

Tesis de Posgrado

Diferenciación de animales vacunados de infectados por el virus de la fiebre aftosa por métodos serológicos

O'Donnell, Vivian K.

1998

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

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

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

Cita tipo APA:

O'Donnell, Vivian K.. (1998). Diferenciación de animales vacunados de infectados por el virus de la fiebre aftosa por métodos serológicos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3098_ODonnell.pdf

Cita tipo Chicago:

O'Donnell, Vivian K.. "Diferenciación de animales vacunados de infectados por el virus de la fiebre aftosa por métodos serológicos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1998.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3098_ODonnell.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**“DIFERENCIACION DE ANIMALES VACUNADOS DE INFECTADOS
POR EL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA
POR METODOS SEROLOGICOS”**

**Trabajo de tesis para optar al grado de Doctor de la
Universidad de Buenos Aires**

Autor: Lic. Vivian K. O'DONNELL

Director: Dr. Alejandro A. SCHUDEL

**Instituto de Virología
Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Castelar, Buenos Aires**

1998

Nº 3 098 1
3098

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**“DIFFERENTIATION BETWEEN INFECTED AND VACCINATED
ANIMALS WITH FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS
BY SEROLOGICAL METHODS”**

**Thesis presented to the Sciences Faculty in order to obtain the PhD degree
from de University of Buenos Aires**

Author: Lic. Vivian K. O'DONNELL

Director: Dr. Alejandro A. SCHUDEL

**Instituto de Virología
Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Castelar, Buenos Aires**

1998

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer especialmente a:

“La Gorda”.

Juano; Carol, Pato y Willie; Finita, Agus y Franchu.

Tony Forman, Susan Friend y Cathy Forman.

Dr. A.A. Schudel.

Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires.

Dr. Leonardo Fainboim del Hospital de Clínicas.

Eliana Smitsaart; Irene Lager, Norberto Fondevila, Laura Weber, Ana Sadir, Betty y Tessie.

Sergio Duffy, Emilio León y Jorge Miquet.

Dr. David Boyle, Paula Stiles, Krissanne Gladman, Tony Pay, Matthew Stevens, Matthew Smith, Adam Foord, MaryAnn Anderson, Hans Heine de CSIRO - AAHL, Australia.

Marta, Juani, Antuan, Florentino.

María Rosa Leunda y Ernesto Späth de INTA - Balcarce.

Bibiana Cetra, Graciela Draghi y Carlos Soni de INTA - Mercedes, Corrientes.

Dra. E. Damonte; Dr. Massou.

Ana K., Mariana P. M., Diego, Andrés, Alejandra R., Patricia y Mariano.

David Mackay de Pirbright, UK.

International Foundation of Sciences.

Fundación Crawford, Australia.

Osvaldo, Estela, Teresa y Daniel.

Claudia y Sandra, Eva y Perla, Marcela, Stella y Claudia S.

Delia Fernandez y Jorge Dillon del Ministerio de la Prov. de Buenos Aires.

Abraham Falcksuk y Eduardo Maradei de SENASA.

Dr. J. Casal.

Carlos Blanco y Laura Marangunich.

A mis mejores amigas Mary y Mercedes, a “La Tía” y a Julio, a mi Padre.

A la memoria de Leo Satz y Marcos Rodríguez.

Y a todos los bovinos, ovinos, porcinos, cobayos, conejos, que dieron su sangre para que esta tesis se pueda realizar.

A todos muchas gracias.

Good on you mates!!

INDICE

RESUMEN	i
RESUMEN EN INGLES (ABSTRACT)	iii
ABREVIATURAS	vi
I.- INTRODUCCION	1
1- La Fiebre Aftosa	1
1.1- Signos Clínicos	2
1.2- Patogenia y Transmisión	3
1.3- Estado Portador o "Carrier"	4
2- Distribución Mundial de la Fiebre Aftosa	6
2.1- Ocurrencia de Fiebre Aftosa en Argentina	8
3- La Prevención de la Fiebre Aftosa	16
3.1- Vacunas contra Fiebre Aftosa	16
4- Virus de la Fiebre Aftosa	19
4.1.- Características de los Picornavirus	19
4.2.- Biología del Virus de la Fiebre Aftosa	21
4.2.1- La Partícula Viral	21
4.2.2- Estructura del genoma del VFA	24
4.2.3- Ciclo de replicación del VFA	29
5- Respuesta Inmune	30
6- Diagnóstico de Fiebre Aftosa	32
6.1- Detección del Virus de la Fiebre Aftosa	33
6.1.1- Aislamiento viral	33
6.1.2- Fijación de Complemento y ELISA	34
6.2- Detección del Genoma del virus de la Fiebre Aftosa	34
6.3- Detección de anticuerpos contra el virus de la Fiebre Aftosa	35

6.3.1- Detección de anticuerpos contra Proteínas Estructurales del virus de la Fiebre Aftosa	35
6.3.2- Detección de anticuerpos contra Proteínas no Estructurales del virus de la Fiebre Aftosa	36
II.- OBJETIVOS	42
III.- MATERIALES Y METODOS	43
1- Expresión de la proteína 3D en <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) como sistema de expresión	43
1.1- Transformación de <i>E. coli</i> con pKSO1	45
1.2- Inducción de la expresión y purificación de la proteína de fusión GST-3D	46
2- Detección de anticuerpos contra la proteína no estructural 3D del VFA	47
2.1- ELISA-3D	47
2.2- Diseño de las placas ELISA-3D	49
3- Expresión de la proteína de fusión GST-2C en <i>E. coli</i> como sistema de expresión.	52
3.1- Secuenciación del DNA	54
3.2- Transformación de <i>E. coli</i> con pMF4	54
3.3- Inducción de la expresión y purificación de la proteína GST-2C en <i>E. coli</i>	55
4- “Western blot”	57
4.1- Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	57
4.2- Electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa	57
5- Métodos serológicos comparativos	58
5.1- Antígeno asociado a la infección viral (Ag VIA)	58
5.2- ELISA - VIA	58
5.3- Inmunodifusión en Agar Gel	58

5.4- Detección de anticuerpos tipo específicos contra el VFA	59
5.4.1- ELISA en Fase - Líquida	59
5.5- Detección de anticuerpos contra las PNE Lb y 3A del VFA por “Western blot”	60
6- Muestras de suero	60
7- Diseño Experimental	60
7.1- Desarrollo del método de ELISA en fase-líquida, utilizando como antígeno la proteína no estructural GST-3D del virus de la Fiebre Aftosa	60
7.1.1- Determinación del punto de corte	60
7.1.2- Estudio de especificidad	61
7.1.3- Estudio de sensibilidad	61
7.1.4- Estudio de reproducibilidad	62
7.2- Evaluación y validación del método de ELISA-3D con sueros categorizados. Comparación con el método de IDAG	62
7.2.1- Cinética de Ac contra la proteína 3D durante el estado agudo y convaleciente de la infección	62
7.2.2- Detección de Ac contra 3D por ELISA y contra el Ag VIA por IDAG, en sueros de bovinos infectados en estadios tardíos de la infección persistente	63
7.2.3- Respuesta de Ac post-vacunación contra la proteína 3D en animales vírgenes	63
7.3- Aplicación del método de ELISA-3D en estudios a campo	63
7.3.1- Ensayo en terneros	64
7.3.1.1- Vacunación	64
7.3.1.2- Muestras de líquido esófago - faríngeo	65
7.3.1.3- Aislamiento Viroológico	65
7.3.2- Ensayo en bovinos mayores de 2 años	66
7.3.2.1- Vacunación	66
7.3.3- Estudio de la actividad viral en tres partidos de la Provincia de Buenos Aires	67

8- Desarrollo del método de “Western blot” para la detección de Ac contra las PNE GST-3A, GST-2C y GST-Lb del VFA	68
8.1- Evaluación de la PNE GST-2C del VFA utilizando el método de "Western blot"	68
8.1.1- Estudio de especificidad	69
8.1.2- Cinética de Ac contra la proteína 2C durante el estado agudo y convaleciente de la infección	69
8.1.3- Inducción de Ac postvacunación contra la proteína 2C en animales vírgenes	69
9- Análisis estadísticos	70
 IV.- RESULTADOS	 71
1- Expresión de la proteína GST-3D en <i>E. coli</i> como sistema de expresión	71
2- Desarrollo del método de ELISA-3D	73
2.1- Optimización de los reactivos	73
2.2- Determinación del punto de corte. Distribución de frecuencias de títulos por ELISA-3D en sueros negativos	73
2.3- Estudio de especificidad	76
2.4- Estudio de sensibilidad	78
2.5- Estudio de reproducibilidad	80
3- Evaluación del método de ELISA-3D con sueros categorizados (animales infectados y animales vacunados). Comparación con la técnica de IDAG.	81
3.1- Cinética de Ac contra la proteína 3D durante el estado agudo y convaleciente de la infección.	81
3.2- Detección de Ac contra 3D por ELISA y contra el Ag VIA por IDAG, en sueros de bovinos infectados en estadios tardíos de la infección persistente	85

3.3- Respuesta de Ac post-vacunación contra la proteína 3D en animales vírgenes	90
3.4- Aplicación del método de ELISA-3D en estudios a campo	92
3.4.1- Ensayo en terneros	92
3.4.2- Ensayo en bovinos mayores de 2 años	98
3.4.3- Estudio de la actividad viral en tres partidos de la Provincia de Buenos Aires	101
4- Desarrollo del método de “Western blot” para la detección de anticuerpos contra las PNE GST-2C, GST-3A y GST-Lb del VFA	105
4.1- Desarrollo del antígeno GST-2C biosintético	105
4.1.1- Secuenciación del DNA	105
4.1.2- Transformación de <i>E.coli</i> con pMF4	105
4.1.3- Inducción de la expresión y Purificación de GST-2C en <i>E. coli</i>	106
4.2- Optimización del método de "Western blot".	110
4.3- Detección de anticuerpos contra las proteínas GST-2C, GST-3A y GST-Lb del VFA	111
4.4- Evaluación de la proteína GST-2C con sueros categorizados. Comparación con los métodos de ELISA-3D e IDAG	119
4.3.1- Sueros de zona libre de Fiebre Aftosa	119
4.3.2- Sueros de animales experimentalmente infectados	119
4.3.3- Sueros de animales vacunados.	125
V.- DISCUSION	128
VI.- CONCLUSIONES	150
VII.- BIBLIOGRAFIA	152
VIII.- APENDICE	172

RESUMEN

El virus de la Fiebre Aftosa (VFA), un Aftovirus de la familia *Picornaviridae*, es el agente causal de una enfermedad altamente contagiosa y de tremenda importancia económica, que afecta al ganado de pezuña hendida. La diferenciación entre animales infectados y vacunados así como la detección de animales portadores del virus o “carriers” es esencial para evaluar la efectividad de campañas de control y erradicación.

La detección de anticuerpos (Ac) contra un antígeno (Ag) no estructural asociado con la replicación del virus, el Ag Asociado a la Infección Viral (Ag VIA), cuyo componente principal es la ARN polimerasa o proteína 3D, altamente conservada entre los diferentes serotipos, ha sido una herramienta útil para monitorear programas de control y erradicación, como un indicador indirecto para la evaluación de la actividad viral a nivel poblacional. Es conocido que vacunas inactivadas contra el VFA pueden inducir Ac contra el Ag VIA, si bien los niveles de estos Ac son muy bajos y su permanencia mas corta que en animales infectados. Esta respuesta transitoria y variable se atribuye a la presencia de restos de la polimerasa viral en el Ag vacunal, el cual sería antigénico y resultaría en la producción de Ac contra el Ag VIA.

El método más ampliamente utilizado para medir Ac contra el Ag VIA es la Inmunodifusión en Agar Gel (IDAG). Este método es simple de realizar, pero su baja sensibilidad y el uso de un Ag parcialmente purificado derivado de cultivos infectados con el virus, llevó al desarrollo de otras metodologías.

Con el objeto de sobrellevar estos inconvenientes, se desarrollaron ensayos inmunológicos capaces de detectar Ac contra proteínas no estructurales del VFA, para la identificación de animales infectados con el virus.

Las proteínas no estructurales, 3D y 2C, se expresaron en *Escherichia coli*, como proteínas de fusión a glutathion-S-transferasa (GST).

Se desarrolló un método de ELISA en fase-líquida (ELISA-3D) capaz de detectar Ac específicos contra la proteína 3D o RNA polimerasa del VFA. El ELISA-3D, fue capaz de detectar Ac contra la proteína 3D en suero de bovinos luego de una infección natural o experimental, desde los 5 días postinfección (dpi) hasta los 565 dpi, mientras que sueros de bovinos provenientes de zona libre de Fiebre Aftosa, así como sueros de referencia de bovinos

y porcinos infectados con diferentes virus ARN y ADN, fueron negativos, resultando en una especificidad del 100%. Los resultados de la comparación del ELISA-3D con la técnica de IDAG y con un ELISA-VIA descrito previamente (Alonso y col., 1990), los que utilizan el Ag VIA semipurificado, mostraron que el ELISA-3D es altamente sensible (95.2 %), específico (100%) y reproducible (C.V. 2.75 %). Los ensayos en sueros de animales vacunados, mostraron una respuesta transitoria de Ac inducida por algunas vacunas.

La evaluación del método de “Western blot” utilizando como Ag la proteína no estructural 2C, mostró una reacción positiva cuando se analizaron sueros de bovinos infectados, mientras que sueros de bovinos de zona libre no mostraron ninguna reactividad. El estudio de sueros de bovinos vacunados mostró 1/79 sueros con reactividad positiva para Ac contra 2C.

Estos resultados indican que el método de ELISA-3D, es recomendable para ser utilizado como método complementario en estudios seroepidemiológicos para monitorear actividad viral. La respuesta de Ac contra 3D inducida por la vacunación en animales con una o dos vacunaciones es transitoria. El aumento en la frecuencia de reacciones positivas luego de la revacunación, indica que para el monitoreo de actividad viral en planes de control bajo vacunación, es necesario considerar los parámetros de reacción postvacunal contra 3D para una mejor interpretación de los resultados obtenidos por éstas técnicas. Finalmente, el uso de proteínas biosintéticas tiene ventajas en su estabilidad y pureza, evita el manejo de virus vivo y provee una fuente consistente de Ag. La detección de Ac contra otras proteínas no estructurales del VFA, como es el caso de 2C, proveería un mayor grado de confianza en la identificación de animales infectados con VFA.

Palabras claves: virus de la Fiebre Aftosa, Ensayos inmunoenzimáticos, ARN polimerasa, diagnóstico diferencial entre infectados y vacunados, proteínas no estructurales recombinantes.

ABSTRACT

Foot-and-mouth disease virus (FMDV), an Aphthovirus of the *Picornaviridae* family, is the causal agent of a highly contagious and economically important disease of cloven-hooved animals. Differentiation between infected and vaccinated animals and the detection of carriers animals are essential to evaluate the effectiveness of control and eradication campaigns.

Detection of antibodies against a non-structural antigen associated with the replication of the virus, the virus-infection-associated (VIA) antigen, the main component of which is the viral RNA polymerase or 3D protein, highly conserved among all serotypes, has been a useful tool in monitoring control and eradication programmes, as an indirect indicator of viral activity at the population level.

It is well known that inactivated vaccines against FMDV can induce antibodies against the VIA antigen, although the levels of antibodies and their persistence are lower than in infected animals. This transitory and variable response is attributed to the presence of traces of the viral polymerase in the vaccine antigen, which could be antigenic and result in the production of antibodies against the VIA antigen.

The most widely used method for measuring antibody to the VIA antigen is the Agar Gel Immunodiffusion (AGID). The method is simple to perform, but its low sensitivity and the use of partially purified antigen derived from infected cell cultures, made necessary the development of other methods.

With the aim of overcome this difficulties, immunochemical assays were developed, able to detect antibodies against FMDV non-structural proteins for the identification of infected animals with the virus.

Recombinant non-structural proteins, 3D and 2C, were expressed in *Escherichia coli*, as fusion proteins with glutathione-S-transferase (GST).

A liquid-phase blocking sandwich ELISA assay (ELISA-3D) able to detect specific antibodies to the 3D protein or RNA polymerase of FMDV was developed. The ELISA-3D, was able to detect antibodies against the 3D protein in cattle sera after natural or experimental infection as early as 5 days postinfection (dpi) and at later stages, 565 dpi, whereas sera from naive cattle from the FMD free area as bovine and porcine reference sera raised against

different RNA and DNA viruses were negative, resulting in a specificity of 100%. Comparison of the ELISA-3D with the AGID and the ELISA-VIA previously described (Alonso et al., 1990), which used the semipurified VIA antigen, shows that the ELISA-3D is highly sensitive (95.2%), specific (100%) and reproducible (C.V. 2.75%). Assays in vaccinated cattle sera, demonstrated a transitory antibody response induced by some vaccines.

The evaluation of the “Western blot”, using as antigen the non-structural 2C protein, shows a positive reaction with sera from infected cattle, whereas sera from naive cattle from FMDV free area did not react. One of 79 sera from vaccinated cattle shows a positive antibody reaction against 2C.

The results obtained here indicate that the ELISA-3D method must be used as a complementary method for seroepidemiological studies for monitoring viral activity. Antibody response to 3D induce in vaccinated or revaccinated animals was transient. The increase in the frequency of positive reactions after revaccination, suggest that to monitor viral activity in control programmes under vaccination, it is necessary to take into account the parameters of the post-vaccination anti-3D response, to make a better evaluation of the results obtained. Finally, the use of bioengineered proteins has advantages such as stability and purity, it does not require handling infective virus and provided a consistent source of antigen. The detection of antibodies to other non-structural proteins, as 2C, provides confirmatory evidence for the identification of FMDV infected animals.

Keywords: Foot-and-mouth disease virus, Enzyme-linked immunosorbent assay, RNA polymerase, differential diagnostic between infected and vaccinated animals, recombinant non-structural proteins.

Parte de los resultados presentados en esta tesis fueron publicados bajo los siguientes títulos:

- "Detection of antibodies against foot-and-mouth-disease virus using a liquid-phase blocking sandwich ELISA (LPBE) with a bioengineered 3D protein".

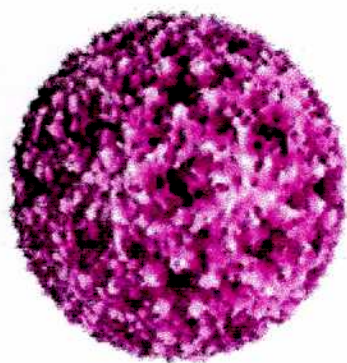
O'Donnell, V.; Boyle, D.; Sproat, K.; Fondevila, N.; Forman, A.; Schudel, A. A. and Smitsaart, E. Journal Veterinary Diagnostic Investigation, 8, 143-150, 1996.

- "Detection of virus-infection-associated-antigen and 3D antibodies in foot-and-mouth disease vaccinated cattle".

O'Donnell, V.; Smitsaart, E.; Cetra, B.; Duffy, S.; Finelli, J.; Draghi, G.; Boyle, D.; Fondevila, N. and Schudel, A. A. Revue Scientifique et Technique, Office International des Epizooties. Vol 16 (3), 833-840, 1997.

ABREVIATURAS

aa	aminoácido
ADN	ácido desoxirribonucleico
Ag VIA	Antígeno Asociado a la Infección Viral
anticuerpo/s	Ac
antígeno/s	Ag
ARN	ácido ribonucleico
BCIP	bromo-cloro-indolil-fosfato
BEI	bietilenimina
CV	coeficiente de variación
Da	Dalton
DE	desvío estandard
DO	densidad óptica
dpi	días post-infección
dpv	días post-vacunación
ECP	efecto citopático
ELISA F-L	ELISA Fase-Líquida
FA	Fiebre Aftosa
FC	Fijación de complemento
GST	glutathione-S-transferasa
IDAG	Inmunodifusión en Agar Gel
IPTG	isopropil-b-D-galactósido
kDa	kiloDalton
LEF	líquido esófago-faríngeo
NBT	azul de tetrazolio
OIE	Oficina Internacional de Epizootias
OPD	O-fenilendiamina
OVA	Ovoalbumina
PBST	PBS Tween-20
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PE	Proteínas Estructurales
pi	post-infección
PM	Peso Molecular
PNE	Proteínas No Estructurales
RIP	Radioinmunoprecipitación
SENASA	Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SN	Seroneutralización
TEMED	N, N, N', N'-tetrametilendiamina
TTE	Triclorotrifluoroetano
V	Voltios
VFA	Virus de Fiebre Aftosa



INTRODUCCION

I.- INTRODUCCION

1- La Fiebre Aftosa

La Fiebre Aftosa (FA) es una enfermedad viral, del grupo de las enfermedades vesiculares de los animales, muy contagiosa, que afecta en forma natural a todas las especies de pezuña hendida, domésticas o salvajes, ocasionando importantes pérdidas en la producción y limitaciones en la comercialización de productos derivados, en el mercado internacional. Se caracteriza por la aparición de fiebre y vesículas, seguidas por el desarrollo de erosiones en el epitelio del hocico, belfos, ollares, patas, pezones, ubres y pilares del rumen. Las especies domésticas principalmente afectadas son los bovinos, porcinos, ovinos y caprinos. También son susceptibles especies como llamas, antílopes, ciervos, jabalíes y otros. En cuanto al hombre, se han reportado dos casos en los que se confirmó el diagnóstico clínico por aislamiento del virus y pruebas inmunológicas (Armstrong y col., 1967; Bauer, 1997).

La enfermedad fue descrita por primera vez en la Edad Media, en 1514, por Fracastorius, quien describió un brote de la enfermedad en Italia, cuyas características eran similares a los actualmente producidos por el virus de la Fiebre Aftosa (VFA) (Fracastorius, 1546). Los animales rechazaban el alimento y presentaban vesículas en las mucosas de la boca, seguidas por erosiones en el epitelio podal, mostrando la mayoría de ellos una recuperación. Loeffler y Frosch, demostraron que la FA era causada por un virus filtrable (Loeffler y col., 1898). Las características de transmisión, amplia distribución, su alta contagiosidad y los daños que ocasiona al ganado y la economía pecuaria han determinado la adopción de severas medidas de prevención a nivel internacional. La Oficina Internacional de Epizootias (OIE) la ha categorizado en el Grupo A de enfermedades de alto riesgo. Los mayores efectos, generalmente en bovinos y porcinos, son debidos al deterioro físico y productivo, más que a pérdidas por mortalidad. La mortalidad en bovinos adultos es generalmente menor al 5%, pero puede alcanzar el 50% cuando la infección viral afecta el músculo cardíaco, particularmente en animales jóvenes (Geering y col., 1995). Sin embargo, el alto grado de morbilidad, las pérdidas de productividad y las lesiones asociadas a infecciones secundarias constituyen un problema importante para los productores ganaderos e industrias relacionadas (Morgan y col., 1980).

Las restricciones que esta enfermedad ocasiona en los mercados internacionales para la exportación de animales y productos derivados, así como la implementación de planes de control y erradicación, originan grandes pérdidas económicas.

1.1- Signos Clínicos

El período de incubación de la enfermedad adquirida naturalmente es variable y depende principalmente de la dosis y cepa de virus, la ruta de infección y el nivel de inmunidad existente. Puede ser tan corto como 2 - 3 días, o entre 10 - 14 días en casos en que la dosis de virus de exposición es muy baja. Cuando la enfermedad es reproducida en forma experimental, el período de incubación puede ser de 18 - 24 horas.

El inicio de la enfermedad se manifiesta por fiebre elevada (40-42°C), y se acompaña de postración grave y anorexia, seguido de aparición de estomatitis aguda y dolorosa así como un notable descenso en la producción de leche.

Hay sialorrea abundante, la saliva pende en forma de filamentos, y el animal produce un chasquido típico de los labios y mastica cuidadosamente. Pronto aparecen vesículas y ampollas de 1 a 2 cm de diámetro en mucosa bucal, encías y lengua, las que se rompen al cabo de 24 horas dejando una superficie cruenta, dolorosa, que cura en una semana. Al mismo tiempo que las lesiones bucales, aparecen vesículas en las extremidades, sobre todo en las hendiduras de las pezuñas y en la corona. La rotura de las vesículas produce grandes molestias y el animal presenta cojera intensa.

La invasión bacteriana secundaria de las lesiones dificulta la curación y afecta las estructuras del pie. En ocasiones aparecen vesículas en los pezones provocando mastitis intensas.

En porcinos, los signos tempranos incluyen fiebre, inapetencia y dificultad para moverse. Las vesículas más pronunciadas se observan en las extremidades, principalmente en el espacio interdigital y en la corona. Estas causan claudicación y dolor, principalmente si los animales se encuentran en recintos con pisos duros. En las hembras se pueden observar vesículas en los pezones y en hembras preñadas pueden ocurrir abortos. Hay una alta mortalidad en lechones lactantes, con muerte súbita sin presencia de lesiones, lo que muchas veces es el primer signo de la enfermedad en los rebaños (Geering y col., 1995).

En ovinos y caprinos la enfermedad suele ser leve y su importancia es sobre todo por el peligro de transmisión a bovinos. Sin embargo, se han registrado brotes epidémicos, en que los ovinos y caprinos resultaron afectados con mayor severidad que los bovinos (Acha y col., 1988; Geering y col., 1995). En pequeños rumiantes, las lesiones en boca suelen no ser prominentes. Las vesículas en boca tienden a ser pequeñas y curar rápidamente. Las lesiones en pie son más pronunciadas en la banda coronaria y en el espacio interdigital. Generalmente el único signo notorio de la enfermedad en el rebaño es la claudicación, pudiendo ocurrir infecciones secundarias de origen bacteriano (Acha y col., 1988; Geering y col., 1995).

1.2- Patogenia y Transmisión

La infección de animales susceptibles al VFA en el campo, ocurre principalmente a través del tracto respiratorio superior, por inhalación del virus. La especie más susceptible es el bovino, requiriéndose solamente 10 dosis infectivas cultivo de tejidos 50% (DICT₅₀) para establecer una infección por inhalación (Donaldson y col., 1987). La cantidad de virus necesaria para que ocurra una infección por vía digestiva es mayor que la requerida para una infección por aerosol (Morgan, 1993), siendo los porcinos la especie más susceptible a la infección por esta ruta. Burrows y col. (1981), encontraron que novillos alimentados con 10^{6.7} UFP del VFA tipo O1 en el agua o en el alimento, en dos ocasiones con un intervalo de 7 días, no se infectaban. Mientras que, Sellers (1971), infectando bovinos por vía oral con dosis de 10^{5.8} a 10^{6.8} DICT₅₀ de VFA observó un 50% de infección. Una infección exitosa en porcinos por la ruta oral, fue observada por Terpstra (1972), requiriéndose 10⁵ a 10^{6.5} DICT₅₀. La infección es también posible por contacto del virus con lesiones en piel o mucosas.

La transmisión de la FA es principalmente por contacto directo, especialmente durante la etapa febril temprana, cuando el virus esta presente en sangre y en todos los órganos, secreciones (saliva, leche, semen, lágrimas) y excreciones (orina, heces) (Morgan, 1993). La dispersión del virus entre animales en contacto ocurre a través de virus presente en saliva y en las lesiones podales, las que permanecen infecciosas por 9 - 11 días luego de la infección inicial (Bachrach, 1968, Scott y col., 1966).

La faringe y los nódulos linfáticos de la región son los sitios de replicación primarios (Burrows y col., 1981). Luego de la multiplicación en este sitio, el virus alcanza los sitios de

replicación secundarios que incluyen otros nódulos linfáticos, tejidos epiteliales lingual y podal, y en menor medida glándula mamaria en las hembras. El músculo cardíaco también es un órgano secundario de importancia en animales jóvenes, y en algunos casos puede provocar la muerte (Bachrach, 1968).

El virus es excretado en altas cantidades en el aire expirado, en todas las secreciones y excreciones (leche y semen), y de las vesículas que se rompen. La excreción del virus puede comenzar 4 días antes que los signos clínicos aparezcan, lo cual es de gran significancia epidemiológica. La mayoría de las excreciones cesa entre los 4 - 6 días luego de la aparición de las vesículas, cuando se desarrolla una respuesta de Ac. El nivel de Ac neutralizantes se eleva y el virus desaparece del torrente sanguíneo, pero no necesariamente de los tejidos.

Con menor frecuencia el virus se difunde mecánicamente por vía de productos contaminados, vehículos o personas (Morgan, 1993).

El virus en carcasas, suelo, lana, ropa y otros objetos puede persistir por largos períodos, sirviendo como reservorio de la infección. El virus puede también ser transmitido por intermedio de productos cárnicos, de allí las restricciones de los países libres, a la importación de productos animales provenientes de países donde la enfermedad es endémica. Durante el preparado de carcasas a 4°C, el pH del tejido muscular baja a 5.3-5.7 dentro de las 72 horas, causando la inactivación del virus en el músculo. Sin embargo el rápido congelamiento de las carnes frescas, detiene la producción de ácido láctico y el virus puede sobrevivir hasta 6 meses. Los nódulos linfáticos, coágulos sanguíneos en el bazo y médula ósea a pesar de estar próximos al tejido muscular, no se acidifican cuando el pH del músculo es de 5.5, pudiendo tener un pH de 6.6. El virus ha sido recuperado de médula ósea y de nódulos linfáticos de carne congelada luego de los 6 meses. El VFA puede diseminarse de materiales contaminados por diferentes medios, animales salvajes, pájaros, camiones, equipos de trabajo, así como ropa y personas. Se ha informado también la capacidad potencial de contagio de la enfermedad por virus presente en el aire (Morgan, 1993; Sellers, 1971).

1.3- Estado Portador o "Carrier"

Una característica del VFA, es su capacidad para establecer una infección persistente inaparente. Los animales luego de la recuperación clínica pueden convertirse en animales

portadores o “carriers”. El virus puede ser recuperado de líquido esófago faríngeo (LEF) de bovinos y otros rumiantes intermitentemente, luego de los 28 días de ocurrida la infección, sin presencia de signos clínicos de la enfermedad (Burrows, 1966; Suttmoller, 1968). El título viral determinado en cultivos celulares es bajo y generalmente menor al nivel necesario para que ocurra la transmisión a animales susceptibles (Donaldson y col., 1989).

La infección persistente en bovinos y búfalos y en menor medida en ovinos y caprinos, es una secuela de la infección clínica y subclínica, ocurriendo también en animales vacunados luego de la infección, donde la replicación del virus está restringida a la región orofaríngea por los niveles protectores de Ac circulantes. Se ha sugerido que los bajos niveles de Ac podrían colaborar con la aparición de animales portadores (Rodríguez y col., 1995).

Muchos reportes de brotes de FA llevaron a creer que los animales convalecientes pueden ser responsables de la infección de animales susceptibles en contacto. Esta pudo ser la causa de la epidemia de 1922 - 1924 en el Reino Unido (Hedger y col., 1971) y parece explicar la introducción de la enfermedad en México por importación de bovinos desde Brasil en la década del '40 (van Bakkum, 1973). A la vez existen evidencias que refutan estas teorías (Mohler, 1926) así como las fallas en transmitir la infección bajo condiciones controladas a animales susceptibles a partir de animales convalecientes (Rodríguez y col., 1995).

El trabajo de van Bakkum (van Bakkum y col., 1959; Suttmöller y col., 1965) finalmente demostró la persistencia del virus en el tracto respiratorio superior de bovinos convalecientes, confirmando la existencia del estado portador, quedando demostrado que el VFA puede establecer una infección persistente y subclínica. Desde aquí, la toma de LEF usando el método de la copa “probang” (Suttmoller y col., 1965) ha sido el método aceptado para la detección de virus persistente en animales portadores. La región orofaríngea y más particularmente el paladar blando fue sugerido por Burrows (1966) como el sitio de predilección para la persistencia del virus en el bovino, aunque éste puede ser recuperado de un número de órganos y tejidos durante la convalecencia por cortos períodos de tiempo (Cottral, 1969; Prato Murphy y col., 1994). En ovinos se determinó que la región tonsilar es el sitio de mayor título y de más frecuente aislamiento (Burrows, 1968).

La duración del estado portador está relacionada con la especie. Los bovinos continúan excretando virus hasta 2.5-3 años, los ovinos y caprinos lo hacen hasta 9 meses, y los búfalos

africanos por lo menos hasta 5 años (Burrows, 1968; Hedger, 1968; Condy, 1985; Pay, 1988). En el caso de los cerdos, estos no liberan virus luego de los 28 días postinfección (dpi) y como consecuencia no se consideran portadores del virus (van Bekkum, 1973).

Existen evidencias de campo que la vacunación de los bovinos reduce el establecimiento de animales portadores en áreas endémicas (Anderson y col., 1974).

Aunque el rol epidemiológico de los animales “carriers” no ha sido totalmente probado, la replicación del virus en los animales portadores es un factor importante en el mantenimiento de la enfermedad representando un reservorio natural y una fuente potencial de variabilidad viral, llevando a la aparición de nuevas variantes virales en el campo (Salt, 1993). Cambios en la virulencia del virus proveniente de animales portadores fueron descritos por Suttmoller y col., (1967, 1968), como así también fueron reportadas variaciones en la antigenicidad (Fagg y col., 1966, Gebauer y col., 1988). Estas nuevas variantes pueden escapar a la inmunidad generada por las vacunas en el resto de la población susceptible.

2- Distribución Mundial de la Fiebre Aftosa

La situación de la FA ha mejorado en algunas áreas del mundo en los últimos años, continúa ausente en Oceanía, siendo más notable en Europa y algunos países de América del Sur. No obstante la enfermedad continúa siendo endémica con altas prevalencias en muchos países de Africa, el Medio Este y Asia.

El control y erradicación de la enfermedad en áreas o países libres se ha logrado a través de estrictos programas de vacunación y aplicación del “rifle sanitario” (“stamping out”), el cual consiste en la matanza de los animales infectados o expuestos, indemnizando el gobierno al productor por los gastos ocasionados. Los animales muertos son enterrados o incinerados y se procede a la desinfección del lugar. Luego de los treinta días, se colocan en el lugar animales susceptibles y si éstos no desarrollan síntomas asociados con la enfermedad, se puede repoblar el área nuevamente con ganado susceptible. (Bachrach, 1968; Cottral, 1975).

En países de América donde la FA es endémica, el control se basa en el uso de vacunas a virus inactivado, con adyuvante oleoso, de larga inmunidad, tanto en rumiantes como en porcinos. En el resto del mundo, la vacuna con adyuvante oleoso se aplica solamente en

porcinos, mientras que en los rumiantes se aplican vacunas con adyuvante acuoso, hidroxisaponinado (Kitching, 1998).

* En Europa la enfermedad ha sido erradicada, los únicos países que han declarado focos de FA durante la década del '90 han sido Italia, Bulgaria, Rusia, Grecia y Macedonia. En 1993, se declararon 55 focos de FA en Italia, luego de la importación de bovinos de origen desconocido, la que fue erradicada en un período de 4 meses. Se han declarado focos únicos en Bulgaria y Rusia en 1993. A mediados de 1994, se declararon focos en Grecia. La vacunación ha sido suspendida en Europa desde julio de 1991, manteniéndose una zona de transición (zona buffer) de vacunación para prevenir la introducción de la enfermedad desde el Medio Oriente, a través de Turquía.

* En Africa la enfermedad es endémica, con altas prevalencias en la mayor parte del continente. El tipo "O" es el más frecuente en el norte y este del continente, el tipo "A" en el oeste, centro y este, mientras que el tipo "C" no es común. Solamente en Africa se observan los tipos SAT("South African Territory") 1, SAT 2 y SAT 3. El tipo SAT 3 ocurre en un área restringida del Sur de Africa, estando los otros dos distribuidos ampliamente, a excepción del norte del continente.

* En el Medio Este la enfermedad es endémica, observándose altas prevalencias, a excepción de Israel donde los focos son esporádicos. El tipo "O" es el más común, seguido por los tipos "A", Asia 1 y ocasionalmente "C".

* En Asia la FA es endémica a excepción de Indonesia, Japón, Korea y Singapur que han estado libres de FA por un largo período de tiempo. Los serotipos "O", "A" y Asia 1 son los más comunes en Asia mientras el tipo "C" está restringido al continente Indico y las Filipinas. En Taipei, Taiwan, República de China, se reportaron a la OIE, 3 focos de FA en marzo de 1997, siendo el agente causal el VFA tipo O1. Hasta ese momento, Taiwan, con una población de 14 millones de porcinos y una exportación de 6 millones de carcasas a Japón, era libre de FA desde el año 1929. Como medida de control se aplicó el rifle sanitario y un sistema de vacunación continua y sistemática de la población susceptible.

* Tanto Norte y Centro América así como las Islas del Caribe se encuentran libres de FA. En Norte América los últimos brotes ocurridos en Estados Unidos, Canadá y México se registraron en los años 1929, 1952 y 1953 respectivamente.

* En Australia, país libre de FA, la enfermedad no ocurre desde hace más de 120 años. Se han observado brotes menores de la enfermedad, en los años 1801, 1804, 1871 y 1872. El último de estos incidentes ocurrió en Victoria en 1872, cuando la enfermedad fue introducida por toros importados desde Inglaterra, involucrando dos establecimientos antes de ser erradicada. En Nueva Zelanda la enfermedad nunca se presentó.

* La FA es endémica en pocos países de América del Sur. Muchos han logrado un muy buen control de la enfermedad o la han erradicado. Chile, Uruguay, Guyana, Surinam y Guayana Francesa, así como la Región Patagónica de la Argentina son libres de la enfermedad. Tanto Argentina como Paraguay han sido declarados “libres de FA con vacunación”, en mayo de 1997. Bolivia ha declarado más de 140 focos durante el año 1996, si bien la incorporación de este país al proyecto Regional de Cuenca del Plata modificará su situación epidemiológica al potenciar las acciones con la cooperación de los países de la región. En Brasil los estados de Santa Catarina y Rio Grande do Sul no presentan focos de FA desde 1993, habiendo sido declarados “libres con vacunación” en Mayo de 1998 por la OIE. El estado de Paraná no presenta focos desde 1994, mientras que hacia el norte la enfermedad no se encuentra controlada. Tanto Perú, Ecuador como Venezuela presentan la enfermedad. En Colombia la enfermedad es endémica, salvo en la Región de “El Chocó”, el cual ha sido declarado libre sin vacunación en mayo de 1997. Los serotipos actuantes en América del Sur son “A”, “O” y “C”.

2.1- Ocurrencia de Fiebre Aftosa en Argentina

La Argentina cuenta con una población de bovinos de 56.029.023 millones de cabezas, a una tasa de extracción anual para faena del 25% con un consumo interno de carne de 63 kilos por habitante, ocupando un importante lugar a nivel mundial (SENASA, 1996). Por estas razones la Sanidad Animal ha constituido desde siempre una preocupación prioritaria en la Argentina, sin embargo la presencia de FA restringió el ingreso a importantes mercados internacionales. La lucha contra la FA a partir del año 1989, requirió un marco legal específico otorgando autarquía al organismo de ejecución de las políticas sanitarias y de una ley específica que trata la Erradicación de la FA, creando un sistema zoosanitario inédito al involucrar a los productores en una organización compuesta por 350 entes locales distribuidos en todo el país

con funciones administrativas de los recursos para la ejecución de la vacunación del 100% de los bovinos y tareas de vigilancia epidemiológica.

Los países limítrofes son Uruguay, Brasil, Paraguay, Bolivia y Chile. Es importante destacar que las fronteras internacionales actúan como barreras naturales al tratarse de cadenas montañosas (La Cordillera de los Andes) y de ríos caudalosos (Uruguay, Paraguay y Paraná de la Cuenca del Plata y Pilcomayo que limita con el resto de Paraguay), que impiden el paso indiscriminado de animales que pudieran ser susceptibles a la FA. Por otro lado existen puestos de control fronterizos, donde actúa el Servicio Oficial. La situación de los países fronterizos con respecto a la FA fue detallado anteriormente (Sección I.2), (Figura N° 1).

Figura N°1: Situación de los Países limítrofes y resto de América del Sur .



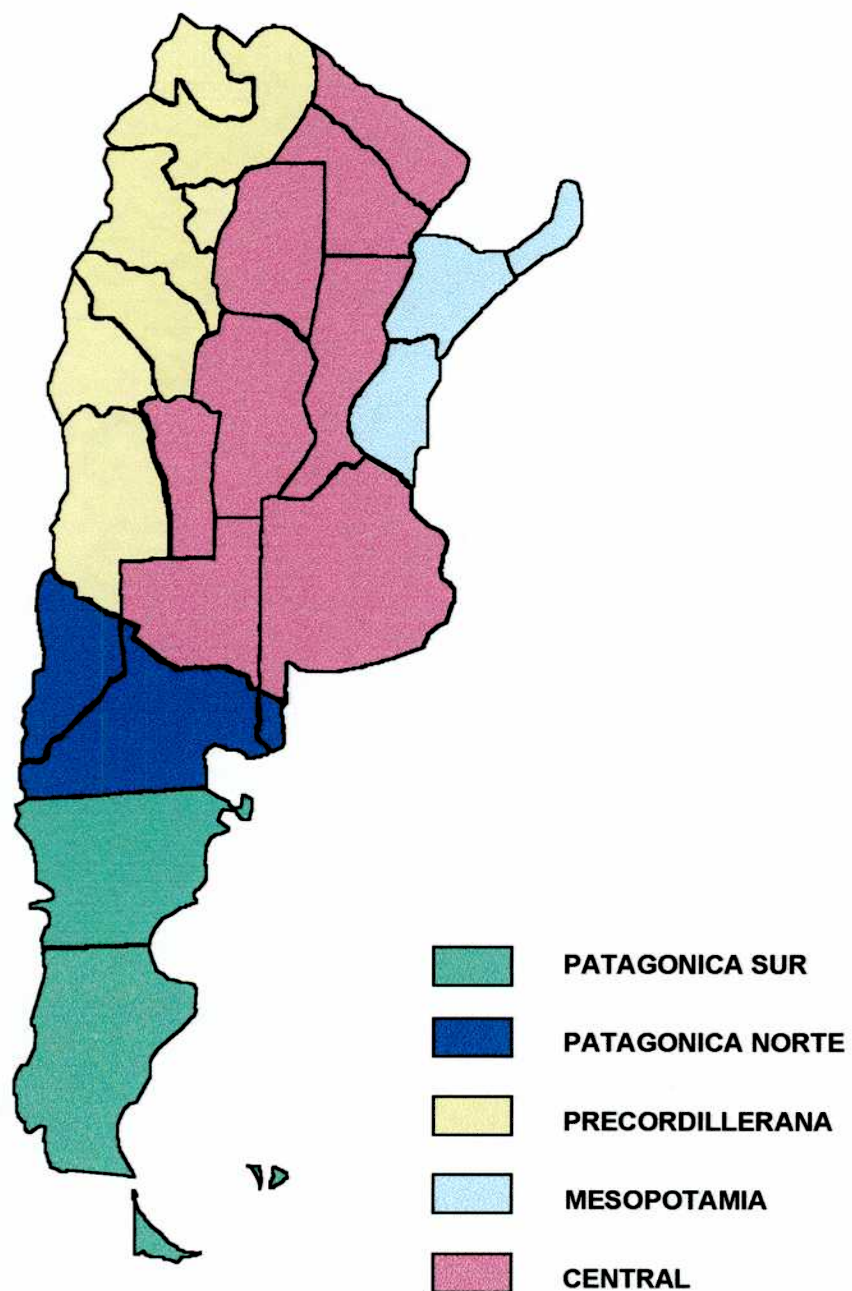
La situación respecto a FA de los países con (*) se detallaron anteriormente (Sección 2).

En la Argentina, la FA fue detectada por primera vez en el año 1865, con la importación de reproductores de valor genético. A partir de 1902 se estableció la declaración obligatoria de la enfermedad. La lucha organizada con base legal contra la enfermedad se inició en el año 1962, basándose en la vacunación obligatoria. La vacuna utilizada era de producción nacional con adyuvante acuoso, hidroxisaponinada, realizándose la vacunación cuatrimestralmente en la especie bovina y semestralmente en la especie ovina. Si bien la cobertura vacunal era variable e incompleta, la presentación de la enfermedad con esta estrategia fue disminuyendo con un registro de focos de 5000 (año 1962) a un promedio de 1000 en la década del '80.

A partir de 1986 se incorporó la vacuna con adyuvante oleoso, de largo período de inmunidad, iniciándose así un nuevo ciclo con la implementación del Plan de Control de la Fiebre Aftosa 1990 - 1992 y posteriormente el Plan de Control y Erradicación 1993 - 1997, con las siguientes características:

- Cambio de la vacuna en uso por la vacuna oleosa, de alta inmunogenicidad y prolongado período de protección que permite vacunar a los animales adultos (mayores de 2 años) una vez al año y a los animales jóvenes (menores de 2 años) dos veces.
- Vacunación a cargo de personal oficial del 100 % de la población bovina.
- La Regionalización del país a fin de preservar y ampliar zonas libres (Figura N°2)
- Un fuerte control en las barreras sanitarias entre diferentes regiones epidemiológicas dentro del país.
- Atención y saneamiento de los focos de la enfermedad registrados hasta abril de 1994, adoptándose las medidas indicadas por la OIE.
- Control permanente en el movimiento de animales.
- Realización de estudios seroepidemiológicos a nivel nacional.

Figura 2: Plan de Control y Erradicación 1993 - 1997. Regionalización.



Desde 1997 la vacunación sistemática se realiza únicamente a la especie bovina, las demás especies susceptibles no se vacunan, estando contemplada su vacunación solo en los casos de emergencia. La misma se realiza con personal capacitado, tratándose de vacunadores oficiales, ésta asegura una cobertura vacunal de la totalidad de los bovinos en un plazo de 60 días calendario por período de vacunación.

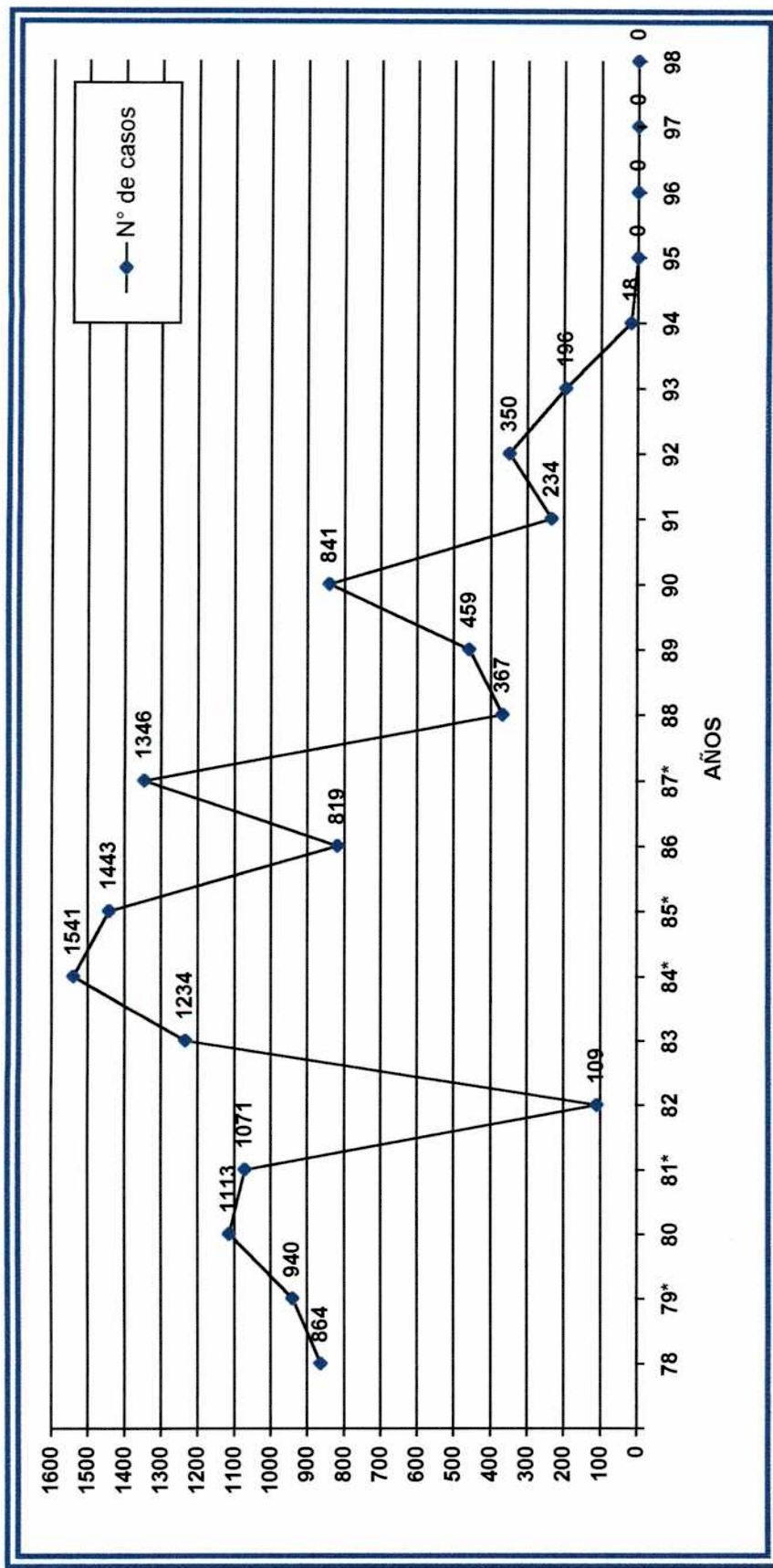
La vacuna utilizada en nuestro país es elaborada por laboratorios privados, tratándose de vacunas con adyuvante oleoso e inactivadas con un inactivante químico de primer orden, bietilenimina (BEI). La integran las 4 cepas oficiales de producción que son provistas por la Gerencia de Laboratorios del Servicio Oficial (O1 Caseros, A79 Argentina, A81 Castellanos 87, C3 Argentina 85).

La implementación de un Plan de Control (1990 - 1992) y un Plan de Control y Erradicación (1993 - 1997) para la FA ha resultado en una disminución en el número de focos, (último foco registrado en Abril 1994) (Figuras N°3 a-b), así como de la prevalencia del virus (León y col., 1994). La ausencia de casos clínicos, complementada con la información relacionada a las estructuras de ejecución del plan, la vigilancia epidemiológica, y los indicadores seroepidemiológicos permitieron a nuestro país ser declarado "País Libre de Fiebre Aftosa con Vacunación" en Mayo de 1997 en la OIE, luego de cumplir 2 años sin presencia clínica de la enfermedad y constatarse la ausencia de actividad viral. Al sur del paralelo 42°, las provincias de Chubut, Río Negro y Tierra del Fuego son consideradas libres de FA, habiéndose registrado el último foco en 1968 en Tierra del Fuego que fuera terminado con "stamping out" en ovinos y bovinos.

La situación de Argentina como país libre de FA con vacunación exige un estricto monitoreo de la circulación viral para poder garantizar las condiciones necesarias para suprimir la vacunación. Esto hace necesario contar con herramientas que permitan continuar con la vigilancia epidemiológica para la FA. El análisis de riesgo efectuado en Diciembre de 1997 (SENASA, 1997), indica que Argentina, implementando las acciones preventivas necesarias, (control de fronteras y aeropuertos, grupos de emergencia entrenados, banco de vacunas validado, etc), estaría en condiciones de levantar la vacunación y modificar su estatus sanitario a país libre de Fiebre Aftosa.

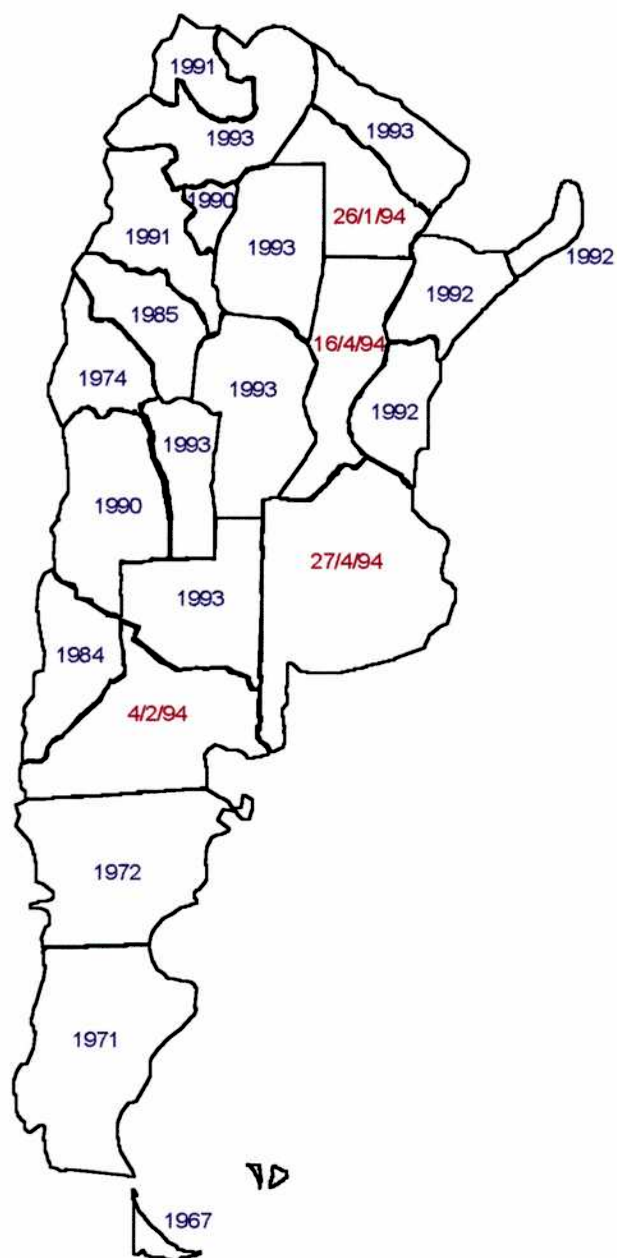
Figura N°3 : Registro del número de focos

a- Distribución cíclica de la Fiebre Aftosa



(*): Cepas variantes
SENASA (1994)

b- Registro de últimos focos por provincia



El Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, referida a la FA, involucra métodos directos e indirectos de vigilancia y seguimiento. Dentro de los métodos directos, se considera la demostración de ausencia de enfermedad clínica en bovinos, en especies centinelas, en animales menores de un año así como la atención urgente de la notificación y sospecha. Sumándose a esto la detección permanente de posibles portadores por pruebas "probang" efectuadas en especies vacunadas, siendo hasta el momento todas negativas.

Dentro de los métodos indirectos tenemos: el método de ELISA en fase-líquida (F-L) (Hamblin y col., 1986a, 1986b; Fondevila y col., 1997; Smitsaart y col., 1997) para la detección de Ac en la especie que se vacuna masiva y sistemáticamente (bovinos) a fin de determinar los niveles de inmunidad poblacional conferidos por la vacuna, la detección de Ac contra el Ag VIA (McVicar y col., 1970), por el método de Inmunodifusión en Agar Gel (IDAG), a fin de determinar su prevalencia y en los últimos dos años la detección de Ac contra proteínas no estructurales (PNE) por el método de "Western blot", "Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot" (EITB) (Bergmann y col., 1993) y la evaluación de animales potenciales portadores por los métodos de la copa "probang" y PCR (Prato Murphy y col., 1994). Desde 1997 se han incorporado al programa de vigilancia las especies susceptibles no vacunadas (ovinos, camélidos, caprinos, porcinos).

3- La Prevención de la Fiebre Aftosa

3.1- Vacunas contra Fiebre Aftosa

Entre los métodos empleados para controlar la FA, la vacunación es el más efectivo y ha permitido la erradicación de la enfermedad en numerosos países. La gran mayoría de las vacunas contra el VFA se basan en la utilización de virus inactivado por agentes químicos.

En un principio, el VFA se obtenía del epitelio lingual de bovinos infectados que contenía al agente en alta concentración y en cantidades suficientes como para comenzar a producir vacunas.

A principios de la década del '50, se desarrolló un sistema para la producción a gran escala del antígeno (VFA) in vitro, utilizando cultivos de epitelio lingual bovino para la formulación de una vacuna (Frenkel, 1951). Este avance permitió la implementación de

programas de vacunación en Argentina y en países de Europa. El sistema presentaba ventajas importantes para la época, como la simpleza de su ejecución, los altos y constantes niveles de producción viral y el no requerimiento de adaptación del virus al cultivo. Sin embargo este método posee desventajas como la dificultad en el suministro de material de propagación en tiempo y forma, el material sobre el que se propaga el virus nunca es estéril, la dificultad en la estandarización o normatización de la producción (material proveniente de varios miles de animales en "batch") y sobre todo la posibilidad de transmisión de agentes ubicuos o de difícil caracterización (ej. BSE en el Reino Unido), para el cual sería una vía de transmisión. Por ello hoy, este método ha sido eliminado como proceso de producción de vacuna.

En la década del '60, se desarrollaron métodos basados en la producción del VFA en cultivos de células crecidas en monocapas, en principio se utilizaron cultivos primarios de riñón bovino y más tarde cultivos de líneas celulares como riñón de hamster (BHK-21), que son los más utilizados en la actualidad (Mowat y col., 1962). Las líneas celulares IBRS-2 (células de riñón porcina) y HmLu (células de pulmón de hamster) también fueron adaptadas al crecimiento en suspensión y son eficientes productoras del VFA.

En 1926 se demostró que el VFA podía ser inactivado con formaldehído sin perder su capacidad inmunizante (Vallée y col., 1926). Sin embargo, éste presenta la desventaja que la cinética de inactivación no es de primer orden, existiendo el riesgo de que persista una fracción de virus residual no inactivado (Brown, 1963). Las azirinas, en cambio, presentan una cinética de inactivación de primer orden, rápida y su acción sobre las proteínas del virus es mínima (Brown y col., 1963; Bahnemann, 1975). Actualmente el procedimiento más usado para la inactivación es el agregado de BEI (Bahnemann, 1975, 1990).

Dado que el virus inactivado presenta baja inmunogenicidad, es necesario el agregado de adyuvantes. Comercialmente solo 3 adyuvantes son utilizados para la producción de vacunas contra el VFA: hidróxido de aluminio, saponina y emulsión oleosa. Las primeras vacunas que se desarrollaron fueron acuosas, que utilizan hidróxido de aluminio y/o saponina. Estas vacunas conferían inmunidad por un período no mayor a cuatro meses. El reemplazo de estos adyuvantes por el adyuvante de tipo oleoso, como el adyuvante de Freund (Freund y col., 1945), donde el Ag es emulsificado en un aceite mineral, confirió una inmunidad más efectiva y de mayor duración en bovinos (Rivenson y col., 1982; Sadir y col., 1988). El adyuvante oleoso

es actualmente aceptado en las vacunas comerciales y esta formulación permitió que la frecuencia de vacunación se redujera a dos veces por año, en lugar de tres, en animales menores de 2 años y a una única vacunación en animales mayores de 2 años (Fondevila y col., 1991; León y col., 1994).

En la última década se han realizado importantes progresos para identificar la secuencia nucleotídica del genoma viral y la composición de aminoácidos (aa) de las proteínas relacionadas. La introducción de las tecnologías de ingeniería genética ha focalizado los estudios hacia el desarrollo de vacunas a virus vivo modificado, recombinantes, y a péptidos sintéticos.

A pesar de los esfuerzos realizados para el desarrollo de un VFA modificado, las cepas obtenidas revertían a su virulencia original. Otra de las limitaciones consistía en que la atenuación no se lograba en todas las especies susceptibles (Mowat y col., 1961 - 1964). En el VFA, existe evidencia que la cadena poli-C estaría asociada con la virulencia, por tanto esto serviría de base para el diseño de virus modificado (Parisi y col., 1985), si bien los resultados obtenidos hasta el momento no son alentadores.

En los estudios realizados para el desarrollo de vacunas recombinantes, se ligó la secuencia de ADN que codifica para VP1, (VFA tipo A12), a un plásmido que expresa una proteína quimérica en el sistema operón-triptofano de *Escherichia coli* (*E. coli*), obteniéndose buenos niveles de Ac neutralizantes y protección al desafío, demostrando que la proteína era efectiva en montar una respuesta inmune específica (Kleid y col., 1981), si bien se necesitaron de 100 a 1000 veces más Ag para obtener una respuesta inmune similar a la producida por el virión completo. Resultados más alentadores se han obtenido utilizando una proteína de fusión expresada en el virus “vaccinia”, correspondiente a los aa 142-160 de la VP1 del VFA tipo O1 Kaufbeuren (O1K) junto con el “core” del virus de la Hepatitis B, resultando más inmunogénico que el péptido solo. La capacidad de producir Ac neutralizantes en cobayos fue comparable con la del virión completo (Clarke y col., 1987).

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. El potencial de estas vacunas está siendo evaluado y recientemente se ha informado

que las cápsides vacías resultaron inmunogénicas para cobayos y cerdos (Grubman y col., 1993).

Otra estrategia para el desarrollo de vacunas ha sido la utilización de péptidos sintéticos como herramienta para la localización de sitios antigénicos relevantes al VFA. Los mismos actúan como inmunógenos efectivos si contienen sitios de reconocimiento de los linfocitos B (epítopes B) para la inducción de Ac así como también sitios capaces de activar a las células T colaboradoras (epítopes T) con los linfocitos B (Mitchinson, 1971).

Las ventajas de estas vacunas son su mayor estabilidad, debido a que tienen un menor requerimiento de refrigeración que las partículas virales inactivadas que mantienen su integridad antigénica, y son más seguras ya que no requieren el manejo de virus vivo para su elaboración.

A pesar de las numerosas investigaciones, en la actualidad aún no se dispone de vacunas de este tipo para su uso comercial.

4- Virus de la Fiebre Aftosa

El VFA pertenece a la familia *Picornaviridae*, género *Aftovirus*. Es el agente causal de una de las enfermedades virales más importantes que afecta al ganado de pezuña hendida ocasionando importantes pérdidas económicas (Bachrach, 1968). Existen siete serotipos del VFA, A, C, O, SAT 1, SAT 2, SAT 3, y ASIA 1, no existiendo reacción cruzada entre ellos. Los serotipos pueden ser además divididos en más de 67 subtipos (Bachrach, 1968, 1977).

4.1.- Características de los Picornavirus

La familia *Picornaviridae* incluye virus con un genoma constituido por una molécula de ácido ribonucleico (ARN), de cadena simple, de polaridad positiva, y de naturaleza infecciosa. Su nombre de *pico* (muy pequeño) “RNA” virus, se debe a que es uno de los virus ARN de menor tamaño conocido.

La familia *Picornaviridae* esta dividida en 5 géneros y un grupo de virus no clasificado (Cooper y col., 1978; VIth ICTV Report, 1996).

- Género Enterovirus:

Especies: Enterovirus Bovino, Humano, Porcino y del Simio; Coxsackievirus Humano, Echovirus Humano, Poliovirus.

- Género Rinovirus:

Especies: Rinovirus Humano y Bovino.

- Género Hepatovirus:

Especie: Hepatitis A, Hepatitis A del Simio.

- Género Cardiovirus:

Especies: Virus de Encefalomiocarditis (cepas: Columbia SK, mengovirus, Elberfield del ratón), Poliovirus del Ratón y Virus Vilyuisk.

- Género Aftovirus:

Especies: Virus de la Fiebre Aftosa, Rinovirus Equino.

- Virus No Clasificados en la Familia:

Especies: Virus de la Parálisis del Grillo (cricket paralysis virus), Virus de Drosophila C, Virus de Gonometa.

Los grupos se diferencian por sus propiedades fisicoquímicas y serológicas, como también por las características propias de la infección que producen en los hospedadores susceptibles. Cada género se divide en tipos y subtipos mediante la caracterización de sus Ag de superficie (Cooper y col., 1978; Sangar, 1979).

4.2.- Biología del Virus de la Fiebre Aftosa

4.2.1- La Partícula Viral

El VFA tiene una cápside no envuelta, con un diámetro de 28 nm. Tiene un coeficiente de sedimentación de 146 Svedbergs (S) y una alta densidad en cloruro de cesio (1.43 - 1.45 g/cm³). Es inestable a pH ácido y a alta temperatura (Rueckert y col., 1984). El ARN, de polaridad positiva, que actúa como ARN mensajero, tiene un peso molecular de $2,7 \times 10^6$ daltons (Da), un tamaño aproximado de 8500 nucleótidos (Bachrach, 1977; Forss y col., 1984; Belsham, 1993) y un coeficiente de sedimentación de 35 S.

La cápside está constituida por un grupo de cuatro proteínas estructurales denominadas VP1, VP2, VP3 y VP4, cada una de las que se encuentra en sesenta copias (Cooper y col., 1978), producidas por clivaje post-traducciona l de un precursor común terminal (Sangar, 1979; Belsham, 1993). El virión contiene además una o dos copias minoritarias de VP0 (precursor VP2 - VP4) y una copia de la ARN polimerasa (Newman y col., 1994).

Los pesos moleculares (PM) de las proteínas VP1, VP2 y VP3 son 23.2, 24.6 y 24.2 Kilodaltons (kDa), lo que hace difícil su separación en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), mientras que la masa de VP4 es de 8.5 kDa (Rueckert, 1985; Boothroyd, 1981).

La estructura tridimensional de la cápside ha sido determinada por la técnica de cristalografía de rayos X, revelando una estructura icosaédrica de simetría 5:3:2 (Fields, 1985). Cada cara del icosaedro está formada por pentámeros, 5 trímeros de VP1, VP2 y VP3, que constituyen las partículas 12S. Se observa claramente que las proteínas VP1, VP2 y VP3 se hallan expuestas y son fosforiladas, mientras que la proteína VP4 se localiza internamente en relación al ARN viral y está unida a ácido miristílico en su extremo amino terminal (N-terminal) (Acharya y col., 1989).

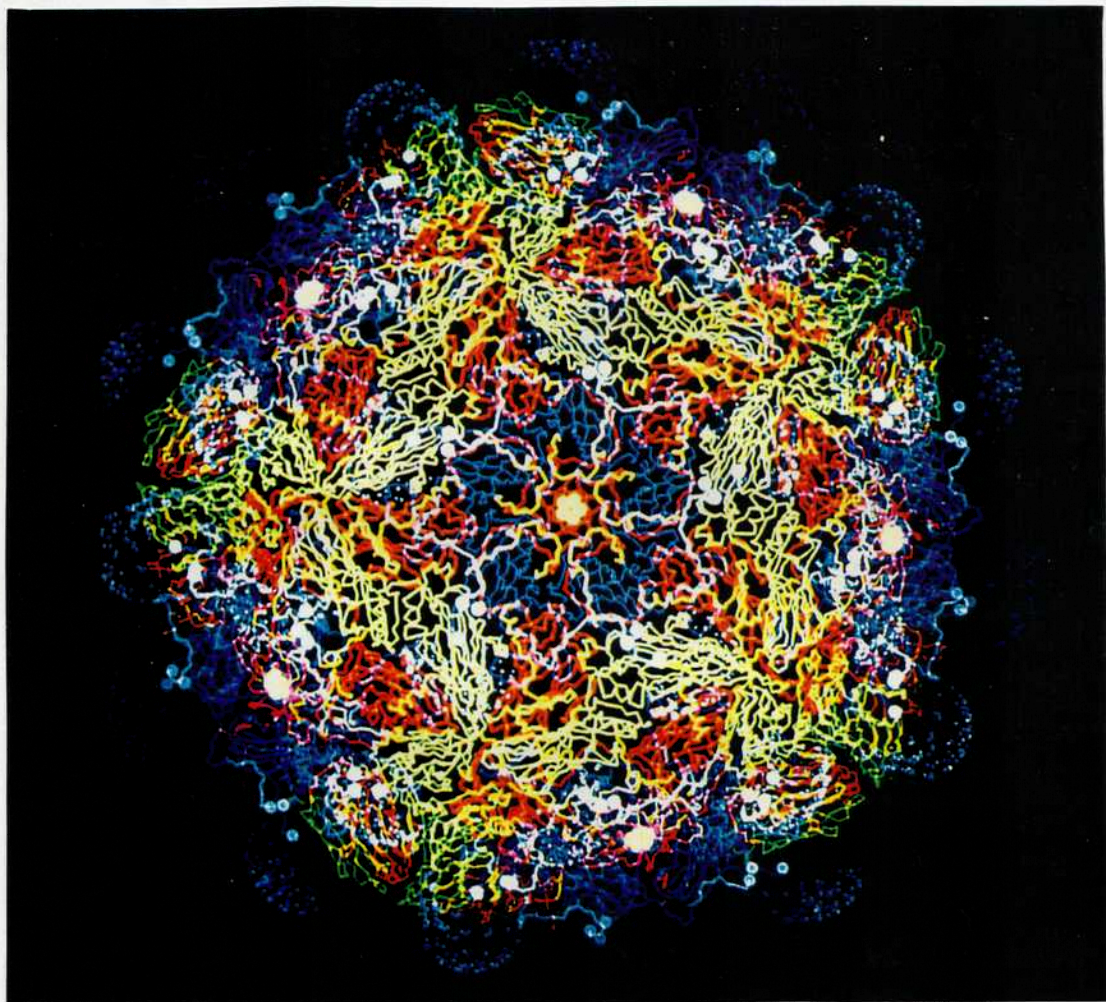


Figura N°4: Representación de la estructura a nivel atómico de la cápside del VFA O1K.

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 situadas en la superficie del virión corresponden a los aa 133-158 de VP1 (Acharya y col., 1989).

Se ha observado que VP1, VP2 y VP3, aunque tienen secuencias aminoacídicas diferentes, adoptan la misma configuración espacial de “barril β ”. Dicha estructura consiste en ocho cadenas con estructura secundaria de lámina ubicadas unas sobre otras y conectadas entre sí por bucles o “loops”, que sobresalen de la superficie, y por lo tanto quedan expuestas al medio externo. Las cadenas β forman las paredes del barril y se identifican con letras (A, B, C, etc.). Los “loops” se denominan según las letras de las cadenas β que conectan, así el “loop” G-H conecta las cadenas G y H. (Acharya y col., 1989).

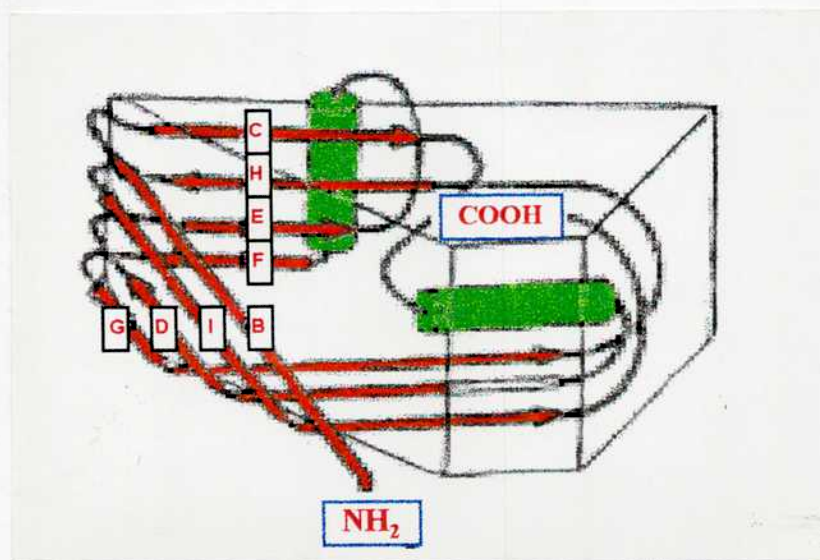


Figura 5: Representación esquemática de la estructura “barril β ” adoptada por VP1, VP2 y VP3.

Las hojas plegadas β están representadas por flechas e identificadas por letras (B a I). Las estructuras en forma de hélice α se representan como cilindros (Hogle y col., 1985).

La estructura de este “loop” G-H ha sido resuelta por adición del agente reductor ditioneitol a los cristales (Logan y col., 1993). La disociación de estos puentes disulfuro entre la Cys 134 de 1D y la Cys 130 de 1B le permite al “loop” adoptar una estructura más estable en el cristal. Otra característica dentro de la región 140 - 160 de 1D es la presencia del triplete RGD (Arginina - Glicina - Acido Aspártico) localizado en las posiciones 145 - 147, el cual se encuentra fuertemente conservado entre serotipos y representaría el sitio de unión del virus a la célula blanco. Se ha sugerido que la alta variabilidad de los residuos que flanquean la región RGD permiten la conservación de este triplete mientras ocurren cambios antigénicos (Fry y col., 1990).

El análisis de los sitios antigénicos de los Picornavirus ha sido realizado utilizando paneles de Ac monoclonales seroneutralizantes para seleccionar mutantes resistentes a la neutralización. El análisis de las secuencias de estos mutantes ha permitido identificar diferentes “clusters” de residuos dentro de cada sitio antigénico, los que se encuentran dentro del área de contacto de los Ac con el virus. Así, se han identificado 4 sitios antigénicos para el VFA tipo O1 K, dos de los cuales se encuentran ubicados en VP1. El sitio 1 está formado por los residuos 144-151, dentro de la región 140-160 (“loop” G-H), junto con el residuo 208 cerca del extremo carboxiterminal (C-terminal) de VP1. El sitio antigénico 3, se encuentra en el “loop” B-C de VP1, involucrando la secuencia entre los residuos 42 - 47. Además de estas regiones, se han identificado otras regiones que involucran epítopes conformacionales de otras proteínas de la cápside. Estas incluyen, el sitio 2 en el “loop” B-C de VP2, involucrando los residuos 72-77 junto con el residuo adyacente 131 (“loop” E-B) y el sitio antigénico 4 que incluye los residuos 56 - 58 de VP3, dentro de esta proteína. El análisis de otras cepas del VFA, han demostrado una distribución similar de los sitios antigénicos.

4.2.2- Estructura del genoma del VFA

El VFA posee una cadena simple de ARN, la cual esta poliadenilada en el extremo 3' (poli A) y unida covalentemente a una proteína viral de pequeño tamaño, VPg, también denominada 3B, en el extremo 5'. Una característica del genoma del VFA, compartida con los Cardiovirus, es la presencia de un tracto de residuos de citidinas, denominado poli-C, localizado aproximadamente hacia los 400 - 500 nucleótidos del extremo 5' no codificante. El

tamaño del poli-C es homogéneo dentro de la misma cepa viral, pero varía en longitud entre diferentes aislamientos (alrededor de 100 y 170 residuos). La función del poli-C es desconocida, si bien se ha intentado relacionar el tamaño de este segmento con la virulencia (Rueckert, 1985; Belsham, 1993).

El genoma es usualmente dividido en cuatro regiones codificantes, denominadas L, P1, P2 y P3 y contiene además una región no codificante, de aproximadamente 720 bases, cerca del segmento poli C. Dentro de esta región no codificante, se encuentra la estructura denominada secuencia interna de entrada del ribosoma (IRES), la que comprende cerca de 435 bases inmediatamente “upstream” (río arriba) del primer codón AUG de iniciación (Belsham y col., 1990; Kuhn y col., 1990).

El genoma contiene un único marco de lectura abierto, que codifica para una poliproteína de PM 258,9 kDa y de 2332 nucleótidos (Forss y col., 1984). La poliproteína completa nunca es observada dentro de las células infectadas debido a que ocurre una serie de procesos proteolíticos extremadamente rápidos, probablemente mientras la traducción esta ocurriendo, que dan lugar a 4 productos primarios, L, P1, P2 y P3 (Belsham, 1993).

El precursor P1 dará lugar a las proteínas de la cápside o estructurales, mientras que P2 y P3 son los precursores que luego de ser procesados darán lugar a las proteínas no estructurales, involucradas en la replicación del ARN viral (Belsham, 1993).

Existen dos sitios de iniciación de la traducción, separados por 84 nucleótidos. Los dos codones de iniciación AUG, se encuentran en el mismo marco de lectura y resultan en dos formas diferentes de la proteína L o “Leader”, ubicada en el extremo 5’ del precursor de la cápside (P1). El análisis de la secuencia nucleotídica ha revelado que estos dos codones de iniciación están presentes en los 7 serotipos y aunque el primer codón AUG (al inicio de la proteína Lab) no esta siempre en un contexto para iniciar eficientemente, ambas formas, Lab y Lb, que han sido detectadas en una reacción de traducción in vitro y en células infectadas. Las 2 formas diferentes, Lab (PM 23 kDa) y Lb (PM 16 kDa), tienen actividad de proteasas y se autoclivan en *trans* del extremo N-terminal del precursor de la cápside entre un dipéptido K-G (Lisina-Glicina). Ambas también inician el clivaje de la subunidad p220 del factor de iniciación eucariótico ribosomal, eIF-4F, resultando en la inhibición de la síntesis proteica celular sin

afectar la transcripción del ARN mensajero viral, la que puede ocurrir en presencia de p220 clivado (Belsham y col., 1990; Porter, 1993)

Hacia el extremo 3', sigue la región P1, que codifica para las cuatro proteínas estructurales, VP4, VP2, VP3 y VP1, también conocidas como 1A, 1B, 1C y 1D respectivamente, que van a constituir las subunidades de la cápside viral o protómeros. Luego siguen las regiones P2 y P3, que codifican para las proteínas no estructurales o funcionales involucradas en la replicación (Belsham, 1993).

La región P2, codifica para la proteína 2A, con actividad de proteasa. Esta es de solamente 16 aa de longitud entre el extremo C-terminal de 1D y el N-terminal de 2B, aún así se cliva en el extremo C-terminal de la región 2A, entre el precursor de la cápside (P1-2A) y el dominio replicativo de la proteína 2BC-P3, en la unión 2A/2B. Esta actuaría solamente en *cis* y luego sería clivada de la proteína de la cápside 1D por otra proteasa, 3C (Ryan Martin y col., 1991).

Las funciones de las proteínas codificadas por las regiones 2B y 2C aún no son bien conocidas. La proteína 2C y su precursor 2BC, estarían formando parte de un complejo proteico de replicación asociadas a membranas de vesículas inducidas por el virus, formadas de membranas del retículo endoplasmático rugoso, siendo la presencia de las vesículas y de la proteína 2C un prerequisite para la síntesis del ARN viral. El precursor 2BC estaría involucrado en la proliferación de las membranas llevando a la formación de las vesículas. La proteína 2C y su precursor 2BC, se unirían al ARN viral y unirían a éste a las membranas vesiculares, esta unión sería vía el precursor 3AB. Este complejo proteico anclaría al ARN viral para proveer la organización espacial correcta necesaria para la replicación (Bienz y col., 1990). La función de 2C parecería ser la de una helicasa, involucrada en la separación de las cadenas del ARN viral durante la replicación.

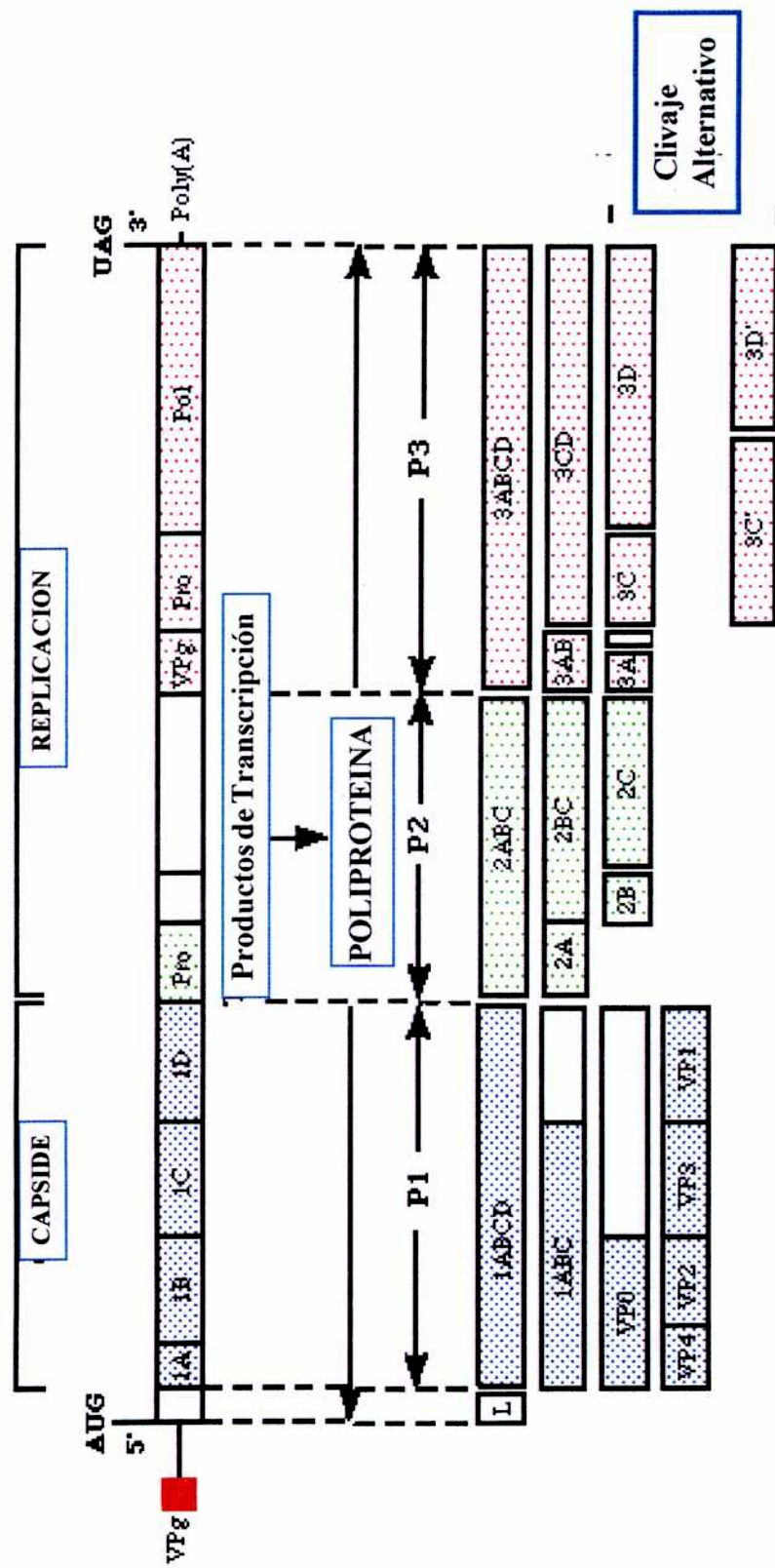
A partir de P3 se obtienen, 3B, también conocida como VPg, un pequeño péptido unido covalentemente vía tirosina al extremo 5' del ARN "full length" y de las cadenas nacientes de ARN. Esta proteína 3B puede aparecer en 3 formas en el VFA. La especie 3B1 es de 23 aa de longitud, mientras que 3B2 y 3B3 tienen 24 residuos, las tres han sido identificadas unidas al ARN viral en los viriones (King y col., 1981). Se ha observado también que VPg jugaría un rol en la síntesis del ARN viral.

El precursor 3AB, altamente hidrofóbico, actuaría en el anclaje del ARN viral a las membranas asociado con 2C, así como precursor de VPg (Porter, 1993).

La región 3C codifica para una proteasa, con una función crítica como la enzima responsable de la mayoría de los clivajes que llevan a la maduración de la poliproteína precursora, excepto por el clivaje de VP0 en VP4 y VP2, el cual ocurre por un mecanismo desconocido durante la encapsidación del ARN viral. La 3C también induce el clivaje específico de la histona H3 *in vivo* (Porter, 1993). Debido a que la parte deleteada de la histona H3 está en la región N-terminal, correspondiente al supuesto dominio regulatorio de la cromatina transcripcionalmente activa, parecería probable que este clivaje específico esté relacionado con la severa inhibición de la transcripción del ARN de la célula huésped, observada en células infectadas con el VFA.

La región 3D codifica para la ARN polimerasa - ARN dependiente, la cual tiene regiones de homología con todas las ARN y ADN polimerasas (Porter, 1993).

Figura N° 6: Organización y Expresión del Genoma del VFA.
(Rueckert, 1985).



4.2.3- Ciclo de replicación del VFA

El ciclo infeccioso del VFA es un proceso rápido que culmina en aproximadamente 2 horas y media. La infección en cultivos celulares comienza con la adsorción del virus a la célula, es un proceso reversible, y está gobernada por fuerzas electrostáticas, requiriendo de la presencia de iones bivalentes, Ca^{2+} y Mg^{2+} . Se ha observado que el agente quelante etilendiamin-tetra-acetato de sodio (EDTA), inhibe la adsorción del virus a la célula. La adsorción es dependiente de la temperatura, con una energía de activación de 6000 cal/mol (Bachrach, 1968). A 2°C o 4°C el virus permanece unido a la célula y puede ser liberado por tratamiento con EDTA sin destruir las células (Bachrach, 1968). A altas temperaturas, el virus adsorbido, penetra a las células por una reacción de primer orden y una energía de activación de 24000 cal/mol.

La proteína viral VP1, altamente conservada en todos los serotipos, estaría involucrada en la unión del virus al receptor celular. Como se comentó anteriormente, la secuencia RGD del “loop” G-H dentro de VP1, representaría el sitio de unión del virus a la célula blanco. Se ha observado que este mismo tripéptido RGD, es importante en la unión de proteínas de la matriz extracelular a varias integrinas (Hynes, 1992), especulándose que una integrina sería el receptor del VFA en la superficie celular, si bien no se puede descartar la posibilidad de que el virus use otros receptores. Además de unirse a sus propios receptores, algunos virus pueden infectar células a través de los receptores Fc en presencia de IgG específicas del virus. La formación de complejos Ag-Ac para el VFA, permiten al virus infectar células uniéndose a los receptores Fc expresados en las células a infectar (Mason y col., 1993).

El mecanismo por el cual el genoma viral ingresa a las células e inicia la infección es un proceso de endocitosis mediado por el receptor. Se ha demostrado que el medio ácido de los endosomas proporcionan el medio necesario para la ruptura del virus en las subunidades proteicas de coeficiente de sedimentación 12S, independiente de algún otro mecanismo, ya que el virus es capaz de disociarse a pH menor que 7, dejando el ARN genómico disponible para iniciar la replicación (Carrillo y col., 1984, 1985).

La replicación del genoma viral ocurre en el citoplasma celular, por la acción de la ARN polimerasa-ARN dependiente, e involucra la síntesis de cadenas complementarias de polaridad negativa, que constituye el templado para la síntesis de cadenas de ARN de sentido positivo. El

proceso de síntesis de cadenas de ARN de sentido positivo, lleva a la formación de un intermediario replicativo, compuesto de dos cadenas de ARN, el cual está asociado al retículo endoplasmático liso (Sangar, 1979).

Luego de la infección de las células con el VFA, se produce la inhibición de la síntesis de ARN y proteínas celulares como se detalló anteriormente (Belsham, 1993). El producto primario de la traducción es una poliproteína que corresponde a la totalidad de la región codificante. La poliproteína completa nunca es observada dentro de la célula infectada, debido a que los primeros clivajes tienen lugar durante la traducción, originando las 4 proteínas precursoras primarias (L, P1, P2 y P3). Las mismas a través de clivajes secundarios, mediados por proteasas virales, generarán las proteínas estructurales y las proteínas no estructurales que se encuentran en células infectadas.

Finalmente tiene lugar el proceso de empaquetamiento de las partículas virales. La entrada de la molécula de ARN en la procápside (partícula vacía), resulta en la formación del virión maduro de 146S (Harris y col., 1990), involucrando el clivaje de casi la totalidad de cadenas VP0 para dar VP4 y VP2, lo que lleva al reordenamiento de la cápside viral y constituye el último paso de la maduración viral (Rueckert, 1976). El ciclo culmina con la lisis celular y la liberación de las partículas virales al medio externo.

5- Respuesta Inmune

La respuesta inmune al VFA se manifiesta principalmente a través de una respuesta de Ac neutralizantes contra las proteínas estructurales VP1, VP2 y VP3, no reconociendo prácticamente a VP4, ya que ésta es una proteína interna.

La infección de bovinos susceptibles con el VFA, resulta en un rápido aumento de los Ac neutralizantes en el suero, el cual puede ser detectado desde los 3-4 días post-infección. Esta respuesta temprana comprende Ac del tipo IgM e IgA, es cruzada entre serotipos y alcanza el pico entre los 10 y 14 días antes de declinar a un nivel basal dentro de los 30-40 días (Salt, 1993). Luego ocurre un cambio en los isotipos y aumenta la respuesta de Ac, específica del serotipo, siendo ésta del tipo IgG, con títulos de IgA detectables. Las inmunoglobulinas del tipo IgG1 se detectan a los 4-7 días post-infección y son altamente específicas del serotipo infectante. El desarrollo de esta respuesta serológica coincide con la resolución de las lesiones,

terminación de la viremia y reducción en la excreción de virus. Los Ac neutralizantes alcanzan un pico cerca de los 28 días y permanecen con títulos equivalentes a protección de por vida para el serotipo contra el cual se han infectado, siendo susceptibles a los otros serotipos (Garland, 1974).

En comparación con la respuesta luego de una infección, la vacunación de los bovinos con vacunas inactivadas induce una respuesta protectora de vida corta, la cual dura no más de 3-6 meses luego de una única vacunación. Luego de la primovacuna, existe una respuesta temprana de Ac neutralizantes del tipo IgA e IgM, similar a la inducida por la infección, pero el desarrollo del pico de Ac está retrasado (Abu Elzeim y col., 1981).

Los terneros recién nacidos provenientes de madres vacunadas poseen Ac circulantes protectores IgG₁ pocas horas después de ingerir el calostro. Varios autores han demostrado que una cantidad adecuada de Ac conferidos a través del calostro protegen a los terneros jóvenes contra la infección hasta la edad de 2-4 meses (Sadir y col., 1988).

Se ha demostrado también que existe una correlación entre los títulos de Ac neutralizantes y protección a la infección conferida por vacunas inactivadas (Pay y col., 1992a, 1992 b).

En cuanto a la respuesta inmune celular en los animales infectados, las evidencias son controvertidas ya que es difícil detectar la presencia de células T colaboradoras específicas mediante pruebas de linfoproliferación.

Se ha observado que la respuesta T celular antígeno-específica, juega un importante rol en la regulación de la inducción y expresión de la respuesta inmune humoral frente al VFA. La regulación de esta respuesta de Ac es dependiente de la estructura de los sitios antigénicos del virus y de la presencia de epítopes Th, si bien una respuesta Th-independiente ha sido descrita (McCullough y col., 1992). Piatti y col. (1991), han demostrado que la respuesta contra el VFA es solamente Th-dependiente cuando bajas dosis de Ag están presentes. Este trabajo fue realizado en ratones, y no es conocido si una situación similar podría ocurrir en bovinos. McCullough y col. (1992), observaron que la mayor respuesta inmune protectora contra el VFA parecería requerir de una opsonización dependiente de Ac específicos del virus. La fagocitosis del virus se vería mejorada con la formación de estos complejos virus-Ac de

apropiada especificidad y afinidad, mediado por las células fagocitarias del sistema reticulo-endotelial.

Se ha descripto también la existencia de células T citotóxicas capaces de lisar las células infectadas en cultivos de linfocitos de bovinos vacunados, aunque el rol de estos mecanismos no ha sido completamente establecido (Amadori y col., 1992).

6- Diagnóstico de Fiebre Aftosa

Los síntomas y lesiones clínicas de las distintas enfermedades vesiculares (FA, Estomatitis Vesicular, Enfermedad Vesicular del Cerdo, Exantema Vesicular) son tan parecidos que resulta casi imposible llevar a cabo un diagnóstico diferencial entre las distintas enfermedades vesiculares a partir de la sintomatología clínica, siendo necesaria la confirmación laboratorial (Geering y col., 1995).

El diagnóstico y caracterización de los virus responsables de los brotes de la enfermedad supone un requisito imprescindible para la puesta en marcha de las medidas preventivas, la eventual elección de una vacuna y la determinación de la procedencia del virus (Manual of Standards, OIE, 1992).

La necesidad de un diagnóstico rápido y seguro se impone debido a la alta contagiosidad de las enfermedades vesiculares, especialmente FA. La rapidez en detectar los brotes de la enfermedad a campo a través de un diagnóstico de laboratorio es importante para el buen funcionamiento de los programas de erradicación, así como soporte de la vigilancia epizootiológica.

Si bien el número de focos ha sido y es un indicador directo de la situación epidemiológica de la enfermedad, en regiones que se encuentran bajo planes de vacunación, como lo es Argentina, donde la aparición de focos no es evidente (último foco registrado: abril 1994), los estudios epizootiológicos utilizando métodos indirectos resultan de utilidad para la evaluación de la actividad viral. La identificación de animales infectados permite realizar estudios prospectivos y retrospectivos y tomar medidas correctas a fin de controlar y disminuir la actividad viral (Fondevila y col., 1992; León y col., 1994).

El diagnóstico consiste tanto en la detección del virus o del Ag viral y su tipificación, como en la detección de Ac. Nuevos métodos han sido desarrollados para la identificación del

ARN viral en tejidos infectados así como para generar suficiente ADN complementario (ADNc) de muestras clínicas para los estudios de secuenciación.

6.1- Detección del Virus de la Fiebre Aftosa

6.1.1- Aislamiento viral

Hasta 30 años atrás, el método utilizado para el aislamiento viral era la inoculación de ratones lactantes de 7 días de edad con la suspensión original de la muestra sospechosa (generalmente tejido epitelial procesado), por vía intraperitoneal, observándose parálisis o muerte de los ratones luego de 2-5 días postinoculación. Generalmente era necesario realizar un alto número de pasajes antes de observar muerte de los ratones inoculados o producir suficiente Ag viral para dar un resultado positivo por Fijación de Complemento (FC).

Posteriormente, monocapas de diferentes cultivos celulares han sido utilizadas para el aislamiento de cepas de campo del VFA, mostrando una sensibilidad mayor que los ratones lactantes así como una identificación más rápida.

En la actualidad la detección de virus se realiza en muestras de LEF con el método de la copa “probang” (van Bekkum y col., 1959; Suttmoller y col., 1965), siendo el método aceptado para la detección de infecciones persistentes por el VFA (Hedger y col., 1971). Si bien la técnica es poco sensible, laboriosa y costosa, aún sigue siendo utilizada. Se ha mejorado la sensibilidad del sistema original incluyendo el pretratamiento de las muestras de LEF con triclorotrifluoroetano (TTE) antes de la inoculación en cultivos de tejidos, que rompe los complejos Ag-Ac en los fluidos (Suttmoller y col., 1967) y con el uso de cultivos primarios de tiroides bovina resultando ser el sistema de detección más sensible, de gran utilidad para la detección y amplificación del virus (Donn, 1994). Los cultivos primarios de tiroides bovino, así como de línea IBRS-2, son los sistemas celulares que actualmente se utilizan de rutina para el aislamiento viral. Células de riñón bovino así como la línea BHK-21 han sido utilizadas también para el aislamiento viral (Ferris y col., 1992).

6.1.2- Fijación de Complemento y ELISA

La FC ha sido el ensayo de elección para la identificación del VFA a partir de aftas o líquido vesicular de las mismas. La rapidez y certeza de este método depende en gran parte de la calidad del material recogido. Durante años esta técnica se ha utilizado de forma rutinaria en los distintos laboratorios de diagnóstico de enfermedades vesiculares. Si bien la detección directa del virus en muestras de campo y su tipificación por FC es muy rápida, el método sufre de varias desventajas, entre ellas la necesidad de disponer de muestras que provengan de vesículas frescas, rotas recientemente y en cantidad suficiente dada la relativa falta de sensibilidad del ensayo, así como los problemas de interpretación por la actividad anticomplementaria que presentan algunas muestras.

Esto ha llevado al desarrollo y adaptación de diferentes métodos de ELISA tipo “sandwich” indirecto, que han mejorado significativamente la sensibilidad y la eficiencia de un diagnóstico primario y confirmatorio para la detección del Ag (Ferris y col., 1992). Un método de ELISA “sandwich” indirecto, de tipificación, modificación del ELISA de Hamblin (1986a), descrito por Roeder y Le Blanc Smith (1987) reúne las condiciones suficientes como método alternativo de la FC para la detección del Ag viral.

Por otro lado la producción de sueros de referencia para tipificación a través del uso del Ag 146S del VFA purificado e inactivado, ha mejorado la calidad de los reactivos y la eficiencia para estudios de tipificación.

6.2- Detección del Genoma del virus de la Fiebre Aftosa

La aplicación de técnicas de biología molecular para la detección de animales portadores o “carriers”, es de gran utilidad ya que permite la detección del genoma viral aún en ausencia de infectividad en tejidos celulares y/o animales de laboratorio.

Usando la técnica de Hibridización (Dot-blot), Rossi y col. (1988), detectaron fragmentos de ARN viral en muestras de LEF de animales “carriers”, tomadas entre los 180 y 560 días postinfección, aún cuando no había sido posible aislar el virus por los métodos convencionales.

La detección específica de genomas virales en LEF mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (House y col., 1993), así como la hibridización “in situ” para la

detección en tejidos animales, han sido incorporados como métodos complementarios de gran aplicación (Brown y col., 1992). Estas técnicas resultan mucho más sensibles que los métodos de aislamiento estandares y podrían ser usadas para la rápida detección de nuevos serotipos del VFA en muestras clínicas, pudiendo jugar un rol importante como métodos de diagnóstico rápido (Donn y col., 1994; Prato Murphy y col., 1994).

6.3- Detección de Ac contra el virus de la Fiebre Aftosa

La determinación de Ac frente al VFA en muestras de suero es importante para la detección de una infección, para análisis de sueros de animales con vistas a la importación / exportación, como un indicador indirecto de pruebas de potencia de vacunas en bovinos, así como para la medición de la eficacia de la vacunación a campo.

La respuesta inducida por las vacunas en uso (virus inactivado) es contra las proteínas estructurales, mientras que luego de la infección es posible detectar una respuesta tanto contra proteínas estructurales como no estructurales, lo que permitiría diferenciar una respuesta de otra. Por otro lado la respuesta de Ac inducida por una infección es de mayor duración cuando se la compara con la respuesta inducida por la vacunación (meses).

6.3.1- Detección de Ac contra Proteínas Estructurales del virus de la Fiebre Aftosa

La prueba serológica más utilizada para la detección de Ac ha sido la seroneutralización (SN) que permite detectar Ac contra los 7 serotipos del VFA. Esta es sensible, específica y relativamente sencilla de llevar a cabo como un método de rutina para medir Ac. Los títulos en suero son fácilmente medibles y se lo puede relacionar con enfermedad y protección luego de la vacunación, pudiendo ser aplicado en estudios seroepidemiológicos, si bien la interpretación de los resultados puede ser dificultosa. Uno de los inconvenientes de la SN es la dependencia de cultivos celulares, ya que estos pueden presentar problemas de contaminaciones, escaso crecimiento y de variación en la sensibilidad; así mismo ciertos sueros pueden resultar tóxicos para los cultivos celulares. El otro inconveniente es que la técnica requiere aproximadamente tres días de incubación antes de poder leer los resultados.

Varios métodos de ELISA han sido utilizados por varios grupos de trabajo para detectar y determinar título de Ac en suero de animales infectados o vacunados con el VFA. Abu Elzein

y col., (1978), Crowther y col., (1980) y Franz y col., (1982), utilizando un ELISA indirecto, determinaron títulos de Ac a partir de curvas de calibración estándares. Se ha desarrollado un método de ELISA en “sandwich” reverso en el cual los resultados se expresan como relaciones de densidades ópticas (Have y col., 1983). Si bien estos métodos no son todos de igual sensibilidad, y los resultados pueden obtenerse en un día, la correlación entre los títulos obtenidos por la SN y estos ELISAs varía.

Hamblin y col., (1986a, 1986b), desarrollaron un método de ELISA en reemplazo de la SN, conocido como ELISA “sandwich” de bloqueo en fase líquida (ELISA F-L) que ha pasado a ser la técnica más utilizada para la detección de Ac tipo específicos. Este método es sensible, específico y reproducible, además los resultados pueden ser directamente correlacionados con los obtenidos por la técnica de SN. Por otro lado elimina el requerimiento de cultivos celulares y da un menor porcentaje de resultados falsos positivos. Una ventaja adicional de este método es que el Ag utilizado puede ser inactivado.

6.3.2- Detección de Ac contra Proteínas no Estructurales del virus de la Fiebre Aftosa

La actividad viral se evalúa determinando la prevalencia de animales que han sufrido infección con el VFA, mediante la detección de Ac contra el antígeno asociado a la infección viral (VIA), descrito por primera vez por Cowan y Graves en 1966.

Este Ag se ha denominado así ya que solamente es encontrado si el virus ha replicado en animales o en tejidos celulares, y se refiere a un complejo proteico cuyo mayor componente es la ARN polimerasa o proteína 3D (Polatnick y col., 1967; Polatnick 1980). El hecho de que el Ag VIA resulta de la replicación del virus es sugerido por la existencia de Ac anti-VIA en suero de animales infectados. Estos animales desarrollan niveles de Ac anti-VIA detectables por IDAG desde los 7 días postinfección hasta por lo menos 18 meses postinfección (McVicar y col., 1970; Alonso y col., 1975; Rosenberg, y col., 1976; Estupiñán y col., 1978; Alonso y col., 1988; Gebauer y col., 1988; Neitzert y col., 1991; Bergman y col., 1993). En pocos animales se ha visto que los Ac persisten menos de 2 meses o no se presentan, Alonso y col., (1975) observaron un animal negativo para Ac contra el Ag VIA en un grupo de 12 bovinos infectados aún cuando todavía aislaban virus de LEF.

Debido a la naturaleza altamente conservada de la polimerasa entre todos los serotipos (Newman y col., 1979), el Ag y los Ac contra el Ag VIA se caracterizan por ser específicos del VFA pero no de tipo. La infección con alguno de los serotipos del VFA puede ser detectado por un único método serológico usando el Ag VIA semipurificado o la proteína 3D purificada como Ag, siendo útil en estudios epizootiológicos especialmente en áreas donde uno o más serotipos virales podrían estar involucrados, (A, O y C) para la detección de animales que hayan cursado o estén cursando una infección viral.

En 1970, McVicar y Suttmoller evaluaron el método de IDAG, utilizando el Ag VIA semipurificado, como un método para detectar Ac contra el Ag VIA en un estudio retrospectivo con sueros de animales categorizados, demostrando que la presencia de Ac contra el Ag VIA es indicativo de infección previa. Además demostraron que el método otorga una rápida y segura medida para distinguir entre animales infectados de no infectados. Alonso y col. (1975) así como Rosenberg y col. (1976), mostraron resultados similares en ensayos serológicos en América del Sur.

La IDAG ha sido el método más usado durante los últimos 25 años para la identificación de Ac contra el Ag VIA (Cowan y col., 1966; Hedger, 1968; McVicar y col., 1970; Lobo y col., 1976; Dawe y col., 1978; Alonso y col., 1984). Esta técnica, es una herramienta útil en el monitoreo de campañas de control y erradicación, como un indicador de la actividad viral a nivel poblacional (Fondevila y col., 1992, León y col., 1994), así como para controlar importaciones / exportaciones.

Si bien este método es altamente específico, simple de realizar, rápido y económico, pudiendo ser realizado en laboratorios de baja complejidad, su baja sensibilidad y la necesidad de manipular material infeccioso para la producción del Ag motivó el desarrollo de otras metodologías, como diferentes ensayos de ELISA, tanto indirecto como de competición en FL, Radioinmunoprecipitación (RIP) y “Western blot” utilizando Ag semipurificados y purificados obtenidos por bioingeniería (Villinger y col., 1989; Berger y col., 1990; Neitzert y col., 1991; Bergmann y col., 1993; Mackay y col., 1994; Lubroth y col., 1995).

Villinger y col (1989), desarrollaron un ELISA indirecto para la identificación de Ac contra el Ag VIA en suero de bovinos. El método utiliza el Ag VIA, expresado en *E.coli* por técnicas de ADN recombinante. Este método comparado con la técnica de IDAG resultó de

baja especificidad, por lo cual concluyen que podría ser aplicado para ensayos de determinación de prevalencia e incidencia de Ac anti-VIA en zonas libres.

Alonso y col., (1990), describieron una técnica de ELISA en F-L para la detección de Ac contra el Ag VIA, utilizando el Ag semipurificado, similar a la previamente descrita por McCullough y col., (1985) y Hamblin y col., (1986a), para la detección de epítopes y Ac específicos del VFA. El ELISA resultó altamente específico al igual que la IDAG, pero es más eficiente para detectar bovinos expuestos al virus, por cuanto ellos sugieren que éste método podría ser una herramienta más satisfactoria para el apoyo de programas de prevención, control y erradicación de la enfermedad.

Sin embargo se ha descrito la detección de Ac contra el Ag VIA en animales vacunados. Si bien los datos observados son muy variables, el nivel de Ac y su persistencia son menores que en animales infectados (Alonso y col., 1990, O'Donnell y col., 1996, O'Donnell y col., 1997). Diversos autores han descrito que la aplicación de vacunas inactivadas con alta concentración de Ag inducen la formación de Ac contra el Ag VIA (Estupiñán y col., 1970; Alonso y col., 1975 ; Dawe y col., 1978; Pinto y col., 1979; Ahl y col., 1986). Alonso y col., (1975), observaron que vacunas formuladas con virus inactivado con formol son más inductoras de Ac anti-VIA que las inactivadas con Acetiletlenimina (AEI). Además, animales vacunados con vacunas con hidróxido de aluminio como adyuvante dieron un mayor número de reacciones positivas para Ac contra el Ag VIA comparadas con vacunas con adyuvante oleoso (Alonso y col., 1988). Asimismo otros grupos de trabajo no han encontrado reactividad positiva contra el Ag VIA en animales con múltiples dosis de vacunas con hidróxido de aluminio, e inactivadas con BEI (Neitzert y col., 1991; Villinger y col., 1989; Schudel y col., 1984). La explicación a esta discrepancia estaría dada por los diferentes métodos de producción de vacunas antiaftosa y su concentración.

El origen de esta respuesta es atribuida a la presencia de trazas de la polimerasa viral (3D) en la vacuna, la cual puede ser antigénica y luego de sucesivas vacunaciones puede sensibilizar a los animales y resultar en una respuesta de Ac contra el Ag VIA (Lobo y col., 1977). Resulta pues necesario estudiar el conocimiento de la respuesta de Ac anti-VIA por vacunaciones únicas o múltiples y la duración de esa respuesta a campo con las vacunas actualmente en uso utilizando los métodos convencionales.

Si bien se han detectado reacciones positivas en bovinos vacunados, varios estudios serológicos poblacionales (Boletín Estadístico 1991, SENASA) han demostrado que en zonas bajo planes de vacunación la prevalencia de Ac anti-VIA determinada por la técnica de IDAG ha disminuido.

Rosemberg y col. (1976), concluyen que en países con planes de vacunación en gran escala contra el VFA una disminución de la reacción positiva para el Ag VIA sería el mejor indicador de un cambio en la tasa de infección. En nuestro país estudios realizados en la provincia de Buenos Aires (Cuenca del Salado), demuestran una disminución significativa en la tasa de Ac anti-VIA en las categorías de terneros y adultos asociado a implementación de planes de vacunación y a disminución de focos en esa región (Fondevila y col., 1992; Späth y col., 1994; Boletín COPROSA 1994).

La presencia del Ag VIA ha sido demostrada en el sobrenadante de cultivos celulares usados para la preparación de vacunas con Ag inactivado con AEI y concentrado por centrifugación zonal. Rowlands y col. (1969), demostraron la presencia de un Ag interno en partículas virales muertas, el mayor componente de las vacunas, el que produce Ac que también reaccionan contra el Ag VIA. Estudios más recientes han confirmado que la polimerasa estaría empaquetada dentro del virión maduro como un componente menor, en un 20% de las partículas virales (Newman y col., 1994) y resulta en la producción de Ac anti-3D.

Varios grupos de trabajo han apuntado su interés al estudio de otras proteínas no estructurales (PNE) del VFA, tratando de identificar Ac indicativos de infección viral, que permitan discriminar entre bovinos infectados y vacunados.

Berger y col. (1990), utilizando la técnica de RIP de proteínas del VFA inducidas en cultivos celulares de línea BHK-21 infectados, demostraron patrones diferenciales entre animales infectados y vacunados. En estos estudios, las proteínas 2C, 3AB₁ y 3AB_{1,2} eran precipitadas ocasionalmente junto con todas las proteínas estructurales y la proteína 3D por sueros de bovinos vacunados, concluyendo que las vacunas contienen además del virión inactivado, PNE, y que algunas de éstas últimas, serían antigénicas. Sus resultados con sueros de animales infectados difieren claramente de los obtenidos con sueros de animales vacunados, observándose Ac contra diferentes PNE. De acuerdo a sus resultados, se recomienda el uso de

las proteínas 2C, 2B, 3AB₁ y 3C como posibles Ag para la detección de animales infectados independientemente si han sido vacunados o si demuestran signos clínicos de la enfermedad.

Neitzert y col. (1991), utilizan la proteína 3D expresada en *E.coli* para la detección de Ac en sueros de animales infectados persistentes por “Western blot”, no encontrando reacciones positivas para Ac anti-3D en animales vacunados. Por otro lado, sueros de animales convalecientes reaccionaron específicamente contra otras PNE, estableciendo que los Ac contra los péptidos 3A y 3B podrían servir como marcadores complementarios en la detección de animales portadores o “carriers”.

Bergmann y col. (1993), desarrollaron un método de inmunoelectrotransferencia asociado a enzimas (EITB) utilizando las PNE 3ABC, 3D, 3B, 3A, 2C del VFA, expresadas en *E. coli* como marcadores de infección. Por éste método fue posible detectar Ac frente a éstas proteínas en animales expuestos al virus aún cuando la detección de Ac anti-VIA por IDAG era negativa, postulando este sistema para diferenciar reaccionantes por vacunación de infección, no detectando Ac contra 2C y 3D en suero de animales vacunados que habían recibido las vacunas estandares.

Ensayos similares fueron realizados por Rodriguez y col. (1994), en cerdos y Silberstein y col. (1997), en bovinos, aplicando las técnicas de “Western blot” y ELISA, utilizando las proteínas 3ABC y 3AB₁ respectivamente expresadas en *E. coli* como Ag. Sus resultados apoyan el uso de estas proteínas para la detección de animales convalecientes y su diferenciación con animales vacunados.

Lubroth y col. (1995), trabajando con un número limitado de animales, demostraron que bovinos y porcinos vacunados contra el VFA podían ser distinguidos de animales convalecientes, aplicando la técnica de RIP. Además de las proteínas estructurales, las PNE 2C, 3ABC, 3C, 3CD y 3D eran precipitadas por el suero de animales convalecientes, mientras que de estas últimas solamente la proteína 3D era precipitada por sueros de animales vacunados luego de una única dosis y desde los 19 - 23 dpv. En ningún caso la proteína 2C fue precipitada por sueros de animales vacunados, aún luego de 3 vacunaciones, estando presente en suero de bovinos y porcinos convalecientes hasta los 365 días postinfección. Esta observación se explica, debido a que 2C está estrechamente asociada a las membranas de las células infectadas para la producción de virus empleado en las vacunas (Lubroth y col., 1995;

Lubroth y col., 1996). A diferencia de la proteína 2C, la proteína 3D es liberada al medio, y no es removida luego de la centrifugación o filtración durante la producción de las vacunas, lo que estimularía una respuesta inmune en animales vacunados.

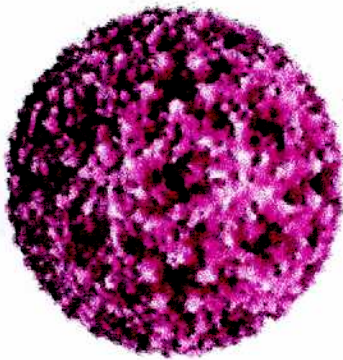
Meyer y col. (1997), desarrollaron un método de ELISA indirecto, utilizando como Ag la proteína 2C expresada en baculovirus. Este método sería rápido y confiable para el diagnóstico de animales convalecientes y su diferenciación con animales vacunados.

De Diego y col. (1997), presentaron un método de ELISA indirecto, altamente sensible y específico, capaz de detectar Ac contra la poliproteína 3ABC, el cual sería de aplicación para la identificación de animales infectados con el VFA en estudios serológicos a gran escala.

Recientemente, Mackay y col. (1998), han desarrollado un método de ELISA que es capaz de detectar Ac contra un grupo de PNE (Lb, 2C, 3A y 3D) y la poliproteína 3ABC. Ellos concluyen que la detección de Ac contra la poliproteína 3ABC, generalmente asociada con una respuesta a alguna/s de las proteínas no estructurales Lb, 2C, 3A o 3D, es evidencia conclusiva de infección previa con el VFA, a excepción de animales más viejos con múltiples vacunaciones. Tales animales no podrían diferenciarse de animales infectados, si bien son raros y estarían bien definidos en estudios epidemiológicos en cuanto a su edad e historia sanitaria.

Como puede observarse, varios grupos de trabajo han presentado diferentes métodos para la identificación de animales infectados, aunque hasta el día de hoy, no existe un método serológico validado internacionalmente que permita distinguir entre Ac inducidos por la vacunación de aquellos resultantes de una infección. Muchos de los trabajos presentados utilizan un número limitado de sueros en los ensayos realizados, por lo que sería necesario la evaluación y aplicación en estudios a gran escala.

En base a estas observaciones es que resulta de gran importancia el desarrollo, evaluación y validación de otros métodos que utilicen las proteínas no estructurales como Ag, a fin de seleccionar el más eficiente para la detección de animales infectados y su diferenciación con animales vacunados, así como para apoyar los estudios epidemiológicos de los Planes de Control y Erradicación de la enfermedad que se están desarrollando en diferentes regiones.



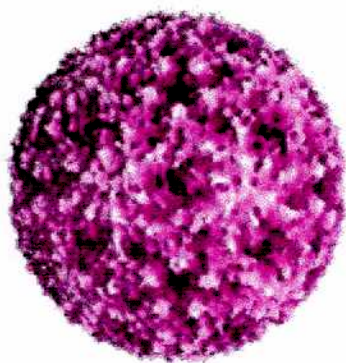
OBJETIVOS

II.- OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis es el desarrollo y la evaluación de un método serológico que permita la identificación de animales infectados con el virus de la Fiebre Aftosa, utilizando antígenos biosintéticos.

Para cumplir con este objetivo se siguieron los siguientes objetivos parciales:

- Expresión y purificación de las proteínas no estructurales GST-3D y GST-2C del virus de la Fiebre Aftosa en *Escherichia coli* como sistema de expresión.
- Desarrollo de los métodos de ELISA en fase-líquida (ELISA-3D) y "Western blot" utilizando como antígenos proteínas no estructurales del VFA.
- Evaluación y validación del método de ELISA-3D con sueros categorizados y su aplicación en estudios a campo.
- Evaluación de la proteína GST-2C utilizando el método de "Western blot" con sueros categorizados.
- Comparación de los resultados obtenidos por los métodos desarrollados con el método de IDAG, actualmente utilizado para la detección de actividad viral.



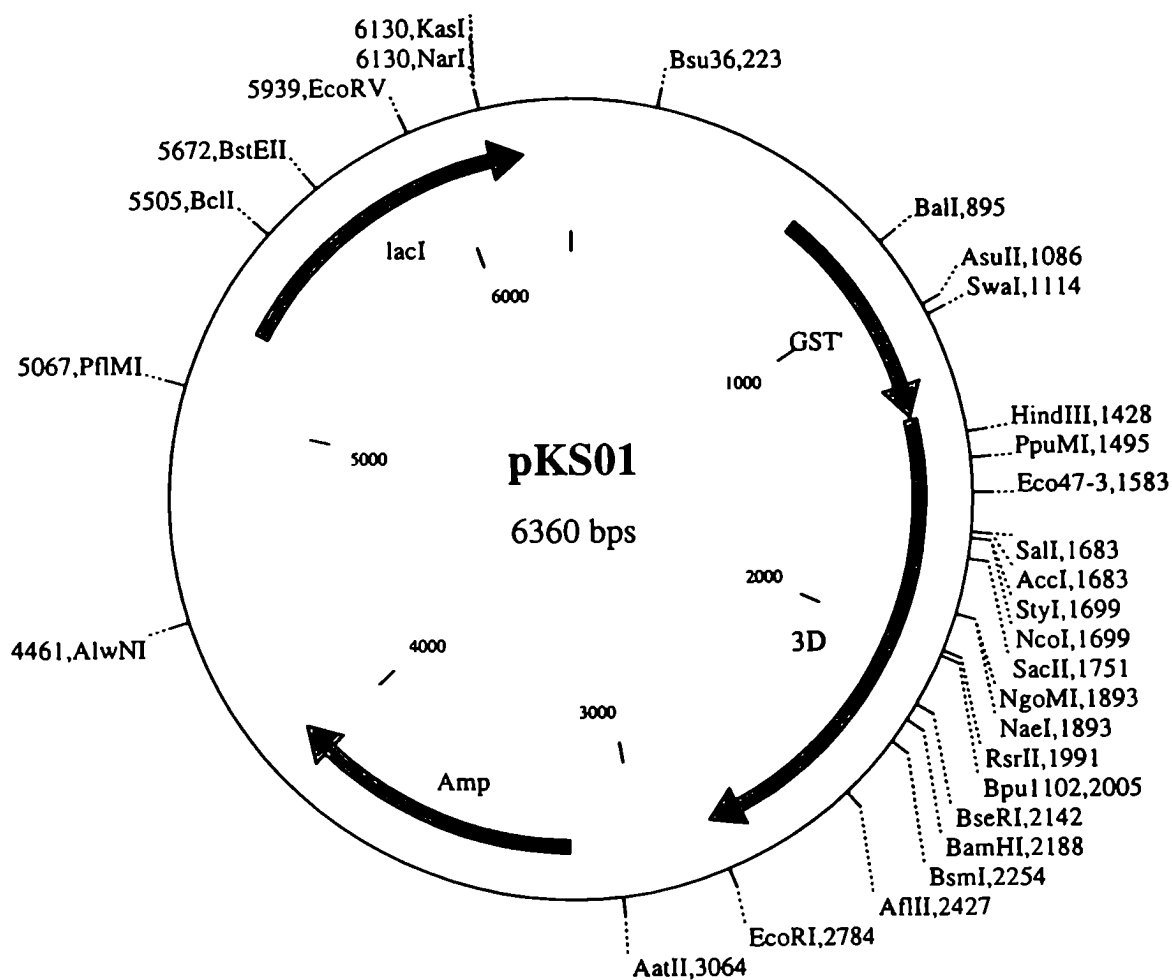
MATERIALES Y METODOS

III.- MATERIALES Y METODOS

1- Expresión de la proteína 3D en *E. coli* como sistema de expresión

Como fuente para la expresión de la proteína 3D, se utilizó el gen correspondiente a la secuencia de ADN complementario de la proteína 3D, bases 1 a 1416 de los 1512 pares de bases de la secuencia completa, del serotipo A 12 del VFA, clonado en el vector de expresión pGEX-2T, plásmido recombinante pKSO1. El plásmido de expresión pGEX-2T codifica para la enzima Glutation-S-transferasa (GST), obteniéndose proteínas de fusión a GST. El plásmido recombinante pKSO1 (Figura N° 7), fue provisto gentilmente por el Dr. David Boyle (CSIRO - AAHL).

Figura N° 7: Plásmido recombinante pKS01.



Esquema del plásmido recombinante pKS01, obtenido del clonado del gen de la proteína 3D del serotipo A12 del virus de la Fiebre Aftosa en el vector de expresión pGEX-2T.

1.1- Transformación de *E. coli* con pKSO1

El plásmido recombinante pKSO1 se utilizó para la transformación de células *E. coli* DH5 α electrocompetentes (Gibco BRL, Australia). Estas células se seleccionaron por la alta eficiencia de transformación. Diez microlitros (10 μ l) del plásmido se adicionaron a 40 μ l de las células competentes en un tubo y se transfirieron a una cubeta fría (*Escherichia coli* “pulser cuvettes”, BIO-RAD), agitando la suspensión hasta el fondo de la cubeta. Se aplicó un pulso de 1.8 Kvolts e inmediatamente se adicionó 1 ml de medio SOC (Apéndice) transfiriéndose la suspensión celular a un tubo e incubándose durante una hora a 37°C a 220 revoluciones por minuto (rpm). También se realizó una reacción de transformación con 50 μ g del plásmido nativo pGEX-2T como control. Diferentes alícuotas (5, 20, 50 y 100 μ l) de la transformación se plaquearon en placas de agar Luria con ampicilina y glucosa (Apéndice) y se incubaron toda la noche a 37°C. Se picó e inoculó un número de las colonias en tubos de 15 ml conteniendo 5 ml de medio de crecimiento Luria/ampicilina/glucosa (Apéndice) y se incubó durante 17 horas a 37°C a 220 rpm. De estos cultivos se prepararon “stocks” mezclando 350 μ l del cultivo con 150 μ l de Glicerol 50% (Apéndice) que se conservaron a -80°C.

Para confirmar el éxito de la transformación y de la incorporación del plásmido conteniendo el gen de la proteína 3D, se realizaron mini-preparaciones de ADN con el método de extracción de lisis alcalina (Sambrook y col., 1989). Las células de *E. coli* inoculadas en tubos de 15 ml, se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 minutos (min) a 4°C en una centrífuga de mesa refrigerada (IEC CENTRA-7R). Se descartó el sobrenadante y el “pellet” se resuspendió en 1 ml de Solución 1 (Apéndice), se transfirió a un tubo y se centrifugó a 14000 rpm durante 30 segundos. El sobrenadante se descartó y el “pellet” se resuspendió en 100 μ l de Solución 1. Luego se agregó 100 μ l de Solución 1 / lisozima (Apéndice), se agitó e incubó por 5 min a temperatura ambiente (TA). Se agregó 400 μ l de la Solución 2 (Apéndice) mezclando por inversión, y se incubó a 4°C durante 5 min. Luego de la adición de 300 μ l de acetato de potasio 3M/5M (Apéndice), se mezcló por inversión e incubó 5 min en hielo. Las muestras se clarificaron a 14000 rpm durante 30 segundos y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio donde se adicionó 500 μ l de fenol/cloroformo (Apéndice). La mezcla se agitó, se centrifugó a 14000 rpm por 5 min y el sobrenadante se transfirió a otro tubo limpio. Luego se adicionó 600 μ l de isopropanol, mezclándose suavemente y se incubó 5 min a TA. Los

plásmidos se centrifugaron a 14000 rpm entre 30 - 40 min. Los “pellets” se lavaron con etanol al 70%, se secaron, se redisolviaron en 50 µl de TE / ARNasa 40 µg /ml (Apéndice), se incubaron a 37°C por 30 min y se guardaron a 4°C. Para confirmar la presencia del inserto en el plásmido, se realizó una digestión con la enzima de restricción EcoRI. Como control se digirió también el plásmido pGEX-2T para poder identificar el recombinante pKSO1. Las muestras se sembraron en un gel de agarosa al 0.8% y las bandas de ADN, teñidas con bromuro de etidio, se visualizaron sobre una fuente de luz UV. Los plásmidos que contenían el inserto se analizaron también por doble digestión con las enzimas EcoRI/SalI y EcoRI/HindIII para determinar el tamaño del inserto, así como la orientación.

1.2- Inducción de la expresión y purificación de la proteína de fusión GST-3D

Los stocks de *E. coli*, cepa DH5α, transformados con pKSO1, crecieron durante 17 horas a 37°C en 20 ml de medio de crecimiento Luria/ampicilina/glucosa a 220 rpm. Los cultivos se centrifugaron a 2500 rpm por 5 min, el sobrenadante se descartó y el “pellet” se resuspendió en 20 ml de medio de crecimiento sin glucosa. Posteriormente se utilizó una dilución 1/10 de este cultivo, 200 µl de cultivo en 1.8 ml de medio fresco, y se lo incubó a 37°C por una hora a 220 rpm. La expresión de la proteína se logró por el agregado de 2 µl de isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) 100mM (Apéndice), continuándose con la incubación durante 2 horas y media a 37°C a 220 rpm.

Las células se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 min, resuspendiendo el “pellet” en un volumen final de 50 µl PBSA (Apéndice), al que se le agregó 100 µl de Triton-X100 (10%) así como ARNasa y ADNasa a una concentración final de 0.1mg/ml. Las células se sonicaron en hielo, 3 ciclos de 10 segundos cada uno al 70%, se centrifugaron y los “pellets” se almacenaron a -80°C para su estudio en geles de poliacrilamida - SDS (SDS-PAGE) y “Western blot”. El sistema de expresión pGEX-2T, se utilizó para hacer posible la purificación de la proteína de fusión GST-3D.

Para la expresión de la proteína y su purificación, se prepararon cultivos de 800 ml, los que fueron inoculados con la cepa DH5α de *E. coli* transformada con el plásmido pKSO1. Para ello, cultivos de un volumen de 80 ml de medio de crecimiento (Apéndice), fueron incubados más de 17 horas a 37°C, a 220 rpm. Una dilución 1/10 de este cultivo, en un

volumen final de 800 ml de medio de crecimiento fresco, se incubó a 37°C durante 1 hora. La expresión de la proteína se indujo con el agregado de 800 µl de IPTG 100 mM durante 2.5 horas. Luego de la inducción, las células se centrifugaron y resuspendieron por duplicado en 4 ml de PBSA frío, al que se agregaron 400 µl de Triton-X100 (10%) por tubo. Las células se sonicaron en hielo, 3 ciclos de 10 segundos cada uno al 70%. Luego de incubar 10 min. en hielo, las muestras se centrifugaron a 9000 rpm durante 5 min, a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y la proteína se purificó por afinidad, incubándose con 1ml de perlas de glutation agarosa 50% (Sigma, Apéndice) durante 2 min. Luego de la adsorción, las perlas se lavaron 3 veces con PBS y la proteína se eluyó por competición con glutation reducido libre (Sigma), mediante dos lavados de 2 min cada uno en 1ml de buffer de elusión (Sigma, Apéndice). La proteína purificada se fraccionó en alícuotas de 0.5 ml que se conservaron a -80°C.

2- Detección de anticuerpos contra la PNE 3D del VFA

2.1- ELISA-3D

La detección de Ac contra la proteína 3D del VFA se realizó básicamente utilizando el método de ELISA en F-L previamente descrito por Alonso y col. (1990), con algunas modificaciones. Se utilizó como antígeno la proteína 3D del VFA recombinante, expresada en *E. coli* como una proteína de fusión a GST (Materiales y Métodos, Sección 1.2). Todos los reactivos se utilizaron en la dilución óptima, determinada al inicio de los estudios.

Placas de 96 pocillos “Immulon II” (Dynatech Laboratories, Inc), se sensibilizaron a 4°C toda la noche, con IgG bovina purificada por afinidad en una columna de Proteína G (Apéndice), a partir de suero de un bovino convaleciente de FA (suero policlonal contra el VFA tipo C3 Resende - Br/55) diluida en buffer de captura carbonato/bicarbonato 0.05M, pH 9.6 (Apéndice), en un volumen de 50 µl por pocillo. Luego de lavar las placas 4 veces con buffer de lavado (Apéndice), las mismas se bloquearon con buffer de bloqueo (Apéndice), en un volumen de 70 µl por pocillo, durante una hora a 37°C con agitación.

Las diluciones de cada muestra de suero se prepararon por duplicado en buffer de dilución (Apéndice), en microplacas de 96 pocillos de baja adsorción. A éstas se les adicionó el mismo volumen de la proteína 3D, pretitulada, diluida en el buffer de dilución y las mezclas se

incubaron durante una hora a 37°C con agitación. Luego de la incubación las mezclas suero/antígeno se transfirieron a las placas de ELISA e incubaron con agitación a 37°C por una hora. Después de lavar 4 veces con PBS-T, el antígeno que no reaccionó se detectó por adición de un suero policlonal de cobayo hiperinmune para el VFA tipo O 1 Campos - Br/58. Luego de los lavados correspondientes, se adicionó un conjugado IgG anti-cobayo marcado con peroxidasa (Sigma). Ambos reactivos se diluyeron en buffer de dilución y se incubaron durante 30 min a 37°C. Después de lavar se agregó O-fenilendiamina (OPD, Sigma) y H₂O₂ como cromógeno y sustrato. La reacción se frenó luego de 15 min con H₂SO₄. Las lecturas se realizaron en un lector Dynatech MR 5000, a una densidad óptica (DO) de 490 nm. En todos los ensayos se incluyeron como control negativo un suero de bovino, proveniente de zona libre de FA, libre de Ac contra los tipos A, O y C del VFA y como control positivo un suero de bovino experimentalmente infectado con el VFA tipo “C”, tomado a los 21 dpi. Se incluyó también un control de GST. Se consideraron positivos aquellos sueros en los que la DO se redujo en más de un 50% en comparación con los controles de Ag con suero normal bovino (SNB). El título de Ac se expresa como la última dilución de suero que inhibe el 50% del valor medio de las absorbancias alcanzadas en los controles de Ag con SNB.

2.2- Diseño de las placas ELISA-3D

2.2.1- Diseño de las placas para el estudio de distribución de frecuencias a fin de determinar el punto de corte entre la población positiva y negativa por el método de ELISA-3D

i- *Titulación de sueros negativos:*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.3 (S/D)	0.6 (1/2)	0.9 (1/4)	1.2 (1/8)	0.3 (S/D)	0.6 (1/2)	0.9 (1/4)	1.2 (1/8)	C. +(b) 1/5	3D SNB(c)	0.3 (S/D)	0.3 (S/D)
B	0.3 (S/D)	0.6 (1/2)	0.9 (1/4)	1.2 (1/8)	0.3 (S/D)	0.6 (1/2)	0.9 (1/4)	1.2 (1/8)	1/25	3D SNB	0.6 (1/2)	0.6 (1/2)
C	0.3 (S/D)	0.6 (1/2)	0.9 (1/4)	1.2 (1/8)	0.3 (S/D)	0.6 (1/2)	0.9 (1/4)	1.2 (1/8)	1/125	3D SNB	0.9 (1/4)	0.9 (1/4)
D	0.3 (S/D)	0.6 (1/2)	0.9 (1/4)	1.2 (1/8)	0.3 (S/D)	0.6 (1/2)	0.9 (1/4)	1.2 (1/8)	1/625	3D SNB	1.2 (1/8)	1.2 (1/8)
E	0.3 (S/D)	0.6 (1/2)	0.9 (1/4)	1.2 (1/8)	0.3 (S/D)	0.6 (1/2)	0.9 (1/4)	1.2 (1/8)	C. + 1/5	3D SNB	0.3 (S/D)	0.3 (S/D)
F	0.3 (S/D)	0.6 (1/2)	0.9 (1/4)	1.2 (1/8)	0.3 (S/D)	0.6 (1/2)	0.9 (1/4)	1.2 (1/8)	1/25	3D SNB	0.6 (1/2)	0.6 (1/2)
G	0.3 (S/D)	0.6 (1/2)	0.9 (1/4)	1.2 (1/8)	0.3 (S/D)	0.6 (1/2)	0.9 (1/4)	1.2 (1/8)	1/125	GST (d)	0.9 (1/4)	0.9 (1/4)
H	0.3 (S/D)	0.6 (1/2)	0.9 (1/4)	1.2 (1/8)	0.3 (S/D)	0.6 (1/2)	0.9 (1/4)	1.2 (1/8)	1/625	GST	1.2 (1/8)	1.2 (1/8)

ii- Titulación de sueros positivos:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1 ^(a) (1/5)	1.7 (1/25)	2.4 (1/125)	3.1 (1/625)	3.8 (1/3125)	C. + ^(b) 1/5	3D SNB ^(c)	1 (1/5)	1.7 (1/25)	2.4 (1/125)	3.1 (1/625)	3.8 (1/3125)
B	1 (1/5)	1.7 (1/25)	2.4 (1/125)	3.1 (1/625)	3.8 (1/3125)	1/25	3D SNB	1 (1/5)	1.7 (1/25)	2.4 (1/125)	3.1 (1/625)	3.8 (1/3125)
C	1 (1/5)	1.7 (1/25)	2.4 (1/125)	3.1 (1/625)	3.8 (1/3125)	1/125	3D SNB	1 (1/5)	1.7 (1/25)	2.4 (1/125)	3.1 (1/625)	3.8 (1/3125)
D	1 (1/5)	1.7 (1/25)	2.4 (1/125)	3.1 (1/625)	3.8 (1/3125)	1/625	3D SNB	1 (1/5)	1.7 (1/25)	2.4 (1/125)	3.1 (1/625)	3.8 (1/3125)
E	1 (1/5)	1.7 (1/25)	2.4 (1/125)	3.1 (1/625)	3.8 (1/3125)	C. + 1/5	3D SNB	1 (1/5)	1.7 (1/25)	2.4 (1/125)	3.1 (1/625)	3.8 (1/3125)
F	1 (1/5)	1.7 (1/25)	2.4 (1/125)	3.1 (1/625)	3.8 (1/3125)	1/25	3D SNB	1 (1/5)	1.7 (1/25)	2.4 (1/125)	3.1 (1/625)	3.8 (1/3125)
G	1 (1/5)	1.7 (1/25)	2.4 (1/125)	3.1 (1/625)	3.8 (1/3125)	1/125	GST ^(d)	1 (1/5)	1.7 (1/25)	2.4 (1/125)	3.1 (1/625)	3.8 (1/3125)
H	1 (1/5)	1.7 (1/25)	2.4 (1/125)	3.1 (1/625)	3.8 (1/3125)	1/625	GST	1 (1/5)	1.7 (1/25)	2.4 (1/125)	3.1 (1/625)	3.8 (1/3125)

^(a)- En el caso de los sueros negativos, los mismos se colocan inicialmente desde sin diluir hasta una dilución 1/8. En el caso de los sueros positivos desde una dilución inicial 1/5 hasta 1/3125.

Las diluciones de los sueros quedan al medio cuando se les adiciona el mismo volumen del Ag (3D). Entre paréntesis se muestran las diluciones iniciales de los sueros. El título se expresa como el log₁₀ de la dilución final del suero más el Ag 3D.

^(b)- C+ :Control positivo: Suero de bovino experimentalmente infectado con VFA tipo "O1", tomado a los 21 dpi. El mismo se diluye desde 1/5 hasta 1/625, quedando diluciones finales desde 1/10 hasta 1/1250 cuando se agrega el antígeno a la placa. El título se expresa como el log₁₀ de la dilución final.

^(c)- 3D - SNB: Control de absorbancia máxima del Ag con suero normal bovino.

^(d)- GST: Control de "background" por GST.

iii- *Determinación de Ac contra la proteína 3D en una única dilución:*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1(a) (1/5)	1(a) (1/5)	1 (1/5)	1 (1/5)	1 (1/5)	1 (1/5)	C. + (b) 1/5	3D SNB(c)	1 (1/5)	1 (1/5)	1 (1/5)	1 (1/5)
B	1 (1/5)	1 (1/5)	1 (1/5)	1 (1/5)	1 (1/5)	1 (1/5)	1/25	3D SNB	1 (1/5)	1 (1/5)	1 (1/5)	1 (1/5)
C	1 (1/5)	1 (1/5)	1 (1/5)	1 (1/5)	1 (1/5)	1 (1/5)	1/125	3D SNB(c)	1 (1/5)	1 (1/5)	1 (1/5)	1 (1/5)
D	1 (1/5)	1 (1/5)	1 (1/5)	1 (1/5)	1 (1/5)	1 (1/5)	1/625	3D SNB(c)	1 (1/5)	1 (1/5)	1 (1/5)	1 (1/5)
E	1 (1/5)	1 (1/5)	1 (1/5)	1 (1/5)	1 (1/5)	1 (1/5)	C. + 1/5	3D SNB(c)	1 (1/5)	1 (1/5)	1 (1/5)	1 (1/5)
F	1 (1/5)	1 (1/5)	1 (1/5)	1 (1/5)	1 (1/5)	1 (1/5)	1/25	3D SNB(c)	1 (1/5)	1 (1/5)	1 (1/5)	1 (1/5)
G	1 (1/5)	1 (1/5)	1 (1/5)	1 (1/5)	1 (1/5)	1 (1/5)	1/125	GST (d)	1 (1/5)	1 (1/5)	1 (1/5)	1 (1/5)
H	1 (1/5)	1 (1/5)	1 (1/5)	1 (1/5)	1 (1/5)	1 (1/5)	1/625	GST (d)	1 (1/5)	1 (1/5)	1 (1/5)	1 (1/5)

(a)- Los sueros a analizar se colocan por duplicado, en una única dilución inicial de 1/5, según lo determinado en los estudios de determinación del punto de corte entre sueros positivos y negativos para Ac contra la proteína 3D.

(b)- C+: Control positivo: Suero de bovino experimentalmente infectado con VFA tipo "O1", tomado a los 21 dpi. El mismo se diluye desde 1/5 hasta 1/625, quedando diluciones finales desde 1/10 hasta 1/1250 cuando se agrega el Ag a la placa. El título se expresa como el log₁₀ de la dilución final.

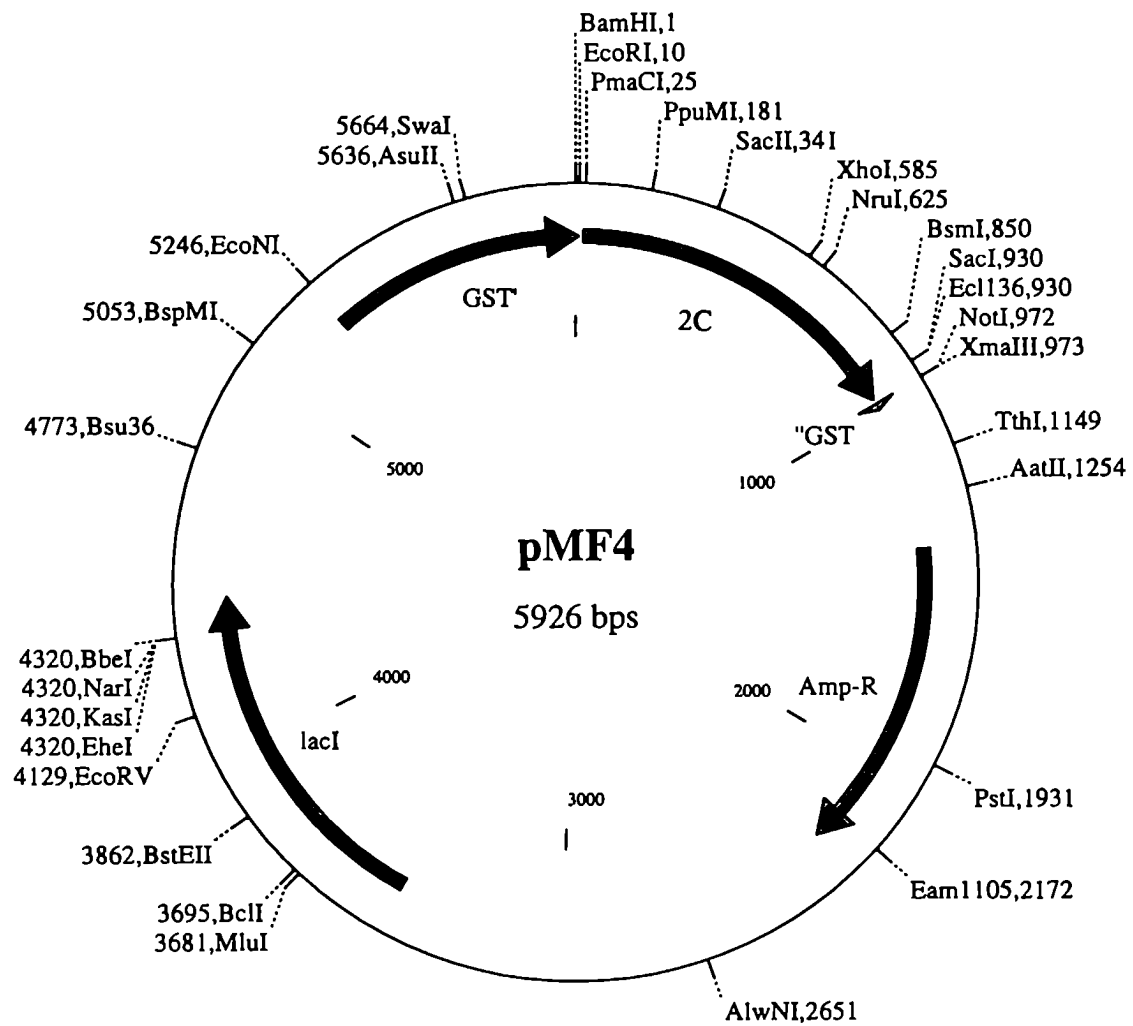
(c)- 3D - SNB: Control de absorbancia máxima del Ag con suero normal bovino.

(d)- GST: Control de "background" por GST.

3- Expresión de la proteína de fusión GST-2C en *E. coli* como sistema de expresión

Como fuente para la expresión de la proteína 2C, se utilizó el gen correspondiente a la secuencia completa del ADN complementario (ADNc) de la proteína 2C (956bp) del serotipo O1K del VFA (Forss y col., 1984) clonado en el vector de expresión pGEX-3X, plásmido recombinante pMF4a. El plásmido de expresión, pGEX-3X, codifica para la enzima GST, obteniéndose proteínas de fusión a GST, cuya expresión está controlada por el promotor Ptac. El plásmido recombinante pMF4 (Figura N° 8), fue provisto gentilmente por el Dr. Ken McColl (CSIRO - AAHL).

Figura N° 8: Plásmido recombinante pMF4.



Esquema del plásmido recombinante pMF4, obtenido del clonado del gen de la proteína 2C del serotipo O1 Kaufbeuren del virus de la Fiebre Aftosa en el vector de expresión pGEX-3X.

3.1- Secuenciación del ADN

El plásmido pMF4 se secuenció a fin de confirmar el tamaño del ADNc y la orientación en el vector, usando el Kit de T7 Sequenase (Amersham Life Science, Inc).

Para ello se utilizaron oligonucleótidos específicos para pGEX-3X y P³² alfa-ATP como nucleótido marcado. Luego de la reacción de secuenciación, las muestras se calentaron a 72°C durante 2 minutos y se sembraron en un gel de poliacrilamida, realizándose dos siembras con diferencia de una hora. El fraccionamiento ocurrió a 18000 Volts y 40 W. Luego de correr el gel, se secó y expuso durante 2 días a TA.

3.2- Transformación de *E. coli* con pMF4

El plásmido de expresión pMF4 se utilizó para transformar las siguientes cepas electrocompetentes de *E. coli*: DH5α (alta eficiencia de transformación), BL21 (DE3) y BL21 (baja actividad proteasa). Las células competentes se descongelaron e inmediatamente se colocaron en hielo. La electrotransformación de las bacterias se realizó utilizando un aparato de transformación Gene pulser (BIO-RAD). Para ello, se mezclaron entre 2 y 5 µl del plásmido pMF4 con 40 µl de las células electrocompetentes en un tubo y se transfirieron a una cubeta fría (*Escherichia coli* pulser cuvettes, BIO-RAD), agitando la suspensión hasta el fondo de la cubeta. Se aplicó un pulso de 1.8 Kvolts e inmediatamente se adicionó 1 ml de medio SOC transfiriéndose la suspensión celular a un tubo y se incubó durante una hora a 37°C a 220 rpm. Diferentes alícuotas (5, 20, 50 y 100 µl) de la transformación se plaquearon en placas de agar Luria con ampicilina y glucosa e incubaron durante 17 horas a 37°C. Se picó y se inoculó un número de las colonias crecidas en tubos de 15 ml que contenían 5 ml de medio de crecimiento Luria/ampicilina/glucosa y se incubaron durante 17 horas a 37°C a 220 rpm. De los cultivos crecidos se prepararon lotes mezclando 350 µl del cultivo con 150 µl de Glicerol 50% y se conservaron a -80°C.

Para confirmar que la transformación fue eficiente y que el plásmido contiene el inserto correspondiente al gen de 2C, se realizaron minipreparaciones de ADN por el método de extracción de lisis alcalina (Sambrook y col 1989). Las células se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 min a 4°C en una centrífuga refrigerada (IEC CENTRA-7R). El sobrenadante se descartó y el “pellet” se resuspendió en 1 ml de Solución 1 y se transfirió a un tubo de 1.5 ml

para su centrifugación a 14000 rpm durante 30 segundos. El sobrenadante se descartó y el “pellet” se resuspendió en 100 µl de Solución 1. Luego se agregaron 100 µl de Solución 1 / lisozima, agitándose e incubándose por 5 min a TA. Luego se agregaron 400 µl de Solución 2, mezclando por inversión e incubándose a 4°C durante 5 min. Luego de agregar 300 µl de acetato de potasio 3M/5M la solución se mezcló por inversión e incubó 5 min en hielo. Las muestras se centrifugaron a 14000 rpm durante 30 segundos y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio donde se le adicionó 500 µl de Fenol/Cloroformo. La mezcla se agitó, se centrifugó a 14000 rpm por 5 min y el sobrenadante se transfirió a otro tubo limpio. Luego se adicionó 600 µl de isopropanol, mezclándose suavemente y se incubó 5 min a TA. Los plásmidos se centrifugaron a 14000 rpm entre 30 - 40 min. Los “pellets” se lavaron con etanol al 70%, se secaron, se redisolviéron en 50 µl de TE / RNAsa 40 µg/ml y se guardaron a 4°C. Para confirmar que el plásmido no ha perdido el inserto se realizó una digestión con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI. Como control el plásmido pGEX-3X fue digerido para poder identificar el recombinante pMF4. Las muestras se sembraron en geles de agarosa al 0.8% y las bandas de ADN teñidas con bromuro de etidio se visualizaron con una fuente de luz UV.

3.3- Inducción de la expresión y purificación de la proteína GST-2C en *E. coli*

Con el fin de establecer las condiciones para la expresión de la proteína de fusión GST-2C, se llevaron a cabo inicialmente ensayos de menor volumen de cultivo.

Para ello, se inocularon por duplicado 10 ml de medio de crecimiento con los “stocks” de *E. coli*, cepa BL21(DE3) transformados con pMF4, los que se incubaron más de 17 horas a 37°C.

Los cultivos obtenidos, se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se descartó y el “pellet” se resuspendió en 10 ml de medio de crecimiento fresco sin glucosa. Se utilizó una dilución 1/10 de estos cultivos, en un volumen final de 100 ml de medio fresco, los que se incubaron a 37°C y 20°C con el fin de determinar las condiciones óptimas de crecimiento e inducción. Los cultivos crecieron hasta alcanzar una DO entre 0.8 y 1 a 600 nm y la expresión de la proteína se indujo por el agregado de IPTG 1mM. Se tomaron alícuotas a los siguientes tiempos postinducción: 45min, 1.30hs, 2.30hs, 4hs y 21hs, para

determinar el tiempo óptimo de inducción. Las muestras tomadas a los diferentes tiempos, se centrifugaron y los “pellets” se guardaron a -80°C.

Los “pellets” guardados a -80°C se descongelaron y resuspendieron en PBSA en un volumen final de 1 ml, al que se le agregó 100 µl de Triton-X100 (10%) así como ARNasa y ADNasa a una concentración final de 0.1mg/ml. Las células se sonicaron en hielo, 3 “sets” de 10 ciclos cada uno al 70%. Luego de incubarse 10 min en hielo las muestras se centrifugaron durante 5 min a 9000 rpm a 4°C. Los sobrenadantes y los “pellets” obtenidos se guardaron a -80°C para su estudio en geles de poliacrilamida - SDS (SDS-PAGE) y “Western blot” .

Para producir altos niveles de expresión de la proteína para su purificación, se prepararon cultivos de 800 ml los que se inocularon con las cepas BL21 y DH5α de *E. coli* transformadas con el plásmido pMF4. Los stocks de *E. coli*, DH5α y BL21, transformados con pMF4a, se inocularon en un volumen de 80 ml de medio de crecimiento Luria/ampicilina/glucosa e incubaron durante 17 horas a 37°C a 220 rpm. Los cultivos incubados más de 12 horas, se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 min a 4°C, el sobrenadante se descartó y el “pellet” se resuspendió en 80 ml de medio de crecimiento Luria/ampicilina. Se utilizó una dilución 1/10 de este cultivo, en un volumen final de 800 ml de medio fresco y se lo incubó a 37°C, a 220 rpm, hasta alcanzar una DO a 600 nm entre 0.8 y 1. La expresión de la proteína se indujo con el agregado de IPTG 0.1M durante 2 horas. Los cultivos se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 min a 4°C, y se resuspendieron por duplicado en 4 ml de PBSA al que se agregó 400 µl de Triton-X100 (10%) y ARNasa y ADNasa a una concentración de 0.1mg/ml. Las células se sonicaron en hielo, 3 ciclos de 10 segundos cada uno al 70%. Luego de incubar 10 min en hielo, las muestras se centrifugaron a 9000 rpm durante 10min. El sobrenadante se pasó a un tubo limpio y la proteína se purificó por afinidad mezclando con 1 ml de perlas de glutatión agarosa 50% durante 2 min. Luego de la adsorción, las perlas se centrifugaron, el sobrenadante se descartó y las perlas se lavaron 3 veces con PBS. La proteína se eluyó por competición con glutatión libre (Sigma), mediante dos lavados de 2 min cada uno a TA en 1 ml de buffer glutatión de elusión (Sigma) y se fraccionó en alícuotas de 0.5 ml que se conservaron a -80°C.

4- “Western blot”

4.1- Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Los minigeles se prepararon con un aparato Mini-PROTEAN II (BIO-RAD), utilizando el sistema discontinuo de Laemmli (1990). Se utilizaron geles de 1mm de ancho, con un gel separador al 12% y un gel concentrador al 4%. Las muestras, extractos crudos o proteína purificada, se mezclaron en una relación 1:1 con buffer de muestra (Apéndice), se hirvieron para su desnaturalización durante 3 a 5 min a 95°C y se colocaron rápidamente en hielo para su posterior siembra en los minigeles.

Se sembraron también marcadores de peso molecular (PM) del rango de 6600 a 192000 Da (Sigma) para la identificación de las bandas proteicas. La electroforesis se realizó a 200 volts y corriente variable, durante aproximadamente 90 min. La visualización de las bandas se logró por tinción con Coomassie blue (Apéndice) durante 1 hora a TA y lavado durante más de 12 horas con solución decolorante (Apéndice).

4.2- Electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa

Una vez corridos, los minigeles se equilibraron con buffer de transferencia (Apéndice) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0.2 micrones (BIO-RAD). Las proteínas se transfirieron a 100 volts y corriente variable, durante 1 hora a 4°C, confirmándose la misma por tinción con Rojo Ponceau (Sigma, Apéndice). Las mismas se lavaron con PBS y se incubaron con buffer de bloqueo (Apéndice) durante toda la noche a 4°C. Luego de bloqueadas las membranas se incubaron con los sueros en estudio (suero anti-GST o sueros bovinos) y con el conjugado correspondiente. Ambas incubaciones se realizaron durante 1 hora a 37°C con agitación, seguidas cada una de 3 lavados con PBS-0.1% Tween-20 (Apéndice). Se realizó un último lavado con PBS y las membranas se incubaron con el sustrato, bromo-cloro-indolil-fosfato / azul de tetrazolio (BCIP - NBT) en buffer de revelado (Apéndice). Una reacción específica positiva se visualizó con una banda de color en correspondencia con el PM de la proteína de fusión en estudio, GST-3D o GST-2C.

5- Métodos serológicos comparativos

5.1- Antígeno asociado a la infección viral (Ag VIA)

El Ag VIA fue provisto por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), preparado según el procedimiento descrito previamente por Alonso y col. (1990). Brevemente, suspensiones de VFA tipo C Argentina 85, propagadas en cultivos de epitelio lingual bovino se inactivaron con BEI. El Ag VIA es removido con 0.05% (p/v) DEAE-Sephadex A 50, eluido por adición de ClNa 1 M - buffer Tris 0.02M, pH 7.6, y precipitado con una solución saturada de sulfato de amonio. El precipitado es recogido por centrifugación y resuspendido en tampón 0.15 M ClNa - 0.02 M Tris, pH 7.6. Posteriormente es clarificado por centrifugación, obteniéndose el Ag VIA en el sobrenadante.

5.2- ELISA - VIA

El método utilizado para la detección de Ac contra el Ag VIA fue el método de ELISA previamente desarrollado por Alonso y col. (CPFA, 1990). El protocolo seguido es el mismo que para el ELISA-3D, pero en este caso el antígeno utilizado es el Ag VIA semipurificado, provisto por el SENASA.

5.3- Inmunodifusión en Agar Gel

Se utilizó el método descrito previamente por el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (Alonso y col 1984). El ensayo se realizó en portaobjetos cubiertos con agar gel al 1% en tampón glicina (Apéndice). El agar al 1% (3.5ml) se depositó en los portaobjetos, los que se colocaron en una superficie nivelada y se dejaron solidificar. Luego el agar se perforó con un molde de siete perforadores dispuestos uno al centro y seis en la perifería, haciéndose dos moldes por portaobjetos, extrayéndose el agar por succión. Las muestras se sembraron de la siguiente manera: el Ag VIA en el pocillo central, un suero control positivo por triplicado en los pocillos de la perifería intercalados con tres muestras de sueros a estudiar. Tanto las muestras de suero como el Ag se sembraron en un volumen de 20 µl (justo bajo el nivel del agar) por pocillo. Los portaobjetos se incubaron en cámara húmeda a TA y se leyeron entre las 24 y 72 horas. Se expresó como positivo a los sueros que muestran una línea de precipitación

entre el Ag y el suero problema, en continuación con la línea de precipitación del suero control positivo (McVicar y col., 1970).

5.4- Detección de anticuerpos tipo específicos contra el VFA

5.4.1- ELISA en Fase - Líquida

La detección de Ac tipo específicos (O, A y C) contra el VFA se determinó utilizando el método de ELISA en F-L previamente descrito por Hamblin y col. (1986).

Microplacas de poliestireno de 96 pocillos “Immulon II” (Dynatech Laboratories, Inc. UK), se sensibilizaron a 4°C toda la noche, con IgG obtenida de suero de conejo convaleciente de FA (sueros policlonales contra los tipos A79, A87, C85 y O1 del VFA) en la dilución óptima, en buffer de captura carbonato/bicarbonato 0.05 M, pH 9.6 (Apéndice). Luego de lavar las placas tres veces con PBS-0.05% Tween (PBS-T, Apéndice), las mismas se bloquearon con 70 µl por pocillo de PBS-T-1% Ovoalbumina (PBST-1% OVA, Apéndice) durante una hora a 37°C. Las diluciones, en base 5, de cada muestra de suero se prepararon en buffer de bloqueo, en microplacas de 96 pocillos de baja adsorción. A éstas se les adicionó el mismo volumen del Ag, VFA tipo A79, A87, C85 u O1, pretitulado, diluido en el buffer de bloqueo y estas mezclas (F-L) se incubaron durante una hora a 37°C con agitación. Luego de la incubación 50 µl de la F-L se transfirió a las placas de ELISA sensibilizadas y bloqueadas, e incubaron con agitación a 37°C por una hora. Después de lavar 3 veces con PBS-T, el Ag que no reaccionó se detectó por adición de un suero policlonal de cobayo hiperinmune contra cada uno de los tipos del VFA usados (50 µl por pocillo en dilución de uso). Luego de tres lavados, se adicionó un conjugado IgG anti-cobayo marcado con peroxidasa (Sigma, 50 µl por pocillo en la dilución de uso). Ambos reactivos se diluyeron en PBST-1% OVA-5% SNB-5% SNC (Apéndice), y se incubaron 30 min a 37°C. Las placas se lavaron tres veces con PBS-T y una última vez con PBS. Luego se agregó OPD (Sigma) en buffer sustrato, (Citrato-Fosfato, Apéndice) y H₂O₂ como cromógeno y sustrato respectivamente. La reacción se frenó luego de 15 min en oscuridad con H₂SO₄. Las lecturas se realizaron en un lector Dynatech MR 5000, a una DO de 490 nm. Se incluyeron controles de suero bovino positivo y negativo. Se consideraron positivos aquellos sueros en los que la DO se redujo en más de un 50% en comparación con el control sin suero. El título de Ac se expresa como la última dilución de

siero que inhibe el 50% de DO del promedio de absorbancias alcanzado en los controles sin suero.

5.5- Detección de anticuerpos contra las PNE Lb y 3A del VFA por “Western blot”

Las PNE, Lb y 3A, fueron cedidas por el Dr. D. Mackay, del Institute for Animal Health, Pirbright, UK. Las mismas fueron producidas como proteínas de fusión unidas a GST. Como fuente para la expresión de las proteínas, se utilizaron los genes correspondientes a la secuencia de ADNc de 3A y Lb del VFA tipo O1K, clonados en el vector de expresión pGEX-3X. Este plásmido contiene el gen de la enzima GST, obteniéndose proteínas de fusión a GST. Cada plásmido se utilizó para la transformación de células de *E.coli* competentes, las que se indujeron con IPTG para la expresión de las proteínas. Las proteínas de fusión fueron purificadas por afinidad a una columna de Glutathion-Sephadex (Pharmacia) y eluidas por competición con un exceso de glutathion libre (Mackay y col., 1998).

6- Muestras de suero

Las muestras fueron obtenidas por punción yugular y luego de separarse el suero por centrifugación, durante 20 min a 2500 rpm, se conservaron a -20°C hasta el momento de su uso.

7- Diseño Experimental

7.1- Desarrollo del método de ELISA en F-L, utilizando como Ag la PNE 3D del VFA

- Determinación del punto de corte

Se analizaron un total de 130 sueros de bovinos negativos, no vacunados ni infectados, provenientes de zona libre de FA (sur del paralelo 42°, Región Patagónica), libres de Ac contra los tipos A, O y C medidos por ELISA en F-L (Hamblin y col., 1986).

Se utilizaron 167 sueros de animales experimentalmente infectados con VFA entre 5 y 565 días postinfección (dpi) con virus del tipo A, O o C, con Ac específicos contra proteínas estructurales determinado por el método de ELISA en F-L (Hamblin y col., 1986).

Para la determinación de la distribución de frecuencias, las muestras se analizaron utilizando un factor de dilución 1/2 para los sueros negativos y 1/5 para los sueros positivos.

- Estudio de especificidad

La especificidad del método de ELISA-3D, se estudió analizando muestras de sueros de bovinos libres de Ac contra los tipos A, O y C del VFA, medidos por ELISA en F-L (Hamblin y col., 1986). La especificidad de la prueba, se calculó basado en una especificidad estimada *a priori* del 98%, un nivel de confianza del 95% y un error no mayor al 2%. En la misma forma se estudió la especificidad para los métodos de ELISA-VIA e IDAG para su comparación con el primero.

En total se analizaron 279 sueros de bovinos provenientes de zona libre por ELISA-3D, de ellos se analizaron 219 sueros por ELISA-VIA y 228 sueros por IDAG. También se ensayaron por ELISA-3D e IDAG sueros de referencia con altos títulos de Ac contra diferentes virus ARN y ADN bovinos y porcinos para estudiar la posible existencia de reacción cruzada inespecífica con 3D. Para este estudio se analizaron sueros hiperinmunes contra los siguientes agentes: Virus de Estomatitis Vesicular (VEV), Virus de Lengua Azul (VLA), Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB, cepas C24V y SINGER), Enterovirus Porcino (EVP), Herpes Virus Porcino-1 (HVP-1), Herpes Virus Bovino-1 (HVB-1), Herpes Virus Bovino 4 (HVB-4, cepa MOVAR), Herpes Virus Bovino-2 (HVB-2), Peste Porcina Africana (PPA).

- Estudio de sensibilidad

Con el fin de determinar la sensibilidad del método de ELISA-3D, se analizaron n=170 sueros de bovinos natural o experimentalmente infectados con el VFA (por inoculación intradermolingual o por contacto), tomados entre los 5 y 565 dpi. Se determinó también la sensibilidad para los métodos de ELISA-VIA (n=69) e IDAG (n=69) para su comparación con el primero.

La sensibilidad relativa se calculó mediante la titulación de cuatro sueros de bovinos convalecientes de FA con los tres métodos en estudio. Para los métodos de ELISA-3D y ELISA-VIA los sueros se diluyeron utilizando un factor de dilución 1/2 y 1/5 respectivamente.

Para la titulación de los sueros por la técnica de IDAG, los sueros se diluyeron al medio en PBS.

- Estudio de reproducibilidad

El ensayo de variabilidad intraplaca se determinó para los dos métodos de ELISA (3D y VIA), por medición de Ac contra la proteína 3D y el Ag VIA en un suero de bovino convaleciente de FA. Para ello se evaluaron un número de $n=20$ repeticiones de titulaciones del suero dentro de la misma placa, el ensayo se realizó por duplicado. Se hicieron también repeticiones de un suero negativo, $n=18$, libre de Ac contra el VFA. Se determinó también la variabilidad entre ensayos mediante la titulación de un suero positivo en $n=43$ ensayos independientes.

7.2- Evaluación y validación del método de ELISA-3D con sueros categorizados. Comparación con el método de IDAG

- Cinética de Ac contra la proteína 3D durante el estado agudo y convaleciente de la infección

La cinética de Ac contra la proteína 3D del VFA se estudió en un grupo de 9 bovinos, luego de ser expuestos a una infección experimental por contacto, con dos terneros infectados por inoculación intradermolingual con VFA tipo O1. El estado inmune humoral de estos nueve bovinos medidos por ELISA en F-L fue el siguiente: tres terneros (Nº 16, 18 y 19) nunca habían sido vacunados y fueron libres de Ac contra los tipos A, O y C del VFA al inicio del ensayo, cuatro bovinos (Nº 4, 6, 13 y 15) con bajo nivel de Ac (títulos entre 1.9 - 2.2) y dos bovinos (Nº 2 y 8) con alto nivel de Ac (títulos entre 2.5 - 2.8). Los seis últimos bovinos, fueron vacunados por última vez con una vacuna tetravalente con adyuvante oleoso, 8 meses antes de la iniciación del ensayo. Previamente a la exposición viral todos los animales fueron negativos para la presencia de Ac contra la proteína 3D medido por ELISA y para Ac contra el Ag VIA medido por IDAG. Los animales se sangraron secuencialmente desde el tiempo 0 hasta los 233 dpi, tiempo de finalización del ensayo. Los sueros se titularon a los diferentes tiempos por ELISA-3D y se expresaron en $\log_{10}$.

- Detección de Ac contra 3D por ELISA y contra el Ag VIA por IDAG, en sueros de bovinos infectados en estadios tardíos de la infección persistente

Con el fin de estudiar la cinética de Ac contra la proteína 3D durante el estado portador o “carrier”, se analizaron siete bovinos persistentemente infectados con el VFA. Dentro de este grupo de animales, cuatro se vacunaron con una dilución de una vacuna monovalente para el tipo O1 Caseros del VFA 30 días antes de la infección experimental. Los otros 3 bovinos nunca habían sido vacunados y eran libres para Ac contra el VFA medido por ELISA en F-L (Hamblin y col., 1986). Los animales se descargaron por inoculación intradermolingual con 10^4 dosis infecciosas 50% (DI50) de la cepa homóloga a la utilizada en la vacuna. Al tiempo cero del ensayo todos los bovinos fueron negativos para Ac contra la proteína 3D y el Ag VIA medidos por ELISA e IDAG respectivamente. Asimismo, todos los animales mostraron signos clínicos de la enfermedad y se estableció una infección persistente con el VFA.

- Respuesta de Ac postvacunación contra la proteína 3D en animales vírgenes

La respuesta de Ac contra la proteína 3D inducida por la vacunación se estudió trabajando bajo condiciones controladas, en diferentes grupos de bovinos vírgenes, provenientes de pruebas de potencia de vacunas comerciales para el VFA, provistos por el SENASA. Los animales utilizados para este estudio provienen de la zona libre de FA (sur del paralelo 42°) y son libres de Ac contra las proteínas estructurales del VFA medido por ELISA en F-L, así como para Ac contra la PNE 3D y el Ag VIA, al tiempo cero del ensayo. En total se evaluaron 7 vacunas comerciales tetravalentes (A Argentina 79, A Argentina 87, C Argentina 85, O 1 Caseros) contra el VFA, de tipo oleoso. Dentro de cada vacuna, se analizaron grupos de entre 12 y 17 bovinos, los que se muestrearon secuencialmente a los 0, 30, 60 y 90 dpv.

7.3- Aplicación del método de ELISA-3D en estudios a campo

En este punto se estudió la influencia de la vacunación y revacunación en la inducción de Ac contra la proteína 3D del VFA en un grupo de terneros y en un grupo de bovinos mayores de 2 años bajo condiciones controladas.

7.3.1- Ensayo en terneros

Para este ensayo se seleccionó de un total de 72 terneros raza Braford de 2-4 meses de edad, un grupo de 51 animales negativos para Ac contra la proteína 3D y el Ag VIA, 20 días antes del inicio y al tiempo cero del ensayo, condición que permitió estudiar solamente la respuesta contra la proteína 3D y el Ag VIA inducida por la vacunación.

El trabajo se realizó, en la Estación Experimental Agropecuaria (EEA), INTA, Mercedes, Corrientes (Región Mesopotamia según el Plan Nacional de Erradicación, Introducción, Sección 2.1, Figura N° 2), bajo condiciones de campo controladas, manteniéndose a todos los animales en el mismo campo experimental durante todo el ensayo.

Los animales se dividieron en tres grupos y recibieron un total de cuatro vacunaciones, en las fechas indicadas por el plan de vacunación sistemática de esa región, establecido por el Plan de Control y Erradicación 1993-1997 (Tabla N° 1).

También se contó con un grupo de 15 ovinos sin vacunar, que sirvió como grupo centinela, control de circulación viral.

Los animales se sangraron secuencialmente cada 30 días a lo largo de todo el ensayo (480 días), conservándose las muestras de suero a -20°C hasta su procesamiento.

Los sueros de estos animales se evaluaron por el método de ELISA en F-L (Hamblin y col., 1986) a los 60 días postprimovacunación y postsegunda vacunación para la detección de Ac contra los 4 serotipos del VFA contenidos en la vacuna utilizada, a fin de determinar los niveles inmunitarios conferidos por la vacunación.

7.3.1.1-Vacunación

Para la vacunación, se utilizaron vacunas comerciales tetravalentes (A Argentina 79, A Argentina 87, C Argentina 85, O1 Caseros) contra el VFA, de tipo oleoso, de aplicación en el Plan de Control y Erradicación. Las mismas son originadas de diferentes laboratorios productores, tanto con antígeno propagado en cultivos de células BHK 21 como en cultivos de epitelio lingual bovino (Frenkel). Los animales se inocularon en la tabla del cuello en dosis de 2 o 3 ml, de acuerdo a las instrucciones del laboratorio productor.

Tabla N°1: Diseño de vacunación recibida por los tres grupos de animales bajo estudio

Grupo	n	1ª dosis ^(a)	2ª dosis ^(b)	3ª dosis ^(c)
1	8	Frenkel	Frenkel	Frenkel
2	26	BHK-21	BHK-21	BHK-21
3	17	Frenkel	BHK-21	BHK-21
4 ^(d)	15	no vacunado	no vacunado	no vacunado

(a): 1ª dosis recibida al tiempo cero del ensayo.

(b): 2ª dosis recibida a los 120 dpv.

(c): 3ª dosis recibida a los 240 días postsegunda vacunación.

(d): Grupo control de circulación viral: ovinos sin vacunar.

n: número de animales por grupo.

7.3.1.2- Muestras de líquido esófago - faríngeo

Se tomaron muestras de LEF de los animales que resultaron positivos para Ac contra el Ag VIA luego de los 90 días postsegunda vacunación con el fin de confirmar que la seroconversión era conferida por la vacunación y no debida a infección viral. En total se tomaron muestras de 12 animales. Seis de éstos se muestrearon durante 3 meses, cuatro animales durante 2 meses y de dos animales se tomaron muestras solamente una vez. Las muestras se tomaron por el método de la copa “probang”, una muestra por mes, se diluyeron en medio Hank's y se congelaron a -70°C hasta su procesamiento. (Sutmoller y col., 1965; Sutmoller y col., 1967).

7.3.1.3- Aislamiento Viroológico

Para el aislamiento del VFA las muestras de LEF se trataron con 1,1,2-trifluoro-tricloroetano (TTE) (Sigma, Chemical Co, USA) en una relación 1:1. Monocapas de cultivo primario de células de tiroides de feto bovino (TiFB), se crecieron en tubos rotantes, en medio Eagle conteniendo una mezcla de antibiótico (Estreptomicina/Penicilina/Gentamicina), antimicótico al 1% (Anfotericina, Fungizone) y suero fetal bovino al 10% por un período de 4 - 5 días a 37°C. Para inocular las monocapas se descartó el medio y se inocularon 0.1 ml por tubo

de las muestras de LEF en un total de 4 tubos por muestra. El inóculo se adsorbió durante 1 hora a 37°C, y luego se agregó 1 ml del mismo medio sin suero fetal bovino. Los tubos se colocaron en una rolera continua a 37°C y se examinaron a las 24, 48 y 72 horas postinoculación para observar evidencia de efecto citopático (ECP). En total se realizaron 3 pasajes ciegos. Se consideraron negativas las muestras en las cuales luego de los 3 pasajes ciegos no se evidenció ECP.

7.3.2- Ensayo en bovinos mayores de 2 años

Con el fin de estudiar la cinética de Ac contra la proteína 3D y el Ag VIA en animales con múltiples vacunaciones, se seleccionaron de un total de 34 bovinos raza Braford, mayores de 2 años, 14 bovinos negativos para Ac contra el Ag VIA al tiempo cero del ensayo.

El ensayo se realizó en la Estación Experimental Agropecuaria (EEA), INTA, Mercedes, Corrientes, (Región Mesopotamia según el Plan Nacional de Erradicación, Introducción, Sección 2.1, Figura Nº 2), bajo condiciones de campo controladas, manteniéndose a todos los animales en el mismo campo experimental durante el ensayo.

Los animales habían recibido 6 vacunaciones previas, con intervalos de seis meses entre cada una, según el plan de vacunación sistemática de esa región, establecido por el Plan de Control y Erradicación 1993-1997. Los mismos recibieron una séptima vacunación, al tiempo cero del ensayo, luego de 12 meses de la sexta vacunación y una octava vacunación a un año y un mes de ésta última.

Se contó también con un grupo de 15 ovinos sin vacunar, que sirvió como grupo centinela, control de circulación viral.

Se tomaron muestras de suero secuenciales de todos los animales cada 30 días a lo largo de todo el ensayo (360 días), conservándose las mismas a -20°C hasta su procesamiento.

7.3.2.1- Vacunación

Para la vacunación se utilizaron vacunas comerciales tetravalentes (A Argentina 79, A Argentina 87, C Argentina 85, O1 Caseros) contra el VFA, de tipo oleoso, de aplicación en el Plan de Control y Erradicación. La vía de inoculación fue intramuscular en la tabla del cuello en dosis de 3 ml por animal.

7.3.3- Estudio de la actividad viral en tres partidos de la Provincia de Buenos Aires

Para evaluar la utilidad de la detección de Ac contra la proteína 3D como indicador epidemiológico de actividad viral, se estudiaron 3 partidos de la provincia de Buenos Aires: Lobos, Navarro y Suipacha.

Los partidos de Navarro y Suipacha tienen características productivas similares. En ambos predomina el sistema extensivo extractivo (cría), ocupando el sector empresarial de leche el segundo lugar y el sector empresarial de engorde el tercero. En el partido de Lobos, predomina el sistema extensivo extractivo, presentando el sector empresarial de leche una importancia relativa muy inferior.

Con respecto a la FA los tres partidos se caracterizan como ecosistema endémico primario (Región Central según el Plan Nacional de Erradicación, Introducción, Sección 2.1, Figura N° 2). Los movimientos de hacienda en los tres partidos son escasos y principalmente se trata de egresos, siendo los ingresos limitados. En estos partidos se vacuna la totalidad de los bovinos en otoño (mayores y menores de 2 años) y los bovinos menores de 2 años en primavera.

Para este ensayo se utilizaron muestras de suero (n=entre 70 - 180) que habían sido tomadas durante las campañas de vacunación de otoño de los años 1993, 1994 y 1995 para el partido de Navarro, 1994 y 1995 para Suipacha, y 1993, 1994, 1995 y 1996 para el partido de Lobos. La categoría de animales seleccionada en base a los resultados obtenidos en el estudio anterior de animales vacunados y revacunados, fue la de 6 - 12 meses de edad. Los animales dentro de esta categoría, debido al programa de vacunación, generalmente no han sido vacunados o han recibido una única vacunación. En el caso de haber recibido una vacunación, se utilizaron vacunas comerciales tetravalentes contra el VFA, de tipo oleoso, de aplicación en el Plan de Control y Erradicación. Por otro lado animales mayores a 6 meses no presentarían Ac detectables contra el Ag VIA o proteína 3D de origen calostrado (León y col., 1995).

Se contó con datos de la fecha de toma de muestra y de la vacunación de acuerdo a los registros de SENASA.

Tabla N° 2: Diseño de muestreo

PARTIDO	AÑO			
	1993	1994	1995	1996
NAVARRO	98*	73	154	nd
LOBOS	139	136	147	120
SUIPACHA	nd	124	180	nd

* : N° de animales analizados / año / partido

nd : no determinado

8- Desarrollo del método de "Western blot" para la detección de Ac contra las PNE GST-3A, GST-2C y GST-Lb del VFA

Con el objeto de contar con otros indicadores complementarios de infección por el VFA, se investigó la capacidad de las PNE GST-3A, GST-2C y GST-Lb del VFA de detectar Ac específicos de infección viral utilizando el método de "Western blot".

Se determinaron las condiciones óptimas de corrida de los geles y transferencia, condiciones de bloqueo, concentración de antígeno a utilizar, y diluciones de los diferentes reactivos (sueros y conjugado). Para estos ensayos se utilizó un número limitado de sueros de bovinos de zona libre (n=10), libres de Ac contra el VFA; sueros de bovinos experimentalmente infectados con el VFA (n= 6), tomados a los 0, 7, 20 y 30 dpi, y sueros de bovinos vacunados con vacunas comerciales (n= 14), tomados entre los 30, 60 y 90 dpv.

8.1- Evaluación de la PNE GST-2C del VFA utilizando el método de "Western blot"

La proteína GST-2C del VFA, evaluada anteriormente, se seleccionó como Ag para su evaluación en la discriminación entre animales infectados y vacunados, con un número mayor de sueros.

8.1.1- Estudio de especificidad

- Sueros de zona libre

Con el objetivo de determinar la especificidad del método de “Western blot” , se analizaron n=40 sueros de bovinos de zona libre (Región Patagónica, sur del paralelo 42°).

8.1.2- Cinética de Ac contra la proteína 2C durante el estado agudo y convaleciente de la infección

- Sueros de animales experimentalmente infectados

A fin de determinar la cinética de Ac contra la PNE 2C del VFA, se analizaron muestras de sueros de 4 bovinos durante el estado agudo, convaleciente y “carrier” de la infección con el virus, luego de ser expuestos a una infección experimental por contacto, con dos terneros infectados por inoculación intradermolingual con VFA tipo “O” (animales N° 4, 16, 18 y 19).

Con el fin de validar el método desarrollado se evaluó un mayor número de sueros de bovinos experimentalmente infectados con el VFA (n=70), tomados entre los 10 y 535 dpi. Todos los sueros ya habían sido evaluados por los métodos de ELISA-3D e IDAG.

8.1.3- Inducción de anticuerpos postvacunación contra la proteína 2C en animales vírgenes

- Sueros de animales vacunados

Con el propósito de validar el método, se evaluaron n=79 sueros de bovinos primovacunados, provenientes de pruebas de potencia de vacunas comerciales tetravalentes contra FA (tipos A Argentina 79, A Argentina 87, C Argentina 85 y O1 Caseros), formuladas con adyuvante oleoso, tomados a los 30, 60 y 90 dpv. Los mismos fueron provistos por el SENASA. Todos los sueros fueron libres de Ac contra la proteína 3D y el antígeno VIA al tiempo cero del ensayo y habían sido evaluados por los métodos de ELISA-3D e IDAG.

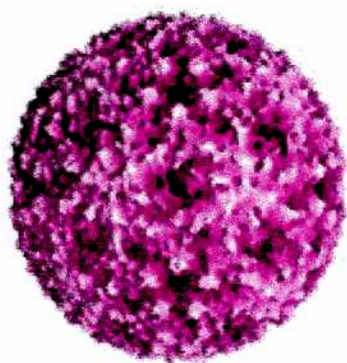
En todos los ensayos se utilizó como control negativo un suero de bovino libre de Ac contra el VFA, proveniente de zona libre de FA y como control positivo un suero de bovino experimentalmente infectado con VFA tipo "C", tomado a los 21 dpi.

9- Análisis Estadísticos

Para la comparación entre los niveles de Ac generados por los bovinos luego de una infección experimental contra PE y PNE, se realizó un análisis de varianza en diseño factorial 2 x 6 para la variable respuesta “título”, aplicando el programa STATISTIX.

Para la prueba de normalidad, se determinó el Índice de Wilk-Shapiro con $n=18$, tanto para el método de ELISA-3D como para el ELISA en F-L.

Para los estudios de comparación de proporciones en los ensayos de aplicación del método de ELISA-3D como indicador epidemiológico de actividad viral en 3 partidos de la provincia de Buenos Aires, (Materiales y Métodos, Sección 7.3.3), se aplicó el programa de Epi-Info 6.



RESULTADOS

IV.- RESULTADOS

1- Expresión de la proteína GST-3D en *E.coli* como sistema de expresión

La inducción de la expresión de la proteína GST-3D, se realizó por el agregado de IPTG, al cultivo de *E.coli*, cepa DH5 α , transformado con el plásmido pKSO1, según el protocolo descrito previamente en Materiales y Métodos (Sección 1.2).

El extracto crudo proteico se separó en un SDS-PAGE al 12%. Luego de la tinción con Coomassie blue, se detectó una banda de proteína inducida, de un tamaño aproximado de 80000 Da. Esta banda corresponde a la proteína de fusión GST (26000 Da) - 3D (56000 Da). El extracto crudo proteico fraccionado en un SDS-PAGE, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y la especificidad de la proteína inducida se confirmó por "Inmunoblotting" con un suero de bovino experimentalmente infectado con el VFA, con alto título de Ac contra PE y PNE, mostrando una unión específica con la proteína 3D expresada de 80000 Da. También se observa una reacción por parte de los sueros con otras proteínas bacterianas, dado que los bovinos desarrollan naturalmente Ac contra *E.coli* (no presentado).

Para la producción de la proteína con fines de utilizarla como Ag y para su purificación se trabajó con cultivos de mayor volumen. Luego de la inducción, los cultivos se sonicaron y se trabajó con la fracción soluble para su purificación.

Las preparaciones de la proteína GST-3D, así como de GST, se purificaron por afinidad utilizando perlas de glutation agarosa al 50%. La especificidad de la proteína purificada se confirmó por análisis de SDS-PAGE y "Western blot". Los resultados del "Western blot" mostraron una reacción específica contra la proteína GST-3D (Figura N° 9).

Los resultados obtenidos muestran una alta expresión de la proteína recombinante según la intensidad de las bandas observadas en el SDS-PAGE. Además de un alto rendimiento luego de la purificación, obteniéndose una concentración proteica de aproximadamente 2000 - 3000 $\mu\text{g/ml}$, según el método de Bradford.

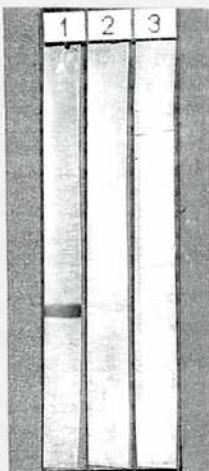
Se observa también que la proteína se eluye específicamente, lo que se corrobora con los resultados de "Western blot".

Figura N° 9: Expresión de la proteína recombinante GST-3D.

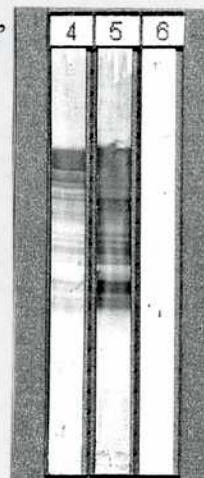
(a)- SDS-PAGE



(b)- "Western blot"



(c)- "Western blot"



La proteína GST-3D obtenida de la transformación de *E.coli* DH5 α con el plásmido pKSO1, se purificó por afinidad con perlas de glutation agarosa 50%. La misma se resolvió en un gel de SDS-PAGE al 12% (panel A) y luego se realizó un "Western blot" para los siguientes sueros: suero de bovino infectado experimentalmente con VFA tipo O1Campos, de 21 dpi; suero de bovino proveniente de zona libre de FA (sur del paralelo 42°) y un suero de bovino anti-GST (panel B). Los mismos sueros fueron enfrentados también contra GST (panel C).

Panel A: línea 1: MPM, línea 2, 3 y 4: GST, líneas 5, 6, y 7: GST-3D.

Paneles B y C: líneas 1 y 4: suero bovino anti-GST; 2 y 5: suero bovino infectado con VFA (21 dpi), líneas 3 y 6: suero normal bovino.

2- Desarrollo del método de ELISA-3D

2.1- Optimización de los reactivos

Para la estandarización del método de ELISA-3D se determinaron las concentraciones óptimas de cada uno de los reactivos, antígeno GST-3D, GST, suero de captura, suero detector, anticuerpo anti-bovino conjugado a peroxidasa, realizando titulaciones cruzadas, según Hamblin y col. (1986), y las recomendaciones de la OIE (Manual of Standards, OIE, 1996).

Para la titulación del suero de cobayo (suero detector) y del conjugado, las placas de ELISA se sensibilizaron con el suero de cobayo en diluciones dobles desde 1/ 25 hasta 1/800. El conjugado se tituló en un rango de diluciones similar al suero de cobayo, en dirección cruzada, determinándose finalmente la dilución de uso.

La concentración óptima del suero de captura se determinó por titulación en damero. Las placas de ELISA se sensibilizaron con una serie de diluciones al medio del suero de captura, desde 1/25 hasta 1/ 800. Diluciones al medio de la proteína GST-3D y de GST, desde 1/25 hasta 1/800, se hicieron reaccionar con cada dilución del suero de captura. El suero de cobayo y el conjugado se usaron en las diluciones predeterminadas, 1/100 y 1/1000 respectivamente.

Todos los reactivos se utilizaron en la última dilución que resultó con el valor máximo de absorbancia. La proteína GST-3D se utilizó en la dilución que otorgó el 60% de la máxima absorbancia obtenida en el ensayo (O'Donnell y col, 1996).

2.2- Determinación del punto de corte. Distribución de frecuencias de títulos por ELISA-3D en sueros negativos

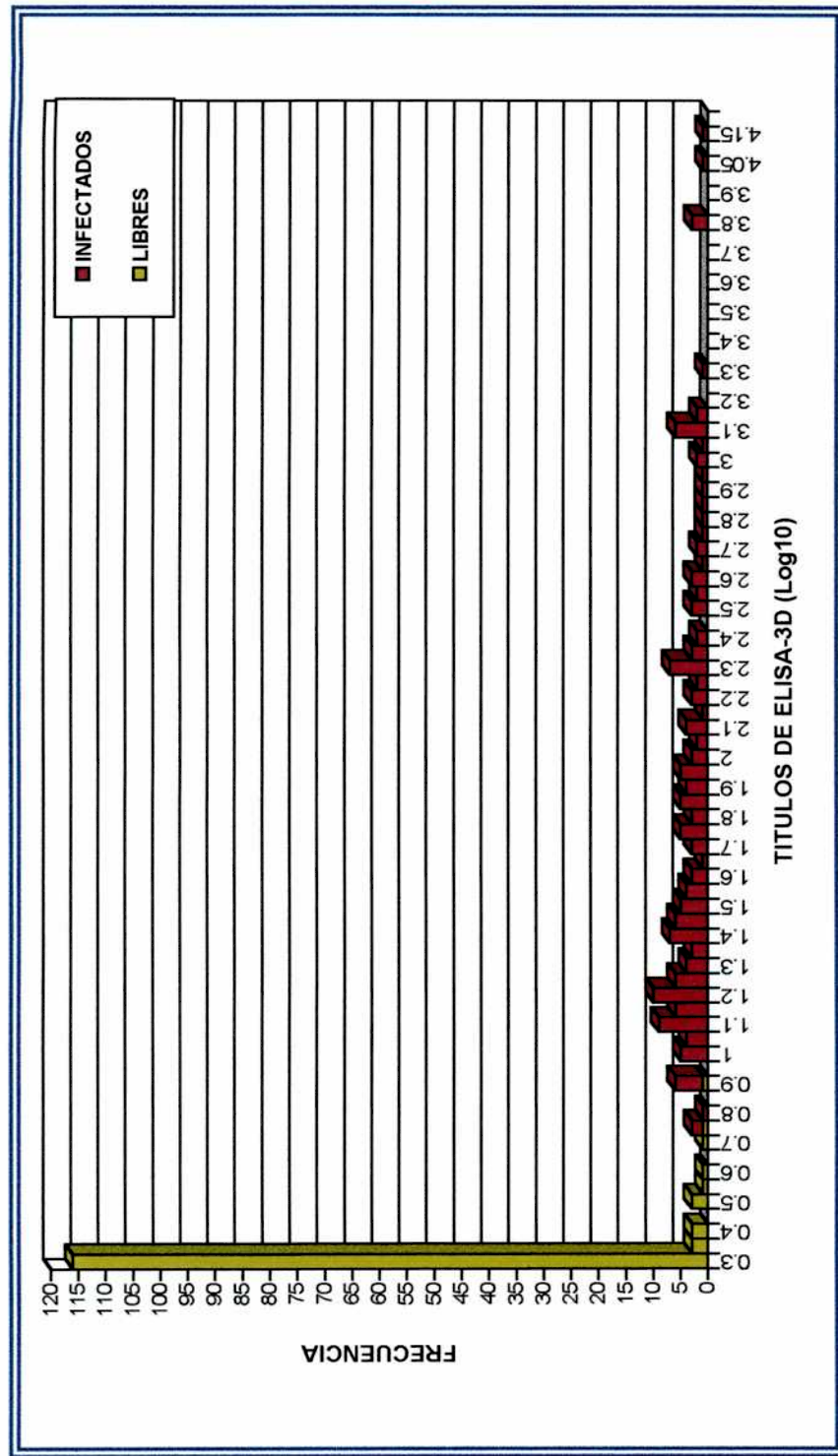
Con el fin de determinar el punto de corte a partir del cual un animal se considera rector positivo para Ac contra la proteína 3D, se estudió una población de sueros positivos y negativos.

La distribución de frecuencias de títulos se determinó por examen de 130 sueros negativos provenientes de zona libre de FA, y 167 sueros positivos derivados de animales entre 5 y 565 días luego de una infección experimental (Materiales y Métodos, Sección 7.1). La distribución de los títulos por ELISA-3D se observa en la Figura N° 10.

Un 89.23% de los sueros negativos mostraron títulos de Ac menores a $\log_{10}=0.3$. El 10% de los sueros resultaron con títulos entre $\log_{10}=0.35$ y 0.75. Solamente uno de los 130 sueros (0.77%) mostró un título de $\log_{10}=0.88$. Ocho de los 167 sueros positivos tuvieron títulos que se superpusieron con la población negativa, entre $\log_{10}=0.75$ y 0.9. De estos sueros, seis correspondían a animales de 5 a 8 dpi y dos a animales de 350 y 565 dpi.

En base a los resultados obtenidos el valor de $\log_{10}$ =igual a 1, mostró la máxima sensibilidad, por lo que este valor se usó como punto de corte para las siguientes determinaciones.

Figura N° 10: Determinación del punto de corte para el método de ELISA-3D.



Distribución de frecuencias de títulos medido por el método de ELISA-3D en 130 sueros negativos, provenientes de zona libre de FA (sur del paralelo 42°) y en 167 sueros positivos, provenientes de animales natural o experimentalmente infectados con el virus de la FA. Los títulos se expresaron como el $\log_{10}$ de la última dilución que da el 50% del valor medio de las absorbancias alcanzadas en el control de antígeno con SNB. Como punto de corte entre la población positiva y negativa, se determinó el valor de $\log_{10}=1$, que dió la máxima sensibilidad, para los siguientes ensayos.

2.3- Estudio de especificidad

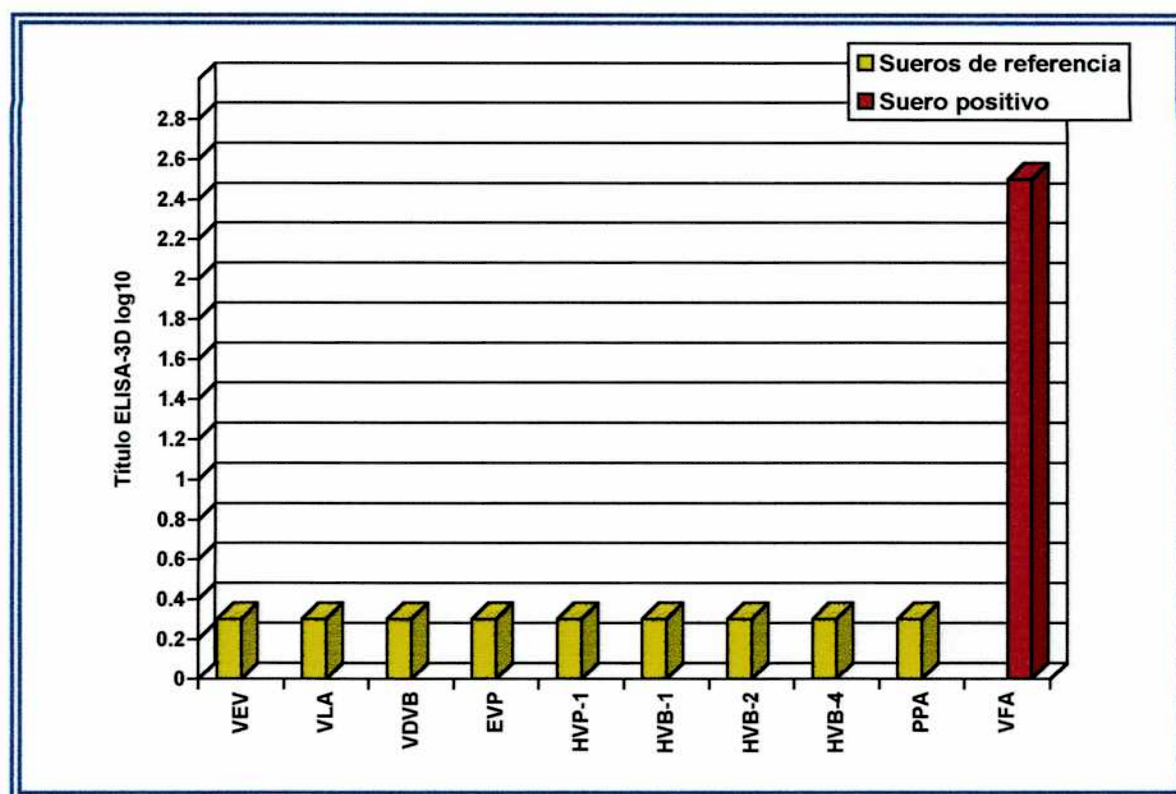
Todos los sueros de bovinos negativos provenientes de zona libre de FA, n=279, analizados por el método de ELISA - 3D resultaron negativos en una dilución inicial del suero de 1/5 ($\log_{10}= 1$), resultando en una especificidad del 100% (Tabla N° 3).

Al mismo tiempo, se evaluaron tanto por el método de ELISA-3D como por IDAG, sueros bovinos y porcinos de referencia, negativos para Ac contra el VFA, con alto título de Ac contra diferentes agentes (Materiales y Métodos, Sección 7.1). No se detectó reactividad alguna contra la proteína 3D ni contra el Ag VIA con ninguno de los sueros analizados (Tabla N° 3). Los títulos medidos por ELISA-3D dieron valores expresados en $\log_{10} \leq 0.3$ (Figura N°11).

Estos resultados confirman la especificidad del método de ELISA-3D y que la reacción es específica en detectar Ac postinfección, no dando reacción cruzada contra otros virus.

De este grupo se analizaron 219 sueros por ELISA-VIA y 228 sueros por IDAG, obteniéndose idénticos resultados (especificidad 100%), comparables con los obtenidos para el ELISA-3D (Tabla N° 3).

Figura N° 11: Titulación de sueros bovinos y porcinos de referencia con alto título de Ac contra diferentes agentes (virus ARN y ADN), por el método de ELISA-3D.



Los títulos expresados en $\log_{10} \leq 0.3$ son negativos. Como control positivo se analizó un suero de un bovino experimentalmente infectado con VFA, con alto título de Ac contra 3D ($\log_{10}=2.5$), y reactividad positiva para Ac anti-VIA.

2.4- Estudio de sensibilidad

Ciento cincuenta y nueve sueros de los 167 sueros de bovinos positivos ensayados resultaron positivos por el método de ELISA-3D. La sensibilidad estimada resultó en un 95,2 % (I.C.= 91.95% - 98.44%).

Los resultados mostraron que el método de ELISA-3D es capaz de detectar animales positivos más precozmente que la técnica de IDAG, cuya sensibilidad estimada fue del 78.26% (I.C.= 87.9% - 68.5%). Por otro lado, cuando se lo comparó con el método de ELISA-VIA, cuya sensibilidad fue de un 85.58% (I.C.= 93.8% - 77.3%), el ELISA-3D resultó de una sensibilidad mayor.

Los resultados obtenidos de la titulación de los sueros para el cálculo de sensibilidad relativa se muestran en la Tabla N° 3. Los títulos obtenidos por ambos métodos de ELISA resultaron 10 a 100 veces más altos que con la técnica de IDAG. Estos resultados demuestran que el método de ELISA-3D es altamente sensible en comparación con los otros dos métodos estudiados y lo hace de elección frente al método de ELISA que utiliza el Ag VIA.

Tabla N° 3: Determinación de la Especificidad y Sensibilidad del método de ELISA-3D para la detección de Ac característicos de infección contra el VFA.

	ELISA-3D		ELISA-VIA		IDAG	
	-	+	-	+	-	+
Zona libre^(a)	279	0	219	0	228	0
Infectados^(b)	8	159	10	59	15	54
Especificidad	100%		100%		100%	
Sensibilidad	95.2%		85.58%		78.26%	

^(a) : Sueros de bovinos provenientes de zona libre de FA, libres de Ac contra las PE del VFA, medido por el método de ELISA en F-L.

^(b) : Sueros de bovinos y ovinos natural y experimentalmente infectados con VFA.

Especificidad: Sueros negativos por el método/total de sueros negativos.

Sensibilidad: Sueros positivos por el método/total de sueros positivos.

2.5- Estudio de reproducibilidad

El coeficiente de variación (C.V.) obtenido intraplaca para el método de ELISA-3D fue en promedio del 2.75 % (rango 2.5% - 3%). Estos resultados fueron comparables con los obtenidos para el ELISA-VIA, cuyo C.V. resultó del 5% (rango 4.6% - 5.4%). El C.V. obtenido entre ensayos para ambos métodos de ELISA, fue del 7.4% para el método de ELISA-3D y del 2.4% para el método de ELISA-VIA (Tabla N°4).

Los bajos C.V. obtenidos, indican una alta reproducibilidad para ambos métodos (OIE, Manual of Standards, 1996).

Tabla N°4: Estudio de reproducibilidad.

(a): Ensayo interplacas.

	ELISA-3D	ELISA-VIA
N° de réplicas	43	43
Media del título	2.53	3.15
D.E. ^(c)	0.168	0.15
C.V. ^(d)	0.066	0.047

(b): Ensayo intraplacas.

	ELISA-3D		ELISA-VIA	
	PLACA 1	PLACA 2	PLACA 1	PLACA 2
N° de réplicas	20	20	16	16
Media del título	2.55	2.47	3.29	3.24
D.E. ^(c)	0.064	0.076	0.152	0.175
C.V. ^(d)	0.025	0.03	0.046	0.054

El C.V. interensayo para los métodos de ELISA-3D y ELISA-VIA, se determinó por titulación de un suero bovino infectado experimentalmente con el VFA, en 43 ensayos independientes respectivamente (a). Se determinó también la variabilidad intraplaca por titulación de Ac en un suero bovino convaleciente de FA. Para ello se realizaron n=20 repeticiones (ELISA-3D) y n=16 repeticiones (ELISA-VIA) de titulaciones del suero dentro de la misma placa, por duplicado (b).

^(c) D.E.: desvío estandar

^(d) C.V.: coeficiente de variación

3- Evaluación del método de ELISA-3D con sueros categorizados (animales infectados y animales vacunados). Comparación con la técnica de IDAG

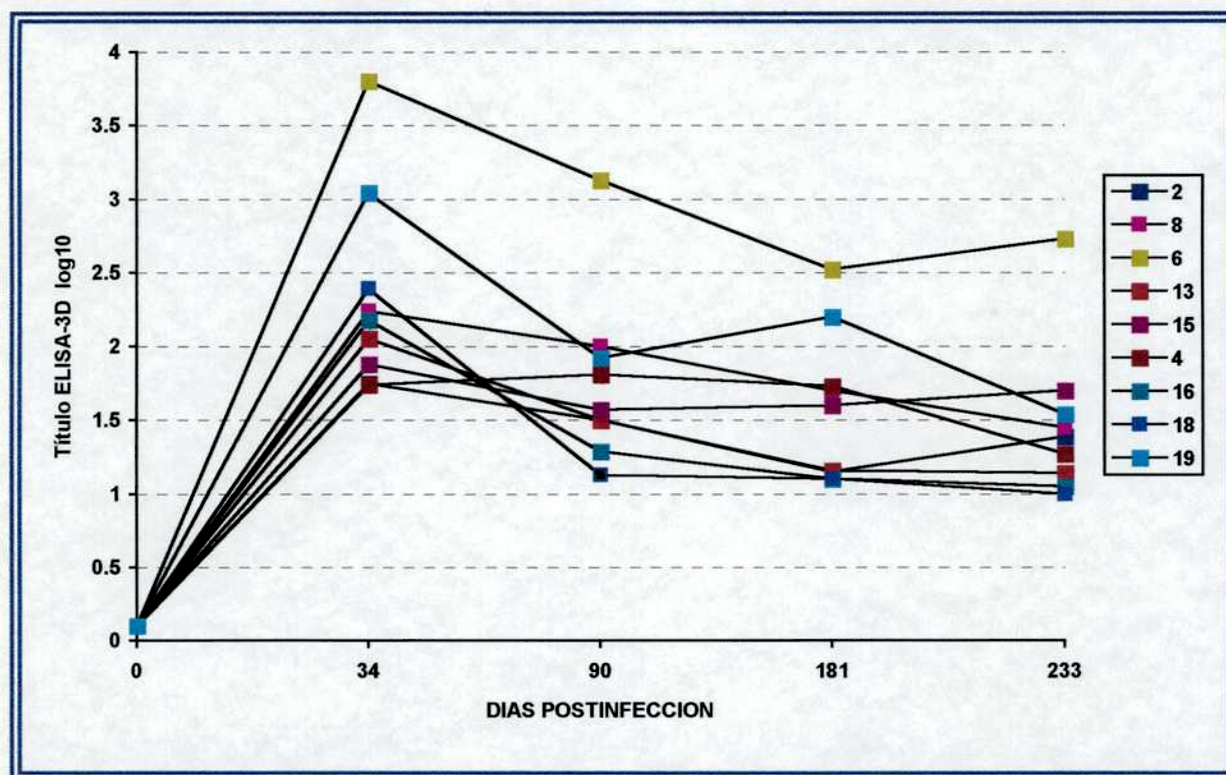
3.1- Cinética de Ac contra la proteína 3D durante el estado agudo y convaleciente de la infección

La cinética de Ac contra la proteína 3D durante el estado agudo y convaleciente de la infección, se estudió un grupo de 9 bovinos (Materiales y Métodos, Sección 7.2).

Los Ac contra la proteína 3D se detectaron a partir de los 5 días luego de la exposición a la infección en 2/9 animales estudiados. A los 7 dpi, seroconvirtieron 3/9 animales más, y a los 20 dpi, 9/9 animales mostraron seroconversión, manteniéndose positivos hasta los 233 dpi, tiempo en que se tomó la última muestra. Los máximos niveles de Ac contra 3D se alcanzaron entre los 20 y 34 dpi, observándose valores entre $\log_{10} = 1.75 - >3.8$, siendo más altos en 2/4 bovinos que mostraron signos clínicos de la enfermedad (animales N° 6 y 19). Estos niveles declinaron gradualmente en todos los bovinos hasta alcanzar valores entre $\log_{10} = 1 - 1.7$ a los 233 dpi, con excepción del bovino N° 6 en el que el título contra 3D siempre fue mayor ($\log_{10} = 2.73$). (Figura N° 12).

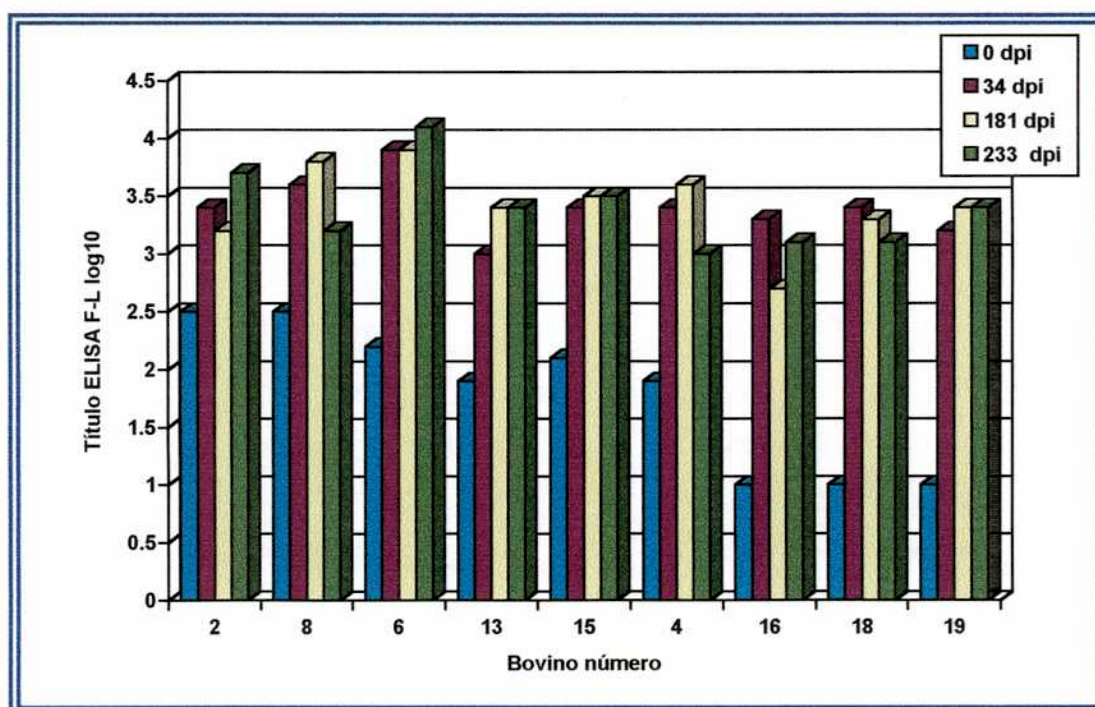
En este estudio, se comprobó el supuesto de normalidad para los métodos de ELISA-3D y ELISA en F-L. Para la prueba de normalidad, se calculó el índice de Wilk-Shapiro, que fue de 0.944 con $n=18$ para el ELISA-3D y de 0.954 con $n=18$ para el ELISA en F-L. La independencia fue correctamente asegurada en el muestreo y en la aleatorización del mismo.

Figura N° 12: Respuesta de Ac contra la proteína 3D del VFA, en bovinos luego de una infección experimental por contacto con dos terneros infectados con VFA tipo O1 Caseros, medido por el método de ELISA-3D.



El análisis de los sueros por ELISA en F-L para determinación de Ac específicos de tipo contra PE del VFA tipo O1, a los tiempos 0, 34, 181 y 233 dpi, demostró una rápida respuesta serológica en todos los animales, con títulos significativamente mayores en comparación que con los obtenidos contra la proteína 3D ($p < 0.05$) (Figura N° 13).

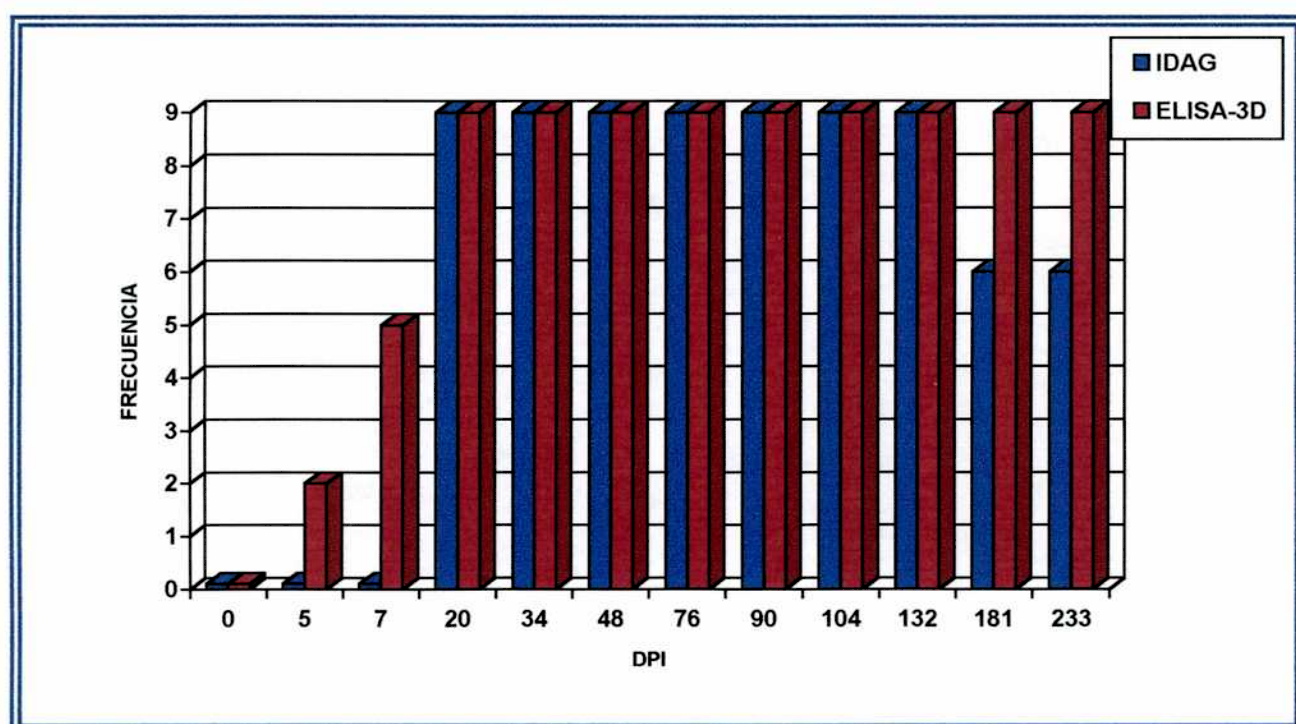
Figura N° 13: Respuesta de Ac específicos de tipo contra el VFA tipo O1 Caseros, en bovinos luego de una infección experimental por contacto con dos terneros infectados con VFA tipo O1 Caseros, medido por el método de ELISA en F-L.



Títulos menores que $\log_{10} = 1$ son negativos para Ac contra PE.

Los sueros se analizaron también por el método de IDAG, para su comparación con los resultados obtenidos por ELISA-3D, observándose resultados positivos desde los 20 dpi hasta los 132 dpi en los 9 animales en estudiados. A los 233 dpi solamente 6/9 (66.6%) bovinos permanecían positivos para Ac contra el Ag VIA (Figura N° 14).

Figura N° 14: Frecuencia de animales reactores positivos a la PNE 3D y al Ag VIA, analizados por ELISA-3D e IDAG respectivamente, en 9 bovinos luego de una infección experimental por contacto con dos terneros infectados con VFA tipo O1 Caseros.



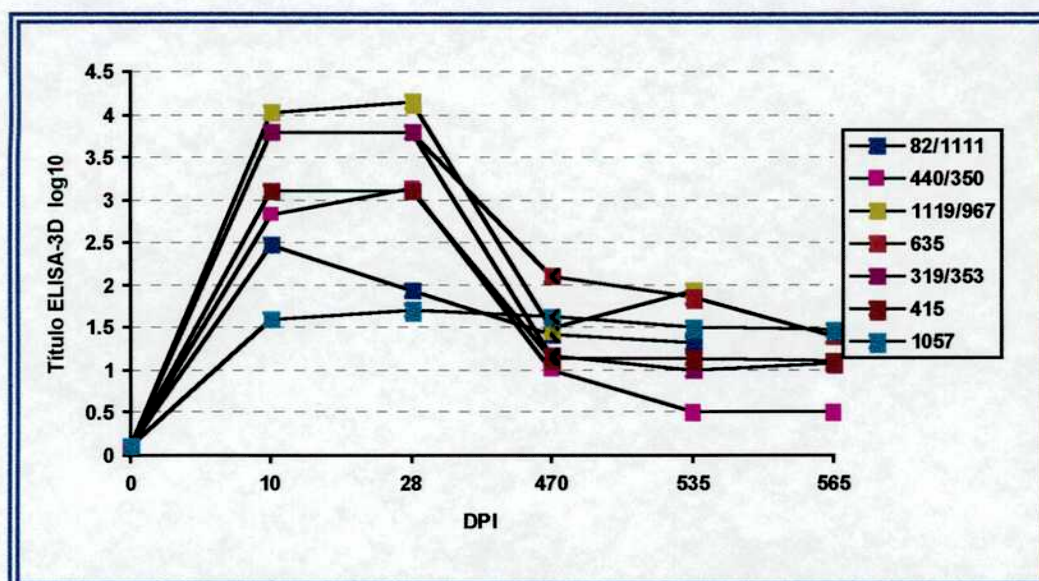
Se puede concluir por tanto que el método de ELISA-3D es más sensible que la técnica de IDAG para la detección de Ac postinfección en un mayor número de animales desde tiempos más tempranos de la infección (5 - 7 dpi), así como a tiempos más tardíos (233 dpi).

3.2- Detección de Ac contra 3D por ELISA y contra el Ag VIA por IDAG, en sueros de bovinos infectados en estadios tardíos de la infección persistente

La cinética de Ac contra la proteína 3D, también se estudió durante el estado portador o “carrier” en un grupo de siete bovinos persistentemente infectados con el VFA tipo O1 (Materiales y Métodos, Sección 7.2), con el objetivo de conocer la capacidad del método de detectar Ac en estadios tardíos de la infección persistente. A los 10 dpi, se observó seroconversión contra 3D en todos los animales, estos resultados se mantuvieron a los 28 y 470 dpi. A los 535 dpi, sólo 1/7 animales se negativizó, y en el último muestreo, a los 565 dpi, donde se contó con suero solamente de 5 bovinos, cuatro de ellos (80%) aún presentaban Ac anti - 3D (Tabla N°6).

Los niveles de Ac contra la proteína 3D fueron altos entre los 10 y 28 dpi, observándose valores de $\log_{10}=1.59$ hasta títulos de $\log_{10}=4.15$. Los títulos de Ac disminuyeron gradualmente, hasta alcanzar valores entre $\log_{10}=1.07$ - 1.48 a los 565 dpi (Figura N° 15).

Figura N° 15: Respuesta de Ac contra la proteína 3D del VFA, en bovinos luego de una infección experimental por contacto con dos terneros infectados con VFA tipo O1 Caseros, medido por el método de ELISA-3D.



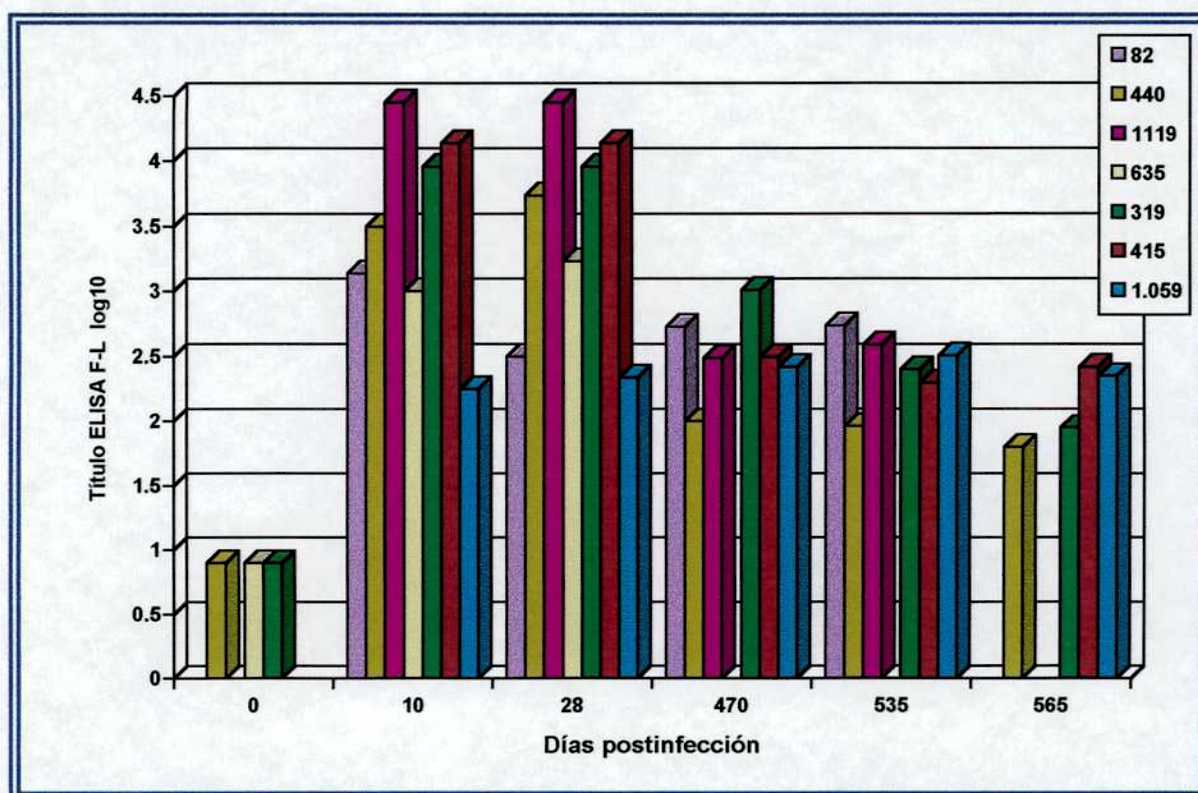
Por otro lado, no se observó ninguna asociación entre los animales que habían sido previamente vacunados (Nos. 82/1111, 1119, 415, 1057) y la persistencia de Ac contra la proteína 3D. Tanto en el grupo de bovinos vacunados y expuestos a la infección con VFA, como en el grupo de bovinos no vacunados y desafiados con el virus, los Ac persistieron entre los 470 y 565 dpi.

El análisis de los sueros por el método de ELISA en F-L para la determinación de Ac específicos de tipo contra el VFA tipo O1C, a los diferentes tiempos mostró altos títulos entre los 10 y 28 dpi. A los 470 dpi se observó una disminución del títulos de Ac contra PE en general en todos los animales, los que se mantuvieron hasta los 565 dpi. La comparación de los títulos obtenidos con el ELISA en F-L con los resultados del ELISA-3D, resultó en títulos significativamente mayores para el primero en comparación con el segundo método ($p < 0.05$) (Tabla N° 5, Figura N° 16).

Tabla N° 5 y Figura N° 16: Respuesta de Ac específicos de tipo contra el VFA tipo O1 Caseros, en bovinos portadores del VFA tipo O1 Caseros, luego de una infección experimental por contacto con dos terneros infectados con VFA tipo O1 Caseros, medido por el método de ELISA en F-L.

Tiempo	ANIMAL N°						
	82	440	1119	635	319	415	1057
0 dpi	nd +	<1	nd +	<1	<1	nd +	nd +
10 dpi	3.14	3.5	4.45	3	3.96	4.14	2.25
28 dpi	2.5	3.74	4.45	3.23	3.96	4.14	2.34
470 dpi	2.73	2	2.49	nd	3.01	2.5	2.42
535 dpi	2.74	1.96	2.59	nd	2.4	2.3	2.51
565 dpi	nd	1.8	nd	nd	1.95	2.42	2.35

nd+: no determinado, positivo para Ac por SN.



Los sueros fueron analizados también por la técnica de IDAG, para su comparación con los resultados obtenidos con el método de ELISA-3D. Todos los animales resultaron positivos para Ac contra el Ag VIA a los 10 y 28 dpi. A los 470 dpi, 5/7 permanecían positivos, dos de éstos se negativizaron a los 535 dpi, siendo positivos en este tiempo 3/7 bovinos para Ac anti-VIA. Solamente se contó con muestras de 5 de los 7 bovinos en estudio en el último tiempo (565 dpi), observándose 2/5 (40%) animales reactores positivos. Se puede observar que el número de animales reactores positivos, detectados por IDAG, es menor que el de reactores positivos a 3D detectados por ELISA (Tabla N° 6).

Los resultados obtenidos demuestran nuevamente que el método de ELISA-3D es más sensible que la técnica de IDAG para detectar Ac postinfección a tiempos más tardíos de la infección persistente.

Tabla N°6: Comparación de la frecuencia de animales reactores positivos al Ag VIA medido por IDAG con los datos obtenidos por ELISA-3D y ELISA en F-L, en un grupo de 7 bovinos luego de una infección experimental por inoculación intradermolingual con VFA tipo O1Caseros.

ANIMAL N°																											
82				440				1119				635				319				415				1057			
Tiempo	E ⁽¹⁾	I ⁽²⁾	FL ⁽³⁾	E	I	F-L	E	I	F-L	E	I	F-L	E	I	F-L	E	I	F-L	E	I	F-L	E	I	F-L	E	I	F-L
0 dpi	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+
10 dpi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
28 dpi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
470 dpi	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
535 dpi	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
565 dpi	nd	nd	+	-	-	+	nd	nd	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(1): ELISA - 3D

(2): IDAG

(3): ELISA F-L

dpi: días postinfección

nd: no determinado

+ : reacción positiva

- : reacción negativa

3.3- Respuesta de Ac postvacunación contra la proteína 3D en animales vírgenes

Con el fin de estudiar la presencia y cinética de Ac contra la proteína 3D inducida por diferentes vacunas comerciales, se examinaron grupos representativos de sueros de animales provenientes de pruebas de vacunas. En la Tabla N° 7 se muestran los resultados obtenidos a los 0, 30, 60 y 90 dpv con las 7 vacunas evaluadas.

Tabla N° 7: Respuesta de Ac contra la proteína 3D inducida por diferentes vacunas comerciales en grupos de bovinos vírgenes, medidos por el método de ELISA-3D.

VACUNA	0 DPV ^(a)	30 DPV	60 DPV	90 DPV
A ^(b)	0/17 ^(c)	3/17	0/17	0/17
B	0/14	7/14	5/14	1/14
C	0/16	14/16	10/16	5/16
D	0/12	0/12	0/12	0/12
E	0/12	0/12	0/12	0/12
F	0/16	14/16	8/16	0/16
G	0/17	0/17	0/17	0/17

(a): Días postvacunación

(b): Lotes de diferentes vacunas comerciales

(c): Bovinos positivos / bovinos totales

Las respuestas inducidas contra la proteína 3D, por las diferentes vacunas fueron muy variables. A los 30 dpv las vacunas D, E y G, no indujeron Ac contra 3D, resultado que se mantuvo a los 60 y 90 dpv.

Las cuatro vacunas restantes indujeron una respuesta positiva de Ac a los 30 dpv. El porcentaje de animales positivos fue variable, observándose un 17.6% y 50% de animales positivos para las vacunas A y B, y un 87.5% para las vacunas C y F. A los 60 dpv en los animales del grupo A no se detectaron Ac contra 3D, observándose los mismos resultados a los 90 dpv para los animales del grupo F. Uno de los 14 animales del grupo B (7.14%) y cinco de los 16 animales estudiados del grupo C (31.25%), se mantuvieron positivos para Ac contra 3D a los 90 dpv.

Los sueros también fueron evaluados por el método de IDAG, se puede observar un menor porcentaje de animales reactivos positivos para Ac anti-VIA, debido a la menor sensibilidad del método (Tabla N° 8).

Tabla N° 8: Respuesta de Ac contra el Ag VIA inducida por diferentes vacunas comerciales en grupos de bovinos vírgenes, medidos por el método de IDAG.

VACUNA	0 DPV ^(a)	30 DPV	60 DPV	90 DPV
A ^(b)	0/17 ^(c)	0/17	0/17	0/17
B	0/14	5/14	2/14	0/14
C	0/16	nd	nd	nd
D	0/12	0/12	0/12	0/12
E	0/12	0/12	0/12	0/12
F	0/16	10/16	6/16	0/16
G	0/17	0/17	0/17	0/17

(a): Días postvacunación

(b): Lotes de diferentes vacunas comerciales

(c): Bovinos positivos / bovinos totales

Estas observaciones demuestran que algunas vacunas son capaces de inducir una respuesta de Ac contra la proteína 3D y/o el Ag VIA de tipo transitoria, que difiere de la observada en sueros de animales luego de una infección, donde la respuesta es mayor en el tiempo.

3.4- Aplicación del método de ELISA-3D en estudios a campo

Con el fin de validar estadísticamente el método de ELISA-3D, éste se investigó bajo condiciones controladas y utilizando un número significativo de sueros en diferentes estudios de campo.

3.4.1- Ensayo en terneros

El objetivo en este punto fue estudiar la cinética de Ac contra la proteína 3D (por ELISA-3D) y el Ag VIA (por IDAG) en animales primovacunados y conocer la influencia de la revacunación en esta respuesta utilizando vacunas comerciales con antígeno propagado en epitelio lingual bovino (Frenkel) o en cultivo de línea (BHK-21) (Materiales y Métodos, Sección 7.3.1).

Los diferentes grupos de animales se evaluaron a los -20, 0, 30, 60, 90 y 120 días luego de recibir la primera dosis de vacuna. A estos tiempos, no se detectaron Ac contra la proteína 3D ni contra el Ag VIA en ningún grupo (Figuras N° 17, 18 y 19).

En el grupo 1 (Materiales y Métodos, Sección 7.3.1), luego de la aplicación de la segunda dosis, se detectaron Ac contra 3D en 1/8 animales (12.5%) a los 30 y 60 dpv, el que se negativizó a los 90 días postsegunda vacunación. Ningún animal del grupo 1 mostró reactividad positiva para Ac contra el Ag VIA (Figura N° 17).

En el grupo 2 (Materiales y Métodos, Sección 7.3.1), 18/26 animales (69.2%) se detectaron como reactores positivos a 3D a los 30 días postsegunda vacunación, de los cuales uno permanecía positivo a los 150 días postsegunda vacunación, y en el que no se detectaron Ac anti-3D a los 180 días postsegunda vacunación. A los 30 días postsegunda vacunación, se detectaron 6 animales (23%) reactores positivos a Ac contra el Ag VIA. El número de animales positivos descendió progresivamente hasta alcanzar cero a los 120 días postsegunda vacunación (Figura N° 18).

El grupo 3 a los 30 días postsegunda vacunación, 7/17 animales (41.5%) eran positivos para Ac contra 3D. Esta respuesta fue disminuyendo en los sucesivos muestreos llegando a los 150 días postsegunda vacunación sin animales reactores positivos. Este grupo mostró por IDAG un animal positivo (5.8%) a los 30 días postsegunda vacunación, el que se negativizó a los 60 días postsegunda vacunación (Figura N° 19).

La tercera dosis de vacuna se aplicó a los 240 días luego de la segunda vacunación, observándose un mayor número de animales reactivos positivos y una respuesta más sostenida en el tiempo en los 3 grupos.

Para el grupo 1, un 50% y 25% de los animales resultaron positivos a los 30 días posttercera vacunación, por ELISA-3D e IDAG respectivamente, detectándose solamente 1/8 positivo para Ac contra 3D a los 120 días de la tercera vacunación, último tiempo del ensayo y en el que los animales recibieron una cuarta dosis de vacuna. (Figura N° 17).

En el grupo 2, un 73% y un 69.2% de animales reactivos positivos fueron detectados a los 30 días posttercera vacunación por ELISA-3D e IDAG respectivamente. Esta respuesta fue descendiendo progresivamente en el tiempo pero de manera más sostenida, llegando a los 120 días posttercera vacunación con un 23% y un 15.3% de animales positivos por ELISA-3D e IDAG respectivamente, los que no se negativizaron antes de recibir la cuarta vacunación. (Figura N° 18).

El grupo 3 mostró a los 30 días posttercera vacunación un 82,3% de animales reactivos positivos por ELISA-3D y un 70,5% por IDAG. Esta respuesta fue disminuyendo en los sucesivos muestreos llegando a los 120 días posttercera vacunación con 4/17 animales reactivos positivos (23.5%) para Ac contra 3D y 1/17 animales positivos (5.85%) para Ac anti-VIA (Figura N° 19).

Las vacunas producidas en cultivos celular BHK-21 indujeron una respuesta de Ac anti-3D mayor a la detectada con las vacunas producidas en cultivos Frenkel. La probabilidad de desarrollar una respuesta positiva a 3D en los animales de los grupos 2 y 3 fue 3.3 (0.48 - 22.46) y 5.5 (0.87 - 35.27) veces mayor respectivamente que en los del grupo 1, diferencias que podrían estar asociadas a las diferentes fuentes de producción del antígeno.

Los animales centinelas (15 ovinos) resultaron negativos por ambas pruebas durante los 540 días que duró el ensayo.

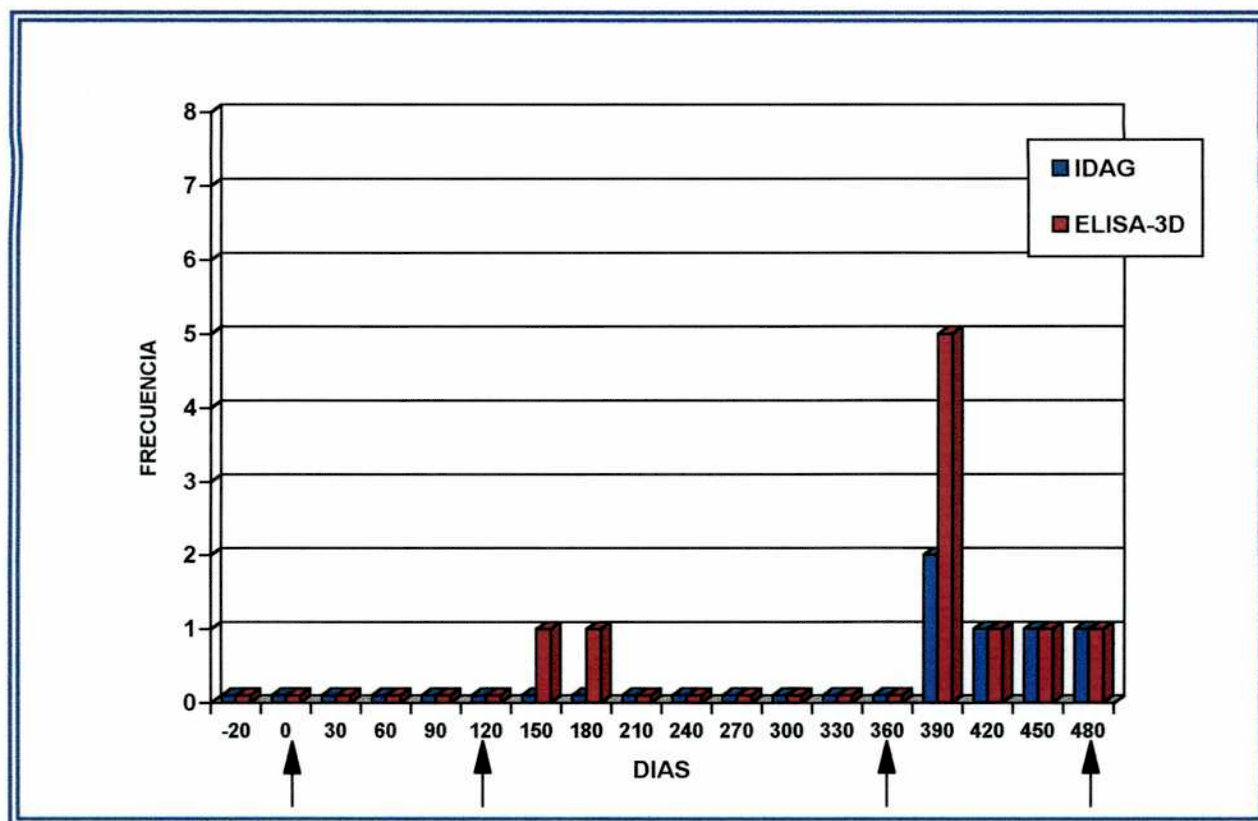
Las muestras de LEF de los 12 animales analizados (Materiales y Métodos, Sección 7.3.1.2), fueron negativas para el aislamiento de VFA.

Con el fin de conocer los niveles inmunitarios conferidos por la vacunación y relacionarlos con los resultados anteriores de ELISA-3D e IDAG, se evaluaron los sueros por el método de ELISA en F-L (Hamblin y col 1986), para cuantificar Ac específicos de tipo,

contra los 4 tipos de VFA presentes en la vacuna. Los sueros se evaluaron tanto a los 60 días postprimovacuna como a los 60 días postsegunda vacuna. El 80% de los animales, en los 3 grupos, mostraron títulos de Ac que variaron entre $\log_{10}=2.05$ o mayores a $\log_{10}=2.6$ a los 60 días postprimovacuna y entre $\log_{10}=2.3$ o mayores a $\log_{10}=2.6$ a los 60 días postsegunda vacuna. Los resultados observados luego de la 1ª y 2ª vacuna, revelaron en promedio altos títulos de Ac específicos contra las PE del VFA contenidas en las vacunas, indicando que la inmunidad conferida por las diferentes vacunas aplicadas fue satisfactoria.

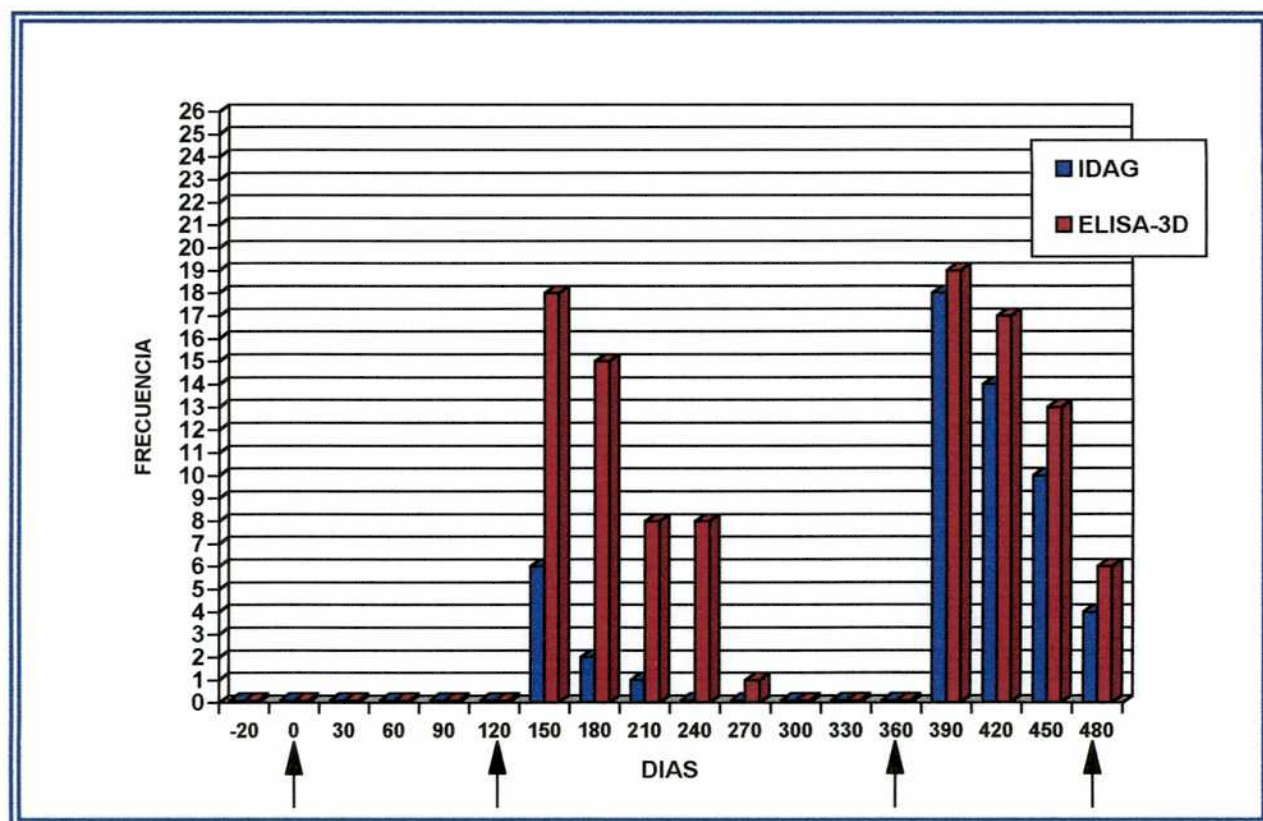
La correlación entre la mayor respuesta de Ac anti-3D luego de la revacunación con vacunas producidas con Ag propagado en cultivos de células (BHK-21) con una mayor concentración de Ag en estas vacunas, se realizó también midiendo la respuesta de Ac contra PE.

Figura N° 17: Detección de anticuerpos contra la proteína 3D por ELISA y el Ag VIA por IDAG en el Grupo 1.



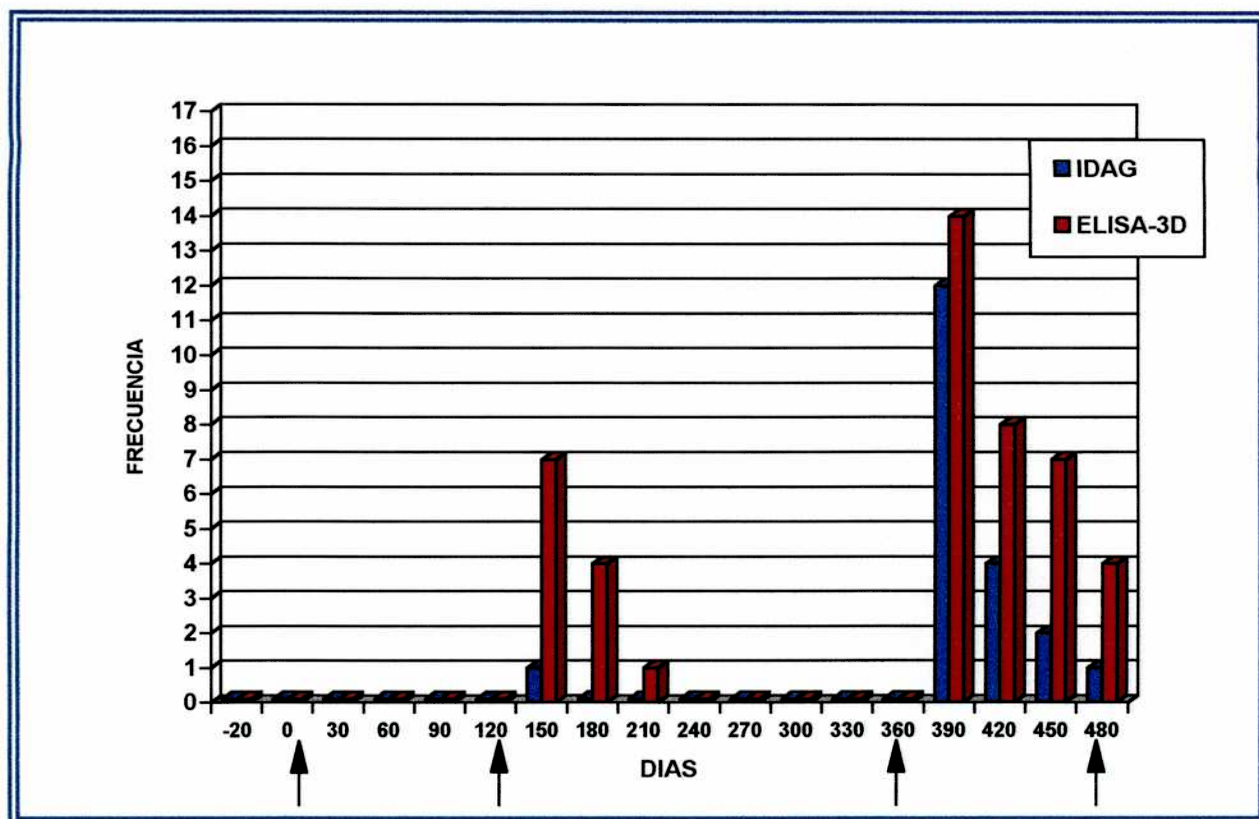
Suero de terneros ($n=8$) vacunados y revacunados, en los tiempos indicados con las flechas, se analizaron con los métodos de ELISA-3D e IDAG a lo largo de 480 días. Los animales eran negativos para Ac anti-3D y anti-VIA 20 días antes del inicio del ensayo y al tiempo cero. Las vacunas utilizadas en este ensayo, fueron vacunas comerciales tetravalentes contra el VFA, de tipo oleoso, con Ag propagado en cultivo lingual bovino (Frenkel).

Figura N° 18: Detección de anticuerpos contra la proteína 3D por ELISA y el Ag VIA por IDAG en el Grupo 2.



Suero de terneros ($n=26$) vacunados y revacunados, en los tiempos indicados con las flechas, se analizaron con los métodos de ELISA-3D e IDAG a lo largo de 480 días. Los animales eran negativos para Ac anti-3D y anti-VIA 20 días antes del inicio del ensayo y al tiempo cero. Las vacunas utilizadas en este ensayo, fueron vacunas comerciales tetravalentes contra el VFA, de tipo oleoso, con Ag propagado en cultivo celular de línea, BHK-21.

Figura N° 19: Detección de anticuerpos contra la proteína 3D por ELISA y el Ag VIA por IDAG en el Grupo 3.



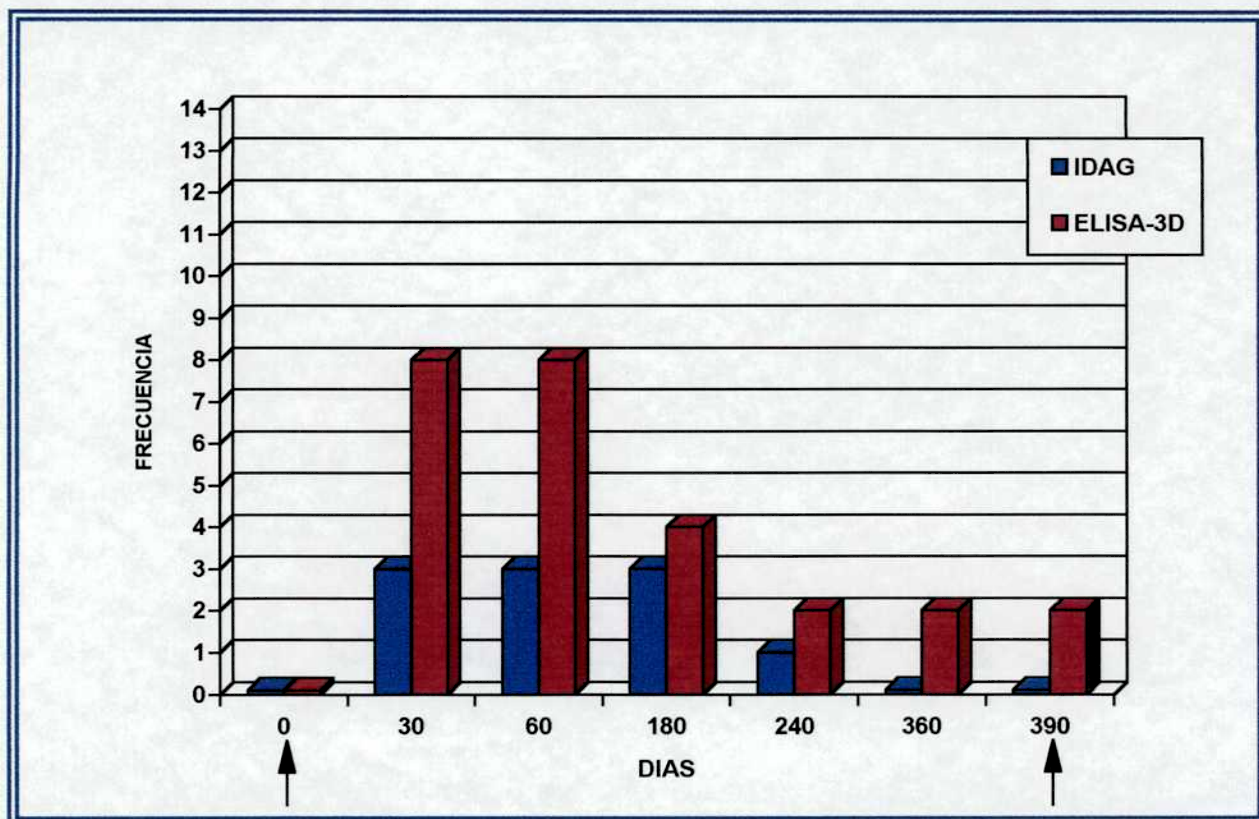
Suero de terneros (n=17) vacunados y revacunados, en los tiempos indicados con las flechas, se analizaron con los métodos de ELISA-3D e IDAG a lo largo de 480 días. Los animales eran negativos para Ac anti-3D y anti-VIA 20 días antes del inicio del ensayo y al tiempo cero. Las vacunas utilizadas en este ensayo, fueron vacunas comerciales tetravalentes contra el VFA, de tipo oleoso, con Ag propagado en cultivo lingual bovino (1ª vacunación) y cultivo celular de línea, BHK-21 (2ª, 3ª y 4ª vacunaciones).

3.4.2- Ensayo en bovinos mayores de 2 años

Con el objetivo de estudiar la cinética de Ac anti-3D y VIA en bovinos que han recibido múltiples vacunaciones, se utilizaron 14 bovinos mayores de 2 años de edad negativos para Ac contra 3D y el Ag VIA al tiempo cero del ensayo (Materiales y Métodos, Sección 7.3.2).

Los resultados mostraron que luego de la aplicación de la primera dosis de vacuna (séptima vacunación recibida), 8/14 animales (57.14%) fueron reactores positivos para Ac contra 3D a los 30 dpv. El número de animales positivos descendió progresivamente hasta llegar a los 390 dpv con 2/14 (14.28%) animales que aún permanecían positivos para Ac contra la proteína 3D (Figura N° 20).

Figura N° 20: Detección de anticuerpos anti-3D y anti-VIA en suero de bovinos tomados luego de repetidas vacunaciones.



Suero de bovinos (n=14) tomados luego de múltiples vacunaciones, con vacunas comerciales tetravalentes (A79, A85, O1 y C85), de tipo oleoso, contra el VFA. Los sueros se analizaron por los métodos de ELISA-3D e IDAG a lo largo de 390 días. Los animales se seleccionaron de manera que fueran todos negativos para Ac anti-3D y anti-VIA al tiempo cero del ensayo y que fueran mayores de 2 años, (han recibido más de 7 vacunaciones).

Cuando se aplicó la técnica de IDAG, fueron detectados 3/14 animales como reactores positivos (21.43%) a los 30 dpv. La respuesta de Ac medida por IDAG, también mostró un descenso en el número de animales positivos, llegando al final del ensayo con 0/14 animales positivos.

Cinco sueros fueron titulados para Ac contra la proteína 3D por el método de ELISA-3D en los siguientes tiempos: 0, 30, 60, 180, 240, 360 y 390 dpv. Todos los animales mostraron títulos entre $\log_{10}= 1.19$ y 1.49 a los 30 dpv. Si bien 1/5 mostró un aumento del título a los 60 dpv ($\log_{10}=1.91$), todos mostraron un decrecimiento en los títulos a lo largo del tiempo hasta su negativización (Tabla N° 9).

TABLA N° 9: Determinación del título de Ac contra la proteína 3D, por ELISA, en sueros de bovinos que han recibido múltiples vacunaciones.

Bovino N°	0 dpv ^(a)	30 dpv	60 dpv	180 dpv	240 dpv	360 dpv	390 dpv
116	- ^(b)	1.21	0.96	-	-	-	-
207	-	1.19	-	-	-	-	-
352	-	1.49	1.19	1.01	1.19	-	-
33	-	1.31	1.91	1.01	0.96	-	-
50	-	1.44	1.3	1.00	1.07	-	-

Cinco de los sueros se titularon para Ac contra la proteína 3D por el método de ELISA-3D en todos los tiempos muestreados. Los títulos se expresaron como el $\log_{10}$ de la última dilución que da el 50% del valor medio de las absorbancias alcanzadas en el control de antígeno con SNB.

^(a) Días postvacunación

^(b) Todo título menor que $\log_{10}= 1$ se tomó como negativo (-) para Ac anti-3D, según se determinó en ensayos anteriores.

3.4.3- Estudio de la actividad viral en tres partidos de la Provincia de Buenos Aires

Con el objetivo de estudiar la aplicación del método de ELISA-3D como un indicador indirecto para estudiar actividad viral en estudios seroepidemiológicos, éste fue aplicado en tres partidos de la provincia de Buenos Aires (Lobos, Navarro y Suipacha) y los resultados fueron comparados con los obtenidos con la técnica de IDAG.

La prevalencia de bovinos reaccionantes a Ac contra la proteína 3D y el Ag VIA medido por ELISA-3D y por IDAG se presentan en la Tabla N°10. Por el método de ELISA-3D, se pudo observar un mayor porcentaje de animales reactores positivos lo cual podría atribuirse a la mayor sensibilidad del método.

La prevalencia de animales reactores positivos a la presencia de Ac contra 3D disminuyó o se mantuvo cuando se compararon los resultados obtenidos en los diferentes años dentro de cada partido. Este descenso fue significativo cuando se analizaron los datos del partido de Navarro para los años 1993 y 1994. El mismo se mantuvo cuando se comparan los datos de los años 1994 y 1995 para los partidos de Navarro y Suipacha. Para el partido de Lobos, este descenso fue significativo para el año 1993 ($p < 0.05$), sin embargo no se observaron diferencias significativas entre los años 1994, 1995 y 1996 ($p > 0.05$). La comparación de los resultados obtenidos con el ELISA-3D con los obtenidos con la técnica de IDAG, reveló una buena correlación entre ambos métodos (Tabla N° 10). Se pudo observar un significativo descenso de la prevalencia de Ac contra el Ag VIA en los partidos de Navarro y Lobos, manteniéndose la misma en el partido de Suipacha (Figuras N° 21a, 21b y 21c).

El porcentaje de animales reactores positivos por IDAG fue menor que el obtenido para Ac anti-3D, si bien esta diferencia no fue significativa ($p > 0.05$). La disminución de la actividad viral medida por IDAG y ELISA-3D se vió asociada con un aumento en el nivel de inmunidad conferida por la vacunación (León y col., 1993).

El método de ELISA-3D resultó un método altamente sensible, específico y reproducible, por lo cual sería un método recomendable para ser utilizado en el monitoreo de actividad viral en estudios seroepidemiológicos.

Tabla N° 10: Prevalencia de bovinos reactivos a Ac contra la proteína 3D y el Ag VIA obtenidos cuando se aplican los métodos de ELISA-3D e IDAG.

Los datos se expresan en frecuencia de animales reactivos positivos.

	SUIPACHA	
	1994	1995
IDAG	14/124 (11%)	18/180 (10%)
ELISA-3D	31/124 (25%)	49/180 (27%)

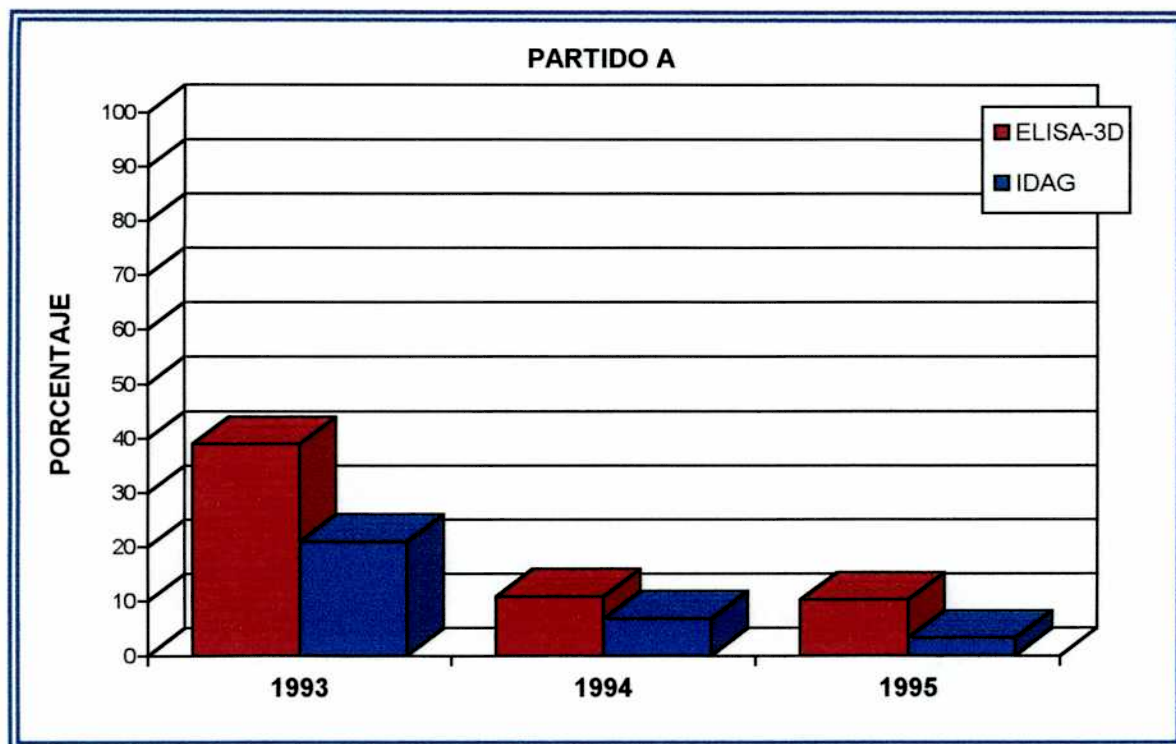
	NAVARRO		
	1993	1994	1995
IDAG	21/98 (21 %)	5/73 (6.8 %)	5/154 (3.2 %)
ELISA-3D	38/98 (39%)	8/73 (10.9 %)	16/154 (10.3 %)

	LOBOS			
	1993	1994	1995	1996
IDAG	21/139 (15.1 %)	2/136 (1.5%)	1/147(0.68%)	2/120 (1.6%)
ELISA-3D	31/139 (22 %)	7/136 (5.14%)	4/147 (2.7%)	8/120 (6.6%)

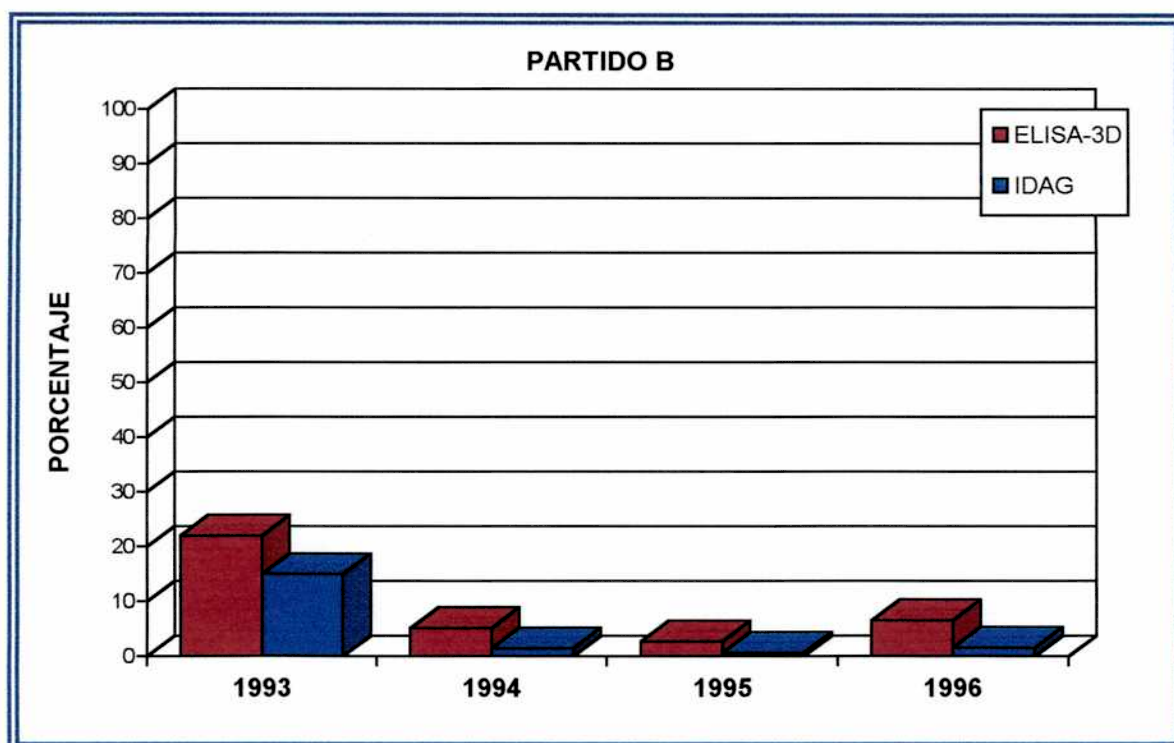
Figura N° 21: Prevalencia de bovinos reactivos a Ac contra la proteína 3D y el Ag VIA medido por ELISA-3D e IDAG respectivamente.

Los datos se expresan en porcentaje de animales reactivos positivos.

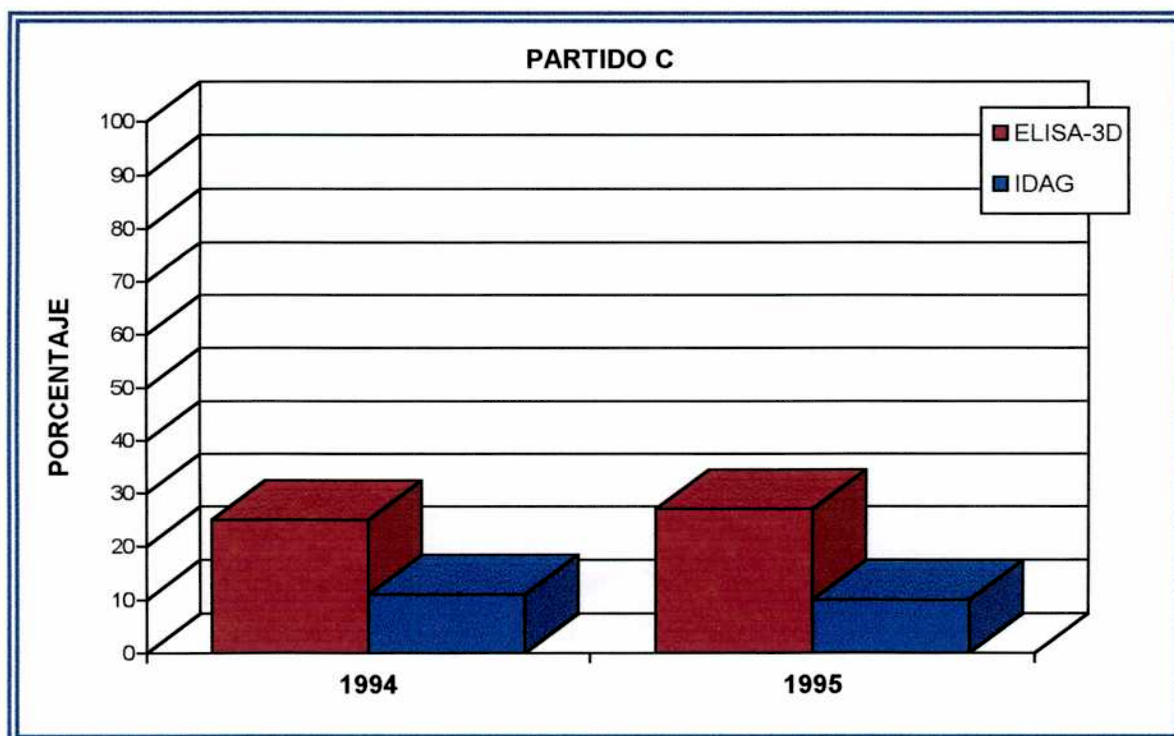
a) Partido A: NAVARRO



b)- Partido B: LOBOS



c)- Partido C: SUIPACHA



4- Desarrollo del método de “Western blot” para la detección de anticuerpos contra las PNE GST-2C, GST-3A y GST-Lb del VFA

4.1- Desarrollo del antígeno GST-2C biosintético

4.1.1- Secuenciación del DNA

Con el fin de confirmar el tamaño y la orientación del gen de 2C clonado en el plásmido de expresión pGEX-3X, el plásmido recombinante pMF4 fue secuenciado. La secuencia obtenida se analizó con información del Data Gene Bank. Los resultados mostraron correlación con el genoma del virus de la Fiebre Aftosa O1K. Las secuencias se analizaron también por alineamiento con el genoma del VFA tipo O1K, usando los programas Aligment y Clone Manager, los resultados mostraron homología con el gen de la proteína 2C.

4.1.2- Transformación de *E.coli* con pMF4

El plásmido de expresión pMF4a se utilizó para transformar las cepas electrocompetentes de *E.coli*: DH5 α de alta eficiencia de transformación y BL21 y BL21(DE3) de baja actividad proteasa.

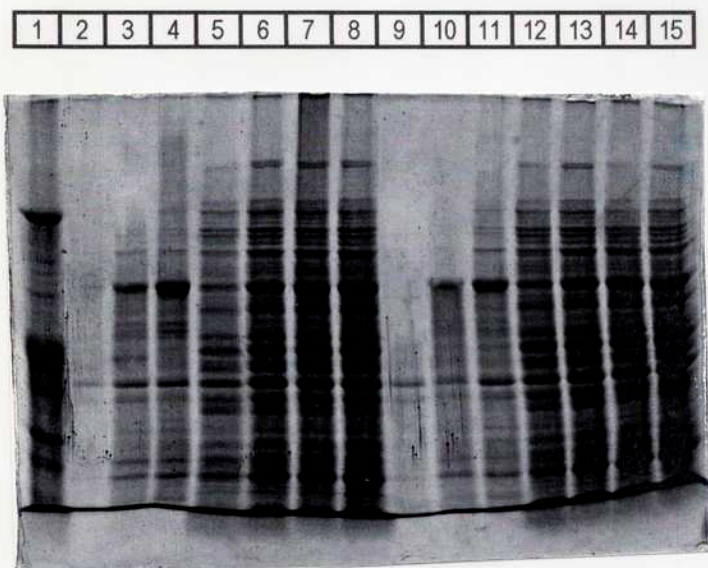
Para confirmar que la transformación de las diferentes cepas de *E.coli* con el plásmido pMF4 fue exitosa y que el plásmido contenía el gen de 2C, se realizaron minipreparaciones del ADN siguiendo el método de extracción de lisis alcalina. Las muestras de ADN plasmídico obtenidas se sometieron a digestión con las enzimas BamHI, EcoRI y una doble digestión BamHI/EcoRI durante una hora a 37°C. Las digestiones se sembraron en un gel de agarosa al 0.6%. Los resultados mostraron bandas de ADN correspondientes al tamaño de pMF4 (5926 pb) así como al plásmido (4970 pb) más el inserto (956 pb) cuando se lo trató con ambas enzimas.

4.1.3- Inducción de la expresión y Purificación de GST-2C en *E.coli*

Los cultivos de *E.coli* BL21(DE3) transformados con pMF4 se incubaron a 37°C y a 20°C con el fin de estudiar las condiciones óptimas de crecimiento e inducción de expresión de la proteína de fusión GST-2C. De los cultivos inducidos por el agregado de IPTG 0.1 M, se tomaron fracciones a diferentes tiempos: sin inducir, 45min, 1.30 horas, 2.30 horas, 4 horas y 21 horas. Estas fracciones se centrifugaron y los “pellets” se guardaron a -80°C. Los mismos se descongelaron, se resuspendieron en PBS y se sometieron a sonicación. Luego de la sonicación, se centrifugaron y los extractos crudos (sobrenadante y “pellets”) se fraccionaron en un gel de poliacrilamida. Luego de la tinción con Coomassie blue se detectó un aumento en los niveles de la expresión en función del tiempo observándose una banda de mayor intensidad con respecto a las otras bandas, correspondiente a la proteína de fusión GST-2C de PM 60000 Da. Se observó una mayor expresión de la proteína entre la 1.30 hs y las 2.30 hs de inducción con IPTG (Figura N°21).

Por otro lado, no se observaron diferencias entre los cultivos inducidos a diferentes temperaturas: 37°C y 20°C, por lo tanto para la alta expresión y purificación de la proteína se trabajó a 37°C.

Figura N°22: Expresión de la proteína GST-2C en *E. coli* transformadas con el plásmido recombinante pMF4.



Análisis por SDS-PAGE de las proteínas totales de dos clones seleccionados.

Las calles corresponden a: 1: MPM (kDa); 2-9: *E. coli* transformada sin inducir clones 1 y 2 (fracción: "pellet"); 3-10: *E. coli* transformada inducida durante 1.30 hs (fracción: "pellet"); 4-11: *E. coli* transformada inducida durante 2.30 hs (fracción: "pellet"); 5-12: *E. coli* transformada sin inducir (fracción: sobrenadante); 6-13: *E. coli* transformada inducida durante 1.30 hs (fracción: sobrenadante); 7-14: *E. coli* transformada inducida durante 2.30 hs (fracción: sobrenadante); 8-15: *E. coli* transformada inducida durante 4 hs (fracción: sobrenadante).

El estudio de los extractos crudos por “Western blot” usando un suero anti-GST y un suero positivo de un animal experimentalmente infectado con el VFA con alto título de Ac contra todas las proteínas no estructurales mostró una reacción específica con la proteína expresada de 60000 Da.

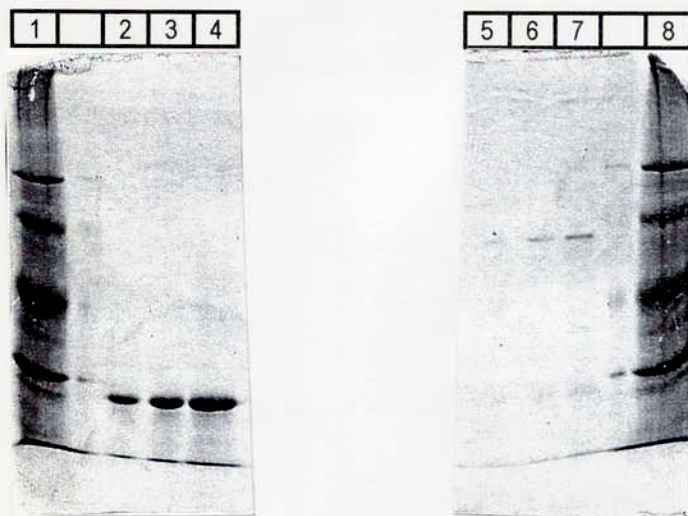
Con el fin de observar si se mejoraban los niveles de expresión de la proteína, se trabajó con diferentes cepas de *E.coli*. Se transformaron cepas BL21, BL21(DE3) y DH5 α con el plásmido pMF4a. La inducción de la expresión se realizó con IPTG 0.1M, según las condiciones establecidas en el ensayo previo, a 37°C y durante 1.30 - 2.30 horas. Para la producción de la proteína con fines de utilizarla como antígeno y purificarla, se trabajó con cultivos de mayor volumen. Luego de la inducción los cultivos se sonicaron y se trabajó con la fracción soluble para la purificación de la proteína.

La proteína se purificó por afinidad utilizando perlas de glutation agarosa al 50% (Sigma). La proteína eluída se analizó por SDS-PAGE y “Western blot” utilizando los mismos sueros como se explicó previamente. Los geles teñidos con Coomassie blue mostraron una banda única correspondiente con el tamaño de la proteína de fusión, 60000 Da, mostrando una alta purificación. Los resultados de “Western blot”, mostraron una reacción específica con la proteína GST-2C. La concentración de los diferentes lotes de proteína producidos se midió en espectrofotómetro a 280 nm, resultando entre 743,29 μ g/ml y 1500 μ g/ml (Figura N° 23).

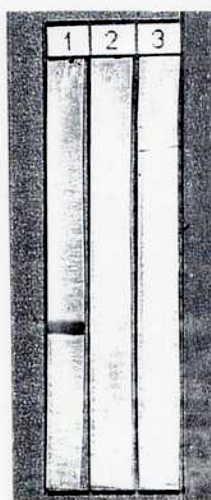
Estos resultados muestran una alta expresión de la proteína recombinante y un alto rendimiento luego de la purificación. Se observa también que la proteína se eluye específicamente lo que se corrobora por los resultados obtenidos por “Western blot” .

Figura N° 23: Purificación de la proteína recombinante GST-2C y caracterización por “Western blot”.

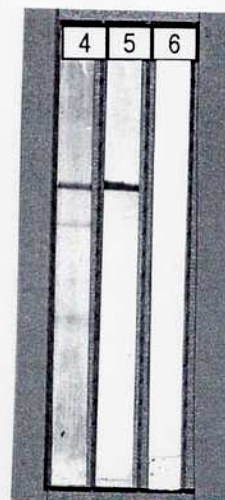
(a)- SDS-PAGE



(b)- “Western blot” frente a GST



(c)- “Western blot” frente a GST-2C



La proteína GST-2C obtenida de la transformación de *E.coli* con el plásmido pMF4a, se purificó por afinidad con perlas de glutation agarosa 50%. La misma se resolvió en un SDS-PAGE al 12% (a) y luego se realizó un “Western blot” para los siguientes sueros: suero de bovino infectado experimentalmente con VFA tipo O1Campos, de 21 dpi; suero de bovino proveniente de zona libre de FA (sur del paralelo 42°) y un suero de bovino anti-GST (c). Los mismos sueros fueron enfrentados también contra GST (b).

Panel a: 1 y 8: MPM; 2, 3 y 4: GST; 5, 6 y 7: GST-2C. Paneles b y c: 1 y 4: suero bovino anti-GST; 2 y 5: suero bovino infectado con VFA (21 dpi); 3 y 6: suero bovino libre de Ac contra el VFA.

4.2- Optimización del método de "Western blot"

Para el desarrollo del método de "Western blot", fue necesario evaluar las concentraciones óptimas de cada uno de los reactivos así como condiciones de corrida electroforética y transferencia. Para ello, se analizaron diferentes concentraciones de antígeno, condiciones de bloqueo, lavado, así como también las diluciones del suero bovino y del conjugado anti-bovino que permitieron una mejor reactividad.

Diferentes concentraciones (1, 3, 5, 10 y 15 µg) de las proteínas (GST-2C, GST-3A y GST-Lb) se sembraron por calle de 3 mm, para determinar la concentración óptima, tanto para su visualización en los geles como para la reacción de "Inmunoblot". Por otro lado estas concentraciones se analizaron bajo diferentes condiciones de electroforesis y transferencia. Las mismas fueron: 30 mA de corriente/voltaje variable ó 200 volts/corriente variable para el SDS-PAGE y 25mA de corriente/voltaje variable, a 4°C durante 17 horas ó 100 volts/corriente variable a 4°C durante 1 hora para la transferencia (datos no presentados).

Una concentración de 3µg / calle de 3 mm resultó óptima. Asimismo se eligieron las condiciones de voltaje fijo - corriente variable para la electroforesis y la transferencia.

Se estudiaron también diferentes tiempos de bloqueo con PBS-Tween 0.1%-Leche 3% : 1 hora a 37°C con agitación ó 17 horas a 4°C, no observándose diferencia entre ambas. Diferentes diluciones de los sueros fueron ensayadas: 1/10, 1/20, 1/50, 1/100 y 1/200 bajo las condiciones de corrida mencionadas anteriormente.

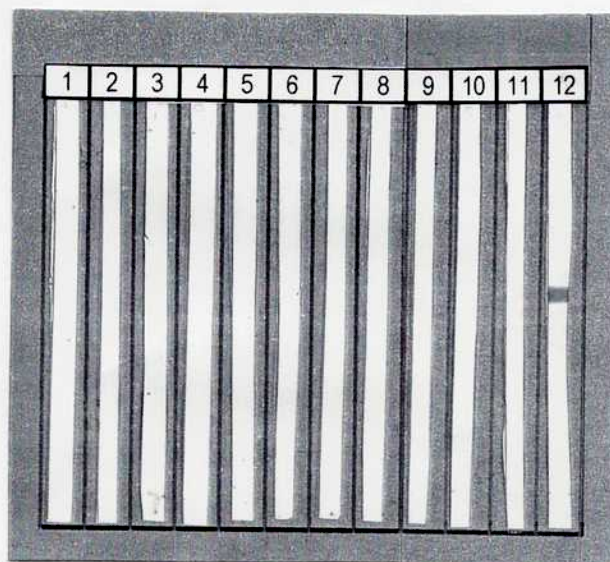
En base a los resultados, las condiciones establecidas: 3 µg de Ag/calle de 3 mm, dilución del suero bovino 1/100, dilución del conjugado-fosfatasa alcalina 1/200, se utilizaron en todos los ensayos de "Western blot" realizados.

4.3- Detección de anticuerpos contra las proteínas GST-2C, GST-3A y GST-Lb del VFA

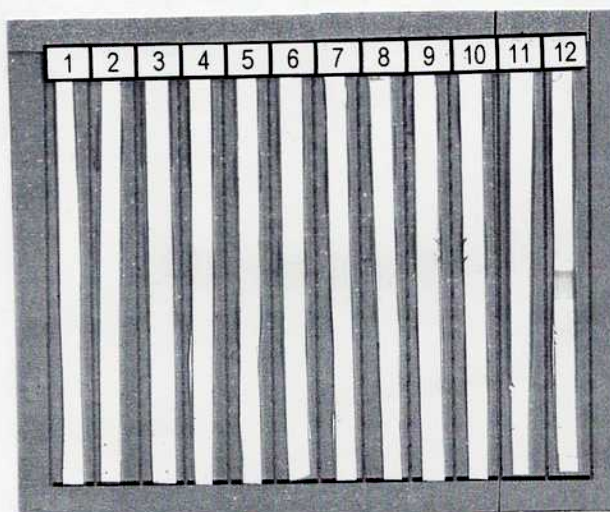
El análisis de los sueros de zona libre (n=10), libres de Ac contra el VFA medido por ELISA en F-L, resultaron negativos por el método de “Western blot” frente a las PNE GST-2C, GST-3A y GST-Lb evaluadas (Figura N° 24). Estos sueros fueron analizados también por las técnicas de ELISA-3D e IDAG, mostrando también resultados negativos. Ninguno de los sueros reaccionó contra GST.

Figura N° 24: Detección de Ac contra las proteínas GST-3A (a), GST-Lb (b), GST-2C (c) y GST (d) por “Western blot” en sueros de bovinos provenientes de zona libre de FA.

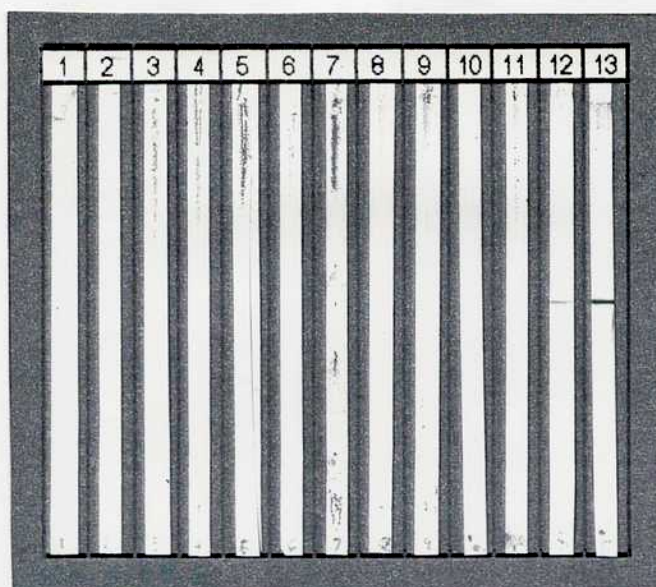
(a)- GST-3A



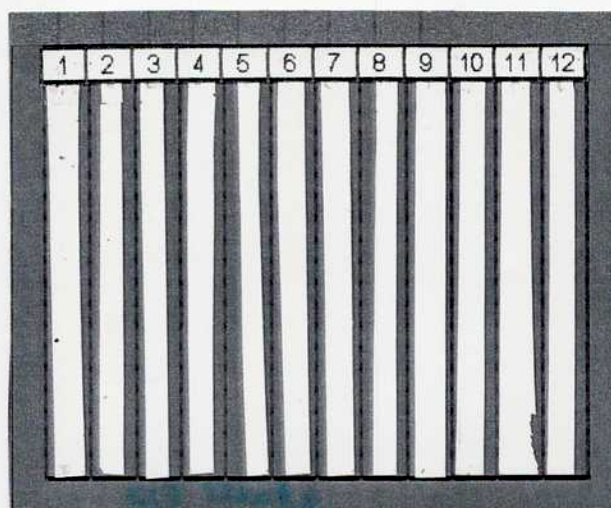
(b)- GST-Lb



(c)- GST-2C



(d)- GST



Las proteínas purificadas se sembraron en un SDS-PAGE y luego se realizó un “Western blot” utilizando sueros de bovinos provenientes de zona libre de FA, libres de Ac contra el VFA, medidos por ELISA en F.-L.

Panel a, b y d: 1-10: sueros de bovinos de zona libre de FA, 11 : control de suero negativo para Ac contra el VFA; 12: control de suero positivo para Ac contra el VFA. Panel c: 1-10: sueros de bovinos de zona libre de FA, 11: control de suero negativo para Ac contra el VFA; 12 y 13: control de suero positivo para Ac contra el VFA.

Si bien es conocida la cinética de Ac contra las diferentes PNE del VFA en animales infectados, resultó necesario conocer como es esta respuesta cuando se aplica el método de “Western blot” desarrollado y compararlo con los métodos de ELISA-3D e IDAG. Para ello, se evaluaron 6 sueros bovinos, tomados entre los 0 y 30 días postinoculación con VFA.

Frente a GST-Lb, se observó una respuesta positiva en 4/6 animales a los 20 dpi, manteniéndose a los 30 dpi. La cinética de Ac contra GST-3A mostró una reacción positiva a partir de los 7 dpi en 3/6 sueros. Dos de los 3 bovinos restantes seroconvirtieron a los 14 dpi, siendo todos positivos para Ac anti-3A a los 20 y 30 dpi. Cuando se estudió la respuesta de Ac contra 2C, 1/6 bovinos mostró Ac anti-2C a los 7 dpi, observándose la seroconversión en todos los animales entre los 14 y 20 dpi, resultado que se mantuvo a los 30 dpi. Los resultados fueron comparados con los obtenidos cuando se aplican las técnicas de ELISA-3D e IDAG. (Tabla N° 11 y Figuras N° 25 y N° 26).

Figura N° 25: Frecuencia de animales reactivos positivos frente a las PNE 2C, 3A y Lb, por “Western blot”, a la PNE 3D por ELISA-3D y al Ag VIA por IDAG.

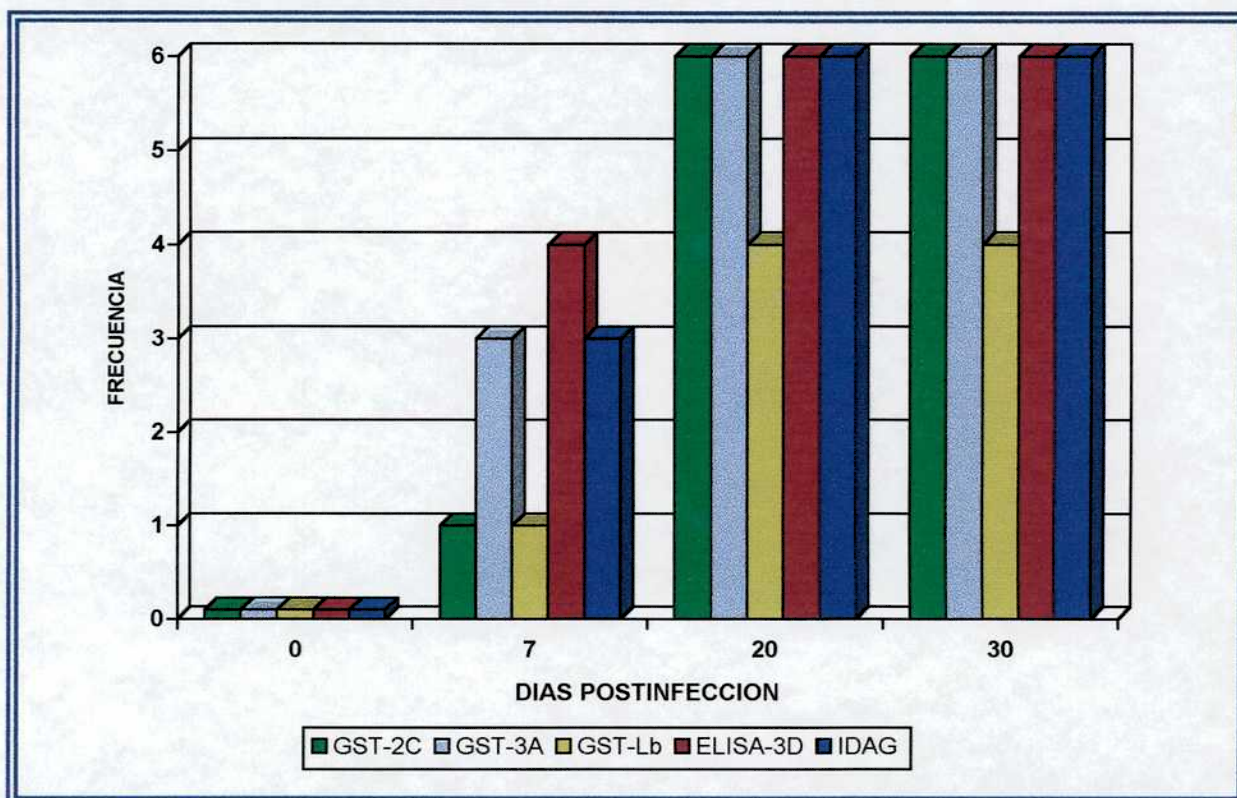
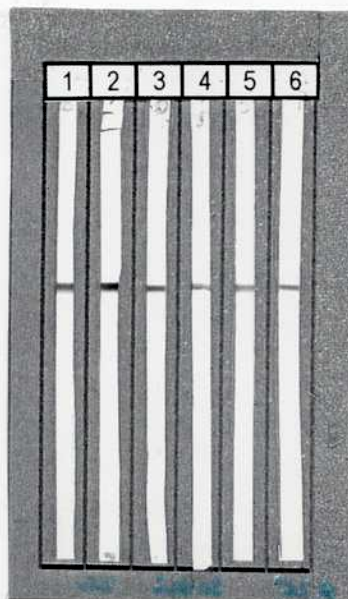
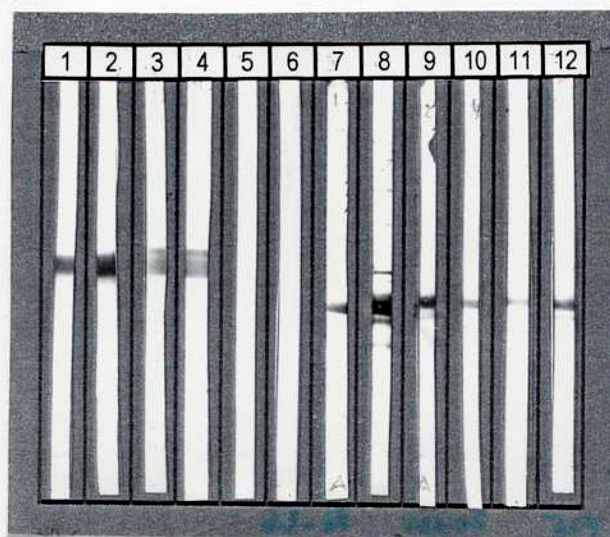


Figura N° 26: Detección de Ac contra las proteínas recombinantes GST-2C (a), GST-3A (b) y GST-Lb (c) en sueros de bovinos luego de una infección experimental con VFA medido por “Western blot”.

(a)- GST-2C



(b)- GST-Lb y GST-3A



Sueros de bovinos experimentalmente infectados con VFA, tomados a los 20 dpi.

Panel a: calles 1-6:animales N° 1, 2, 3, 4, 5 y 6 frente a GST-2C.

Panel b: calles 1-6 animales N° 1, 2, 3, 4, 5 y 6 frente a GST-Lb, calles 7-12 animales N° 1, 2, 3, 4, 5 y 6 frente a GST-3A.

En la Tabla N° 12 y Figura N° 27 se observan los resultados obtenidos cuando se evalúan sueros de animales vacunados, tomados a los 60 y 90 dpv, frente a las PNE 2C, 3A y Lb. Ninguno de los sueros analizados dieron una reacción positiva frente a GST-Lb. De los 14 sueros analizados frente a GST-3A, 4/14 resultaron positivos para Ac contra 3A a los 60 y 90 dpv. Los 10 bovinos restantes no mostraron reactividad positiva frente a 3A en estos dos tiempos ensayados. Cuando se analizaron los sueros para evaluar Ac contra la proteína 2C, ninguno de estos sueros resultó positivo, ni a los 60 ni a los 90 dpv. Tampoco se observó reacción frente a GST. La comparación de los resultados con los obtenidos por el método de ELISA-3D e IDAG, mostró un mayor número de animales positivos para Ac contra 3D, 6/14 bovinos, a los 60 dpv, negativizándose 2 de estos sueros a los 90 dpv. Por la técnica de IDAG, solamente se detectó un animal positivo a los 60 dpv, el que fue negativo a los 90 dpv.

Tabla N° 12: Detección de Ac contra las PNE 2C, 3A y Lb medido por el método de “Western blot”, en sueros de bovinos vacunados.

Bovino N°	DIAS POSTVACUNACION									
	60					90				
	2C	3A	Lb	3D	ID	2C	3A	Lb	3D	ID
1	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
2	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-
11	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-
12	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-
13	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
14	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-

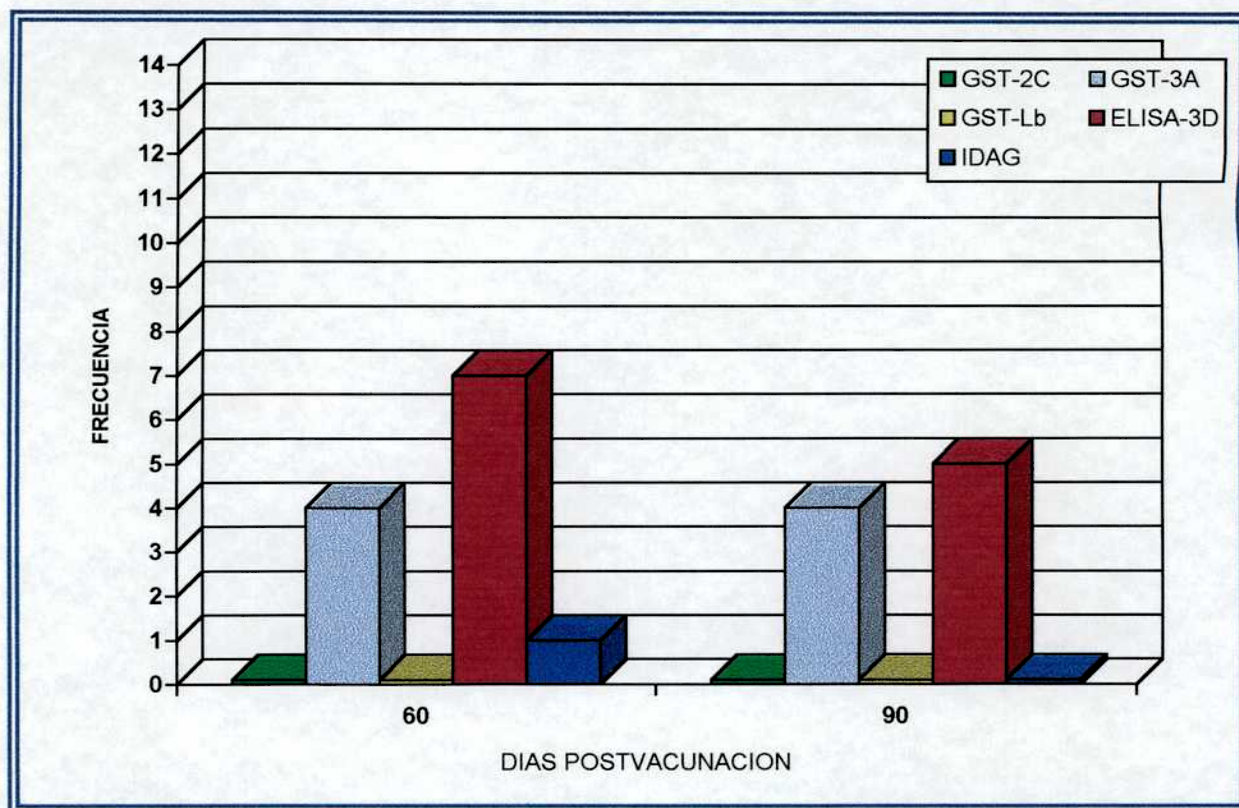
+: reacción positiva

-: reacción negativa

3D: Detección de Ac contra 3D medido con el método de ELISA-3D.

ID: Detección de Ac frente al Ag VIA, medido con la técnica de IDAG.

Figura N° 27: Frecuencia de animales vacunados, reactores positivos frente a las PNE 2C, 3A y Lb, por “Western blot”, a la PNE 3D por ELISA-3D y al Ag VIA por IDAG.



4.4- Evaluación de la proteína GST-2C con sueros categorizados. Comparación con los métodos de ELISA-3D e IDAG

Del análisis de los resultados obtenidos previamente frente a las PNE 2C, 3A, y Lb, se apuntó a evaluar la proteína 2C en un mayor número de sueros, como Ag complementario en la diferenciación de animales que han sufrido una infección con el virus y animales vacunados.

4.4.1- Sueros de zona libre de Fiebre Aftosa

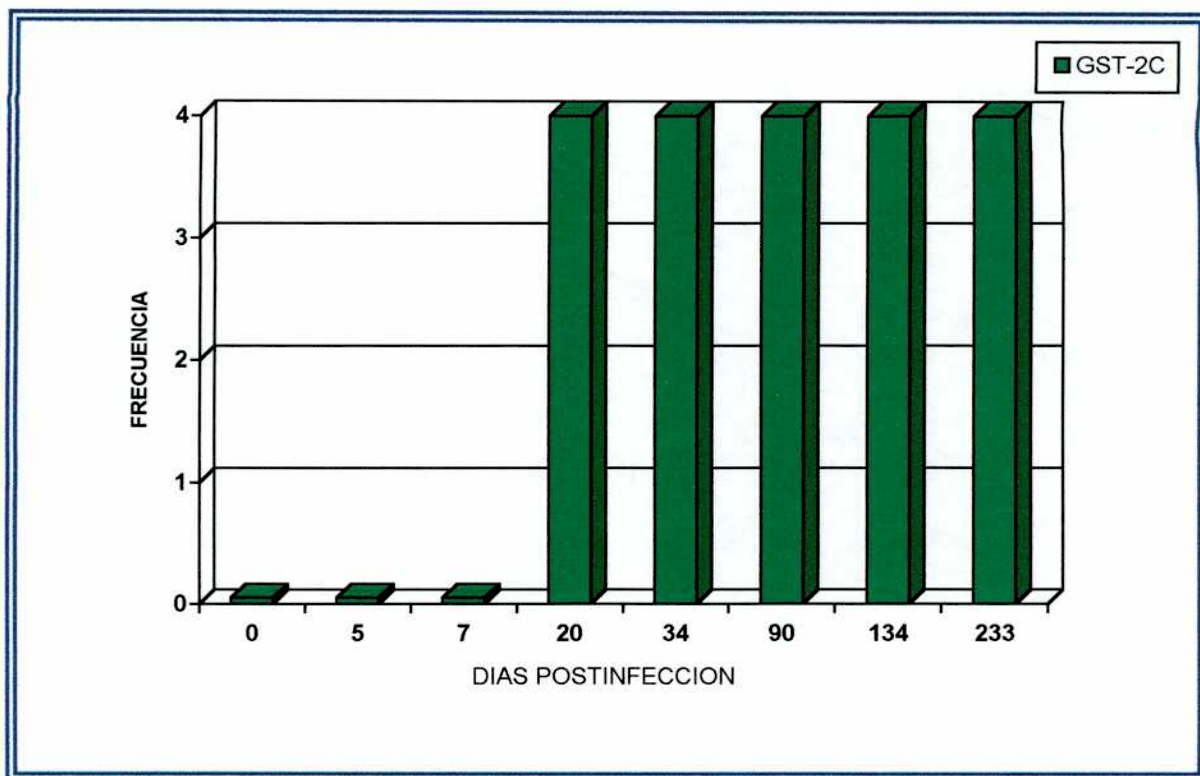
Los n=40 sueros bovinos provenientes de zona libre, resultaron negativos por el método de “Western blot” frente GST-2C. Ninguno de los sueros analizados reaccionó frente a GST. Estos resultados fueron comparables con los obtenidos con las técnicas de ELISA-3D e IDAG, los que también mostraron resultados negativos.

4.3.2- Sueros de animales experimentalmente infectados

En la Figura N° 28 se muestran los resultados obtenidos del estudio de cinética de Ac contra GST-2C en un grupo de 4 bovinos experimentalmente infectados con el VFA, durante el estado agudo y convaleciente de la infección.

Los Ac contra 2C se detectaron a partir de los 20 dpi en los cuatro animales en estudio, resultado que se mantuvo hasta los 233 dpi, último tiempo del ensayo. Se puede ver que el nivel de Ac aumenta con el tiempo postinfección transcurrido. Ninguno de los sueros reaccionó en forma inespecífica cuando se los enfrentó a GST.

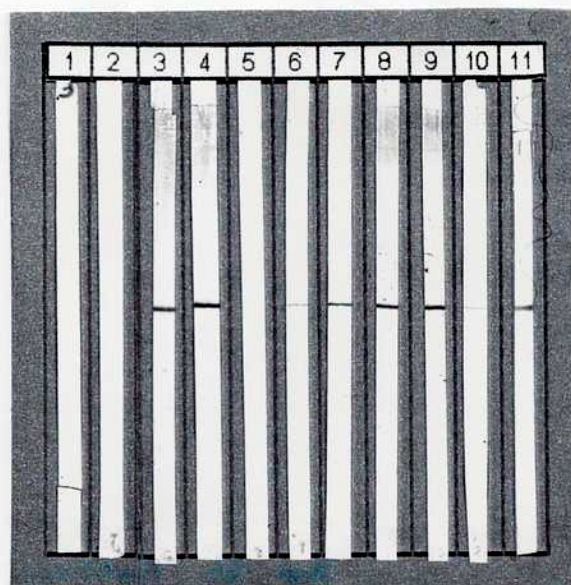
Figura N° 28: Respuesta de Ac contra la proteína 2C del VFA, en 4 bovinos luego de una infección experimental por contacto con dos terneros infectados con VFA tipo O1 Caseros, medido por el método de “Western blot”.



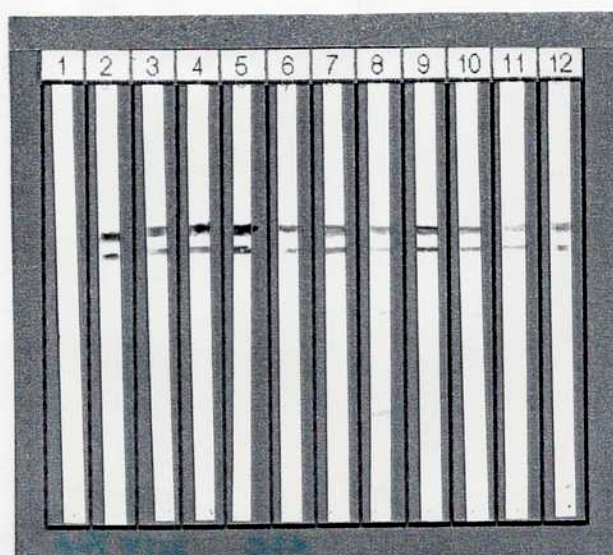
Cuando se analizó un mayor número de sueros de animales infectados (n=70) con el VFA, tomados entre los 10 y 535 dpi, se pudo observar una seroconversión positiva para Ac anti-2C a partir de los 10 dpi. De los 70 sueros de bovinos analizados, solamente 2 fueron negativos. Cabe aclarar que estos dos últimos sueros correspondían a animales de 535 dpi, de los cuales uno había sido negativo también para Ac contra la proteína 3D por el método de ELISA. Algunos de los sueros analizados se muestran en la Figura N° 29.

Figura N° 29: Detección de Ac contra la proteína GST-2C por “Western blot” en sueros de bovinos experimentalmente infectados con VFA.

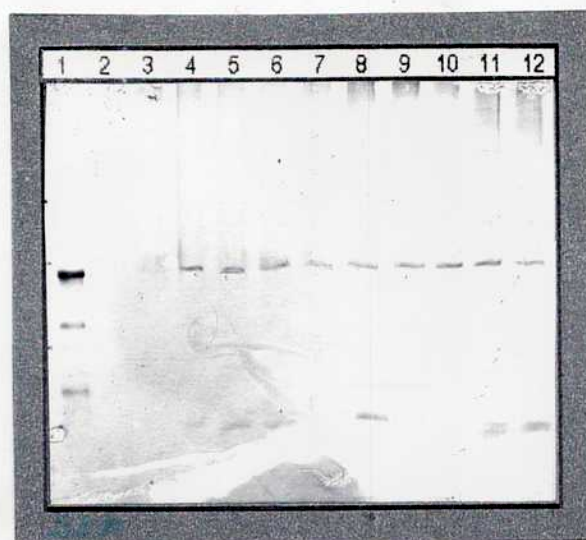
(a)



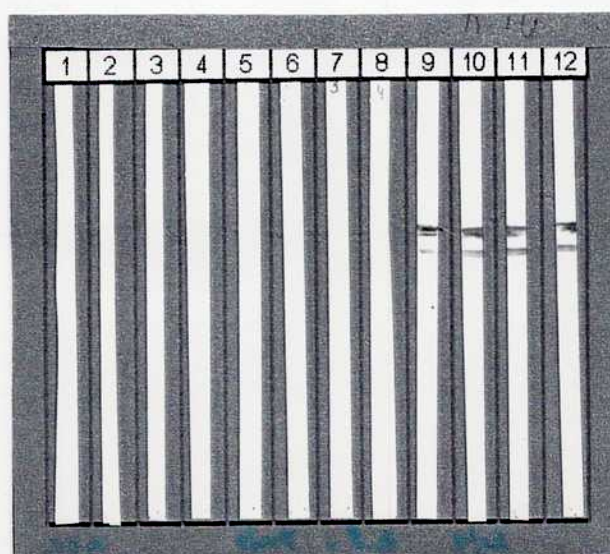
(b)



(c)



(d)



Sueros de bovinos experimentalmente infectados con el VFA, tomados a diferentes tiempos postinfección. (N° animal / dpi).

Panel a: 1: 440/535, 2: 415/535, 3: 18/34, 4: 18/90, 5: control negativo, 6: 18/233, 7: 19/20, 8: 19/34, 9: 19/90, 10: 19/233, 11: 91/20.

Panel b: 1: Control negativo, 2: 12/19, 3: 956/23, 4: 342/23, 5: 877/23, 6: 3/100, 7: 2/150, 8: 9/90, 9: 877/48, 10: 342/48, 11: 1224/48, 12: 4/120.

Panel c: 1: control positivo 91/21, 2: control negativo, 3: 31/14, 4: 31/21, 5: sc/14, 6: sc/21, 7: sc/28, 8: 1/10, 9: 2/10, 10: 3/30, 11: 4/30, 12: 9/33.

Panel d: 1-8 : sueros de zona libre de FA, 9 : 956/16, 10 : 392/16, 11 : 1224/16, 12 : 877/16.

Los resultados se compararon con los obtenidos con los métodos de ELISA-3D e IDAG (Tabla N° 13).

Se observó una reacción positiva para Ac anti-2C por “Western blot” a partir de los 10 dpi, así como para Ac anti-3D y anti-VIA por ELISA-3D e IDAG respectivamente. Es importante destacar que la respuesta contra la proteína 3D por ELISA-3D en algunos sueros fue más temprana.

Tabla N° 13: Respuesta de Ac frente a la proteína 2C por “Western blot”, a la proteína 3D por ELISA-3D y al Ag VIA por IDAG en sueros de bovinos infectados con VFA.

	“Western blot”	ELISA-3D	IDAG
n	68/70 ^(a)	69/70	60/70
Porcentaje ^(b)	97.14%	98.57%	85.71%

n : número de sueros evaluados

(a): Sueros positivos por el método / Sueros totales evaluados

(b): Porcentaje de bovinos positivos para Ac contra 2C, 3D o Ag VIA según el método.

4.4.3- Sueros de animales vacunados

El objetivo de este punto fue evaluar sueros de animales vacunados a fin de conocer el comportamiento de 2C como antígeno para ser utilizado en la diferenciación de animales infectados y vacunados. Se examinaron grupos de sueros (n=79) representativos de bovinos provenientes de pruebas de potencia de vacunas comerciales, tomados a los 30, 60 y 90 dpv.

En la Tabla N° 14 se presentan los resultados obtenidos en el grupo de animales vacunados contra GST-2C por “Western blot”, algunos sueros se muestran en la Figura N° 30.

De los n=79 sueros de bovinos analizados solamente un animal mostró reactividad positiva frente a GST-2C a los 30 dpv. Por otro lado, no se observó reacción inespecífica de los sueros analizados cuando se los enfrentó a GST. Los resultados obtenidos se compararon con los obtenidos con la técnica de ELISA-3D e IDAG (Tabla N° 14). Se puede observar que a diferencia de 2C, donde solamente 1/79 sueros reaccionó, hay un alto porcentaje de reactividad frente a GST-3D y/o el Ag VIA por los métodos de ELISA-3D e IDAG respectivamente.

Estos resultados demuestran claramente que el uso de GST-2C como antígeno en “Western blot” podría ser de gran utilidad en la diferenciación entre animales infectados y vacunados.

Tabla N° 14: Respuesta de Ac frente a la proteína 2C por “Western blot”, a la proteína 3D por ELISA-3D y al Ag VIA por IDAG en sueros de bovinos vacunados.

DPV (a)	n (b)	“Western blot” (c)	ELISA-3D (d)	IDAG (e)
30 dpv	34	1/34 (f)	28/34	13/24
60 dpv	34	0/34	16/34	3/34
90 dpv	11	0/11	8/11	2/11

(a) DPV: días postvacunación

(b) n: número de sueros analizados

(c) “Western blot”: para la detección de Ac anti-2C

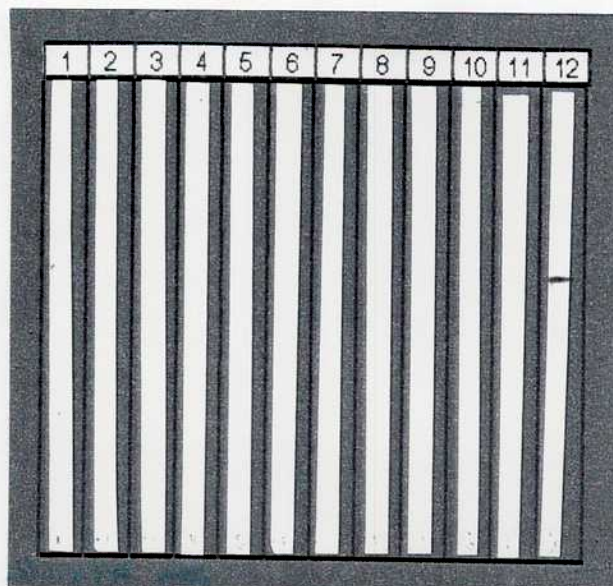
(d) ELISA-3D: para la detección de Ac anti-3D

(e) IDAG: para la detección de Ac anti-VIA

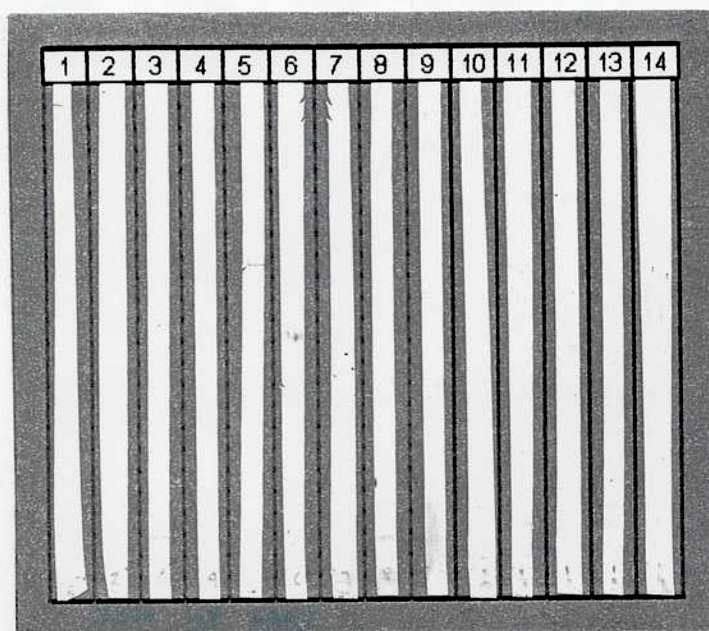
(f) Sueros positivos por el método / Total de sueros analizados

Figura N° 30: Detección de Ac contra GST-2C por “Western blot” en sueros de bovinos vacunados contra el VFA.

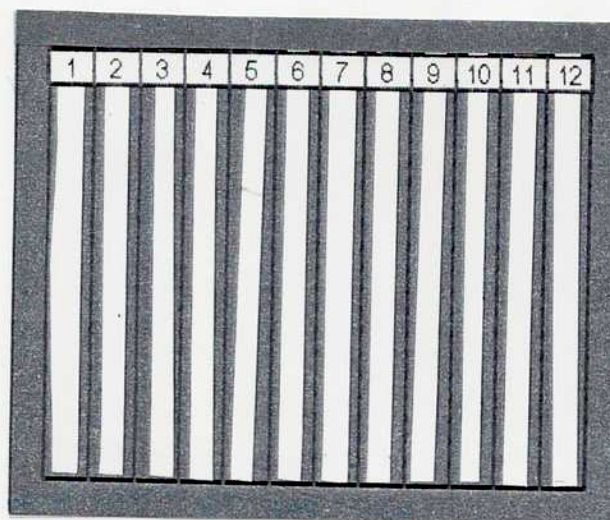
(a)



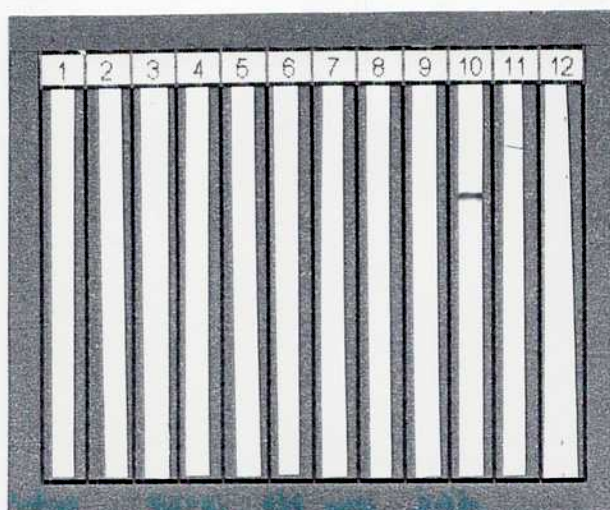
(b)



(c)



(d)

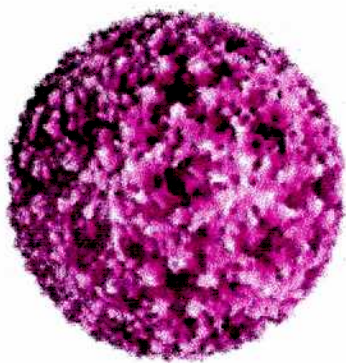


Panel a: calles 1-10: sueros de bovinos vacunados contra el VFA, tomados a los 60 dpv, 11: control negativo, 12: suero de bovino experimentalmente infectado con VFA, tomado a los 21 dpi.

Panel b: 1-14: sueros de bovinos vacunados contra el VFA, tomados a los 60 dpv.

Panel c: 1-12: sueros de bovinos vacunados contra el VFA, tomados a los 30 dpv.

Panel d : 1-9, 11-12 : sueros de bovinos vacunados contra el VFA, tomados a los 30 dpv. 10 : suero de bovino experimentalmente infectado con VFA, tomado a los 21 dpi.



DISCUSSION

V.- DISCUSION

La FA es una de las enfermedades más importantes del ganado, ocasionando desde su ocurrencia tremendas pérdidas tanto para los productores individuales como para la economía del país, debido al impacto en la productividad, en el comercio de animales y subproductos animales.

La presencia de FA en la Argentina impidió el ingreso de nuestras carnes a los mercados de mayor capacidad adquisitiva y demandas crecientes, llamado “circuito no aftósico”, determinando esta situación que el 90 % de la faena se destinara al consumo interno (SMV, 1996).

En 1992 la Argentina, que pertenecía al circuito “aftósico”, perdía aproximadamente 11 millones de dólares anuales por pérdidas de Kgs de carne, litros de leche, muertes, reposición de reproductores y capacidad productiva. Estas pérdidas subían hasta los 17 millones de dólares al año por las limitaciones en el comercio exterior, en el que se logran mejores precios y mayor valor para los cortes de calidad (Sociedad de Medicina Veterinaria, 1996). Con el fin de evitar estas pérdidas, y lograr la apertura a nuevos mercados que nos permitan aumentar significativamente las exportaciones de carne y subproductos de origen animal, la Argentina adoptó la estrategia del control y erradicación de este mal.

En nuestro país, la FA fue detectada por primera vez en el año 1865 (SENASA, 1996), con la importación de reproductores de valor genético, estableciéndose a partir de 1902 la denuncia obligatoria de la enfermedad, según la Ley 3959 de la Policía Sanitaria de los Animales.

En 1989 se inició un nuevo ciclo, el Plan de Control de la FA, que se caracterizó principalmente por el cambio progresivo a la “vacuna oleosa”, de alta inmunogenicidad y largo período de protección, aplicada dos veces al año en bovinos menores de 2 años y anualmente en bovinos mayores de 2 años. A éste le siguió el Plan de Control y Erradicación, 1993-1997, que le permitió a la Argentina obtener ante la OIE desde mayo de 1997, el reconocimiento como “País Libre con Vacunación” y frente al Departamento de Agricultura de los Estados Unidos “país de bajo riesgo” en el mismo año, permitiendo la exportación de carnes frescas a

ese país. Este hecho significó el ingreso de la Argentina al “circuito no aftósico” del mercado mundial de carnes, después de 67 años de prohibición (SENASA, 1998 b).

El control de la enfermedad en áreas o países libres se ha logrado a través de estrictos programas de vacunación y la aplicación del “rifile sanitario” (“stamping out”). Actualmente, para los países que desean ser declarados libres de FA según el Código Zoosanitario Internacional de la OIE, es obligatorio llevar a cabo una vigilancia epidemiológica que demuestre que no hay circulación viral.

En países donde no se vacuna, la vigilancia se realiza a través de la detección de Ac contra PE del VFA, ya que la presencia de Ac contra éstas es evidencia de exposición previa a los antígenos virales por infección. En estos países, la presencia de un foco es controlada inicialmente con el sacrificio total o parcial de los animales infectados y de los animales susceptibles en contacto, la desinfección del área afectada y un estricto control en el movimiento de animales. Asimismo, se aplica la vacunación en anillo con sacrificio posterior de los animales vacunados. No existe aún un método validado internacionalmente para la diferenciación entre Ac producidos por la vacunación y los resultantes de una infección (Kitching, 1998).

En países donde se vacuna la determinación de Ac frente a PE medido por ELISA o SN, no permite la diferenciación entre Ac de origen vacunal y los inducidos luego de una infección (Manual of Standards, OIE, 1992), por lo tanto, la aplicación de métodos que detectan Ac específicos de infección, utilizando como Ag PNE del virus, sería un indicador indirecto de actividad viral en las poblaciones vacunadas.

Una de las propiedades del VFA, es la habilidad de establecer infecciones persistentes inaparentes en bovinos y otros rumiantes, constituyendo estos animales un reservorio del virus. Es conocido también que bovinos vacunados expuestos al virus pueden convertirse en animales “carriers”, sin mostrar signos clínicos de la enfermedad (Doel y col. 1994). Aunque el rol de los animales “carriers” en la transmisión del virus aún no ha sido demostrado, existe evidencia que éstos pueden liberar virus intermitentemente (Dawe y col, 1994; Hedger y col., 1985) e introducir nuevas variantes en la población susceptible (Gebauer y col., 1988; Feigelstock, 1992), pudiendo ser fuente de nuevos focos de la enfermedad.

Los métodos utilizados para la detección de animales infectados han sido, entre otros, el aislamiento viral a partir de muestras de LEF por el método de la “copa probang” y la detección de Ac contra el Ag VIA por el método de IDAG. El aislamiento viral, es el método más específico para la identificación de animales portadores, pero es de baja sensibilidad. En 1966, Cowan y Graves, identificaron el Ag VIA, el cual reaccionaba solamente con suero de animales convalecientes y no con suero de animales vacunados. De esta manera, la técnica de IDAG, para la detección de Ac contra el Ag VIA, ha sido utilizada para detectar una exposición previa al virus en muchas especies y discriminar estos animales de aquellos que han sido seropositivos debido a la vacunación (Cowan y col., 1966, Mc Vicar y col., 1970).

En la Argentina, el Programa de Control y Erradicación de la FA, y actualmente los Programas de vigilancia epidemiológica, que se extienden también a especies susceptibles no vacunadas, involucra la detección de actividad viral por diferentes métodos, incluyendo la detección de Ac contra el Ag VIA por la técnica de IDAG. Esta técnica ha resultado una herramienta práctica para el monitoreo de campañas de control y erradicación, como un indicador indirecto de la actividad viral en regiones endémicas (Fondevila y col., 1992; León y col., 1994). El método es altamente específico, siendo su mayor desventaja la baja sensibilidad, así como la necesidad de manipular material infeccioso para la producción del Ag. Además, la inducción de Ac contra el Ag VIA luego de una o más dosis de vacuna, algunas de alta concentración antigénica (30-40 µg de Ag/dosis de vacuna), la hace poco específica para la diferenciación entre animales vacunados e infectados (Alonso y col., 1990).

Por otro lado, Rowlands y col., (1969), han demostrado la presencia de un Ag interno en partículas virales muertas, altamente inmunogénico, que produce Ac que reaccionan con el Ag VIA. Estudios recientes han demostrado que el Ag VIA (proteína 3D) estaría empaquetado en 1/5 viriones maduros (Grigera y col., 1988; Newman y col., 1994) y como resultado induciría una respuesta de Ac contra esta proteína. Sin embargo, esta evidencia se contradice con los hallazgos en regiones bajo programas de vacunación, donde se observa un descenso de la prevalencia de Ac anti-VIA de acuerdo a la intensidad de las campañas (Spath y col., 1994; Fondevila y col., 1998).

Frente a la infección viral, se producen PE y PNE en cantidades equimolares debido a la replicación del virus (Rueckert, 1991), induciendo una respuesta de Ac tanto contra PE como

PNE. En los animales vacunados, se desarrolla solamente una respuesta de Ac contra las PE del virus (proteínas de la cápside), debido al uso de vacunas inactivadas, y en menor medida, de existir, contra alguna/s PNE. Así, el mejoramiento de técnicas diagnósticas, que utilizan como Ag PNE del VFA, para la detección de animales infectados con el VFA, y su diferenciación con aquellos que han sido vacunados, resulta de gran importancia para los programas de prevención, control y erradicación de la enfermedad. Hasta el día de hoy no está disponible un método serológico sensible y de aplicación a gran escala, validado internacionalmente que permita la diferenciación entre estos dos grupos de animales.

A consecuencia de esto, es que varios grupos de trabajo han apuntado su interés al desarrollo de otras metodologías como indicadores indirectos de actividad viral, entre ellos ensayos de ELISA, RIP y “Western blot”, utilizando como Ag diferentes PNE del VFA semipurificadas y purificadas obtenidas por bioingeniería, a fin de identificar aquella/s que permitan la discriminación entre Ac de origen vacunal y los resultantes de una infección, así como la diferenciación entre animales “carriers” y no “carriers” (Villinger y col., 1989; Berger y col., 1990; Neitzert y col., 1991; Bergmann y col., 1993; Mackay y col., 1994; Lubroth y col., 1995). La observación de reactividad positiva contra alguna/s PNE diferente a la proteína 3D en suero de animales vacunados ha sido demostrada por algunos grupos de trabajo (Berger y col., 1990; Mackay y col., 1998).

La utilización de un método de ELISA para la detección de Ac contra el Ag VIA, sería de aplicación para la detección de animales infectados con el VFA. El interés en utilizar la proteína 3D como Ag, se debe a su reacción cruzada entre los diferentes serotipos del VFA, debido a su naturaleza conservada (Newman y col., 1979). El método sería de aplicación en estudios seroepidemiológicos, donde varios serotipos virales pueden estar actuando, pudiendo aplicarse también en estudios de serología de rutina para la certificación de animales libres contra cualquiera de los 7 serotipos del VFA para importación/exportación.

Ha sido ampliamente demostrado que el Ag VIA o proteína 3D, es altamente inmunogénica. Berger y col., (1990) aplicando la técnica de “Western blot” demostraron que la proteína 3D es la de mayor reactividad en sueros de animales luego de una infección. Esto sugeriría que 3D induce una respuesta de mayor intensidad, resultando en un indicador de infección más sensible.

Bergmann y col. (1993), observaron que la duración de los niveles de Ac contra 3D detectados es mayor en animales “carriers” que en aquellos que han eliminado la infección. En este ensayo el número de animales estudiado fue muy bajo, siendo necesario el análisis de un mayor número de sueros antes de concluir si existen diferencias significativas en la respuesta humoral contra 3D en animales “carriers” y no “carriers”.

Alonso y col. (1990), describieron una técnica de ELISA en F-L para la detección de Ac contra el Ag VIA (ELISA-VIA), utilizando el Ag semipurificado, similar a la previamente descrita por Mc Cullough y col., (1985) y Hamblin y col., (1986 a), para la detección de epítopes y Ac específicos del VFA. El ELISA-VIA resultó altamente específico al igual que la IDAG, pero más eficiente para detectar bovinos expuestos al virus, es por ello que estos autores recomiendan este método como una herramienta más satisfactoria para el apoyo de programas de prevención, control y erradicación de la enfermedad. Sin embargo, este método no está a disposición para su aplicación como método de rutina; y al igual que la técnica de IDAG, el Ag VIA es purificado de suspensiones virales producidas en cultivos celulares, lo que requiere de un laboratorio de alta seguridad para la manipulación del virus.

Resulta finalmente de gran aplicación la construcción de vectores de expresión bacterianos que codifican secuencias completas o parte de las secuencias de diferentes PNE. La utilización de éstos, tiene ventajas en cuanto a su estabilidad y pureza, evita el manejo de virus vivo y provee una fuente consistente de antígeno. En 1989, Villinger y col., desarrollaron un método de ELISA indirecto, utilizando como Ag parte de la secuencia del VIA (proteína 3D) obtenido por bioingeniería, expresado en *E. coli*. El método resultó de una especificidad baja, pudiendo solamente ser utilizado para determinar la prevalencia o incidencia de Ac anti-VIA. Resultados similares fueron observados por Mackay y col, 1994, aplicando un método de ELISA similar, en este caso utilizando como Ag la proteína 3D completa, expresada en *E. coli*. El método, de alta sensibilidad pero baja especificidad, estaría limitado a estudios preliminares de “screening” para detectar infección con alguno de los serotipos del VFA en áreas donde no se vacuna.

En esta tesis se apuntó al desarrollo de un método serológico, que sea de aplicación para la identificación de animales infectados con el VFA utilizando Ag biosintéticos.

A - Desarrollo del método de ELISA

- Expresión de la proteína 3D

La proteína 3D del VFA se expresó como una proteína de fusión a GST (GST-3D), la que se purificó por afinidad con perlas de glutation agarosa. La proteína GST-3D así purificada, se utilizó como Ag para el desarrollo del método de ELISA (ELISA-3D). Los niveles de expresión de la proteína en la cepa DH5 α de *E. coli*, resultaron adecuados, según la intensidad de las bandas observadas por SDS-PAGE, además de obtenerse una alta concentración de aproximadamente 2000 - 3000 μ g de Ag/ml, luego de la purificación.

La purificación de la proteína resultó un paso importante en la obtención del Ag a utilizar en el ensayo de ELISA, ya que los sueros de bovinos pueden reaccionar contra proteínas de *E. coli*. Asimismo, se observó que la proteína es eluída en forma específica según los resultados obtenidos cuando se evalúa la proteína recombinante por “Western blot” frente a sueros de bovinos libres de Ac contra el VFA y sueros de bovinos infectados con el virus.

La elección de un método de ELISA, se basó en que es simple y rápido de realizar, permitiendo el “screening” de un gran número de sueros en laboratorios que realizan serología de rutina. Además es un método seguro, fácil de estandarizar y transferir, y no requiere laboratorios de alta complejidad.

El método desarrollado es un ELISA competitivo en F-L (ELISA-3D), que puede realizarse en una única dilución. El mismo utiliza dos sueros policlonales, uno de captura (IgG de bovino) y el otro como detector (suero hiperinmune de cobayo), y se basa en la habilidad de los Ac contra la proteína 3D, contenidos en el suero en estudio, para bloquear la captura del Ag por parte del Ac de captura. La titulación de todos los reactivos en damero, permitió determinar las concentraciones óptimas de cada uno, utilizándose la última dilución que resultó con el valor máximo de absorbancia.

- Estudio de sensibilidad, especificidad y reproducibilidad

El valor de corte de $\log_{10}=1$, aseguró una buena diferenciación entre animales reactivos y no reactivos, además de permitir obtener la máxima sensibilidad. Los títulos de los sueros negativos se distribuyeron con un promedio de título de Ac de $\log_{10}=0.32$ (D.E.=0.085),

observándose solamente en 1/130 sueros analizados un título de $\log_{10}=0.88$. Por otro lado, el 95.2% de los sueros positivos mostraron títulos de $\log_{10} \geq 1$.

El método permitió combinar las ventajas de alta especificidad y sensibilidad. La alta especificidad del método de ELISA-3D se determinó por resultados negativos en 279 sueros de bovinos provenientes de zona libre, sin Ac neutralizantes o tipo específicos contra el VFA, resultando ésta en un 100%. Además, los resultados negativos obtenidos de la evaluación de sueros de referencia con alto título de Ac contra diferentes virus ARN y ADN confirmaron la alta especificidad del ensayo, resultando con títulos menores que $\log_{10} < 0.3$. Estos resultados difieren con los obtenidos por Villinger y col. (1989), quienes utilizando la proteína 3D como Ag, observaron reacciones cruzadas con enterovirus y poliomielitis, ambos virus pertenecientes a la familia de los Picornavirus.

La especificidad fue comparable con la observada para los otros dos métodos evaluados, IDAG y ELISA-VIA, las que resultaron en un 100%, coincidiendo con lo presentado por otros autores (McVicar y col., 1970; Alonso y col. 1990).

La sensibilidad del ELISA-3D, así como de los métodos de IDAG y ELISA-VIA, se determinó empleando sueros de animales experimentalmente infectados tanto en estadios tempranos como tardíos de la infección. El método de ELISA-3D fue capaz de detectar Ac en bovinos tanto en estadios tempranos (5 dpi), como en estadios tardíos (565 dpi) de la infección. El método falló en detectar Ac en 8/167 sueros post-infección, observándose títulos que se superpusieron con la población negativa. Estos sueros fueron negativos también por IDAG. La reactividad negativa en estos 8 sueros, se pudo deber al bajo nivel de Ac, no detectable por este método, ya que 6/8 sueros pertenecían a bovinos de 5 a 8 dpi y los otros 2 a bovinos de 350 y 565 dpi.

Estos resultados revelan una alta sensibilidad para el ELISA-3D, la que resultó en un 95.2%, siendo significativamente mayor que la IDAG, 78.26%, y el ELISA-VIA, 85.58%. Los resultados observados en estos experimentos coinciden con lo observado por otros autores, en los que Ac contra la proteína 3D y otras PNE son detectados, por la técnica de EITB, a tiempos tempranos y tardíos de la infección (Bergmann y col., 1993).

Teniendo en cuenta estos resultados, se estudió la sensibilidad relativa para ambos métodos de ELISA en comparación con la IDAG. Se comprobó que el método de ELISA es

uno a dos órdenes más sensible que la IDAG, lo que permite explicar los resultados de mayor sensibilidad.

Los bajos C.V., intra (2.75%) e interplaca (7.4%), indicaron una alta reproducibilidad del método, siendo comparables con los obtenidos para el método de ELISA-VIA por Alonso y col. (1990) y en este trabajo, los que mostraron también una alta reproducibilidad.

B - Evaluación del método de ELISA-3D con sueros categorizados

Resulta necesario caracterizar la respuesta de Ac contra PNE tanto en el grupo de animales infectados como en el grupo de animales vacunados. La identificación de Ac contra diferentes PNE, recombinantes o nativas, por RIP o “Inmunoblot” ha sido propuesta para la identificación de animales infectados (Berger y col., 1990; Bergmann y col., 1993). La mayoría de los bovinos desarrollan Ac contra el Ag VIA, detectados por IDAG, al menos durante 6 meses después de la infección, observándose resultados positivos frecuentemente hasta uno o dos años post-infección.

- Cinética de Ac contra la proteína 3D durante el estado agudo y convaleciente de la infección

Si bien existen algunos estudios previos sobre la cinética de Ac inducida contra el Ag VIA luego de una infección, resultó de gran importancia conocer la cinética de Ac contra la proteína 3D cuando se aplica el método de ELISA-3D y compararlo con las técnicas de IDAG y ELISA-VIA.

En este estudio, se observó una reacción positiva para Ac contra 3D a partir de los 5 dpi, siendo a los 20 dpi todos los animales reactores positivos (Fig N°14). Estos resultados coinciden con los de otros grupos de trabajo, cuando se aplican los métodos de ELISA o “Inmunoblot”, quienes observan seroconversión para Ac contra 3D entre los 6 y 21 dpi (Villinger y col., 1989; Bergmann y col., 1993; Mackay y col., 1998).

Los títulos de Ac contra 3D, mostraron los valores máximos entre los 20 y 34 dpi, declinando en el tiempo. En 2/9 bovinos, se observó un mayor título de Ac contra 3D, a los 34 dpi, pudiendo estar asociado con la presencia de enfermedad clínica, bajo o negativo título de Ac contra PE al inicio del ensayo y el aislamiento viral de LEF en tiempos tardíos de la

infección. A diferencia de éstos, 1/9 bovinos mostró un título contra 3D más bajo a los 34 dpi y aislamiento viral de LEF. Estos hallazgos pueden explicarse por el alto nivel de Ac contra PE vacunales preexistentes que pudieron conferirle un cierto grado de protección, limitando la replicación viral solamente a la región esófago-faríngea.

En 6/9 animales se detectaron títulos de Ac similares a lo largo de todo el ensayo, independientemente del nivel inmunitario previo a la infección, presencia o no de enfermedad clínica y tiempo de aislamiento del virus de la región orofaríngea. En 2/6 bovinos, se pudo aislar virus de LEF hasta los 76 y 90 dpi. En los 4/6 restantes el virus se detectó hasta los 20 dpi, detectándose el genoma viral por la técnica de PCR entre los 48 y 62 dpi.

La evaluación de los sueros por ELISA en F-L, para determinar Ac específicos de tipo contra PE del VFA tipo O1, a fin de compararlo respecto a los Ac contra 3D, mostró una rápida respuesta serológica de tipo primario en bovinos vírgenes y de tipo secundario en bovinos con Ac vacunales.

El análisis de varianza, mostró una diferencia significativa entre los títulos de Ac contra PE, medido por ELISA en F-L, y los títulos contra 3D, por ELISA-3D ($p < 0.05$), manteniéndose a lo largo de todo el ensayo.

En base a estos resultados, se puede inferir que la respuesta de Ac contra PE es significativamente mayor que contra la proteína 3D en el período estudiado y debido a la vida media de estos Ac seguramente también mayor en el tiempo (Späth y col 1994). Esta respuesta mayor, puede explicarse por la mayor inmunogenicidad de estas proteínas.

No se encontró ninguna relación entre la persistencia de Ac contra la proteína 3D o el Ag VIA y el aislamiento del virus de LEF, ya que todos los animales fueron positivos para Ac contra 3D independientemente del aislamiento viral, datos que coinciden con lo observado por Alonso y col. (1975). Solamente animales con títulos preexistentes de Ac contra PE, medido por ELISA en F-L, menores a $\log_{10} = 1$ o bajos ($\log_{10} = 2.2$), desarrollaron enfermedad clínica.

Los resultados obtenidos cuando se aplica la técnica de IDAG son muy similares a los observados por otros grupos, donde se comprueba la menor sensibilidad del método de IDAG en detectar Ac contra el Ag VIA tanto a tiempos tempranos como más tardíos de la infección cuando se lo compara con el ELISA.

En nuestro estudio, se observa que el número de animales reactores positivos es menor cuando se aplica la técnica de IDAG en comparación con el ELISA-3D. Bergmann y col. (1993), en un grupo de 4 bovinos experimentalmente infectados por inoculación intradermolingual con VFA tipo O1 Campos, utilizando la técnica de IDAG, observaron seroconversión para Ac contra el Ag VIA a partir de los 14 dpi, respuesta que se mantuvo hasta los 266 días luego de la inoculación en los 4 animales. Alonso y col. (1975), en un grupo de 12 bovinos observaron una respuesta positiva a Ac anti-VIA desde los 7 dpi en 1/12 bovinos, desarrollando Ac el resto de los animales entre los 14 y 21 dpi. Por otro lado McVicar y col. (1970), aplicando el mismo método en un grupo de 81 bovinos infectados con VFA, observaron a los 21 dpi un 86% de sueros fuerte positivos para Ac anti-VIA, un 10% débiles positivos y un 4% negativos.

- Detección de Ac contra 3D por ELISA y contra el Ag VIA por IDAG, en sueros de bovinos infectados en estadios tardíos de la infección persistente (mayores de 400 dpi)

La identificación de animales con una infección persistente, generalmente se lleva a cabo por el aislamiento del virus de la región esófago-faríngea con el método de la copa “probang”. En este punto, resultó de gran importancia extender los estudios de sensibilidad y especificidad del método de ELISA-3D para la detección de Ac contra la polimerasa en suero de bovinos persistentemente infectados con el VFA.

La capacidad del método de ELISA-3D para evaluar la presencia de Ac anti-3D en estadios muy tardíos de la infección (mayores de 400 dpi) se evaluó en un grupo de 7 bovinos persistentemente infectados en forma experimental, comprobándose a los 565 dpi Ac contra la 3D en 6/7 bovinos estudiados.

Estos resultados coinciden con los datos reportados previamente por Bergmann y col. (1993), quienes aplicando el método de EITB observaron en un grupo de 5 bovinos una reacción positiva hasta los 700 dpi tanto contra 3D como contra otras PNE.

Los sueros se evaluaron también para Ac contra PE por ELISA en F-L. Como en el ensayo anterior, la comparación de los títulos de Ac específicos de tipo obtenidos por ELISA en F-L mostró valores significativamente mayores que los títulos de Ac contra la proteína 3D medido por ELISA-3D ($p < 0.05$), debido a la mayor inmunogenicidad de estas proteínas.

La aplicación de la técnica de IDAG mostró, al igual que lo observado en los ensayos previos y por otros grupos, una menor sensibilidad para detectar animales reactivos positivos en estadios tardíos de la infección, cuando se compara con el ELISA-3D.

La determinación de Ac contra la proteína 3D del VFA, aplicando el método de ELISA-3D, junto con la detección de Ac contra PE, es un indicador sensible y específico de infección previa con el VFA, independientemente del serotipo causante de la infección. Los Ac contra PE luego de una infección se detectan durante un periodo mayor y en mayores niveles que los Ac contra 3D.

- Respuesta de Ac postvacunación contra la proteína 3D en animales vírgenes

Es conocido que las vacunas inactivadas contra el VFA pueden inducir Ac contra el Ag VIA detectables por IDAG y ELISA. El origen de esta respuesta, transitoria y variable, se atribuye a la presencia de restos de la polimerasa viral en las vacunas, los que resultarían antigénicos y con vacunaciones repetidas sensibilizarían al bovino con la formación de Ac contra el ag VIA (Lobo y col., 1977). Se ha demostrado la presencia del Ag VIA o proteína 3D en el sobrenadante de cultivos celulares utilizados para la preparación de Ag vacunal inactivado con AEI y concentrado por centrifugación zonal (Pinto y col., 1979). Asimismo, existen evidencias recientes que la ARN polimerasa es un componente de al menos 20-30 % de las partículas virales (Newman y col., 1994).

El conocimiento de la respuesta de Ac contra la proteína 3D o el Ag VIA inducida por la vacunación y su cinética es esencial para poder distinguirla de aquella inducida por una infección con el VFA.

A fin de estudiar la inducción de Ac contra la proteína 3D por diferentes vacunas de uso comercial y su cinética, se examinaron grupos representativos de sueros de animales vacunados provenientes de 7 pruebas de vacunas, tomados a diferentes tiempos postvacunación. La respuesta inducida contra 3D por las diferentes vacunas en estudio fue muy variable. Tres de las 7 vacunas no indujeron Ac contra 3D a los 30 dpv, manteniéndose negativas para la detección de Ac por el método de ELISA-3D en todos los tiempos estudiados. Las cuatro vacunas restantes indujeron una respuesta de Ac contra 3D detectable por el ELISA-3D a los 30 dpv, variando el porcentaje de animales positivos entre un 17.6% a un 87.5%. A los 60 y

90 dpv, 2/4 vacunas se negativizaron, manteniéndose 1/14 y 5/16 animales de las 2 vacunas restantes positivos hasta los 90 dpv.

Los resultados obtenidos cuando se aplicó el método de IDAG, mostraron un porcentaje menor, pero igualmente variable de animales reactores positivos para Ac anti-VIA debido probablemente a la menor sensibilidad del método.

La respuesta de Ac, tanto contra 3D como el Ag VIA en animales vacunados, varía según el inmunógeno aplicado, siendo algunas vacunas capaces de inducir una respuesta de Ac transitoria, mientras que otras no inducen una respuesta de Ac contra estos Ag. Esta respuesta vacunal difiere de la observada luego de una infección, siendo esta última de mayor duración según lo reportado en este trabajo y en ensayos previos por otros grupos de trabajo (Bergmann y col., 1993; Lubroth y col., 1995; Mackay y col., 1998). Las vacunas estudiadas son todas producidas por diferentes laboratorios productores y aprobadas por las autoridades sanitarias (SENASA) mediante pruebas de protección, con más de un 82% de animales protegidos, revelando todas ellas, a los 60 y 90 dpv, altos títulos de Ac contra las PE de las cepas vacunales contenidas en las vacunas medido por el método de ELISA en F-L (SENASA, Resolución Oficial 219).

C - Aplicación del método de ELISA-3D en estudios a campo

Resultó de gran importancia estudiar la aplicación del método de ELISA-3D en estudios a campo, con el fin de validar el método y compararlo con la técnica de IDAG, la que ha sido ampliamente utilizada en estudios seroepidemiológicos.

Con este fin, se realizaron tres ensayos, dos para estudiar la cinética de Ac contra la proteína 3D y el Ag VIA inducida en animales primovacunados y multivacunados y un tercer ensayo para estudiar la aplicación del método como un indicador de actividad viral en estudios seroepidemiológicos.

- Ensayo en terneros

La inducción de Ac contra 3D y el Ag VIA por la vacunación, se estudió en un grupo de 51 terneros, basándose en que éste es el grupo de mayor riesgo epidemiológico ya que tienen niveles de inmunidad más bajos como consecuencia de haber recibido menos dosis de

inmunógeno durante su vida y además por ser la categoría que más se moviliza desde las regiones de cría hacia las de engorde y también dentro de cada región. Estos animales adquieren Ac maternos a través del calostro, los que pueden persistir solamente hasta los 5 - 6 meses de edad (Sadir y col., 1988). Por lo tanto resultó esencial conocer la cinética de Ac contra la proteína 3D o Ag VIA inducida por la vacunación en esta categoría de animales, ya que representa el indicador más sensible de la situación epidemiológica del país o región por ser la más susceptible a la infección viral.

Las vacunas utilizadas en este ensayo, no indujeron Ac contra la proteína 3D ni contra el Ag VIA a los 30, 60, 90 y 120 días luego de la primovacunación en ninguno de los 3 grupos analizados, coincidiendo estos resultados con los observados por Bahnemann y col. (1990) y Alonso y col. (1990). Estos últimos estudiando un grupo de 20 bovinos no hallaron una respuesta positiva de Ac contra el Ag VIA, ni por ELISA ni por IDAG, luego de una dosis con vacunas comerciales así como con vacunas de alta concentración antigénica (18µg de Ag/dosis de 5 ml).

Nuestros resultados obtenidos por IDAG, concuerdan también con los observados por Pinto y col. (1979), cuando aplican vacunas inactivadas con formalina y con los presentados por Bergmann y col. (1993), con vacunas de uso comercial donde no observan respuesta de Ac anti-VIA por IDAG ni contra 3D por EITB, luego de recibir una vacunación. Sin embargo Alonso y col. (1990) demuestran que la aplicación de vacunas con alta concentración de Ag (54 µg de Ag/dosis de 5 ml), inducen una respuesta de Ac contra el Ag VIA débil y transitorio detectable solamente por ELISA y no por IDAG en 2/20 animales en estudio. Asimismo, Mackay D. y col. (1998), observan una reacción positiva para Ac anti-3D por ELISA en 24/30 sueros de bovinos tomados a los 21 dpv.

Luego de la segunda dosis de vacuna, el incremento en la frecuencia de terneros reactivos positivos, en todos los grupos en estudio, sugiere una exposición previa al Ag durante la primovacunación. Esta respuesta que es de corta duración, permite la detección de Ac contra 3D por el método de ELISA-3D hasta los 150 dprv y hasta los 90 dprv para Ac anti-VIA por IDAG y se diferencia de la inducida por la infección viral, donde los Ac anti-3D y anti-VIA pueden detectarse hasta 1 o 2 años luego de la infección (Alonso y col., 1990; Neitzert y col., 1991; Bergmann y col., 1993).

Los resultados obtenidos luego de la segunda dosis de vacuna, coinciden con los de Alonso y col. (1990), en el que la mayoría de los bovinos estudiados, vacunados con 54 µg Ag/dosis o con 18 µg de Ag/dosis, se hicieron positivos entre los 15 y 30 dprv tanto por IDAG como por ELISA. Esta respuesta de Ac anti-VIA continuó aún a los 90 dprv, siendo todos los animales negativos a los 120 dprv. Al igual que en este trabajo, el ELISA-3D resultó en un mayor porcentaje de animales positivos y en una respuesta de mayor duración. Pinto y col. (1979), observaron una respuesta positiva de Ac contra el Ag VIA por IDAG luego de una segunda vacunación hasta los 85 dprv, siendo más frecuente en animales que han recibido vacunas inactivadas con formaldehído que con AEI.

La aplicación de una tercera vacunación, permitió observar un mayor porcentaje de animales reactores positivos y una respuesta más sostenida en el tiempo. Los porcentajes de animales positivos en los diferentes grupos fueron significativamente mayores que los obtenidos luego de la segunda dosis.

Similar a estos resultados fueron los observados por Pinto y col. (1979), y por Dawe y col. (1978), donde a mayor número de vacunaciones, el número de animales que responde con Ac anti-VIA por IDAG, es mayor. Asimismo, Berger y col. (1990), utilizando el método de RIP, luego de 3 vacunaciones detectaron Ac anti-3D, concluyendo que las vacunas contienen tanto PE como restos de PNE, siendo estas últimas eventualmente antigénicas.

Villinger (1989), aplicando un método de ELISA para detectar Ac contra el Ag VIA recombinante (3D), observaron también un aumento en la respuesta de Ac contra el Ag VIA entre animales no vacunados y vacunados, del 2% (0 vacunaciones) al 10% (10-17 vacunaciones). A diferencia de esto, Bergmann y col. (1993), observaron reacciones negativas para Ac contra 3D, por EITB, en bovinos que han recibido 2 a 3 vacunaciones.

Las vacunas producidas en cultivo celular BHK-21, indujeron una respuesta de Ac contra 3D mayor que la detectada con la vacuna producida en cultivos Frenkel. La probabilidad de desarrollar una respuesta positiva de Ac contra 3D en los animales de los grupos 2 y 3, fue de 3 a 5 veces mayor respectivamente que en los animales del grupo 1. Estas diferencias podrían estar asociadas con las diferentes fuentes de producción de Ag, coincidiendo con observaciones previas en un total de 5568 sueros bovinos primovacunados (Duffy y col., comunicación personal). Por otra parte se observó una respuesta positiva

transitoria de Ac contra 3D luego de la vacunación y revacunación de bovinos inmunizados con una vacuna producida en cultivos Frenkel (O'Donnell y col, 1996). Bergmann y col. (1993), observaron una reactividad positiva tanto contra el Ag VIA por IDAG como contra la proteína 3D por ELISA, cuando comparan dos vacunas comerciales producidas una por el método Frenkel y la otra en cultivo celular de línea.

Las diferencias de reactividad, detectadas tanto por ELISA-3D como por IDAG, podrían atribuirse a una diferente concentración de Ag en producción de las vacunas. Dependiendo del proceso usado, es esperable que se concentren no solo los Ag que inducen Ac protectores (contra epítopes de la cápside), sino también otras proteínas virales de las regiones P2 y P3, así como algunos componentes celulares (Lubroth y col., 1998). La concentración del Ag por ultracentrifugación, ultrafiltración, el uso de PEG, o alguna combinación de todas ellas podría inducir las diferentes reactividades presentadas en este trabajo.

A fin de correlacionar la mayor respuesta de Ac contra la proteína 3D luego de la revacunación con vacunas producidas con Ag propagado en cultivo de células BHK-21 con una mayor carga antigénica en estas vacunas, se examinó la respuesta de Ac contra PE por ELISA en F-L. Los resultados del análisis de los sueros tomados a los 60 dpv revelaron títulos de Ac contra las diferentes cepas vacunales del VFA, significativamente mayores ($p < 0.01$) en el grupo de animales inmunizado con la vacuna 1, con Ag vacunal producido en cultivos Frenkel, que los observados en los grupos de bovinos que recibieron la vacuna 2 con Ag vacunal propagado en cultivo de células BHK-21. Esto indica la ausencia de asociación entre concentración antigénica medida por Ac contra PE (Pay y col, 1992a) e inducción de Ac contra PNE, sugiriendo que los procesos de concentración de vacunas está asociado con esta inducción de Ac.

En todos los grupos, los resultados obtenidos por el método de ELISA-3D mostraron siempre un mayor número de animales reactores positivos, revelando nuevamente la mayor sensibilidad del método con respecto a la IDAG, en detectar Ac postvacunales, teniendo en cuenta que todos los animales positivos por IDAG también lo fueron por ELISA-3D.

Cuando se monitorea actividad viral, el grupo poblacional más susceptible es la categoría de terneros menores de 1 año de edad. En esta categoría, los animales generalmente han recibido una sola vacunación por lo menos 4 meses antes del momento de extracción de la

muestra a analizar. Bajo estas condiciones, en nuestros estudios no fue detectada una respuesta positiva de Ac contra la proteína 3D ni contra el Ag VIA luego de la primer dosis de vacuna. Si bien en un estudio previo, se detectaron Ac contra 3D a los 30 y 60 dpv, disminuyendo el número de animales reactivos a los 90 dpv.

Esta respuesta transitoria de Ac inducida por algunas vacunas, sugiere que para el monitoreo de actividad viral en países o regiones con programas de control bajo vacunación, es necesario tener en cuenta los parámetros de reacción postvacunal contra 3D o el Ag VIA para una mejor interpretación de los resultados, seleccionando para el estudio animales con ninguna o una única vacunación previa, o vírgenes y primovacunados.

- Ensayo en bovinos mayores de 2 años

Teniendo en cuenta que la cobertura inmunológica en áreas o países bajo planes de vacunación es alta y que la inducción de Ac puede verse estimulada por la edad de los animales, cantidad de vacunaciones y programa de vacunación, se analizaron bovinos que han recibido un alto número de vacunaciones, pertenecientes a una región sin focos de FA durante los últimos 6 años, a fin de conocer en estos animales como es la cinética de Ac contra 3D inducida por la aplicación de múltiples vacunaciones. Para este estudio, se seleccionaron 14 bovinos negativos para Ac anti-3D, de un grupo de 34 animales. Los 19/34 bovinos restantes positivos para Ac contra 3D se descartaron del estudio, debido a que el origen de la misma podría deberse a una infección previa o a exposiciones sucesivas al Ag presente en las vacunaciones recibidas.

Los resultados revelaron un alto porcentaje de seroconversión en los animales a los 30 días luego de la séptima vacunación recibida, siendo mayor cuando se aplicó el método de ELISA-3D en comparación con la técnica de IDAG. Todos los animales fueron negativos para Ac contra el Ag VIA detectable por IDAG luego de un año, mientras que 2/14 bovinos permanecían positivos para Ac anti-3D a este tiempo.

Mackay y col. (1998b), observaron reacciones positivas contra diferentes PNE, incluida la 3D, en bovinos luego de recibir 10 o más vacunaciones, asemejándose esta respuesta a la observada en algunos animales varios meses más tarde de haber sufrido una infección con el

virus. La aplicación del método de EITB por Bergmann y col. (1998), demostró una respuesta de Ac contra una o más PNE, diferentes a la 3D, en animales que han recibido múltiples vacunaciones.

Estos resultados indican que la detección de Ac contra otras PNE además de la proteína 3D, no sería un indicador absoluto de infección previa en animales mayores que han recibido múltiples vacunaciones. Resulta necesario en estos casos contar con los datos de edad e historia clínica previa de los animales cuando se determine una estrategia de vigilancia epidemiológica para detectar actividad viral, sugiriendo además el muestreo de animales menores de 2 años de edad a fin de evitar los problemas de resultados falsos-positivos debido a la exposición al virus o a vacunaciones previas.

- Aplicación del método de ELISA-3D como un indicador de actividad viral en tres partidos de la Provincia de Buenos Aires

La utilización del método de ELISA-3D como un indicador indirecto para monitorear actividad viral en estudios seroepidemiológicos, se evaluó aplicando el método en tres partidos de la provincia de Buenos Aires. Según los resultados obtenidos en los ensayos anteriores, se eligió la categoría de animales menores de 1 año para este estudio, siendo estos los verdaderos centinelas de circulación viral para la FA. La evolución de la actividad viral, determinada por las técnicas de ELISA-3D e IDAG, en el tiempo, entre los años 1993 y 1995 para el partido de Navarro y entre los años 1993 y 1996 para el partido de Lobos, demostró una disminución significativa ($p < 0.05$). Para el partido de Suipacha, solamente se evaluaron los años 1994 y 1995, no observándose diferencias significativas entre los mismos.

Cuando se compararon los niveles de Ac obtenidos por las técnicas de ELISA-3D e IDAG, se detectó como en los casos anteriores un mayor porcentaje de animales positivos por ELISA-3D que por IDAG, si bien estas diferencias no fueron significativas ($p > 0.05$). Ambos métodos permitieron observar una tendencia similar de disminución de animales con Ac positivos tanto para 3D como para el Ag VIA. El descenso en los niveles de actividad viral medido por estos métodos, se asoció con el aumento en los niveles de inmunidad contra PE, conferidos por la vacunación (Fondevila y col., 1997), los que reducen la replicación viral y la difusión del virus.

Estos resultados apoyan los resultados obtenidos previamente, con la técnica de ELISA-3D, e indican que es un método confiable para el análisis de la evolución de la actividad viral en el tiempo. Debido a que tanto el método de ELISA-3D como la técnica de IDAG requieren ciertas condiciones del muestreo en poblaciones bajo planes de vacunación, para poder diferenciar animales infectados de vacunados, condiciones que no siempre pueden cumplirse en estudios a campo, es que resulta necesario la evaluación de otras metodologías así como el uso de otras PNE como Ag, que permitan corroborar estos resultados, especialmente en etapas finales de las campañas de erradicación de la enfermedad, en que los porcentajes de animales positivos por estos métodos son bajos.

D - Detección de anticuerpos contra las PNE 2C, 3A y Lb por “Western blot”

La determinación de Ac contra la proteína 3D por ELISA-3D ha demostrado ser un método altamente sensible y específico para la detección de animales que han sufrido una infección con el VFA. Sin embargo, dada la inducción de Ac contra esta proteína por algunas vacunas resultó esencial la evaluación de otras PNE que permitan una discriminación entre infectados y vacunados prescindiendo de los tiempos postvacunación.

La proteína 2C del VFA se expresó como proteína de fusión a GST (GST-2C), purificándose por afinidad a glutation agarosa. Los niveles de expresión de la proteína en *E. coli*, resultaron adecuados, según las bandas observadas por SDS-PAGE, además de obtenerse una alta concentración proteica luego de la purificación, obteniéndose valores entre 700 - 1500 µg/ml. La utilización de proteínas purificadas, permitió evitar reacciones inespecíficas de los sueros contra proteínas de *E. coli*, asimismo la determinación de las concentraciones óptimas de todos los reactivos permitió obtener reacciones específicas contra las proteínas evaluadas. La especificidad de la reacción, se pudo confirmar también por los resultados negativos con sueros de bovinos provenientes de zona libre de FA, sin Ac específicos de tipo por ELISA en F-L. Además de los sueros evaluados ninguno reaccionó contra GST, indicando la especificidad de la reacción contra las PNE 2C, 3A y Lb del virus.

La evaluación de Ac frente a las PNE 2C, 3A y Lb en bovinos aplicando el método de “Western blot”, demostró ser un indicador sensible de infección. La respuesta de Ac contra Lb en el grupo de animales experimentalmente infectados con VFA, fue menor, detectándose

seroconversión contra Lb solamente en 3/6 bovinos en estudio. Estos resultados coinciden con lo observado por Mackay y col., (1998c), donde Lb parecería ser menos inmunogénica que otras PNE, debido a la falla en responder contra ésta por ELISA en bovinos infectados con el virus. Esta respuesta resultó más débil y generalmente de corta duración. Luego, la detección de Ac contra Lb, sería altamente específica de infección con el VFA, la cual en asociación con una respuesta de Ac contra otras PNE, podría ser confirmatorio de infección (Mackay, 1998).

La evaluación de la cinética de Ac contra 3A y 2C, mostró resultados positivos desde los 7 dpi, siendo todos los animales positivos contra estas dos proteínas a los 20 dpi.

Varios grupos de trabajo (De Diego y col., 1997; Mackay y col., 1998; Malirat y col., 1998) han presentado a la poliproteína 3ABC (la que incluye a la proteína 3A), como posible indicador de infección, aunque estos trabajos no han sido validados y deberían extenderse a un mayor número de animales en ensayos a campo como los nuestros.

Lubroth y col (1995, 1996), proponen a la proteína 2C como un marcador para la diferenciación entre animales infectados y vacunados debido a la ausencia de Ac contra 2C en sueros de animales vacunados y a la ausencia de esta proteína en las preparaciones vacunales examinadas.

Los resultados en los grupos de bovinos vacunados, evaluados a los 60 y 90 dpv, mostraron resultados negativos contra 2C y Lb en los 14 animales en estudio. Una respuesta positiva para Ac contra 3A fue observada en 4 de los bovinos, la que se mantuvo a los 90 dpv, si bien la señal en este tiempo fue menos intensa. Asimismo, Ac contra 3D fueron detectados por el método de ELISA-3D en un mayor porcentaje de animales en comparación con la IDAG donde solamente un animal resultó positivo para Ac anti-VIA a los 60 dpv.

Berger y col. (1990), observaron por RIP que suero de animales vacunados precipitaban además de las PE a las PNE 2C, 3AB₁ y 3AB_{1,2} en forma más débil. Rodríguez y col. (1994), fueron capaces de diferenciar cerdos convalecientes de FA de cerdos que habían sido vacunados, aplicando un método de ELISA que utiliza como Ag el polipéptido 3ABC, sin embargo estos autores no observaron una respuesta consistente contra las proteínas 2C y 3D en sueros de animales convalecientes. Estos resultados coinciden con lo observado por Bergmann y col. (1993), pudiendo deberse a diferencias en la configuración de las proteínas y por lo tanto dar diferencias en las observaciones.

En ningún caso los sueros de bovinos vacunados evaluados en nuestros estudios reaccionaron contra 2C. Otros autores han demostrado la ausencia de Ac anti-2C en sueros de bovinos vacunados hasta 3 veces, con vacunas comerciales inactivadas con BEI, a diferencia de sueros de bovinos y porcinos convalecientes de FA, que si son positivos para Ac anti-2C (Lubroth y col., 1995). Esta diferencia en la reactividad, se debería a que 2C, formando un complejo replicativo junto con 2BC y 3ABC (Porter y col., 1993), quedaría unida a membranas de vesículas inducidas por el virus, provenientes del retículo endoplasmático rugoso, durante su replicación. El paso de clarificación del Ag en la producción de vacunas comerciales, removería las células y detritos celulares antes de la inactivación del Ag cosechado, removiendo a la proteína 2C asociada a las membranas (Lubroth y col., 1996), siendo seguramente la causa de los resultados negativos observados en este grupo de animales, coincidiendo con lo observado por Lubroth y col. (1996).

E - Evaluación de la proteína 2C del virus de la Fiebre Aftosa utilizando el método de "Western blot"

El uso de PNE en forma individual como Ag, para el desarrollo de inmunoensayos para la detección de animales infectados con el VFA está siendo ampliamente evaluado. Entre éstas, la proteína 2C y la poliproteína 3ABC en forma independiente han demostrado ser indicadores indirectos confiables de infección previa con el VFA (Lubroth y col., 1996; Meyer y col., 1997; Lubroth y col., 1998; Mackay y col., 1998b; Malirat y col., 1998; Mezencio y col., 1998).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el estudio previo, se apuntó a evaluar un mayor número de sueros utilizando como Ag a la proteína 2C.

El método de "Western blot" resultó específico, obteniéndose resultados negativos cuando se evaluaron sueros libres de Ac contra el VFA, provenientes de zona libre de la enfermedad, siendo la reacción contra la proteína 2C específica para detectar Ac en sueros de animales infectados con el VFA.

Resultó de gran importancia extender los estudios de sensibilidad y especificidad del método de "Western blot" para la detección de Ac contra 2C en un mayor número de sueros de bovinos infectados con el virus, tomados en estadios tempranos como tardíos de la infección. El análisis de 4 bovinos experimentalmente infectados, revelaron Ac contra 2C desde

los 20 dpi, hasta los 233 dpi tiempo en que se tomó la última muestra. La evaluación de un mayor número de sueros de bovinos infectados, permitió observar una reactividad positiva para Ac anti-2C desde los 10 dpi. La aplicación del método para evaluar la presencia de Ac en estadios muy tardíos de la infección se evaluó en animales persistentemente infectados, obteniéndose animales reactivos a esta proteína a los 565 dpi luego de una infección experimental. Ninguno de estos sueros reaccionó en forma positiva contra GST, lo que corrobora la especificidad de la reacción. Estos resultados concuerdan con los observados por Bergmann y col (1993), así como por Lubroth y col. (1996, 1998), quienes observan Ac contra 2C, hasta los 700 dpi por EITB los primeros y hasta los 300 dpi por RIP y ELISA los segundos.

Los resultados se compararon con la detección de Ac contra el Ag VIA y la proteína 3D por ELISA-3D, siendo menor el porcentaje de animales reaccionantes por IDAG, por razones inherentes a la menor sensibilidad del método. Esta disminución en el nivel de Ac contra el Ag VIA fue descrito por otros autores previamente (Bergmann, 1993), indicando la baja sensibilidad de esta técnica. La cinética de Ac contra 3D, fue similar en el tiempo que la de 2C, si bien se pudo detectar un mayor número de animales positivos para 3D desde tiempos más tempranos.

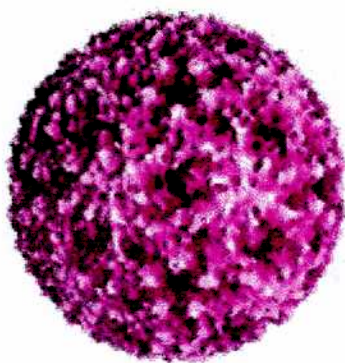
Debido a que no es posible diferenciar animales convalecientes de aquellos vacunados contra FA utilizando los métodos serológicos convencionales de SN y ELISA para detectar PE, es que se estudió si las vacunas comerciales en uso son capaces de inducir Ac contra la proteína 2C, a fin de utilizar a ésta como un indicador de infección viral.

Los resultados obtenidos mostraron solamente 1/79 (1.2%) sueros de bovinos vacunados, positivo para Ac anti-2C por este método, a diferencia de una respuesta positiva para el 97.14% de los sueros de bovinos experimentalmente infectados con el VFA evaluados anteriormente. Estos resultados coinciden con lo observado previamente por Mezencio y col. (1998) donde un 1-2% de sueros de animales vacunados, fueron positivos por un ELISA indirecto, utilizando como Ag la proteína 2C expresada en baculovirus. Berger y col. (1990), utilizando la RIP, encontraron que animales vacunados eran positivos a 3D, mientras que sueros de animales infectados también precipitaban otras PNE, entre ellas 2C. En un caso un suero de un bovino con 3 vacunaciones reaccionó contra 2C en forma transitoria, así como

contra 3AB₁. Estos autores concluyen que las vacunas contra el VFA podrían contener PNE junto al virión inactivado, siendo algunas de éstas ocasionalmente antigénicas. A diferencia de éstos, Bergmann y col. (1993), no detectan Ac contra las PNE 2C, 3A, 3B, 3ABC y 3D por EITB, en 400 sueros de bovinos vacunados a los 30 dpv con vacunas monovalente o trivalente inactivadas con BEI o con vacunas con adyuvante oleoso preparadas de acuerdo a los protocolos de rutina, ni cuando evalúan grupos de bovinos vacunados 2 a 3 veces al año con estas vacunas. Meyer y col. (1997) analizando sueros de bovinos luego de 2 a 3 vacunaciones, tampoco detectan Ac contra 2C por ELISA, observando en cambio un aumento en la respuesta de Ac contra 3D.

La ausencia de reactores contra 2C postvacunales en nuestros estudios, junto a las evidencias de otros grupos de trabajo de la retención de la proteína en membranas de células infectadas, nos permite concluir que 2C podría ser un Ag de elección como indicador indirecto de actividad viral, así como para la diferenciación entre animales infectados y animales que han sido vacunados.

El desarrollo de un método de ELISA, más simple y rápido, sería de elección para la continuación de estos estudios, siendo de gran necesidad para el apoyo de programas de control de la FA en países donde la enfermedad es endémica y se encuentran bajo planes de vacunación o en países como la Argentina, que van rumbo al cese de la vacunación, donde resulta imprescindible monitorear la situación epidemiológica. Estos métodos podrían ser complementados con la detección de Ac contra PE, el aislamiento viral y la detección de genoma viral en LEF para certificar el estado sanitario del individuo.



CONCLUSIONES

VI.- CONCLUSIONES

- El método de ELISA-3D resultó altamente específico (100%), sensible (90,9%, I.C.= 96.2%-85.54%) y reproducible (C.V. 2,5-3%).
- El método de ELISA-3D desarrollado, tiene las ventajas de ser simple y rápido de realizar. El método permite evaluar un gran número de muestras, es seguro, fácil de estandarizar y transferir, y no requiere de laboratorios de alta complejidad para su ejecución.
- El método de ELISA-3D es capaz de detectar Ac específicos de infección en bovinos luego de una infección natural o experimental con VFA tanto en estadios tempranos (5 dpi, infección aguda) como tardíos de la infección (565 dpi, infección persistente), resultando más sensible para la detección de animales infectados que la técnica de IDAG utilizada de rutina.
- En países o regiones, donde la FA es endémica y bajo vacunación sistemática, se sugiere como estrategia de vigilancia epidemiológica, el muestreo de animales menores de 2 años de edad, ya que esta categoría de animales constituye el mejor indicador de actividad viral.
- El método de ELISA-3D permite la detección de Ac específicos de infección en terneros. La respuesta de Ac contra la proteína 3D, luego de una o dos dosis de vacunas, fue detectada en forma transitoria. La misma aumenta con el aumento en el número de vacunaciones, por lo tanto es necesario contar con registros de vacunación previa para realizar los muestreos a intervalos de 4 a 6 meses entre vacunaciones.
- En animales mayores de 2 años que han recibido múltiples vacunaciones, la detección de Ac contra PNE, diferentes a la proteína 3D, no sería un indicador consistente de infección previa. Resulta necesario contar con registros de vacunación y muestreos adecuados, datos de edad e historia clínica de los animales a fin de facilitar la interpretación de los resultados.

● La detección de Ac contra la proteína 3D aplicando el método de ELISA-3D es evidencia concluyente de exposición y/o infección con el VFA, siendo de gran utilidad para monitorear actividad viral en regiones bajo vacunación sistemática.

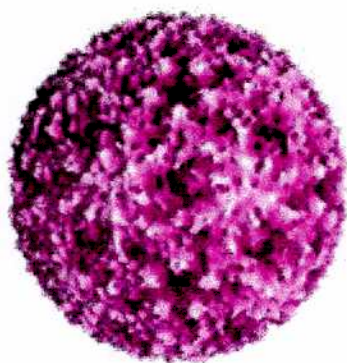
● El método de ELISA-3D podría ser utilizado como un método de “screening” en estudios seroepidemiológicos para monitorear actividad en áreas endémicas con vacunación, complementado con la detección de Ac contra PE y otras PNE del VFA, el aislamiento viral y la detección de genoma viral en LEF para certificar el estado sanitario del individuo.

● La detección de Ac contra las PE (proteínas de la cápside) del VFA sigue siendo el método más sensible y específico para detectar una exposición previa con el virus por infección o vacunación.

● La proteína 2C como antígeno en “Western blot”, resultó de una alta sensibilidad y especificidad para la detección de animales infectados. Este antígeno podría ser la base del desarrollo de un método de ELISA, rápido y sensible como lo es el ELISA-3D, para la detección de animales infectados.

● La ausencia de Ac contra 2C en casi la totalidad de los sueros de bovinos vacunados y revacunados evaluados (69/70), indica que esta proteína sería un indicador específico de infección previa con el VFA.

● El uso de proteínas biosintéticas tiene ventajas en cuanto a su estabilidad y pureza, evita el manejo de virus vivo y provee una fuente consistente de antígeno.



BIBLIOGRAFIA

VII.- BIBLIOGRAFIA

- Abu Elzein, E.M.E. & Crowther, J.R. (1978). Enzyme-labelled immunosorbent assay techniques in Foot-and-Mouth Disease virus research. *Journal of Hygiene, Camb.*, 80, 391.
- Abu Elzein, E.M.E. & Crowther, J.R. (1981). Detection and quantification of IgM, IgA, IgG1 and IgG2 antibodies against foot-and-mouth disease virus from bovine sera using an enzyme linked immunosorbent assay. *Journal Hyg.*, Vol 86, (1), 79.
- Acha, P.N. & Szyfres, B. (1988). Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Publicación Científica N° 503. OPS / OMS. p394.
- Acharya, R.; Fry, E.; Stuart, D.; Fox, G.; Rowlands, D. & Brown F. (1989). The three dimensional structure of FMDV at 2.9 Å resolution. *Nature*, 337, 709.
- Ahl, R. & Wittmann, G. (1986). Detection of antibodies to VIAA in sera from vaccinated cattle and antigenic variation of this antigen. *Off. Int.of Epizoot. 17th Conference*, 31.
- Alonso, F.A.; Augé de Melo, P.; Gomez, I. & Rosenberg,F. (1975). El uso del antígeno asociado a la infección viral (VIAA) en la detección del ganado expuesto al virus de la fiebre aftosa. *Bltn. Centro Panam.de F.A.* 17/18,17.
- Alonso, F.A.; Sondahl, M.S.; Giacometti, H. & Ferreira, M. (1984). Identificación de Acs anti-VIAA en sueros de animales. *Serie de Manuales Técnicos N° 6. Centro Panamericano de Fiebre Aftosa.*
- Alonso, F.A.; Gomes, I. & Bahneman, H.G. (1988). La inducción de Acs anti-VIAA en bovinos vacunados y revacunados con vacuna inactivada antiaftosa. *Bltn.Ctro.Panam. de F.A.* 54, 51.

- Alonso, A; Gomes, M.P.D.; Gomes, I. & Sondahl, M.S. (1988). Application of the ELISA in the identification of FMD virus infection associated antigen (VIAA) antibodies in cattle sera. Pan American FMD Center (PAHO/WHO).

- Alonso, A; Gomes, M.P.D.; Martins, M.A. & Sondahl, M.S. (1990). Detection of foot and mouth disease virus infection associated antigen antibodies: Comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay and agar gel immunodiffusion test. *Prev. Vet. Med.*, 9, 233.

- Anderson, E.C.; Doughty, W. & Anderson, J. (1974). The effect of repeated vaccination in an enzootic foot-and-mouth disease area on the incidence of virus carrier cattle. *J. Hyg.*, 73, 229

- Armstrong, R.; Davie, J. & Hedger, R.S. (1967). Foot-and-Mouth Disease in man. *Brit. Med. J.*, Vol.4, (578), 529.

- Bachrach, H. L. (1968). Foot and Mouth Disease Virus. *Annu Rev. Microbiol.*, 22, 201.

- Bachrach, H.L.; Moore, D.M.; McKercher, P. & Polatnick, J. (1975). Immune and antibody responses to an isolated capsid protein of foot-and-mouth disease virus. *J. Immunology*, 115, 1636.

- Bachrach, H.L. (1977). Foot and mouth disease virus: Properties, molecular biology and immunogenicity. In "Beltsville Symposia in Agricultural Research. I. Virology in Agriculture". J.A. Romberger Ed. Allanheld, Osmun, Montclair, N.Y. pp 3.

- Bahnemann, H.G. (1975). Binary ethylenimine as an inactivant for foot and mouth disease virus and its application for vaccine production. *Arch Virol.*, 47, 47.

- Bahnemann, H.G. (1990). Inactivation of viral antigens for vaccine preparation with particular reference to the application of binary ethylenimine. *Vaccine*, Vol 8, 299.

- Bauer, K. (1997). Foot-and-mouth disease as zoonosis. Arch. Virol. Suppl. (Austria). Vol 13, 95.

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

- Belsham, G.J. (1993). Distinctive features of Foot-and-Mouth Disease Virus, a member of the Picornaviruses family; aspects of virus protein synthesis, protein processing and structure. Prog. Biophys. Molec. Biol., Vol. 60, 241.

- Berger, H.G.; Straub, O.C.; Ahl, R.; Tesar, M. & Marquardt, O. (1990). Identification of FMDV replication in vaccinated cattle by antibodies to non structural virus proteins. Vaccine. 8, 213.

- Bergmann, I.E.; Augé de Mello, P.; Neitzert, M.S.; Beck, E. & Gomes I. (1993). Diagnosis of persistent aphtovirus infection and its differentiation from vaccination response in cattle by use of enzyme-linked immunoelectrotransfer blot analysis with bioengineered non structural viral antigens. Am.J.Vet.Res. Vol.54,Nº6, 825.

- Bergmann, I.E.; Astudillo, V.; Malirat, V. & Neitzert, E. (1998). Serodiagnostic strategy for estimation of foot-and-mouth disease viral activity through highly sensitive immunoassays using bioengineered nonstructural proteins. The Veterinary Quarterly, Vol. 20, S2, 6.

- Bienz, K.; Egger, D.; Troxler, M. & Pasamontes, L. (1990). Structural Organisation of Poliovirus ARN Replication in Mediated by Viral Proteins of the P2 Genomic Region. Journal of Virology, Vol 64, Nº 3, 1156.

- Boletín Técnico Nº 3, COPROSA. (1994). La Fiebre Aftosa en la Provincia de Buenos Aires. Seroepidemiología y Análisis de focos. pp 21.

- Boothroyd, J.; Highfield, P.; Cross, G.; Rowlands, D.; Lowe, P.; Brown, F.; & Harris, T. (1981). Molecular cloning of foot and mouth disease virus genome and nucleotide sequence in the structural protein genes. *Nature*, Vol. 290, 800.

- Brown, F.; Hyslop, N.; Crick, J. & Morrow, A. (1963) The use of acetyl-ethylenimine in the production of inactivated foot and mouth disease vaccines. *J. Hyg.*, 61, 337.

- Brown, C.C.; Meyer, R.F.; Olander, H.J. House, C. & Mebus, C.A. (1992). A pathogenesis study of foot-and-mouth disease in cattle, using in situ hybridization. *Can. J. Vet. Res.* Vol 56, (3), 189.

- Burnette, W.N. (1981). "Western blotting": Electrophoretic transfer of proteins from SDS-Polyacrilamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry*, 112, 195.

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

- Burrows, R. (1968). The persistence of foot and mouth disease virus in sheep. *J. Hyg., Camb.* Vol 66, N°4, 633.

- Burrows, R.; Mann, J.A.; Garland, A.J.; Greig, A. & Goodridge, D.(1981). The pathogenesis of natural and simulated natural foot and mouth disease infection in cattle. *J. Comparative Pathology*, Vol 91, 599.

- Carrillo, E.; Giachetti, C. & Campos, R. (1984). Effect of lysosomotropic agents on the FMDV replication. *Virology*, 135, 542.

- Carrillo, E.; Giachetti, C. & Campos, R.(1985). Early steps in FMDV replication: further analysis on the effects of chloroquine. *Virology*, 147, 118.

- Clarke, B.; Newton, S.; Carroll, A.; Francis, M.; Appleyard, G.; Syred, A.; Highfield, P.; Rowlands, D. & Brown, F. (1987). Improved immunogenicity of a peptide epitope after fusion to Hepatitis B core protein. *Nature*, 330, 381.

- Condry, J.B. & Hedger, R.S. (1974). The survival of FMD virus in African buffalo with non-transference of infection to domestic cattle. *Research in veterinary Science*, 16, 182.

- Condry, J.B.; Hedger, R.S.; Hamblin, C. & Burnett I.T.R. (1985). The duration of foot and mouth disease carrier state in African Buffalo (y) in the individual animal and (ii) in a free-living herd. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Disease*, 8, 259.

- Cooper, P.; Agol, V.; Bachrach, H.; Brown, F.; Ghendon, Y.; Gibbs, A.; Gillespie, J.; Longberg-Holm, K.; Mandel, B.; Melnick, J.; Mohanty, S.; Povey, R.; Rueckert, R.; Schaffer, F. & Tyrrel, D. (1978). Picornaviridae: second report. *Intervirology*, 10, 165.

- Cottral, G.E. (1969). Persistence of foot and mouth disease virus in animals, their products and environment. *Bull. Off. int. Epiz.*, 71, 549.

- Cottral, G. (1975). Foot and mouth disease virus. In: *Foreign Animal disease*. third ed. Committee on Foreign Animal Diseases, United States Animal Health Association, Richmond, VA.

- Cowan, K.M. & Graves, J.H. (1966). A third antigenic component associated with FMD infection. *Virology*, 30, 528.

- Crowther, J.R. & Abu Elzein, E.M.E. (1980). Detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus using purified Staphylococcus A protein conjugated with alkaline phosphatase. *J. Immunol. Methods* 34, (3), 261.

- Dawe, P. & Pinto, A.A. (1978). Antibody responses to type-specific and VIA antigens in cattle vaccinated with inactivated polyvalent FMDV in North Malawi. *British Veterinary Journal*, 134, 504.

- Dawe, P.S.; Sorensen, K.; Ferris, N.; Barnett, I.T.; Armstrong, R.M. & Knowles, N.J. (1994). Experimental transmission of foot-and-mouth disease from carrier African buffalo (*Syncerus caffer*) to cattle in Zimbabwe. *Veterinary Record*, 134, 211.

- De Diego, M.; Brocchi, E.; Mackay, D. & De Simone F. (1997). The non-structural polyprotein 3ABC of foot and mouth disease virus as a diagnostic antigen in ELISA to differentiate infected from vaccinated cattle. *Arch. Virol.*, 142, 2021.

- Doel, T.R.; Williams, L. & Barnett, P.V. (1994). Emergency vaccination against FMD: Rate of development of immunity and its implications for the carrier state. *Vaccine*, 12, (7), 592.

- Donaldson, A.; Gibson, C.F.; Oliver, R.; Hamblin, C & Kitching, R.P. (1987). Infection of cattle by airborne foot-and-mouth disease virus: minimal doses with O1 and SAT2 strains. *Research in Veterinary Science* 43, (3), 339.

- Donaldson, A. I. & Kitching, R. P.(1989). Transmission of foot and mouth disease virus by vaccinated cattle following natural challenge. *Research in Veterinary Science*, 46, 9.

- Donn, A.; Martin, L.A. & Donaldson, A.I. (1994). Improved detection of persistent foot-and-mouth disease infection in cattle by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods*, 49, (2), 179.

- Estupiñan, J.; Lobo, C.A.; Barrera, J.; Restrepo, G. Cardona, U. & De Gerardino, A.G. (1979). Observaciones diferenciales de títulos de Acs anti-VIA en bovinos infectados con VFA y bovinos revacunados. *Revista del Instituto Colombiano Agropecuario*, XIV, (2), 81.

- Fagg, R. & Hyslop, N. (1966). Isolation of variants strain of FMDV (type O) during passage in partly immunized cattle. *J of Hygiene*, 64, 397.

- Feigelstock, D.; Mateu, M.G.; Piccone, M.E.; De Simone, F.; Brocchi, E.; Domingo, E. & Palma, E.L. (1992) Extensive antigenic diversification of FMDV by amino acid substitutions outside the major antigenic site. *J. of General Virology*, 73, 3307.

- Ferris, N.P. & Donaldson, A.I. (1992). The World Reference Laboratory for Foot-and-Mouth Disease: a review of thirty-three years of activity (1958-1991). *Rev. Sci. Tech. Off. int. Epiz.* 11, (3), 657.

- Fields, B.N. & Knipe, D.M. (1985). *Virology*. Ed. Raven Press, New York.

- Fondevila, N.; Uriona, C.; Duffy, S.; León, E. & Schudel, A. (1992).- Determinación de la actividad viral y del nivel de inmunidad poblacional en bovinos vacunados contra Fiebre Aftosa en el partido de Navarro. *Veterinaria Argentina*, Vol. IX, Nº 90, 686.

- Fondevila N.; O'Donnell, V.; Duffy, S.; León, E.; Smitsaart, E. & Schudel, A. (1997). Indicadores seroepidemiológicos para la evaluación de las campañas de control de Fiebre Aftosa. *Rev. Sci. Off. Int. Epis.*, 16, (3), 784.

- Forss, S.; Strebel, K.; Beck, E. & Schaller, H. (1984). Nucleotide sequence and genome organization of foot-and-mouth disease virus. *Nucleic Acid Research*, Vol 12, Nº 16, 6587.

- Fracastorius, H. (1546). *De Contagione et Contagiosis Morbis et Curatione*. Bk. 1, Chap. 12. Venecia.

- Franz, J.; Flachsel, P.; Hubik, R. & Mensik, J. (1982). De La XVIeme Conference de la Commission Permanente de la Fievre Aphteuse de l'OIE. París, 14-17 September, pp. 241.

- Frenkel, S.H. (1951). Research on foot-and-mouth disease III. The cultivation of the virus on a practical scale in explantations of bovine tongue epithelium. *Am J. Vet Res.*, 12, 187.

- Freund, J. & Thompos, K. (1945). A simple rapid technique of preparing water-in-oil emulsions of penicillin, drugs and biologicals. *Science* 101, 468.

- 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.

- Gebauer, F.; De La Torre, J.C.; Gomes, I.; Mateu, M.G.; Barahona, H.; Tiraboschi, B.; Bergmann, I.; De Mello, P.A. & Domingo, E. (1988).- Rapid selection of genetic and antigenic variants of FMDV during persistence in cattle. *Journal of Virology*, Vol 62, N°6, 2041.

- Geering W., Forman A. & Nunn M. (1995). *Exotic diseases of animals*. Australian Government Publishing Services, Canberra.

- Graves, J.H.; McVicar, J.W.; Sutmoller, P.; Trautman, R. & Wagner, G.G. (1971) Latent viral infection in transmission of FMD by contact between infected and susceptible cattle. *J. of Infectious Diseases*, 124, 270.

- Grigera, P.R.; Tisminetzky, S.G.; Lebendiker, M.B.; Periolo, O.H. & La Torre, J.L. (1988) Presence of a 43 kDa host-cell polypeptide in purified aphtovirions. *Virology*, 158, 133.

- Grubman, M.J.; Lewis, S.A. & Morgan, D.O. (1993). Protection of swine against FMD with viral capsid proteins expressed in heterologous systems. *Vaccine* Vol. 11, N°8, 825.

- Hamblin, C.; Barnett, I.T.R. & Hedger, R.S. (1986 a). A new enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against FMDV. I Development and method of ELISA. *Journal of Immunological Methods*, 93, 115.

- Hamblin, C.; Barnett, I.T.R. & Crowther, J.R. (1986 b). A new enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against FMDV. II Application. *Journal of Immunological Methods*, 93, 123.

- Harris, K.S.; UT, C., Wimmer, H. & Wimmer, E. (1990). Proteolytic processing in the replication of picornaviruses. *Sem. Virol*, 1, 325.

- Have, P. & Jensen, M.H. (1983). Report of the Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for Control of Foot-and-Mouth Disease. Lelystad. The Netherlands, 20-22 Septiembre. Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Rome.

- Hedger, R.S. (1968). The isolation and characterization of FMDV from clinically normal herds of cattle in Botswana. *J.Hyg.Camb.*, 66, 27.

- Hedger, R.S. & Stubbins, A.G.J. (1971). The carrier state in foot and mouth disease and the probang test. *State Vet. J.* 26: 45.

- Hedger, R.S. & Condry, J.B. (1985). Transmission of foot-and-mouth disease from African buffalo virus carriers to bovines. *Veterinary Record* 117, 205.

- House, C. & House, J.A. (1989). Evaluation of techniques to demonstrate foot-and-mouth disease virus in bovine tongue epithelium: comparison of the sensitivity of cattle, mice, primary cell culture, cryopreserved cell cultures and establish cell lines. *Vet. Microb.* 20, 99.

- House, C. & Meyer, R.F. (1993). The detection of foot-and-mouth disease in oesophagealpharyngeal samples by a polymerase chain reaction technique. *J. of Virological Methods* 43, 1.

- Hynes, R.O. (1992). Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, Vol 69, 11.

- King, A.M.Q.; Underwood, B.O.; McCahon, D.; Newman, J.W.I & Brown, F. (1981). Biochemical identification of viruses causing the 1981 outbreaks of foot and mouth disease in the UK. *Nature*, Vol 293, 479.

- Kitching, R.P. (1998). A Recent History of Foot-and-Mouth Disease. *J. Comp. Path.* Vol 118, 89.

- Kleid, D.G.; Yansura, D.; Small, B.; Dowbenko, D.; Moore, D.; Grubman, M.; McKercher, P.; Morgan, D.; Robertson, B. & Bachrach, K.L. (1981). Cloned viral protein vaccine for foot-and-mouth disease: response in cattle and swine. *Science* Vol. 214, (4), 1125.

- Kuhn, R.; Luz, N. & Beck, E. (1990). Functional analysis of the internal initiation site of foot-and-mouth disease virus. *J. Virology* Vol. 64, N°10, 4625.

- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, Vol.227,15, 680.

- León, E.; Duffy, S.; Corbellini, C.N.; Fondevila, N.; O'Donnell, V.; Uriona, C.; Spinelli, C.A.; Yanarella, F. & Schudel, A.A. (1994). Fiebre Aftosa: Actividad viral e inmunidad poblacional en los partidos de Navarro, Lobos y Suipacha. *Veterinaria Argentina*, Vol. XI, N° 103, 177.

- León, E.; Duffy, S.; Fondevila, N.; O'Donnell, V.; Corbellini, C.N. & Humaran, M. (1996) Persistencia de Acs anti-VIA de origen calostrual en terneros. *Veterinaria Argentina*, Vol XIII, N° 123, 174.

- Lobo, C.; Hanson, R.P.; Gutierrez, A. & Beltran, L.E. (1976). Serological detection of natural FMD infection in cattle and pigs. *Bull. Off. Int. Epizoot.*, 35, 1075.

- Lobo, C.; Arbelaez, G. & Restrepo, A. (1977). Prevalencia de Acs anti-VIA en bovinos del norte del Choco, Colombia. *Boletín Centro Panamericano de Fiebre Aftosa*, 26, 31.

- Loeffler, F. & Frosch, P. (1898). Report of the Commission for Research on Foot-and-Mouth Disease. *Centralbl. Bakt. Parisit. Infekt. Part. I*, 23, 371.

- Logan, D.; Abu-Ghazaleh, R.; Blakemore, W.; Curry, S.; Jackson, T.; King, A.; Lea, S.; Lewis, R.; Newman, J. & Parry, N. (1993). Structure of a major immunogenic site of FMDV, *Nature* 362, (6420), 566.

- 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 livestock. *Research in Veterinary Science*, 59, 70.

- Lubroth, J.; Grubman, M.J.; Burrage, T.G.; Newman, J.F. & Brown, F. (1996). Absence of protein 2C from clarified FMDV vaccines provides the basis for distinguishing convalescent from vaccinated animals. *Vaccine*, Vol. 14, Nº 5, 419.

- Lubroth, J.; López, A.; Ramalho, A.K.; Meyer, R.F.; Brown, F. & Darsie, G.C. (1998). Cattle response to foot-and-mouth disease virus nonstructural proteins as antigens within vaccines produced using different concentrations. *The Veterinary Quarterly*, Vol 20, S2, 13.

- Lucas-Lenard, J.M. (1979). Inhibition of cellular protein synthesis after virus infection. In: *The molecular biology of Picornaviruses*. Edited by Perez-Bercoff. p 73. Cambridge University Press, New York.

- Mackay, D.K.J. (1994). The use of non-structural proteins in immunoassays for the diagnosis of FMDV. Inst. for Animal Health, Pirbright Laboratory, Ash Road, Woking Surrey, GU24 0NF.

- Mackay, D.K.J.; Forsyth, M.A.; Davies, P.R.; Berlinzani, A.; Belsham, G.J.; Flint, M. & Ryan M.D. (1998a). Differentiating infection from vaccination in foot and mouth disease using a panel of recombinant, non-structural proteins in ELISA. *Vaccine* Vol 16, N°5, 446.

- Mackay, D.K.J.; Forsyth, M.A.; Davies, P.R. & Salt, J.S. (1998b). Antibody to the nonstructural proteins of foot-and-mouth disease virus in vaccinated animals exposed to infection. *The Veterinary Quarterly*, Vol 20, S2, 9.

- Mackay, D.K.J. (1998c). Differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease. *The Veterinary Quarterly*, Vol 20, S2, 2.

- Malirat, V.; Neitzert, E.; Bergmann, I.E.; Maradei, E. & Beck, E. (1998). Detection of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus by means of an indirect ELISA test using bioengineered nonstructural polyprotein 3ABC. *The Veterinary Quarterly*, Vol. 20, S2, 24.

- Mason, P.W.; Baxt, B.; Brown, F.; Harber, J.; Murdin, A. & Wimmer, E. (1993). Antibody-complexed foot and mouth disease virus, but not poliovirus, can infect normally insusceptible cells via the Fc receptor. *Virology* 192, 568.

- McCullough, K.K.; Crowther, J.R. & Butcher, R.N. (1985). A liquid-phase ELISA and its use in the identification of epitopes on foot and mouth disease antigen. *J. Virol. Methods* 11, 329.

- McCullough, K.K.; De Simone, F.; Brocchi, E.; Capucci, L.; Crowther, J.R. & Kihm, U. (1992). Minireview. Protective Immune Response against Foot-and-Mouth Disease. *Journal of Virology*, Vol 66, 4, 1835.

- McVicar, J.W. & Suttmoller, P. (1970). Foot-and-mouth-disease: the agar gel diffusion precipitin test for antibody to virus-infection-associated (VIA) antigen as a tool for epizootiologic surveys. *American Journal of Epidemiology*, 92, 273.

- Meyer, R.F.; Babcock, G.D.; Newman, F.E.; Burrage, T.G.; Toohey, K.; Lubroth, J. & Brown, F. (1997). Baculovirus expressed 2C of foot and mouth disease virus has the potential for differentiating convalescent from vaccinated animals. *Journal of Virological Methods* 65, 33.

- Mezencio, J.M.S.; Babcock, G.D.; Meyer, R.F.; Lubroth, J.; Salt, J.S.; Newman, J.F.E. & Brown, F. (1998). Differentiating foot-and-mouth disease virus infected from vaccinated animals with baculovirus expressed specific proteins. . *The Veterinary Quarterly*, Vol 20, S2, 11.

- Mitchinson, N.A. (1971). The carrier effect in the secondary response to haptene protein conjugates II. Cellular cooperation. *Eur. J. Immunology*, 1, 18.

- Mohler, J.R. (1926). Foot and mouth disease with special reference to the outbreaks in California, 1924 and Texas 1924 and 1926. U.S. Department of Agriculture Circular. 400, 1.

- Morgan, D.; Moore, D. & McKercher, P. (1980). Vaccination against foot-and-mouth disease. In: *New Developments with Human and Veterinary Vaccines*. Alan A. Liss, Inc., NY.

- Morgan, I.R. (1993). Review: Spread of Foot-and-Mouth Disease. Australian Meat Research Corporation. Victorian Institute of Animal Science.

- Mowat, G.H. (1961). Multiplication "in vitro" of modified foot-and-mouth disease virus. *Res. Vet. Sci.* 2, 153.

- Mowat, G.N. & Chapman, W.G. (1962). Growth of foot and mouth disease virus in fibroblastic cell line derived from hamster kidneys. *Nature* Vol. 194, 253.

- Mowat, G.H. (1964). Selection of attenuated strains of foot-and-mouth disease virus by cloning in tissue culture. *Bull. Off. Int. Epiz.* 61, 639.

- Newman, J.F.E.; Cartwright, B.; Doel, T.R. & Brown, F. (1979). Purification and identification of the RNA-dependent RNA polymerase of FMDV. *J.Gen.Virol* 45, 497.

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

- Neitzert, E.; Beck, E.; Auge de Mello, P.; Gomes, I. & Bergmann, I.E. (1991). Expression of the aphthovirus RNA polymerase gene in *E.coli* and its use together with other bioengineered nonstructural antigens in detection of late persistent infections. *Virology* 184, 799.

- O'Donnell, V.; Boyle, D.; Sproat, K.; Fondevila, N.; Forman, A.; Schudel, A.A. & Smitsaart, E. (1996). Detection of antibodies against foot and mouth disease virus using a liquid-phase blocking sandwich ELISA (LPBE) with a bioengineered 3D protein. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation* 8, 143.

- O'Donnell, V.; Smitsaart, E.; Cetra, B.; Duffy, S.; Finelli, J.; Draghi, G.; Boyle, D.; Fondevila, N. & Schudel, A.A. (1997) Detection of virus infection associated antigen and 3D antibodies in foot-and-mouth disease vaccinated cattle. *Revue Scientifique et Technique, Office International des Epizooties*. Vol 16, (3), 833.

- OIE. Manual of Standards for diagnostic tests and vaccines. (1992). 2nd Ed. pp. 1. ISBN 92-9044-314-6.

- OIE Manual of Standards for diagnostic tests and vaccines (1996). Principles of validation of diagnostic assays for infectious diseases. Capítulo 1.3: 8.

- Parisi, J.M.; Gioni, P.; Giera, P.; Augé de Mello, P.; Bergmann, I. & La Torre, J. (1985). Biochemical characterization of an aphthovirus type O1 strain Campos attenuated for cattle by serial passages in chicken embryos. *Virology* 147, (1), 61.

- Pay, T.W.F. (1988) Foot and mouth disease in sheep and goats: a review. *Foot and Mouth Disease Bulletin* Vol 26, 2.

- Pay, T.W & Hingley, P.J. (1992a). Foot-and-mouth disease vaccine potency tests in cattle: the interrelationship of antigen dose serumneutralizing antibody response and protection from challenge. *Vaccine* 10, (10), 699.

- Pay, T.W & Hingley P.J. (1992b). A potency test method for foot-and-mouth disease vaccine based on the serum neutralizing antibody response produced in cattle. *Vaccine* 10, (10), 707.

- Piatti, P.; Berinstein, A.; López, O.; Borca, M.; Fernández, F.; Schudel, A. & Sadir, A. (1991). Comparison of the immune response elicited by infectious and inactivated foot and mouth disease virus in mice. *J. Gen. Virol.* 72, 1691.

- Pinto, A.A. & Garland, A.J. (1979). Immune response to VIAA in cattle repeatedly vaccinated with FMDV inactivated by formalin or acetyleneimine. *Journal of Hygiene*, 82, 41.

- Polatnick, J.; Arlinghaus, R.B.; Graves, J.H. & Cowan, K.M. (1967). Inhibition of cell-free foot and mouth virus-ribonucleic acid synthesis by antibody. *Virology* 31, 609.

- Polatnick, J. (1980). Isolation of foot and mouth disease polyuridylic acid polymerase and its inhibition by antibody. *J. Virol.* 33, 774.

- Porter, A.G. (1993). Picornavirus Nonstructural Proteins: Emerging Roles in Virus Replication and Inhibition of Host Cell Functions. *Journal of Virology*, Vol. 67, Nº 12, 6917.

- Prato Murphy, M.L.; Meyer, R.F.; Mebus, C.; Schudel, A.A. & Rodríguez, M. (1994). Analysis of sites of foot-and-mouth disease virus persistence in carrier via the polymerase chain reaction. *Arch. Virol.* 136, 299.

- Rivenson, S.; Marcovecchio, F.; Zabal, O.; Sadir, A.; Borca, M.V. & Laporte, O. (1982). Ensayos comparativos en cobayos y bovinos de una vacuna anti-aftosa emulsionada con adyuvante oleoso sintético e hidróxido de aluminio. *Gaceta Veterinaria* Nº 367: 74.

- Rivenson, S.; Sadir, A.; Gaggino, O.; Marcovecchio, F.; Zabal, O. & Laporte, O. (1982). Estudio comparativo en bovinos de dos vacunas antiaftosa: oleosa e hidroxisaponinadas. *Rev. Med. (Bs. As.)* 63, 364.

- Rodríguez, A.; Dopazo, J.; Sáiz J.C. & Sobrino F. (1994) Immunogenicity of non-structural proteins of foot and mouth disease virus: differences between infected and vaccinated swine. *Archives of Virology* 136, 123.

- Rodríguez, M.; Sánchez, A.; Smitsaart, E. & Schudel, A.A. (1995). Infecciones inaparentes y persistentes como medio de circulación del VFA en la naturaleza. *R. I. A. Argentina.*, 25, (3), 103.

- Roeder, P.L. & Le Blanc Smith, P.M. (1987). Detection and typing of FMDV by enzyme linked immunosorbent assay: a sensitive rapid and reliable technique for primary diagnosis. *Research in Veterinary Science* 43, 225.

- Rosenberg, F.J.; Malaga, J. & Alonso, F.A. (1976). Prevalence of antibodies against foot-and-mouth disease virus-infection-associated-antigen (VIA) in cattle of the Paraguayan Chaco. *Boletín del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa* 21-22, 1.

- Rossi, M.S.; Sadir, A.M.; Schudel, A.A. & Palma, G.L. (1988). Detection of foot-and-mouth disease virus with DNA probes in bovine esophageal-pharyngeal fluids. *Arch. of Virol.* 99, 67.

- Rowlands, D.J.; Cartwright, B. & Brown, F. (1969). Evidence for an internal antigen in foot-and-mouth disease virus. *J. Gen. Virol.* 4, 479.

- Rueckert, R.R. (1976). On the structure and morphogenesis of Picornaviruses. In: *Comprehensive Virology*. Vol 1. p131. Edited by H. Fraenkel-Conrat and R. Wagner, N.Y., Plenum Press.

- Rueckert, R.R. & Wimmer, E. (1984). Systematic nomenclature of picornavirus proteins. *J. Virol.* 50, (3), 957.

- Rueckert, R.R. (1985). Picornaviruses and their replication. In: *Virology* (Eds Fields, B.N. et al). Raven Press, New York. Pp. 705.

- Ryan Martin, D.; King, A.M.Q. & Thomas, G.P. (1991). Cleavage of FMDV polyprotein is mediated by residues located within a 19 amino acid sequence. *Journall of General Virology* 72, 2727.

- Sadir, A.; López, O.; Marcovecchio, F.; Tiraboschi, B.; Bergmann, Y.; La Torre, J. & Schudel, AA. (1988). The duration of immunity in cattle after experimental infection with FMDV. *Impacto de las Enfermedades Virales en el Desarrollo de Países de Latinoamérica y de la Región del Caribe*. 2da Conferencia Internacional. p 91. Mar del Plata, Argentina.

- Salt, J.M. (1993). The carrier state in foot and mouth disease: an immunological review. *British Veterinary Journal* 149, 207.

- Sambrook, J.; Fritsche, F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Lab Press, USA. 2nd edition.

- Sangar, D.V. (1979). The replication of picornaviruses. *J. Gen. Virology* 45, 1.

- Schudel, A.A.; Zuloaga, G.; Fernandez, F.; Borca, M.V. & Marcovecchio, F.E. (1984). Anticuerpos anti-VIA en animales susceptibles al virus de Fiebre Aftosa. *Rev. Sci. Tech. OIE*. Vol 3, (2), 329.

- Scott, F.W.; Cottral, G.E. & Gailiunas, P. (1966). Persistence of foot-and-mouth disease virus in external lesions and saliva of experimentally infected cattle. *Am. J. of Vet. Res.* 27, 1531.

- Sellers, R. F. (1971). Quantitative aspects of the spread of Foot-and-Mouth Disease. *Veterinary Bulletin* 41, 431.

- SENASA (1994). Programa de Lucha Sanitaria contra la Fiebre Aftosa. Indicadores: Sintesis. Informe del Programa de Fiebre Aftosa. Actualización al 15/8/1994.

- SENASA (1996). Informe del Programa de Fiebre Aftosa.

- SENASA (1997). Fiebre Aftosa: Análisis Cualitativo de Riesgo. ISBN 987-96849-2-3.

- SENASA (1997). Fiebre Aftosa: Análisis Cualitativo de Riesgo. La Prevención de la Fiebre Aftosa y el cese de la vacunación. ISBN 987-96849-3-1.

- SENASA (1998). Noticias. Sanidad Animal. Internet: senasa.mecon.gov.ar, pp.2.

- 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* 142, 795.

- Smitsaart, E.; Zanelli, M.; Rivera, I.; Fondevila, N.; Compaired, D.; Maradei, E.; Bianchi, T.; O'Donnell, V. & Schudel, A. (1998). Assessment using ELISA of the herd immunity levels in cattle by foot-and-mouth disease oil vaccines. *Preventive Veterinary Medicine* 33, 283.

- Sociedad de Medicina Veterinaria. (1996). Simposio "Los últimos días de la Aftosa en la Argentina". Noviembre 1996, Buenos Aires, Argentina.

- Späth, E. & Cacace, P. (1994). Análisis de la Actividad Viral. Cuenca del Salado 1992-1993. *Bol. Téc. N°3, COPROSA*, 1.

- Sutmöller, P. & Gaggero, A. (1965). Foot-and-mouth disease carriers. *Veterinary Record*, 77, 968.

- Sutmöller, P. & Cottral, G.E. (1967). Improved techniques for the detection of FMDV in carrier cattle. *Archiv. für die Gesamte Virusforschung*, 21, 170.

- Sutmöller, P.; Mc Vicar, J.W. & Cottral, G.E. (1968). The epizootiological importance of foot-and-mouth disease carriers. I. Experimentally produced foot-and-mouth disease carriers in susceptible and immune cattle. *Arch. für Gesamte Virusforsch* 23, (3), 227.

- Terpstra, C. (1972). Pathogenesis of foot-and-mouth disease in experimentally infected pigs. *Bulletin de l'Office International des Epizooties* 77, 859.

- Towbin, H.; Staehelin, T. & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, Vol. 76, N° 9, 4350.

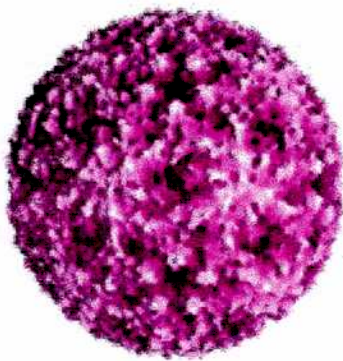
- Vallée,H.; Carré, H. & Rinjard P. (1926). Sur l'immunisation antiaphteuse par le virus formolé. *Rev. Gen. Med. Vet.* 35, 129.

- van Bakkum, J.G.; Frenkel, H.S.; Frederiks, H.H.J. & Frenkel, S.(1959). Observations on the carrier state of cattle exposed to FMDV. Tijdschr. Diergeneesk. 84, 1159.

- van Bakkum, J.G. (1973). The carrier state in FMD.In Proc. 2nd Int.Conf.on FMD,ed M.Pollard Gustav Stern Foundation Inc., NY., 45.

- Vith ICTV Report. (1996). Minor PD, Brown F, Domingo E, Hoey E, King A, Knowles N, Lemon S, Palmenberg A, Rueckert RR, Stanway G, Wimmer E, Yin-Murphy M.

- Villinger, F.; Mueller, H.K.; Bruckner L.; Ackermann, M. & Kihm U. (1989). Antibodies to foot and mouth disease virus infection associated (VIA) antigen: Use of a bioengineered VIA protein as antigen in an ELISA. Veterinary Microbiology 20, 235.



APENDICE

VIII.- APENDICE

- Soluciones y Reactivos

- ELISA

Buffer de bloqueo

PBS 1X - 0.05 % Tween 20 - 1% OVA

Tween 20	0.5 ml
PBS 1X	1000 ml
OVA	10 g

Buffer de dilución (ELISA-3D)

PBS 1X - 0.05 % Tween 20 - 1% OVA - 10 % SNB

Tween 20	0.05 ml
PBS 1X	90 ml
OVA	1 g
SNB	10 ml

Buffer de dilución (ELISA F-L)

PBS - 0.05 % Tween 20 - 1 % OVA - 2 % SNC - 2 % SNB

Tween 20	0.05 ml
PBS 1X	96 ml
OVA	1 g
SNC	2 ml
SNB	2 ml

Buffer de Lavado

PBS 0.25X - 0.05 % Tween 20 - pH 7.4

Tween 20	0.50 ml
PBS 1X	250 ml
H ₂ O bidestilada	750 ml

Buffer de pegado

Buffer carbonato / bicarbonato, pH 9.6

Na ₂ CO ₃	1.59 g
NaHCO ₃	2.93 g
H ₂ O bidestilada	csp 1000 ml

Buffer Sustrato

Buffer citrato / fosfato, pH 5.0

Acido Cítrico	4.67 g
Na ₂ HPO ₄	7.30 g
H ₂ O bidestilada	csp 1000 ml

PBS 1X

NaCl	40 g
KH ₂ PO ₄	1 g
Na ₂ HPO ₄ . 12H ₂ O	14.5 g
KCl	1g
H ₂ O bidestilada	csp 5000 ml

PBS 1X - 0.05% Tween 20, pH 7.4

Tween -20	0.50 ml
PBS 1X	csp 1000 ml

Peróxido de Hidrógeno 3%

H ₂ O ₂ 35%	0.969 ml
H ₂ O bidestilada	csp 10 ml

Solución de OPD madre

1,2 diamino benceno.2ClH (OPD)	1 g
Buffer citrato - fosfato	100 ml

Solución OPD de uso

Buffer citrato - fosfato	6 ml
Solución madre de OPD	360 µl
H ₂ O ₂ 3%	30 µl

Solución de frenado

Acido Sulfúrico 1.25 M.

H ₂ SO ₄ 98%	125 ml
H ₂ O bidestilada	875 ml

LON II (Dynat

- Geles de Poliacrilamida - SDS y “Western blot”

Acrilamida stock

acrilamida	40g
bis-acrilamida	1.1g
H ₂ O bidestilada	csp 100ml

Buffer de Bloqueo

Leche descremada en polvo (3% p/v)

PBS 1X	1000 ml
Tween-20 (0.1%)	1 ml
Leche descremada en polvo	30 g
Preparar justo antes de su uso.	

Buffer de Corrida 1X

Tris-Base	6.06 g
Glicina	28.4 g
SDS	2 g
H ₂ O bidestilada	csp 2000 ml
Guardar a 4°C.	

Buffer de Lavado

PBS 1X - 0.1% Tween 20

PBS 1X	1000 ml
Tween-20 (0.1%)	1 ml

Buffer de Muestra

1M Tris Hcl, pH 6.8	1 ml
Glicerol	3 ml
2-Mercaptoethanol	0.2 ml
SDS (10%)	1 ml
H ₂ O bidestilada	4.7 ml
0.1% Azul de Bromofenol	100 µl

Se prepara la muestra de proteínas en relación muestra: buffer de muestra = 1:1, calentar a 95-100°C durante 3 - 5 minutos.

Buffer de Secado y Almacenamiento para geles

Por vacío secar en papel de filtro:

Acido acético	10 ml
Glicerol	2 ml
H ₂ O bidestilada	csp 100 ml

Por aire secar entre hojas de celofan (Promega Kit):

Empapar el gel en glicerol al 10% en agua por al menos 30 minutos

Buffer de Transferencia

Tris	5.79 g
Glicina	27 g
H ₂ O bidestilada	csp 3000 ml

Buffer Sustrato (Buffer 3)

1M Tris-ClH pH 9.6	3.6 ml
3M ClNa	1.2 ml
1M Cl ₂ Mg	1.8 ml
H ₂ O bidestilada	csp 36 ml

Coomasie Blue - Solución colorante

Coomasie blue R-250 (Sigma,USA)	1 g
Metanol	400 ml
Acido acético glacial	100 ml
H ₂ O bidestilada	4.7 ml

Primero mezclar el Coomasie blue con el metanol durante 20 minutos. Guardar a TA.

Coomasie blue- Solución decolorante

Metanol	400 ml
Acido acético glacial	100 ml
H ₂ O bidestilada	500 ml

Guardar a TA.

Gel Separador 12 %

1M Tris-ClH, pH8.8	7.5 ml
Sacarosa 60%	6.5 ml
Acrilamida stock	6 ml
PSA 10%	70 μ l
TEMED	10 μ l

Gel Concentrador 4 %

1M Tris-ClH, pH6.8	620 μ l
Acrilamida 40%	620 μ l
H ₂ O bidestilada	3.72 ml
PSA 10%	75 μ l
TEMED	5 μ l

PBS, pH 7.2

NaCl	160 g
KCl	4 g
NaH ₂ PO ₄	23 g
KH ₂ PO ₄	4 g
H ₂ O bidestilada	csp 2000 ml
Autoclavar y guardar a TA o a 4°C	

Persulfato de Amonio (PSA) 10% p/v

PSA (Sigma, USA) 0.15 g

H₂O bidestilada 1.5 ml

Guardar a 4°C hasta una semana.

Sodio Dodecyl Sulfato (SDS) 10% (p/v)

SDS 10 g

H₂O bidestilada csp 100 ml

Guardar a TA.

Tris-ClH 1M, pH 8.8

Trizma base 121.1 g

Agregar 700 ml de H₂O bidestilada, ajustar el pH con ClH 1 N. Llevar a 1000 ml con H₂O bidestilada. Guardar a TA.

Tris-ClH 1M, pH 6.8

Trizma base 121.1 g

Agregar 700ml H₂O bidestilada, ajustar el pH a 6.8 con ClH 1N. Llevar a 1000ml con H₂O bidestilada. Guardar a 4°C.

Sustrato Fosfatasa - Alcalina

NBT	8 μ l
BCIP	4 μ l
Buffer sustrato (Buffer 3)	1 ml

Sustrato Peroxidasa

Solución 1:

4-chloro-1-naphthol (Sigma)	30 mg
Metanol (BDH, Australia)	10 ml

Solución 2:

Peroxido de hidrógeno (3 %p/v)	30 μ l
TBS 1X	50 ml

Mezclar ambas soluciones antes de su uso.

- Inmunodifusión en Agar Gel

Agar 2%

Agar Noble (Difco)	2 g
H ₂ O bidestilada	1100 ml

Disolver y dejar solidificar en una bandeja. Cortar el agar solidificado en cubos de 2 cm de lado, y colocarlos en agua corriente durante 24 horas. Posteriormente se lavan 3 veces mas con H₂O bidestilada y se mantienen en ella a 4°C hasta su uso.

Buffer Glicina

Glicina	1 M
Dietilbarbiturato de Na	0.057 M
Azida sódica	1 %

Ajustar el pH a 7.8 con una solución 1 N de ClH.

El agar al 2 % se disuelve, se mezcla en partes iguales con este buffer y se guarda a 4°C.

- Mini-preparaciones de DNA

Acetato de Potasio 3M / 5M

Acetato de potasio 5M	300 ml
Acido acético glacial	57,5 ml
H ₂ O bidestilada	142,5 ml
Guardar a 4°C	

Acetato de Sodio, 5M

Acetato de potasio	147.21 g
H ₂ O bidestilada	300 ml

Bromuro de Etidio (20mg/ml)

Bromuro de etidio (Sigma)	2 g
Llevar a 100ml con ddH ₂ O. Guardar en oscuridad a TA.	

Buffer de Muestra, 10X (Gel de agarosa)

Azul de bromofenol (Sigma,USA)	0.025 %
Xylene cyanol FF (Sigma,USA)	0.025 g
Glicerol (Fisons England)	5 ml
Llevar a 10ml con TAE 10X. Guardar a -20°C.	

Etanol 70%

Etanol (BDH, Australia) 350 ml

H₂O bidestilada 150 ml

Mezclar y guardar a TA.

Fenol/Cloroformo

Mezclar igual cantidad de fenol y cloroformo. Guardar a 4°C.

<u>Gel de Agarosa</u>	0.6%	0.8%	1%
-----------------------	------	------	----

Agarosa grado ADN (BIO-RAD)	0.6 g	0.8 g	1 g
-----------------------------	-------	-------	-----

1X buffer TAE	100 ml	100 ml	100 ml
---------------	--------	--------	--------

Disolver la agarosa. Guardar a TA.

Solución 1

Glucosa 1M 5 ml (50 mM)

EDTA 0.5M 2 ml (10 mM)

Tris-ClH 1M,pH8 2.5 ml (25 mM)

H₂O bidestilada csp 100 ml

Guardar a 4°C

Solución 1 + Lisozima

Solución 1 2.6 ml

Lisozima 20 mg

Preparar antes de su uso

Solución 2

SDS 10 %	1 ml (1 %)
NaOH 3 M	0.66 ml (0.2 M)
H ₂ O bidestilada	8.34 ml
Preparar antes de su uso	

Tris Acetato (TAE) (10 X)

Trizma base	96.8 g
Acetato de Sodio	32.9 g
EDTA	7.44 g
H ₂ O bidestilada	1800 ml
Ajustar el pH a 8.2 con Acido acético g (aprox. 30ml). Llevar a 2000 ml con H ₂ O bidestilada.	
Guardar a TA.	

Tris Acetato 1X

Diluir 100 ml de buffer 10 X con 900ml de H₂O bidestilada.
Guardar a TA.

Tris - EDTA (10mM Tris-ClH, 1mM EDTA)

Tris 1 M - ClH (pH 8)	10 ml
0.5 M EDTA	2 ml
Llevar a 1000 ml con H ₂ O bidestilada.	
Guardar a TA.	

Tris - EDTA - ARNasa

TE, pH 8	3 ml
----------	------

ARNasa (10mg/ml)	12 µl
------------------	-------

Preparar antes de su uso.

- Secuenciación

Gel para Secuenciación

Urea	21 g
------	------

TTE 20 X	2.5 ml
----------	--------

Sn Long Ranger Gel (Bioproducts)	6 ml
----------------------------------	------

H ₂ O bidestilada	csp 50ml en un tubo de 50ml
------------------------------	-----------------------------

PSA	70 µl
-----	-------

Temed	65 µl
-------	-------

- Transformación, Expresión y Purificación de las proteínas recombinantes

Ampicilina (25mg/ml)

Ampicilina (Progen, Australia) 250 mg

H₂O bidestilada 10 ml

Filtrar en esterilidad con un filtro de 0.22 µm (Sartorius Germany) en una cabina de Clase II.

Alicuotarlo y guardarlo a -20°C.

Buffer de Elución, Glutation

Glutation reducido (Sigma,USA) 0.015 g

Tris-ClH (50mM),pH 8 10 ml

Preparar antes de usar. Disolver y guardar a 4°C.

Buffer Tris (TBS) (10X)

Trizma base 60.55 g

NaCl 87.66 g

Agregar 700ml de H₂O bidestilada, ajustar el pH a 7.5 con ClH concentrado. Llevar a 1000 ml con H₂O bidestilada.

Diluir 100ml de buffer 10X con 900ml de H₂O bidestilada para llevar a 1X TBS. Guardar a TA.

Buffer Tris - 0.1% Tween 20

TBS 1 X 200 ml

Tween 20 200 µl

Guardar a TA.

ADNase (2.5mg/ml)

ADNase (Sigma) 25 mg

H₂O bidestilada 10 ml

Alicuotar en 1ml. Guardar a -20°C.

Glicerol 50 %

Glicerol 50 ml

H₂O bidestilada 50 ml. Mezclar y guardar a 4°C.

Glucosa - 1 M

D-glucosa 50 g

Llevar a 100ml con ddH₂O. Filtrar en forma esteril y guardar a -20°C.

Glicerol 50 %

Glicerol 50 ml

H₂O bidestilada 50 ml

Filtrar en forma estéril. Guardar a -20°C.

Glutation Agarosa 50% (Perlas)

Prehumedecer las perlas durante 2 horas en PBS.

Perlas Glutation Agarosa (Sigma)	75 mg / 80 ml de cultivo 17 horas
----------------------------------	-----------------------------------

PBS	50 ml
-----	-------

Lavar las perlas 3X con PBS 1X, centrifugando suavemente de 3-5 min. Resuspender en un volumen de 0.5 ml y centrifugar para remover todo el PBS. Finalmente resuspender los 2 ml de perlas en 2 ml de PBS.

Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) (100mM)

IPTG (Boehringer, Germany)	238 g
----------------------------	-------

H ₂ O bidestilada	10 ml
------------------------------	-------

Alicuotar en 1 ml. Guardar a -20°C.

Medio de Crecimiento Luria (L-Broth) 1X

Bacto Triptona (Difco, USA)	10 g
-----------------------------	------

Extracto de levadura (Difco)	5 g
------------------------------	-----

Cloruro de sodio (BDH, Australia)	5 g
-----------------------------------	-----

H ₂ O bidestilada	800 ml
------------------------------	--------

Ajustar el pH a 7.4 con NaOH.

Llevar a 1000 ml con H₂O bidestilada y alicuotar. Autoclavar por 20 min a 121°C. Guardar a 4°C.

Medio de Crecimiento Luria / Ampicilina

Adicionar Ampicilina (25mg/ml) al medio de crecimiento Luria a una concentración final de 50 µg/ml (dilución 1/500).

Medio de Crecimiento Luria/Ampicilina/Glucosa para placas de Agar

Medio de crecimiento Luria	100 ml
----------------------------	--------

3% Agar noble	100 ml
---------------	--------

Ampicilina	0.5 ml
------------	--------

Glucosa	0.5 ml
---------	--------

Equilibrar el medio L-broth a 42°C, derretir el agar y equilibrar a 42°C. Agregar el medio Luria-broth en el agar y mezclar. Adicionar Ampicilina y Glucosa. Agregar aproximadamente 25ml por placa. Realizar en cabina Clase II a TA.

Medio de Crecimiento Luria / Agar 1.5 %

Medio Luria	100 ml
-------------	--------

Agar Noble	1.5 g
------------	-------

Agregar el medio Luria-broth en el agar y mezclar. Autoclavar por 20 min a 121°C. Guardar a 4°C.

Medio SOC

Triptona	20 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro de Sodio (250 mM)	10 ml
Cloruro de Potasio (2 M)	5 ml

Esterilizar por autoclavado por 15 min a 121°C. Enfriar a 60°C y agregar 20 ml de glucosa 1 M estéril. Guardar a 4°C.

ARNasa (10mg/ml)

ARNasa	100 mg
H ₂ O bidestilada	10 ml

Calentar a 100°C por 15 min. Enfriar despacio y alicuotar en fracciones de 1 ml.. Guardar a -20°C.

Triton - X100, 10%

Triton-X100	10 µl
H ₂ O bidestilada	90 ml

Mezclar y guardar a 4°C.