa.

# **INTRODUCCION**

# **1. LA FIEBRE AFTOSA**

## **1. 1. Reseña general**

La fiebre aftosa es una enfermedad altamente contagiosa que afecta a los animales de pezuña partida. Se presenta con mayor frecuencia en los bovinos y porcinos. Sin embargo, el rango de posibles huéspedes naturales es muy amplio presentándose también en ovinos, caprinos y más de treinta especies de animales silvestres. Cada una de estas especies cumple un rol diferente en el mantenimiento y diseminación de la enfermedad.

Fue descrita por primera vez en la Edad Media (28) y continúa aún hoy siendo de gran importancia económica, afectando a extensas regiones del planeta que incluyen África, Europa oriental, Sudamérica y Asia.

Existen siete tipos serológicos determinados por la técnica de fijación de complemento: los tipos A, O y C que son los más distribuidos en el mundo. Los tipos SAT 1, 2 y 3 se encuentran en África y el tipo Asia 1 en Oriente medio y sur de Asia. Las diferentes cepas del VFA muestran virulencia variable dentro de una misma especie y para los distintos hospedadores.

Los bovinos actúan como principales diseminadores de la enfermedad y constituyen la especie doméstica más susceptible. El virus se replica en forma primaria en la faringe y luego se disemina por vía sanguínea estableciendo sitios de replicación secundaria.

## **1. 2. Impacto económico y distribución geográfica**

La fiebre aftosa es una de las enfermedades más devastadoras para las especies domésticas debido a las características de transmisión, su contagiosidad extrema y su amplia distribución geográfica.

El alto grado de morbilidad, la pérdida de productividad y las lesiones asociadas a infecciones secundarias constituyen un problema muy importante para



los productores ganaderos e industrias relacionadas. Las regiones endémicas deben afrontar serias restricciones en los mercados internacionales para la exportación de animales y productos derivados, como también los costos de la implementación de medidas de control y programas de erradicación.

La fiebre aftosa es endémica en África, parte de Asia y de Sudamérica. Los países de la Comunidad Económica Europea, América del Norte y Central, Chile, Uruguay, Australia, Japón, Noruega y Suecia, son países libres de fiebre aftosa y aplican estrictas medidas sanitarias para el control de la enfermedad. La erradicación se logró por medio del sacrificio de los animales infectados o expuestos y mediante programas estrictos de vacunación.

En América del Sur, se realizan campañas de vacunación que cubren casi el 90% de los rumiantes existentes (2). El control se lleva a cabo mediante la inmunización preventiva de todo el ganado y el seguimiento epidemiológico de cualquier foco de la enfermedad. Los focos son más frecuentes en las áreas de cría extensiva. Estas regiones presentan complicaciones adicionales como el nacimiento de terneros (lo que incrementa la cantidad de animales susceptibles), y la existencia de fauna silvestre que constituye un importante reservorio natural.

### **1. 3. Sintomatología, transmisión y estado portador**

La sintomatología es la típica de una enfermedad febril y aguda. Los animales infectados presentan vesículas en las mucosas de la boca y nariz, en las pezuñas y en la glándula mamaria. La aparición de estas vesículas hace dificultosa la alimentación y el traslado de los animales afectados (85). La muerte ocurre en animales jóvenes debido a una miocarditis producida por algunas cepas virales, mientras que en los adultos la mortalidad no sobrepasa el 5%. En ovejas y cabras, las manifestaciones clínicas no son severas lo que dificulta el diagnóstico a campo.

La vía de infección natural es el tracto respiratorio, pero también puede darse por ingestión o por contacto del virus con lesiones en la piel (15).

La transmisión tiene lugar después de un contacto físico o cercano entre animales agudamente infectados y susceptibles.

La faringe y tejidos linfoides asociados, son los sitios de replicación viral primarios (15). Luego, el virus se disemina por vía sanguínea y establece sitios de replicación secundarios en los epitelios podal y lingual, en la glándula mamaria y otros órganos internos. Se encuentra un alto nivel de virus en todas las secreciones así como también en los aerosoles derivados principalmente de los conductos respiratorios durante 1 a 3 días antes y 7 a 14 días después de la aparición de lesiones. La orina y las heces, contienen cantidades variables pero generalmente más bajas de virus. Con menor frecuencia el virus se difunde mecánicamente por vía de productos animales contaminados, vehículos o personas (93).

La respuesta inmune contra el virus es la responsable de la desaparición de la viremia y de la reconstitución de los tejidos dañados. La infección resulta en un rápido incremento de los anticuerpos neutralizantes circulantes los que juegan un rol muy importante en la protección frente a la infección natural.

Si bien los animales se recuperan completamente de la infección, algunos pueden permanecer con infección persistente y convertirse en portadores. El estado de portador puede durar desde pocas semanas hasta años y también se produce luego de infecciones subclínicas o en animales con inmunidad insuficiente.

Los animales portadores representan un reservorio natural del virus debido a la permanencia del mismo en la faringe. Para cumplir los requisitos de un portador, el virus no sólo debe persistir en el animal sino que éste debe ser capaz de transmitir la infección (93).

Existen evidencias que indican que los animales portadores pueden liberar virus intermitentemente. Durante la replicación viral pueden producirse cambios en la virulencia (88) y debido a la alta frecuencia de mutaciones pueden generarse nuevas variantes genéticas (25, 31, 52, 56). Estas nuevas variantes pueden escapar a la inmunidad generada por las vacunas en el resto de la población susceptible.

La identificación de portadores de la fiebre aftosa y la comprensión de su papel en la iniciación de focos son cada vez más importantes. Con la liberación del comercio internacional de animales y productos agrícolas, podría aumentar la posibilidad de que animales portadores introduzcan la enfermedad en países que hayan logrado erradicarla, no sólo porque los portadores son más difíciles de identificar, sino también porque las poblaciones de animales de regiones libres de fiebre aftosa son más susceptibles debido a la ausencia de inmunización (93).

## **2. EL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA**

### **2. 1. La partícula viral**

El virus de la fiebre aftosa (VFA) es el único representante del género *aphthovirus* de la familia *Picomaviridae*.

La partícula viral consiste en una cápside desnuda de 28 nm de diámetro, que aloja en su interior al genoma, constituido por una cadena simple de ARN de polaridad positiva. El virión intacto tiene un coeficiente de sedimentación de 146S. Es inestable a pH ácido y a altas temperaturas.

La cápside viral es de forma icosaédrica y está formada por 60 copias de cada una de las cuatro proteínas estructurales denominadas VP1, VP2, VP3 y VP4 producidas por clivaje post-traducciona l de un precursor común (36, 84). El virión contiene además 1 o 2 copias de dos proteínas minoritarias: VP0 (precursora de VP2 y VP4) (27) y 3D (polimerasa viral) (60).

La estructura tridimensional de la cápside de los serotipos O y C fue determinada por la técnica de difracción de rayos X del virus cristalizado (1, 26, 45). Las proteínas VP1, VP2 y VP3 se hallan parcialmente expuestas, mientras que VP4 es interna (FIG. 1). Una copia de VP1, una de VP2 y una de VP3, forman un protómero; cinco protómeros se agrupan para formar un pentámero. Los

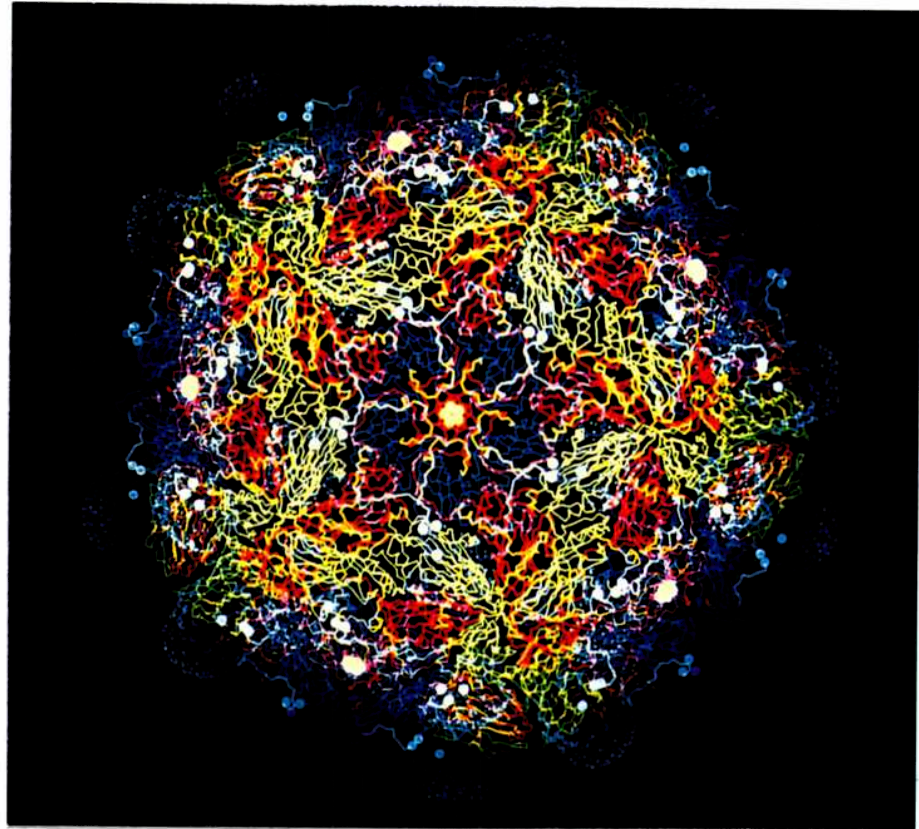
pentámeros son la principal estructura en que se disocia la partícula viral completa al ser expuesta a pH menor que 5. Doce pentámeros se asocian para conformar la estructura icosaédrica que presenta el virión (94).

A pesar de las diferencias en la secuencia primaria VP1, VP2 y VP3 adoptan la misma configuración espacial de "barril  $\beta$ ". Dicha estructura consiste en ocho cadenas con estructura secundaria de lámina  $\beta$ , ubicadas unas sobre otras y conectadas entre sí por bucles o "loops" que se hallan expuestos al medio externo (38) (FIG. 2). Las cadenas  $\beta$  forman las paredes del barril y se identifican con letras (A, B, C, etc.). Los "loops" se denominan según las letras de las cadenas  $\beta$  que conectan; así el "loop" GH conecta las láminas G y H (1).

Basados en estudios de secuenciación de variantes antigénicas que escapan a la neutralización por anticuerpos monoclonales y en ensayos de competencia con éstos y péptidos sintéticos, se identificaron diferentes sitios antigénicos en los serotipos A (9, 79, 92), O (43, 63) y C (45, 55).

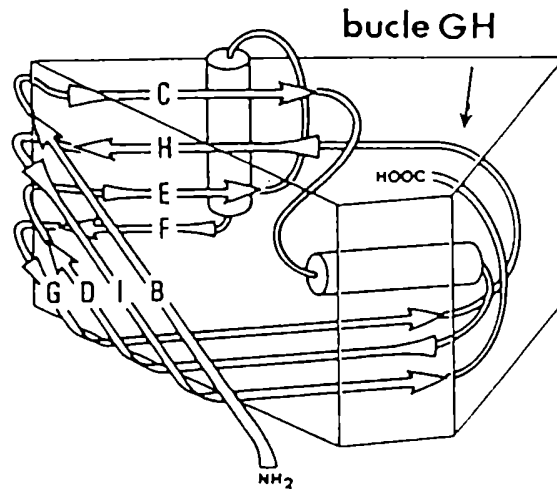
La proteína VP1 es la que posee los determinantes antigénicos principales del VFA, siendo el principal el bucle comprendido entre los aminoácidos 141 a 160.

La longitud y la secuencia de esta región son muy variables entre cepas. Sin embargo, existe un triplete de aminoácidos, Arg-Gly-Asp (RGD), localizado en las posiciones 145-147, que está fuertemente conservado entre serotipos. Esta secuencia es la responsable de la unión del virus a la célula blanco (54).



**FIG. 1: Representación de la estructura, a nivel atómico, de la cápside del VFA O<sub>1</sub> Kb**

En azul se muestran los residuos de VP1, en verde los de VP2 y en rojo los de VP3. Las esferas punteadas de color azul y situadas en la superficie del virión corresponden a los aminoácidos 133-158 de VP1 (Acharya et al, 1989).



**FIG. 2: Representación esquemática de la estructura “barril  $\beta$ ” que adoptan VP1, VP2 y VP3**

Las hojas plegadas  $\beta$  están representadas por flechas e identificadas por letras (B a I). Las estructuras en forma de hélice  $\alpha$  se representan como cilindros (Hogle et al., 1985).

## 2. 2. El genoma del VFA

El ARN viral de polaridad positiva, actúa como mensajero y tiene una longitud de aproximadamente 8400 nucleótidos (27, 72). Su peso molecular es de  $2,7 \times 10^6$  Da y su coeficiente de sedimentación es de 35S.

El extremo 5' no posee la secuencia CAP característica de la mayor parte de los ARN mensajeros celulares y virales. Sin embargo, está covalentemente unido a una proteína de bajo peso molecular denominada VPg (33, 83) que estaría involucrada en la replicación del ARN.

El extremo 3' se encuentra poliadenilado. La longitud del poli A varía entre 40 y 100 nucleótidos (18, 66).

Una particularidad del genoma del VFA es la presencia de residuos de poli C cercanos al extremo 5', cuya longitud es variable (entre 100 y 170 residuos) según

la cepa viral. Su función es desconocida aunque se ha intentado relacionar el tamaño de este segmento con la virulencia.

El ARN viral tiene un único marco de lectura abierto que codifica para una poliproteína de peso molecular 258,9 KD y 2300 aminoácidos (27). Esta poliproteína es procesada a través de una serie de clivajes proteolíticos que dan origen a las proteínas virales estructurales y no estructurales.

El genoma se divide en cuatro regiones codificantes denominadas L, P1, P2 y P3 (FIG. 3).

La región L, ubicada en el extremo 5', codifica para un polipéptido líder. La traducción puede comenzar en cualquiera de dos codones de iniciación (AUG) que están distanciados por 84 nucleótidos, dando origen a una proteína de PM 23000 (Lab) o a una proteína de PM 16000 (Lb) (10). La proteína L tiene actividad proteolítica y se autocliva en el extremo amino terminal del precursor de las proteínas de la cápside.

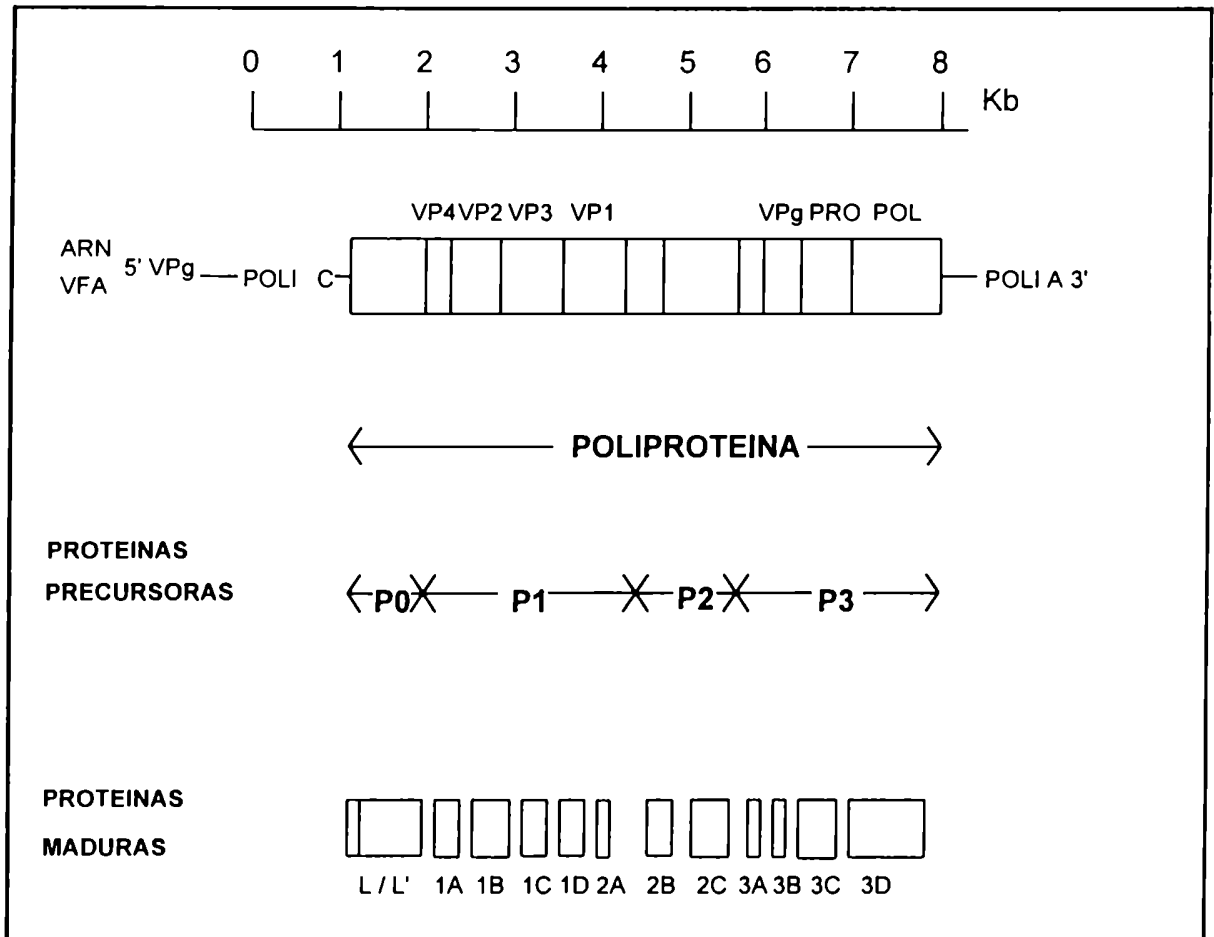
Hacia el extremo 3' se halla la región P1 que codifica para las cuatro proteínas estructurales VP4, VP2, VP3 y VP1 que constituyen la cápside. Las regiones P2 y P3 codifican para las proteínas no estructurales del virus y están involucradas en la replicación.

El polipéptido 2A está formado por 16 aminoácidos y tiene actividad proteolítica.

Las funciones de las proteínas codificadas por las regiones 2B y 2C no han sido aún dilucidadas. Existen evidencias que indican que 2C y el precursor 2BC forman parte del complejo de replicación. La proteína 2C estaría involucrada en la síntesis de ARN viral y su función sería semejante a la de una helicasa (67).

A partir del precursor 3AB se origina la proteína VPg, constituida por 22 aminoácidos y que se une covalentemente vía tirosina al extremo 5' del ARN "full-length" y a las cadenas nacientes.

La proteína 3A contiene un dominio altamente hidrofóbico que constituiría una región involucrada con el anclaje a membrana.



**FIG. 3: Organización y expresión del genoma del VFA**

La proteína 2C y el precursor 3AB se hallan fuertemente asociados; por lo tanto se postula que 2C se une también a membranas vía 3AB. Este complejo, anclaría el ARN viral con el fin de proveer la organización espacial correcta y necesaria para su replicación (67).

La región 3C codifica para una proteasa cuya función es fundamental, pues es la enzima responsable de la mayoría de los clivajes relacionados con la maduración de la poliproteína precursora (67).



La región 3D codifica para la proteasa viral, que es una ARN polimerasa ARN dependiente. Se la denomina también antígeno VIA (antígeno asociado a la infección viral) (19).

### **2. 3. Ciclo de replicación viral**

El ciclo infectivo del VFA es un proceso rápido que transcurre en aproximadamente 2 horas y media.

La infección en cultivos celulares comienza con la adsorción del virus a la membrana plasmática de la célula hospedadora. Es un proceso reversible y su etapa inicial está gobernada por fuerzas electrostáticas, resultando necesaria la presencia de cationes bivalentes como  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ .

La proteína viral involucrada en la unión al receptor celular es la VP1. Para la adsorción del virus a células BHK-21, resulta esencial la secuencia RGD del "loop" G-H de dicha proteína, aunque puede realizarse por formación de complejos antígeno-anticuerpo utilizando los receptores Fc presentes en las células a infectar (54).

El mecanismo propuesto para la entrada del genoma viral es la endocitosis mediada por el receptor. Se demostró que el pH ácido de los endosomas proporciona el medio adecuado para la ruptura del virus en subunidades 12S, dejando el ARN disponible para la replicación (16).

La replicación del genoma se produce en el citoplasma por medio de la ARN polimerasa ARN dependiente viral (3D) que sintetiza cadenas complementarias de polaridad negativa, las que constituyen el templado de las cadenas de polaridad positiva (84). Durante el proceso de replicación se forma un intermediario de ARN doble cadena asociado al retículo endoplásmico liso.

Después de la infección de las células por el VFA, se inhiben la síntesis de ARN y proteínas celulares (50). El producto primario de la traducción es una poliproteína que corresponde a la totalidad de la región codificante. Este precursor

no se detecta pues se cliva durante su traducción, originando las 4 proteínas precursoras P0-P3. Las mismas, a través de clivajes secundarios mediados por proteasas virales, generan las proteínas estructurales y no estructurales que se hallan en células infectadas.

El último evento en el procesamiento, es el clivaje del precursor VP0 que genera VP2 y VP4. Este proceso ocurre en los picornavirus después del ensamblado de la cápside y está asociado con la encapsidación del ARN viral y con la adquisición de infectividad del provirión. Además, el clivaje de VP0, resulta en un reordenamiento estructural dentro de la cápside que incrementa en alto grado su estabilidad (36).

El ciclo se completa con la lisis de la célula hospedadora que libera el virus al medio externo.

### **3. EL DIAGNÓSTICO DE LA FIEBRE AFTOSA**

La identificación de animales portadores de la fiebre aftosa y la diferenciación entre animales vacunados e infectados resultan fundamentales, especialmente en países como la Argentina, donde la enfermedad está en vías de ser completamente erradicada.

Se han desarrollado diferentes técnicas para el diagnóstico de la fiebre aftosa, que incluyen la aplicación de metodologías tanto de inmunología como de biología molecular.

### **3. 1. Aislamiento viral**

El diagnóstico en laboratorio de los animales portadores del VFA se puede realizar mediante la detección del virus en muestras de fluido esófago-faríngeo. La toma de muestras se lleva a cabo con una sonda esofágica o copa de metal "probang". La presencia de virus se detecta mediante ensayos de placas en cultivos celulares. Los cultivos primarios de células de tiroides bovina constituyen el sistema de detección más sensible (23).

La irregularidad de la presencia de virus en fluido esófago-faríngeo resta fiabilidad a este método de detección de animales persistentemente infectados. La cantidad de virus recuperado es usualmente muy baja debido a la presencia de anticuerpos neutralizantes en los fluidos (6) y a la asociación del virus persistente a células.

La falta de precisión al recoger las muestras convierte al método en una técnica de acierto o error especialmente si es realizada por diagnosticadores sin experiencia. Asimismo, se pueden obtener resultados falsos negativos debido a la inactivación del virus durante el muestreo y el traslado de las muestras hasta los laboratorios.

### **3. 2. Detección del genoma del VFA**

Las técnicas de biología molecular también fueron aplicadas en la identificación de animales persistentemente infectados.

En 1988, Rossi et al. (77), detectaron ARN del VFA en muestras de fluido esófago-faríngeo por hibridización molecular utilizando una sonda de "cDNA" radiactiva. Dicha sonda contenía secuencias de la ARN polimerasa viral y permitió la identificación de los tipos A, O y C del virus.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue también utilizada en la detección del genoma viral. A partir de 1989, se describieron numerosos métodos

empleando RT-PCR que permitieron la identificación del VFA tanto en tejidos animales (23, 57, 68 ) como en fluido esófago-faríngeo (40, 73, 75). Se utilizaron como iniciadores de la reacción de PCR, oligonucleótidos complementarios al gen de la ARN polimerasa. Las secuencias de estos oligonucleótidos surgieron de un análisis basado en los perfiles de homología entre todas las secuencias publicadas para el gen mencionado (73).

Con el propósito de diseñar un método de diagnóstico por RT-PCR, que resultara rápido, simple y de alta sensibilidad, Rodríguez et al. (75), desarrollaron una técnica que facilitó la evaluación de un alto número de muestras. El paso inicial del proceso consistía en la adsorción directa de suspensiones de virus provenientes de fluido esófago-faríngeo a placas de microtitulación. Posteriormente se realizaba la reacción de RT-PCR "in situ". De este modo, lograron eliminar los pasos críticos de extracción del ARN viral que utilizan las técnicas convencionales como el empleo de fenol o la desnaturalización por calor de las partículas virales.

En 1995 (53), se describió un método alternativo que permitió la detección del VFA en hisopados nasales de bovinos con infección asintomática que involucra también una reacción de RT-PCR. Las ventajas de este procedimiento son la facilidad de la toma de las muestras y la rapidez del conocimiento de los resultados (menos de 24 hs.), lo que constituye un requisito muy importante cuando se producen por ejemplo, brotes de fiebre aftosa inesperados en países libres de la enfermedad.

Las técnicas desarrolladas para la detección de cantidades muy pequeñas de ARN en animales portadores, son muy promisorias, aunque todavía no se ha evaluado su automatización para el diagnóstico de rutina ni se ha validado su empleo en estudios de campo.

### **3. 3. Detección de anticuerpos contra el antígeno asociado a la infección viral o antígeno VIA**

El antígeno asociado a la infección viral o antígeno VIA (proteína 3D), fue identificado por Cowan y Graves en 1966 (19). Su antigenicidad está conservada entre todos los serotipos del VFA.

La detección de anticuerpos anti-VIA por inmunodifusión en agar gel (ID-VIA)(3), ha sido ampliamente utilizada en los últimos 25 años para diferenciar animales vacunados de infectados y para el monitoreo de la actividad viral en el campo.

Debido a la baja sensibilidad del test de inmunodifusión se desarrollaron diferentes ensayos de ELISA tanto indirectos como de competición en fase líquida. Se utilizó como antígeno el VIA purificado a partir de virus multiplicado en células BHK (5) o la proteína 3D producida como proteína de fusión en *Escherichia coli* (61, 95).

Sin embargo, la detección de anticuerpos anti-VIA no se correlaciona siempre con la recuperación de virus de fluido esófago faríngeo (31, 59). Además, en las regiones en las que se aplican regularmente programas de vacunación, el uso del antígeno VIA como marcador de infección viral no es adecuado debido a que los sueros de bovinos vacunados y revacunados presentan anticuerpos contra este antígeno (4).

Existen fuertes evidencias de la presencia del antígeno VIA en el material que se utiliza en la elaboración de vacunas (78). Asimismo, estudios recientes (60) demostraron que el antígeno VIA es un componente menor de las partículas virales, que constituyen el principal inmunógeno utilizado en todas las vacunas actuales.

Por todas las razones expuestas, la detección de anticuerpos anti-VIA en sueros no es necesariamente indicador de infección viral y el uso de los ensayos basados en la identificación del mismo presenta muchas limitaciones.

### **3. 4. Detección de anticuerpos contra las proteínas no estructurales**

Con el objeto de encontrar algún marcador que permita una distinción real entre bovinos infectados y vacunados, algunos investigadores han dirigido sus esfuerzos al estudio de aquellas proteínas virales (proteínas no estructurales) que pueden ser indicativas del estado de infección pues no inducen respuesta inmune frente a la vacunación.

Berger et al. (11), utilizaron la inmunoprecipitación de proteínas inducidas en células BHK infectadas para diferenciar bovinos vacunados de infectados y convalecientes. En estos estudios, las proteínas de la cápside del virus y la proteína 3D eran precipitadas regularmente por sueros de animales vacunados, mientras que otras proteínas tales como 2C, 3AB<sub>1</sub> y 3AB<sub>1,2</sub> eran sólo precipitadas ocasionalmente.

Bergmann et al. (12), desarrollaron el test de inmunoelectrotransferencia asociado a enzimas (EITB) para diferenciar animales vacunados de persistentemente infectados. En este ensayo se utilizaban las proteínas no estructurales 3A, 3B, 2C, 3D y 3ABC expresadas en *Escherichia coli*. Comprobaron que sueros de animales vacunados con vacunas convencionales o experimentales, no presentaban anticuerpos contra las proteínas 3A, 3B, 2C y 3ABC. Asimismo, evaluaron sueros de animales persistentemente infectados cuyas muestras fueron tomadas cada 14 días entre los 0 y los 230 días post-infección. Observaron que la intensidad de las bandas disminuía con el tiempo post-infección transcurrido y además hallaron reacción positiva aún en aquellos sueros correspondientes a estadios en los que el test de inmunodifusión era negativo.

Estudios similares fueron realizados por Rodriguez et al. (74) en cerdos, también utilizando también las proteínas no estructurales expresadas en *Escherichia coli*, tanto en ensayos de "immunoblot" como en ELISA. Estos autores sólo hallaron anticuerpos contra el polipéptido precursor 3ABC en sueros de animales convalecientes.

Lubroth et al. (48), determinaron que antisueros de bovinos y de cerdos vacunados no reaccionaban con las proteínas 2C y 3ABC producidas en células BHK infectadas aún después de tres inoculaciones. Sin embargo, detectaron anticuerpos anti-3D luego de una única inoculación y a los 19 días post-vacunación.

En estudios recientes estos investigadores (49), extendieron sus observaciones mediante el estudio de las proteínas presentes en el proceso de elaboración de las vacunas, tanto en la fracción que contiene los detritos celulares como en la fracción correspondiente a las partículas virales separadas en la etapa de clarificación. También examinaron el efecto del inactivante usual de las vacunas comerciales, la etilenimina binaria (BEI), en la antigenicidad de las proteínas no estructurales 2C y 3D y de las proteínas de la cápside. No detectaron anticuerpos contra la proteína 2C en sueros de animales vacunados y sugirieron que dicha proteína no está presente en los sobrenadantes usados en la preparación de vacunas debido a su posible asociación con los componentes de membrana. La posibilidad de la inactivación de 2C y 3D por acción de la etilenimina binaria (BEI), fue descartada debido a que sueros de animales infectados precipitaron estas proteínas antes y después de una incubación de 24 hs. con el agente inactivante.

Por todas las observaciones detalladas en párrafos previos, se puede inferir que el desarrollo de técnicas que involucren la utilización de las proteínas no estructurales como marcadores serológicos pueden ser de gran utilidad para detectar posibles brotes muy tempranamente e incluso anticiparlos, evitando importantes pérdidas económicas derivadas de drásticas medidas sanitarias y para diseñar las etapas de las campañas contra la fiebre aftosa en función de la actividad viral detectada en las diferentes regiones epidemiológicas.

## 4. EL CONTROL DE LA FIEBRE AFTOSA

### 4. 1. Inmunización contra el VFA

Los principales factores epidemiológicos que dificultan el control de la fiebre aftosa son la contagiosidad extrema de la enfermedad, la diversidad de hospedadores, la complejidad de la respuesta inmunológica, la variación antigénica que experimenta el virus y la existencia de animales portadores asintomáticos.

Entre los métodos empleados para controlar la fiebre aftosa, la vacunación es el más efectivo y difundido y el que permitió la erradicación de la enfermedad en numerosos países.

Se utilizan vacunas a virus inactivado por agentes químicos. La primer fuente de antígeno viral utilizada fue el epitelio lingual de bovinos infectados. El virus se adsorbía a un gel de hidróxido de aluminio y luego se inactivaba con formaldehído.

Este método fue reemplazado por el desarrollado por Frenkel que se basaba en la producción a gran escala del VFA *in vitro* utilizando cultivos de epitelio lingual bovino (29). Las partículas virales luego de ser cosechadas, clarificadas y filtradas se adsorbían a un gel de hidróxido de aluminio y luego se inactivaban con formaldehído. El sistema presentaba ventajas importantes como la simpleza de su ejecución, los altos y constantes niveles de producción viral y el no requerimiento de adaptación del virus al cultivo. Las vacunas elaboradas por este método fueron aplicadas con éxito en diferentes países.

En la década del '60 se comenzó a producir el virus en cultivos de células crecidas en monocapas. En principio se utilizaron cultivos primarios de riñón bovino y más tarde fueron reemplazados por cultivos de células BHK21 (58) que son los más utilizados en la actualidad.

Para la producción a escala industrial de virus se infectan células BHK crecidas en suspensión (69) en tanques fermentadores de hasta 5000 litros. Las suspensiones virales obtenidas de los fermentadores son concentradas por ultrafiltración (87) o por precipitación con polietilenglicol y óxido de polietileno (96).



El procedimiento más usado para la inactivación de las partículas virales es el agregado de BEI (8).

Dado que el virus inactivado presenta baja inmunogenicidad, es necesario el agregado de sustancias adyuvantes que actúan como vehículos y como inmunoestimulantes.

Las primeras vacunas que se desarrollaron fueron las acuosas, que utilizaban hidróxido de aluminio o saponina como adyuvantes. Los animales vacunados con las vacunas acuosas que contienen saponinas son protegidos por un período de 4 meses.

La introducción de adyuvantes oleosos, como el adyuvante de Freund, significó un gran avance en el logro de estados de protección más duraderos. La formulación de las vacunas oleosas fue perfeccionada en nuestro país con nuevas mezclas de aceites minerales (71). Estas formulaciones permitieron que la frecuencia de vacunación se redujera de tres a dos veces por año en los animales de hasta dos años.

El nivel y duración de la inmunidad depende de la calidad de la vacuna, del número de vacunaciones recibidas (dado que una revacunación induce una respuesta inmune secundaria) y de la edad y patrimonio genético de los animales.

Con el advenimiento de las tecnologías de ingeniería genética, se desarrollaron vacunas sintéticas que involucran la expresión de la proteína VP1 (44) y de los epitopes relevantes de la misma fusionados a otras proteínas. Se obtuvieron respuestas protectoras en cobayos y en cerdos, utilizando como inmunógenos proteínas de fusión conteniendo la proteína "core" del virus de la hepatitis B y múltiples copias en tándem del péptido 140-162 (17). También se obtuvieron buenos niveles de protección en cobayos combinando dos sitios antigénicos (141-158 y 200-213) unidos a la proteína TrpE en *E. coli* (32).

Con el objeto de desarrollar una vacuna que reprodujera la estructura tridimensional de todos los sitios antigénicos del VFA, se realizaron experimentos con cápsides virales vacías para los serotipos A, O y C, utilizando como sistemas de expresión bacterias o células de insecto (48, 77, 81). El potencial de estas

vacunas está siendo evaluado, y recientemente se ha reportado que las cápsides vacías resultaron inmunogénicas para cobayos y cerdos (34).

Otras estrategias que fueron aplicadas para el desarrollo de nuevas vacunas, fueron la expresión de los epitopes principales de VP1 formando parte de un vector vivo constituido por una cepa atenuada del virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina (42) , la obtención de "cDNA" infeccioso (70, 98) y el uso péptidos cortos elaborados por síntesis química (13, 22, 63).

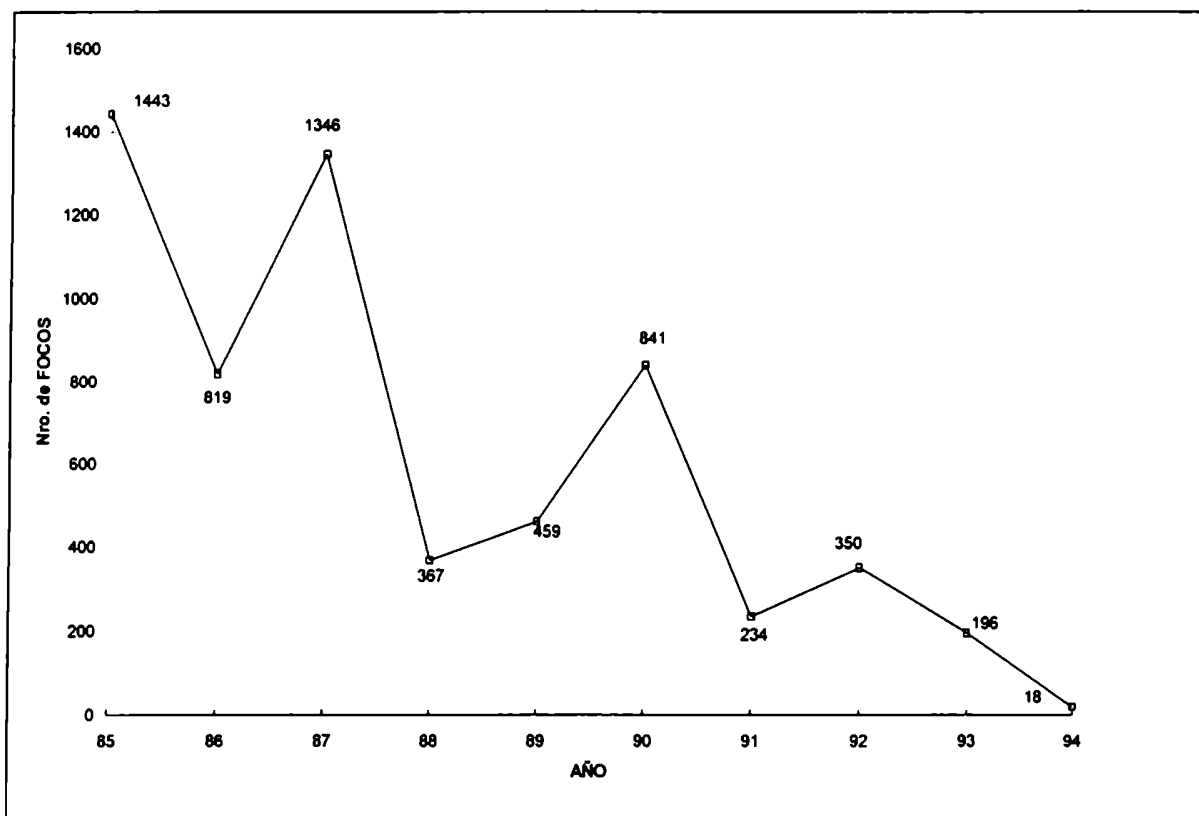
Las ventajas de estas vacunas son su mayor estabilidad debido a que tienen menores requerimientos de refrigeración que las partículas virales inactivadas para mantener su integridad antigénica y son más seguras, dado que no se requiere la manipulación de virus infeccioso durante su elaboración. La aparición de focos de infección en zonas libres se relaciona con la existencia de vacunas mal inactivadas y con escapes de virus de las plantas productoras (41).

Aunque se han realizado numerosas investigaciones en el campo de la biotecnología tendientes a obtener vacunas efectivas, no se dispone en la actualidad de una vacuna para uso comercial.

#### **4. 2. Situación actual de la Fiebre Aftosa en Argentina**

En la actualidad está en vigencia el Plan Nacional de Erradicación de la fiebre aftosa 1993-1997, cuyo principal objetivo es la erradicación de la enfermedad mediante la vacunación sistemática y masiva de todos los bovinos con inmunógenos de largo período inmunitario (46). En todas las regiones sanitarias se efectúa una estricta vigilancia epidemiológica consistente en registro de movimientos, inspección en barreras sanitarias y puestos de control, restricciones de ingreso tanto de animales como de productos que puedan vehiculizar el VFA, registro de notificaciones y sospechas, seroepidemiología y determinación de establecimientos de riesgo.

La vacuna que se utiliza en todo el país es una vacuna a virus inactivado con adyuvante oleoso cuatrivalente, compuesta por dos cepas del serotipo A , una cepa del serotipo C y una cepa del serotipo O. Su aplicación redujo sustancialmente el número de focos y desde abril de 1994 no se han reportado nuevos brotes de fiebre aftosa (FIG. 4).



**FIG. 4: Registro de focos de fiebre aftosa en la República Argentina** (Anuario 1993 del Servicio Nacional de Sanidad Animal, SENASA).

La necesidad del conocimiento sistemático del estado sanitario del campo, aún en ausencia de sintomatología característica, hace imprescindible la determinación de la actividad viral y el grado de inmunidad poblacional. El

seguimiento de la circulación viral entre los bovinos se realiza mediante la detección de anticuerpos contra el antígeno VIA por inmunodifusión en agar gel, aunque muy recientemente se ha incorporado el test de inmunoelectrotransferencia asociado a enzimas (EITB)(12). El grado de protección de la población bovina, se mide por el título de anticuerpos séricos (46). El manejo de esta información es una herramienta fundamental en la evolución de la campaña antiaftosa hacia la no vacunación.

El test ID-VIA ha sido utilizado ampliamente en un esfuerzo por caracterizar la actividad viral en el campo (3) aunque presenta limitaciones en la distinción real entre animales vacunados e infectados debido a que las vacunas comerciales producidas en cultivos de células infectadas, contienen cantidad suficiente de la proteína 3D que puede resultar inmunogénica. Existen evidencias sobre la obtención de resultados falsos positivos para la prueba ID-VIA, fundamentalmente en el suero de aquellos animales que han sido revacunados en cortos períodos de tiempo con inmunógenos que contienen alta concentración de antígenos virales no purificados y producidos en células BHK (4, 20, 65).

Debido a las restricciones sanitarias vigentes en nuestro país desde enero de 1996, es necesario contar con un laboratorio de alta seguridad para trabajar con el virus aftoso. Dichas restricciones son también aplicadas a la obtención de los reactivos de diagnóstico utilizados en la prueba ID-VIA y en el aislamiento viral a partir de muestras de campo, ya que ambos procedimientos requieren el manejo de material infeccioso.

La región fronteriza con Bolivia, Paraguay y Brasil donde la enfermedad es endémica con aparición de brotes, representa una de las principales zonas de riesgo. También constituyen zonas de riesgo aquellas en las que la concentración ganadera es muy grande, con animales provenientes de diferentes regiones del país, así como zonas marginales donde los bovinos están en contacto con animales biungulados salvajes probables reservorios naturales.

El conocimiento del estado sanitario de la población ganadera mediante tests seguros y específicos ayudará al objetivo impuesto en nuestro país de alcanzar y

mantener el status de país libre de Fiebre Aftosa frente a los importantes y cada vez más demandantes mercados internacionales.

Por las razones expuestas, en este momento se hace imprescindible el desarrollo de una metodología diagnóstica que apunte al monitoreo de regiones de alto riesgo de introducción de la enfermedad con un test seguro, rápido y económico.

En esta Tesis se describe el desarrollo de ensayos de ELISA y "Western blot" basados en la detección de anticuerpos contra la proteína no estructural 3AB1 y se establece el potencial uso de dicha proteína en el diagnóstico de animales infectados por el VFA.

## 5. OBJETIVOS

El objetivo principal de esta Tesis es el desarrollo de un método diagnóstico que permita diferenciar animales vacunados de infectados con el VFA.

Para ello, se fijaron los siguientes objetivos parciales:

- Clonado y expresión de la proteína no estructural 3AB1 del VFA en diferentes sistemas de expresión: bacterias y células de insecto.
- Purificación de la proteína no estructural 3AB1 del VFA.
- Desarrollo de los ensayos de ELISA y “Western blot” utilizando la proteína no estructural 3AB1 como antígeno.
- Validación de dichos ensayos mediante el estudio de sueros de bovinos procedentes de áreas libres de fiebre aftosa, sueros de bovinos vacunados y sueros de bovinos infectados experimentalmente.
- Comparación de los resultados obtenidos por los métodos diseñados con el ensayo de inmunodifusión en agar gel (ID-VIA), actualmente utilizado en la detección de actividad viral.
- Aplicación de los ensayos de ELISA y “Western blot” en la evaluación de muestras de campo para el monitoreo de actividad viral.

# **MATERIALES Y METODOS**

## 1. Cepas bacterianas

Se utilizaron las cepas de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , HB109, JM101 y BL21. Los cultivos se realizaron en medio LB (triptona 5 g/l; extracto de levadura 5 g/l; NaCl 10 g/l) a una temperatura de 37°C con agitación constante a 100 rpm.

## 2. Células

Se utilizaron células derivadas de tejidos ováricos de la larva *Spodoptera frugiperda* Sf9 (ATCC) y células BHK-21 clon 13 .

Las células Sf9 se crecieron a 28°C en monocapas en medio TNM-FH (Sigma) suplementado con 10 % de suero fetal bovino y 50  $\mu$ g/ml de gentamicina.

Las células BHK-21 clon 13 se multiplicaron a 37°C en “rollers” de 2 litros en medio de cultivo mínimo esencial de Eagle (MEM-Eagle) suplementado con 10 % de suero fetal bovino y 50  $\mu$ g/ml de gentamicina.

## 3. Virus

El VFA O<sub>1</sub> Caseros utilizado en este trabajo fue provisto por el Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA) y fue obtenido de epitelio lingual bovino. Se amplificó en células BHK-21 clon 13 realizando no más de tres pasajes.

El virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* C6 (AcNPV C6) utilizado se amplificó en células Sf9 crecidas en monocapa a 28°C.

En la obtención de los baculovirus recombinantes por transfección en células Sf9, se utilizó el ADN Baculogold (Pharming) que es un ADN genómico modificado de baculovirus salvaje.



#### **4. Anticuerpos**

Anti-IgG bovina (H+L) conjugado a fosfatasa alcalina (Accurate Chemical & Scientific Corp.): se utilizó en los ensayos de "Western blot".

Anti-IgG bovina (H+L) conjugado a peroxidasa (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.): se utilizó en el test de ELISA.

#### **5. Sueros**

Se utilizaron sueros de bovinos libres de FA provenientes de la Patagonia, sueros de animales vacunados no infectados provenientes del campo experimental del INTA, Castelar, sueros provenientes de diferentes zonas epidemiológicas del país (Servicio Nacional de Sanidad Animal, SENASA), sueros de animales infectados experimentalmente en los "boxes" de aislamiento que posee el CICV en Castelar y sueros de animales infectados extraídos a diferentes tiempos post-infección provenientes de la seroteca del CICV, INTA y del SENASA.

#### **6. Enzimas de restricción**

Las enzimas de restricción BamHI y EcoRI, las enzimas ADN ligasa y fosfatasa alcalina de timo de ternera, como también sus respectivos "buffers" de reacción, fueron provistos por New England Biolabs. La enzima Taq polimerasa y su "buffer" de reacción fueron provistos por Promega.

## **7. Vectores de clonado**

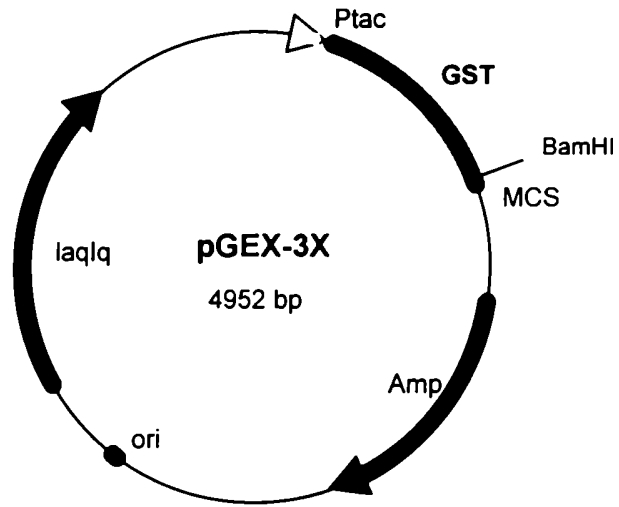
Se utilizaron dos vectores de clonado diferentes: pGEX-3X (Pharmacia) para la expresión de la proteína 3AB1 en bacterias y pVL1392 (Pharminggen) para la expresión en el sistema baculovirus-células de insecto.

El plásmido de expresión pGEX-3X (FIG. 5) codifica para la enzima glutathion S-transferasa (GST) y su expresión está controlada por el promotor inducible Ptac (86). Este vector posee un sitio múltiple de clonado en el que es posible clonar genes de interés en fase con la proteína GST, y obtener proteínas de fusión. Asimismo en el extremo 3' de la proteína GST hay un sitio de clivaje para la proteasa de restricción Factor Xa, lo que permite clivar la proteína de interés y facilita su purificación.

El plásmido de transferencia pVL1392 (FIG. 6) se utiliza para obtener altos niveles de expresión de proteínas foráneas no fusionadas en células de insecto (35). Contiene un sitio múltiple de clonado y el locus completo del gen de la polihedrina y regiones flanqueantes del virus de la polihedrosis nuclear AcNPV.

## **8. Síntesis de "cDNA"**

Se utilizó como templado ARN de la cepa O<sub>1</sub> Caseros, extraído de virus purificado en gradientes de sacarosa (21). La reacción se realizó en un volumen total de 50 ml que contenía el templado, "buffer" TR (50 mM Tris-HCl, pH 8,3; 10 mM Mg Cl<sub>2</sub>; 50 mM KCl; 10mM DTT), 5 mM dNTPs (mezcla de nucleótidos) y oligo dT. El ARN se desnaturalizó a 100°C durante 2 minutos, se agregaron 20 unidades de MLV transcriptasa reversa (Gibco-BRL) y la mezcla de reacción se incubó 1 hora a 42°C.



Detalle del sitio múltiple de clonado (MCS)

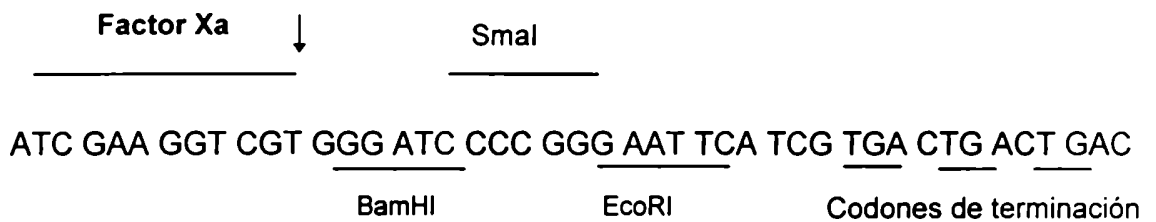
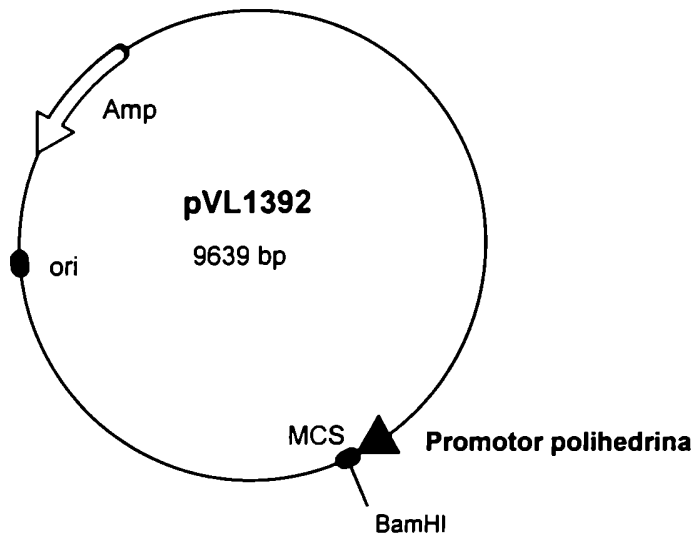


FIG. 5: Esquema del plásmido de expresión pGEX-3X



**FIG. 6: Esquema del plásmido de transferencia pVL1392**

## **9. Clonado del gen 3AB1**

### **9. 1. Construcción del plásmido pGEX-3AB1**

El gen que codifica para la proteína no estructural 3AB1, se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa [PCR (40)] usando como templado el "cDNA" obtenido y los siguientes oligonucleótidos: uno de sentido positivo 5'-CGTGGGATCCCAATCTCAATTCCTTCTCAA-3', que contiene un sitio de clivaje para la enzima BamHI y los nucleótidos 4989-5007 del VFA (27) y otro de sentido negativo 5'-GCGGAATTCTCCTGCTGTGGGAGCTT-3' que contiene un sitio de clivaje para la enzima EcoRI y los nucleótidos 5499-5517 del VFA (27).

La reacción se realizó en un volumen final de 100  $\mu$ l que contenía el "buffer" PCR (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 9; 0,1 % Triton X-100); 0,2 mM dNTPs; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 70 ng de cada oligonucleótido; el templado y 0,5 unidades de Taq ADN

polimerasa. Las condiciones de la reacción de PCR fueron las siguientes: 1 ciclo a 94°C 1 min, 30 ciclos a 94 °C 1 min, 60 °C 1 min y 73 °C 1 min, 1 ciclo a 73 °C 5 min.

El fragmento de ADN obtenido por PCR y el plásmido pGEX-3X se cortaron con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI. Los productos de esta reacción se separaron por electroforesis en gel de agarosa 1,2 % (51) y se purificaron posteriormente por Genclean (Bio 101, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

El plásmido pGEX-3X linealizado y purificado se trató con fosfatasa alcalina de timo de ternera. Inserto y vector se ligaron en una relación molar de 2 : 1 en presencia de T<sub>4</sub> ADN ligasa. Con el producto de la reacción de ligado, se transformaron bacterias *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , las cuales se hicieron competentes previamente por el método de Hanahann. Las reacciones de ligación de ADN y la transformación de *Escherichia coli* con ADN plasmídico fueron realizadas según Maniatis (51). Las bacterias transformadas se seleccionaron en placas que contenían medio LB agarizado y 100  $\mu$ g/ml ampicilina. Se realizaron minipreparaciones de plásmidos por el método de Birnboim (51) y se estudiaron los patrones de restricción de dichos plásmidos mediante digestión con las enzimas BamH1 y EcoRI.

## **9. 2. Construcción del plásmido pVL1392-3AB1**

El gen que codifica para la proteína no estructural 3AB1, se amplificó mediante la reacción de PCR, utilizando como templado el plásmido pGEX-3AB1 obtenido previamente y dos oligonucleótidos diseñados teniendo en cuenta las secuencias consenso necesarias para asegurar la correcta transcripción y traducción del gen 3AB1 en un sistema de expresión eucariótico.

Dichas secuencias fueron: oligonucleótido de sentido positivo 5'-CCGGGATCCAATATGATCTCAATTCCTTCTCAAAAA-3', que contiene un codón de iniciación de la traducción, un sitio de clivaje para la enzima BamHI y los

nucleótidos 4989-5010 del VFA (27); oligonucleótido de sentido negativo 5'-CCGGGATCCATTACTCCTGCTGTGGGAGCTTGG C-3' que contiene un codón de terminación, un sitio de clivaje para la enzima BamHI y los nucleótidos 5496-5517 del VFA (27).

El fragmento de ADN amplificado y el vector pVL1392 se cortaron con la enzima BamHI. El plásmido se trató además con fosfatasa alcalina con el propósito de impedir que los extremos generados se ligen entre sí. El procedimiento utilizado para el clonado (reacción de ligado, transformación y posterior selección de las bacterias transformadas) fue idéntico al descrito en párrafos anteriores para la construcción del pGEX-3AB1. En este caso los recombinantes se estudiaron por digestión de las minipreparaciones de plásmidos con la enzima BamHI y visualización de los productos obtenidos en geles de agarosa 1,2 %.

## **10. Secuenciación de ADN**

Para determinar la integridad del gen 3AB1 clonado, se secuenciaron los plásmidos recombinantes pGEX-3AB1 y pVL1392-3AB1 por el método de secuenciación directa con dideoxinucleótidos. Se utilizó el "kit" de la enzima Secuencasa (United States Biochemical Corporation) y [<sup>35</sup>S]αdATP como nucleótido radioactivo. Para secuenciar los clones derivados del plásmido pGEX-3X se utilizó como iniciador el oligonucleótido 5'-ATAGCATGGCCTTTGCAG-3'.

Para secuenciar los clones derivados del plásmido pVL1392 se utilizó el oligonucleótido 5'-CAGCCATTGTAATGAGAC-3' como iniciador.

## **11. Expresión de la proteína de fusión GST-3AB1**

Los experimentos que se describirán en esta sección se realizaron inicialmente con la proteína GST con el objeto de poner a punto todas las técnicas utilizadas.

### **11. 1. Inducción de la síntesis de la proteína GST-3AB1**

Se crecieron bacterias transformadas con el plásmido pGEX-3AB1 durante toda la noche en 5ml de cultivo. Posteriormente, se utilizó como inóculo una dilución 1/100 de dicho cultivo en 5 ml de medio fresco e incubó hasta alcanzar una DO de 0,3 a 550 nm. Se indujo la expresión de la proteína recombinante con IPTG 1mM durante 3 horas. Las células cosechadas, se resuspendieron en 200 ml de "buffer" NET (10mM Tris-Cl, pH 7.5; 100 mM NaCl; 1mM EDTA) y se agregaron 30 ml de lisozima (10 mg/ml). Después de 15 minutos de incubación se agregaron 6 ml de Triton X-100 (10 %), 5 ml de MgCl<sub>2</sub> (1M) y DNasa I (1 mg/ml). Los extractos proteicos así obtenidos se clarificaron a 12000 rpm durante 5 minutos.

Para producir mayores niveles de la proteína GST-3AB1 se partió de volúmenes de cultivo de 2 litros. En la obtención de extractos crudos se siguió el protocolo descrito en párrafos anteriores, ajustando los volúmenes de todas las soluciones utilizadas.

### **11. 2. Purificación de la proteína de fusión GST-3AB1**

El extracto proteico concentrado obtenido a partir de 2 litros de un cultivo inducido, se fraccionó en columnas de afinidad de glutation agarosa. Luego se lavó la misma exhaustivamente con 200 ml de "buffer" MTPBS (150 mM NaCl; 16 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) y se eluyó la proteína GST-3AB1 específicamente con

un "buffer" que contenía glutatión reducido (Tris-HCl 50 mM pH 8; 5 mM glutatión reducido)(86). Se colectaron 30 fracciones de 250  $\mu$ l. Se detectó el pico correspondiente a la proteína de interés por medición de la densidad óptica a 280 nm de las fracciones colectadas. Finalmente se corroboró la presencia de la proteína GST-3AB1 en las fracciones seleccionadas mediante fraccionamiento de las proteínas por electroforesis en un gel de poliacrilamida 13 % con SDS y posterior caracterización mediante un ensayo de "Western blot".

## 12. Obtención de baculovirus recombinantes por co-transfección

Para la obtención del baculovirus recombinante AcNPV-3AB1 se utilizó el kit de transfección "Baculogold " de Pharmingen (35).

Se transfectaron  $4 \times 10^6$  células de insecto de la línea Sf9 en fase de crecimiento exponencial con 2  $\mu$ g de ADN del plásmido recombinante pVL1392-3AB1 y 0,5  $\mu$ g de ADN "Baculogold" en presencia de lipofectina, siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. A los 5 días post-infección, se colectó el sobrenadante de la infección, se clarificó y se realizaron diluciones seriadas del mismo. Estas diluciones se utilizaron como inóculo para infectar nuevas monocapas de células crecidas en placas de 96 pocillos (primera ronda de purificación). Después de 5 días de incubación a 27°C, se guardaron los sobrenadantes de la infección estérilmente y se lisaron las células *in situ* con 100  $\mu$ l de 0,5 M NaCl durante 10 minutos. Luego se agregaron 100  $\mu$ l de 1,2 M acetato de sodio y se transfirió el ADN total extraído de cada pocillo a una membrana de nylon "Magnacharge" de 0,45  $\mu$ m (Micron Separations, Inc.), utilizando un sistema de "Dot blot". La membrana se lavó con una solución 2x SSC (0,3 M NaCl; 0,03M citrato de sodio), se fijó el ADN con luz ultravioleta y se secó durante 20 minutos a 80°C. La prehibridación se realizó durante 3 horas a 42°C con una solución que contenía 50% formamida, 5x denhardts, 5x SSC y 500  $\mu$ g/ml de ADN de esperma de salmón.



Se utilizó como sonda el ADN del gen 3AB1, que fue marcado radioactivamente con [<sup>32</sup>P]aCTP, utilizando el kit "Oligolabelling" (Pharmacia). La hibridación se llevó a cabo durante toda la noche a 42°C con una solución que contenía 50 % formamida; 1x denhardts; 5x SSC; 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón y la sonda. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados a temperatura ambiente y 3 lavados a 65°C con una solución que contenía 2x SSC y 0,1 % SDS. Finalmente, se analizaron las muestras por autorradiografía.

Se seleccionaron los pocillos que presentaron la señal más fuerte a la más alta dilución. A partir de los sobrenadantes correspondientes se realizaron diluciones seriadas 1:10 y las mismas se utilizaron para infectar nuevamente células crecidas en placas de 96 pocillos (segunda ronda de purificación). Siguiendo un protocolo idéntico al descrito para la primera ronda de purificación, se seleccionaron una vez más los pocillos que presentaron la señal más fuerte a la más alta dilución y se prepararon diferentes "stocks" virales, utilizando como inóculos los sobrenadantes correspondientes.

### **13. Preparación y titulación de "stocks" virales**

Para obtener volúmenes de trabajo con alto título viral se diluyeron los "stocks" del baculovirus recombinante 1:100 y se infectaron monocapas de células Sf9 durante 4 días a 27°C. Con los sobrenadantes obtenidos en dicha infección se re-infectaron células en idénticas condiciones. A los 4 días post-infección se colectaron los sobrenadantes, se clarificaron a 2500 rpm, se fraccionaron y se conservaron a 4°C.

El título de los diferentes "stocks" del baculovirus AcMNPV-3AB1, se determinó por ensayo de placas. Para ello, se sembraron  $2 \times 10^6$  células en cada pocillo de una placa de cultivo de 6 pocillos y se infectaron con diferentes diluciones de inóculo. Después de 1 hora de incubación, se descartó el sobrenadante y las células se cubrieron con una capa de medio TNM-FH suplementado con 10 %

suero fetal bovino y agarosa Sea Kem (FMC Bio Products) 0,5 %. Las células se incubaron durante 5 días en atmósfera controlada y luego se agregó una nueva capa de medio de cultivo en agar conteniendo rojo neutro. A las 48 horas se visualizaron las placas y se calculó el título de cada "stock" viral (UFP/ml) (35).

#### **14. Producción y purificación de la proteína recombinante 3AB1**

Se infectaron monocapas de células Sf9 por 4 días a 27°C con una solución de "stock" viral de título mayor que  $1 \times 10^8$  UFP/ml y a una multiplicidad de infección de 5. Se cosecharon las células, se lavaron 2 veces con PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) pH 6,2 y se lisaron con "buffer" de ruptura (35). Se probaron diferentes soluciones para lisar las células [ "buffer" 1: 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 130 mM NaCl; 1 % Triton X-100; 10 mM NaF; 10 mM  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  pH 7,5; 10 mM  $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$  pH 7,5; 1 mM PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo), leupeptina y pepstatina A (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) ] o [ "buffer" 2: 50 mM Tris-HCl, pH 8; 150 mM NaCl; 1 % Nonidet P 40 ] y se eligió la que permitió la extracción de la proteína de interés con mayor eficiencia.

Las proteínas totales se resolvieron en geles de poliacrilamida 13 %, los que se tiñeron con azul de Coomassie para determinar el nivel de proteína recombinante en el total del lisado. La reactividad de la proteína 3AB1 expresada se comprobó por "Western blot" con antisueros de bovinos infectados.

También se realizaron experimentos para determinar el tiempo óptimo de infección que permitiera la obtención de altos rendimientos de la proteína recombinante, cosechando las células a los 2, 3 y 4 días post-infección.

La purificación de la proteína 3AB1 a partir de lisados celulares clarificados se realizó por tamizaje molecular a través de una columna de Sephacryl S-300 siguiendo los protocolos convencionales (51). Se eluyeron las proteínas utilizando "buffer" MTPBS y las fracciones se analizaron por "Western blot" con sueros de animales infectados para identificar el pico correspondiente a la proteína 3AB1. Las

fracciones que presentaron reactividad se juntaron y conservaron para su posterior utilización en los ensayos de ELISA y "Western blot".

## **15. ELISA**

Para el desarrollo de este ensayo se utilizaron las proteínas GST-3AB1 y 3AB1 purificadas. Se sensibilizaron placas de poliestireno con 0,5 µg/pocillo de proteína en "buffer" carbonato/bicarbonato 0,1M pH 9,6.

Después de la adsorción, que se realizó a 4°C durante toda la noche, las placas se bloquearon durante 1 hora a 37°C con una solución que contenía "buffer" TBS (200mM NaCl; 50mM Tris-HCl, pH7,5) y leche descremada 5 %.

Se agregaron los sueros bovinos y los mismos se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Posteriormente se realizaron dos lavados con TBS/0,1 % Tween 20 (solución de lavado) durante 15 minutos con agitación constante. Al finalizar estos lavados se agregó el segundo anticuerpo (antibovino conjugado a peroxidasa, previamente titulado) durante 1 hora a 37 °C. Finalmente la placa se lavó exhaustivamente con la solución de lavado y se reveló la reacción mediante el agregado del sustrato ABTS [2,2'-Azino-bis(3-etilbentiazolina-6- ácido sulfónico)] y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en "buffer" citrato pH 5. Se midió la absorbancia a 405 nm. Se determinó un valor de corte de DO 0,172. Dicho valor se calculó como  $2X$  o  $X + 3\sigma$  ( $\sigma$ : desviación standard; X: media) y corresponde al máximo valor de DO obtenido comparando ambos métodos (90).

## **16. "Western blot"**

Este ensayo se realizó siguiendo el protocolo descrito por Maniatis et al. (51). Se utilizaron membranas de nitrocelulosa Nitro Bind de 0,45 µm de Micron Separations, Inc. El bloqueo de la membrana se realizó con una solución de TBS/leche 5 %. Los sueros bovinos y el anticuerpo antibovino conjugado a

fosfatasa alcalina se diluyeron en TBS/leche 3 %. Los lavados se realizaron con una solución de lavado que contenía TBS/0,05 % Tween 20. La reacción se reveló con el "buffer" de revelado de fosfatasa alcalina (100 mM Tris-HCl, pH 9,5; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>) conteniendo NBT (nitroazul-tetrazolio) y BCIP (bromocloroindolilfosfato).

### **17. Inmunodifusión en agar gel (ID-VIA)**

El ensayo de inmunodifusión se realizó en placas de plástico cubiertas con 0,6 % agar en "buffer" barbital (0,06 M ácido dietilbarbitúrico, pH 8,6 y 0,1 % N<sub>3</sub>Na). En cada reacción se sembró el antígeno VIA en el pocillo central, dos sueros como controles positivos y los 4 sueros a estudiar en los pocillos de la periferia. Las placas se incubaron en cámara húmeda a temperatura ambiente hasta la aparición de las bandas de precipitación (3).

# **RESULTADOS**

# **1. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA NO ESTRUCTURAL 3AB1 EN BACTERIAS**

## **1. 1. Amplificación del gen 3AB1 por PCR**

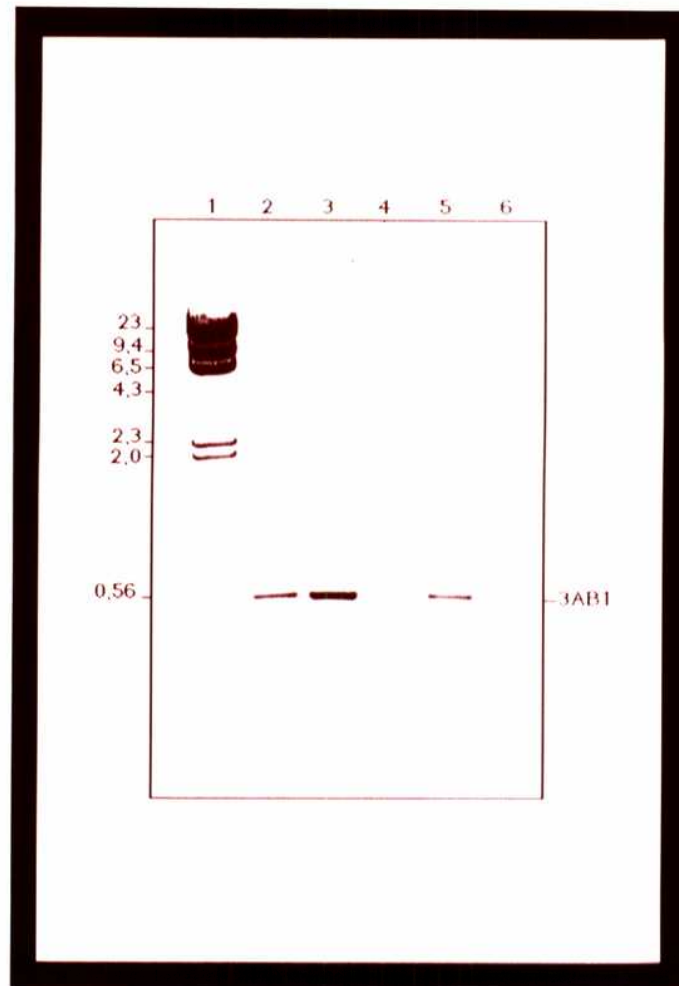
El gen que codifica para la proteína 3AB1 se amplificó por PCR usando como templado "cDNA", que se sintetizó a partir de ARN del virus O<sub>1</sub> Caseros como se describió en materiales y métodos, sección 8.

Para optimizar las condiciones de la reacción de amplificación se realizaron ensayos con diferentes concentraciones de oligonucleótidos y se modificaron las condiciones de cada ciclo. En todos los experimentos se utilizó como control negativo un tubo con la mezcla de reacción pero sin "cDNA" templado. Los productos de la reacción de PCR se visualizaron en un gel de agarosa 1,2 % teñido con bromuro de etidio (FIG. 7). Se obtuvo un único producto de amplificación de aproximadamente 530 pb, del tamaño esperado para el gen 3AB1.

## **1. 2. Clonado del gen 3AB1 en el plásmido de expresión pGEX-3X**

Con el objeto de clonar el gen que codifica para la proteína 3AB1 en el plásmido pGEX-3X, se siguió el procedimiento descrito en materiales y métodos, sección 9.1. En la FIG. 8, se presenta un esquema del procedimiento empleado. Se aislaron 20 colonias resistentes a ampicilina. A partir de cada colonia transformante, se preparó ADN plásmidico el que se analizó mediante digestión con las enzimas EcoRI y BamHI en un gel de agarosa 1,2 % teñido con bromuro de etidio. Se identificaron cuatro clones que poseían un inserto del tamaño esperado (530 pb).

Mediante secuenciación de nucleótidos se comprobó que el gen 3AB1 clonado se ligó en fase con el gen de la proteína GST y también se verificó su integridad. Los plásmidos que contenían la secuencia esperada se denominaron pGEX-3AB1.



**FIG. 7: Amplificación del gen 3AB1**

Análisis de los productos de PCR por electroforesis en gel de agarosa 1,2 %, teñido con bromuro de etidio.

1: marcador de PM (Kb).

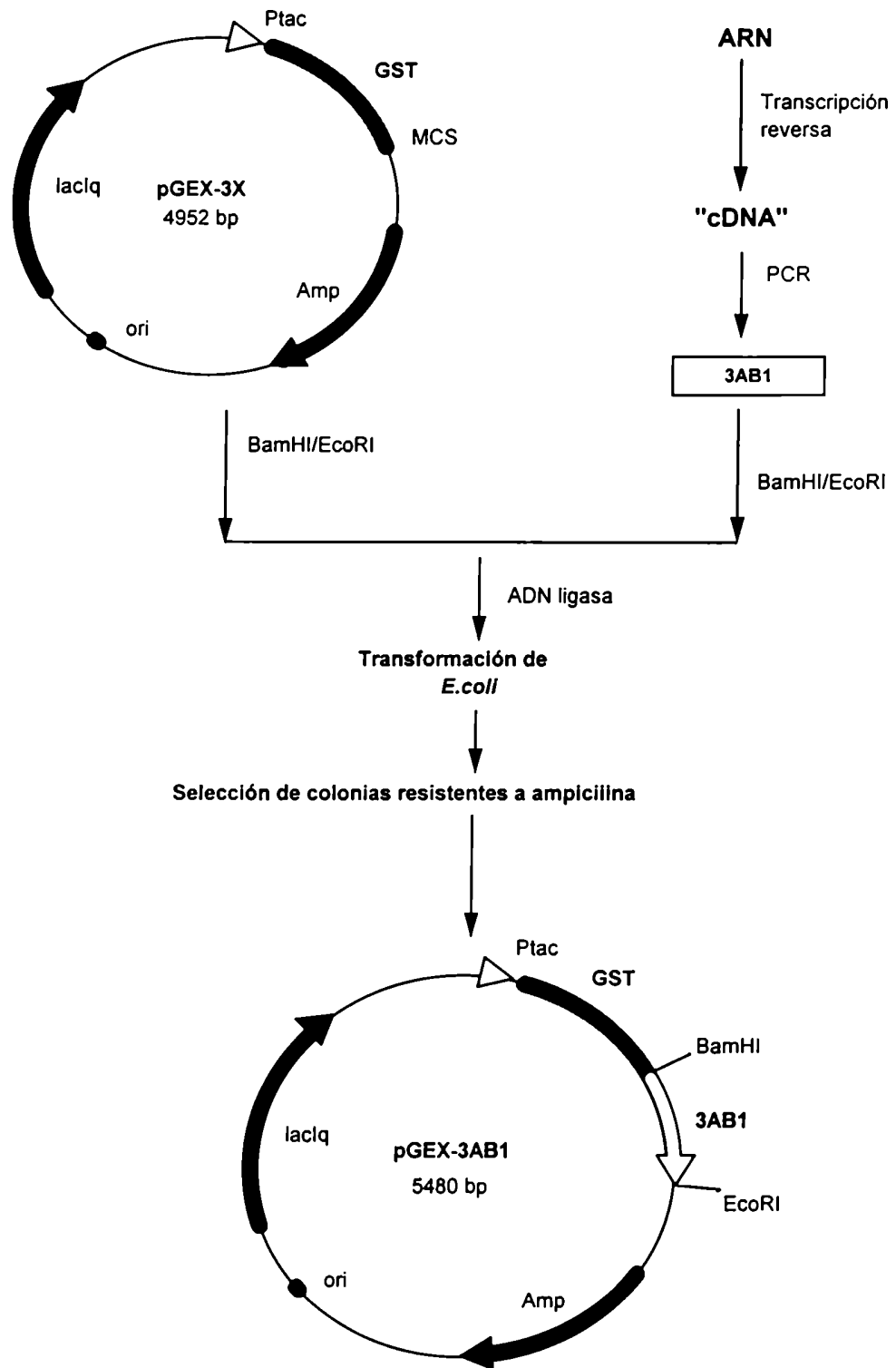
2: 10  $\mu$ l del producto de PCR obtenido utilizando 140 ng de cada oligonucleótido.

3: 20  $\mu$ l del producto de PCR obtenido utilizando 140 ng de cada oligonucleótido.

4: 10  $\mu$ l del producto de PCR obtenido utilizando 70 ng de cada oligonucleótido.

5: 20  $\mu$ l del producto de PCR obtenido utilizando 70 ng de cada oligonucleótido.

6: control negativo.



**FIG. 8: Esquema de la construcción del plásmido pGEX-3AB1**



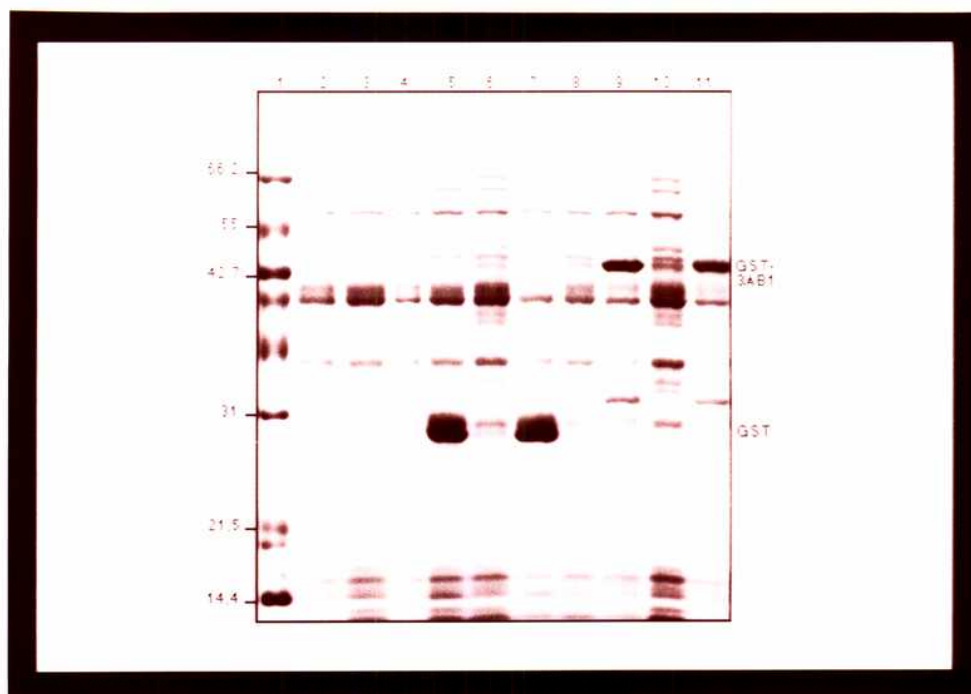
### **1. 3. Expresión de la proteína de fusión GST-3AB1**

#### **1. 3. 1. Inducción de la síntesis de las proteínas GST y GST-3AB1**

La inducción de la expresión de la proteína de fusión GST-3AB1, se realizó mediante el agregado de IPTG a los cultivos de bacterias transformadas con el plásmido pGEX-3AB1. Después de 3 horas de inducción, se lisaron las células y las proteínas totales se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida 12 % con SDS. En este experimento se utilizó como control negativo un extracto de bacterias sin transformar y como control positivo un extracto de bacterias transformadas con el plásmido pGEX-3X. En todos los casos se analizaron paralelamente cultivos inducidos y sin inducir.

Los resultados obtenidos en este ensayo se muestran en la FIG. 9. En las bacterias transformadas con el plásmido pGEX-3X, se visualizó la inducción de la proteína GST que tiene un PM de 27 KD (líneas 5 y 7) mientras que tanto en las bacterias sin transformar (líneas 2 y 3) como en las transformadas y no inducidas (líneas 4, 6, 8 y 10) no se observó inducción de las proteínas. En las bacterias transformadas con el plásmido pGEX-3AB1 se obtuvo la inducción de una proteína de aproximadamente 45 KD (líneas 9 y 11). El PM obtenido, concuerda con el tamaño esperado para la proteína de fusión GST-3AB1.

Con el fin de determinar las condiciones óptimas de la inducción para obtener un mayor rendimiento de la proteína GST-3AB1, se incubaron las bacterias con IPTG durante diferentes períodos de tiempo: 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas y 6 horas. Los extractos proteicos obtenidos para cada condición, se analizaron en geles de poliacrilamida 12 % con SDS teñidos con azul de Coomasie. Se observó un aumento en los niveles de expresión en función del tiempo de incubación con IPTG. A las 3 horas de inducción, la proteína GST-3AB1 representaba el 15 % de las proteínas totales y estas condiciones se utilizaron en los experimentos subsiguientes.



**FIG. 9: Expresión de las proteínas GST y GST-3AB1**

Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida 12 % de las proteínas totales extraídas de los clones seleccionados.

1: marcador de PM (KD).

2: *E. coli* DH5 $\alpha$  sin transformar no inducidas.

3: *E. coli* DH5 $\alpha$  sin transformar inducidas.

4 y 6: *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas con el plásmido pGEX-3X no inducidas.

5 y 7: *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas con el plásmido pGEX-3X inducidas durante 3 hs.

8 y 10: *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas con el plásmido pGEX-3AB1 no inducidas.

9 y 11: *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas con el plásmido pGEX-3AB1 inducidas durante 3 hs.

### 1. 3. 2. Expresión de la proteína de fusión GST-3AB1 en diferentes cepas de *E. coli*

Con el propósito de observar si se podían mejorar los niveles de expresión de la proteína de fusión GST-3AB1, se transformaron las cepas HB109, JM101 y BL21 de *E. coli* con el plásmido pGEX-3AB1. La inducción con IPTG de los diferentes cultivos y la preparación de los extractos proteicos se realizó en forma

paralela con las cepas DH5 $\alpha$ , HB109, JM101 y BL21 siguiendo los protocolos detallados en materiales y métodos. Las proteínas totales se resolvieron en geles de poliacrilamida 12 % con SDS, teñidos con azul de Coomasie (no se muestran los datos). En las cepas HB109 y JM101 los niveles de expresión resultaron ser más bajos que en la cepa DH5 $\alpha$ , dado que no se pudo distinguir la proteína GST-3AB1 del total de proteínas bacterianas. En la cepa BL21 se obtuvieron los mejores niveles de expresión y por lo tanto, la misma se utilizó en los experimentos subsiguientes. Este resultado era esperable ya que dicha cepa es ampliamente utilizada para obtener altos rendimientos de proteínas de interés. La característica sobresaliente de la cepa BL21 es que es deficiente en la proteasa lon y por lo tanto existe menor degradación de proteínas en dicho sistema.

#### **1. 4. Purificación de la proteína de fusión GST-3AB1**

Los experimentos descritos anteriormente se realizaron con fines analíticos en volúmenes de cultivo de 5 ml.

Para la producción de la proteína GST-3AB1 con fines preparativos, se utilizaron volúmenes de cultivo mayores. El extracto de células correspondiente a 2 litros de cultivo, se concentró y resuspendió en un volumen de 20 ml de "buffer" MTPBS. La proteína GST-3AB1 se purificó por cromatografía de afinidad utilizando una columna de glutation agarosa. El sistema se puso a punto con la purificación de la proteína GST. La elución de dicha proteína se realizó en forma específica con un "buffer" que contenía glutation reducido. Se colectaron 30 fracciones y se identificó el pico correspondiente por lectura de la absorbancia a 280 nm. En la FIG. 10, se muestran los resultados obtenidos en la purificación de la proteína GST. Se observa claramente la presencia de un pico de OD = 1 en la fracción N<sup>o</sup> 20 que corresponde a la proteína GST purificada como se comprobó al resolver las fracciones eluidas de la columna en un gel de poliacrilamida 12 %. Un procedimiento idéntico al descrito para la proteína GST, se siguió con cultivos de bacterias inducidas que contenían el plásmido pGEX-3AB1 y se obtuvo el perfil que se ve en la FIG. 10. Se

puede observar que la proteína GST-3AB1 se eluye específicamente en las fracciones 16-19 lo que se corroboró también por "Western blot", utilizando sueros de animales infectados con el VFA. Dichas fracciones se juntaron para ser usadas posteriormente en los ensayos inmunoquímicos.

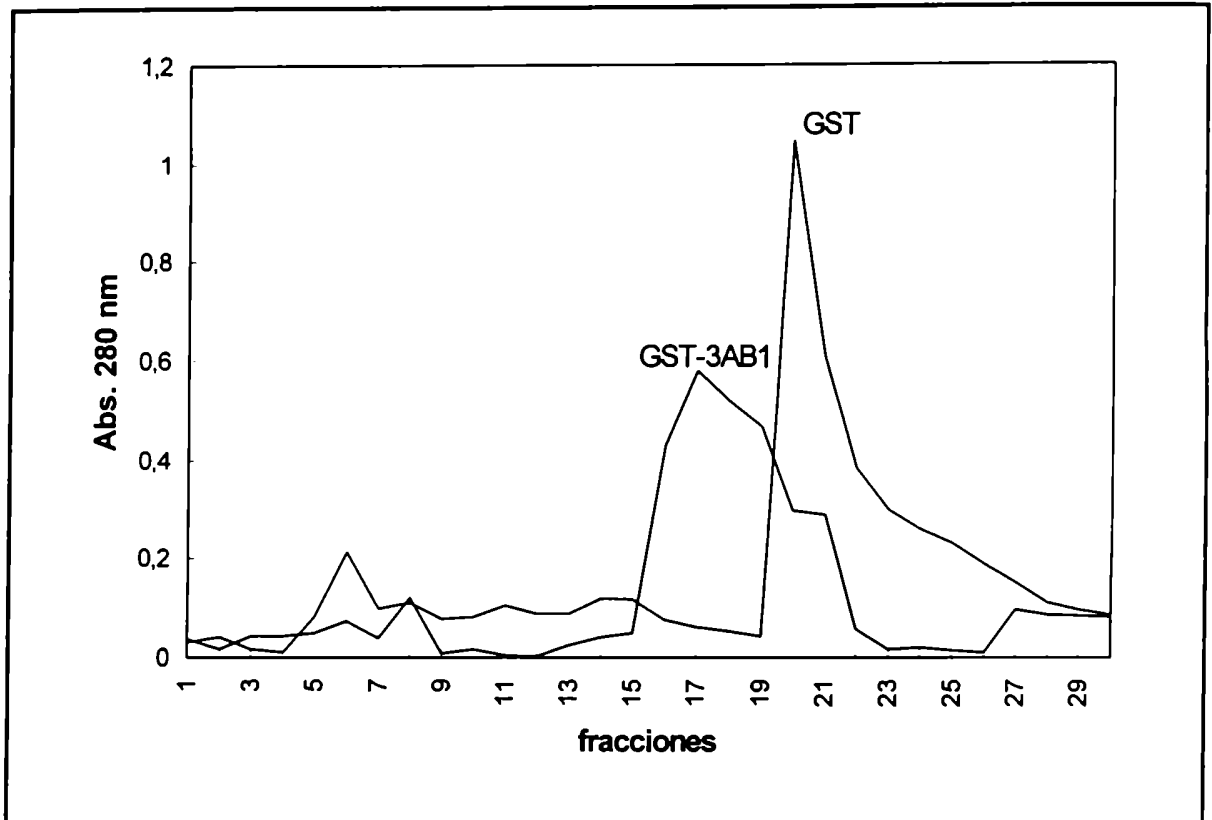
Es importante destacar que cuando se resolvieron las fracciones correspondientes al pico de DO en geles de poliacrilamida, los cuales fueron posteriormente teñidos con azul de Coomasie, no se pudo visualizar la proteína de interés.

De los resultados presentados se deduce que si bien los niveles de expresión de la proteína recombinante eran buenos (aproximadamente 15 % del total de proteínas de la bacteria), el rendimiento obtenido después de la purificación resultó bajo. Este hecho puede deberse a que la proteína GST-3AB1 queda retenida en la columna de glutation agarosa y se eluye parcialmente con el "buffer" que contiene glutation reducido.

#### **1. 5. "Western blot"**

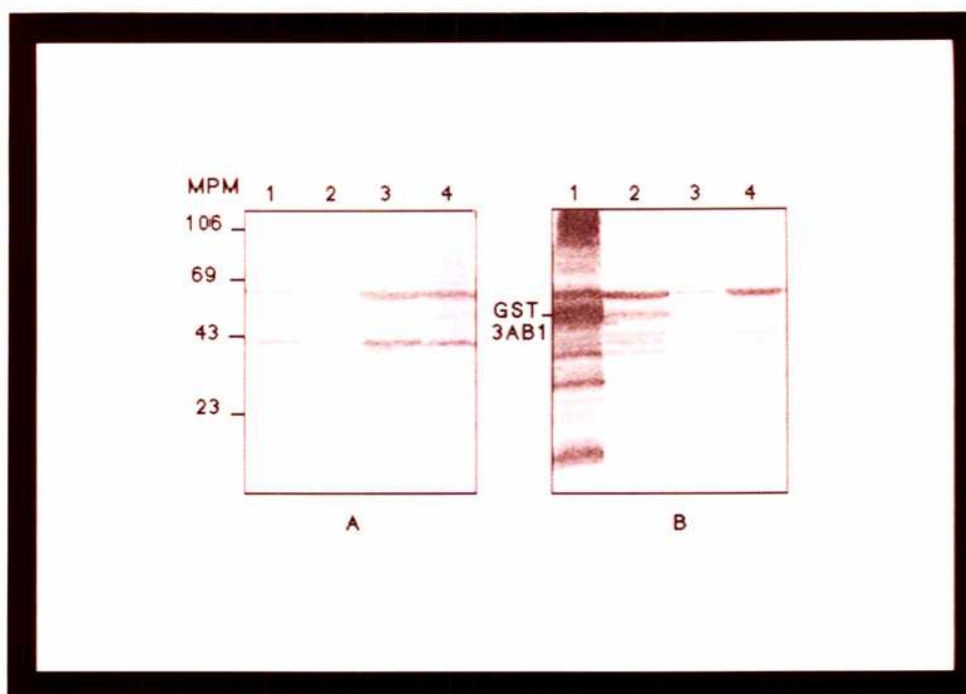
Con el fin de comprobar que la proteína GST-3AB1 producida era reconocida por sueros de bovinos infectados con el VFA, se desarrolló un ensayo de "Western blot".

Los experimentos se realizaron inicialmente con extractos crudos de *E.coli* BL21 transformadas con el plásmido pGEX-3AB1. En la FIG. 11, se puede observar que tanto el suero de bovino infectado como el suero control (suero de bovino proveniente de la región patagónica libre de anticuerpos anti-VFA) reaccionan con otras proteínas bacterianas, dado que los bovinos desarrollan naturalmente anticuerpos anti-*E.coli*. En los ensayos subsiguientes se utilizó la proteína parcialmente purificada en columnas de glutation-agarosa.



**FIG. 10: Purificación de las proteínas GST y GST-3AB1 por cromatografía de afinidad**

Para el desarrollo del "Western blot", fue necesario evaluar las condiciones óptimas para el bloqueo y lavado de la membrana de nitrocelulosa, como así también determinar las diluciones del suero bovino y del anticuerpo anti-bovino conjugado a fosfatasa alcalina, que permitieron la mejor visualización de las bandas de reactividad (datos no presentados). Las condiciones establecidas (suero bovino 1/200 y anticuerpo anti-bovino conjugado a fosfatasa alcalina 1/1000) fueron utilizadas en todos los ensayos de "Western blot" realizados utilizando la proteína GST-3AB1 como antígeno.



**FIG. 11: Detección de anticuerpos contra la proteína GST-3AB1 por “W. blot”**

Las proteínas totales extraídas de *E.coli* BL21 transformadas con el plásmido pGEX-3AB1, se resolvieron en un gel de poliacrilamida 12 % con SDS y luego se realizó un “Western blot” utilizando los siguientes sueros: suero de bovino proveniente de la región patagónica libre de anticuerpos anti-VFA (panel A) y suero de bovino infectado extraído a los 21 dpi (panel B).

1. Extractos crudos de *E.coli* BL21 transformadas con el plásmido pGEX-3AB1 inducidas.
2. Extractos crudos de *E.coli* BL21 transformadas con el plásmido pGEX-3AB1 sin inducir.
3. Extractos crudos de *E.coli* BL21 transformadas con el plásmido pGEX-3X inducidas.
4. Extractos crudos de *E.coli* BL21 transformadas con el plásmido pGEX-3X sin inducir.

Se ensayaron sueros de bovinos infectados experimentalmente (21 días post-infección), sueros de bovinos vacunados con una vacuna oleosa experimental monovalente y sueros de bovinos provenientes de la región patagónica libres de anticuerpos anti-VFA. Estos últimos fueron utilizados a modo de control negativo del test. Se comprobó que sólo los sueros de bovinos infectados reaccionan específicamente con la proteína GST-3AB1, como se muestra en la FIG. 12, líneas 3-9, mientras que los sueros de animales procedentes de zonas libres (líneas 1 y 2) y los sueros de bovinos vacunados (líneas 10-16), no dan reacción positiva.

Los resultados obtenidos demuestran claramente que la utilización de la proteína GST-3AB1 en "Western blot", permite la diferenciación entre bovinos vacunados e infectados.

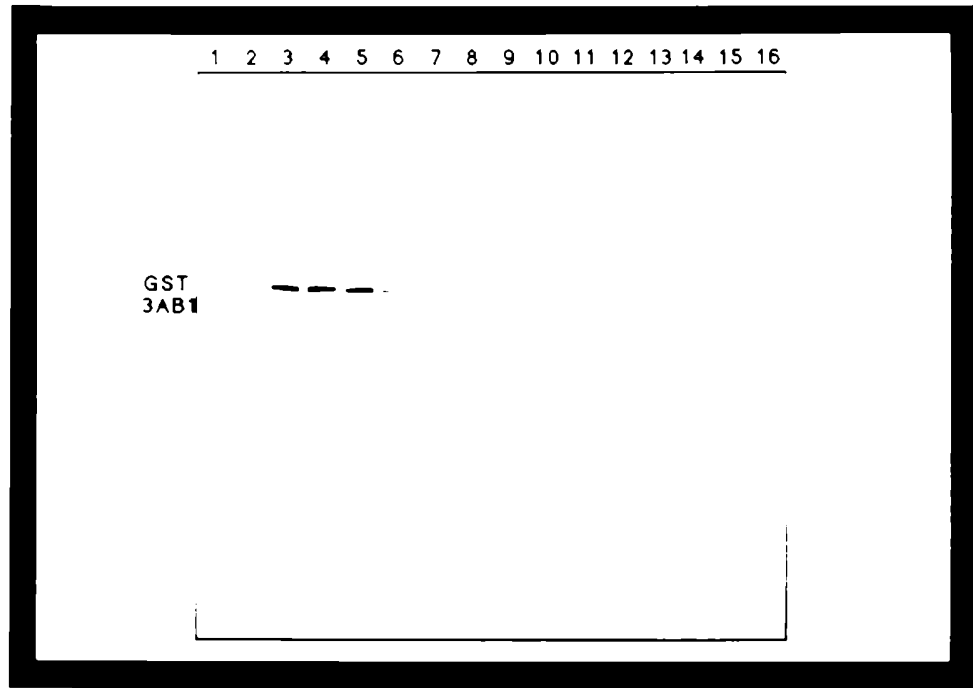
## **1. 6. ELISA**

Debido a que el "Western blot" es un método poco práctico para evaluar gran cantidad de sueros, se diseñó un ensayo de ELISA indirecto utilizando como antígeno la proteína GST-3AB1 parcialmente purificada en columnas de glutation agarosa.

Durante la puesta a punto de este ensayo se probaron distintos tipos de placas de ELISA tanto de baja adsorción como de máxima adsorción. Se comprobó que utilizando una placa de adsorción intermedia se lograba pegar el antígeno eficientemente y se obtenían valores de DO de aproximadamente 0,05 en los sueros utilizados como controles negativos.

Se determinaron además las concentraciones óptimas del antígeno, del suero bovino y del anticuerpo anti-bovino conjugado a peroxidasa, realizando diluciones seriadas de cada uno de los reactivos.

En la FIG. 13, se muestran los resultados obtenidos en la titulación de la preparación de antígeno que fue utilizada para la evaluación de los sueros que se describirá en este capítulo, sección 1.7. Para cada dilución de la proteína GST-3AB1, se ensayaron sueros de bovinos infectados, vacunados y controles (sueros de bovinos procedentes de la Patagonia, libres de anticuerpos contra el VFA). Todos los sueros fueron analizados por duplicado y se usaron los siguientes controles negativos: pocillos sin antígeno y pocillos sin suero bovino. Estos controles se realizaron para detectar la existencia de adsorción inespecífica de los reactivos utilizados en el ensayo. Se determinó que con una concentración de antígeno de aproximadamente 0,5 µg de proteína por pocillo se cumplían las condiciones de saturación de la placa.



**FIG. 12: Detección de anticuerpos contra la proteína GST-3AB1 parcialmente purificada por “Western blot”**

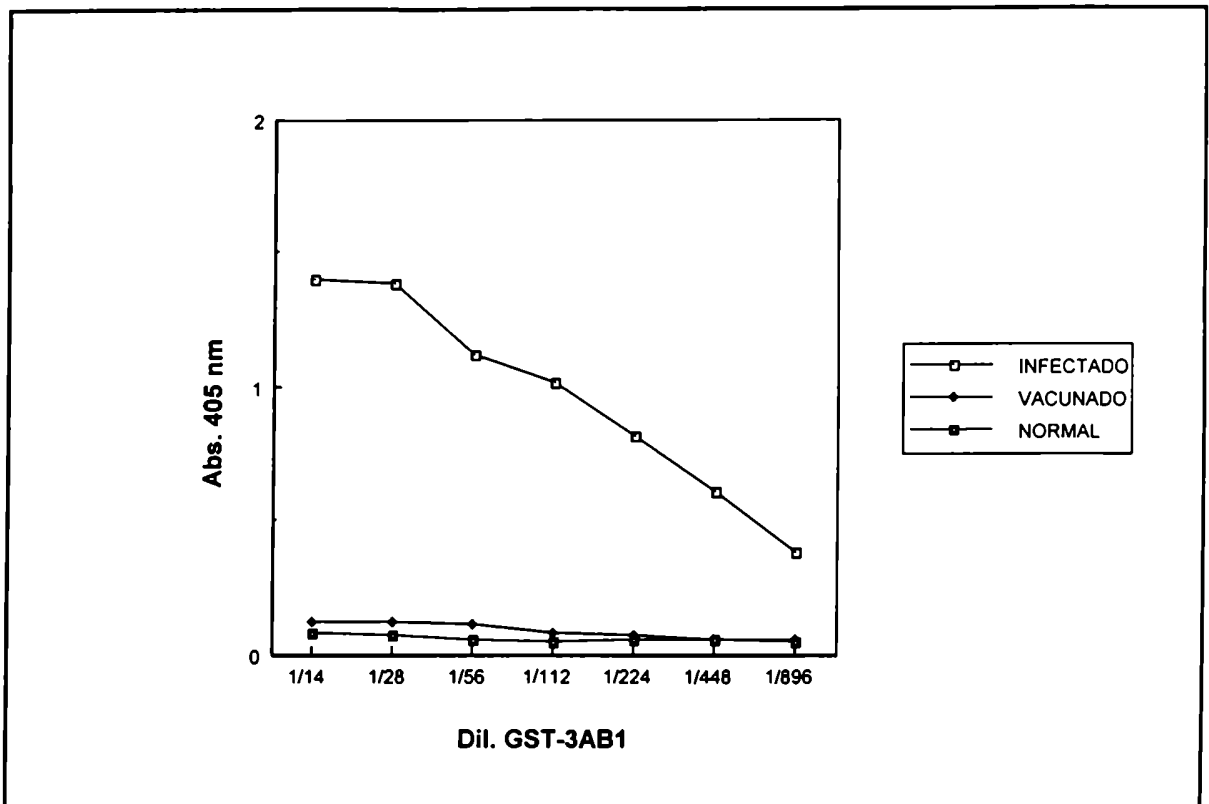
La proteína GST-3AB1 eluída de la columna de glutation agarosa se sembró en un gel preparativo de poliacrilamida 12 % con SDS y luego se realizó un “Western blot” utilizando los siguientes sueros :

1-2: sueros de bovinos libres de anticuerpos anti-VFA.

3-9: sueros de bovinos infectados (21 dpi).

10-16: sueros de bovinos vacunados con vacuna experimental (21 dpv).



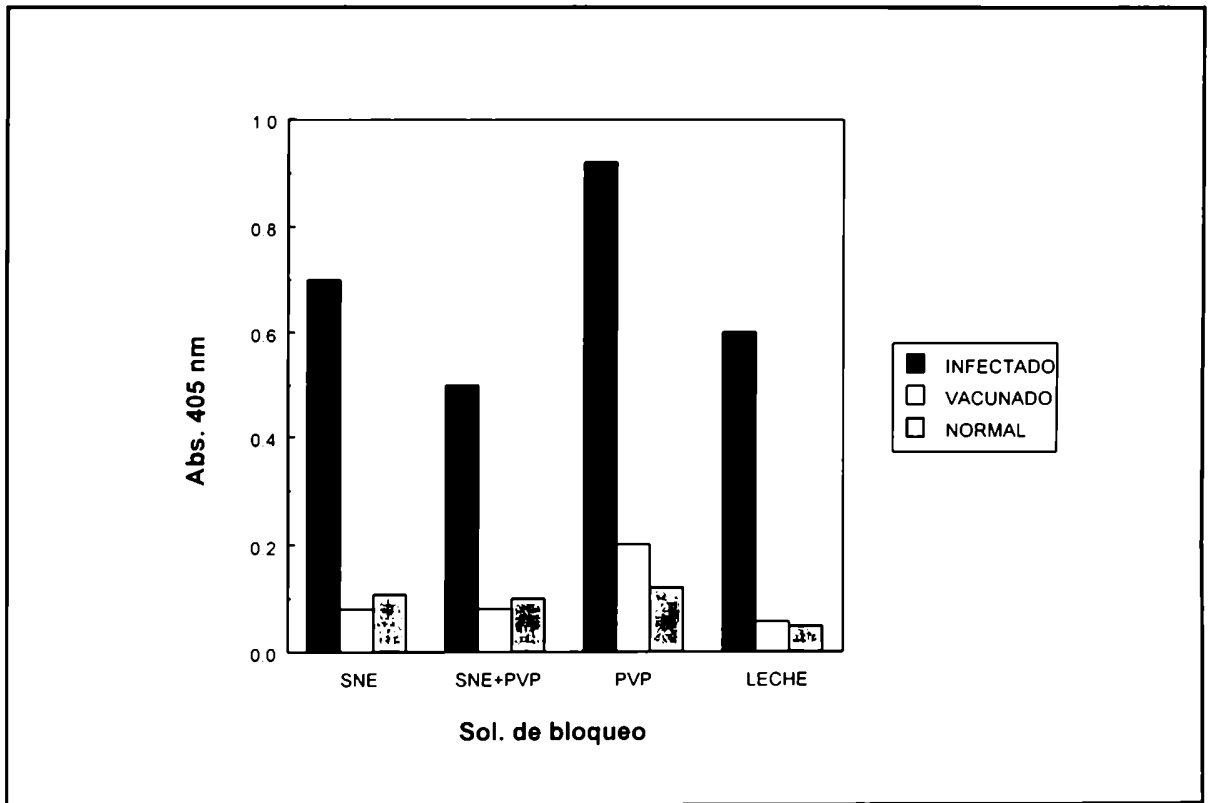


**FIG. 13: Titulación de la proteína GST-3AB1 por ELISA**

Diferentes diluciones de la proteína GST-3AB1 parcialmente purificada en columnas de glutación agarosa se sembraron en una placa de 96 pocillos y para cada dilución se ensayaron sueros de bovinos infectados, vacunados y normales (libres de anticuerpos anti-VFA).

Asimismo se probaron distintas soluciones de bloqueo: TBS-suero normal equino 5 %, TBS-suero normal equino 5 %-polivinilpirrolidona 40 3 %, TBS-polivinilpirrolidona 40 3 % y TBS-leche 5 %. En la FIG. 14, se muestran los resultados obtenidos para el mismo grupo de sueros, con los diferentes bloqueantes. Para cada ensayo se calculó la relación de DO entre el suero de bovino infectado y el suero de bovino vacunado. La relación de DO obtenida para la solución TBS-leche 5% resultó ser la más alta y por lo tanto este bloqueante se utilizó en los experimentos subsiguientes.

También se probaron diferentes condiciones para realizar los lavados, variando la concentración de Tween-20 entre 0,05 % y 1%. En este caso, no se observaron diferencias significativas con el aumento de la concentración de dicho detergente.



**FIG. 14: Ensayos de ELISA utilizando diferentes soluciones de bloqueo**

0,5  $\mu\text{g}$  de la proteína GST-3AB1 parcialmente purificada en columnas de glutation agarosa se sembraron en una placa de 96 pocillos y se ensayaron sueros de bovinos infectados, vacunados y normales (libres de anticuerpos anti-VFA) utilizando los siguientes bloqueantes: suero normal equino (SNE), polivinilpirrolidona 40 (PVP) y leche.

## **1. 7. Validación de los ensayos de ELISA y "Western blot" para el diagnóstico diferencial**

Con el propósito de validar estadísticamente los tests desarrollados, se evaluaron mediante las dos técnicas un grupo de 153 sueros formado por 51 sueros de bovinos infectados experimentalmente obtenidos entre 7 y 70 días post-infección, 51 sueros de bovinos vacunados con vacuna oleosa monovalente experimental y 51 sueros de bovinos procedentes de la Patagonia, libres de anticuerpos contra el VFA.

En la FIG. 15, se muestran los resultados obtenidos en el test de ELISA. Todos los sueros de bovinos infectados reaccionaron con la proteína GST-3AB1 a excepción de uno de ellos. Este suero que presentó un valor de DO menor que el punto de corte de 0,172 DO, y aquellos con valores menores que 0,3 DO, fueron obtenidos entre los 7 y 8 días post-infección. Dichos animales desarrollaron niveles mayores de anticuerpos anti-3AB1 después de los 21 días post-infección.

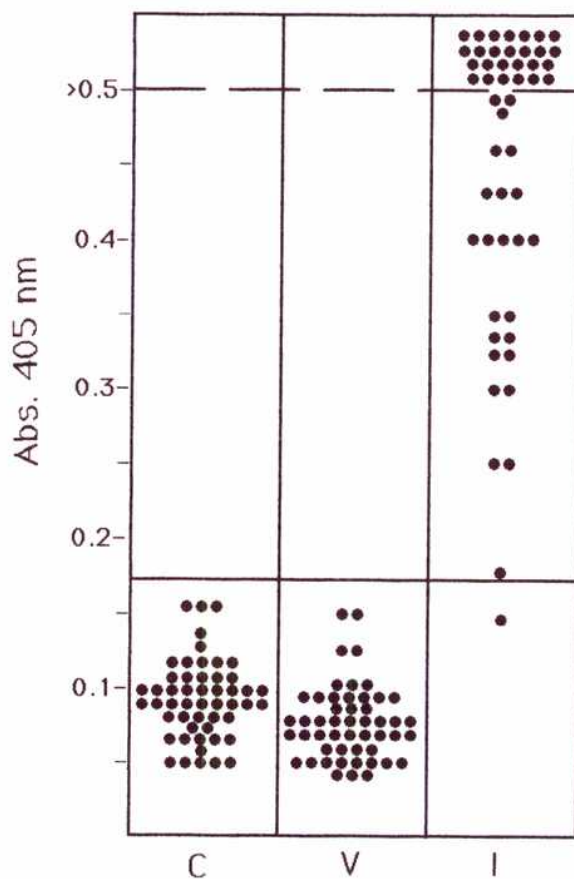
Todos los sueros de bovinos vacunados (n=51) y de bovinos procedentes de zonas libres (n=51) presentaron valores de DO menores que el valor de corte.

Este grupo de 153 sueros fue evaluado también por "Western blot", y se obtuvieron idénticos resultados. Sin embargo, mediante esta técnica resultó positivo el único suero de bovino infectado que había dado negativo por ELISA, lo que indicaría una mayor sensibilidad del "Western blot" respecto del ELISA en las condiciones ensayadas.

En la FIG. 16, se muestran los resultados del estudio de un grupo de sueros provenientes de 4 bovinos infectados experimentalmente, cuyas muestras se obtuvieron a los 7, 14, 21 y 28 días post-infección. Se observa que el nivel de anticuerpos anti-3AB1 aumenta con el tiempo post-infección transcurrido. En la línea 1, se observan bandas de reactividad de menor peso molecular que constituyen productos de degradación de la proteína GST-3AB1.

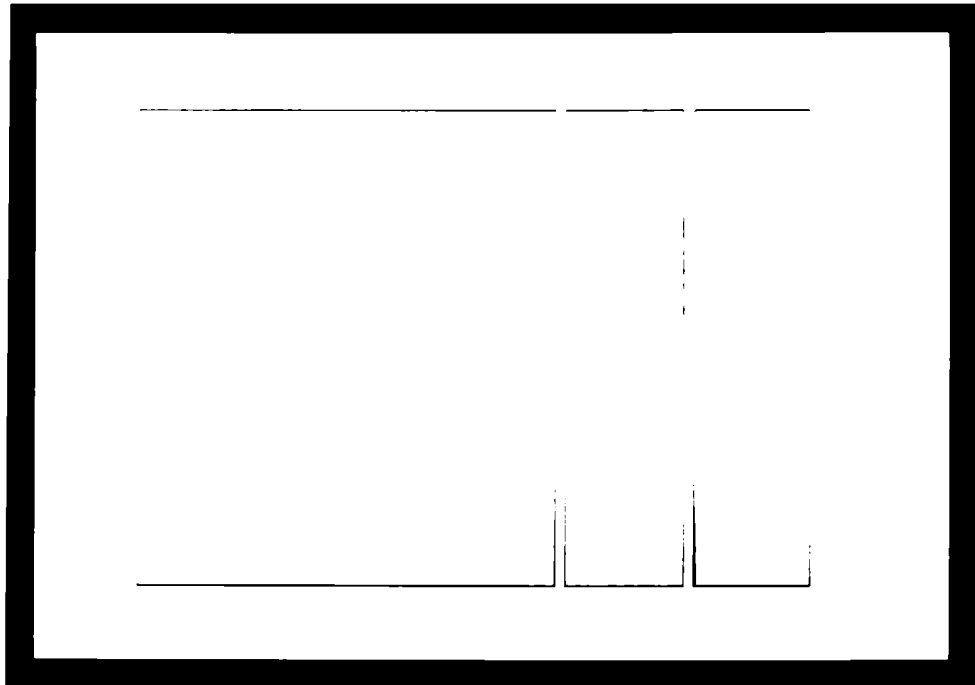
Paralelamente, se evaluaron sueros de bovinos infectados con enterovirus bovino, virus de la lengua azul, virus de la estomatitis vesicular, virus de la diarrea

bovina y herpesvirus bovino tipo 2. Se comprobó que ninguno de los sueros mencionados reconoce a la proteína GST-3AB1, confirmando una vez más que la reacción es específica para los sueros de bovinos infectados con el VFA.



**FIG. 15: Detección de anticuerpos contra la proteína GST-3AB1 por ELISA**

0,5  $\mu\text{g}$  de la proteína GST-3AB1 parcialmente purificada en columnas de glutation agarosa se sembraron en una placa de 96 pocillos y se ensayaron sueros de bovinos infectados (I: 7-10dpi), vacunados (V: 21 dpv) y normales (C: libres de anticuerpos anti-VFA).



**FIG. 16: Detección de anticuerpos contra la proteína GST-3AB1 parcialmente purificada en sueros de bovinos infectados experimentalmente por “W. blot”**

La proteína GST-3AB1 eluída de la columna de glutatión agarosa se sembró en un gel preparativo de poliacrilamida 12 % con SDS y luego se realizó un “Western blot” utilizando los siguientes sueros:

1-4: sueros de bovinos libres de anticuerpos anti-VFA.

5: suero de bovino infectado (21 dpi).

6: suero de bovino vacunado con vacuna experimental (21 dpv).

7-10: sueros del bovino N<sup>o</sup>1 obtenidos a los 7, 14, 21 y 28 dpi.

11-13: sueros del bovino N<sup>o</sup>2 obtenidos a los 8, 14 y 21 dpi.

14-17: sueros del bovino N<sup>o</sup>3 obtenidos a los 8, 14, 21 y 28 dpi.

18-21: sueros del bovino N<sup>o</sup>4 obtenidos a los 8, 14, 21 y 28 dpi.

## 2. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA NO ESTRUCTURAL 3AB1 EN EL SISTEMA BACULOVIRUS-CÉLULAS DE INSECTO

De los resultados expuestos se puede deducir que si bien la proteína GST-3AB1 se expresó en altos niveles en *E.coli* BL21 (aproximadamente 15 % del total de las proteínas de la bacteria), los rendimientos obtenidos después de la purificación en columnas de glutation agarosa fueron bajos. Asimismo, se destacó que este paso era indispensable para la obtención del antígeno utilizado en los tests de ELISA y "Western blot" debido a la reactividad de los sueros bovinos con otras proteínas bacterianas (FIG. 11). Con el objeto de superar estos inconvenientes y conocidas las ventajas del sistema de expresión baculovirus-células de insecto, se clonó y expresó la proteína no estructural 3AB1 en dicho sistema.

El uso de un sistema eucariótico para expresar genes eucariotas es particularmente importante en la obtención de proteínas biológicamente activas. Además provee de un entorno adecuado para el plegamiento correcto, formación de puentes disulfuro, oligomerización y otras modificaciones post-traduccionales indispensables para la actividad biológica de las proteínas expresadas.

La característica sobresaliente del sistema baculovirus-células de insecto es la posibilidad de expresar altos niveles de proteínas heterólogas. En algunos casos, se alcanzan niveles de expresión que representan el 25-50 % del total de las proteínas celulares (35).

Los baculovirus son virus de ADN doble cadena que tienen diferentes especies de insectos como huéspedes naturales. El ADN es empaquetado en nucleocápsides. Dado que el tamaño de las mismas es flexible, las partículas de baculovirus recombinante pueden contener gran cantidad de ADN foráneo. En la fase temprana de la infección, las células infectadas liberan partículas virales extracelulares. En la fase tardía, se forman cuerpos de inclusión en el núcleo, compuestos por una matriz homogénea formada por una única proteína que se

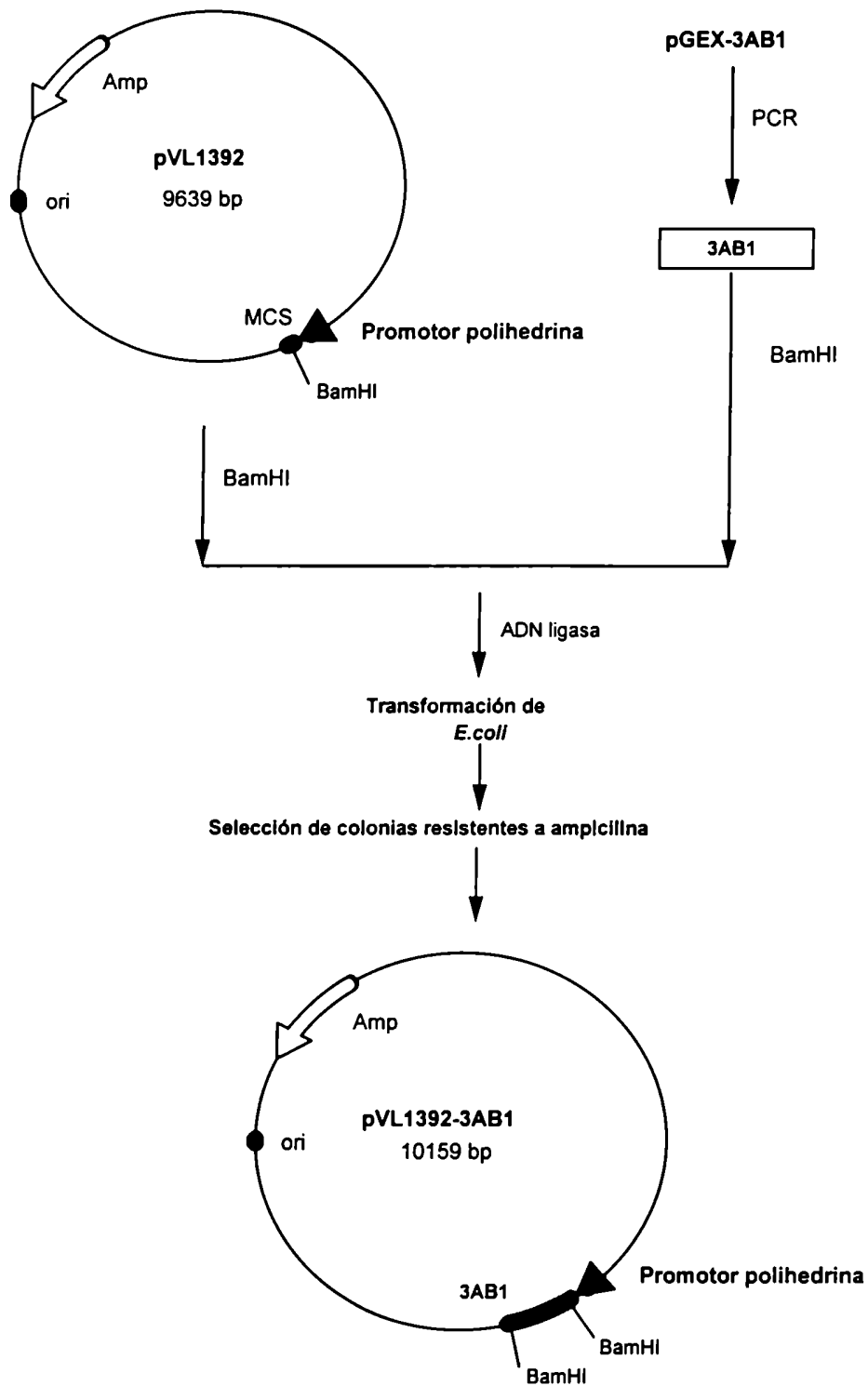
denomina polihedrina. La polihedrina se acumula alcanzando niveles que representan casi el 50 % de las proteínas celulares y no es esencial para el ciclo de vida de los baculovirus, siendo entonces posible clonar genes foráneos que reemplazan al gen de dicha proteína (35, 62).

Existen diferentes vectores de transferencia que permiten el clonado de proteínas heterólogas bajo la regulación del promotor de la polihedrina. Como la expresión de esta proteína es tardía, en estas condiciones se pueden producir productos que resultan tóxicos en otros sistemas (62).

## **2. 1. Clonado de la proteína no estructural 3AB1 en el plásmido de transferencia pVL1392**

El ADN del gen 3AB1 se amplificó por PCR a partir del plásmido pGEX-3X utilizando los oligonucleótidos y las condiciones de reacción señaladas en materiales y métodos, sección 9. 2. Se obtuvo un fragmento de ADN del tamaño esperado el que se clonó en el sitio de restricción BamHI del plásmido pVL1392 (FIG. 17). Se aislaron colonias resistentes a ampicilina, a partir de las cuales se preparó ADN plasmídico que se estudió mediante digestión con la enzima BamHI. Los resultados se visualizaron en geles de agarosa y se identificaron 12 clones que poseían un inserto de aproximadamente 530 pb.

Para conocer cuales de estos clones poseían el inserto en la orientación correcta, se amplificó el inserto por PCR utilizando como templado minipreparaciones de plásmidos. Se emplearon como iniciadores dos oligonucleótidos: uno de ellos complementario al extremo 3' del gen 3AB1 (oligonucleótido 2, FIG. 18) y el otro complementario a secuencias del baculovirus salvaje que se encuentran río arriba del sitio de clonado del plásmido pVL1392 (oligonucleótido 1, 18).



**FIG. 17: Esquema de la construcción del plásmido pVL1392-3AB1**



Por lo tanto, sólo en el caso en que el inserto se ligó en la orientación correcta, se obtuvo un fragmento de ADN de 660 pb como producto de la amplificación. Se identificaron 6 clones que contenían el inserto en la orientación deseada (FIG. 19).

Por secuenciación de nucleótidos, se verificó la integridad del gen 3AB1 clonado y la presencia de los codones de iniciación y terminación de la traducción.

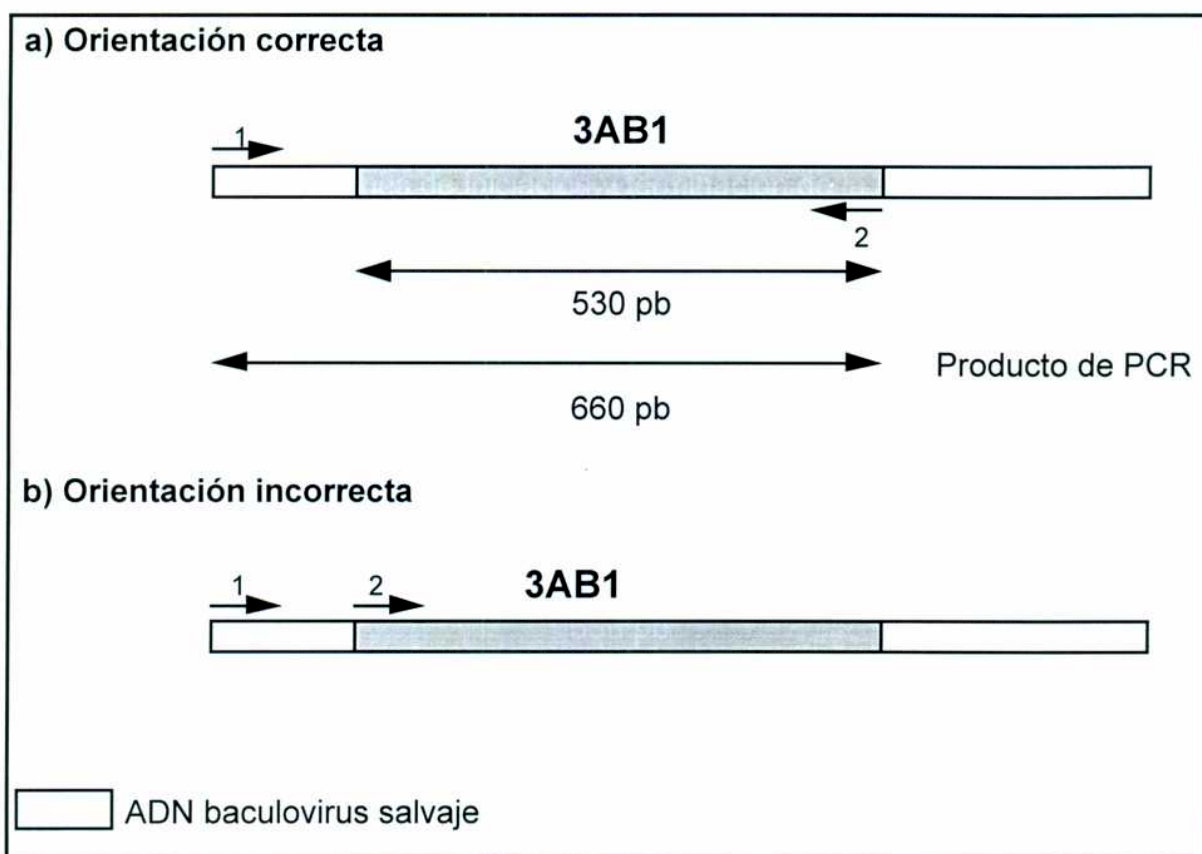
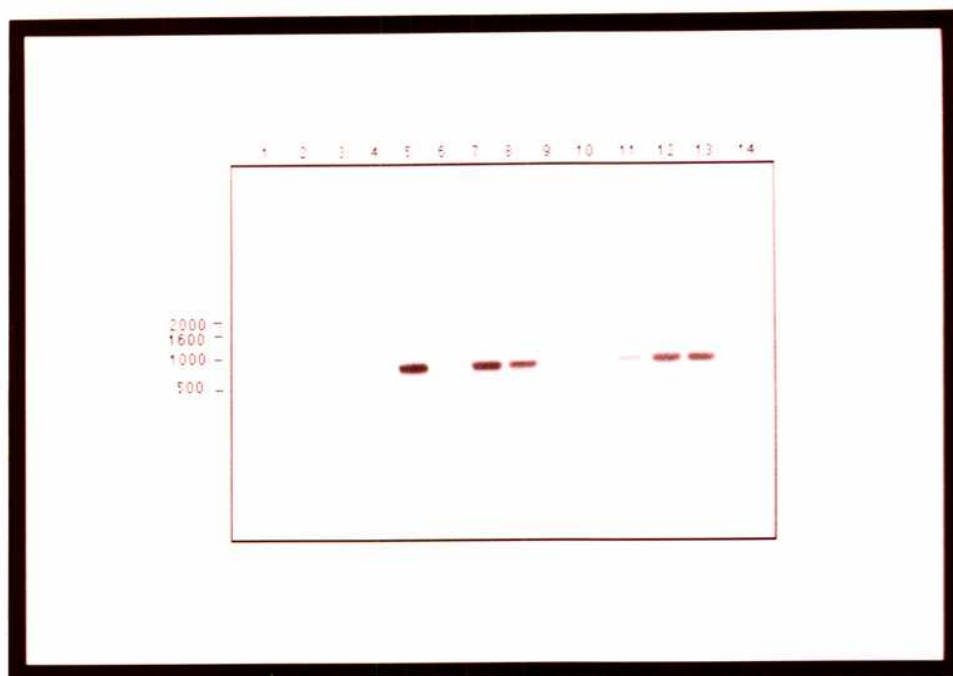


FIG. 18: Esquema de la estrategia empleada para determinar la orientación del gen 3AB1 clonado en el plásmido pVL1392



**FIG. 19: Determinación de la orientación del gen 3AB1 clonado en el plásmido pVL1392**

Análisis de los productos de PCR derivados de los clones seleccionados en 2.1, por electroforesis en gel de agarosa 1,2 %, teñido con bromuro de etidio.

1: marcador de peso molecular (pb).

2: control positivo de PCR.

3: control negativo de PCR.

4-14: productos de amplificación obtenidos a partir de minipreparaciones de plásmidos.

## **2. 2. Obtención del baculovirus recombinante AcMNPV-3AB1 por co-transfección**

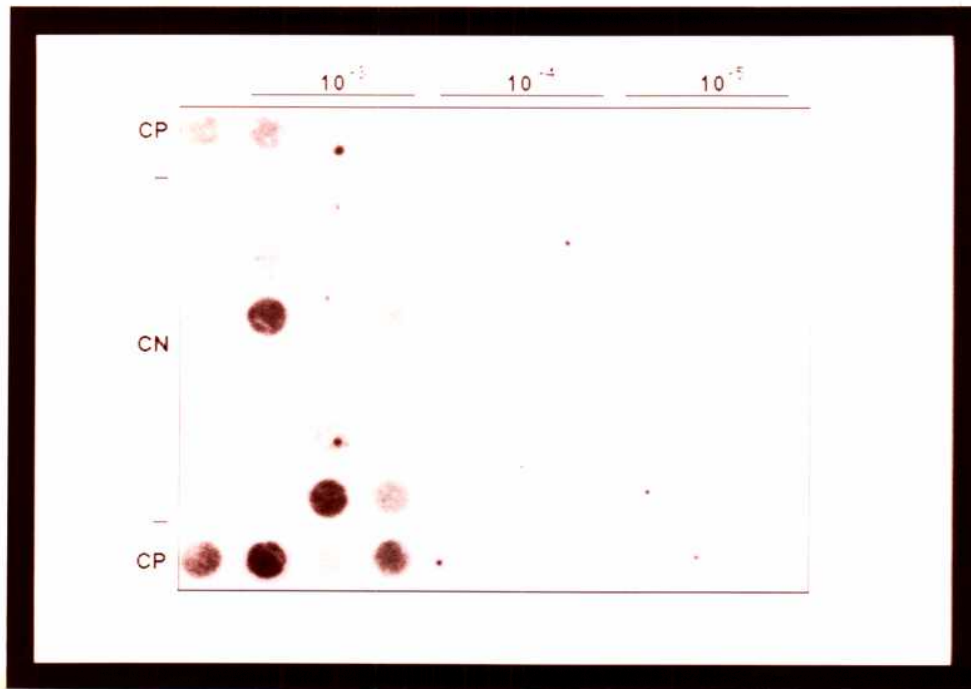
Para la obtención del baculovirus recombinante, se siguió el protocolo detallado en materiales y métodos, sección 12. Con el sobrenadante de la co-transfección, se infectaron monocapas de células Sf9 crecidas en placas de 96 pocillos. Se utilizó dicho sobrenadante puro y dos diluciones:  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ . A los 5 días post-infección, se lisaron las células infectadas *in situ* y el ADN total se transfirió a una membrana de nylon. Con una sonda radioactiva del gen 3AB1 se

reveló la presencia de los baculovirus recombinantes. En el ensayo de "Dot blot" se utilizaron los siguientes controles: ADN del plásmido pVL1392-3AB1 (como control positivo) y ADN proveniente de células infectadas con el baculovirus salvaje y ADN proveniente de células sin infectar (como controles negativos). Se seleccionaron entonces los sobrenadantes correspondientes a los pocillos que dieron positivos en la dilución  $10^{-1}$  del virus original. Los mismos fueron utilizados como inóculo para infectar nuevamente células crecidas en placas de 96 pocillos (segunda ronda de purificación). Se realizaron diluciones seriadas hasta  $10^{-5}$  de los sobrenadantes elegidos. Siguiendo los procedimientos ya descritos, se seleccionaron los sobrenadantes correspondientes a las células infectadas de los 5 pocillos más radiactivos en las diluciones  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  (FIG. 20).

A partir de los "stocks" de baculovirus elegidos, se prepararon volúmenes mayores de inóculo y se determinaron los títulos por ensayo de placas. Se obtuvieron títulos promedio de aproximadamente  $2 \times 10^7$  UFP/ml. Para aumentar el título de estos "stocks" virales, se infectaron células usando una multiplicidad de infección baja ( $moi=0,01-0,1$ ). Los sobrenadantes provenientes de esta última infección, se titularon por ensayo de placas, y se comprobó que los nuevos títulos promedio alcanzados eran de  $10^8$  UFP /ml.

### **2. 3. Producción y purificación de la proteína 3AB1 a partir de células Sf9 infectadas**

Con el propósito de comprobar que los baculovirus recombinantes obtenidos producían la proteína 3AB1, se infectaron  $4 \times 10^6$  células Sf9 utilizando un inóculo de alto título con una  $moi$  de 5. A los 3 días post-infección, se cosecharon las células, se lisaron y los extractos proteicos obtenidos se resolvieron en geles de poliacrilamida 13 %. Paralelamente se realizaron experimentos con el baculovirus salvaje en idénticas condiciones.



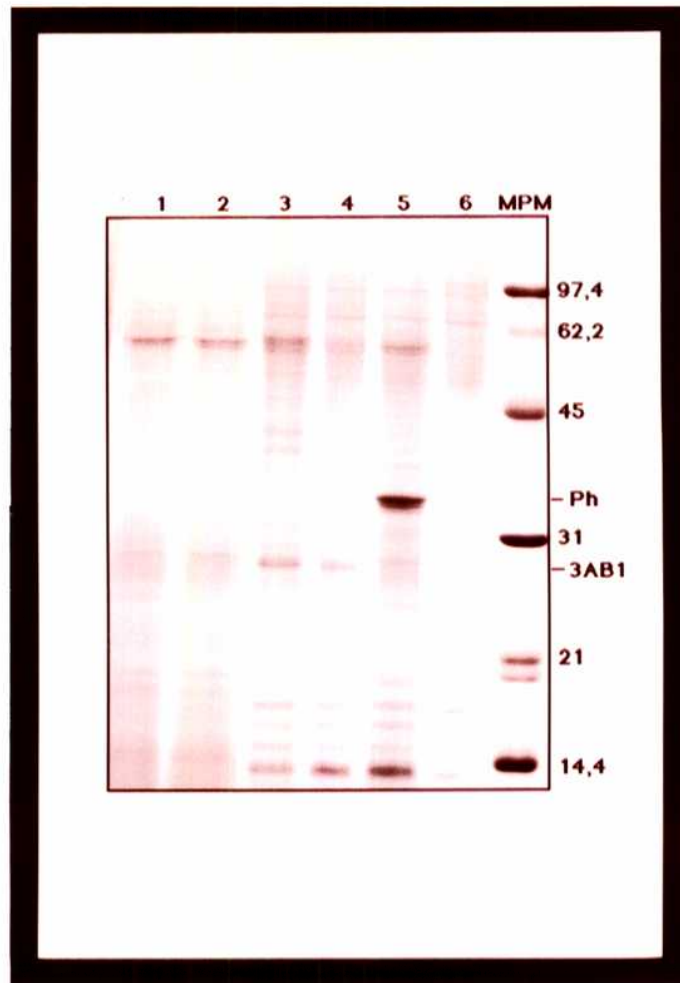
**FIG. 20: Detección de los baculovirus recombinantes AcMNPV-3AB1 por “Dot blot”**

Autorradiografía del “Dot blot” realizado con la sonda radioactiva del gen 3AB1 correspondiente a la segunda ronda de purificación.

CP: control positivo.

CN: controles negativos.

Los resultados se muestran en la FIG. 21. Se detectó la presencia de una proteína de aproximadamente 20 KD que es el PM esperado para la proteína 3AB1, en las células que habían sido infectadas con el baculovirus AcMNPV-3AB1. Dicha proteína representaba aproximadamente el 4 % del total de proteínas celulares.



**FIG. 21: Análisis de la expresión de la proteína 3AB1 en células Sf9 por electroforesis en geles de poliacrilamida**

Las proteínas totales derivadas de extractos celulares preparados a los 3 días post-infección con diferentes detergentes se resolvieron en un gel de poliacrilamida 13 % con SDS.

- 1: extracto de células infectadas con el baculovirus AcMNPV-3AB1 (detergente: Triton X-100 1%).
- 2: extracto de células infectadas con el baculovirus AcMNPV-3AB1 (detergente: NP-40 1%).
- 3 y 4: extracto de células infectadas con el baculovirus AcMNPV-3AB1 (detergente: SDS 2%).
- 5: extracto de células infectadas con el baculovirus salvaje (detergente: SDS 2%).
- 6: extracto de células sin infectar (detergente: SDS 2%).

En los extractos proteicos provenientes de células infectadas con el baculovirus salvaje (FIG. 21, línea 5) se observó la producción de la polihedrina.

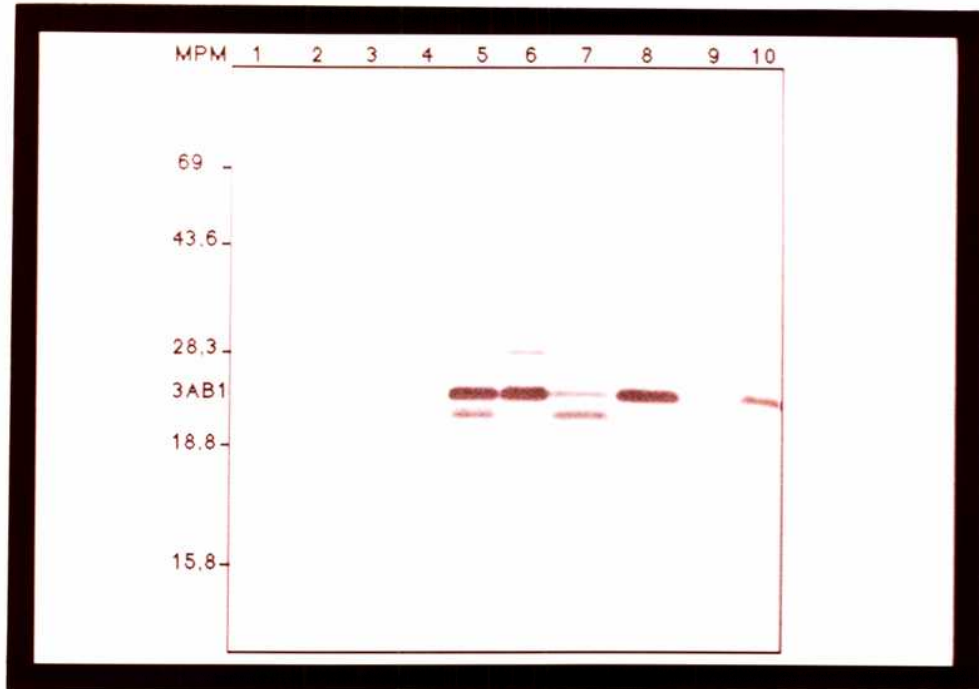
Asimismo, se evaluaron las condiciones óptimas para lisar las células infectadas, utilizando "buffers" de ruptura que contenían distintos detergentes. Se comprobó que empleando un "buffer" que contenía SDS 2% (FIG. 21, líneas 3 y 4) se lograba extraer mayor cantidad de la proteína de interés que con los "buffers" que contenían Triton X-100 1% y NP40 1% (FIG. 21, líneas 1 y 2, respectivamente). Sin embargo, en los experimentos subsiguientes se utilizaron las condiciones más suaves de extracción (Triton X-100 1%), con el objeto de preservar la estructura de la proteína 3AB1 y asegurar su adsorción a las placas de ELISA, dado que el detergente SDS podía interferir en este último proceso.

Para evaluar la reactividad de la proteína 3AB1 expresada en este sistema, se realizó un ensayo de "Western blot" y se comprobó que sueros de bovinos infectados reconocían específicamente la banda visualizada en los experimentos descritos anteriormente. No se detectó reactividad en extractos crudos de células infectadas con el baculovirus salvaje (datos no presentados).

Para determinar las condiciones óptimas de expresión de la proteína 3AB1, se infectaron células de forma idéntica a la detallada en párrafos previos y se cosecharon 1, 2, 3 y 4 días post-infección. Se prepararon extractos celulares utilizando el "buffer" de extracción que contenía Triton X-100 1%. Los resultados obtenidos por "Western blot" indicaron que la proteína 3AB1 se expresaba a partir de los 2 días post-infección (FIG. 22, líneas 5 y 6) y que la cantidad de proteína producida disminuía a partir de los 3 días post-infección (FIG. 22, líneas 7 y 8), observándose niveles de degradación muy altos a los 4 días post-infección (FIG. 22, línea 9).

Además, para establecer si disminuía el nivel de degradación lisando las células infectadas en presencia de inhibidores de proteasas, se empleó nuevamente el "buffer" de extracción que contenía Triton X-100 1%, al cual se le agregaron los inhibidores PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo), leupeptina y pepstatina A (FIG. 22, líneas 6, 8 y 10). Se concluyó que la degradación de la proteína 3AB1 disminuía considerablemente si la extracción se realizaba a los 3

días post-infección empleando inhibidores de proteasas. Estas condiciones fueron empleadas en los experimentos subsiguientes.



**FIG. 22: Determinación de las condiciones óptimas para la producción y extracción de la proteína 3AB1 a partir de células Sf9 infectadas por "W. blot"**

Las proteínas totales derivadas de extractos celulares preparados utilizando el detergente Tritón X-100 se resolvieron en un gel de poliacrilamida 13 % con SDS, y luego se realizó un "Western blot" el que se reveló con un suero de bovino infectado (21 dpi).

- 1: extracto de células sin infectar preparado a los 3 dpi.
- 2: extracto de células infectadas con el baculovirus AcMNPV salvaje preparado a los 3 dpi.
- 3: extracto de células infectadas con el baculovirus AcMNPV-3AB1 preparado 1dpi.
- 4: idem 3 pero en presencia de inhibidores de proteasas.
- 5: extracto de células infectadas con el baculovirus AcMNPV-3AB1 preparado a los 2dpi.
- 6: idem 5 pero en presencia de inhibidores de proteasas.
- 7: extracto de células infectadas con el baculovirus AcMNPV-3AB1 preparado a los 3dpi.
- 8: idem 7 pero en presencia de inhibidores de proteasas.
- 9: extracto de células infectadas con el baculovirus AcMNPV-3AB1 preparado a los 4dpi.
- 10: idem 8 pero en presencia de inhibidores de proteasas.

La proteína 3AB1 se purificó parcialmente por tamizaje molecular a través de una columna de Sephacryl S-300. Las fracciones que contenían la proteína 3AB1 se identificaron por "Western blot" y por ELISA utilizando sueros de bovinos infectados y sueros de bovinos procedentes de zonas libres de fiebre aftosa (controles negativos).

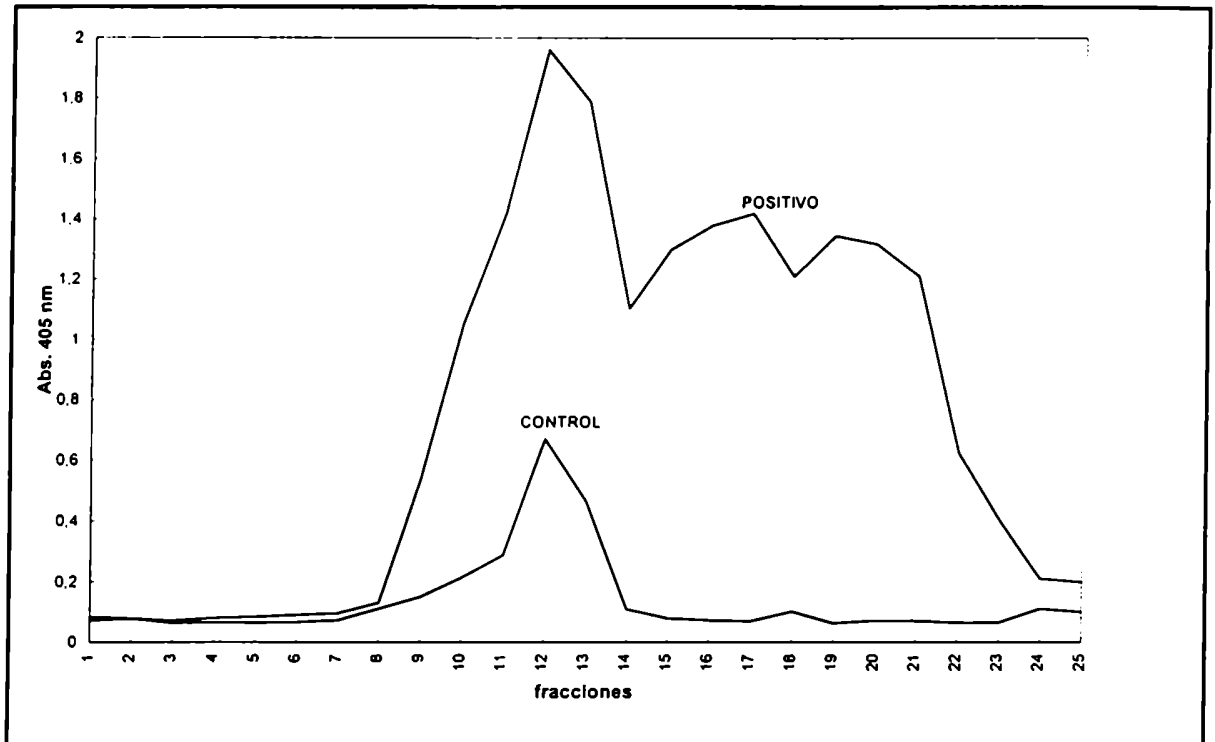
En la FIG. 23 se muestran los resultados obtenidos en la evaluación de las fracciones eluídas de la columna de Sephacryl S-300 por ELISA. Si bien la mayor reactividad con el suero de bovino infectado se obtuvo en las fracciones 10-14, también se observó reacción con el suero control en las mismas, originando valores de DO muy altos. Este hecho puede deberse a la presencia de otras proteínas que reaccionan inespecíficamente con los sueros bovinos. Por lo tanto, para los ensayos de ELISA que se describirán posteriormente, se utilizaron las fracciones 15-22, en las que se obtuvo valores de DO de 0,1 en los sueros control.

#### **2. 4. Evaluación de la capacidad de la proteína 3AB1 producida en células Sf9 para diferenciar animales vacunados de infectados con el VFA**

Con la proteína 3AB1 purificada por tamizaje molecular a través de una columna de Sephacryl S-300, se puso a punto el ensayo de ELISA, siguiendo protocolos idénticos a los que se detallaron para la proteína GST-3AB1.

Se estudió el mismo grupo de 153 sueros que se utilizó para evaluar la reactividad de la proteína GST-3AB1 y los resultados obtenidos fueron similares a los descritos en la sección 1.7 (FIG. 15), en cuanto a que la proteína 3AB1 producida en células Sf9, permitía una clara distinción entre animales vacunados e infectados. Sin embargo, el valor de corte obtenido en este caso resultó de DO= 0,2.





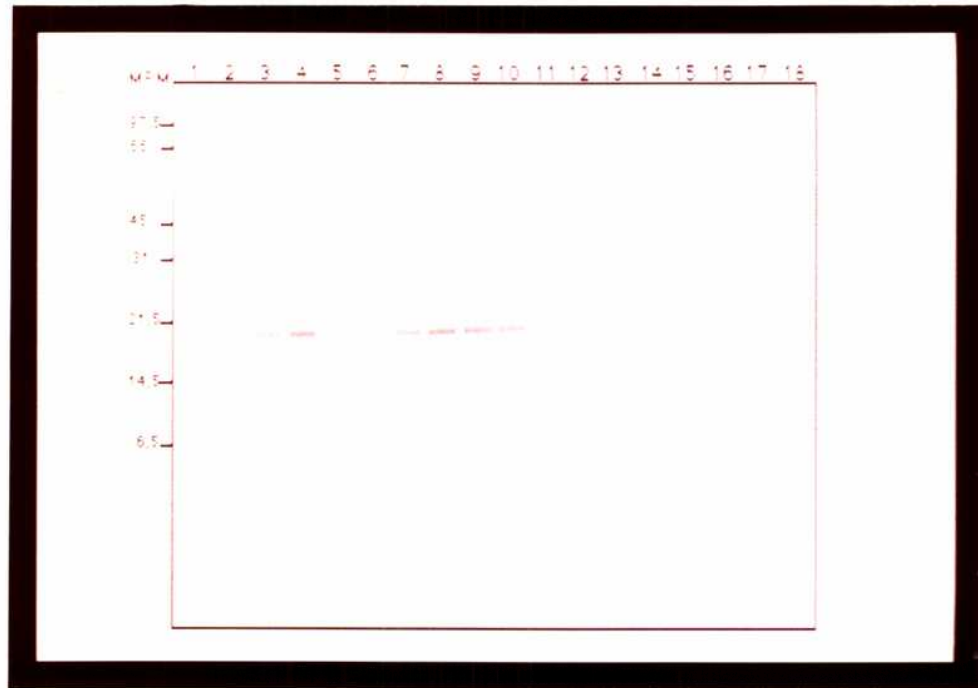
**FIG. 23: Purificación de la proteína 3AB1 mediante tamizaje molecular**

Extractos crudos preparados a partir de células infectadas con el baculovirus recombinante AcMNPV-3AB1 se purificaron mediante tamizaje molecular utilizando una columna de Sephacryl S-300. Se colectaron 30 fracciones. Alícuotas correspondientes a cada una de ellas se sembraron en una placa de 96 pocillos y se identificó el pico de interés mediante un ensayo de ELISA utilizando un suero de bovino infectado (21 dpi) y un suero control (suero de bovino libre de anticuerpos anti-VFA).

Paralelamente se realizaron ensayos de "Western blot" con lisados totales de células infectadas con el baculovirus AcMNPV-3AB1 (FIG. 24) y se pudo comprobar una vez más que el antígeno producido permite diferenciar claramente los bovinos infectados de los vacunados.

La sensibilidad relativa del test de ELISA con respecto al "Western blot" se estudió en algunas muestras de sueros de bovinos infectados. Se comprobó que la reactividad de la proteína 3AB1 en "Western blot" fue retenida aún en diluciones de

suero 1:12000 mientras que en el test de ELISA la reactividad se perdía en diluciones de suero superiores a 1:1500.



**FIG. 24: Detección de anticuerpos contra la proteína 3AB1 producida en células Sf9 por “Western blot”**

La proteína 3AB1 derivada de extractos crudos de células infectadas con el baculovirus recombinante AcMNPV-3AB1 sin purificar, se sembró en un gel preparativo de poliacrilamida 15 % con SDS y luego se realizó un “Western blot” utilizando los siguientes sueros:

1-2: sueros de bovinos libres de anticuerpos anti-VFA.

3-10: sueros de bovinos infectados (21 dpi).

11-18: sueros de bovinos vacunados con vacuna experimental (21 dpv).

## 2. 5. Comparación de la especificidad del antígeno 3AB1 y el antígeno VIA para diferenciar animales vacunados de infectados

Debido a que diferentes investigadores comprobaron que animales vacunados desarrollan anticuerpos contra el antígeno VIA (12, 20), resultó necesario determinar si bovinos vacunados con una vacuna comercial presentaban también anticuerpos contra la proteína 3AB1. Por tal motivo, 24 animales procedentes de la Patagonia, libres de anticuerpos contra el VFA, fueron inoculados por lo menos 10 veces (cada 6 meses) con una vacuna comercial disponible. Se estudió la presencia de anticuerpos anti-VIA y anti-3AB1 en sueros obtenidos 15 días antes y 15 días después de la última revacunación (Tabla 1). No se hallaron anticuerpos anti-3AB1 en ninguna de las 48 muestras evaluadas por ELISA y "Western blot". Sin embargo, se detectaron anticuerpos anti-VIA en 14 de los 24 sueros obtenidos antes de la última revacunación y en 18 de los 24 sueros obtenidos post-revacunación. Estas observaciones indicaron que la vacuna comercial utilizada en estos experimentos fue capaz de inducir anticuerpos anti-VIA y no anti-3AB1.

**TABLA 1: Detección de anticuerpos anti-VIA y anti-3AB1 en sueros de bovinos inoculados varias veces con una vacuna comercial**

	Anticuerpos anti-VIA	Anticuerpos anti-3AB1	
	Inmunodifusión	ELISA <sup>3</sup>	W.BLOT <sup>3</sup>
Pre-revacunación <sup>1</sup>	14/24*	0/24	0/24
Post-revacunación <sup>2</sup>	18/24	0/24	0/24

<sup>1</sup> Suero obtenido 15 días antes de la última revacunación.

<sup>2</sup> Suero obtenido 15 días después de la última revacunación.

\* Relación de sueros positivos vs. total de sueros analizados por cada método.

<sup>3</sup> Se utilizó como antígeno la proteína no estructural 3AB1 producida en células Sf9.

## 2. 6. Aplicación de los ensayos de ELISA y "Western blot" en el estudio de muestras de campo

Para confirmar la falta de especificidad del ensayo de inmunodifusión con el antígeno VIA, se analizaron muestras de animales seleccionados al azar y provenientes de una región de nuestro país donde la fiebre aftosa se encontraba en vías de erradicación. Estos sueros habían sido evaluados en un estudio seroepidemiológico realizado previamente (46). Se estudiaron sueros de animales jóvenes (entre 6 y 12 meses) vacunados una única vez o sin vacunar, y nacidos 18 meses después del último brote de fiebre aftosa informado por SENASA en dicha región. Los sueros fueron extraídos aproximadamente a los 4 meses post-vacunación. Los resultados se muestran en la tabla 2 y de los mismos se puede inferir que se detectaron anticuerpos anti-VIA en 19 animales, mientras que ninguno de los 42 bovinos estudiados desarrolló anticuerpos contra la proteína. La presencia de anticuerpos anti-VIA en estos bovinos puede atribuirse a la existencia de antígeno VIA residual en la vacuna utilizada. La posible incidencia de anticuerpos calostrales en los 19 animales que resultaron positivos a la prueba de VIA, se descarta pues dichos anticuerpos no se pueden detectar después de 4 meses en bovinos primovacunados (81).

**TABLA 2: Análisis de los anticuerpos anti-VIA y anti-3AB1 en sueros de bovinos procedentes de una región endémica**

	Anticuerpos anti-VIA	Anticuerpos anti-3AB1	
	Inmunodifusión	ELISA <sup>1</sup>	W. blot <sup>1</sup>
<b>sueros positivos / totales</b>	19/42	0/42	0/42

<sup>1</sup> Se utilizó como antígeno en estos ensayos la proteína no estructural 3AB1 producida en células Sf9.

Paralelamente, se evaluaron 72 sueros de animales que poseían anticuerpos anti-VIA, provenientes de la seroteca del SENASA. Los resultados obtenidos en estos ensayos se muestran en la tabla 3. Se detectaron anticuerpos anti-3AB1 en 39 de los 72 sueros estudiados por "Western blot" y en 38 de los 72 sueros ensayados por ELISA. La falta de reactividad de uno de los sueros en ELISA puede atribuirse a la menor sensibilidad de este ensayo con respecto al "Western blot". Estas observaciones permiten inferir que existe una correlación entre los dos métodos utilizados y confirman una vez más la baja especificidad de la prueba ID-VIA.

**TABLA 3: Análisis de los anticuerpos anti-3AB1 en sueros de bovinos positivos para la prueba ID-VIA**

	Anticuerpos anti-VIA	Anticuerpos anti-3AB1	
	Inmunodifusión	ELISA <sup>1</sup>	W. blot <sup>1</sup>
<b>sueros positivos/ totales</b>	<b>72/72</b>	<b>38/72</b>	<b>39/72</b>

<sup>1</sup> Se utilizó como antígeno la protelina no estructural 3AB1 producida en células Sf9.

## **2. 7. Detección de anticuerpos anti-3AB1 en sueros de bovinos portadores**

La importancia de la identificación de animales persistentemente infectados resulta de suma importancia debido a que los mismos, bajo determinadas circunstancias, pueden convertirse en portadores de la enfermedad como se mencionó en la introducción, sección 1.3. Con el propósito de estudiar la posibilidad de detectar anticuerpos anti-3AB1 en estadios muy tardíos de la infección (Tabla 4), se analizaron sueros de 8 animales que fueron infectados experimentalmente con  $10^4$  dosis bovinas infectantes (77).

**Tabla 4: Detección de anticuerpos anti-3AB1 por ELISA y "Western blot" en bovinos portadores**

DPI <sup>1</sup>	Anticuerpos anti-VIA	Anticuerpos anti-3AB1	
	Inmunodifusión	ELISA <sup>2</sup>	W. blot <sup>2</sup>
30	5/6 *	5/6	6/6
60	7/8	8/8	8/8
90	4/8	7/8	7/8
180	1/7	6/7	6/7
560	0/7	5/6	5/6

<sup>1</sup> Días post-infección.

<sup>2</sup> Se utilizó como antígeno la proteína no estructural 3AB1 producida en células Sf9.

\* Relación de sueros positivos vs. total de sueros analizados por cada método.

Se extrajeron muestras de suero a los 30, 60, 90, 180 y 560 días post-infección (77). A los 90 días post-infección, se hallaron anticuerpos anti-3AB1 en 7 bovinos mientras que en sólo 4 animales se detectaron anticuerpos anti-VIA por inmunodifusión (A. M. Sadir, comunicación personal). A los 560 dpi, 7 bovinos presentaban todavía anticuerpos anti-3AB1. Sin embargo no se hallaron anticuerpos anti-VIA en ninguno de ellos. La presencia de anticuerpos anti-3AB1 en sueros de animales persistentemente infectados se correlaciona con la detección de ARN del VFA en 5 de los 8 animales estudiados (77). De los resultados expuestos, se puede concluir que el diagnóstico en animales portadores, basado en la detección de anticuerpos anti-3AB1 por ELISA y "Western blot", es más sensible que la basada en la detección de anticuerpos anti-VIA por inmunodifusión.

# **DISCUSSION**

El éxito de las campañas contra las enfermedades endémicas se basa principalmente en la vacunación de todos los animales susceptibles y en un eficaz seguimiento epidemiológico. Durante el desarrollo de las mismas se cumplen las siguientes etapas: el control de la enfermedad y posteriormente la erradicación.

En relación a la fiebre aftosa, el país se halla en la fase de erradicación. El Plan Nacional de Erradicación identifica áreas de diferente nivel de riesgo y permite el análisis de la enfermedad en función de las características de cada una de ellas, regionalizando epidemiológicamente al país.

Desde abril de 1994 no se registran focos de fiebre aftosa y por lo tanto, Argentina será próximamente reconocida como país libre con vacunación.

Debido a las favorables condiciones sanitarias de la población ganadera, se proyecta en el corto plazo eliminar la vacunación. Para ello, es necesario contar con información fehaciente sobre el nivel de actividad viral en el campo.

La ausencia de focos de fiebre aftosa no implica que no exista circulación viral, tanto en animales productores de alimento como en animales salvajes. El conocimiento del nivel de actividad viral permitirá determinar el momento adecuado para suspender la vacunación como así también reforzar las campañas de vigilancia en las zonas epidemiológicas de mayor riesgo.

El virus aftoso se caracteriza por producir infecciones agudas y la respuesta inmune luego de la infección, es suficiente como para conferir protección a la cepa infectante por lapsos mayores a 2 años.

Sin embargo, diferentes autores han demostrado que en un porcentaje variable de animales se establecen infecciones persistentes. Estos animales se pueden convertir entonces en portadores, constituyendo un reservorio de virus y se sospecha que bajo ciertas circunstancias pueden desencadenar nuevos focos de la enfermedad. Asimismo, durante la replicación viral pueden producirse cambios en la virulencia (88) y generarse nuevas variantes genéticas (25, 31, 52, 56) diferentes a la cepa infectante original. En consecuencia, aún los animales vacunados se convierten en población susceptible a la infección.



Por las razones expuestas, resulta de gran importancia la identificación de animales infectados, incluyendo los animales vacunados en los que se produjo replicación viral pero sin manifestaciones clínicas de la enfermedad.

En el país se han utilizado dos métodos para detectar actividad viral: el aislamiento de virus de muestras de fluido esófago-faríngeo y la reacción de inmunodifusión radial que se basa en la detección de anticuerpos contra el antígeno VIA (ID-VIA).

Como se describió en la introducción, sección 3. 1, la irregularidad de la presencia de virus en fluido esófago-faríngeo y la falta de precisión al recoger las muestras, restan fiabilidad al aislamiento viral. Asimismo, se pueden obtener resultados falsos negativos debido a la inactivación del virus durante el muestreo y el traslado de las muestras hasta los laboratorios.

Por otra parte, la prueba ID-VIA, no sólo presenta baja sensibilidad y por lo tanto, es frecuente que un porcentaje considerable de animales infectados se presenten como negativos, sino que es poco específica para diferenciar animales vacunados de infectados, debido a la presencia de anticuerpos contra el antígeno VIA en sueros de bovinos vacunados y revacunados [ver resultados, sección 2.5; (4, 12, 20,65)]. Finalmente, la detección de anticuerpos anti-VIA no se correlaciona siempre con la recuperación de virus de fluido esófago-faríngeo (31, 59).

Debido a las limitaciones que presentan las dos metodologías mencionadas y con el objeto de encontrar algún marcador confiable de infección por VFA, algunos investigadores han dirigido sus esfuerzos al estudio de aquellas proteínas virales (proteínas no estructurales) que no inducen respuesta inmune frente a la vacunación.

Durante la replicación viral, se producen proteínas estructurales y no estructurales en cantidades equimoleculares. Los animales infectados están expuestos a todos los antígenos virales y por lo tanto desarrollan anticuerpos tanto contra las proteínas estructurales como contra las proteínas no estructurales. Por ejemplo, se pueden detectar anticuerpos anti-3ABC en cerdos 2 semanas post-

infección (74) y anticuerpos anti-2C en animales infectados y en portadores asintomáticos (48).

Los animales vacunados están únicamente expuestos a los antígenos virales presentes en las vacunas inactivadas, y por lo tanto presentan anticuerpos contra las proteínas de la cápside y el antígeno VIA (4, 20, 65).

Durante el desarrollo de este trabajo de Tesis, se expresó la proteína no estructural 3AB1 del VFA en dos sistemas de expresión diferentes con el objeto de utilizarla como antígeno en ensayos de ELISA y "Western blot".

En la etapa inicial, se clonó dicha proteína en el vector de expresión bacteriano pGEX-3X y se obtuvo la proteína de fusión GST-3AB1, la que se purificó por cromatografía de afinidad en columnas de glutatión agarosa.

Si bien los niveles de expresión de la proteína recombinante en la cepa BL21 de *E. coli* representaban aproximadamente el 15% del total de proteínas de la bacteria, el rendimiento obtenido después del proceso de purificación resultó bajo. Como se mencionó en el capítulo de resultados, sección 1.4., este fenómeno puede deberse a que la proteína GST-3AB1 queda retenida en la columna de glutatión agarosa y se eluye sólo parcialmente con el "buffer" que contiene glutatión reducido.

También se demostró que la purificación constituía un paso indispensable en la obtención del antígeno a utilizar en los ensayos de ELISA y "Western blot", debido a que los bovinos desarrollan naturalmente anticuerpos anti-*E. coli*, razón por la que tanto el suero de bovino infectado como el suero control (suero de bovino proveniente de la región patagónica libre de anticuerpos anti-VFA) reaccionan con otras proteínas bacterianas ( FIG. 11).

Con el propósito de superar estos inconvenientes y conocidas las ventajas del sistema de expresión baculovirus-células de insecto, descritas en forma detallada en la sección 2 del capítulo de resultados, se clonó y expresó la proteína no estructural 3AB1 en dicho sistema.

Los resultados obtenidos en esta segunda etapa, demostraron que aún cuando no se lograron los niveles de expresión esperados, el antígeno obtenido a

partir de células Sf9 infectadas podía utilizarse en el diagnóstico diferencial por "Western blot" sin ningún proceso de purificación. En contraste, para el test de ELISA fue necesario realizar una purificación parcial de la proteína 3AB1 pues se encontraron dificultades en la adsorción a las placas de los extractos que contenían detergentes.

La evaluación de la reactividad de las proteínas recombinantes obtenidas, se realizó con un panel de sueros de bovinos infectados en forma experimental, sueros de bovinos vacunados y sueros de bovinos libres de anticuerpos anti-VFA (controles negativos). Se demostró que sueros de bovinos infectados reconocieron tanto la proteína GST-3AB1 expresada en bacterias como la proteína recombinante 3AB1 expresada en células de insecto. Sueros de animales que nunca estuvieron en contacto con el VFA (FIG. 12, 15 y 24) y sueros de animales infectados con otros virus bovinos no reaccionaron con dichas proteínas. Estos resultados indican que la reacción resultó específica para los sueros de bovinos infectados.

La sensibilidad de los ensayos desarrollados se determinó empleando sueros de animales infectados experimentalmente, y se evaluó la posibilidad de detectar anticuerpos anti-3AB1 tanto en estadios muy tempranos como tardíos de infección.

Estudios realizados en 4 bovinos infectados experimentalmente, revelaron la presencia de anticuerpos anti-3AB1 a los 7 días post-infección. Como se mostró en la FIG. 16, todos los animales resultaron positivos para el ensayo de "Western blot". Sin embargo, no fue posible detectar anticuerpos anti-3AB1 en 1 de los 4 bovinos analizados mediante el test de ELISA (FIG. 15). La falta de reactividad de este suero puede deberse a que dicho ensayo no fue lo suficientemente sensible como para detectar los bajos niveles de anticuerpos presentes en estadios muy tempranos de la infección.

Teniendo en cuenta estas observaciones, se estudió la sensibilidad relativa del test de ELISA con respecto al "Western blot" en algunas muestras de sueros de bovinos infectados. Se comprobó que la reactividad de la proteína 3AB1 en "Western blot" fue retenida aún en diluciones de suero 1:12000 mientras que en el test de ELISA la reactividad se perdía en diluciones de suero superiores a 1:1500.

Estas observaciones mostraron que el “Western blot” resultó ser aproximadamente un orden más sensible que el test de ELISA y permiten explicar los resultados mencionados en párrafos previos.

Otros autores (12), paralelamente al desarrollo de este trabajo, arribaron a conclusiones similares a las expuestas, utilizando el test de inmunoelectrotransferencia asociado a enzimas (EITB). Detectaron anticuerpos en sueros de bovinos infectados, contra las proteínas no estructurales 3A, 3B, 3D, 2C y contra el precursor 3ABC a partir de los 7 días post-infección.

La capacidad de los ensayos de “Western blot” y ELISA para evaluar la presencia de anticuerpos anti-3AB1 en estadios muy tardíos de la infección, se estudió en animales persistentemente infectados en forma experimental. Los resultados se compararon con la detección de anticuerpos anti-VIA por el ensayo de inmunodifusión (ID-VIA), ya que este es el método actualmente utilizado en nuestro país. Se comprobó que a los 560 dpi, 7 de un total de 8 bovinos presentaban anticuerpos anti-3AB1 (Tabla 4).

Estas observaciones concuerdan con los datos reportados previamente por Bergman et al. (12), quienes hallaron anticuerpos contra las proteínas no estructurales hasta los 700 días post-infección, mediante el test EITB.

Por otra parte, no se detectaron anticuerpos anti-VIA en ninguno de los bovinos estudiados. Este descenso en el nivel de anticuerpos anti-VIA en función del tiempo post-infección fue descrito por algunos autores con anterioridad (12, 61), los que comprobaron la baja sensibilidad del ensayo ID-VIA después de los 6 meses post-infección.

Es importante destacar que la presencia de anticuerpos anti-3AB1 en sueros de animales persistentemente infectados no significa necesariamente que estos animales sean portadores. No obstante, en nuestros estudios la reactividad de los sueros contra la proteína 3AB1 se correlaciona con la detección de ARN del VFA realizada previamente en el laboratorio, en 5 de los 8 animales estudiados (77).

La inducción de anticuerpos anti-VIA en bovinos vacunados con vacunas comerciales fue sugerida por algunos autores (49, 61). La respuesta puede variar

en función del tipo de vacuna utilizada durante la inmunización. En general se detectan anticuerpos anti-VIA hasta los 60 días post-vacunación y hasta los 90 o 120 días post-revacunación.

Considerando estos antecedentes, resultó necesario estudiar si las vacunas también podían inducir anticuerpos anti-3AB1. Los resultados mostraron que bovinos libres de anticuerpos contra el virus (al comienzo de la experiencia) e inoculados hasta 12 veces con una vacuna comercial desarrollaron anticuerpos anti-VIA en el 75% de los casos, detectables al menos 6 meses después de la revacunación y no desarrollaron anticuerpos anti-3AB1 (Tabla 1).

Estas observaciones son muy semejantes a las reportadas por Bergmann et al. (12), quienes comprobaron la ausencia de anticuerpos contra las proteínas no estructurales (incluyendo la proteína 3D o antígeno VIA) en sueros de animales vacunados y revacunados tanto con vacunas experimentales como comerciales.

Por el contrario, Lubroth et al. (48), determinaron que aunque los sueros de animales vacunados no reaccionaban con las proteínas nativas 2C y 3ABC producidas en células BHK (aún después de 3 vacunaciones), se podían detectar anticuerpos contra el antígeno VIA luego de una única vacunación y a los 19 días post-infección. En consecuencia, considerando los hallazgos realizados por estos autores y los datos obtenidos en este trabajo, se puede inferir que la proteína no estructural 3AB1 es un indicador confiable de infección por VFA ya sea presente o previa.

Hasta el presente, sólo un grupo de investigadores (49), ha realizado experiencias tendientes a explicar la ausencia de anticuerpos contra las proteínas no estructurales en sueros de animales vacunados.

Estos autores investigaron en detalle las razones que permitirían explicar este fenómeno, focalizando sus estudios en la proteína 2C. Las hipótesis planteadas fueron las siguientes:

1. La proteína 2C podría ser degradada en el período de incubación asociado al crecimiento viral durante la elaboración de vacunas.

2. La proteína 2C podría inactivarse por la acción de la etilenimina binaria (BEI).
3. La proteína 2C se encontraría asociada a las membranas celulares y por lo tanto, no estaría presente en los sobrenadantes que contienen las partículas virales que son usualmente incluidos en las vacunas.

Mediante ensayos de inmunoprecipitación, demostraron que las dos primeras hipótesis eran poco probables debido a la presencia de la proteína 2C durante las 24 horas de incubación a 37°C y después de un período prolongado de contacto con el inactivante (BEI).

La tercera posibilidad fue evaluada por medio de la identificación de la proteína 2C tanto en la fracción de las partículas virales como en la de los detritos celulares. Comprobaron la ausencia de dicha proteína en los sobrenadantes de infección clarificados y además observaron que el tratamiento con detergentes de la fracción correspondiente a membranas, permitía la liberación de la proteína 2C. Por lo tanto, sugirieron que la proteína 2C, y en consecuencia también el precursor 3ABC, se encontrarían asociados a las membranas y no estarían presentes en la fracción que contiene las partículas virales durante el proceso de elaboración de vacunas. En contraste, la proteína 3D estaría asociada a esta fracción y sería entonces incluida en la vacuna, pudiendo inducir anticuerpos anti-VIA.

Las observaciones realizadas para la proteína 2C y el precursor 3ABC, pueden extenderse a la proteína 3AB1 y por lo tanto, la ausencia de anticuerpos anti-3AB1 en animales vacunados también podría ser explicada por la asociación de esta proteína a membranas y su remoción junto con la proteína 2C. Asimismo, no se puede descartar que tanto la proteína 3D como la proteína 3AB1 estén presentes en la vacuna, pero que podría producirse una degradación diferencial o una diferente presentación antigénica o ambos fenómenos, que determinarían que sólo se detectaran anticuerpos anti-VIA.

Hasta el momento, no se han reportado resultados que confirmen alguna de las hipótesis planteadas para explicar la ausencia de anticuerpos anti-3AB1 en animales vacunados.

La posibilidad de utilizar los ensayos de ELISA y "Western blot" desarrollados para el estudio de muestras de campo, también fue evaluada. Se emplearon sueros de animales entre 6 y 12 meses de edad, sin vacunar o que fueron vacunados una vez. Es importante aclarar que en la región en que se realizó este estudio, no se habían producido brotes de fiebre aftosa posteriores al nacimiento de los animales (46). Los resultados obtenidos mostraron que el 45 % de los animales poseía anticuerpos anti-VIA detectables por inmunodifusión mientras que ninguno poseía anticuerpos anti-3AB1 (Tabla 2). La presencia de anticuerpos anti-VIA en los bovinos vacunados puede atribuirse al antígeno VIA contenido en las vacunas comerciales utilizadas o a la existencia de anticuerpos maternos. Esta última posibilidad puede descartarse para nuestros estudios, dado que los bovinos evaluados eran mayores de 6 meses y los anticuerpos maternos son detectables sólo hasta los 120 días después del nacimiento (81). En consecuencia, es altamente probable que los anticuerpos anti-VIA hayan sido inducidos por las vacunas aplicadas.

Paralelamente, se evaluaron sueros de animales que poseían anticuerpos anti-VIA, provenientes de la seroteca del SENASA (Tabla 3). Se detectaron anticuerpos anti-3AB1 en el 54 % de los sueros estudiados por "Western blot" y en el 52 % de los sueros ensayados por ELISA. Los resultados mostraron que sólo un suero resultó negativo por ELISA y como ya se explicó en la sección 2.6 del capítulo de resultados, la falta de reactividad del mismo puede atribuirse a la menor sensibilidad de este ensayo con respecto al "Western blot". Estas observaciones permiten inferir que existe una correlación entre los dos métodos utilizados y confirman una vez más la baja especificidad de la prueba ID-VIA.

Por lo tanto, se puede concluir que el diagnóstico basado en la detección de anticuerpos anti-3AB1 puede realizarse mediante el ensayo de ELISA debido a la sencillez de este método para evaluar miles de muestras. No obstante, el "Western blot" debería utilizarse en la determinación de las muestras dudosas ( $DO=0,2-0,3$ ), debido a la mayor sensibilidad que presenta mismo con respecto al ELISA.

Aunque como ya se mencionó en párrafos previos, se ha demostrado la presencia del antígeno VIA en la fracción que contiene las partículas virales utilizada en la producción de vacunas, este marcador es aún ampliamente utilizado en el diagnóstico de la enfermedad y en estudios epidemiológicos. Asimismo, estudios previos (78) demostraron la existencia de un antígeno interno en las partículas virales inactivadas que induce la formación de anticuerpos anti-VIA y recientemente se comprobó que la proteína 3D forma parte de los viriones maduros (60).

Nuestros resultados, junto con los de otros investigadores (11, 12, 48, 74) y las evidencias mencionadas, sugieren fuertemente que la proteína 3AB1 constituye un marcador serológico muy confiable para la diferenciación entre animales vacunados e infectados con el VFA.

El uso de la proteína 3AB1 para el diagnóstico de fiebre aftosa, tiene múltiples ventajas. Esta proteína se produce en niveles aceptables en células de insecto Sf9 y puede utilizarse en "Western blot" sin ningún proceso de purificación. Otra ventaja muy importante es que su producción carece de riesgos, pues no requiere la manipulación de virus infeccioso.

Tanto el test de ELISA como el "Western blot", constituyen metodologías simples, rápidas y que permiten la evaluación de un alto número de sueros.

Aunque en este trabajo, se estudiaron únicamente sueros de bovinos, la proteína 3AB1 podría utilizarse en ensayos muy semejantes para el diagnóstico de fiebre aftosa en otras especies susceptibles. Esta actividad contribuiría a detectar la infección en animales que pueden actuar como reservorios naturales del virus.

Asimismo, como se demostró en la sección 2.6 del capítulo de resultados, estos métodos pueden aplicarse para el monitoreo de la actividad viral en el campo. Los resultados son muy promisorios pero sin embargo, la evaluación de un mayor número de muestras constituye un requerimiento indispensable para poder validar los dos ensayos basados en la detección de anticuerpos anti-3AB1.

Dado que la población ganadera argentina se encuentra en condiciones sanitarias favorables y por lo tanto, se proyecta eliminar la vacunación a corto plazo,



cobra importancia la certificación de regiones libres de fiebre aftosa. La utilización de la proteína 3AB1 en forma conjunta y paralela con otras técnicas basadas en la detección del genoma viral, contribuirían a establecer el "status" de las distintas regiones epidemiológicas de nuestro país.

# **CONCLUSIONES**

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo de Tesis permiten arribar a las siguientes conclusiones:

- 1) Tanto la proteína GST-3AB1 como la proteína 3AB1 producida en células Sf9, fueron reconocidas específicamente por sueros de bovinos infectados.
- 2) Los ensayos basados en la detección de anticuerpos anti-3AB1 pueden utilizarse para el diagnóstico de la fiebre aftosa en estadios muy tempranos o tardíos de la infección.
- 3) Los ensayos desarrollados resultaron más sensible en la identificación de animales persistentemente infectados que la utilización del antígeno VIA por inmunodifusión.
- 4) La ausencia de anticuerpos anti-3AB1 en bovinos vacunados y revacunados, indica que la proteína no estructural 3AB1 constituye un indicador muy confiable de infección presente o previa por VFA.
- 5) Los ensayos basados en la detección de anticuerpos anti-3AB1 también pueden utilizarse en el monitoreo de la actividad viral en el campo.
- 6) Dada la mayor sensibilidad del "Western blot" respecto del ELISA, pero conociendo la mayor sencillez de este método para el diagnóstico de miles

de sueros, se concluye que el diagnóstico diferencial debe basarse en el uso de la proteína 3AB1 en ELISA y las muestras dudosas deberían ser confirmadas por "Western blot".

Los resultados de este trabajo se han transferido al Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA) para su implementación.

Handwritten signature of E. H. Filiberto.

Handwritten signature.

# **BIBLIOGRAFIA**

1. Acharya R, Fry E, Stuart D, Fox G, Rowlands D, Brown F (1989) The three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2,9 A° resolution. *Nature* 337, 709-716.
2. Alonso-Fernandez A, Vianna Filho YL, Durini LAE, Suttmoller P (1981) Foot-and-mouth disease viruses used in vaccine production and control in South America. *Bol Cent Panam Fiebre Aftosa* 43-44: 21-28.
3. Alonso-Fernandez A, Sondahl MS, Giacometti H, Ferreira MEV (1984) Identificación de anticuerpos VIA de la fiebre aftosa. Serie de Manuales Técnicos N°6. Cent Panam de Fiebre Aftosa. Rio de Janeiro. OPS/OMS.
4. Alonso-Fernandez A, Gomes I, Bahnemann HG (1988) The induction of antibodies against VIAA in cattle vaccinated and revaccinated with inactivated foot-and-mouth disease vaccine. *Bol Cent Panam Fiebre Aftosa* 54: 53-54.
5. Alonso-Fernandez A, Gomes MPD, Martins MA, Sondahl MS (1990) Detection of foot-and-mouth disease virus infection-associated antigen antibodies: comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay and agar gel immunodiffusion tests. *Prev Vet Med* 9, 233-240.
6. Archetti IL, Amadori M, Donn A, Salt J, Lodetti E (1995) Detection of foot-and-mouth disease virus-infected cattle by assessment of antibody response in oropharyngeal fluids. *J Clin Microb* 33 N° 1, 79-84.
7. Bachrach HL (1968) Foot-and-mouth disease virus. *Annu Rev Microbiol* 22: 201-244.

8. Bahnemann HG (1975) Binary ethylenimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production. *Arch. Virol.* 47: 47-56.
9. 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* 63, 2143-2151.
10. Belsham GJ (1992) Dual initiation sites of protein synthesis on foot-and-mouth disease virus RNA are selected following internal entry and scanning of ribosomes in vivo. *EMBO J* 11, 1105-1105.
11. Berger HG, Straub OC, Ahl R, Tesar M, Marquardt O (1990) Identification of foot-and-mouth disease virus replication in vaccinated cattle by antibodies to nonstructural virus proteins. *Vaccine* 8: 213-216.
12. Bergmann I, De Mello PA, Neitzert E, Beck E, Gomes I (1993) Diagnosis of persistent aphtovirus infection and its differentiation from vaccination response by enzyme-linked immunoelectrotransfer blot analysis with bioengineered nonstructural viral antigens. *Am J Vet Res* 54: 825-831.
13. Bittle JL, Houghten RA, Alexander H, Shinnick TM, Sutliff JG, Lerner RA, Rowlands DJ, Brown F (1982) Protection against foot-and-mouth disease by immunization with chemically synthesized peptide predicted from the nucleotide sequence. *Nature (London)* 298, 30-33.
14. Broekhuijsen M, van Rijn J, Blom T, Pouwels P, Enger Valk B, Brown F, Francis M (1987) Fusion proteins with multiple copies of the major antigenic determinant of foot-and-mouth disease virus protect both the natural host and laboratory animals. *J Gen Virol* 68: 3137-3143.

15. Burrows R, Mann J A, Garland AJ, Greig A, Goodridge D (1981) The pathogenesis of natural and simulated natural foot-and-mouth disease infection in cattle. *J Comp Pathol* 9: 599-609.
16. Carrillo E, Giachetti C, Campos R (1984) Effect of lysosomotropic agents on the natural foot-and-mouth disease virus replication. *Virology* 135: 542-545.
17. Clarke BE, Newton SE, Carroll AR, Francis MJ, Appleyard G, Syred AD, Highfield PE, Rowlands DJ, Brown F (1987) Improved immunogenicity of a peptide epitope after fusion to hepatitis B core protein. *Nature (London)* 330: 381-384.
18. Chartejee NK, Bachrach HL, Polatnik J (1976) Foot-and-mouth disease virus RNA, presence of 3' terminal polyriboadenilic acid and absence of amino acid binding ability. *Virology* 69: 369-377.
19. Cowan KM, Graves JH (1966) A third antigenic component associated with foot-and-mouth disease infection. *Virology* 30: 528-540.
20. Dawe PS, Pinto AA (1978) Antibody responses to type-specific and "virus-infection-associated" antigens in cattle vaccinated with inactivated polyvalent foot-and-mouth disease virus in North Malawi. *Br Vet J* 134: 504-511.
21. Diez J, Davila M, Escarmis C, Mateu MG, Dominguez J, Perez JJ, Giralt E, Melero JA, Domingo E (1990) Unique aminoacid substitutions in the capsid proteins of foot-and-mouth disease virus from a persistent infection in cell culture. *J Virol* 64: 5519-5528.



22. Di Marchi R, Brooke G, Gale C, Cracknell V, Doel T, Mowat N (1986) Protection of cattle against foot-and-mouth disease by synthetic peptide. *Science* 232, 639-641.
23. Donn A, Martin LA, Donaldson AI (1994) Improved detection of persistent foot-and-mouth disease infection in cattle by the polymerase chain reaction. *J Virol Meth* 49: 179-186.
24. Fagg R, Hyslop N (1966) Isolation of variant strains of foot-and-mouth disease virus (type O) during passage in partly immunized cattle. *J Hyg* 64: 397-402.
25. Feigelstock D, Mateu MG, Piccone ME, De Simone F, Brochi E, Domingo E, Palma E (1992) Extensive antigenic diversification of foot-and-mouth disease virus by aminoacid substitutions outside the major antigenic site. *J Gen Virol* 73: 3307-3311.
26. Fox G, Stuart D, Acharya RK, Fry E, Rowlands D, Brown F (1987) Crystallisation and preliminary X-ray diffraction analysis of foot-and-mouth disease virus. *J Mol Biol* 196: 591-597.
27. Forss S, Strebel K, Beck E, Schaller H (1984) Nucleotide sequence and genome organization of foot-and-mouth disease virus. *Nucleic Acids Res* 12: 6587-6601.
28. Fracastorius, H (1546) *De contagione et contagiosis morbis et curatione*, Bk1, Chap. 12, Venezia.
29. Frenkel SH (1951) Research on foot-and-mouth disease II. The cultivation of the virus on a practical scale in explantations of bovine tongue epithelium. *Am J Vet. Res* 12: 187-199.

30. Fry E, Logan D, Acharya R, Fox G, Rowlands D, Brown F, Stuart D (1990) Architecture and topology of an aphtovirus. *Sem Virol* 1: 439-451.
31. Gebauer F, De La Torre JC, Gomes I, Mateu MG, Barohona H, Tiraboschi B, Bergmann I, De Mello PA, 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.
32. Giavedoni LD, Kaplan G, Marcovecchio F, Piccone ME, Palma EL (1991) Protection conferred by TRpE fusion proteins containing portions of the C terminal region of capsid protein VP1 of foot-and-mouth disease virus. *J G Virol* 72, 967-971.
33. Grubman MJ (1980) The 5' end of foot-and-mouth disease virion RNA contains a protein covalently linked to the nucleotide pUp. *Arch Virol* 63: 311-315.
34. Grubman MJ, Lewis SA, Morgan DO (1993) Protection of swine against foot-and-mouth disease with viral capsid proteins expressed in heterologous systems. *Vaccine* 11: 825-829.
35. Gruenwald S, Heitz J (1993) *Baculovirus Expression Vector System: Procedures and Methods Manual*, 2nd edn Pharmingen, San Diego.
36. Harris KS, UT C, Wimmer H, Wimmer E (1990) Proteolytic processing in the replication of picornaviruses. *Sem Virol* 1, 325-333.
37. Hogle JM, Chow M, Fildman DJ (1985) Three dimensional structure of poliovirus at 2,9 Å resolution. *Science* 229 : 1358-1365.

38. House C, House JA (1989) Evaluation of techniques to demonstrate foot-and-mouth disease virus in bovine tongue epithelium : comparison of the sensitivity of cattle, mice, primary cell cultures, cryopreserved cell cultures and establish cell lines. *Vet Microb* 20, 99-109.
39. House C, Meyer RF (1993) The detection of foot-and-mouth disease virus in oesophagealpharyngeal samples by a polymerase chain reaction technique. *J Virol Meth* 43, 1-6.
40. Innis MA, Gelfland DH, Sninsky JJ, White TJ (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, Inc, San Diego.
41. King AMQ, Underwood BO, McCahon D, Newman JWl, Brown F (1981) Biochemical identification of viruses causing the 1981 outbreaks of foot-and-mouth disease in the UK. *Nature* 293: 479-485.
42. Kit S, Kit M, DiMarchi R, Little SP, Gale C (1991) Modified-live infectious bovine rhinotracheitis virus vaccine expressing monomer and dimer forms of foot-and-mouth disease capsid protein epitopes on surface of hybrid virus particles. *Arch Virol* 120: 1-17.
43. Kitson JDA, 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: 26-33.
44. Kleid DG, Yansura D, Small B, Dowbwnko D, Moore DM, Grubman MJ, McKercher PD, Morgan DO, Robertson BH, Bachrach HL (1981) Cloned viral protein vaccine for foot-and-mouth disease: responses in cattle and swine. *Science* 214: 1125-1129.

45. Lea S, Hernandez J, Blakemore W, Broccho E, Curry S, Domingo E, Fry E, Abu-Ghazaleh R, King A, Newman J, Stuart D, Mateu MG (1994) The structure and antigenicity of a type C foot-and-mouth disease virus. *Structure* 2 : 123-139.
46. Leon EA, Duffy SJ, Corbellini CN, Fondevila N, O'Donnell V, Uriona C, Spinelli CA, Yanarella F, Schudel AA (1994) Foot-and-mouth disease: viral activity and population immunity in Navarro, Lobos and Suipacha counties. *Veterinaria Argentina* 11 N° 3: 177-191.
47. Lewis SA, Morgan DO, Grubman MJ (1992) Expression, processing, and assembly of foot-and-mouth disease virus capsid structures in heterologous systems: induction of neutralizing antibody response in guinea pigs. *J Virol* 65: 6572-6580.
48. Lubroth J, Brown F (1995) Identification of native foot-and-mouth disease virus non-structural protein 2C as a serological indicator to differentiate infected from vaccinated animals. *Res Vet Sci* 59: 70-78.
49. Lubroth J, Grubman MJ, Burrage TG, Newman JFE, Brown F (1996) Absence of protein 2C from clarified FMDV vaccines provides the basis for distinguishing convalescent from vaccinated animals. *Vaccine* 14 N° 5: 419-427.
50. Lucas-Lenard JM (1979) "The molecular biology of picornaviruses". p. 73. Perez-Bercoff, Cambridge University Press, New York.
51. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1989) *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*, 2nd edn, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
52. Malirat V, Augé de Mello P, Tiraboschi B, Beck B, Gomes I, Bergmann IE (1994) Genetic variation foot-and-mouth disease virus during persistent infection in

cattle. Virus Res 34: 31-48.

53. Marquardt O, Straub OC, Ahl R, Haas B (1995) Detection of foot-and-mouth disease virus in nasal swabs of asymptomatic cattle by RT-PCR within 24 hours. J Virol Meth 53, 255-261.
54. Mason PW, Rieder E, Baxt B (1994) RGD sequence of natural foot-and-mouth disease virus is essential for infecting cells via the natural receptor but can be bypassed by antibody-dependent enhancement pathway. Proc Natl Acad Sci 91, 1932-1936.
55. Mateu MG, Martinez MA, Rocha E, Andreu D, Parejo J, Gilart E, Sobrino F, Domingo E (1989) Implications of a quasispecies genome structure: effect of frequent, naturally occurring aminoacid substitutions on the antigenicity of foot-and-mouth disease virus. Proc Natl Acad Sci 86, 5883-5887.
56. Mateu MG, Hernandez J, Martinez MA, Feigelstock D, Lea S, Perez JJ, Giralt E, Stuart D, Palma E, Domingo E (1994) Antigenic heterogeneity of 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.
57. Meyer RF, Brown CC, House C, House JA, Molitor TW (1991) Rapid and sensitive detection of foot-and-mouth disease virus in tissues by enzymatic RNA amplification of the polymerase gene. J Virol Meth 34, 161-172.
58. Mowat GN, Chapman WG (1962) Growth of foot-and-mouth disease virus in fibroblastic cell line derived from hamster kidneys. Nature 194: 253-257.
59. Neitzert E, Beck E, De Mello PA, Gomes I, 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 infection. *Virology* 184: 799-804.

60. Newman JF, Piatti PG, Gorman BM, Burrage TG, Ryan MD, Flint M, Brown F (1994) Foot-and-mouth disease virus particles contain replicase protein 3D. *PNAS, USA* 91: 733-737.
61. O'Donnell VK, Boyle DB, Sproat K, Fondevila NA, Forman A, Schudel AA, Smitsaart EN (1996) Detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus using a liquid-phase blocking sandwich ELISA (LPBE) with a bioengineered 3D protein. *J Vet Diagn Invest* 8, 143-150.
62. O'Reilly DR, Miller LK, Luckow VA (1992) *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*, W. H. Freeman and Company, New York.
63. Parry NR, Ouldrige EJ, Barnett PV, Rowlands DJ, Brown F (1989) Neutralizing epitopes of type O foot-and-mouth disease virus II. Mapping the three conformational sites with synthetic peptide reagents. *J Gen Virol* 70: 1493-1499.
64. Pffaf 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.
65. Pinto AA, Garland AJ (1979) Immune response to virus-infection-associated (VIA) antigen in cattle repeatedly vaccinated with foot-and-mouth disease virus inactivated by formalin or acetyleneimine. *J Hyg* 82: 41-50.
66. Porter AG, Fellner P, Black D, Rowlands D, Harris TJ, Brown F (1978) 3' Terminal nucleotide sequences in the genome RNA of picornaviruses. *Nature* 276: 298-301.

67. Porter AG. (1993) Picornavirus nonstructural proteins: emerging roles in virus replication and inhibition of host cell functions. *J Virol* 67: 6917-6921.
68. Prato Murphy ML, Meyer RF, Mebus C, Schudel AA, Rodriguez M (1994) Analysis of sites of foot-and-mouth disease virus persistence in carrier cattle via the polymerase chain reaction. *Arch Virol* 136: 299-307.
69. Radlett PJ, Pay TWF, Garland AJM (1985) The use of BHK suspension cells for the commercial production of foot-and-mouth disease vaccines over a twenty year period. *Dev Biol Stand* 60: 163-170.
70. Rieder E, Bunch T, Brown F, Mason PW. (1993) Genetically engineered foot-and-mouth disease virus with poly(C) tracts of two nucleotides are virulent in mice. *J Virol* 67: 5139-5145.
71. Rivenson S, Sadir AM, Gaggino OP, Marcovecchio FE, Zabal O, Laporte O (1982) estudio comparativo en bovinos de dos vacunas antiaftosa : oleosa e hidroxisaponinada. *Rev Med (Buenos Aires)* 63 : 364-370.
72. Robertson BH, Grubman MJ, Weddell GN, Moore DM, Welsh JD, Fischer T, Dowbenko D, Yansura D, Small B, Kleid DG (1985) Nucleotide and aminoacid sequence coding for polypeptides of foot-and-mouth disease virus type A12. *J Virol* 54, 651-660.
73. Rodríguez A, Martínez-Salas E, Dopazo J, Dávila M, Sáiz JC, Sobrino F (1992) Primer design for specific diagnosis by PCR of highly variable RNA viruses: typing of foot-and-mouth disease virus. *Virology* 189 : 363-367.
74. Rodríguez A, Dopazo J, Saiz JC, Sobrino F (1994) Immunogenicity of non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus: differences between infected

- and vaccinated swine. Arch Virol 136: 123-131.
75. Rodríguez A, Nuñez JI, Nolasco G, Ponz F, Sobrino F, de Blas C (1994) Direct PCR detection of foot-and-mouth disease virus. J Virol Meth 47, 345-349.
76. Roosien J, Belsham GJ, Ryan MD, King AMQ, Vlak JM (1990) Synthesis of foot-and-mouth disease virus capsid proteins in insect cells using baculovirus expression vectors. J Gen Virol 71 : 1703-1711.
77. Rossi MS, Sadir AM, Schudel AA, Palma E (1988) Detection of foot-and-mouth disease virus with DNA probes in bovine oesophageal-pharyngeal fluids. Arch Virol 99: 67-74.
78. Rowlands DJ, Cartwright B, Brown F (1969) Evidence for an internal antigen in foot-and-mouth disease virus. J Gen Virol 4: 479-487.
79. Saiz JC, Gonzalez MJ, Borca MV, Sobrino F, 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, 2518-2525.
80. Saiz JC, Cairo J, Medina M, Zuidema D, Abrams C, Belsham GJ, Domingo E, Vlak JM (1994) Unprocessed foot-and-mouth disease virus capsid precursor displays discontinuous epitopes involved in viral neutralization. J Virol 68 : 4557-4564.
81. Sadir AM, Schudel AA, Laporte O (1988) Response to foot-and-mouth disease vaccines in new-born calves. Influence of age, colostral antibodies and adjuvants. Epidem Inf 100: 135-144.



82. Salt JS (1993) The carrier state in foot-and-mouth disease: an immunological review. *Br Vet J* 149: 207-223.
83. Sangar DV, Rowlands DT, Harris TJR, Brown F (1977) A protein covalently linked to foot-and-mouth disease virus RNA. *Nature (London)* 268, 648-650.
84. Sangar DV (1979) The replication of picornaviruses. *J Gen Virol* 45, 1-13.
85. Shahan M (1962) The virus of foot-and-mouth disease. *Ann N Y Acad Scie* 101: 444-453.
86. Smith DB, Johnson KS (1988) Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusion with glutathione-S-transferase. *Gene* 67: 31-40.
87. Strohmaier L (1967) Virus concentration by ultracentrifugation. *Meth Virol* 3: 45-49.
88. Sutmoller P, Gaggero CA (1965) Foot-and-mouth disease carriers. *Vet Rec* 77: 968-969.
89. Sutmoller P, Cottral GE (1967) Improved techniques for the detection of foot-and-mouth disease virus in carrier cattle. *Arch Ges Virusforsch* 29: 113-126.
90. Sutula CL, Gillett JM, Morrissey SM, Ramsdell DC (1986) Interpreting ELISA data and establishing the positive-negative threshold. *Plant Dis* 70 N° 8: 722-726.
91. Tesar M, Berger HG, Marquardt O (1989) Serological probes for some foot-and-mouth disease virus nonstructural proteins. *Virus Genes* 3: 29-44.

92. Thomas A, Wootmeijer P, Puijk W, Bartelling S (1988) Antigenic sites on foot-and-mouth disease virus type A10. *J Virol* 62: 2782-2789.
93. Thomson GR (1996) La función de los animales portadores en la transmisión de la fiebre aftosa en 64ª Sesión General de la Organización Mundial de Sanidad Animal.
94. Vasquez C, Palma E, Barrantes J (1972) Foot-and-mouth disease virus 1. Capsid fine structure. *J Microsc* 14, 147-154.
95. Villinger F, Mueller HK, Bruckner L, Ackermann M, Kihm U (1989) Antibodies against foot-and-mouth disease virus infection associated (VIA) antigen: use of a bioengineered VIA protein as antigen in an ELISA. *Vet Microb* 20: 253-246.
96. Wagner GG, Card JI, Cowan KM (1970) Immunochemical studies of foot-and-mouth disease virus. VII. Characterization of foot-and-mouth disease virus concentrated by poliethylenglicol precipitation. *Arch Ges Virusforsch* 30 : 343-350.
97. Woodbury EL (1995) A review of the possible mechanisms for the persistence of foot-and-mouth disease virus. *Epidemiol Infect* 114, 1-13.
98. Zibert A, Maass G, Strebel K, Falk MM, Beck E (1990) Infectious foot-and-mouth disease virus derived from a cloned full-length cDNA. *J Virol* 64: 2467-2473.