



UNSAM

UNIVERSIDAD
NACIONAL DE
SAN MARTÍN

ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"

Maestría en Microbiología Molecular

*Desarrollo y evaluación de tecnología para la detección de
proteínas no estructurales del Virus de la Fiebre Aftosa en
formulaciones vacunales.*

Autor: Bioq. Myrian V. Trotta

Director: Dr. Mariano Pérez Filgueira

Director de Beca: Med. Vet. Norberto Fondevila

Lugar de Trabajo: Instituto de Virología, Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

Año 2009

Abreviaturas

ABTS: 2,2 AZINO-Di(3-Ethyl-Benzotiazolinesulfonic) acid diamonium salt	OIE: Organización Internacional de Epizootias.
AcM: anticuerpo monoclonal	OPD: O-fenilendiamina
Acs: anticuerpos	ORF: marco de lectura abierto
ADN: ácido desoxiribonucleico	PBST: Buffer fosfato Tween 20
ADNc: ácido desoxiribonucleico cadena complementaria	pb: pares de bases
ARN: ácido ribonucleico	PCR: reacción en cadena de la polimerasa
BHK-21: línea celular de riñón de hámster	PM: peso molecular
DITC50/ml: dosis infectivas cultivo de tejido 50%/mililitro	PNE: proteína no estructural
DO: densidad óptica	Poli A: cola de poli A
dNTPs: desoxirribonucleótidos trifosfato	RT: retro-transcripción
dpv: días post-vacunación	RT-PCR: transcripción reversa asociada a la reacción en cadena de la polimerasa
ELISA: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (Ensayo de Sorbete Inmunitario de Liga Enzimática)	SDS: dodecil sulfato de sodio
EMA: European Medicines Agency	SNB: suero normal de bovino
FA: Fiebre Aftosa	SNC: suero normal de cobayo
HAT: hipoxantina-aminopterina-timidina	SNR: suero normal de ratón
H ₂ O ₂ : agua bidestilada	TAE: TRIS + Acido Acético Glacial + EDTA Sal Disódica
HT: hipoxantina-timidina	TE: TRIS + EDTA Sal Disódica
Ig: Inmunoglobulina	Taq ADN polimerasa: polimerasa de ADN dependiente de ADN aislada de <i>Thermus aquaticus</i>
IDGA: inmunodifusión en agar gel	TMB: 3, 3', 5, 5' tetramethylbenzidine dihydrochloride
INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria	UV: luz ultravioleta
LEF: líquido esófago faríngeo	VFA: virus de la Fiebre Aftosa
MEM-D: medio mínimo esencial-Dilbecco	VIAA: antígeno asociado a la infección viral
MOI: multiplicidad de infección	WB: Western blot
MPM: marcador de peso molecular	mg: miligramo
NSB 3A: Normas de Seguridad Biológica 3 Agricultura	mL: mililitro
	nm: nanómetros
	µg: microgramo
	µL: microlitro

Objetivos e Hipótesis

Objetivo General

-Desarrollo de métodos para la evaluación de vacunas respecto a presencia de antígenos no estructurales del VFA.

Objetivos Específicos

1. Evaluar la presencia de PNE en preparaciones vacunales a través de la inducción de anticuerpos específicos en el modelo bovino y en modelos animales alternativos de laboratorio.
2. Desarrollo de métodos *in vitro* para detección de antígeno no estructurales en vacunas o distintas etapas de producción.

Hipótesis de trabajo

1. El empleo de animales de laboratorio permitirá evaluar la presencia de PNEs en formulaciones vacunales que generarían anticuerpos tras múltiples vacunaciones.
2. Es posible la detección de proteínas no estructurales del Virus de la Fiebre Aftosa en antígenos vacunales empleando métodos *in vitro*.

I-Introducción

I-1-La Fiebre Aftosa

La fiebre aftosa (FA) es una enfermedad viral altamente contagiosa que afecta a todas las especies de pezuña hendida, salvajes y domésticas. Las especies domésticas principalmente afectadas son los bovinos, porcinos, ovinos y caprinos. La enfermedad 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. Se la ha descrito como la enfermedad viral animal más contagiosa ^(Aggarwal y cols., 2002)

La FA fue observada por primera vez en 1514 y descrita en 1546 en Venecia por Hieronymus Fracastorius de Verona, en su publicación "*De Contagione et Contagiosis Morbis et Eorum Curatione*". 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 ^(Fracastorius, 1546)

En la última parte del siglo XIX, en el camino de la comprensión de las enfermedades infecciosas, hay que mencionar la labor pionera de Pasteur y Koch y sus colegas. Amén de las referencias a Fracastorius que aparecen en la mayoría de los artículos sobre la historia de la enfermedad, considero que el punto de partida en nuestro conocimiento de la enfermedad y su agente causal pertenece a Loeffler y Frosch (1898), un poco más de un siglo atrás.

En Alemania así como en toda Europa, el tamaño del problema causado por esta enfermedad, era tan grande en ese momento que condujo a la oferta por el Ministerio de Agricultura prusiano en 1893 de un premio de 3000 Reichmarks para la persona que "identificara y, si es posible, aislara la *cuestión contagiosa* que causaba fiebre aftosa, y demostrara su eficacia a través de un experimento decisivo con animales". Diez candidatos trabajaron sin éxito sobre el problema por 2 años.

Esto dio lugar a una moción que presenta el Canciller Imperial de Reichstag para tener en cuenta la necesidad del establecimiento inmediato de las instituciones experimentales para la investigación exhaustiva de la enfermedad. Con una asignación de 55000 Reichmarks se organizó una comisión de investigación en la enfermedad. Loeffler, quien fue profesor en el Instituto de Higiene de la Universidad de Greisswald, empezó a trabajar sobre la enfermedad en 1897, y en colaboración con Frosch en Berlín, se describe en 1898 sus estudios históricos donde se estableció el agente causal como un virus. Esta fue la primera demostración de que una enfermedad animal puede ser causada por un virus ^(Loeffler y Frosch 1898)

Loeffler continuó su labor en Greisswald pero la naturaleza altamente contagiosa de la enfermedad, y como resultado de la presión de los agricultores de la zona se puso fin a los estudios hasta que se pudieron hacer en un lugar seguro. Esto llevó finalmente a pasar en 1909 a Insel Reims, una pequeña isla en el Mar Báltico, justo al norte de Greisswald. Similares precauciones se han tomado en otros países, sobre todo en los Estados Unidos, donde fue creado en 1954 una instalación especialmente para trabajar en FA en Plum Island, a una milla de la punta de North Fork de Long Island.

En el presente, la FA se caracteriza por ser la enfermedad animal para cuya prevención o combate se dispone de mayores recursos en el mundo. Su importancia deriva de las implicaciones socioeconómicas que su presencia origina, sobre todo en los mercados internacionales de animales, productos y subproductos de origen animal; en los perjuicios directos que ocasiona sobre la producción y productividad ganadera; y en los costos públicos y privados motivados por su prevención, control y erradicación.

1.2- Distribución geográfica mundial de la enfermedad

Se han reportado casos de FA en casi todo el mundo a excepción de Groenlandia, Islandia, Nueva Zelanda. Las pequeñas islas de Oceanía a fines del siglo XIX, fueron la primera región libre de la enfermedad y la misma nunca se volvió a contraer; esto ha sido en parte debido a las condiciones geográficas y en parte a las medidas político sanitarias adoptadas (como lo son el sacrificio, cuarentena, aislamiento, la seroterapia y los controles a las importaciones ganaderas).

El último brote registrado en Australia fue en el año 1870. Tanto América del Norte y Central así como las Islas del Caribe se encuentran libres de FA. En América del Norte los últimos brotes ocurridos en Estados Unidos, Canadá y México se registraron en los años 1929, 1952 y 1953, respectivamente ^(Samuel y Knowles, 2001).

Europa cesó la vacunación durante los años 1990-91 y fue declarada libre de FA desde el año 1997. Desde que cesó la vacunación ha tenido unos pocos brotes aislados en Bulgaria (1991, 1993 y 1996), Italia (1993), Grecia (1994, 1996 y 2000), Turquía (1995 y 1996), Albania (1996) y en la ex-República Yugoslava de Macedonia (1996) ^(Samuel y Knowles, 2001). También se describieron brotes en Georgia (1997) y Armenia (1996) ^(Kitching, 1999). Se detectaron brotes en el República de Irlanda (2001), Francia (2001) y Holanda (2001) ^(Sutmoller y cols., 2003). En Reino unido los últimos brotes fueron en 2001 (provocó el sacrificio de entre 6 y 10 millones de animales y tuvo un coste aproximado de

US\$16.000 millones) y más recientemente en agosto 2007 en la provincia de Surrey, recuperando su estado de país libre de FA, donde no se aplica vacunación, en febrero de 2008.

En África 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 África se observan los tipos SAT1, SAT2 y SAT3. El tipo SAT3 ocurre en un área restringida del sur de África, estando los otros dos distribuidos ampliamente, a excepción del norte del continente ^(Geering y cols., 1995). Un brote del serotipo O aislado en el año 2000 en la República de Sudáfrica se relacionó con otros aislamientos realizados previamente en Asia y con los aislamientos en Europa del año 2001 ^(Knowles y cols., 2001b).

En Asia central la enfermedad es endémica, siendo los serotipos A, O y Asia 1 los prevalentes. En Tajikistán desde el año 2004 en adelante se han reportado brotes todos los años causados por los serotipos anteriormente mencionados. El límite entre Pakistán, Irán y Afganistán, la región Punjan, es considerada una zona de muy alto riesgo debido a la alta densidad de la población animal y la baja cobertura vacunal (se estiman unos 23 millones de cabezas entre búfalos y bovinos).

En cuanto al este asiático, los serotipos O, A y Asia 1 también son endémicos principalmente en 7 de los 10 países integrantes de la zona, estos son Camboya, La República Democrática Popular de Laos, Malasia, Birmania, Filipinas, Tailandia y Vietnam. Es importante destacar que tanto el Estado de Brunei como Indonesia y Singapur son considerados países libres del virus de la Fiebre Aftosa (VFA) y que hay regiones de Malasia y Filipinas consideradas, también, libres de la enfermedad ^(FAO/EUFMD, 2006).

Durante los años 2005-2006 la FA reemergió en el sudeste asiático con alrededor de 800 brotes en Vietnam; la epizootia fue causada principalmente por el serotipo O, si bien, se reportaron brotes causados por el serotipo Asia 1, el cual afecto mucho más a la población bovina que a la porcina. Dicho serotipo, además se ha localizado al norte de Vietnam en la frontera con China y una provincia del sur de Camboya por lo cual se sospecha que los brotes mencionados anteriormente, tienen su origen en el movimiento no reglamentado de ganado bovino y búfalos procedentes de China y Camboya.

La República Democrática Popular de Laos sufrió varios brotes de FA a fines de 2006 debido al serotipo A, y se sospecha que ha sido debió al movimiento de animales procedentes de Tailandia ^(FAO/EUFMD, 2006).

Los datos de los programas de FA en el sudeste de Asia confirmaron que el 51,3% de los brotes entre 2005 y 2006 no se han podido tipificar, que el 19% fueron causados por el serotipo A, 28,8% por serotipo O y 1% por el Asia 1. Con respecto a las especies afectadas, los bovinos han sido los más frecuentemente afectados en focos de FA (en el 65,7% de estos brotes los bovinos son las principales especies afectadas); otros fueron los búfalos (20,3%), porcinos (12,1%) y los pequeños rumiantes (1,8%) ^(FAO/EUFMD, 2006).

La FA se registró por primera vez en América del Sur alrededor de 1870, en Buenos Aires, Argentina, en Uruguay, y en el sur de Brasil como consecuencia de la introducción de ganado de Europa durante los primeros días de la colonización. La producción ganadera para el comercio con los países vecinos se estableció en la región de La Plata, y el comercio de ganado y sub-productos se extendió desde Chile, el noreste y el centro oeste de los estados de Brasil, Perú, Bolivia y Paraguay lo que propagó la FA, llegando a Venezuela y Colombia en el 1950 y, finalmente, a Ecuador en 1961.

En la actualidad en América del Sur, la FA es endémica en pocos países. Muchos han logrado un muy buen control de la enfermedad o la han erradicado. Chile, Surinam, Guyana y Guayana Francesa, así como la Región Patagónica de la Argentina son libres de la enfermedad ^(OIE, 2007).

En el año 1996 Uruguay había sido declarado "libre sin vacunación" aunque tuvo rebrotes en los años 2000 y 2001. La OIE (Organización Internacional de Epizootías) lo declaró "libre con vacunación" el 22 de mayo de 2003 y mantiene dicho estatus actualmente ^(OIE, 2007).

Bolivia presenta zonas endémicas y la OIE le aprobó una zona "libre de FA en donde se practica la vacunación" a partir de enero de 2003. El 9 de octubre de 2003 se informó a la OIE que se habían cerrado todos los focos de aftosa y no se presentaron focos hasta el año 2007. Actualmente las zonas de Chiquitania y una zona situada en la parte occidental del departamento de Oruro son reconocidas libres con vacunación ^(OIE, 2007).

La misma categoría se le asignó a algunos estados en Brasil. A pesar de ello, hubo un brote aislado en mayo de 2004 y en septiembre-octubre de 2005 en el estado de Paraná; en el estado de Mato Grosso do Sul se registraron brotes por lo cual quedó suspendido el estatus de libre con vacunación en los estados de Paraná, Sao Paulo, Goias, Mato Grosso y el Distrito Federal de Brasil, Tocantins, Mina Gerais, Rio de Janeiro, Espiritu Santo, Bahia y Sergipe donde todos los animales fueron sacrificados ^(OIE, 2007).

En Paraguay, tras el aislamiento del virus de la FA a partir de muestras de bovinos colectadas en el departamento de Canindeyú, el estatus de "país libre de FA con vacunación" fue suspendido a partir del 4 de noviembre de 2002. Otro aislamiento fue también reportado a la OIE en el año 2003. Dicho país recuperó el estatus de libre con vacunación en el año 2004 ^(OIE, 2007).

Tanto Perú, Ecuador como Venezuela presentan la enfermedad de forma endémica. Colombia presenta una "zona libre sin vacunación" (región del noroeste del departamento de Chocó), una región "libre con vacunación" que comprende todos los departamentos de la costa atlántica y territorios de los departamentos de Antioquía y Caldas donde se encuentra casi el 40% de la ganadería y una zona endémica en el resto de su territorio donde se siguen produciendo brotes ^(OIE, 2007).

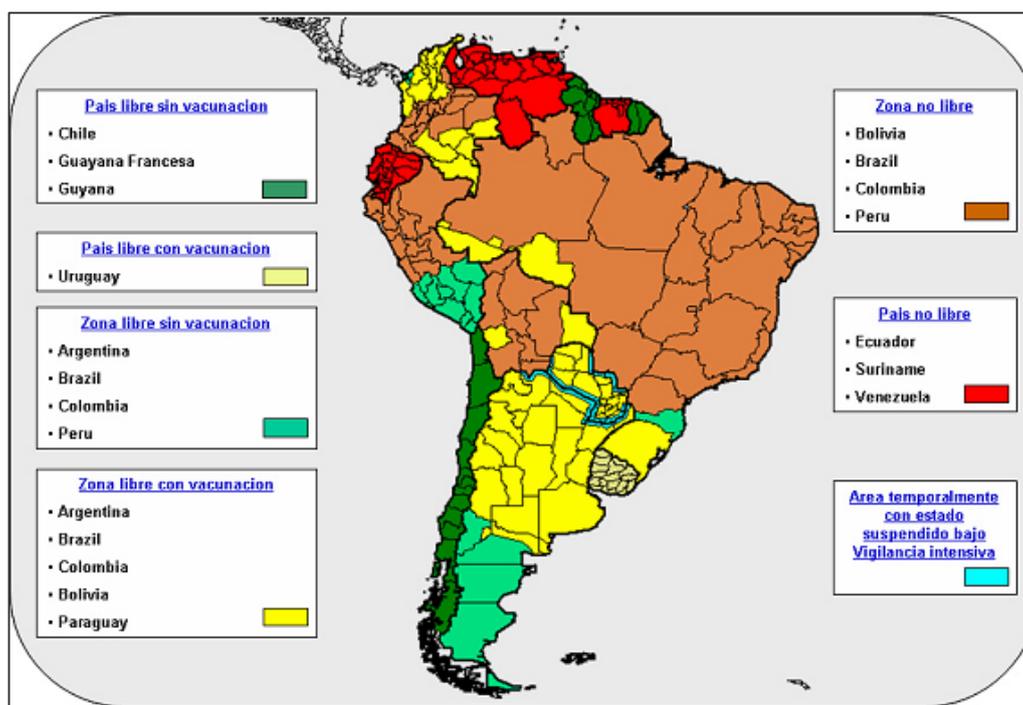


Fig.1: Situación de América del Sur con relación a la Fiebre Aftosa (según Datos de OIE 2007).

1.3- La situación en Argentina

En Argentina, la FA fue reconocida por primera vez en el año 1870, traída por inmigrantes ganaderos europeos que asentaban sus rodeos en Sudamérica ^(Samuel y Knowles, 2001), y desde entonces, ha sido una de las enfermedades que mayor impacto ha causado en la producción animal.

En 1870 en los Anales de la Sociedad Rural Argentina, se informa que los doctores Wilke y Douglas habían diagnosticado aftosa en San José de Flores y Lomas de Zamora. En 1878 y 1883, bovinos del partido de Arrecifes presentaban llagas de la enfermedad. En 1882 José Hernández, autor del Martín Fierro, escribe "Instrucción del estanciero", que editó Casavalle, y allí se indica que en 1865 y 1866 se observaron focos en el norte y noroeste de Buenos Aires que describe como enfermedad de las "llagas".

Ante la aparición de esta enfermedad, se sanciona la ley 3.959 (5 de octubre de 1900) de Policía Sanitaria de los Animales con el objeto de hacer efectiva en el país la defensa de los ganados contra la invasión de enfermedades contagiosas exóticas. Como regla general se dispone que, todo propietario o persona que de cualquier manera tenga a su cargo el cuidado o asistencia de animales atacados por enfermedades contagiosas o sospechosos de tenerlas, está obligado a declararlo inmediatamente a la autoridad local competente (art. 4º). Los artículos 12º a 23º se ocupan de la importación y exportación de animales. En caso de infracción, se aplicarían las penalidades establecidas por los artículos 29º a 33º.

Es en 1910 cuando el gobierno reconoce oficialmente la existencia de la enfermedad. El primer gran golpe internacional se produjo en 1929, cuando Estados Unidos cerró sus fronteras a las carnes de países con aftosa, luego de la epidemia que sufrieron y que atribuyeron a la carne ingresada por importación de países con ese mal.

Luego, en 1945, a través del decreto 24.954 se dispuso la creación del Instituto para la Elaboración de Vacunas contra la Fiebre Aftosa. Cinco años después, en 1950, se impone la obligación de vacunar contra dicha enfermedad a los ganados que entraban en el sur del límite norte de los entonces territorios de Neuquén y Río Negro. Las cosas mejoraban, en 1953 se dicta una ley que obliga a la faena del ganado con aftosa sólo en el Frigorífico Nacional, mataderos anexos o próximos que cuenten con inspección veterinaria oficial, estableciendo que sus productos debían destinarse al consumo interno o industrialización.

Después de crearse, en 1957, la Comisión Permanente de Erradicación de la Aftosa, nace (en 1960) la Comisión Asesora Nacional para la Erradicación de la Aftosa (CANEFA), que nucleaba a

organismos oficiales, instituciones y entidades particulares. Le siguió, en 1963, la creación de Servicios de Luchas Sanitarias (SELSA).

En el año 1971 la Argentina dejó de ser el principal exportador de carnes mundiales. La difusión de la aftosa tuvo su parte en ese cambio.

En 1972 el gobierno nacional dictó la ley 19.852 que dio origen al actual Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA). Es allí cuando comienzan a instrumentarse planes piloto de control y erradicación.

Oficialmente en Argentina se han organizado campañas de lucha contra la FA desde el año 1962. Respecto de los planes oficiales hay que analizar algunos puntos:

En el plan establecido entre 1960 y 1990 se realizaban tres vacunaciones obligatorias por año, con vacuna hidróxido de aluminio saponinada. Se vacunaba en todo el país (excepto la región Patagónica), desde los ríos Barrancas y Colorado hasta el norte. Se establecía en la zona de esos ríos una barrera de control sanitario para evitar el ingreso del VFA en la región patagónica (libre del VFA). Además de las medidas anteriores, en esta región se utilizaron otras estrategias sanitarias tradicionales como control del movimiento de hacienda, sacrificio de animales con sintomatología que hiciera suponer un brote de FA, etc.

Sin embargo, la inmunidad conferida por la vacuna no duraba lo suficiente como para proteger a los animales entre una vacunación y la siguiente (4 meses). De esta forma, se posibilitaba una permanencia anual cíclica de la enfermedad ^(Pizzi, 1998).

Cabe destacar que la instauración del control de vacuna y la aplicación del plan, junto a la inclusión de variantes antigénicas llevo a bajar el numero de brotes desde más de 4000 a alrededor de 1000, número que se mantuvo estacionalmente.

En el gráfico siguiente se representan el número de brotes a lo largo de los años desde mediados de la década del '60 hasta principio de los '90, nótese que en función de las variantes aisladas a campo, las cuales luego fueron incorporadas en las vacunas, y las medidas de control adoptadas sobre las formulaciones vacunales, se observa una consecuente disminución de los casos.

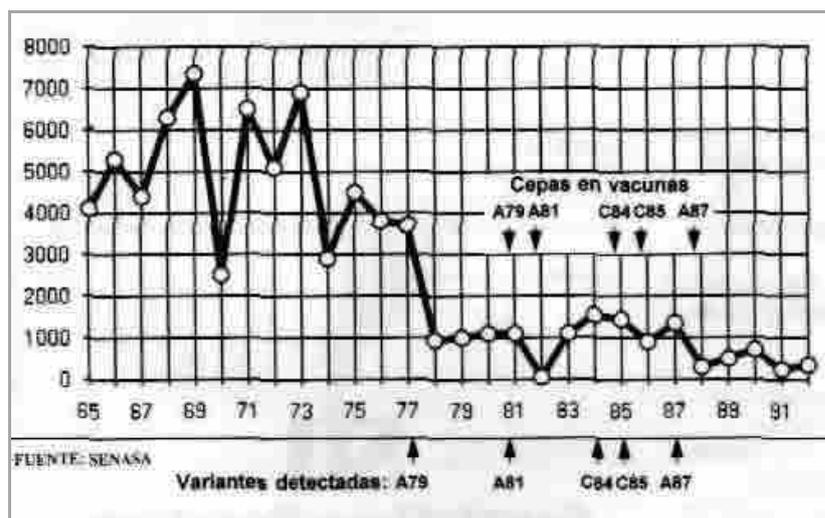


Fig.2: En el gráfico se observa el seguimiento epidemiológico de los brotes de FA desde los años 60 hasta el comienzo de los años 90; la consecuente incorporación de nuevas cepas en las formulaciones vacunales esta en relación directa a la disminución de los brotes'

A raíz del Programa Nacional de Lucha contra la Fiebre Aftosa, (Ley 24.305) en la década del '90 y en base a estudios epidemiológico realizados se determinó la distribución de la FA en nuestro territorio, y su relación con los sistemas de producción predominantes en cada zona. Así se dividió al país en cinco regiones que presentaban similitud de factores y condiciones en relación a la enfermedad, como ser carga animal, movimiento de animales, categoría implicada, etc. Se citan a continuación:

- *Zona 1-Patagonia Sur:* libre de FA y sin un riesgo de contagio inmediato.
- *Zona 2-Patagonia Norte:* indemne, limitando al norte con las áreas del país afectadas, representando un riesgo inmediato para la zona.
- *Zona 3-Precordillerana (Oeste):* constituida por aquellas provincias, salvo las patagónicas, que limitaban al oeste con la Cordillera de los Andes, y sumada a ellas Tucumán. En las mismas predominaba una explotación de subsistencia, con una baja carga animal, y con una presentación paraendémica de la FA (algunos focos aislados).
- *Zona 4-Mesopotamia:* compartía ciertas características con la anterior; y más hacia el sur, poseía características similares a la Región Central. En su conjunto se encontraba aislada de las demás regiones por medio del río Paraná.

- *Zona 5-Centro:* con distintos tipos productivos, y con una alta densidad de bovinos. Se trataba de la principal región productiva del país, y a su vez la más importante como mantenedora de la enfermedad. Por otro lado era ésta la zona que más interesaba sanear. Se la subdividió en dos zonas:

5.i. Zona endémica primaria: La actividad productiva predominante era la cría. Caracterizada por una menor densidad animal, pero fuente constante de nuevos animales susceptibles (terneros), que junto a los adultos, mantenían la enfermedad en forma permanente, y luego la transportaban a la zona endémica secundaria, cuando se los trasladaba para el engorde.

5.ii. Zona endémica secundaria: La actividad predominante era la invernada (engorde de novillos). Esta zona poseía una altísima densidad de bovinos que se veían afectados con la introducción de animales infectados traídos desde las zonas de cría; ocasionando de esta manera verdaderas epidemias regionales.

Se realizaron también, estudios sobre inmunidad y demás factores asociados a la vacunación (concentración antigénica, adyuvantes, edad/categoría vacunada, presencia de tipos y subtipos virales). Se dejó de utilizar la vacuna de hidróxido de aluminio saponinada y se comenzó a utilizar la vacuna con adyuvante de tipo oleoso: primero en las zonas endémicas primarias y luego en las endémicas secundarias, hasta abarcar todo el país (menos la Patagonia). La misma brindaba una inmunidad más duradera. Se vacunaban anualmente a los bovinos mayores de dos años, y dos veces al año a aquellos menores de dos. Utilizando vacunadores oficiales del SENASA ^(Pizzi, 1998).

Se descentralizaron los organismos oficiales. Se crearon organismos Regionales y otros Locales. Estos dependían de los centrales, como ser SENASA, pero poseían cierta independencia, posibilitando una rápida toma de decisión y acción. De esta forma el plan adquirió una mayor flexibilidad, aunque en un primer momento fue algo descoordinado e inoperante (se extendían mucho los períodos de vacunación). Corregidas estas particularidades, e incorporando gradualmente la vacuna de tipo oleoso, hasta abarcar el total de la población bovina (50.000.000 de cabezas), logró en cuatro años lo que no se había conseguido en más de cien ^(Pizzi, 1998).

Así, con el gran porcentaje de la población cubierta por el plan, y la estrategia de vacunación y revacunación en las diferentes categorías, se logró por fin controlar y luego erradicar la FA del territorio nacional. El éxito de estas campañas permitió que no se detectaran brotes de la enfermedad por primera vez (en más de 100 años) en abril de 1994. En el año 1998, la Argentina

fue reconocida por las autoridades internacionales (OIE) como “país libre con vacunación obligatoria” (en relación a FA); y en 2000 declarada por la OIE, “país libre de FA sin vacunación”.

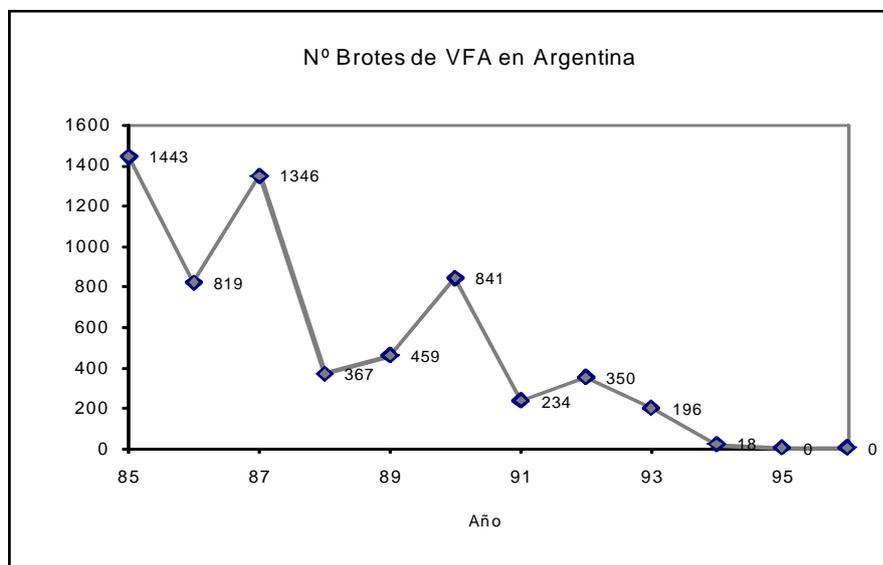


Fig.3: En el gráfico se representan el número de brotes de VFA en Argentina desde el año 1985 hasta mediados de la década del '90. Obsérvese que para el año 1996, ya con una estrategia de vacunación implementada y un amplio porcentaje de la población cubierto por la vacunación el número de brotes reportados es 0 (cero).

En mayo de 2000, si bien la OIE declaró a la Argentina libre de aftosa sin vacunación dos meses después se verificaron brotes de la enfermedad en el noroeste del territorio nacional, producidos por la entrada ilegal de animales portadores desde Paraguay, luego los brotes se extendieron por amplias áreas ganaderas. La enfermedad afectó en su mayoría a bovinos menores de 2 años (80%), aunque también se vieron afectados ovinos y porcinos ^(Mattion y cols., 2004). La epizootia fue controlada finalmente por restricciones en el movimiento de animales y nuevamente el país retomó la estrategia de vacunar sistemáticamente los bovinos en riesgo.

En julio de 2003 la Argentina volvió a ser declarado país libre de aftosa con vacunación, por la OIE, condición que se volvió a perder dos meses después con motivo de la reaparición de la enfermedad en el norte de Salta, en la vecindad con Bolivia. A partir del año 2005, nuevamente gracias a los controles y a las entidades intermedias que han rendido sus frutos, se declaró a la Argentina país libre de aftosa con vacunación. Pero en el mes de febrero de 2006 reaparecieron focos de infección de la enfermedad en el Establecimiento Agropecuario “San Juan” en la localidad de San Luis del Palmar, Departamento del mismo nombre, Provincia de Corrientes, motivando el

dictado de nuevas resoluciones en virtud a la gravedad de la enfermedad y haciendo necesaria la adopción de criterios epidemiológicos y medidas de vigilancia y control de máxima prevención, como así también, otros procedimientos extraordinarios, tanto en los aspectos técnicos ,como en los administrativos que le dan sustento.

El Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) por Resolución N°35/06 declara el Estado de Emergencia Sanitaria en todo el territorio Nacional a causa del Foco de Aftosa detectado en la Prov.de Corrientes. En este sentido, el SENASA, ejecutó de manera inmediata los procedimientos establecidos por las normas internacionales, para eliminar la fuente de infección del virus y evitar una posible difusión; procediéndose al sacrificio sanitario de todos los animales enfermos de FA (aproximadamente 5000 cabezas de ganado) y de aquellos que fueron considerados sus contactos. También se establecieron las siguientes medidas: cuarentena con inmovilización total de animales y productos de los establecimientos en el área perifocal y de vigilancia, interdicción del resto del departamento afectado y de siete departamentos colindantes, fortalecimiento de la barrera inmunitaria de todos los animales susceptibles a la fiebre aftosa.- instalación de puestos de control, desinfección y vigilancia activa con la inspección clínica de animales en un área de 13 km.

En este marco se dictaron otras medidas gubernamentales a saber: se crea el Sistema Nacional de Identificación Bovina: se caravanea a todos los bovinos nacidos en 2006. El procedimiento se lleva a cabo junto a la campaña de vacunación anti-aftosa. La Secretaría de Agricultura nacional creó el Sistema Nacional de Identificación de Ganado Bovino, en la órbita del SENASA, que establece la obligación de identificar a todos los terneros nacidos en 2006.

Hacia Junio del mismo año se crea el Comité del MERCOSUR libre de aftosa integrado por Uruguay, Argentina, Brasil, Paraguay Bolivia y Chile, donde para el fortalecimiento de áreas tales como diagnóstico de laboratorio y vigilancia, se estableció un presupuesto de 18 millones de dólares para los seis países por el período de 5 años.

Actualmente, a octubre de 2008, Argentina posee el estatus de país libre con vacunación, exceptuando la zona patagónica en donde no se vacuna y una zona de vigilancia intensiva (franja de 15 km en la frontera norte del país).

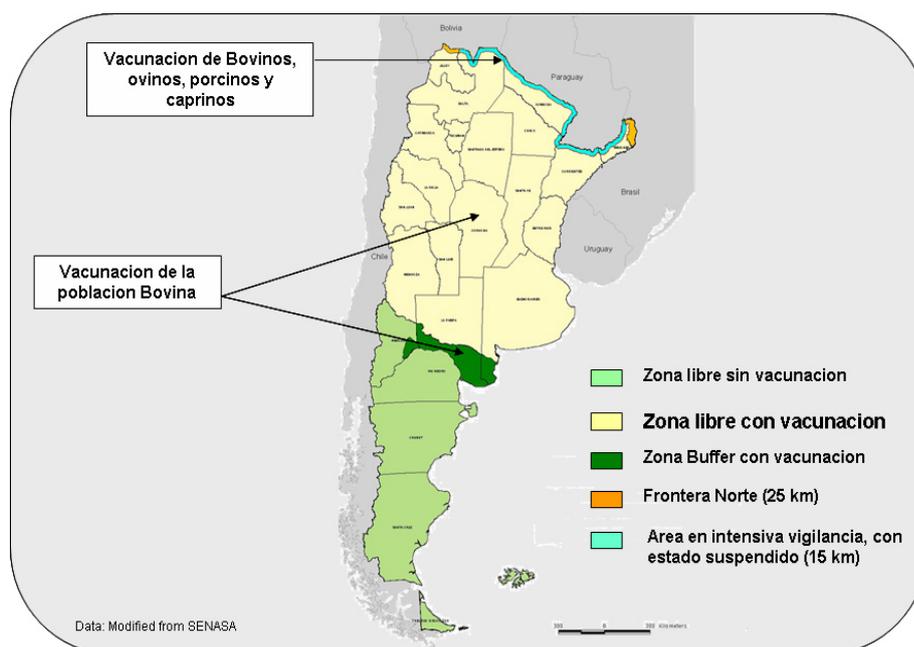


Fig.4: Estatus sanitario argentino respecto a la fiebre aftosa (Fuente: OIE, marzo 2007).

1.4- Importancia económica

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

La gravedad de la infección se debe principalmente a su alta contagiosidad, a la gran cantidad de huéspedes naturales y a la variabilidad del virus; lo que resulta dificultosa la implementación de programas de erradicación para el control de la enfermedad.

Por lo tanto, las pérdidas económicas se ven potenciadas por los costosos y complejos planes de control de la enfermedad. Finalmente, otro factor importante es la restricción impuesta por los países libres de la enfermedad a la importación de productos de origen animal provenientes de países en los cuales la enfermedad es endémica.

El 19 de febrero de 2001, el veterinario de un matadero de Brentwood (Essex) diagnosticó la enfermedad en un lote de cerdos. El virus fue identificado y tipificado como del subtipo O PanAsiático que representa una de las cepas más virulentas. Una granja en Heddon on the Wall en

Northumberland (Reino Unido) se ha considerado como la fuente más probable del brote primario. La causa principal de la dispersión de la enfermedad fueron los movimientos de animales infectados subclínicamente, ya que no se detectó el punto de entrada inicial del virus y cuando la enfermedad fue diagnosticada en el matadero ya se había esparcido el proceso por gran parte del país. Así también, se diseminó la enfermedad empezando por Francia y más tarde otras zonas de Europa.

Un total de, 8 millones de animales fueron sacrificados durante esta epizootia, la cual se extendió por un lapso de 8 meses ^(Sutmoller y cols., 2003).

Estos episodios ponen en evidencia la excepcional importancia de contar con planes estratégicos orientados al efectivo control de la enfermedad. Siendo la vigilancia epidemiológica uno de los principales elementos para lograr la rápida detección de la enfermedad, obviamente, se debe contar con herramientas que permitan realizar un diagnóstico etiológico rápido para detectar animales infectados ya sea en el estado agudo como en el de portador de la enfermedad.

Es importante remarcar que en Argentina poseemos una población bovina de 49 M de cabezas, repartidas en, aproximadamente, 270.000 predios ganaderos. La producción de carne, es de alrededor de 2.5M de toneladas anuales de los cuales el 80% se destina al consumo interno y el resto a exportación. La población lechera, en continuo crecimiento en los últimos años, está constituida por unas 20.000 explotaciones con 2.0 M de vacas en ordeño.

En marzo de 2001 el país reconoció oficialmente la pérdida del status sanitario de país libre de FA con vacunación. La crítica situación epidemiológica ocasionó pérdidas cuantiosas a la producción de carnes, lácteos y lanas y provocó el cierre de todos los mercados, las restricciones al ingreso de otros productos cárnicos y el cierre de frigoríficos, generando desfavorables consecuencias económicas y sociales. Además, cabe destacar que se puso en riesgo la situación sanitaria regional, particularmente con Chile, libre de la enfermedad sin vacunación desde 1984

Las pérdidas de producción, alcanzan cifras estimadas en más de mil millones de dólares anuales.

1.5- Huéspedes susceptibles

La FA afecta a una gran variedad de animales como se ha mencionado anteriormente, se destacan los de pezuña hendida, como bovinos, ovinos, porcinos y caprinos dada su importancia como productores de alimentos. También son susceptibles especies como bisontes, jabalíes, camellos, llamas, alpacas, vicuñas, guanacos, antílopes, ciervos, venados, búfalos, yacks, erizos,

armadillos, nutrias, elefantes, carpinchos, cuya importancia reside en el hecho de poder portar y transmitir el virus (Callis, 1979, House y Mebus, 1998)

En un brote de FA, tres de sus huéspedes susceptibles juegan un rol crucial. El ovino actúa como huésped de mantenimiento, el porcino como amplificador y el bovino como indicador, evidenciando los signos clínicos de la enfermedad (House y Mebus, 1998)

Las lesiones bucales en los ovinos suelen ser mucho menos frecuentes que las podales, de allí que en esta especie la enfermedad pase desapercibida muchas veces (McVicar y Suttmoller, 1976). El porcino juega un papel importante en la cadena epidemiológica de la FA particularmente por ser, después de infectado, un gran replicador de virus (Donaldson y Ferris, 1980, Donaldson y cols., 1987, Sellers y Parker, 1969). Por su parte el bovino, es la especie más importante en la diseminación y mantenimiento de la cadena epidemiológica de la transmisión.

1.6- EL Virus de la Fiebre Aftosa

1.6.1- La familia Picornaviridae

La FA es causada por un virus clasificado dentro de la familia Picornaviridae. Esta familia incluye varios virus patógenos para el hombre y los animales y consta de 9 géneros: enterovirus, rinovirus, cardiovirus, aftovirus, hepatovirus, parechovirus, erbovirus, kobuvirus y teschovirus (King y cols., 2000). La diferencia entre los géneros se establece por sus propiedades físico-químicas como la estabilidad al pH, densidad de flotación en cloruro de cesio y coeficiente de sedimentación (Racaniello, 2001)

Los picornavirus derivan su nombre de la composición de las palabras pico que quiere decir pequeño y RNA (del inglés RiboNucleic Acid, por su material genético, ácido ribonucleico). El virus de la FA es muy pequeño, tiene un diámetro menor de 30 nm y está compuesto por una molécula de ácido ribonucleico (ARN) de cadena simple de algo más de 8.000 bases, recubierta por una cápside proteica de forma icosaédrica (20 caras triangulares) que está compuesta por 60 copias de cada una de las 4 proteínas estructurales: 1A, 1B, 1C y 1D, basándonos en la nomenclatura definida por Rueckert y Wimmer (1984). Las proteínas estructurales también se conocen como VP4, VP2, VP3 y VP1, respectivamente (Racaniello, 2001).

Por su polaridad positiva y la presencia de poli(A) en el extremo terminal 3', el ARN del virus de la FA puede ser traducido sin transcripción previa de un mensaje complementario, por esta razón, el ARN desnudo es infeccioso si es transfectado al interior de la célula o cuando es

inoculado utilizando la vía intradermolingual o intramuscular en bovinos y otros animales (Cottral y Bachrach, 1968). Este virus posee una cápside proteica pero carece de cubierta lipídica y por lo tanto no es sensible a los solventes de lípidos como el fenol y el cloroformo. El virus de la FA es muy sensible a cambios de pH y se inactiva a pHs por debajo de 6,0 y por encima de 9,0 (van Vlijmen y cols., 1998). Los desinfectantes generalmente utilizados son el ácido cítrico al 0,2%, el ácido acético al 5%, el carbonato de sodio al 4% y el hidróxido de sodio al 2%. El virus es resistente a los iodóforos, al amonio cuaternario, al hipoclorito de sodio y al fenol, especialmente en presencia de materia orgánica. El virus puede sobrevivir en leche, suero y otros materiales orgánicos. También puede ser transportado largas distancias a través de objetos contaminados. El virus puede sobrevivir por largos períodos en la carne congelada, dentro de la médula ósea o linfonódulos (House y Mebus, 1998).

1.6.2-Organización del genoma

La Fig.5 muestra la estructura del genoma del VFA. Este posee más de 8.000 bases de longitud y está unido covalentemente en su región terminal 5' a un residuo de 23-24 aminoácidos, la proteína 3B (también conocida como VPg). El genoma viral es encapsidado durante la maduración en una estructura icosaédrica compuesta por 60 copias de 1A, 1B, 1C y 1D (Jackson y cols., 2003). El genoma contiene un único marco de lectura abierta, con 2 sitios alternativos de iniciación. La poliproteína codificada puede procesarse en más de una docena de polipéptidos maduros así como intermediarios parciales del clivaje (Grubman y cols., 1984, Robertson y cols., 1985, Rueckert, 1996). La mayoría de estos eventos proteolíticos que dan origen a productos maduros son mediados por tres proteasas virales, L^{pro}, 2A^{pro}, y 3C^{pro}. La naturaleza exacta de los mecanismos utilizados por 2A^{pro} y la ruptura de maduración de la proteína 1AB de la cápside en 1A y 1B se mantiene todavía sin dilucidar.

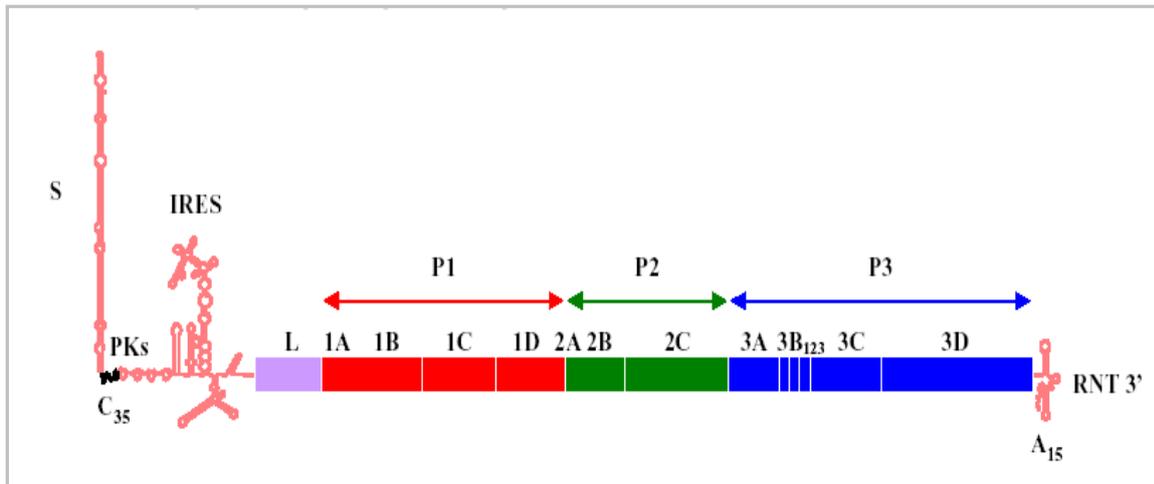


Fig.5: Organización del genoma del VFA. Diagrama que muestra el genoma del VFA: la región no traducida 5', la región que codifica para la síntesis de proteínas, la región no traducida 3' y el extremo de poli(A). L es la proteína líder, P1 corresponde a la porción que traduce a proteínas estructurales y P2 y P3 corresponden a la porción que traduce a PNEs.

1.6.2.1-Región no codificante 5'

1.6.2.1.1-Proteína "cap"

La familia Picornaviridae no presenta la estructura "cap" en el extremo 5', que es crítico para la traducción de ARN mensajero (ARNm) en eucariotas. Los genomas de los picornavirus asociados al virión están unidos covalentemente a un corto polipéptido viral, que es la proteína 3B. Esta proteína se encontró en el extremo de los genomas nacientes de polaridad positiva y negativa, sugiriendo un rol en la iniciación de la replicación de ARN King y cols. 1980, demostraron que el virus de la FA poseía más de una 3B que fueron secuenciadas por Forrs y Schaller ⁽¹⁹⁸²⁾ quienes descubrieron que 3 copias de 3B no idénticas estaban ubicadas en tándem en el genoma y coincidían con los péptidos de 3B que se incorporaban al genoma viral en radios equimoleculares. Estas 3 copias de 3B muestran una secuencia altamente conservada y todas poseen un residuo de tirosina en la posición 3, que se conoce involucrado en la unión fosfodiéster con el ARN. El virus de la FA es el único de los picornavirus que codifica copias redundantes de 3B, y no se han aislado virus con menos copias hasta hoy, sugiriendo que hay una presión selectiva fuerte manteniendo esta redundancia.

1.6.2.1.2-Fragmento S, poli(C), "pseudoknot" y estructuras "cre"

La región no traducida (RNT) 5' del genoma del virus de la FA posee más de 1.300 bases de longitud ^(Forss y cols., 1984). Esta región incluye el fragmento S (del inglés small, pequeño) y un fragmento de poli(C) de aproximadamente 100 bases conteniendo 90% de residuos de C y el resto de U y A ^(Brown y cols., 1974). Siguiendo a éstos hay un segmento de ARN de más de 700 bases de longitud que puede formar estructuras secundarias, las que incluyen repetidos pseudoknots en tándem, un elemento involucrado en la replicación del ARN llamado cre (del inglés cis acting element, elemento actuante en cis) y una estructura conocida como IRES (del inglés internal ribosome entry site, sitio interno de entrada del ribosoma). La estructura del fragmento S podría prevenir la digestión del genoma por exonucleasas, dando estabilidad al genoma, así como cumplir funciones en la replicación viral ^(Mason y cols., 2003a). Se sugiere que el fragmento poli(C) se asocia a la proteína PCBP (del inglés poly(C) cellular binding protein, proteína celular ligada al poli(C)) y serviría en la circularización del genoma junto con esta proteína para iniciar el cambio de traducción a replicación durante el ciclo de crecimiento viral ^(Mason y cols., 2003a). La función de los pseudoknots es desconocida ^(Mason y cols., 2003a). El cre se asocia con la replicación viral ^(Mason y cols., 2002). El IRES se involucra en el inicio del ciclo de replicación permitiendo que los ribosomas traduzcan activamente el ARN viral y podría jugar un rol fundamental en la patogénesis viral ^(Mason y cols., 2003a).

1.6.2.2-Región codificante

1.6.2.2.1 Síntesis de proteínas virales

El ARN viral contiene un solo marco de lectura abierta y el producto es traducido como una poliproteína de aproximadamente 240.000 Da que es dividida en proteínas intermediarias y finales por medio de proteasas virales (L^{pro} , $2A^{pro}$ y $3C^{pro}$) ^(Belsham, 1993, Forss y cols., 1984). Los productos primarios de degradación de la proteína son 4 polipéptidos que están perfectamente mapeados y localizados en el genoma viral e identificados en orden de 5' a 3' como L, P1, P2 y P3, con un peso molecular de 16.000 Da, 88.000 Da, 52.000 Da y 100.000 Da, respectivamente.

1.6.2.2.1.1-Proteasa Líder (L^{pro})

La proteína L^{pro} es codificada por el extremo 5' del marco de lectura abierto ^(Robertson y cols., 1985). Ésta posee dos codones de iniciación AUG ^(Sangar y cols., 1987) que codifican para dos variantes de la

proteína denominadas Lab y Lb, siendo ésta última la que cumple un rol más importante (Cao y cols., 1995). Esta proteína se autocliva del resto de la poliproteína en su extremo carboxi-terminal (Strebel y Beck, 1986) y se le atribuyen funciones de degradación del factor celular de iniciación de la traducción (eIF4G) (Devaney y cols., 1988, Medina y cols., 1993). Esta actividad lleva a un bloqueo en la traducción cap-dependiente de proteínas, de esta manera la síntesis proteica dentro de la célula se deriva sólo a proteínas virales que, por ser iniciada en el IRES, es independiente del factor eIF4G (Mason y cols., 2003a). L^{pro} es también un determinante importante de la virulencia, esencial para producir transmisión viral entre huéspedes. Sin ella el virus no puede superar la respuesta inicial del huésped, expresada por la producción de IFN tipo I (Mason y cols., 2003a).

1.6.2.2.1.2-Proteínas estructurales

La cápside del VFA está compuesta de 60 copias de las 4 proteínas estructurales: 1A, 1B, 1C y 1D. La estructura tridimensional de éstas es la que provee los sitios antigénicos que dan la respuesta a la vacunación o infección, y a su vez son las mediadoras de unión a receptores celulares y de entrada en la célula. El clivaje de las proteínas que conforman P1/2A es realizado por una proteasa codificada por el propio genoma viral localizada en P3, 3C^{pro}, excepto el clivaje entre 1A y 1B, el cual se ha sugerido que es endoproteolítico, y que ocurre tardíamente en la infección, una vez formada la cápside viral y durante el empaquetamiento del ARN (Mason y cols., 2003a).

1.6.2.2.1.3-Proteínas no estructurales

Las proteínas no estructurales (PNEs) derivan de las regiones P2 y P3 del genoma y participan en la replicación del ARN y en el plegamiento de las proteínas estructurales.

1.6.2.2.1.3.1-2A/B/C

La porción P2 es procesada en 3 polipéptidos maduros, 2A^{pro}, 2B y 2C (Rueckert y Wimmer, 1984). 2A^{pro} posee sólo 16 aminoácidos y se mantiene asociada a la porción P1 después del clivaje primario de la poliproteína (Vakharia y cols., 1987) y se cree que es una autoproteasa (Ryan y cols., 1991). 2A puede ser clivada del precursor P1/2A por medio de 3C^{pro} y 3CD^{pro} (Ryan y cols., 1989).

Las funciones de las proteínas codificadas por las regiones 2B y 2C aún no son bien conocidas. Tanto 2B como 2C han sido implicadas en el efecto citopático inducido por el virus. La proteína 2C y su precursor 2BC estarían formando parte de un complejo proteico de replicación

asociado 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 y esta unión sería mediada por el precursor 3AB. Este complejo proteico anclaría al ARN viral para proveer la organización espacial correcta necesaria para la replicación ^(Bienz y cols., 1990). La función de 2C parecería ser la de una helicasa, involucrada en la separación de las cadenas del ARN viral durante la replicación. Basado en estudios en polio y por la estructura muy conservada con 2C del VFA, se cree que 2C cumple funciones en la iniciación de la síntesis de la hebra de ARN negativa. 2C tiene actividad GTPasa y ATPasa ^(Mason y cols., 2003a).

1.6.2.2.1.3.2-3A/B

El VFA se diferencia de los otros Picornavirus por poseer una 3A más larga (153 aminoácidos en vez de 87 en poliovirus) y 3 copias de 3B, aunque se ha demostrado que no son necesarias las 3 para la replicación ^(Falk y cols., 1992).

Estudios realizados con dos diferentes cepas del VFA atenuadas para su uso como vacunas por pasaje serial en huevo embrionado de pollo revelaron cambios en el tamaño aparente de 3A en geles de poliacrilamida ^(Giraud y cols., 1987, Sagedahl y cols., 1987). Subsecuentemente se demostró que estos cambios eran resultado de una deleción de 19 o 20 codones en el tercio carboxi-terminal de la región codificante de 3A ^(Giraud y cols., 1990). 3A forma parte de intermediarios estables que incluyen a 3AB y 3ABB ^(Falk y cols., 1992, O'Donnell y cols., 2001). Se predice cierta actividad de 3A asociada a las membranas por estudios hechos en polio y por los perfiles hidropáticos de 3A. Así 3A y 3AB serían críticas en la replicación de ARN asociada a membranas celulares ^(Mason y cols., 2003a).

1.6.2.2.1.3.3-3C proteasa (3C_{pro})

3C^{pro} fue identificada como una proteasa ^(Klump y cols., 1984) y es responsable de la mayoría de los clivajes que se producen en la poliproteína viral y también es responsable del clivaje de algunas proteínas celulares para inhibir su transcripción. Como actividades no proteolíticas, participa en la formación de complejos de ribonucleoproteína y 3CD ligadas al ARN, y se cree que influye en la replicación y la traducción ^(Mason y cols., 2003a).

1.6.2.2.1.3.4-3D polimerasa (3Dpol)

3D^{pol} es la polimerasa de ARN codificada por el virus. Conocida como antígeno VIAA (del inglés viral infection associated antigen, antígeno asociado a la infección viral), posee una secuencia de nucleótidos y aminoácidos altamente conservada en todos los serotipos y subtipos del VFA. Poco se ha estudiado de esta proteína en particular para el VFA, pero por analogía con otros Picornavirus nos permite inducir sus funciones. No se sabe si cumple una función en el inicio de la replicación de la hebra de ARN negativa, pero sí se sabe que cataliza la elongación de las cadenas nacientes de ARN, y la replicación se da en complejos de replicación asociados a membranas compuestas por PNEs y ARN ^(Mason y cols., 2003a).

1.6.2.2.1.3.5-Región no codificante 3'

El extremo 3' del genoma de los Picornavirus contiene un tracto de poli(A) separado de la secuencia que codifica para 3D por un segmento corto de ARN que se pliega en una estructura específica ^(Pilipenko y cols., 1992). Se cree que el tracto de poli(A) cumple funciones de circularización del genoma que podrían intervenir en la replicación del ARN ^(Barton y cols., 2001, Herold y Andino, 2001). A su vez los residuos de poli(A) podrían abastecer el templado que permite la hibridación del iniciador 3B-pUpU que permite la síntesis de la copia de sentido negativo del ARN ^(Mason y cols., 2003a). En el caso en particular del VFA la RNT 3' podría transportar algunas secuencias actuantes en cis requeridas para la iniciación de la replicación.

1.7-Ciclo de infección

La infección viral se produce por la adsorción a la membrana plasmática de la célula huésped ^(Schneider-Schaulies, 2000). Se ha propuesto que la zona de interacción del virus con el receptor celular es la secuencia RGD (arginina-glicina-aspártico) en el "loop" G-H de la proteína VP1 que, altamente conservada en todos los serotipos, se encuentra expuesta en la superficie del virión ^(Grubman and Baxt, 2004). Ciertas moléculas de la familia de las integrinas utilizan el tripéptido RGD del virus como secuencia de reconocimiento para la posterior penetración del virus ^(Neff et al., 2000; Jackson et al., 2003).

El mecanismo de penetración viral es el de endocitosis mediada por receptor, durante la cual se produce la pérdida de la proteína VP4 y la liberación del genoma viral al citoplasma ^(Grubman and Baxt, 2004).

El ARN viral es traducido, mediante un mecanismo cap-independiente, por medio del reconocimiento del sitio IRES dando como resultado una poliproteína, para lo cual utiliza la maquinaria biosintética de la célula huésped. Esta poliproteína es clivada rápidamente por proteínas celulares o por procesos autocatalíticos hasta la formación de las proteínas funcionales (Grubman and Baxt, 2004)

El extremo 5' del ARN viral se encuentra unido covalentemente a la proteína VPg, y el extremo 3' codifica para un extremo de poli A. Así la ARN polimerasa ARN dependiente, reconoce diferencialmente entre el ARN viral del ARNm celular para la replicación (Grubman and Baxt, 2004).

La ARN polimerasa viral (3Dpol) sintetiza cadenas complementarias (de polaridad negativa) que sirven como templados para la síntesis de cadenas de polaridad positiva (Grubman and Baxt, 2004) que serán empaquetadas en la formación de nuevos viriones. La formación del virión maduro 146S, involucra al clivaje de VP0 generando VP2 y VP4. El reordenamiento de la cápside viral resultante de dicho clivaje constituye el paso final del proceso de maduración (Grubman and Baxt, 2004). El ciclo se completa con la lisis de la célula hospedadora que libera las partículas virales al medio externo.

Como se ha mencionado en el proceso de replicación del VFA las proteínas estructurales del virus, junto a las moléculas de ARN y la 3Dpol constituirán las nuevas partículas infectivas, pero a la vez se sintetizan una gran cantidad de PNEs del virus. Estas últimas poseen diferentes funciones durante la replicación viral, algunas ya conocidas y otras aun en estudio; además poseen una gran importancia en el diagnóstico de la infección con el VFA (Silberstein et al., 1997; Bergmann et al., 1993; Sorensen et al., 1998)

1.8-Variabilidad antigénica

Actualmente, el género aftovirus posee 7 serotipos: O, A, C, SAT1, SAT2, SAT3 y Asia1 que le dan una de sus principales características, la gran diversidad antigénica. La comparación de secuencias de nucleótidos de la proteína neutralizante VP1, entre los diferentes serotipos, permite la construcción de árboles filogenéticos para visualizar las relaciones entre diferentes aislamientos. Sin embargo, es difícil relacionar los datos de las secuencias y las propiedades antigénicas de los virus.

Algunas sustituciones aminoacídicas son antigénicamente conservadas, mientras que otras pueden tener un efecto significativo en su habilidad para unir anticuerpos (Acs) (Knowles y Samuel, 2003). Cada serotipo incluye numerosos subtipos y centenas de cepas diferentes comprobadas en

pruebas serológicas y que presentan cierto grado de protección cruzada, y así es como se estableció la epidemiología molecular de los diferentes serotipos (Domingo y cols., 2003; Knowles y Samuel, 2003). Esta diversidad y heterogeneidad antigénica tiene enorme importancia en el control de la enfermedad, exigiendo una vigilancia epidemiológica constante y la elaboración de vacunas con componentes inmunogénicos perfectamente identificados con las cepas de virus actuantes en el campo (Brown y cols., 2003).

Knowles y Samuel, compararon las secuencias de 1D para separar a los 7 diferentes serotipos en diferentes topotipos (a los que definen como líneas evolutivas que difieren genética y geográficamente), basándose en diferencias de hasta un 15% para los serotipos O, A, C y Asia1 y de un 20% para los serotipos SAT. Por su parte, los tipos A y O son los más distribuidos en el mundo y los únicos reportados en Sudamérica junto con el serotipo C. Los tipos SAT 1, 2, 3 se encuentran en el África al sur del Sahara y el tipo Asia 1 en el oriente medio y sur de Asia (Knowles y Samuel, 2003).

1.9-Patogenia de la Fiebre Aftosa

1.9.1-El estado agudo de infección

Si bien el VFA afecta a una amplia variedad de animales, la patogenia ha sido estudiada principalmente en bovinos y porcinos (Grubman y Baxt, 2004).

La infección en los bovinos susceptibles ocurre principalmente por vía aerógena, debido a la inhalación de partículas virales provenientes de animales infectados (Donaldson y cols., 1987). La infección también puede ocurrir por abrasiones en la piel o en la membrana de las mucosas; sin embargo, es muy poco eficiente y requiere al menos 10000 veces más virus (Donaldson y cols., 1987).

Ciertos trabajos sugieren al pulmón o al tracto faríngeo como los principales sitios de iniciación de la replicación (Brown y cols., 1992; Suttmoller y McVicar, 1976) con una rápida diseminación del virus por el epitelio oral y podal.

En bovinos experimentalmente infectados por vía aerógena, fue encontrado dentro de las primeras 24hs, virus en el epitelio bronqueolar así como en áreas del pulmón, luego de 72hs, el virus fue aislado de células epiteliales de la lengua, paladar blando, epitelio podal y tonsilas (Brown y cols., 1996).

Se debe tener en cuenta que el periodo de incubación y la susceptibilidad de los animales para contraer la enfermedad depende de varios factores como ser: dosis, cepa viral, especie animal, vía de infección y nivel de Acs neutralizantes (AcN) (Grubman y Baxt, 2004).

La aparición de vesículas en lengua y patas es precedida por el aumento de la temperatura. Posteriormente, el virus se disemina por vía sanguínea estableciendo sitios de replicación secundaria. El periodo de incubación puede variar entre 2 y 14 días, dependiendo de la dosis infectante y la vía de infección. (Grubman y Baxt, 2004).

Los porcinos son menos susceptibles que los bovinos a contraer la enfermedad por vía aerógena (Alexandersen y cols., 2002; Alexandersen y Donalson, 2002). En esta especie la vía digestiva es una de las puertas de entrada viral más comunes. Además los porcinos son capaces de excretar mas virus que bovinos y ovinos (Alexandersen y Donalson, 2002; Alexandersen y cols., 2001). En animales de corta edad, la infección puede ser letal generada por una miocarditis.

Es importante mencionar que el virus puede ser encontrado en sitios donde las lesiones clínicas aún no han sido observadas (Alexandersen y cols., 2001).

El ovino representa una peligrosa e inaparente fuente de diseminación del VFA ya que es muy difícil realizar el diagnóstico clínico de los animales infectados. Esta especie es altamente susceptible a la infección viral por aerosol o por contacto, y puede excretar altas dosis de virus (Kitching y Hughes, 2002).

El VFA puede infectar una gran variedad de especies silvestres, pero aun no ha sido definido el riesgo de propagación debido a la infección de estos animales (Sutmoller y cols., 2003; Thomson y cols., 2003).

1.10-Vías de transmisión

La forma más común de transmisión del virus es por contacto directo, es decir, por medio de una transferencia mecánica o por medio del depósito de aerosoles o bien gotas en el tracto respiratorio de los animales receptores. Tanto las gotas como los aerosoles que portan el VFA, originados de animales infectados pueden diseminarse y transmitir el virus a gran distancia. Así, la cantidad de virus excretada es mayor para los porcinos, con un máximo de $10^{8.6}$ dosis infecciosas DICT50/ml, 1000 a 3000 veces mayor que para los rumiantes.

La duración de la excreción es de alrededor de 4-5 días. Los ovinos inoculados excretan cantidades mayores de virus cuando las lesiones primarias son evidentes, mientras que el bovino

y porcino excretan el máximo de virus cuando las lesiones vesiculares están en el estado temprano agudo de generalización ^(Donaldson, 1986).

Cuando se realizan pruebas de potencia de vacunas, lo animales son infectados por la inyección del virus por la vía intradérmica/subdérmica, como una vía confiable para establecer la infección. Así, se eligen a las regiones epiteliales altamente susceptibles como la lengua del bovino, la banda coronaria del ovino o la almohadilla plantar en el pie de porcino. ^(Burrows. 1966, Burrows, 1968^a, Henderson, 1949,, Henderson 1952). Estas vías son sensibles y confiables para establecer la infección con un periodo de incubación, en general, muy corto. Estos son métodos experimentales que simulan una infección natural a través de la piel dañada al sobrepasar la barrera tegumentaria intacta. Si bien la dosis para establecer una infección puede ser del orden de 100 DICT50/ml, en condiciones experimentales esta se eleva a $10^4 - 10^5$ DICT50/ml para brindar resultados consistentes.

1.11-Período de incubación

Se entiende por periodo de incubación de una enfermedad de tipo infecciosa, como lo es la FA, al intervalo de tiempo entre la exposición a una dosis infecciosa y la primera aparición de los signos clínicos. El periodo de incubación en este caso, es altamente variable y depende de la cepa y la dosis del virus así como también de la vía de transmisión la especie animal y las condiciones de cría. Luego de la diseminación por vía aerógena de un establecimiento a otro, el período de incubación oscila entre 4 a 14 días ^(Sellers y Forman, 1973), para la transmisión por contacto indirecto rige el mismo período de incubación. Cuando la transmisión entre animales se da por contacto directo, el periodo de incubación comprende 2 a 14 días.

Según condiciones experimentales el período de incubación descrito mediante contacto directo continuo en la especie bovina fue de 3.5 días mientras que para la especie ovina de 2 días. ^(Alexandersen y cols., 2003^a).

Estas diferencias confirman la relación estrecha entre la dosis y la longitud de la incubación, por ejemplo, cuanto más grande es la dosis o la intensidad de contacto, más corto el periodo de incubación.

1.12-Sitios de infección

Se cree que las células epiteliales en la superficie dorsal del paladar blando, el techo de la faringe y parte de la tonsila juegan un rol especial en la infección primaria, a excepción de los

casos en que el virus penetra directamente en la piel o en las mucosas a través de cortes o abrasiones. La importancia de la faringe se demostró para el bovino mediante la infección por contacto directo e indirecto, instilación intranasal y por la vía aerógena (Alexandersen y cols., 2003^a). En cambio, para el ovino las tonsilas son las que juegan un importante rol en la primo infección. Lo cual se explica por el hecho de que en esta especie las tonsilas están situadas inmediatamente sobre el paladar blando, así hay un estrecho contacto entre las dos superficies anatómicas.

El VFA puede detectarse en la faringe 1 a 3 días antes de que se detecte la viremia. La viremia dura de 3 a 5 días siendo la vía mediante la cual el virus se disemina a los sitios secundarios (Alexandersen y cols., 2003^a). Los títulos de virus en sangre llegan hasta 10^{5-8} dosis letal en ratón lactante 50% (DLRL50/mL) por mL, pero se presenta gran variación en la concentración de virus en sangre, lo cual es individuo dependiente (Cottral y Bachrach, 1968).

Posteriormente a la inyección de este virus en la piel de la lengua o cuando la lesión toma lugar en la piel, el mismo replica en el sitio de inoculación y luego de hacer viremia y ser diseminado a los linfonódulos llega a los sitios secundarios como la piel y el epitelio de la lengua y la boca.

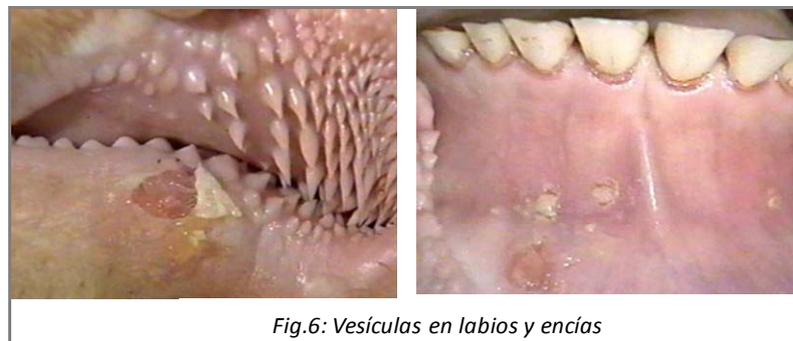




Fig.8A: Vesículas en pezones; 8B: Vesículas en rodete coronario



Fig.9: Extracción de líquido vesicular

1.13-Excreción viral

Todas las secreciones y excreciones se transforman en infecciosas durante el curso de la enfermedad e incluso pueden tener títulos altos de virus antes de que se manifiesten los signos clínicos. Así, la saliva, el fluido nasal, el fluido lagrimal, la leche, y el aire expirado pueden contener virus durante el periodo prodrómico. La orina y las heces también contienen virus pero en menor cantidad. Estudios experimentales han demostrado que a partir de la infección de bovinos mediante la exposición indirecta a cerdos infectado el virus fue hallado primariamente en saliva y en muestras de *probang* de la faringe ^(Alexandersen y cols., 2003^a).

El virus también se excreta en la leche y en el semen por un período corto antes que aparezcan los signos clínicos, en un comportamiento que imita el perfil de viremia ^(Burrows, 1968b). Grandes cantidades de virus son excretadas en el fluido vesicular y en el epitelio vesicular

descamado de todas las especies y en la saliva en el bovino. Una declinación aguda en la excreción viral ocurre alrededor del día 4-5 de la enfermedad clínica, cuando una respuesta significativa de Acs circulantes puede ser detectada.

Estudios en el ovino demostraron que el virus se detectó en el aire expirado 1 a 2 días antes de la aparición de signos clínicos ^(Sellers y Parker, 1969) y subsecuentemente en la sangre seguido del fluido nasal. Por contraste, en el bovino y en el porcino el pico de excreción viral por vía aerógena ocurre durante la fase de viremia luego de que se desarrollaron las lesiones tempranas generalizadas.

1.14-El estado portador en FA

Seguida de la fase aguda de la infección con el VFA, algunos animales pueden experimentar una infección de tipo persistente y asintomática. Asimismo, animales vacunados pueden ser susceptibles a una infección persistente luego de ser expuestos al virus. Estos animales son los denominados “*carriers*” ^(Salt y cols. 1993).

Van Bekkum y cols, demostraron que es posible recuperar VFA infeccioso a partir de líquido esófago faríngeo luego de 28 días post-infección de bovinos en estado convaleciente ^(van Bekkum y cols. 1959).

El VFA puede causar infección persistente en bovinos, ovinos y caprinos. Los porcinos, en cambio, no presentan estado portador, ya que luego de 3-4 semanas no es posible detectar el VFA.

La duración del estado portador está relacionada con la raza y especie. En bovinos puede ser aislado el VFA hasta 3 años post-infección ^(Hedger y cols., 1968), mientras que en ovinos se puede recuperar virus infeccioso hasta 9 meses post infección ^(Burrows y cols., 1968) y en búfalos africanos por un mínimo de 5 años ^(Condy y cols., 1985).

La transmisión de la enfermedad por medio de animales *carriers*, aún no ha sido completamente comprobada. Existe solo una evidencia de transmisión de búfalos africanos a bovinos durante el un brote de FA en Zimbabwe en 1980 y 1990. Del mismo modo, en condiciones controladas, la transmisión de la enfermedad a animales susceptibles a partir de animales portadores parecería ocurrir a través del contacto sexual ^(Bastos y cols., 1999).

La presencia de virus vivo en muestras de líquido esófago faríngeo de animales *carriers* no es indicador de transmisión. Sin embargo, la persistencia y replicación del virus en el animal

hospedador, puede inducir variaciones genéticas, siendo estas responsables de la generación de nuevas variantes (Gebauer y cols., 1988; Toja y cols., 1999).

1.15-Control y erradicación

La FA es una enfermedad que llega a impactar duramente un país o región debido no solo al alto contagio, rápida diseminación de la misma, la gran variación antigénica por parte del virus, la complejidad inmunológica, diversidad de hospedadores y la existencia de portadores asintomáticos (carriers) sino fundamentalmente a las pérdidas económicas ocasionadas.

Por lo tanto, el control y erradicación del VFA están basados en las condiciones epidemiológicas, la capacidad técnica y operativa y la disponibilidad de recursos humanos, económicos y financieros.

Podemos enumerar varios principios fundamentales en la estrategia a aplicarse en el control y erradicación de esta enfermedad:

- Controlar las fuentes de infección
- Reducir la susceptibilidad de los animales
- Evitar el contacto entre los animales susceptibles y las fuentes de infección

Si se pudiesen controlar las fuentes de infección o se pudiese aumentar la resistencia de los animales al VFA de manera de que ya no sean susceptibles a la infección o se lograra evitar el contacto entre las fuentes de infección y los animales susceptibles el virus desaparecería de la población en forma natural y progresiva por la eliminación de los reservorios de virus y de las fuentes de infección o por la inactivación del agente en estas últimas.

En países libres en donde no se practica la vacunación, ante el ingreso del VFA, se deben tomar medidas para proteger el resto de la población susceptible, para lo cual es imprescindible la detección precoz, el sacrificio inmediato de los animales infectados y sus contactos, la desinfección de equipos y la eliminación de materiales potencialmente infectados; la cuarentena de los establecimientos o áreas infectados y la imposición de restricciones a los movimientos de animales, productos y subproductos de origen animal y vehículos potenciales del agente (Inglaterra 2000-2001).

En oportunidades en que la efectividad de las medidas descritas no puedan llegar a ser garantizadas o existan condiciones que favorezcan la transmisión viral (Ej.: alta densidad animal) esas acciones son complementadas mediante la vacunación en anillo, destinada a reducir la susceptibilidad de los animales y así disminuir la difusión del virus.

Estas medidas se apoyan en la utilización de técnicas de diagnóstico especiales que permitan asegurar luego la ausencia de infección en las poblaciones vacunadas (ELISA para detección de Acs contra PNE-VFA).

Si los brotes se presentan en zonas libres con vacunación, las acciones a tomar son similares a las descritas anteriormente para los países libres sin vacunación, pero realizando en todos los casos la vacunación en anillo y la vigilancia epidemiológica controlando ausencia de circulación viral con técnicas de ELISA.

Como consecuencia de planes de control en países infectados donde se aplican planes efectivos que incluyen vacunación, el número de focos declina hasta hacerse esporádicos o desaparecer. En estas etapas, si bien la inmunidad de la población animal puede protegerlos de la enfermedad, el virus aún puede llegar a infectar los animales y, continuar circulando entre los animales de manera subclínica, por lo tanto en estos casos el relevamiento serológico a través de la técnica anteriormente mencionada es una herramienta fundamental en la vigilancia epidemiológica de la infección.

1.16-Diagnóstico de la infección con VFA

1.16.1-Diagnóstico clínico

La presencia de lesiones vesiculares tanto en el bovino, como en porcinos, ovinos y caprinos lleva a una sospecha de FA. Sin embargo mediante el diagnóstico clínico no se pueden diferenciar las diferentes enfermedades vesiculares (estomatitis vesicular, el exantema vesicular y la enfermedad vesicular del cerdo). En el caso de bovinos y ovinos afectados, también debe diferenciarse de: viruela mamaria, fiebre catarral maligna, lengua azul, peste bovina, rinotraqueitis bovina, vulvovaginitis infecciosa bovina, entre otras. Por este motivo y por la gravedad de la enfermedad aguda en cuestión, ante esta situación, no debe efectuarse el movimiento de los animales hasta haber realizado un diagnóstico definitivo en laboratorios oficiales.

1.16.2-Diagnóstico de laboratorio

1.16.2.1-Detección viral

Si se cuenta con una muestra sospechosa de enfermedad vesicular se intenta la detección viral. En los casos clínicos se puede analizar una variedad de muestras que incluye el epitelio, muestras faringoesofágicas y suero mediante aislamiento del virus, RT-PCR y ELISA.

Para realizar el aislamiento viral se utilizan cultivos celulares donde el virus produce efecto citopático. Los sistemas de cultivos celulares sensibles incluyen células primarias de tiroides bovino (de ternera), y células primarias de riñón de cerdo, ternero o cordero. También se pueden utilizar líneas celulares establecidas, como la BHK-21 (de riñón de hámster lactante) o la IB-RS-2, pero, por lo general, son menos sensibles que las células primarias para detectar niveles bajos de infectividad ^(Clarke, 1980). Los cultivos celulares deben examinarse para efecto citopático (ECP) durante 48 horas. Si no se detecta ECP las células se deben congelar y descongelar, y utilizar para inocular cultivos frescos, que se examinan para ECP durante otras 48 horas. La alternativa a los cultivos celulares son los ratones lactantes, que deben tener 2-7 días de edad y proceder de cepas de razas seleccionadas.

El mejor procedimiento inmunológico para la detección del antígeno vírico de la FA y para la identificación de los serotipos víricos es el ELISA ^(Roeder P.L, 1987). Por lo general, la técnica ELISA es preferible a la prueba de fijación de complemento (FC) porque es más sensible y no se ve afectada por factores pro- y anti-complementarios.

Actualmente esta es la técnica empleada en la confirmación del diagnóstico clínico y en la identificación del serotipo viral.

Para amplificar los fragmentos del genoma del virus de la FA, se utiliza la reacción en cadena de la polimerasa precedida de transcripción inversa (RT-PCR). Esta técnica se emplea para la detección y tipificación del VFA.

Tiene una sensibilidad comparable a la del aislamiento del virus y los procedimientos automatizados mejoran el rendimiento de la muestra ^(Reid. S., 2001). Si bien, el RT-PCR para VFA cuenta con buenos porcentajes de sensibilidad y especificidad, la visualización del producto amplificado en gel de agarosa le quita objetividad a los resultados ya que depende, en muchos, casos del operador. Recientemente, el laboratorio mundial de referencia para FA, Laboratory Pirbright WRL, ha desarrollado un método de detección cuantitativa de RT-PCR en tiempo real, el cual requiere instalaciones, equipamiento y personal especializado. ^(Alexandersen et al., 2003).

Para investigar la presencia del ARN del virus de la FA en muestras de tejidos se han desarrollado técnicas de hibridación *in situ* ^(WOODBURY E.L., 1995). Estas técnicas solo se utilizan en laboratorios especializados, aunque se están elaborando sistemas simplificados procedimientos para uso potencial en trabajo de campo.

1.16.2.2-Detección de anticuerpos contra proteínas estructurales del VFA

La detección y cuantificación de Acs específicos para el VFA se puede realizar por ELISA fase líquida y seroneutralización.

El ELISA fase líquida presenta una alta sensibilidad y especificidad ^(Hamblin y cols., 1986a, b; Robiolo y cols.1995) y puede detectar Acs contra proteínas estructurales del VFA en animales (bovinos, ovinos y porcinos) infectados experimentalmente a partir de los 5-8 días post infección.

La seroneutralización es el método recomendado por la OIE como técnica “Gold Standard” para la detección de Acs neutralizantes del VFA y es utilizada para la confirmación de los datos obtenidos por ELISA fase líquida ^(Alexandersen y cols., 2003).

1.16.2.3-Detección de anticuerpos contra PNEs del VFA

La detección de Acs por seroneutralización o ELISA de fase líquida no permite diferenciar si estos provienen de poblaciones de animales vacunados o infectados. En este aspecto la fiebre aftosa ha sido pionera en utilizar técnicas serológicas utilizando antígenos marcadores o diferenciales (DIVA). La importancia de estas técnicas se ha ido incrementando como herramienta epidemiológica para la vigilancia de la infección en zonas donde la vacunación es una de las principales medidas de lucha contra la enfermedad; ya sea durante la erradicación de la misma, la contención de un foco, o incluso en el mantenimiento de poblaciones libres de la enfermedad con planes de vacunación sistemáticos a toda la población bovina (como ocurre en la República Argentina). En estos casos se vuelve imprescindible asegurar la ausencia (“no circulación”) del agente en la población bovina vacunada. Esto se debe a que la inmunidad conferida por la vacunación de los mismos, puede ocasionar que los animales se infecten con el VFA, sin manifestarlo clínicamente.

Los métodos específicos para la detección de Acs producidos por la infección con el VFA son las técnicas de detección de Acs contra PNEs del VFA. Las mismas son expresadas únicamente durante la replicación del VFA dentro del hospedador. La excepción es la polimerasa 3D, que suele

estar asociada a las cápsides maduras.; en este punto cabe destacar que el término “antígeno asociado a la infección viral” (VIAA) para el VFA fue referido a un complejo de proteínas no-estructurales identificado por Cowan y Graves, cuyo principal componente es la ARN polimerasa viral o proteína 3D.

La primera técnica descrita para la detección de Acs anti-VIAA como indicio de infección previa con el VFA fue la prueba de inmunodifusión en gel de agar (IDGA). Debido a la baja sensibilidad de este test, Alonso y colaboradores, desarrollaron un ensayo inmunoenzimático de ELISA en fase líquida (ELISA-VIAA) para identificar y cuantificar los Acs contra el VIAA del VFA. Sin embargo, la mayor sensibilidad alcanzada mediante la aplicación de este tipo de ensayo, en comparación con el IDGA-VIAA, generó un aumento en el número de resultados VIAA-positivos en bovinos vacunados y reinmunizados con vacunas que contenían altas concentraciones de antígenos no purificados del VFA.

Para superar las limitaciones mencionadas, se reemplazó el VIAA por un antígeno recombinante del VFA, la polimerasa 3D, con el propósito de eliminar la presencia potencial de cualquier antígeno no específico en las preparaciones del VIAA, como pueden ser proteínas derivadas de células BHK o componentes de la cápside del VFA, y que pueden ser reconocidos en la prueba de IDGA-VIAA o ELISA por el suero de animales inoculados con vacunas producidas en BHK, llevando a resultados falso-positivos.

En un estudio realizado por Bergman y cols se analizaron muestras de bovinos sistemáticamente vacunados provenientes de regiones libres de FA y se observó que al realizar tanto la prueba IDGA-VIAA como IDGA-3D algunos de los resultados falso positivos por IDGA-VIAA en sueros de animales post-vacunados fueron eliminados por IDGA-3D.

Sin embargo, en la mayoría de los casos hubo reactividad contra ambos antígenos, lo cual se explica debido a la existencia de Acs anti 3D inducidos contra la ARN polimerasa.

El estudio realizado por Newman y cols. fue concluyente: por microscopía electrónica se vio que la proteína 3D es un componente de por lo menos 20-30% de las partículas virales y, por lo tanto, la falta de reactividad contra 3D en muchos de los animales vacunados puede deberse a una concentración insuficiente del polipéptido 3D en las suspensiones virales.

En la actualidad el principio de detección de Acs contra PNE-VFA se ha transferido a la metodología de ELISA en diferentes formatos, detectando Acs contra otros tipos de PNEs las cuales no están presentes en las formulaciones vacunales oficialmente aprobadas ^{(Silberstein et al., 1997;}

^{Sorensen et al., 1998; Mackay et al., 1998; Bergmann et al., 2000)}

Se han desarrollado a partir de la década de los noventa diferentes métodos de ELISA con alta sensibilidad y especificidad para la detección de Acs contra diferentes PNEs-VFA como marcadores específicos de infección. Sin embargo luego de varios estudios realizados, se observó que las PNEs-VFA 3AB y 3ABC (descriptas como las más inmunogénicas) son las que poseen mejores propiedades como marcadoras de infección y diferenciación de animales infectados y vacunados (Silberstein et al., 1997; Mackay et al., 1998)

Hoy en día la técnica de tamiz propuesta como referencia por OIE para la detección de Acs contra PNEs-VFA, es el I-ELISA 3ABC, de Panaftosa, cuyos resultados positivos son posteriormente confirmados por el EITB (Inmunoblot) desarrollado por la misma institución (Bergmann et al., 2000; Malirat et al., 1998, OIE, 2004)

Su uso está ampliamente difundido por toda Sudamérica donde es utilizada oficialmente como herramienta para la vigilancia epidemiológica tanto en planes de erradicación, como para garantizar la no circulación viral en regiones libres de FA con poblaciones bovinas vacunadas sistemáticamente (como es el caso de la República Argentina, donde la mayor región productiva del país está reconocido en la actualidad como región libre del VFA con vacunación obligatoria).

Las regiones libres del VFA sin vacunación, realizan la vigilancia epidemiológica de la población animal, utilizando ELISA en fase líquida (para detección de Acs contra proteínas de cápside de VFA). Sin embargo, luego de los últimos episodios de FA ocurridos en la Unión Europea (UE) (2000 y 2001), donde se utilizó la vacunación de emergencia para contener el avance de la enfermedad en lugar del sacrificio masivo de animales (políticas de “vaccine to live”) surgió luego la necesidad de testear a la población vacunada para garantizar la no circulación del VFA en las mismas. Para ello se utilizaron técnicas de detección de Acs contra PNEs-VFA. A pesar de ser el I-ELISA 3ABC / EITB de Panaftosa la técnica de referencia según la OIE, las autoridades sanitarias de la UE se inclinaron por el uso de técnicas desarrolladas en aquella región (Paton et al., 2006). En esa situación propusieron la combinación de al menos dos técnicas: una primera con alta sensibilidad y la confirmación de casos positivos con una segunda, más específica.

En la siguiente tabla se citan distintos métodos de ELISA para la detección de PNEs-VFA utilizados en la actualidad muchos de los cuales están en vías de validación.

Test	Proteína	Sistema de expresión	Institución	Autores
I-ELISA 3ABC Aftosa bovino	3ABC	<i>E. coli</i>	Panaftosa, Br.	Marilat y Bergmann, 1998.
3ABC Trappig ELISA	3ABC	<i>E. coli</i>	IZSELE, Ita.	De Diego y Brocchi, 1997.
Ceditest FMDV-NS	3ABC	Baculovirus	Cedi, Hol.	Sorensen, 2005.
Svanovir FMDV 3ABC	3ABC	<i>E. coli</i>	Svanova, Sue.	Person, 2004.
Chekit FMDV 3ABC	3ABC	<i>E. coli</i>	Bommeli, Sui.	Schalcha, 2002; Bruderer, 2004.
UBI FMDV-NS ELISA	3B	Peptido sintético	UnitedB, US.	Shen, 1999.
3ABC ICT-MILSTEIN	3ABC	<i>E. coli</i>	ICT-MILSTEIN, Arg.	Silverstein,
ELISA 3AB1	3AB1	<i>E. coli</i>	INTA, Arg.	1997; Nanni 2005.

Por su parte, en nuestro país se han desarrollado dos técnicas para la detección de Acs contra PNEs-VFA: el ELISA 3AB1, del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) y el ELISA 3ABC, del ICT-MILSTEIN ambas técnicas en vías de ser validadas en la actualidad.

1.17-Profilaxis

La eficacia de una vacuna es la capacidad de lograr los objetivos para los que fue desarrollada bajo condiciones ideales. El objetivo primario de la vacuna es reducir la susceptibilidad del animal a la infección, protegiéndolo contra los síntomas clínicos, y reduciendo la cantidad de virus que excrete en el caso de que el animal se infecte.

La cantidad y el tipo de Acs producidos por el individuo como respuesta a la vacunación determinarán el grado de protección, dependiendo este, de la cepa viral, la masa antigénica y la formulación usada en la elaboración del inmunógeno.

La calidad de la vacuna anti-aftosa es imprescindible para lograr una campaña de control anti-aftosa efectiva, pero esto no es suficiente ya que la eficacia de una campaña de vacunación debe incluir una correcta cobertura vacunal, frecuencia de vacunación, duración de períodos vacunales, intervalo entre vacunaciones, provisión, distribución y mantenimiento de los inmunógenos y aplicación. Asimismo, la correspondencia entre la cepa vacunal y la presente en el campo será determinante de la efectividad. La planificación, implementación y control de una campaña efectiva de vacunación implica necesariamente la participación de diferentes sectores y niveles relacionados con la industria pecuaria.

En cuanto a la lucha contra la FA en nuestro país, la vacunación de la especie bovina es, sin dudas, la más importante de todas las medidas profilácticas existentes. Es importante destacar que previniendo la enfermedad en la especie bovina, se previene la misma en todas las demás especies presentes en la región, posibilitando su erradicación.

Existen diversos parámetros que modulan la respuesta inmune de los animales vacunados y que no pueden ser pasados por alto al momento de desarrollar un programa de vacunación eficiente. Éstos son:

- Concentración antigénica de la dosis vacunal: la misma guarda una relación directamente proporcional con la producción de Acs, y en menor medida, con la duración de la respuesta inmune.
- El grado de pureza de la formulación vacunal: es menester asegurar la ausencia de PNE-VFA en la vacuna. Hoy en día se efectúan controles estrictos al respecto, que se detallarán más adelante en este trabajo, para evitar la generación de Acs contra PNEs-VFA en animales vacunados que interfieran luego con el diagnóstico específico de infección con el VFA.
- Tipo de Adyuvante: este aspecto está directamente relacionado con la duración de la respuesta inmune, siendo el mismo mucho mayor para el caso de los adyuvantes oleosos, mientras que los adyuvantes a base de hidróxido de Aluminio y saponina poseen una duración de aproximadamente 3-4 meses.

- Variantes virales: las vacunas contra la FA comúnmente contienen más de una cepa del virus, lo que refleja la situación epidemiológica en el país región. En América del Sur, por ejemplo, es trivalente y contiene los serotipos O, A y C.
- Edad de los animales vacunados: Los primeros tres meses de vida, los animales están protegidos por los Acs. calostrales aportados por sus madres. Luego de este tiempo, y hasta los dos años de vida, los animales no generan una buena respuesta inmunitaria post vacunal. Por este motivo, se deben revacunar los mismos cada seis meses, empleando vacunas de excelente calidad (adyuvante oleoso, y alta concentración antigénica). Los animales mayores de dos años deben ser vacunados una vez al año con vacuna de tipo oleosa.

Resumiendo, podemos decir que el éxito de un plan de vacunación depende no solo del porcentaje de la población cubierta y de las estrategias de vacunación y revacunación a las distintas categorías animales sino que también de la calidad de una formulación vacunal.

1.18-Producción de la vacuna del VFA y su control

1.18.1-Producción

La vacuna actual contra la FA es de tipo inactivado y se formula con adyuvante para favorecer la respuesta inmune. Una serie de países han establecido bancos de vacunas que contienen el antígeno concentrado y almacenado en la fase gaseosa de nitrógeno líquido. El antígeno almacenado en estas condiciones es estable durante un período más largo de tiempo que la vacuna formulada.

Los Bancos de antígenos contienen semillas de varios serotipos del virus y proporcionan, de esta manera, a los países miembros una fuente casi inmediata de la vacuna.

La producción de antígenos y vacunas contra la FA deben llevarse a cabo en condiciones que cumplan plenamente con las normas reconocidas internacionalmente de GMP (dentro de la UE, la Directiva 91/412/CEE), siempre en el marco de un sistema de aseguramiento de la calidad, y un nivel de biocontención provisto con aire filtrado HEPA en condiciones de presión positiva al ambiente en un nivel de seguridad biológica NSB3 que impide cualquier posibilidad de que haya un escape de virus de la planta de manufactura.

En esencia, la línea del proceso consiste en una serie tanques de acero inoxidable sellados y unidos entre sí por tuberías de acero y elementos auxiliares, tales como filtros en línea y equipos de concentración y de depuración.

Brevemente, el proceso de producción consiste en cultivar una suspensión de células BHK-21 en un medio nutritivo, hasta que alcancen un buen título en una escala de varios miles de litros para luego decantar las células resuspendiéndolas en medio fresco. Las células son infectadas con el virus semilla de trabajo y se mantienen durante 24 horas aproximadamente, dependiendo de las propiedades de crecimiento de la cepa particular del virus en la línea celular. Las cepas del VFA varían considerablemente en su capacidad para crecer en las monocapas y suspensiones de células y el desarrollo de cepas vacunales, por lo tanto, es prácticamente un arte, teniendo en cuenta la necesidad de un rápido crecimiento, la buena inmunogenicidad y alto rendimiento

Tan pronto como la mayoría de las células están muertas, la mayor parte del virus se clarifica, es decir, que todo contaminante de mayor peso molecular que el 146S es eliminado del producto soluto antes del proceso de inactivación. Dicho proceso se realiza mediante un primer agregado de BEI (etilenimina binaria), sin dejar de agitar el contenido del tanque para luego traspararlo a un segundo tanque estéril donde se realiza la segunda adición de BEI. En este punto se retiran muestras para la titulación en una línea de células sensibles a fin de establecer la tasa de inactivación y determinar por extrapolación el último título al final del período de inactivación (este debe ser inferior a una partícula infecciosa por 10 000 L).

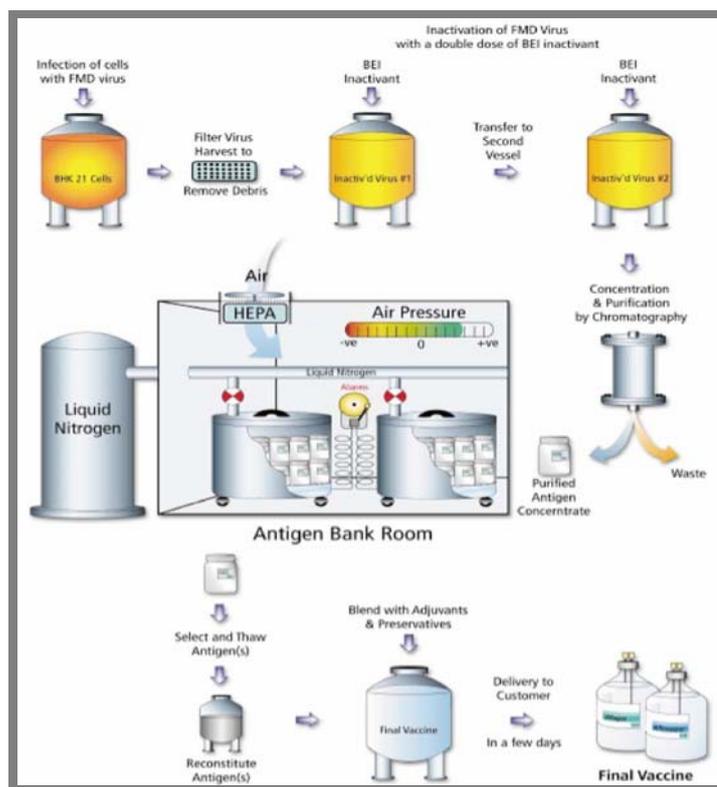


Fig.10: Esquema de producción de antígeno concentrado de FA y vacunas. Doel, 2003.

El antígeno está sujeto a la ultrafiltración y a la cromatografía para poder obtenerlo altamente purificado y altamente concentrado. Así los antígenos inactivados, se almacena en nitrógeno líquido hasta su utilización. Este material es especialmente adecuado para las necesidades de los bancos de antígenos, así como para facilitar la formulación de la vacuna cuando se requiere más de una cepa.

Es importante en el marco del presente trabajo, resaltar algunos puntos del proceso de elaboración de la vacuna de VFA. Los procesos de concentración, ultrafiltración, diafiltración como también la clarificación viral emplean como operación unitaria la filtración tangencial. Las operaciones de filtración tangencial son procesos físicos de separación transmembrana que permiten separar y/o concentrar los constituyentes de una mezcla líquida en función de sus propiedades. Así, una solución fluye bajo presión sobre la superficie de una membrana y como resultado de la presión aplicada y en función de las propiedades de la membrana, el solvente y ciertos solutos pasan a través de la membrana mientras que otros son retenidos.

En el proceso de concentración utilizado en la elaboración de estas vacunas, el cual se denomina *batch topped off* se llega a concentrar el virus en el orden de 80X veces; para llegar a este valor (desde el punto de vista de la ingeniería) se tiene que emplear un tanque asociado al principal que admita los caudales de recirculación de modo tal que el tanque grande lo alimenta con producto fresco y este va concentrando hasta el factor de concentración deseado. Quiero resaltar que en el proceso de concentración además de la partícula viral o 146S se están concentrando proteínas espurias de menor peso molecular que deberán ser eliminadas posteriormente para evitar reacciones adversas, como por ejemplo alergia, una vez formulada la vacuna. Entre estas proteínas también se encuentran las PNEs que de estar presentes en la formulación vacunal final, ya formulada con adyuvante oleoso, desencadenarían una respuesta inmune en el animal inmunizado con una o más dosis según el nivel (masa) en que dichas proteínas estén presentes en la vacuna.

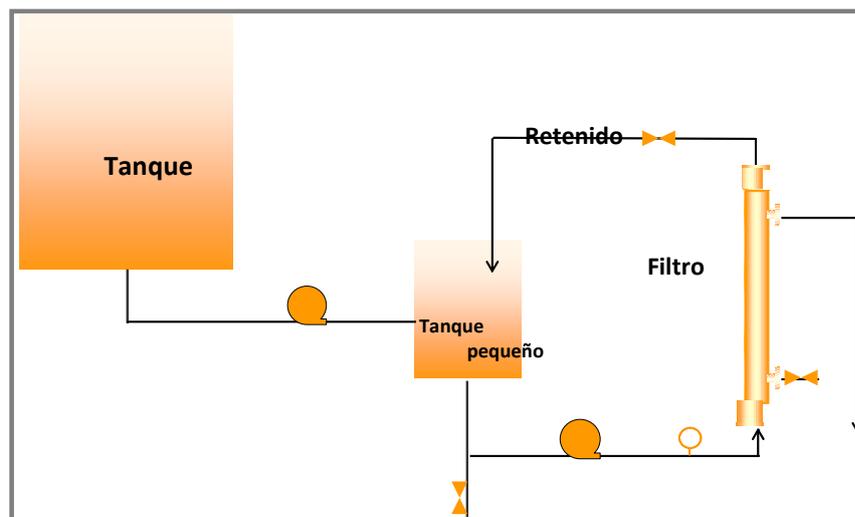


Fig.11: Esquema del proceso batch "Topped off" mediante el cual se concentra el VFA, para luego ser purificado.



Fig.12: Planta de elaboración de vacuna anti-aftosa. Sistemas de tanques y filtros empleados en la concentración y purificación; en azul se observan válvulas automáticas para cerrar caudales de 3 pulgadas de diámetro, conectadas por cable de red a una PC situada a 10 mts de distancia. Estos sistemas automáticos brindan las variables de proceso on line y un cálculo del factor de concentración.

A continuación con el fin de remover proteínas espurias se realiza un proceso denominado diafiltración, y en particular, la diafiltración discontinua es una operación que podríamos denominarla “*en diente de sierra*” donde el producto se concentra, luego se adiciona buffer hasta volver al volumen inicial, nuevamente se concentra para luego volver a añadir buffer y así, la operación se repite n veces hasta separar la partícula viral de las proteínas mediante la presencia de una membrana que no permite el escape del virus pero sí de las PNEs.

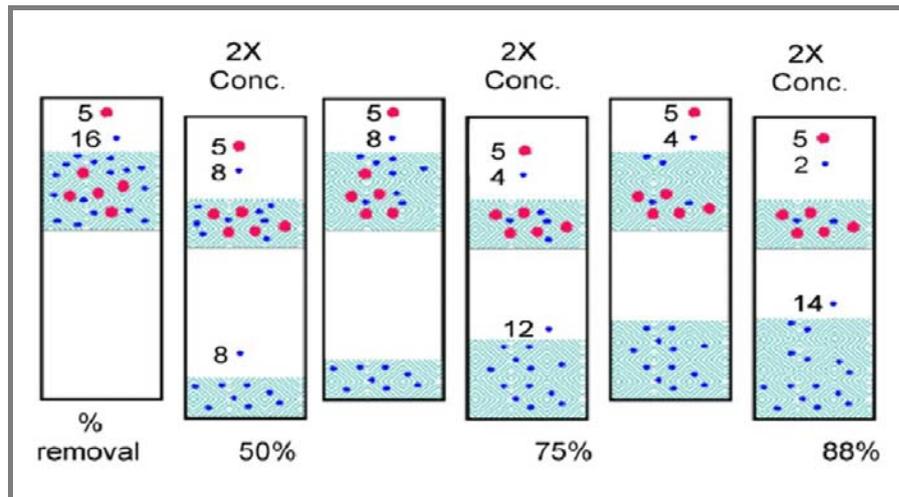


Fig.13: Esquema de diafiltración discontinua. Los puntos azules representan las PNEs, y los colorados, de mayor tamaño, la partícula viral. La membrana intermedia permite el escape de las estructuras de bajo peso molecular. En una primera instancia el volumen inicial se concentra 2X veces, perdiendo un 50% de las PNEs, nuevamente se adiciona buffer para luego concentrar 2X veces, perdiendo el 75% de las proteínas contaminantes. El proceso se repite N veces hasta que en el concentrado no se detectan o están presentes en concentraciones ínfimas las PNEs.

En general, en los primeros 6 volúmenes de diafiltración se remueve alrededor del 95% de los contaminantes, a partir de ahí en adelante la cantidad de los mismos se dispara y el número total de volúmenes utilizados dependerá no sólo del tiempo y dinero para ir más allá en el porcentaje de filtración, sino que también debe garantizar que el mínimo porcentaje remanente de PNEs no sea capaz de inducir una respuesta inmune en el ganado vacunado. A continuación se ejemplifica en forma gráfica los pasos anteriormente mencionados.

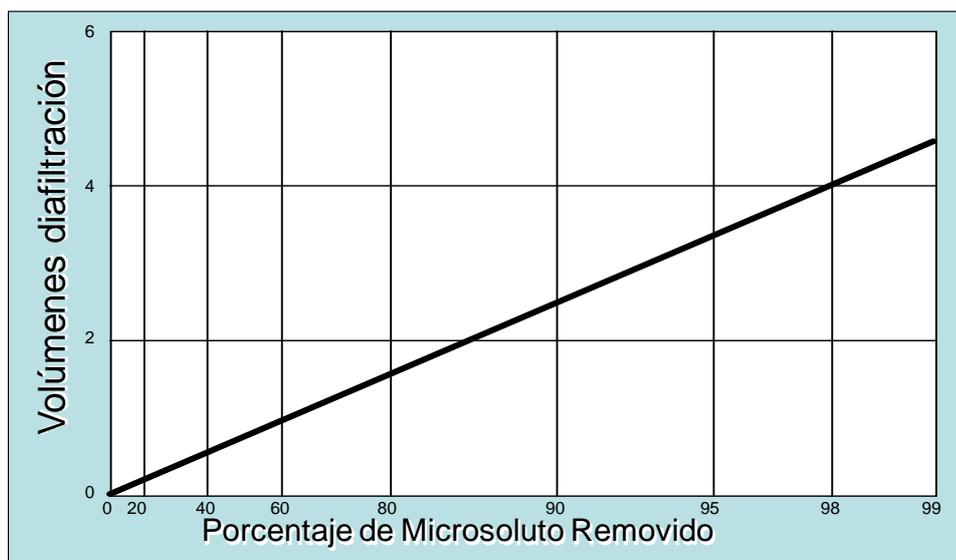


Fig.14: Remoción de microsolutos en función del volumen de diafiltración. En forma gráfica se representan los volúmenes necesarios para la diafiltración, versus el porcentaje de PNEs removido. Si bien la cantidad de volúmenes se estima de modo teórico, generalmente, surgen de analizar cada proceso en forma práctica dado que las distintas estructuras a purificar responden a diferentes principios fisicoquímicos, entre ellos la fuerza iónica.

La industria dedicada a la elaboración de vacunas del VFA, en los últimos años ha incorporado tecnología de última generación dedicada exclusivamente a la eliminación de las PNEs, para ello luego de los procesos anteriormente descriptos se acopla un proceso cromatográfico a fin de que el target o producto de interés, en este caso el virus, esté lo “más solo” posible. Esta última técnica y su desarrollo están sujetos a convenios de confidencialidad de las distintas empresas.

Finalmente, una vez realizada la selección de las cepas, el antígeno ya concentrado, purificado y que fuera oportunamente almacenado en la fase gaseosa de nitrógeno líquido se retira del mismo y en dilución adecuada se mezcla ya sea con un adyuvante oleoso o hidróxido de aluminio. El sistema adyuvante oleoso produce una emulsión adecuada para bovinos, porcinos, ovinos y caprinos (por ejemplo, las vacunas formuladas por el laboratorio *Merial, de Pirbright*, se realizan en una emulsión doble agua-aceite-agua); el hidróxido de aluminio se prescribe únicamente para los rumiantes.

En cuanto a la carga útil de cada antígeno depende de la antigenicidad de la cepa, así como la potencia necesaria de las vacunas. En general, las cargas virales varían de 1 a 18 µg de 146S por dosis de vacuna por cepa y, por razones que todavía no son totalmente entendidas, son

necesarios más μg de antígenos serotipo O que de A, C y Asia1 para lograr una potencia equivalente.

1.18.2-Pruebas sobre el producto vacunal final

Las dos propiedades principales que debe reunir una vacuna contra cualquier patógeno, son la seguridad y la eficacia protectora, ésta última, está íntimamente relacionada con la inmunogenicidad.

Tanto la *OIE* como la *EMEA (European Medicines Agency)* dan recomendaciones a cerca de las pruebas pertinentes que deben realizarse sobre las vacunas anti-aftosa una vez formuladas, las cuales, de aprobar dichos controles, pueden ser utilizadas a campo. Entre estas pruebas se destacan las siguientes:

- *Inocuidad*: para obtener la aprobación reguladora, se debe realizar una prueba de toxicidad local y sistémica sobre un lote de ensayo de vacuna empleando un número adecuado de cabezas de ganado. Se recomienda realizar pruebas con dosis doble y dosis repetida de modo tal que contengan la mayor cantidad y número de antígenos permitida.
- *Potencia*: esta prueba es denominada PGP (porcentaje de protección contra la infección generalizada de la pata o prueba de generalización podal) para la cual se vacuna con una dosis completa por la ruta recomendada por el fabricante a un grupo de 16 animales seronegativos a la FA (oriundos de áreas sin FA, que no se hayan vacunado previamente contra la FA y que carezcan de Acs contra los diferentes tipos de virus de la enfermedad) de al menos 6 meses de edad. Se debe disponer de un grupo control de dos animales no vacunados. Alrededor de 4 semanas post vacunación se los inocula para ser desafiados con una cepa altamente virulenta según los tipos virales presentes en la vacuna a desafiar. Se estima que se inoculan con 10.000 DIB-50 (dosis infectiva bovina al 50%) en al menos dos zonas de la superficie superior de la lengua. Los animales control no protegidos mostrarán lesiones en otros sitios, además de la lengua, a los 7 días posteriores a la inoculación y desarrollarán lesiones en al menos tres patas; para uso profiláctico rutinario, la vacuna debe proteger al menos a 12 de los 16 animales vacunados. En cuanto al resto de las especies animales esta prueba no está estandarizada por lo cual se considera que se puede garantizar que aquellas vacunas que pasaron la prueba llevada a cabo en el modelo bovino se pueden usar en otras especies animales susceptibles al VFA. La *OIE* establece que se pueden utilizar otras pruebas indirectas, como la medida en cultivo celular de los

Acs neutralizantes del virus después de la vacunación, o de los Acs por ELISA, o de los Acs de protección en ratones lactantes, con tal de que se haya establecido estadísticamente una correlación satisfactoria entre los resultados obtenidos por la prueba con el serotipo particular de la vacuna y la prueba de potencia en el ganado. Por ejemplo, en un grupo único al que se suministra una dosis completa de vacuna, el porcentaje medio de protección individual *esperado* sería igual o mayor que el 75% si se emplean 16 animales (OIE, 2006).

- *Duración de la inmunidad:* La duración de la inmunidad (DI) de una vacuna contra la FA dependerán de la formulación y la potencia. Como parte del procedimiento de autorización, el fabricante está obligado a demostrar la DI de una vacuna, ya sea por desafío en el modelo animal o el uso de una prueba alternativa validada, como la serología. Los fabricantes de vacunas deben demostrar la duración de la inmunidad para su formulación específica en cada especie para la cual está indicada.
- *Pureza: prueba para Acs contra PNEs:* el Código de Salud de la OIE para animales terrestres estipula que los fabricantes de vacunas deben garantizar que sus vacunas no inducen Acs contra una o más PNEs. Además de proporcionar documentación concluyente sobre los procesos que implica tal purificación (y los controles sobre la misma), los fabricantes deben demostrar la ausencia de inmunogenicidad respecto a las PNEs como parte del procedimiento de obtención de una licencia (OIE, 2006).

Como método de prueba de la pureza respecto a PNEs la OIE propone vacunar un número adecuado de terneros, con al menos una dosis doble de la vacuna que contenga el máximo número y cantidad de antígenos permitidos. Los terneros deben vacunarse al menos *tres* veces durante un periodo de 3–6 meses y, a continuación, deben ensayarse 30–60 días después de la última vacunación para detectar la presencia de Acs contra las PNEs. De este modo los resultados negativos de estas pruebas demostrarían que la vacuna no induce Acs contra estas proteínas. Por otra parte, por lo que respecta a los lotes, puede demostrarse la confirmación de la pureza de la vacuna si se demuestra la ausencia de aumento de la reactividad contra PNEs en los sueros procedentes de los animales utilizados en la prueba de potencia obtenidos 30 días después de la primovacunación y antes del desafío, en comparación con los sueros de los mismos animales antes de la vacunación.

Por su parte la *EMEA (European Medicines Agency)* propone un protocolo similar *in vivo*, contemplando los mismos parámetros, es decir, la inmunización repetida, emplear las vacunas formuladas que contienen un número máximo de antígenos permitidos, llevar a cabo estas pruebas al menos una vez por cada vacuna (dado que la información que se proporciona se refiere a la formulación de antígenos y adyuvantes ambos juntos, y no solo a los antígenos). Brevemente, se estipula también vacunar a los bovinos *tres* veces, a los 0, 14-28, y 42 días y continuar con el sangrado de los animales hasta el día 56 post vacunación (siempre trabajando con animales sin antecedentes de exposición a la FA); de este modo y con un test válido se analizan los niveles de Acs anti PNEs que deberán ser inferiores a los considerados como positivos en la prueba inmunológica elegida.

Cumpliendo con los parámetros anteriormente detallados los fabricantes pueden utilizar otros esquemas y calendarios de inmunizaciones y pruebas, siempre que se pueda justificar que el programa utilizado es el más adecuado para inducir una respuesta de Acs a PNEs ^(EMEA, 2004).

Como parte del expediente de autorización del producto final, la vacuna, y según recomienda la *EMEA* el fabricante debe presentar datos de ensayos, *in vitro* (de tipo inmunoquímico) a modo tal de demostrar que el proceso de purificación reduce el nivel de PNEs una vez concentrado antígeno. Sin embargo, es poco probable que cualquier proceso de purificación pueda eliminar el 100% de las proteínas espurias, y aun están en vías de desarrollo métodos que pudieran predecir la inmunogenicidad de las proteínas remanentes ^(EMEA, 2004).

1.19-Importancia del presente trabajo

A lo largo de este capítulo introductorio se ha destacado la importancia de la vigilancia epidemiológica activa como parte de todo programa de control y lucha contra la FA ^(OIE, 2004). También se ha mencionado la importancia de las pruebas de diagnóstico para la detección de Acs contra PNEs-VFA y su aporte a la vigilancia epidemiológica. Dichas pruebas adecuadamente validadas, constituyen la mejor opción para la detección de infección con el VFA en poblaciones animales vacunadas contra la enfermedad, donde la inmunidad conferida puede ocultar la sintomatología clínica (regiones libres con vacunación sistemática, luego de una vacunación de emergencia para intentar frenar el avance de un brote, o durante campañas de vacunación masiva para erradicar la enfermedad en zonas endémicas). Las PNEs-VFA aparecen durante la replicación

del virus en del huésped, mientras que no se encuentran dentro de las formulaciones vacunales purificadas o bien están en concentraciones ínfimas. Por lo tanto, los Acs desarrollados en respuesta a la vacunación no interferirían con el diagnóstico de la enfermedad siempre y cuando las vacunas hayan sido oficialmente aprobadas respecto al contenido de estas proteínas espurias.

En la actualidad existe suficiente información sobre la inmunogenicidad de las distintas PNEs y mediante el desarrollo de tecnología y tests adecuados se podrían fijar los niveles por debajo de los cuales las vacunas contra la FA, puede considerarse "libres". Además, lo importante es la capacidad de cualquier residuo, contaminante de PNEs para inducir una respuesta de Acs en animal vacunado que sería suficiente para interferir con una prueba de diagnóstico. Este último concepto es, desde una perspectiva reglamentaria, un requerimiento que garantiza la calidad de una vacuna contra el VFA.

En el presente trabajo se ha desarrollado un método *in vitro* que permitiría detectar la presencia de las PNEs ya sea en la formulación vacunal o en muestras de bancos de antígeno siendo de utilidad para analizar las distintas etapas de purificación de la vacuna y corroborar el grado de eliminación de estas proteínas (control durante las etapas de producción).

Asimismo, empleando modelos *in vivo* se analizaron distintas formulaciones vacunales que podrían inducir Acs contra PNEs luego de vacunar repetidamente animales y corroborar así la interferencia que esto podría acarrear en tests diagnóstico vigentes.

En última instancia, empleando una PNE recombinante se evaluó en el modelo bovino y en el modelo ratón la mínima cantidad de PNE inductora de Acs, este último modelo animal podría a futuro de algún modo reemplazar las pruebas *in vivo* en animales grandes lo cual que implicaría un ahorro de tiempo y costos.

M-Materiales y métodos

M.1-Producción de reactivos para las diferentes técnicas y ensayos

M.1.1-Proteína recombinante 3AB1

Una versión recombinante de la PNE 3AB1 del VFA fue producida en bacterias *E. coli*. Para ello se aislaron colonias individuales a partir de stocks de estas bacterias transformadas con el plásmido pRSET A-3AB1^(Silberstein, 1997) congelados a -70°C. Las colonias individuales se amplificaron y se caracterizaron, para ser luego utilizadas en la producción a gran escala de la proteína recombinante.

M.1.1.1-Aislamiento de colonias individuales y extracción de DNA plasmídico

Minipreparación

Se partió de una placa de Petri con medio LB semisólido con ampicilina (50 µg/mL) donde se crecieron las bacterias *E. coli BL21* transformadas con el plásmido pRSET A-3AB1.

El DNA plasmídico fue aislado siguiendo el protocolo descrito por Sambrook y cols. 1989, en el cual las bacterias fueron sometidas a una lisis alcalina con NaOH 0,2M y SDS 1% y una precipitación con acetato de potasio 3M/5M. Luego de una extracción con fenol/cloroformo (1:1) el ADN fue precipitado con isopropanol. El pellet fue resuspendido en 50µL de buffer TE con RNAsa e incubado por 60min. a 37°C. Esta extracción se conservó a 4°C hasta el momento de uso.

M.1.1.2-Detección de la presencia del inserto en las bacterias transformadas

M.1.1.2.1-Colony PCR

Nuevamente, se partió de una placa de Petri con medio LB semisólido con ampicilina (50 µg/mL) donde se crecieron las bacterias *E. coli BL21* transformadas con el plásmido pRSET A-3AB1. Con el objetivo de rastrear aquellas colonias que contuvieran la secuencia nucleotídica deseada 10 de estas colonias fueron seleccionadas al azar y analizadas por PCR.

Para la reacción de la PCR se utilizó 1 µL de la muestra a analizar previamente purificada. Se realizó la mezcla de la reacción al cual contenía: 1 µL de cada uno de los cebadores ("T7 forward" y "T7reverse" 0,1 µg/µL), 1,5 µL de MgCl₂ 50 mg/mL, 5mL de Buffer 10X (Invitrogen), 0,25 µL de Taq polimerasa (500U/mL) (Invitrogen), 1 µL de DNTPs 10mM y se completó con 39,25 mL de H₂O (libre de DNAsa/RNAsa (Invitrogen)) para obtener un volumen final de 50µL.

La reacción se realizó en el termociclador GeneAmpPCR System 2400 de Perkin Elmer con el ciclado para la amplificación de la región específica (desnaturalización: 5 min. a 95°C-35 ciclos de 95°C 1 min., 54°C 1 72°C 1min., extensión final: 72°C 5min.). Los productos de PCR obtenidos se resolvieron en geles de agarosa al 1.8% con 0.5 µg/mL de Bromuro de Etidio en buffer TAE. Las corridas electroforéticas se realizaron a 100 volts (6-12 volts/cm) durante 20 min. a temperatura ambiente en una cuba de electroforesis horizontal (Wide-Min.i-Sub Cell GT cell, Bio Rad). Las muestras se sembraron en el gel con el agregado de 1/10 de buffer de siembra. Se incluyó en cada corrida un marcador de peso molecular (1Kb DNA Ladder o 100bp Ladder, (Promega)). Posterior a la corrida electroforética, las bandas fueron visualizadas por fluorescencia a la luz UV en un transiluminador (Dual System Transiluminator UVP INC.).

M.1.1.2.2-Digestión con enzimas de restricción

Una vez obtenido el ADN plasmídico (M.1.1.1), se realizó la digestión distintas enzimas de restricción específicas (*BamH I* y *Hind III*) para confirmar definitivamente la presencia del fragmento de ADN que codifica para la proteína de interés.

Para ello en un tubo Eppendorf se colocó 1µL del DNA plasmídico extraído al que se añadió 2µL de buffer correspondiente a la enzima de restricción, 1µL de seroalbúmina bovina (BSA) y 0,5 µL de la enzima *BamH I*, completando con agua tridestilada y desionizada estéril para alcanzar un volumen final de 10µL. Se incubó 1 hora a 37°C. Posteriormente se llevo a cabo una nueva digestión con el doble de volumen de DNA plasmídico, las mismas condiciones de buffer y BSA tiempo y temperatura y se empelaron las enzimas *BamH I* y *Hind III* (1 unidad de cada enzima). Como control se digirió el plásmido pRSET A con la enzima *Hind III* para linealizarlo. Luego de realizada la restricción las muestras (1µL) se sembraron con buffer muestra en un gel de agarosa al 1,8% en buffer TAE y se corrieron durante 20 min. con voltaje fijo (100 volts). Se evidenciaron las bandas luego de teñir durante 10 min. con Bromuro de Etidio y exponer a luz Ultravioleta.

M.1.1.3-Secuenciación de la porción codificante para la proteína 3AB1 presente en el plásmido pRSET A-3AB1-his

El plásmido pRSET A-3AB1-his fue extraído a partir de cultivos competentes de *E.coli BL21* transformados con el mismo, utilizando un kit comercial (GFX Microplasmid Prepkit, GE). El mismo, fue secuenciado por el Servicio Interno de Genotipificación y Secuenciación- Ibiotec (Instituto de

Biología, CICVyA), utilizando el kit (Big Dye Terminator v3.1, de Applied Biosystems) y el secuenciador 3130 xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems. Ambas cadenas del inserto fueron secuenciadas, utilizando los cebadores “T7 forward” y “T7reverse”.

M.1.1.3.1-Análisis de secuencia

Las secuencias nucleotídicas obtenidas, junto a las secuencias aminoacídicas estimadas, fueron comparadas a secuencias cargadas en el Gene Bank (NCBI). Para lo cual el análisis y el alineamiento primario de las secuencias fueron realizados con el programa CLUSTAL W, (Multiple Sequence Alignment Program) dentro del programa BIOEDIT v5.0.9 (c) Tom Hall, North Carolina State University, 1997-2001.

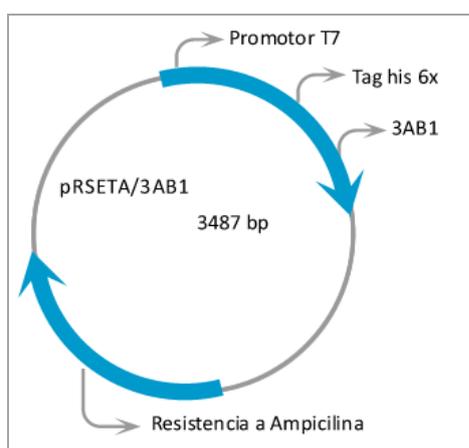


Figura.15: Estructura del plásmido pRSETA-3AB1-his, donde se detallan los componentes más importantes del mismo: Promotor T7, tag de histidinas, inserto 3AB1, y la resistencia a antibióticos.

M.1.1.4-Predicción de determinantes antigénicos en la proteína 3AB1

Obtenidas las secuencias aminoacídicas y antes de realizar la producción de la proteína recombinante se analizó “in silico” el nivel primario de organización proteico. Empleando el método de Kolaskar y Tongaonkar (<http://bio.dfci.harvard.edu/Tools/antigenic.pl>) basado en un enfoque semiempírico que utiliza las propiedades fisicoquímicas de los residuos de la secuencia aminoacídica de una proteína, se realizó la predicción de los determinantes antigénicos de la proteína 3AB1.

M1.1.5-Expresión de la proteína 3AB1 recombinante

Se utilizaron cultivos competentes de *E. coli* BL21 (con resistencia hacia el cloranfenicol) transformados con el plásmido pRSET A-3AB1-his^(Silberstein et al., 1997). Las bacterias transformadas fueron crecidas en medio de cultivo Luria Broth (triptona; levadura; NaCl y NaOH, pH: 7,4) con el agregado de cloranfenicol (34 mg/mL) y ampicilina (25 mg/mL) a 37°C con agitación constante hasta alcanzar una densidad óptica, medida a 700 nm, de 0,7 (D.O₇₀₀ = 0,7). En ese momento se agregó al medio de cultivo isopropil-D-tiogalactosa (IPTG) hasta una concentración final de 1mM y se continuó el crecimiento de las bacterias con agitación a 37°C hasta que el cultivo alcanzara el plateau de su curva de crecimiento: D.O₇₀₀ = 1,0. Finalizada la inducción de las bacterias transformadas con el plásmido pRSET A-3AB1-his se procedió a alicuotar los 500 mL de cultivo obtenidos en tubos cónicos de 50 mL. Posteriormente, los tubos se centrifugaron durante 20 min. a 5000 rpm. Se descartó el sobrenadante (medio de cultivo) y se conservaron los pellets (bacterias expresando 3AB1) a -70°C. Se tomaron alícuotas en cada una de las etapas para analizar la producción de proteína 3AB1 recombinante.

M.1.1.6-Producción de stock de proteína recombinante 3AB1 por el método de SDS-PAGE / Electroelución

Se utilizó el protocolo descrito por Nanni y col. (2005). Se partió de un pellet de bacterias *E.coli* transformadas con el plásmido pRSET A-3AB1-his e inducidas con IPTG. Al pellet obtenido a partir de 45 mL de cultivo por centrifugación (20 min. a 5000 rpm) se le agregaron 6 mL de buffer de carga (SDS 4%; Tris 125 mM; β-mercapto-etanol 10%; glicerol 10%; azul de bromofenol 0,02%). Una vez homogeneizada, la mezcla se sonicó con 3 ciclos de 15 segundos cada uno, a una potencia tal que se produjera una correcta agitación con un mínimo de espuma en la superficie. De los 7 mL resultantes, se tomaron 1,6 mL y se colocaron en un baño térmico (95°C) durante 5 min. La muestra así preparada se sembró en una calle de 15 cm. de longitud en un gel preparativo de poliacrilamida (12%) de formato grande (22 x 20 cm). En una segunda calle pequeña se sembró el marcador de peso molecular (Prestained protein ladder, Fermentas). Se montó el equipo para electroforesis (ProteanII, Bio Rad). Se agregó el buffer de corrida (Tris 20mM; glicina 150mM y SDS 0,1% - pH: 8,3) y se realizó una corrida electroforética en condiciones desnaturalizantes, de 5 horas de duración a 35 mA. El gel obtenido, se tiñó con una solución de Coomasie blue (Acido acético 10%; metanol 40% y coomasie brilliant blue R-250 0,1%) durante 1 hora a 37° realizando

una leve agitación del mismo. Posteriormente se colocó en solución decolorante (Acido acético 10% y metanol 40%) durante 12 horas a 4°C con el fin de eliminar el exceso de Coomasie blue del gel y permitir así una correcta visualización de las bandas proteicas. Identificada la banda correspondiente a la proteína 3AB1 recombinante (27 Kd) la misma fue separada del resto del gel realizando dos cortes paralelos a ambos lados de la misma, utilizando para ello un bisturí. Una vez separada la banda de proteína 3AB1 recombinante, fue cortada en trozos (de 3 x 3 mm) y colocada en un dispositivo para electro-elución (Electro-eluter, Bio Rad) con buffer de corrida. Empleando una corriente eléctrica de 10mA por un tiempo de 3 horas, la proteína fue extraída del gel en forma soluble. Finalmente fue alicuotada y conservada a -70°C para posteriores análisis.

M.1.1.7- Caracterización de la proteína recombinante 3AB1 obtenida

M.1.1.7.1-Electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) evidenciada por tinción con Coomasie blue

De cada muestra se sembraron 15 µL/calle (entre 0,1 y 1 µg/mm de calle), diluida previamente en partes iguales en buffer de carga (SDS 4%; Tris 125 mM; β-mercapto-etanol 10%; glicerol 10%; azul de bromofenol 0,02%). Una vez homogeneizada, cada mezcla fue colocada en un baño térmico (95°C) durante 5 min. Las muestras así preparadas fueron sembradas junto a un marcador de peso molecular (Prestained protein ladder, Fermentas) en minigeles de poliacrilamida (12%). Una vez montado el equipo para electroforesis, se agregó el buffer de corrida (Tris 20mM; glicina 150mM y SDS 0,1% - pH: 8,3) y se realizó una corrida electroforética de 2 horas de duración a 100-150 Volts. El gel obtenido, se tiñó con una solución de Coomasie blue (Acido acético 10%; metanol 40% y coomasie brilliant blue R-250 0,1%) durante 1 hora a 37° realizando una leve agitación del mismo. Posteriormente se colocó en solución decolorante (Acido acético 10% y metanol 40%) durante 12 horas a 4°C con el fin de eliminar el exceso de Coomasie blue del gel y permitir así una correcta visualización de las bandas proteicas. Los geles teñidos y lavados, se colocaron entre dos películas plásticas transparentes y fueron secados, para ser luego escaneados y analizados.

M.1.1.7.2-Western blot de la proteína 3AB1

Cada muestra se sembró a una concentración de 0,02 µg de proteína/ mm de calle de gel (en el caso de la proteína 3AB1 purificada) o 0,1 µg de proteína/ mm de calle (al tratarse de un extracto proteico sin purificar). Previo a la siembra, las muestras se colocaron en un tubo junto al buffer de carga (SDS 4%; Tris 125 mM; β-mercapto-etanol 10%; glicerol 10%; azul de bromofenol 0,02%) y se homogeneizaron. A continuación, se calentaron en un baño térmico a 95°C durante 5 min. (desnaturalización de las proteínas). Las muestras así procesadas fueron sembradas junto a un marcador de peso molecular (Prestained protein ladder, Fermentas) en un gel de poliacrilamida (12%). Se realizó la electroforesis durante 2 horas a 100-150 Volts (SDS-PAGE). Las proteínas de esta forma separadas, fueron transferidas luego a una membrana de nitrocelulosa de 0,22 µm. Para ello se utilizó una cuba semiseca para electrotransferencia y buffer de transferencia (Tris 0,025 M; glicina 0,192 M – pH: 8,3). La electrotransferencia se realizó a 20 V durante 1 hora. Los sitios de unión remanentes sobre la membrana de nitrocelulosa se bloquearon en buffer de bloqueo (PBS; tween-20 0,05%; leche en polvo 3% (m/v)) durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, las membranas se incubaron con el primer Ac en la dilución apropiada en buffer de dilución (PBS; tween-20 0,05%; leche en polvo 3% (m/v)) durante 12 horas a 4°C.

Para la detección de la proteína recombinante 3AB1-his por Western blot se emplearon distintos sueros de referencia como primer Ac: AcM anti-his producido en ratón (1:3000 (Amersham®), sueros policlonales de referencia provenientes de bovinos infectados: (091INTA) (031SENASA) y un suero policlonal mono específico anti-3AB1 (suero“HA5”), y sueros policlonales de referencia provenientes de bovinos no infectados con el VFA: 5 sueros de bovinos no vacunados, 5 sueros de bovinos vacunados. Dichos sueros se preadsorbieron junto al buffer de dilución con el agregado de lisado de *E.coli* 1%, durante 1 hora a 37°C con agitación.

Finalizada la incubación con el primer Ac, la membrana se lavó con buffer de lavado (PBS; tween-20 0,05%), y se incubó durante una hora a 37°C con el respectivo segundo Ac: anti-ratón (1:2000) o anti-bovino (1:1500), ambos conjugados con fosfatasa alcalina. Posteriormente las membranas fueron lavadas nuevamente con buffer de lavado. La banda correspondiente a la proteína recombinante 3AB1 se evidenció con el agregado de la solución de cromógeno-sustrato (Tris 0,1M; NaCl 0,1M; MgCl₂ 0,005M; NBT 100 mg/mL; BCIP 50 mg/mL). Las membranas se lavaron con agua destilada, se secaron y fotografiaron para su posterior análisis.

M.1.1.7.3-Cuantificación proteica

Se utilizaron dos métodos de cuantificación proteica: 1) Kit comercial basado en el método del ácido bisinconínico (Micro BCA protein assay kit, Pierce), siguiendo las recomendaciones del fabricante, y 2) Cuantificación por el método de Bradford ^(Sambrook et al., 1989). Ambos métodos se realizaron en forma paralela para disminuir los errores de cuantificación.

M.1.1.7.4-Titulación de proteína 3AB1 como antígeno para ser utilizado en la técnica de ELISA

Se realizaron diluciones seriadas al medio de los diferentes stocks de proteína 3AB1 recombinante en buffer carbonato/bicarbonato (pH=9,6) de ELISA. Se partió de una dilución 1:250 hasta una dilución 1:4000. Se utilizaron 10 sueros de bovinos infectados y no infectados con el VFA, y se determinó la máxima dilución de proteína 3AB1 (utilizada como antígeno) que era capaz de discriminar correctamente entre sueros de bovinos infectados y no infectados con el VFA. Otro parámetro que se tuvo en cuenta fue el valor de los resultados obtenidos para cada suero de referencia relacionándolo con su historial.

M.1.1.7.5-Inmunogenicidad de la proteína recombinante 3AB1

Se inocularon ratones machos BALB/c con 5 µg de proteína recombinante 3AB1. Dado que el sistema de expresión es en *E.coli*, otro grupo de animales fue inoculado con un purificado de proteína de *E. coli* BL21, que no expresaban la proteína de interés, de peso molecular cercano a los 27Kb, obtenido por el mismo sistema de purificación en el formato de SDS-PAGE a gran escala anteriormente mencionado. En ambos casos y para el grupo control de animales normales se utilizaron 5 ratones/grupo. La fase acuosa la proteína a inocular, se emulsionó en adyuvante de Freund y los grupos recibiendo tres vacunaciones (una cada 10 días) de 0, 2 mL/dosis. Se recolectó sangre de la vena caudal y los sueros fueron analizados por ensayos inmunológicos citados a continuación.

M.1.1.7.5.1-Detección de la proteína 3AB1 nativa y/o sus precursores por inmunofluorescencia

Se sembraron células BHK-21 sobre chambers slides. Luego, fueron ingresados al laboratorio de Seguridad NSB3A donde en condiciones de bioseguridad se descartó el sobrenadante para proceder a la infección. En los cuatro pocillos superiores se realizó la infección con virus VFA O1 Campos de modo de obtener una multiplicidad de infección (MOI multiplicity of infection) de 10^5 PFU/célula, en los cuatro pocillos inferiores solo se sembró medio MEM.

Se incubó durante 3 hs a 37°C. Finalizado ese tiempo se retiró el medio sobrenadante y luego el soporte plástico. Se lavó el portaobjetos con PBS 1X. Luego las células fueron fijadas al portaobjetos con paraformaldehído 4% por 20 min.

Los portaobjetos sumergidos en PBS 1X se retiraron del laboratorio previamente rociados con ácido cítrico 2% siguiendo las normas de bioseguridad pre-establecidas.

Se realizó la permeabilización celular con buffer PBTG durante 20 min. a temperatura ambiente. Luego se añadieron en los distintos pocillos infectados y no infectados los siguientes primeros Acs: suero de ratón inoculado con 5 µg de la proteína recombinante 3AB1 y suero normal de ratón (SNR). Se incubó en estufa de cultivo a 37°C durante 40 min. Luego de lavar con PBS, se incubó por 40 min. a 37°C con el segundo Ac de ratón conjugado con fluoresceína diluido en PBS/EVANS BLUE. Nuevamente se lavó con PBS 1X y se sumergió por 5 min. en agua destilada. Se observó al microscopio con el objetivo de 40X utilizando el filtro FICT/Evans Blue.

M.1.1.7.5.2 Detección de anticuerpos anti 3AB1 en ratones

Una vez puesto a punto el ELISA para este modelo animal los sueros obtenidos de los tres grupos experimentales (inoculado con 5µg de 3AB1 recombinante, inoculado con proteína bacteriana y sueros normales) se analizaron por este enzimoimmunoensayo (M.2.2.5). Los sueros que brindaron una D.O mayores al punto de corte se consideraron positivos.

M.1.2-Producción de sueros policlonales

M.1.2.1-Suero bovino positivo

Se obtuvo un suero policlonal de monoespecífico anti-3AB1 (suero HA5), a partir de un bovino (*Bos taurus*), de 3 meses edad, procedente de un tambo ubicado en la provincia de Buenos

Aires. El mismo fue descalostrado y alimentado con un sustituto lácteo para evitar la ingesta de Acs contra el VFA a través del calostro materno. El animal fue inmunizado por vía intramuscular con un adyuvante oleoso cuya formulación fue 50% de adyuvante oleoso y 50% solución que contenía la proteína recombinante 3AB1 (50 µg de proteína recombinante 3AB1); a los 21 días de la primer dosis, se le aplicó una segunda dosis con la misma cantidad de proteína 3AB1 recombinante. Finalmente fue sangrado a los 21 días de haber recibido la segunda dosis con el propósito de obtener un suero con un alto nivel de Acs contra la proteína 3AB1.

M.1.2.2-Suero murino utilizado como control positivo interno de la técnica de ELISA

3AB1

Ratones (n=3) BALB/c de 2 meses fueron inoculados por vía intraperitoneal con la proteína 3AB1 recombinante (40 µg/dosis; dosis 0.2mL), aplicando 3 dosis de inmunógeno cada 15 días, utilizando adyuvante completo de Freund en la primera e incompleto en las siguientes. Se efectuaron las sangrías finales a los 15 días luego de la segunda dosis y con dichos sueros se realizó un pool a fin de obtener un buen volumen para posteriormente empelarlo como control positivo interno en la técnica ELISA 3AB1-ratón.

M.1.2.3-Suero de cobayo

Se inoculó una cobaya de 3 meses de edad por vía intramuscular con la proteína 3AB1 recombinante (40 µg/dosis; dosis 0.2mL) se aplicaron 3 dosis de inmunógeno cada 15 días utilizando adyuvante completo de Freund en la primera e incompleto en las siguientes. La sangría se realizó a los 15 días posteriores a la última dosis. Dicho suero se conservó a -20°C con 50% v/v de glicerol hasta su utilización como detector en ELISA de captura.

Todos los sueros mencionados en este apartado se titularon por ELISA 3AB1 y se analizaron por Western blot.

M.1.2 4-Sueros normales y de referencia

Se utilizaron 283 muestras de suero murino, de animales normales para VFA provenientes de 3 bioterios de la provincia de Buenos Aires.

Además se dispone de un amplio panel de sueros bovinos, de animales libres de VFA, vacunados e infectados, con los cuales se han puesto a punto las distintas técnicas detalladas.

M.1.3-Producción de anticuerpos monoclonales

M.1.3.1-Inmunización de ratones

Para la producción de anticuerpos monoclonales (AcMs), se inoculo por vía intraperitoneal en tres oportunidades (0, 15 y 21 días pre fusión) ratones BALB /c de dos meses de edad con 30 µg de antígeno soluble en adyuvante de Freund completo (50% fase acuosa y 50 % fase oleosa). Se determinó el título de Acs por ELISA 3AB1 en los sueros murinos y luego de la segunda reinmunización y habiendo obtenido un título mayor a 1/10000, se realizaron 3 inoculaciones previas a la fusión en los días -4, -3 y -2 con 50 µg de antígeno soluble en PBS 1X.

M.1.3.2-Células de mieloma

Se utilizaron células NS0 de mieloma murino certificadas libres de contaminantes (bacterias, micoplasmas y virus adventicios) las cuales 24 hs antes de la fusión fueron amplificadas a modo de que estuvieran en fase exponencial. Para realizar la fusión la viabilidad celular fue del 90 %.

M.1.3.3-Obtención de células de bazo

La fusión se realizó a las 24 hs posteriores a la última inoculación del antígeno en ratones, dado que es el momento de máxima presencia de blastocitos en el bazo. Para ello se extrajo el bazo de uno de los ratones inoculados con el péptido 3AB1; luego el órgano se disgregó en 5 mL de medio L para separar el tejido conectivo y las células se pasaron a un tubo de 15 mL, separando el sobrenadante del sedimento por centrifugación a 15000 rpm por 5 min. y lavando posteriormente con 5 mL de medio L y centrifugándolo en las mismas condiciones para finalmente resuspender el pellet en 1 mL de NH₄Cl al 0.85% de modo de lisar los eritrocitos. Posteriormente se centrifugó, se lavó con medio L y se procedió a contar las células al microscopio empleando azul Tripán.

M.1.3.4- Fusión de células en suspensión

En un baño equilibrado a 37°C se mezclaron 10^8 células del bazo en 25 mL de medio L con $2 \cdot 10^7$ células de mieloma en 25 mL en medio L (relación 5:1). Luego se centrifugó 10 min. a 1000 rpm y se añadió 1 mL de solución de polietilenglicol (PEG) que actuó como agente fusogénico a lo largo de un periodo de 1 min. con agitación constante. Se continuó agitando por alrededor de 15 min. en simultáneo con el agregado de medio L precalentado a 37°C. Luego se centrifugaron las células y se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en medio de selección (HAT: hipoxantina, aminopterina y timidina) a una densidad de 2×10^8 células híbridas /mL. Se distribuyeron las células en 7 placas de cultivo de 96 pocillos (100 µl/pocillo) y se sembró un control de células de mieloma para evaluar que funcionara la selección. La incubación se realizó en estufa de atmósfera controlada con 5% de CO₂ y 95% de humedad. A partir de los 7 días se comenzó a observar el crecimiento de las células híbridas. A los 15 días post fusión el medio HAT fue reemplazado por el medio HT (hipoxantina y timidina) y se comenzó a realizar la observación periódica del crecimiento celular.

M.1.3.5-Detección de anticuerpo monoclonales en el sobrenadante de cultivo

Cada tres días se realizó la renovación del medio de cultivo HT en un 50% junto con la observación al microscopio del crecimiento de los híbridos. El sobrenadante celular se analizó tanto por ELISA 3AB1 como por Western blot. Este procedimiento se repitió en cada repique celular hasta confirmar la presencia de células productoras de AcMs y así poder proceder a realizar el clonado.

M.1.3.6- Clonado

Se utilizó el método de clonado por dilución al límite sembrando en la tres primeras filas de una placa de 96 pocillos un promedio de 5 células/ pocillo, en las tres filas siguientes 1 célula/pocillo y 0.5 células/pocillo en las dos filas restantes. Se incubó por 10 días realizando controles periódicos y marcando los pocillos donde crecía solo un clon. Los clones positivos en crecimiento semiconfluyente y con reacción positiva (detectado por ELISA 3AB1) fueron expandidos en forma gradual. Los hibridomas productores de AcMs fueron clonados nuevamente y aquellos que secretaron AcMs con un alto título evaluado por ELISA 3AB1 fueron congelaron a -70°C y forman parte de la colección de hibridomas del Instituto de Virología del INTA Castelar.

M.1.3.7-Producción de líquido ascítico

Células de un cultivo con muy buena confluencia fueron cosechadas y luego 0.5 mL conteniendo $2 \cdot 10^6$ células híbridas se inyectaron por vía intraperitoneal en 20 ratones BALB/c isogénicos previamente inoculados (7 días antes) por esta vía con 0.25 mL de adyuvante incompleto de Freund ^(Gillette, 1986).

El líquido acumulado se drenó por punción intraperitoneal, previa sedación de los ratones (15 días luego de la inoculación) y se repitió el proceso cada dos días hasta el sacrificio de los animales.

El líquido ascítico obtenido fue analizado por ELISA 3AB1 para evaluar el título de Acs. Posteriormente se empleó una solución saturada de NH_4SO_4 para realizar una precipitación salina y eliminar impurezas contaminantes. El líquido ascítico se conservó a -20°C puro y parte al 50% en glicerol.

M.1.3.8-Characterización del anticuerpo monoclonal anti-3AB1

M.1.3.8.1-Determinación de la especificidad de reconocimiento de moléculas antigénicas

M.1.3.8.2-Titulación de anticuerpo monoclonal anti-3AB1

Con el fin de determinar el título del AcM anti-3AB1 se procedió a analizar la reactividad de dicho Ac contra la proteína homóloga purificada y se lo comparó con el Ac policlonal murino monoespecífico y un SNR tanto por la técnica de ELISA como por Western blot.

M.1.3.8.3-Determinación de isotipo del anticuerpo monoclonal anti-3AB1

Se sensibilizó una Placa Inmulon I con el péptido 3AB1 en dilución 1/1000 en buffer carbonato/bicarbonato pH 9.6, se dejó a 4°C overnight. Se lavó 3 veces con PBST 0.25X y se procedió a bloquear con buffer PVP (polovinilpirrolidona). La incubación fue de 1 hora a 37°C . Las placas se lavaron y luego se transfirieron los Acs en diluciones seriadas al 1/2 en buffer PVP y se incubó 1 hora a 37°C (AcM anti-3AB1, AcM anti-3 A de isotipo IgG1, AcM anti-histidina de isotipo IgG2a (Amersham[®]) un Ac policlonal de ratón anti-3AB1 (recibió una dosis y 2 boosters de $50\mu\text{g}$ de dicho antígeno)). Se lavaron las placas y se adicionó el Ac anti-isotipo conjugado con peroxidasa

(Caltag) en dilución apropiada en buffer PVP. Se incubó 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron las placas y se reveló utilizando o-fenilenediamina (OPD)-H₂O₂ como sustrato de la peroxidasa. Posteriormente, se leyó la D.O a 490 nm en un lector MR5000 microplate. Se incluyeron controles positivos y negativos. EL punto de corte se estableció como la media de la D.O alcanzada por sueros negativos más dos desvíos estándares.

M.1.3.8.4- Inmunofluorescencia indirecta para identificación de PNEs nativas en células BHK-21 infectadas con el VFA

Como fuera descrita en la sección M.1.1.7.5.1 se llevó a cabo la técnica de IFI. En este caso sobre los pocillos conteniendo células BHK-21 infectadas y no infectadas con el VFA se añadieron los siguientes primeros Acs: AcM anti-3AB1, sueros de ratón específico anti-3AB1 y SNR, en dilución adecuada. Se incubó en estufa de cultivo a 37°C durante 40 min. Luego de lavar con PBS 1X, se incubó por 40 min. a 37°C con el segundo Ac de ratón conjugado con fluoresceína diluido en PBS/EVANS BLUE. Nuevamente se lavo con PBS 1X y se sumergió por 5 min. en agua destilada. Se observó al microscopio con el objetivo de 40X utilizando el filtro FICT/Evans Blue.

M.2-Test serológicos utilizados en el presente trabajo

M.2.1-Detección de anticuerpos contra proteínas estructurales por ELISA en fase líquida

La técnica fue realizada de acuerdo al protocolo descrito por Hamblin y cols. ^(Hamblin y cols., 1986 a y b).

Placas Inmulon II fueron absorbidas con 50 µL por pocillo de suero de conejo anti-VFA utilizado como captura diluido en buffer carbonato /bicarbonato pH 9, 6, las mismas fueron incubadas a 4°C durante toda la noche. Luego de lavar 3 veces con PBST-1X, se sembraron 70 µL por pocillo de buffer de bloqueo (PBST-OVA 1%) y se incubó durante 1 hora a 37 °C con agitación. En una placa de baja adsorción se realizó la fase líquida, mezclando diluciones de sueros problemas (50µL) con un volumen equivalente de suspensión viral inactivada (cepa O1 Campos y cepa A2001) en dilución óptima. Ambas diluciones se realizaron en buffer de bloqueo. Se incubó durante 1 hora a 37 °C con agitación. Luego de descartar la solución de bloqueo se transfirió a la placa Inmulon II, las diluciones del suero problema y de los sueros controles positivo y negativo. Se incubó durante 1 hora a 37°C con agitación. Se lavó la placa 3 veces con PBST-1X y se agregó 50

μL por pocillo de suero de cobayo detector anti-VFA, en dilución óptima en PBST-SNC-SNB y se incubó durante 30 min. a 37°C con agitación. Se volvió a lavar 3 veces con PBST-1X y se agregó por pocillo 50 μL de suero anti-cobayo marcado con peroxidasa (KPL) en dilución óptima en PBST-SNC-SNB. Se incubó 30 min. a 37°C con agitación. Se lavó nuevamente y se reveló mediante el agregado de 50 uL por pocillo de OPD-H₂O₂ como sustrato de la peroxidasa. Se incubó la placa por 15 min. a temperatura ambiente y luego la reacción se frenó con H₂SO₄ 2N. Finalmente se leyó la absorbancia a 492 nm en un lector de microplacas (Microplate Labsystem). Los títulos de Acs fueron obtenidos como la dilución de suero que otorga el 50% de absorbancia del promedio de absorbancia de los controles sin suero (absorbancia de corte).

M.2.2-Detección de anticuerpos contra PNEs

M.2.2.1- ELISA 3D

Este test es un ELISA en fase líquida tipo sandwich. Primeramente se sensibilizó la placa Immunolon II con IgG proveniente de un bovino infectado con VFA subtipo C, diluido 1/200 en buffer carbonato bicarbonato. Se dejó overnight a 4°C. Posteriormente se lavó 3 veces con PBST, y se bloquea con (PBST-OVA 1%) y se Incubó a 37 °C durante 60 min. sin agitación. Luego se llevó a cabo la fase líquida en una placa de baja adsorción donde se puso en contacto diluciones seriadas de los sueros problema, el control positivo y negativo con un volumen equivalente de suspensión proteica GST-3D y GST en dil 1/400. Se transfirieron las diluciones de suero y controles sin suero a la placa sensibilizada y bloqueada, y se incubó 60 min. con agitación. Se lavó, como se indico anteriormente y la detección de los sueros GST-3D no reactivos se realizó añadiendo suero de cobayo anti-VFA subtipo O en dil 1/400. Se incubó 30 min. a 37°C con agitación. Nuevamente se lavó y se añadió el conjugado anti-IgG de cobayo conjugado con peroxidasa en dilución adecuada. El revelado se llevó a cabo utilizando OPD-H₂O₂ y se incubó a temperatura ambiente por 15 min., luego la reacción fue frenada con 2,25 M de H₂SO₄. Se leyó a 492 nm. Una reacción positiva es aquella en que la cual la D.O se redujo más del 50% respecto a la observada en los controles sin suero. Los títulos de Acs se expresaron como la dilución de suero que otorga el 50% de densidad óptica del promedio de absorbancia de los controles sin suero (llamada absorbancia de corte).

M.2.2.2-I-ELISA 3ABC (Panaftosa)

El I-ELISA 3ABC (Producido por el laboratorio de referencia de la OIE, para Fiebre Aftosa en América del Sur: el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, Panaftosa, ubicado en Río de Janeiro, Brasil) es un kit comercial de tipo ELISA indirecto que utiliza la proteína recombinante 3ABC para posibilitar la detección de Acs contra PNE-VFA a partir de muestras de suero bovino; permitiendo de esta manera, diferenciar entre animales infectados y no infectados con VFA (estén estos vacunados o no contra la enfermedad). Este ensayo ha sido descrito por OIE como técnica oficial de screening, utilizando al EITB (Inmunoblot, de Panaftosa) como prueba confirmatoria para el diagnóstico de Acs contra PNE-VFA ^(OIE, 2004).

El ensayo se realiza en tres etapas: 1) incubación de las muestras (sueros bovinos, en una dilución de 1:20) en una placa previamente sensibilizada (PNE-VFA 3ABC); 2) incubación del conjugado y 3) incubación del sustrato. Siguen a las dos primeras etapas ciclos de lavados y a la última la adición de la solución bloqueadora para detener la reacción. Se efectúa la lectura de la microplaca en una lectora de placa y se mide la absorbancia de cada pocillo. Los resultados de los sueros control permiten el cálculo del valor de corte recomendado para la prueba, a partir del cual es posible clasificar las muestras problema como reactivas o no reactivas.

M.2.2.3-ELISA 3ABC (ICT-MILSTEIN)

Para llevar a cabo el I-ELISA 3ABC desarrollado por el ICT-MILSTEIN, las placas de ELISA se sensibilizaron utilizando como captura el AcM anti-3A en dilución adecuada en buffer carbonato-bicarbonato. Se incubó overnight a 4°C. Luego de lavar 4 veces con PBS 1X-Tween 0,05%, se añadió 50 µL del antígeno recombinante 3ABC diluido en buffer de dilución y se incubó durante 2 hs a 37°C con agitación. Luego, cada muestra de suero en dilución 1:40 se añadió a los pocillos con y sin antígeno y se incubó por 30 min. a 37°C. Nuevamente, se lavó 4 veces y la detección del Ac unido se realizó mediante agregando IgG anti-bovino conjugado con peroxidasa en dilución adecuada incubándose por 30 min. a 37°C, se lavó 4 veces y como sustrato se empleó ABTS/H₂O₂. A los 30 min. de transcurrida la reacción se leyó la absorbancia a 415nm. Los resultados fueron expresados como porcentajes de positividad (PP%) respecto del valor control positivo: $PP\% = (DO_{415nm} \text{ muestra} \times 100) / DO_{415nm} \text{ control positivo}$.

M.2.2.4-ELISA 3AB1

Dicha técnica se realizó en una placa de 96 pocillos (Immunolon I, Dynatech Laboratories). Para cada muestra a analizar se destinaron tres pocillos. De estos, 2 se sensibilizaron con el antígeno: proteína 3AB1 (0,0066 µg/pocillo en buffer carbonato/bicarbonato – pH: 9,6) mientras que en el tercero se colocó buffer carbonato/bicarbonato solamente y se utilizó para cuantificar el background provocado por la interacción suero-placa. Colocada la proteína en los pocillos correspondientes, la placa se incubó por 12 horas a 4°C. Una vez sensibilizada, se realizaron 3 lavados de la misma con solución de lavado (solución tampón de fosfatos pH 7,4 (PBS); 0,05% Tween 20). A continuación se bloqueó, agregando a todos los pocillos 70 µL de buffer de bloqueo (PBS pH 7,4; 0,05% Tween 20; 10% pool de suero normal equino (SNE)) durante 1 hora y 30 min. a 37°C con agitación. En otra placa de 96 pocillos con baja afinidad hacia Acs (Microtitter, Dynatech Labs) se procedió a realizar la dilución de cada suero y los controles internos del ensayo en buffer de preabsorción (PBS; 0,05% Tween 20; 10% SNE; 2,5% lisado de *E.coli* sin transformar). Se colocaron 2 µL de cada muestra en 200 µL de buffer de preabsorción (dilución final de cada suero: 1:100). Se analizaron 29 muestras por placa, junto a los tres controles internos del ensayo: 1) control positivo primario (CP1), 2) control positivo secundario (CP2), y 3) control negativo (CN). La placa con las diluciones de sueros se incubó durante 1 hora a 37°C con agitación. Concluida la incubación de ambas placas, y una vez retirado el buffer de bloqueo de la placa sensibilizada, los sueros de la placa de preabsorción se transfirieron por triplicado (50 µL/pocillo) a la placa sensibilizada (dos réplicas se incubaron en pocillos con antígeno, mientras que la tercera se colocó en el pocillo sin antígeno) y se incubaron durante 1 hora a 37°C con agitación. Finalizado este período de tiempo, se realizaron 3 lavados con buffer de lavado. La detección de Acs anti-3AB1 se evidenció con del agregado de suero de cobayo anti-IgG bovina conjugado con peroxidasa (KPL). Se agregó a toda la placa 50 µL de dicho conjugado en una dilución 1:2500 en buffer de conjugado (PBS; 0,05% Tween 20; 10% SNE) y se incubó durante 30 min. a 37°C con agitación. Posteriormente se realizaron 6 lavados a la placa con buffer de lavado. La reacción global el ensayo se evidenció a través de la actividad de la enzima peroxidasa, agregando a cada pocillo 100 µL de buffer de sustrato-cromógeno (citrato/fosfato pH: 5,0; 3, 3 5, 5 tetramethylbenzidine dihydrochloride 10% (TMB)); peróxido de hidrógeno 0,01%). La placa se incubó durante 15 min. a 37°C con agitación y la reacción fue frenada con el agregado de 100 µL/pocillo de H₂SO₄ 12% en agua bi-distilada. La placa se leyó en un lector para microplacas a 450 nm. De cada muestra se promediaron los resultados obtenidos de cada réplica con antígeno (densidades ópticas brutas) y se restó el valor

del background (resultado de la tercer réplica ubicada en el pocillo sin antígeno). El valor obtenido se relativizó con el valor obtenido de igual manera para el control positivo primario (CP1) del ensayo expresándose como el valor porcentual (PP%) de la muestra respecto al CP1 (muestra/CP1*100). El valor de corte se ha establecido en el 12 % del valor del CP1 del ensayo. Toda muestra que brindó valor igual o por encima del mismo se consideró positiva, de manera contraria toda muestra que arrojó un valor por debajo del mismo se consideró negativa para el ELISA: $PP\% = (A_{450nm} \text{ muestra} / A_{450} \text{ promedio control positivo}) \times 100$.

El control interno de este test se corresponde al suero policlonal mono específico anti-3AB1, el "HA5" anteriormente citado, el cual fue comparado y analizado respecto de un suero de referencia (animal infectado) mediante una curva de dilución seriada. La dilución de este suero "HA5" que se equipara al comportamiento de un suero positivo fuerte se corresponde al control positivo primario 1, CP1, y la dilución equivalente a un suero positivo medio se corresponde al llamado control positivo secundario o CP2, ambas diluciones confeccionadas sobre una matriz de suero bovino normal para VFA.

Todas las pruebas de factibilidad, determinación de punto de corte y validación de dicha técnica se realizaron en el laboratorio de enfermedades vesiculares INTA Castelar.

M.2.2.5-Puesta a punto del ELISA 3AB1 ratón

Tomando como referencia el ELISA bovino se realizó la puesta a punto de la técnica para la especie murina. Las condiciones del ensayo fueron nuevamente analizadas para esta especie y se determinaron las mismas condiciones en cuanto a placas, tiempos de incubación, buffers y temperaturas. Se ajustaron las condiciones para la dilución adecuada de los sueros, el punto de corte y nuevos sueros controles internos.

Brevemente, placas Immunolon I fueron sensibilizadas con la proteína 3AB1 purificada (0,0066 µg/pocillo) en buffer carbonato bicarbonato pH 9,6 y se incubó overnight a 4°C. Las placas se lavaron con PBST-1X 3 veces y se bloqueó con 70 µL por pocillo de PBST-SNE10% y se incubó durante 1 hora a 37 °C con agitación. Las muestras de suero fueron diluidas 1/50 y preincubadas en PBST-SNE10% durante 1 hora a 37°C con agitación, fueron agregadas a la microplaca. La detección de Acs unidos a la proteína 3AB1 fue realizada por la adición de IgG de conejo anti-ratón conjugado con peroxidasa (KPL) durante 30 min. a 37°C con agitación. El color de la reacción fue desarrollado luego de 15 min. usando el sustrato cromogénico TMB (Sigma). Luego de que la reacción fue detenida por el agregado de H₂SO₄ 2N, las placas fueron leídas a 450 nm en un lector

de microplacas (microwells labssystem). Los resultados fueron expresados como $PP\% = (A_{450nm} \text{ muestra} / A_{450} \text{ promedio control positivo}) \times 100$.

M.2.2.5.1-Determinación del punto de corte ELISA 3AB1 ratón

Para determinar el punto de corte del ELISA 3AB1 para el modelo ratón se utilizaron 283 muestras de suero murino, de animales normales para VFA provenientes de 3 bioterios de la provincia de Buenos Aires. La totalidad de los sueros fueron analizados por medio del ELISA 3AB1, y los resultados obtenidos se expresaron en forma porcentual relativa al control positivo del ensayo (M1=100%). Luego se verificó la distribución normal de dichos resultados, y se estableció el punto de corte, a 3 desvíos estándares (D.E.) por sobre el valor de la media de los mismos.

M.2.2.5.2-Suero control interno ELISA 3AB1 ratón

Se desarrolló un suero policlonal monoespecífico anti-3AB1, el "M1", para ser utilizado en la técnica de ELISA 3AB1 como control positivo interno del ensayo. Posteriormente se realizó la titulación del suero utilizando la técnica de ELISA 3AB1. Para ello se analizaron diluciones seriadas al medio de dicho suero (a partir de 1:50 hasta 1:100.000). Las mismas se realizaron en buffer de dilución de la técnica de ELISA 3AB1. Se establecieron 2 diluciones del suero "M1" una dilución equivalente a 1 suero positivo fuerte (CPF) y una dilución equivalente a 1 suero positivo medio (CPM) para ser utilizadas como controles de positividad y validez en el test de ELISA 3AB1. Una vez definidas las 2 diluciones finales, para ser utilizadas como CPF y CPM, las mismas se confeccionaron con SNR. Como control negativo se empleó un pool de SNR.

M.3-Extracción de ARN y PCR para detectar virus en muestras de líquido esófago faríngeo

Para la extracción del RNA viral se utilizó el reactivo comercial Trizol (Sigma). Se tomaron 250 μL de muestra y se agregó 1 mL de Trizol [®]Reagent (Relación 1:5). Luego de incubar la suspensión durante 15 min. a T.A., se agregó 200mL de cloroformo y se centrifugó la mezcla a 12000 g durante 15 min. a 4°C. La fase acuosa se resuspendió en una solución con 0,5 mL de isopropanol y 1 μL de glicógeno de concentración 20mg/mL (GEHealthcare). La mezcla se dejó precipitar durante 30 min. a T.A. y se centrifugó a 12000 g durante 15 min. a 4 °C. El pellet se lavó

en etanol 70% y se dejó secar en horno de vacío. Luego, el ARN viral se resuspendió en 10 µL de H₂O (DNAsa/RNAsa free) a 56 °C durante 10 min. y se almacenó a -80 °C hasta el momento de su uso. Junto con las muestras a analizar, se sumó la extracción de una muestra control positivo (virus O1 Campos 10^{7.5} DURL50%/mL inactivado en Trizol[®]) y una control negativo (H₂O). A partir del ARN viral obtenido, se sintetizó el ADNc mediante una reacción de retro transcripción (RT). La mezcla de reacción se realizó con 2µL de ARN viral, 2.5 µL de Buffer RT 5x (Promega), 1 µL de una solución 10mM de dNTPs (Promega), 0.25 µL de RNAsin 40U/µL (Promega), 0.5 µL de Random Primers 2µg/µL (Alfa DNA), 0.35 µL de Retro-Transcriptasa Reversa M-MLV RT (“Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase”) 200U/µl (Promega) y se completó con 3.4 µL de H₂O (destilada, DNAsa/RNAsa free –Invitrogen-) para obtener un volumen final de 10 µL. La reacción se realizó en el termociclador GeneAmp PCR System 2400 de Perkin Elmer o en el Thrio Termoblock TB1 de Biometra con el siguiente ciclado: 45 min. a 42 °C, 10 min. a 94 °C, infinito a 4°C. Con el ADNc obtenido se realizó una reacción de PCR utilizando 10 µL de la reacción de Retro-transcripción. Se realizó la mezcla de reacción la cual contenía: 1 µL de cada uno de los primers específicos (0.1 mg/mL) (Alfa DNA), 1.5 µL de MgCl₂ 50mg/mL (Invitrogen), 5 µL de Buffer 10X (Invitrogen), 0.25 µL de Taq Polimerasa (500 U/mL) (Invitrogen) y se completó con 31.25 µL de H₂O (destilada, DNAsa/RNAsa free) (Invitrogen) para obtener un volumen final de 50 µL. La reacción de PCR se realizó con oligonucleótidos iniciadores (primers) específicos para VFA (región interna de la polimerasa viral 3D). Las condiciones de la PCR fueron: 94°C durante 3 min., luego 35 ciclos de 1 min. a 94°C, 1 min. a 55°C y 1,5 min. a 72°C, luego 7 min. a 72°C y finalmente hold a 4°C. Los productos de PCR se corrieron en gel de agarosa 1.8% y se observaron las bandas correspondientes al producto de amplificación del VFA: 380 Kpb.

Primers utilizados para la amplificación de VFA ^(Martinez Salas y cols., 1985):

1461: 5'GACCCGAAGTTGAGGCTGCC 3'

1462: 5'GCCGAACTCCGTGCGAAACA 3'

M.4-Modelos in vivo para control de la presencia de proteínas no estructurales en vacunas

M.4.1- Modelo Bovino

M.4.1.1 Selección de Animales

Cuarenta bovinos de entre 6 y 12 meses de edad, provenientes del campo experimental de INTA Castelar fueron utilizados en dos diseños experimentales. Los mismos habían recibido sólo una dosis de vacuna anti-aftosa, según las disposiciones de la *Campaña Nacional de Fiebre Aftosa* vigente.

Previo al desarrollo de las dos pruebas experimentales se tomaron muestras de sangre y líquido esófago faríngeo para ser analizadas usando el ELISA en fase líquida, el ELISA 3AB1 y la técnica RT-PCR.

M.4.1.2-Muestras

Las muestras de líquido esófago faríngeo obtenidas al día 0 de la experiencia fueron tomadas con una copa Probang; dicho líquido se almacenó en tubos Eppendorf de 2mL con 0,5 mL de Trizol[®] Reagent (Invitrogen), las muestras se conservaron a -70 °C hasta ser procesadas.

Las muestras de sangre entera fueron colectadas en tubos Eppendorf de 15mL, los cuales se centrifugaron por 20 min. a 2000 rpm hasta separación completa del suero. Las muestras se alicuotaron en tubos Eppendorf de 2mL y se conservaron a 4°C hasta ser procesadas.

M.4.1.3-Inmunógenos

M.4.1.3.1-Vacunas polivalentes

Se trabajó con formulaciones vacunales polivalentes de elaboración industrial cedidas gentilmente por un laboratorio comercial que había tenido antecedentes de producir vacunas que generaban respuesta contra PNEs determinado en pruebas Oficiales. Dichas vacunas habían pasado las pruebas de potencia e inocuidad, siendo por tanto, inmunogénicas e inocuas para poder ser probadas a campo en la experiencia.

Las vacunas fueron formuladas con los virus A 24 Cruzeiro, A Arg 2000, A Arg 2001, O1 Campos, C3 Indaial y en todos los casos se empleo como adyuvante Marcol 52, con el agregado de

Span 80 y Tween 80 como emulgentes (datos provistos por el fabricante). Dichas formulaciones han tenido diferentes procesos de purificación, como ser precipitación con Polietilenglicol 8000 durante 48 hs. y retiro de sobrenadante hasta volumen necesario para la formulación o bien la precipitación con Polietilenglicol 8000 pero durante 96 hs., y luego el retiro del total del sobrenadante y la posterior recomposición del volumen necesario para formulación con medio de cultivo. Otros antígenos no fueron purificados.

Como control negativo se utilizó una vacuna comercial libre de PNEs.

M.4.1.3.2-Vacunas experimentales

Empleando como inmunógeno la proteína recombinante 3ABC cedida por el *ICT-MILSTEIN*, se formularon vacunas experimentales para estudiar la mínima dosis en que los bovinos eran capaz de desarrollar Acs contra esta PNE. Para formular cada una de las vacunas se colocó en un vaso de precipitado con un agitador magnético, el adyuvante oleoso (Marcol 52) cedido gentilmente por el Laboratorio Biogénesis y se procedió a agitar a baja velocidad mientras se adicionó gota a gota una solución de PBS-1X conteniendo el doble de concentración de antígeno que la concentración final deseada, en el mismo volumen que el adyuvante. Una vez incorporada toda la solución de antígeno se agitó a velocidad media overnight a 4°C. Las fases acuosas se realizaron con distintas masas/dosis de antígeno recombinante detalladas a continuación:

Grupo 1: 670 ng; Grupo 2: 170 ng; Grupo 3: 104,2 ng; Grupo 4: 42.5 ng; Grupo 5: 10.6 ng; Grupo 6: 2.6ng.

Se formuló un volumen suficiente de modo tal que cada animal recibiera una dosis de 2mL.

M.4.1.4-Prueba experimental

M.5.1.4.1-Determinación de la presencia de PNEs en vacunas

Los animales fueron divididos en 8 grupos integrados por 2 a 4 bovinos cada uno; cada grupo recibió un total de tres dosis de 2 mL de vacuna anti-aftosa por vía intramuscular y las inoculaciones se efectuaron a los 0, 30, y 60 días. El muestreo serológico se efectuó a los 0, 30, 60, 90 y 120 dpv. El diseño experimental se detalla en la Fig.16.

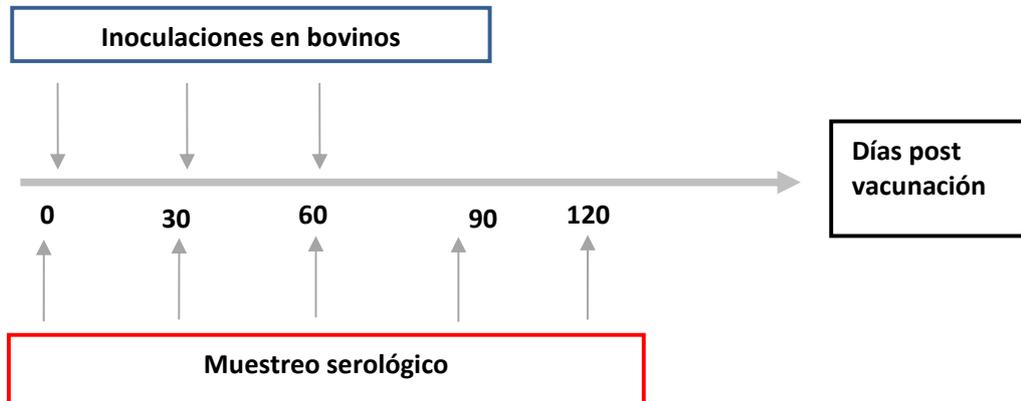


Fig.16.

5.1.4.2-Determinación de la dosis mínima inmunizante de la PNE 3ABC recombinante

Los animales fueron divididos en grupos integrados por 3 bovinos cada uno; cada grupo recibió un total de tres dosis de 2mL de vacuna experimental (formulada con antígeno 3ABC) por vía intramuscular y las inoculaciones se efectuaron a los 0, 30, y 60 días. El muestreo serológico se efectuó a los 0, 30, 60, y 90 dpv (Figura 17).

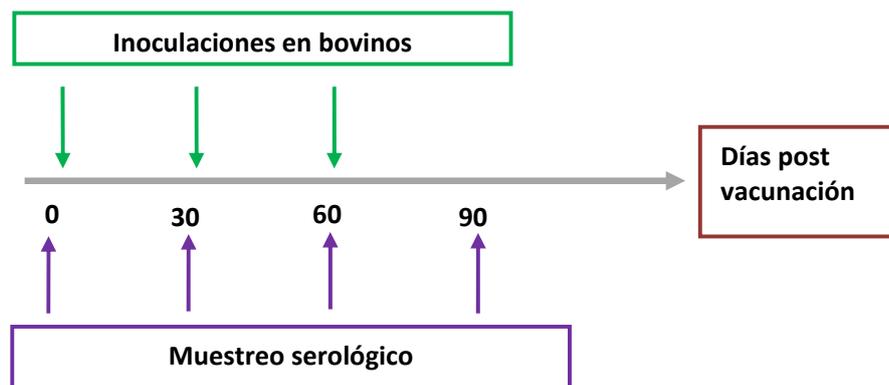


Fig.17

M.4.1.5-Tests Serológicos empleados

Para la detección de Acs anti-PNEs se realizaron las técnicas: ELISA 3AB1, 3ABC ELISA (*ICT-MILSTEIN*), I-ELISA 3ABC (Panaftosa) y ELISA 3D las cuales fueron descritas anteriormente. En el caso de animales inoculados con vacuna polivalente comercial también se analizó el nivel de Acs contra proteínas estructurales (ELISA en fase líquida).

M.4.2-Modelo Murino

M.4.2.1-Determinación de la dosis mínima inmunizante de la PNE 3ABC recombinante

Con el fin de estudiar la mínima dosis capaz de inducir Acs contra PNE-VFA, los murinos fueron divididos en grupos integrados por 5 ratones BALB/c de 2 meses de edad; cada grupo recibió un total de 3 dosis de 0,2mL de vacuna experimental por vía intraperitoneal y las inoculaciones se efectuaron a los 0, 15, y 30 días (Figura 18).

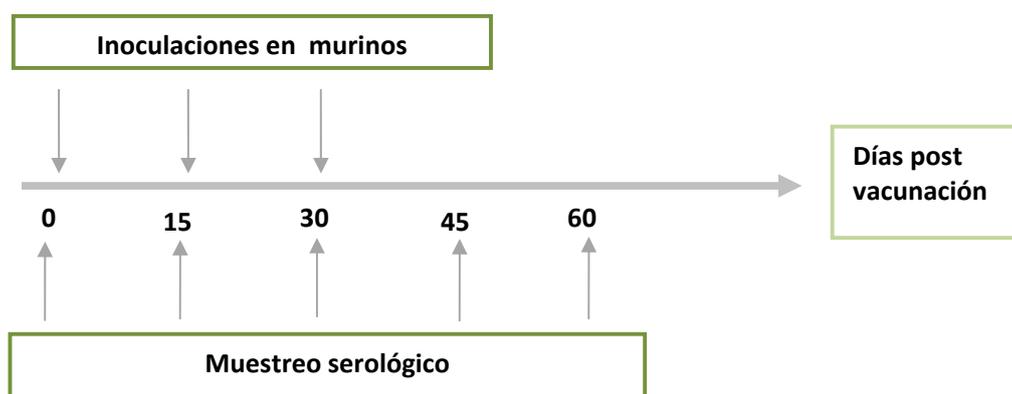


Fig.18.

Para la formulación de las vacunas experimentales se empleó como inmunógeno la PNE del VFA 3ABC recombinante cedida por el *ICT-MILSTEIN*. Para formular cada una de las vacunas se colocó en una jeringa de 2,5 mL la fase acuosa con la concentración adecuada de antígeno, luego en otra jeringa de igual volumen se cargó el adyuvante oleoso cedido gentilmente por el Laboratorio Biogénesis, ambas jeringas se interconectaron por una llave de tres piezas y se procedió a agitar manualmente a baja velocidad a modo de generar una formulación al 50 % fase en acuosa y 50 % en fase oleosa.

Las fases acuosas se realizaron con distintas masas/dosis de antígeno recombinante detalladas a continuación:

Grupo 1: 670 ng; Grupo 2: 170 ng; Grupo 3: 42.5 ng; Grupo 4: 26 ng Grupo 5: 10.6 ng; Grupo 6: 2.6ng.

El muestreo serológico se efectuó a los 0, 15, 30, 45 y 60 dpv. La respuesta inmune se evaluó empleando el test serológico desarrollado para el modelo murino mencionado en la sección M.2.2.5 de este apartado.

M.4.2.2-Estudio preliminar en vacunas

Se trabajo con 6 grupos experimentales conformados por ratones BALB/c de 2 meses de edad. Los mismos fueron inoculados con vacunas oleosas comerciales polivalentes previamente evaluadas en el modelo bovino.

Cada animal recibió un total de 3 inoculaciones por vía intraperitoneal en un intervalo de 15 días; el volumen de la dosis fue de 0. 2mL/ animal.

El muestreo serológico se realizó a los 0, 15, 30, 45 y 60 dpv; La respuesta inmune se evaluó empleando el test serológico desarrollado para el modelo murino mencionado en la sección M.2.2.5 de este apartado (ELISA 3AB1 ratón). El diseño experimental se detalla en la Fig.19.

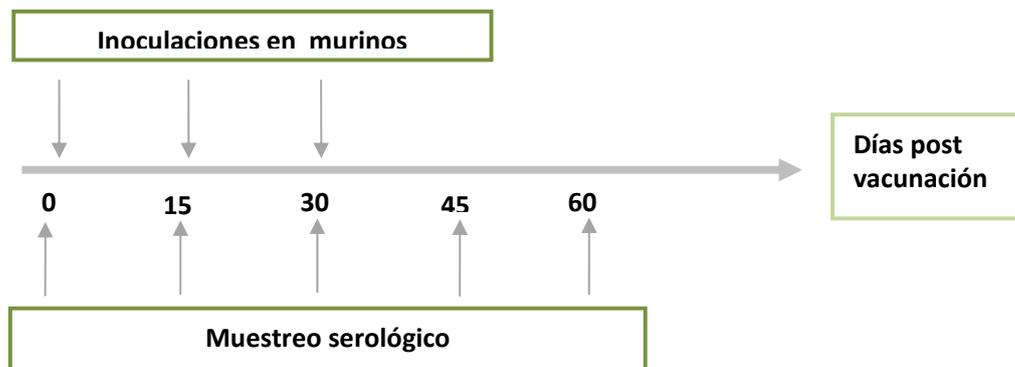


Fig.19.

M.5-Modelo in vitro para determinación de proteínas no estructurales en formulaciones vacunales

En esta sección se estudia la factibilidad y el desarrollo de un test que podría permitir a futuro la detección de PNEs ya sea en la formulación vacunal, en muestras de bancos de antígenos o bien analizar las distintas etapas de purificación de la vacuna para corroborar la clarificación y eliminación de estas proteínas a fin de realizar un control durante las etapas de producción. Se eligió un ELISA de captura indirecto, en donde el antígeno no estructural (de estar presente en la vacuna) sería capturado por un Ac específico previamente adherido a la placa de ELISA, y posteriormente sería detectado con un segundo Ac, también específico. De haber reacción inmunológica la misma se evidenciaría empleando un Ac conjugado con peroxidasa anti-especie y revelada con OPD. La ventaja de este formato de ensayo es la posibilidad de analizar varias muestras en una misma placa, (que podría corresponderse a las distintas etapas de producción de un lote vacunal), la especificidad brindada al trabajar con los Acs anteriormente mencionados, y por último el ensayo, si bien es cualitativo, empleando un control estándar adecuado y realizando los estudios pertinente podría brindar una estimación cuantitativa de la masa de antígeno remanente presente en la muestra analizada.

M.5.1-Desarrollo de ELISA de captura para la detección de proteínas no estructurales.

M.5.1.1-Factibilidad

Se emplearon como captura sueros policlonales de conejo, bovino y ratón anti- 3AB1 un AcM de referencia y el AcM anti-3AB1 para evaluar el mejor sistema de captura; como detectores se estudiaron un suero de cobayo monoespecífico, un suero de cobayo infectado y un suero de cobayo normal. Se emplearon como antígeno las proteínas recombinantes 3AB1 y 3ABC.

M.5.1.2-Optimización y estandarización de los reactivos

M.5.1.2.1-Selección del Buffer de captura

Se evaluaron tres buffer de captura: buffer carbonato de sodio /bicarbonato de sodio (BCB), 50mM pH9,6; TRIS-HCl 20mM pH 8,5 y PBS 10M, pH 7,2 . La incubación de esta etapa se realizó a 4°C durante 12 horas.

M.5.1.2.2-Ajuste de la dilución de uso del anticuerpo monoclonal anti-3AB1 utilizado como captura

Se ajustó la dilución de uso del AcM captura. Se hicieron diluciones dobles de dicho Ac desde 1/1000 hasta 1/16000 y se midió su absorbancia a distintas concentraciones (ng/pocillo) de la proteína estándar.

M.5.1.2.3-Selección del Buffer de Bloqueo

Se analizaron un total de 8 bloqueantes, PBST-gelatina 1%, PBST-BSA 1%, buffer polivinilpirrolidona (PVP), PBST-1X, PBST-SNE 10%, PBST-LECHE3%, PBST-SNE10%-LECHE3%-PBST-OVA 1% para evitar pegadas inespecíficas de componentes del suero detector. De dichos bloqueantes se adicionaron 70 µL/pocillo y la incubación se llevó a cabo durante 1 h a 37°C con agitación.

M.5.1.2.4-Suero de cobayo detector específico y Conjugado anti-IgG de cobayo-peroxidasa

Con el suero de cobayo anti-3AB1 se realizaron diluciones seriadas en PBST-OVA1%-SNR al 2% y se comparó respecto de un suero normal de cobayo empleados como detectores en el sistema de ELISA y un suero de cobayo infectado con el VFA serotipo C. La incubación de esta etapa fue de 30 min. a 37°C con agitación. Para determinar la dilución óptima del conjugado anti-especie se hicieron diluciones de trabajo desde 1:500 hasta 1:8000 en PBST-OVA1%-SNR2%, se incubó 30 min. a 37°C. Luego se adicionó el sustrato OPD (Sigma 0,4 mg/mL) en tampón 0,1M citratotrisódico, a pH 4,5 y H₂O₂ al 0,03% durante 15 min. Posteriormente, se detuvo la reacción con H₂SO₄ 2 N y se realizó la lectura a 492 nm. Entre cada paso del ensayo se realizaron 3 lavados con PBS 0.25X-Tween 20 al 0,05% para eliminar los excesos de reactantes.

M.5.1.2.6 Parámetros de calidad del ELISA

Se analizaron los parámetros Precisión (Repetibilidad o precisión intraensayos; precisión intermedia o interensayos y reproducibilidad o precisión interlaboratorios), límite de detección y se realizó la curva de regresión pertinente.

Se utilizaron distintas concentraciones de proteína 3AB1 purificada y distintos lotes de la misma de modo de determinar el límite de detección de la técnica. Posteriormente se analizó otro antígeno recombinante, la proteína 3ABC cedida gentilmente por el *ICT MILSTEIN*, la cual comparte epitopes con la proteína estándar y se la empleó a modo de comprobar si el test desarrollado era capaz de capturarla.

M.5.1.2.7-Protocolo final del ELISA de captura

Una vez comprobada la factibilidad del ELISA de captura y analizado cada uno de los reactivos componentes del test se confeccionó un protocolo definitivo de esta técnica donde se describieron todos los reactivos utilizados, junto al procedimiento del ensayo.

M.5.2-Utilización del ELISA de captura

M.5.2.1-Evaluación de la presencia de PNEs en formulaciones vacunales experimentales

A modo de evaluar en forma cualitativa la presencia de la PNE 3ABC en formulaciones vacunales empleando como herramienta el test de captura previamente desarrollado, se utilizaron 4 de las vacunas experimentales que fueran usadas como inmunógeno en la sección de *Modelos in vivo para control de la presencia de PNE-VFA en vacunas*.

Vacuna	Concentración inmunógeno	Dosis inoculada	Fase Acuosa	Fase oleosa
	3ABC total (ug/mL)	3ABC ng	PBS 1X	Marcol 52
#2	0,84	167	50%	50%
#3	0,21	42,5	50%	50%
#4	0,13	26	50%	50%
#5	0,05	10,6	50%	50%

Fig. 20: Características de las vacunas utilizadas

El procedimiento para realizar estas formulaciones fue descripto en la sección M.4.1.3.2 de materiales y métodos.

M.5.2.1.1-Extracción de la PNE 3ABC desde formulaciones oleosas experimentales

Las vacunas oleosas se llevaron a temperatura ambiente, se agitaron 2 min. e inmediatamente se recolectaron 1,5 mL para la extracción; tras agregar 3 mL de diclorometano y

0,25 mL de agua destilada los tubos conteniendo las formulaciones se agitaron 3 min. en vortex y se dejaron reposar otros 3 min. Una vez realizada la centrifugación a 2000 rpm durante 5 min.; la fase acuosa fue transferida a un tubo de 2 mL. Al residuo oleoso se le añadió 0,5mL de agua destilada repitiendo todo el procedimiento 2 veces; los extractos acuosos se reunieron y sin concentrar se procesaron por el test ELISA de captura.

M.5.2.2-Evaluación de la presencia de PNEs nativas en sobrenadantes de cultivo de células infectadas con el VFA

Si bien al momento de finalizada esta tesis no se pudo realizar un control sobre la producción de vacunas con el test desarrollado, se procedió alternativamente a la infección de células susceptibles al VFA; desde el sobrenadante de las mismas, luego de haberse corroborado el efecto citopático, se evaluó la factibilidad de capturar PNEs nativas pero sin concentrar el sobrenadante celular.

M.5.2.2.1-Infección de células BHK-21 con el VFA

Una monocapa de células BHK-21 contenida en un frasco de 150 cm² fue infectada con 1,5 mL de VFA A2001 en 15 mL de medio MEM D durante 90 min. de adsorción a 37°C en CO₂ 5%.

A las 72 horas se congeló el cultivo con total efecto citopático y se mantuvo a -20°C, el mismo fue inactivado con una solución de 2-Bromoetilamin.a.HBr (BEI) al 1% en NaOH 0,2 M durante 18 horas a 37°C con agitación leve. A la suspensión viral ya inactivada contenida en el frasco de 150 cm² se le añadió la centésima parte del volumen total de la solución de Tiosulfato de Sodio 1M (con el objeto de destruir el BEI remanente) y se mantuvo 30 min. a 37°C con agitación leve. Luego de dicho procedimiento se retiró el cultivo del área de bioseguridad NBS3A.

R-Resultados

R.1-Producción de reactivos para las diferentes técnicas y ensayos

R.1.1-Proteína recombinante 3AB1

R.1.1.1-Detección de la presencia del inserto en las bacterias transformadas y análisis de restricción

La secuencia nucleotídica que codifica para los 176 aminoácidos del péptido 3AB1 se clonó en el plásmido pRSET A (Invitrogen) ^(Silberstein et al., 1997). Este vector de expresión cedido gentilmente por el Instituto de Biotecnología de INTA Castelar, es controlado por el promotor T7, incorpora en 3' un punto de unión a ribosoma, un ATG y una secuencia que codifica para 6 histidinas consecutivas, tras la cual se clona en el mismo marco de lectura la secuencia que codifica para la proteína de interés.

En 10 colonias seleccionadas al azar de *E. coli* BL21 transformadas con el plásmido recombinante pRSET A-3AB1 fue confirmada la identidad del inserto por PCR con los cebadores específicos "T7 forward" y "T7reverse". Los resultados obtenidos por colony PCR verificaron que las colonias contenían el inserto de tamaño correcto (Fig. 21).

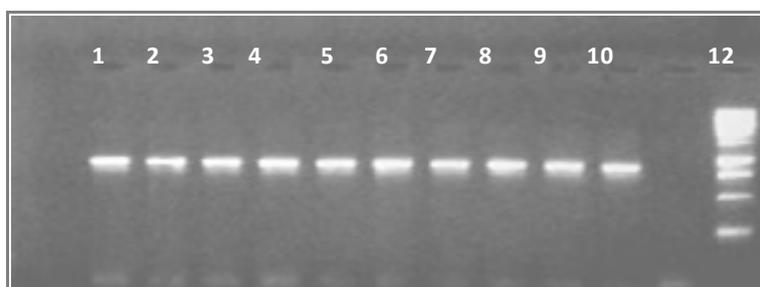


Fig.21: Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos en la verificación del correcto ensamblado de los fragmentos del plásmido pRSET A-3AB1. En los carriles 1 a 10 se ven los productos de 10 colonias seleccionadas, en el carril 12 MPM: Marcador de Peso Molecular (1 Kb Ladder).

Posteriormente se hizo un análisis por restricción enzimática sobre 4 de las colonias positivas por PCR. Estos clones fueron digeridos con una enzima de corte único (*Bam*H I) para

linealizar el plásmido y mediante la digestión con dos enzimas flanqueantes del inserto (*BamH I* y *Hind III*) se logró liberar el mismo en el clon 8 y 9 verificando así su tamaño (1Kb aprox.)

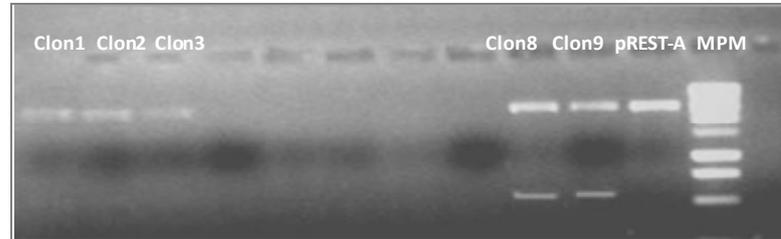


Fig.22: Confirmación del plásmido recombinante *pRSET A-3AB1* por digestión con dos enzimas de restricción. Se observa el producto de la digestión doble con las enzimas *Hind III* y *BamH I*, liberándose un fragmento de tamaño correspondiente al esperado para los clones 8 y 9. E vector *pRSET A* sin inserto fue digerido con la enzima *BamH I* para el cual se observa una banda de 3Kb en el último carril se ubica nuevamente el MPM de 1Kb.

R.1.1.2-Secuenciación de la porción codificante para la proteína 3AB1 presente en el plásmido *pRSET A-3AB1-his*

De los clones de *E. coli* transformados con el plásmido *pRSET A* analizados en el punto anterior, se seleccionó el clon 8 con el cual se realizó la secuenciación aminoacídica “in silico” (*CLUSTAL W-BIOEDIT*) que demostró una identidad del 90% con relación a secuencias aminoacídicas de la proteína 3AB1-VFA, presentes en el Gene Bank.

A continuación se muestra tanto la secuencia nucleotídica como la aminoacídica de la proteína recombinante 3AB1, y luego el alineamiento resultante entre la secuencia aminoacídica de la proteína 3AB1 y la proteína 3AB del VFA obtenida de la Base de Datos del Gene Bank.

Secuencia nucleotídica: proteína 3AB1 recombinante

```

>MVT-3AB1-T7promotor
ATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGGGATCTGTACGACGATGACG
ATAAGGATCGATGGATCCGACCTCGAGCAATCTCAATTCCTTCTCAAAAATCCGTGCTGTACTTTCTCATCGAGAA
GGGCCAGCACGAGGCTGCAATTGAATCTTTGAGGGCATGGTACACGACCCCATCAAGGAGGAGCTCCGGCCTCTC
ATCCAACAGACCTCATTTGTGAAACGCGCTTTCAAGCGCTTGAAGGAAAACCTTTGAGATTGTTGCCCTATGTTTGA
NCCTTCTGGCCNACATAGTGATCATGATCCGCGAAACTCGCAAGAGGCAGAAAATGGTGGATGACGCAGTGAGCGA
GTACATCGAGAAGGCAAACATCACCACGGATGACAAGACCCTTGACGAGGCGGAAAAGAACCCTCTGGGGACCAGC
GGCGCCACCGCTGTAGGTTTCAGAGAGAAAACCTAACGGGTCAAAGGGCGTGTGATGACGTGAACTCCGAGCCTG
CCCAGCCCCTGGAGAGCAACCACTAGCTGAAGGACCCTACTCCGGGCCGCTTGAGCGCCAGAGACCTCTGAAGGT
GAGAGTTAAGCTCCACAGCAGGAGTAACTCGAGATCTGCAGCTGGTACCATGGAATTCGAAGCTTGATCCGGCTG

```

Fig.23: Secuencia nucleotídica obtenida del inserto del plásmido pRSET A-3AB1-his. La secuencia codificante para la proteína 3AB1 se destaca en negro, seguida del codón stop (rojo); En azul se pueden observar los fragmentos de la secuencia del plásmido pRSET A y la secuencia que codifica para la cola de histidinas.

A-Secuencia aminoacídica de la proteína 3AB1 recombinante

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      5      15      25      35      45
3AB1 AISIPSQKSV LYFLIEKGQH EAAIEFFEGM VHDPIKEELR PLIQQTSFVK

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      55     65     75     85     95
3AB1 RAFKRLKENF EIVALCLXLL AXIVIMIRET RKRQKMVDDA VSEYIEKANI

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      105    115    125    135    145
3AB1 TTDDKTLDEA EKNPLGTSGA TAVGFREKTL TGQRACDDVN SEPAQPAGEQ

      ....|....| ....|....| ....|....|
      155    165    175
3AB1 PLAEGPYSGP LERQRPLKVR VKLPQQE---

```

B-Alineamiento de las secuencias de aminoácidos: 3AB1 – 3AB

	5	15	25	35	45
3AB1	AISIPSQKSV	LYFLIEKGQH	EAAIEFFEGM	VHDPIKEELR	PLIQQTSFVK
3AB	-ISIPSQKSV	LYFLIEKGQH	EAAIEFFEGM	VHDSIKEELR	PLIQQTSFVK
Clustal Co	*****	*****	*****	***.	*****

	55	65	75	85	95
3AB1	RAFKRLKENF	EIVALCLXLL	AXIVIMIRET	RKRQKMVDDA	VSEYIEKANI
3AB	RAFKRLKENF	EIVALCLTLL	ANIVIMVRET	RKRQKMVDDA	VNEYIEKANI
Clustal Co	*****	*****	**	* ****:***	*****

	105	115	125	135	145
3AB1	TTDDKTLDEA	EKNPLGTSGA	TAVGFREKTL	TGQRACDDVN	SEPAQPAGEQ
3AB	TTDDKTFDEA	EKNPLETSGA	STVGFRERTL	PGQKACDDVN	SEPAQPVEGQ
Clustal Co	*****:***	*****	****	::*****:***	.**:*

	155	165	175		
3AB1	PLAEGPYSGP	LERQRPLKVR	VKLPQQE		
3AB	PQAEGPYAGP	LERQKPLKVR	AKLPQQE		
Clustal Co	* *****:***	*****:*****	.*****		

Fig.24: A. Fragmento de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la proteína 3AB1. B. Alineamiento entre ambas secuencias de aminoácidos de la proteína 3AB1 y de la proteína 3AB del VFA obtenida de la Base de Datos del Gene Bank. Se encuentran resaltados con asteriscos, los aminoácidos que son idénticos entre ambas secuencias.

R.1.1.3-Predicción de determinantes antigénicos en la proteína 3AB1

Se compararon y alinearon las secuencias de aminoácidos predichas para la proteína recombinante 3AB1 y la proteína 3AB obtenida en el Gen Bank. Los determinantes antigénicos predichos están resaltados debajo de las secuencias en color rojo, en donde los asteriscos (*) corresponden a aminoácidos totalmente conservados y los puntos (.) a aquellos que varían en una de las secuencias. Empleando el método de Kolaskar y Tongaonkar se determinaron 5 posibles epitopes B, en 3 de los cuales encontramos entre una secuencia y otra, mutaciones puntuales en 2 aminoácidos. Sin embargo, el reconocimiento de la proteína por sueros de bovinos infectados con el VFA por Western blot, indica que alguno de esos epitopes B se expresan durante el curso de la

infección (R.1.1.6.1); posteriormente sueros de ratones inmunizados con dicha proteína fueron capaces de reconocer PNEs nativas al infectar células BHK-21 con el VFA, lo cual se puso en evidencia por Inmunofluorescencia indirecta (R.3.1.3.4)

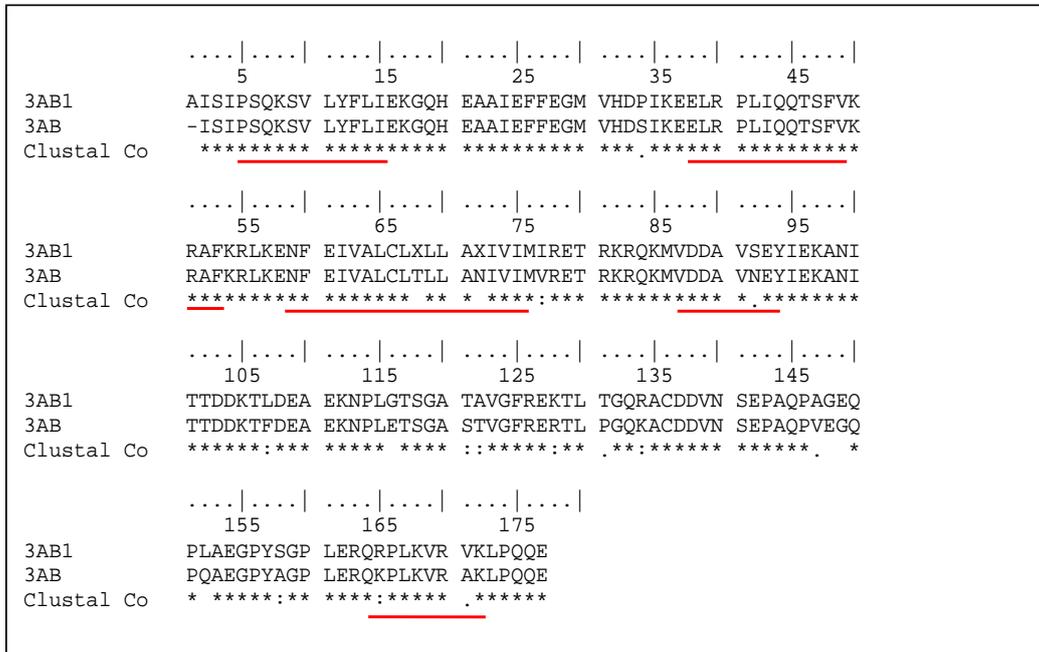


Fig.25: Predicción de epitopes B, empleando el método de Kolaskar y Tongaonkar. Se comparó y alineó las secuencias de aminoácidos de la proteína recombinante 3AB1 y la proteína 3AB obtenida de la bases de datos del Gen Bank, en rojo se destacan los epitopes B predichos.

R.1.1.4-Expresión de la proteína 3AB1 recombinante

Una vez seleccionado el clon de bacterias *E.coli* BL21, transformadas con el plásmido pRSET A-3AB1-his con la secuencia codificante para la proteína 3AB1, se realizó una experiencia previa para confirmar la expresión y ajustar tiempos de incubación para futuras producciones de proteína.

De este modo, mediante la realización de minigeles de poliacrilamida al 12% teñidos con Coomassie blue se analizó el nivel de expresión de la proteína 3AB1 en el cultivo de *E.coli* transformado con el plásmido pRSET A-3AB1-his con o sin inducción por el agregado de IPTG. Se observó un aumento gradual en la expresión de la proteína 3AB1 (PM=27 Kd) en el cultivo

inducido con el transcurso del tiempo de inducción (muestras tomadas cada 30 min. post-inducción) en comparación con el no inducido.

En la Fig.26, se observa que partir de los 30 min post inducción hay un incremento en la expresión de la proteína 3AB1 (calle 3) respecto del cultivo sin inducir (calle2), en las calles 4, 5, y 6 se ve el aumento en el nivel de expresión a los 60, 90 y 120 min. post inducción de la proteína 3AB1 (PM=27 Kd) en el cultivo transformado e inducido.

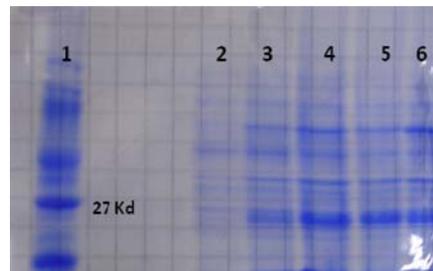


Fig.26: Electroforesis en SDS-poliacrilamida 12%, en geles teñidos con Coomassie blue. Se analizó la expresión de la proteína 3AB1 en cultivos de E.coli transformados con el plásmido pRSET A-3AB1-his, sin inducir (calle 2) y a distintos tiempos post- inducción con IPTG. (calles 3 4, 5, y 6). En la calle 1 se sembró el marcador de peso molecular.

Para confirmar en forma específica la presencia de la proteína 3AB1 en el cultivo transformado y luego inducido con IPTG, se realizó la transferencia desde el gel de poliacrilamida al 12% a una membrana de nitrocelulosa para realizar posteriormente la técnica de Western blot, utilizando como primer Ac un suero policlonal anti-VFA proveniente de un animal de referencia infectado con VFA (091), un Ac policlonal mono específico anti-3AB1 (HA5) y un AcM anti-his. En todos los casos pudo observarse la banda de 27 Kd correspondiente a la proteína 3AB1 expresada en los cultivos inducidos con IPTG previo a su enriquecimiento.

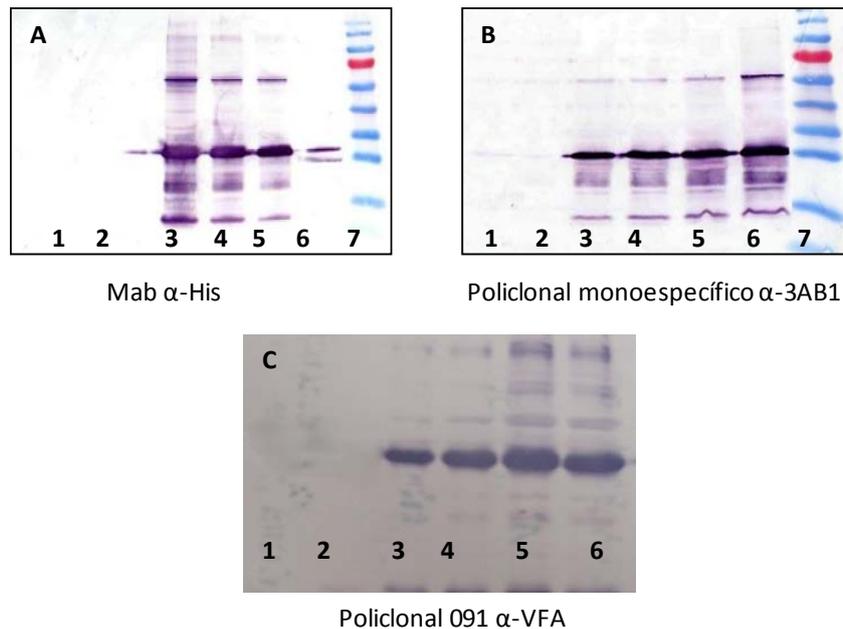


Fig.27: Western blot de la proteína recombinante 3AB1 realizado a partir de cultivos de *E.coli* transformados con el plásmido pRSET A-3AB1-his e inducidos con IPTG previo a su purificación. En cada membrana (A, B y C) se emplearon diferentes primeros Acs como indican las leyendas de la figura. 1. cultivo de *E.coli* sin transformar. 2. cultivo de *E.coli* transformado sin inducir 3.4.5.6. Tiempos de inducción de *E.coli* transformado e inducido con IPTG 7.MPM.

R.1.1.5-Producción de stock de proteína recombinante 3AB1 mediante enriquecimiento por el método de SDS-PAGE / Electroelución

Se prepararon tres stocks proteicos para la realización del presente trabajo. Mediante la electroforesis en geles de poliácridamida bajo condiciones desnaturalizantes en formato grande (SDS-PAGE Large), de cultivos de *E.coli* BL21 transformados con el plásmido pRSET A-3AB1-his e inducidos con IPTG se identificó la banda de 27 Kd correspondiente a la proteína recombinante 3AB1 (Fig.28), luego se realizaron dos cortes paralelos, por encima y por debajo para extraer la sección del gel con la proteína recombinante en forma aislada del resto de las proteínas presentes en la muestra. Una vez electroeluída del gel, se obtuvo a la proteína 3AB1 recombinante en forma soluble y enriquecida.

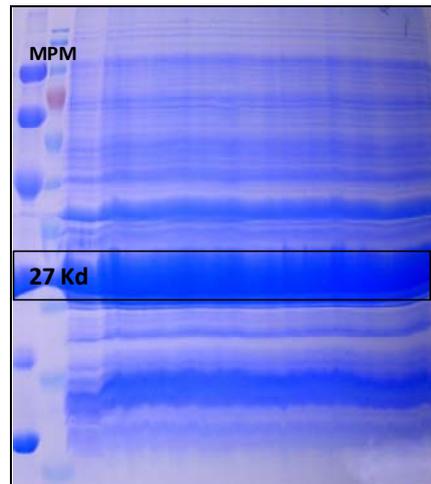


Fig.28: Gel de poliacrilamida (12%) formato grande (20 x 22 cm) teñido con Coomassie blue. Bandas correspondientes al lisado del cultivo de bacterias *E.coli* BL21 transformadas con el plásmido pRSETA-3AB1-his, e inducidas con IPTG. MPM (marcador de peso molecular). La banda remarcada se corresponde a la proteína recombinante 3AB1.

R.1.1.6- Caracterización de la proteína recombinante 3AB1 obtenida

R.1.1.6.1-Electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) evidenciada por tinción con Coomassie blue y Western blot

La identidad de la proteína obtenida se evaluó realizando un gel de poliacrilamida al 12% donde se sembró la proteína recombinante soluble escindida; luego de realizar la corrida electroforética se tiñó el gel con Coomassie blue, para realizar el correspondiente análisis de la proteína 3AB1. A continuación se efectuó el Western blot utilizando distintos primeros Acs: 1) un AcM anti-his y 2) un Ac policlonal "031" anti-VFA procedente de un animal de referencia infectado con el VFA, ambos Ac revelan específicamente, la presencia de una banda de 27 Kd correspondiente a la proteína recombinante 3AB1.

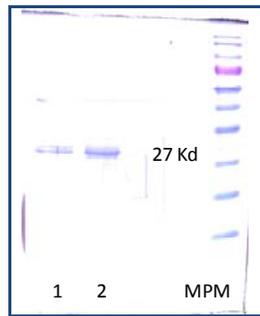


Fig.29: Gel de poliacrilamida (12%) teñido con Coomassie blue. MPM: marcador de peso molecular; calle 1: proteína 3AB1 stock de referencia; calle 2: proteína 3AB1 (27 Kd) purificada por SDS-PAGE / Electroelución.

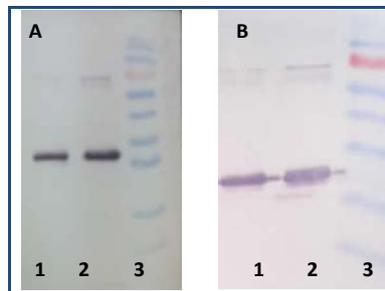


Fig.30: Western blot de la proteína 3AB1. A: Utilizando como primer Ac un AcM anti-his. B: Utilizando como primer Ac un suero policlonal "031" anti-VFA de referencia procedente de un bovino infectado. Calle 1: 3AB1 stock correspondiente al gel de la Fig.21, solución enriquecida por SDS-PAGE/Electroelución; Calle 2: stock de referencia, purificado por columna de afinidad, de proteína 3AB1 (27 Kd).

Se realizó un estudio detallado del stock de trabajo por Western blot. Para ello se utilizó un panel de sueros de referencia para VFA:

- 4 sueros bovinos, provenientes de animales infectados con el VFA (de 21 días post infección).
- 1 suero policlonal mono específico (HA5).
- 3 sueros bovinos provenientes de animales no infectados con el VFA, no vacunados contra la enfermedad.
- 2 sueros bovinos provenientes de animales no infectados con el VFA, vacunados contra la enfermedad.

Los resultados obtenidos se muestran en la Fig.31, donde se puede observar que los sueros de los animales infectados y así como también el suero policlonal monoespecífico empleados como primeros Acs detectan la banda de 27 kd correspondiente a la proteína purificada. En cambio con el panel de sueros no infectados empleados como primeros Acs no se observó detección de banda alguna correspondiente al peso molecular de la proteína 3AB1.

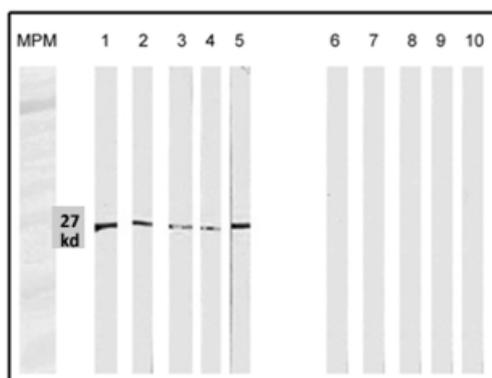


Fig.31: Western blot de la proteína 3AB1 purificada. Calle MPM: corresponde al marcador de peso molecular. Calle 1: membrana incubada con el suero policlonal monoespecífico; calles 2 a 5: membranas incubadas con sueros de referencia provenientes de animales infectados con el VFA (como primer Ac). Calles 6 a 10: membranas incubadas con sueros de referencia provenientes de animales no infectados con el VFA (como primer Ac); de dichos sueros, los utilizados en las calles 7, 8 y 10 provienen de animales no vacunados contra el VFA; mientras que los utilizados en las calles 6 y 9 provienen de animales vacunados contra el VFA. Se puede observar una banda de 27 Kd correspondiente a la proteína 3AB1 (calles 1 a 5).

R.1.1.6.2-Cuantificación y Rendimiento

La concentración proteica se determinó empleando los métodos físico químicos de Bradford y el kit comercial *Micro BCA protein assay kit*, de Pierce. También se estimó la masa proteica mediante geles de poliacrilamida al 12% por comparación colorimétrica con una curva estándar de BCA. A partir de este resultado se estimó el rendimiento (en μg de proteína 3AB1 recombinante obtenida por litro de cultivo); así como también el número de determinaciones posibles (utilizando la técnica de ELISA 3AB1) por litro de cultivo para cada uno de los stocks.

Stock	Concentración (ug/ul)	η (ug/L)	η (det/L) ELISA 3AB1
2006	0.170	20000	150000
2007	0.133	16000	120000
2008	0.4	> 20000	>120000

Fig. 32: La tabla indica la concentración de cada uno de los stocks proteicos obtenidos ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$), como también el rendimiento de cada lote. Referencia η : rendimiento en μg de proteína/Litro de cultivo bacteriano y en determinaciones/Litro de cultivo bacteriano.

R.1.1.6.3-Inmunogenicidad de la proteína recombinante 3AB1

R.1.1.6.3.1-Detección de la proteína 3AB1 nativa y/o sus precursores por inmunofluorescencia

Con el objeto de seguir evaluando la capacidad inmunogénica de la proteína 3AB1 se utilizó la técnica de inmunofluorescencia indirecta con la cual sueros de ratones inoculados con dicho péptido reconocieron la proteína nativa y/o sus precursores, en células infectadas con el VFA. Se observó la reactividad de los Acs murinos sobre las células BHK-21 infectadas con el virus de la cepa O1 Campos en contraposición con un SNR para VFA, donde no hay reactividad alguna, concluyéndose que este es un péptido capaz de generar Acs.

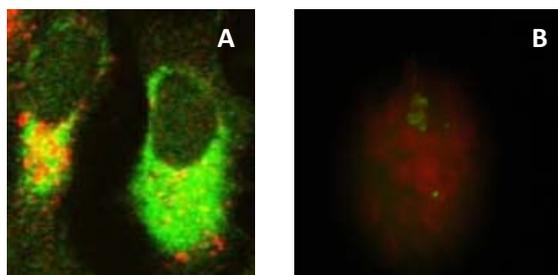


Fig.33: Inmunofluorescencia indirecta: células BHK-21 infectadas con VFA e inactivado. En la foto A, se empleó suero de ratón anti-3AB1 como primer Ac y en la foto B un SNR. En ambos casos el segundo Ac empleado para realizar la detección es un anti-ratón conjugado con fluoresceína.

R.1.1.6.3.2-Detección de anticuerpos anti-3AB1 en ratones

Empleando la técnica de ELISA 3AB1, se analizaron los sueros provenientes de dos grupos de 5 ratones BALB/c inoculados con 5 μ g de la proteína recombinante o con 5 μ g de una proteína de *E.coli* BL21 de PM similar a la proteína 3AB1 (sistema que no expresaba la proteína de interés) obtenida por el mismo proceso de purificación y se los comparó con un grupo de sueros normales. Como se observa en el gráfico 34, la proteína 3AB1 induce una respuesta de Acs que produce una alta señal positiva en el ELISA, comparada con la proteína de *E. coli* inoculada en ratón, mientras que los sueros normales están muy por debajo del punto de corte (P.C) establecido (R.1.2.5).

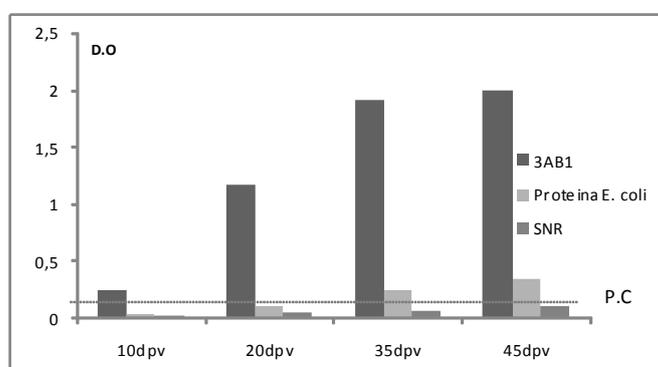


Fig.34: Comparación de sueros de ratón inoculados con la proteína 3AB1 recombinante y con una proteína de *E.coli* respecto de SNR. En el eje vertical se grafican las densidades ópticas medias obtenidas en el ensayo de inmunoenzimático y en el horizontal los días post vacunación.

R.1.2-Puesta a punto del ELISA 3AB1 ratón

R.1.2.1-3AB1 como antígeno para ser utilizado en la técnica de ELISA

La dilución óptima de uso de la proteína 3AB1 en la etapa de sensibilización de la técnica de ELISA, fue de 0,0066 μ g/pocillo en buffer carbonato/bicarbonato (pH=9,6) la incubación se llevó a cabo durante 12 hs a 4°C.

R.1.2.2-Control de ensayo positivo

Se desarrolló, según fuera descripto en la sección de materiales y métodos, un suero policlonal de ratón monoespecífico anti-3AB1 (M1). El propósito de su elaboración fue poder

contar con un suero control positivo interno del ensayo o control de placa. Se obtuvieron 4 mL de suero, los cuales fueron alicuotados y conservados a -70°C para preservar su estado. El suero M1 fue analizado en forma conjunta por Western blot comprobando su reacción específica contra las PNEs 3AB1 y 3ABC.

Posteriormente se realizó, a través del ELISA 3AB1, la titulación del suero M1. Se prepararon diluciones seriadas al medio del suero en buffer de dilución del ELISA 3AB1 (desde 1:50, hasta 1:128000). Todas las diluciones fueron analizadas con el ELISA 3AB1. El ensayo se repitió en 3 ocasiones diferentes (días consecutivos). Con todos los datos obtenidos, se realizó una curva de titulación para evaluar el grado de reactividad del suero M1. En la Fig.35 se muestra la curva obtenida para el suero M1 junto a la obtenida, para un pool de sueros de ratones normales.

A partir de la curva obtenida para el suero M1 (Fig.35), y considerando el valor límite de positividad (punto de corte) correspondiente a la técnica de ELISA 3AB1 ratón, se establecieron dos diluciones del suero M1: 1) una dilución equivalente a un suero positivo fuerte (1:500), denominada control positivo fuerte (CPF); y 2) una dilución equivalente a un suero positivo medio (1:1500), denominada control positivo medio (CPM), para ser utilizadas como controles de positividad y validez en el test de ELISA 3AB1 para el modelo ratón. Las dos diluciones finales, se realizaron en una matriz de en SNR.

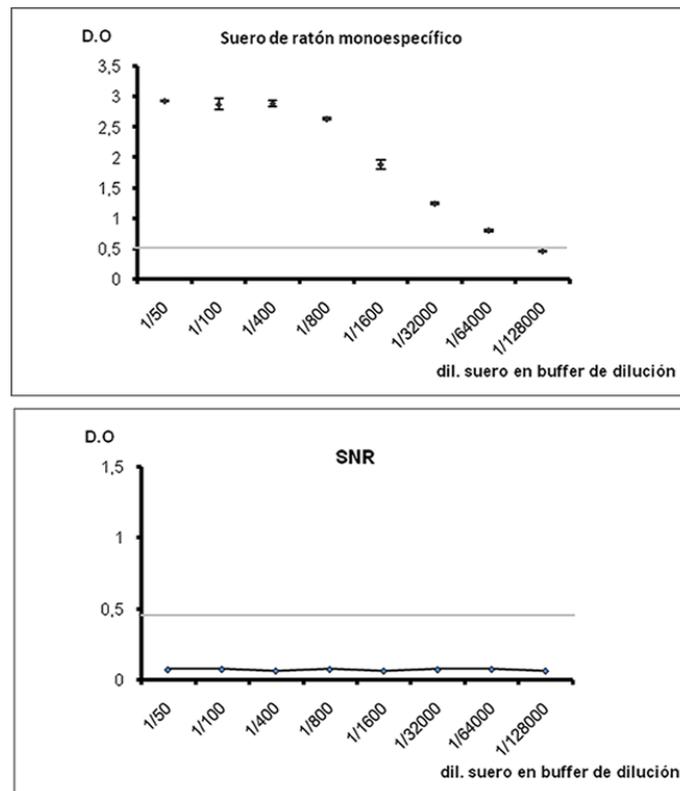


Fig.35: Curva de dosis-respuesta para suero policlonal mono específico anti-3AB1 "M1" y un pool de SNR analizados por la técnica de ELISA 3AB1. En el eje vertical se muestran los resultados obtenidos (densidades ópticas brutas) en función de las diluciones de cada suero (eje horizontal). Cada punto representa el promedio \pm un desvío estándar (D.E) de series individuales de dilución ($n=3$). La línea horizontal en el gráfico de la derecha señala el resultado promedio ($n=34$) para la técnica de ELISA 3AB1, del suero control "H5A" para el ELISA Bovino tomado de referencia, en la dilución de uso de dicha técnica (1:100).

Se realizaron por medio de la técnica de ELISA 3AB1, 17 series de 2 repeticiones cada una ($n=34$ repeticiones) donde se analizaron las diluciones 1:500 y 1:1500 del suero M1 (Fig.36). Esto permitió ver por un lado la reproducibilidad de los resultados obtenidos con las diluciones del suero M1, y por otro demostrar la aptitud de éstas como posibles controles positivos (CPF y CPM) de trabajo.

La dilución de las muestras para el ELISA 3AB1 modelo ratón quedó establecida en 1:50, la misma es lo suficientemente concentrada para obtener reactividad con un suero positivo, dado que para dicha dilución el pool de sueros normales se mantiene muy por debajo del punto de corte establecido (Fig.35).

Medidas de Resumen	M1	M1
	(1:500)	(1:1500)
	CPF	CPM
N	34	34
D.O media	1,1	0,95
Desvío estándar	0,24	0,25
CV%	23	26

Fig.36: En la Tabla se muestran los resultados del análisis por ELISA 3AB1 del suero M1 en sus dos diluciones (en SNR) de uso propuestas, M1 1:500 (CPF) y M1 1:1500 (CPM). Se muestran los valores promedio de los resultados (expresados como densidad óptica bruta), desvíos estándar y coeficientes de variación obtenidos para cada uno de los sueros analizados. D.O: densidad óptica, N: número de repeticiones, CV: coeficiente de variación.

Por lo tanto, se definieron tres controles internos del ensayo:

- Un control positivo Fuerte (CPF): el suero M1 en dilución 1:500.
- Un control positivo Medio (CPM): el suero M1 en dilución 1:1500.
- Un control negativo (CN): pool de suero normal ratón.

R.1.2.3-Criterio de normalización de resultados del ensayo

Se definió un criterio de normalización de los resultados obtenidos, con el propósito de minimizar los errores y variaciones producidas al trabajar con datos crudos (densidades ópticas brutas).

Por cada muestra, incluyendo los tres controles de placa (CPF, CPM, y CN) se realizan 3 réplicas por placa. De éstas, 2 son colocadas en pocillos con antígeno (proteína 3AB1) y la tercera en un pocillo sin antígeno (para determinación del blanco). Los resultados brutos de las dos primeras réplicas son promediados (D.O.450 nm) y a este promedio se le debe restar el resultado (D.O.450 nm) del tercer pocillo sin antígeno (blanco). Todos los resultados de las 29 muestras y los 3 controles internos de cada placa son procesados de esta manera. Una vez procesados, cada uno de los resultados (incluyendo los CPM y CN) son normalizados con relación al CPF de su respectiva placa, expresándose como un porcentaje de dicho control:

$$PP\% = (D.O. \text{ procesada de muestra analizada} / D.O. \text{ procesada del CPF}) \times 100$$

PP: porcentaje de positividad porcentual respecto al control positivo fuerte.

El resultado final de cada muestra analizada, queda entonces expresado en forma porcentual, y relativizado al CPF de su respectiva placa. Utilizando el punto de corte establecido para la técnica de ELISA 3AB1 (R.1.2.5), se puede concluir si una muestra es positiva o negativa para esta técnica.

R.1.2.4-Criterios de validez del ensayo

Se establecieron los siguientes criterios de validez del ensayo:

1. la densidad óptica procesada del CPF de cada placa debe estar dentro del siguiente rango de valores: 0,60 – 1,60. Dicho intervalo surgió del análisis los resultados procesados de 34 réplicas del CPF, a partir de la siguiente ecuación: $X_m \pm 2 * D.E.$ (promedio \pm 2 desvíos estándar).
2. una vez normalizado el CPM de cada placa debe resultar positivo.
3. una vez normalizado el CN de cada placa debe resultar negativo.

Para que un ensayo se considere válido debe cumplir con cada uno de los tres criterios definidos anteriormente. Si un ensayo no cumpliera con alguno de ellos debe ser repetido en su totalidad.

R.1.2.5-Determinación del punto de corte del ensayo

El punto de corte de un ensayo permite la clasificación de los resultados obtenidos a través del mismo en dos categorías únicas: “resultados positivos” y “resultados negativos”. Para determinar el punto de corte del ELISA 3AB1 se utilizaron 283 muestras de suero de ratones BALB/c de 8 semanas de edad, provenientes 3 bioterios de la provincia de Buenos Aires. Los resultados obtenidos para estos 283 sueros, por medio de la técnica de ELISA 3AB1, fueron normalizados según los criterios establecidos para la misma, quedando expresados en forma porcentual con relación al CPF. A partir de estos resultados, se comprobó la distribución normal de los mismos (Fig.37), y se estimó el valor de la media en 1,03 %. El punto de corte quedó

establecido a 3 desviaciones estándar (D.E= 4,2 %) por sobre el valor de la media estimada ($X_m=1,03\%$).

Punto de corte del ELISA 3AB1 = 14 % o bien 0,162 D.O (relativo al valor del control positivo primario (CPF) del ensayo).

Interpretación: los resultados de las muestras analizadas por la técnica de ELISA 3AB1, procesados y normalizados, que sean iguales o mayores al 14 % del CPF de su respectiva placa, serán consideradas positivas para este ensayo. Por otro lado, aquellos resultados menores al 14 % del CPF, serán considerados negativos.

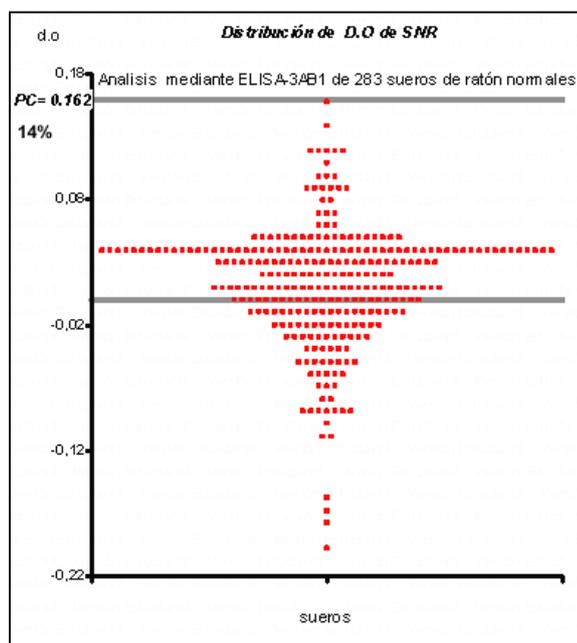


Fig.37: Gráfico de distribución de 283 sueros de ratón normal empleados para el cálculo del punto de corte (PC o punto de corte) del ELISA 3AB1 para el modelo ratón. Nótese que en una dilución alta (1:50) la totalidad de los sueros normales se mantienen muy por debajo del PC.

R.2-Modelos in vivo para control de la presencia de PNEs en vacunas

R.2.1-Modelo Bovino

R.2.1.1-Estudio de vacunas

Actualmente en los programas de erradicación y vigilancia epidemiológica la detección de Acs anti-PNEs VFA, se utiliza para diferenciar animales vacunados de infectados. Con el objeto de determinar si las trazas de PNEs presentes en vacunas podrían interferir con los test serológicos empleados, nos hemos propuesto realizar múltiples vacunaciones experimentales en el modelo bovino (modelo animal de referencia) empleando una vacuna libre de PNEs (vacuna control) y con otras que potencialmente puedan contener trazas de dichas proteínas. Para ello se utilizaron grupos experimentales de 2 a 4 bovinos cada uno cuyas edades oscilaron entre 6 y 12 meses; cada grupo recibió un total tres dosis de dichas vacunas y las inoculaciones se efectuaron cada 30 días. Las sangrías se realizaron también en intervalos de 30 días desde el tiempo 0 hasta los 120 dpv. Todos los sueros fueron analizados por 4 enzimoimmunoensayos que detectan PNEs-VFA: el test de referencia I- ELISA 3ABC (Panaftosa) propuesto por la OIE, ELISA 3AB1, ELISA 3ABC (ICT-MILSTEIN) y el ELISA 3D.

R.2.1.1.1-Selección de los animales

R.2.1.1.1.1-Análisis serológico y análisis de la no circulación viral

Se trabajó con 8 grupos de animales, de 2 a 4 bovinos cada uno, cuyas edades oscilaran entre 6 y 12 meses de edad. Estos animales recibieron previamente una dosis de vacuna anti-aftosa aprobada por SENASA.

Mediante ELISA en fase líquida se determinó que esta población contaba con un alto título de Acs totales contra proteínas estructurales de VFA para todas las cepas incluidas en la vacuna (Virus A, O y C) (Fig.38). Los sueros fueron al mismo tiempo analizados mediante ELISA 3AB1 para determinar la presencia de Acs contra PNEs del virus, los cuales son indicadores de replicación viral en el huésped y por lo tanto de circulación viral. A su vez, muestras de LEF fueron analizadas por RT-PCR para la detección de genoma viral (Fig.39). En ambos casos, los estudios resultaron negativos tanto para los animales implicados en esta experiencia, como para aquellas muestras

tomadas al azar de los bovinos de la población acompañante (datos no mostrados), lo cual confirma que no había circulación viral en la población.

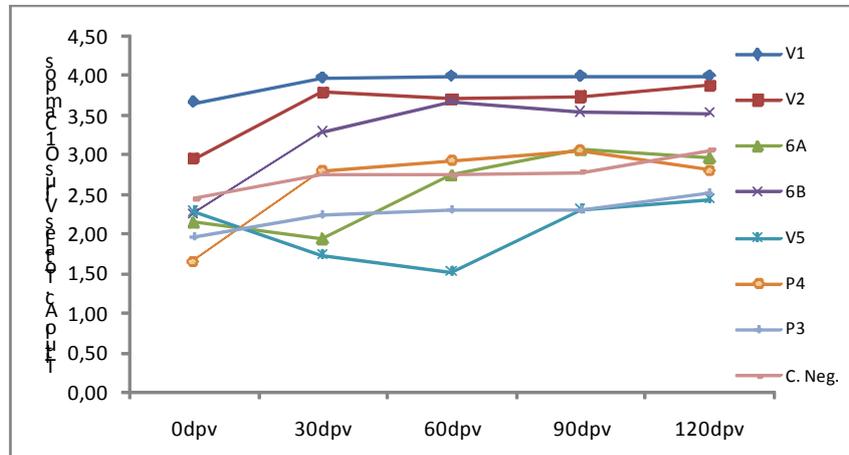


Fig.38: AcS totales inducidos en bovinos luego de la vacunación. Se muestran los títulos promedios de cada grupo. En este caso el análisis se realizó para el virus O1 Campos, tanto para el serotipo A2001 y C Indaial se obtiene un perfil similar (datos no mostrados).

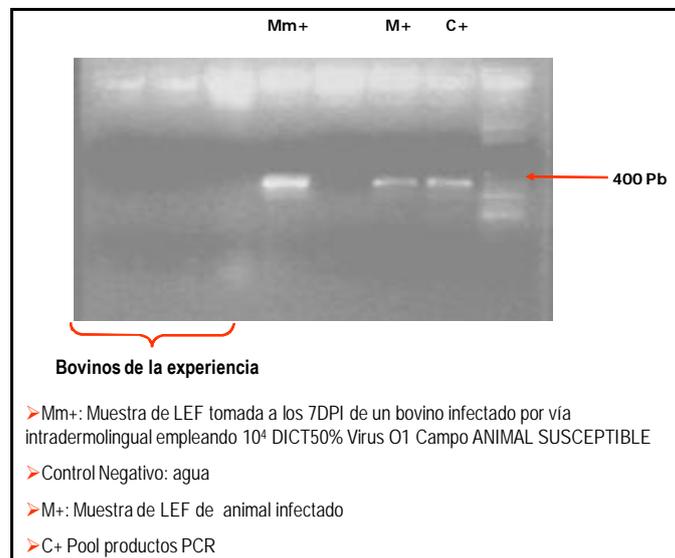


Fig.39: gel de agarosa de los productos de PCR en muestras de LEF. El total de las muestras poblacionales tomadas, resultaron negativas para RNA del VFA.

R.2.1.1.2-Análisis de la detección de anticuerpos contra PNEs

R.2.1.1.2.1-Análisis y detección de anticuerpos anti-3D

Al analizar los sueros mediante el ELISA 3D se evidencia que tanto el grupo inoculado con la vacuna control negativo como el resto de los grupos generan respuesta inmune humoral contra el antígeno 3D a partir de los 60 dpv, es decir, cuando ya han recibido la segunda dosis de la vacuna. Esto es debido a que la PNE 3D (RNA pol) es un componente de por lo menos 20-30% de las partículas virales lo cual fue demostrado en un estudio realizado por *Newman y cols (1994)*, por microscopía electrónica, por lo tanto, la falta de reactividad contra 3D en muchos de los animales vacunados a los 30 dpv puede deberse a una concentración insuficiente del polipéptido 3D en las suspensiones virales y por ello los Acs comienzan a detectarse luego de las revacunaciones.

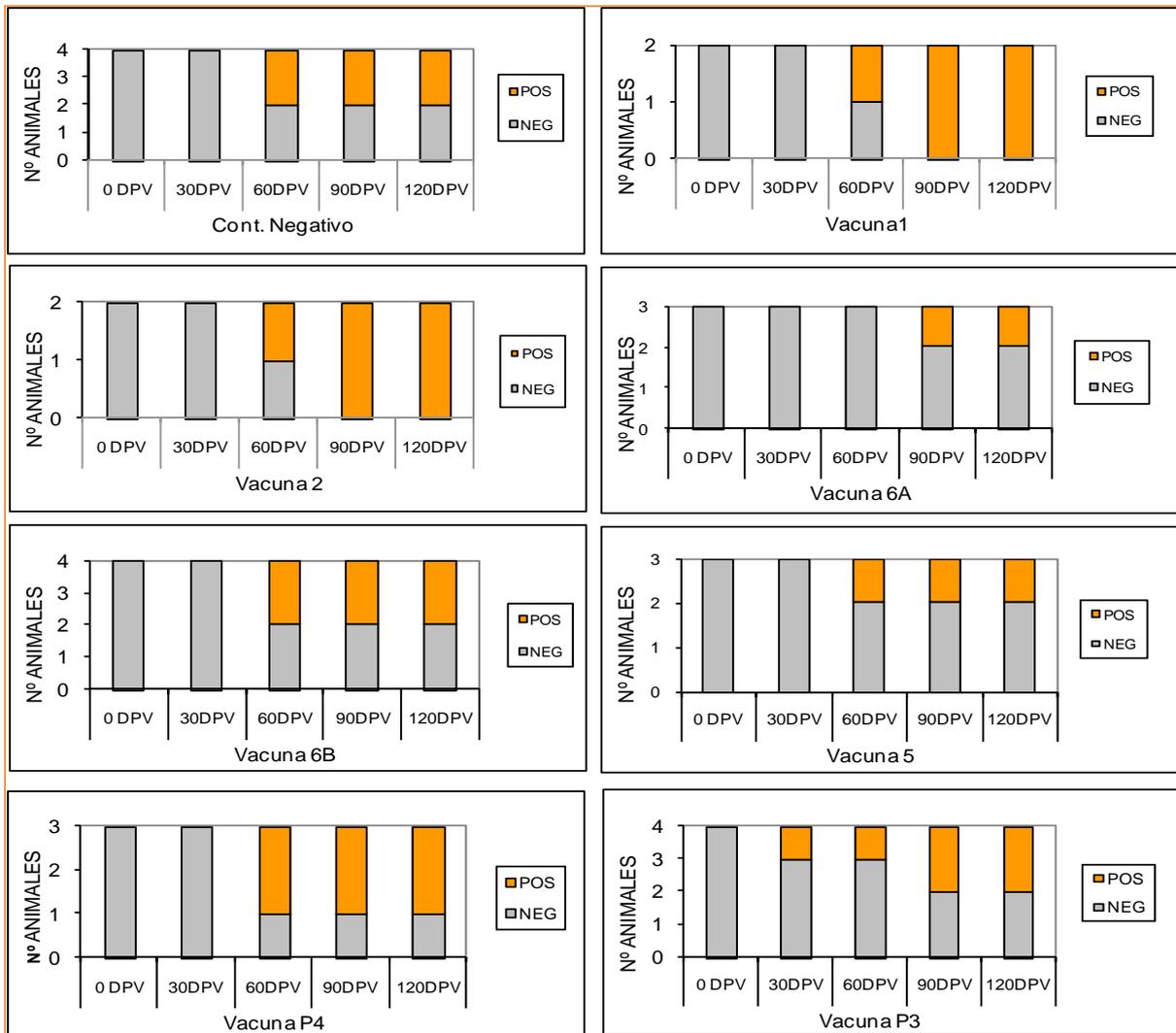


Fig.40: Gráficos de barras que muestran los resultados obtenidos por el ELISA 3D al analizar muestras provenientes de 25 animales que recibieron 3 dosis de vacunas anti-aftosa. En el eje horizontal se representan los días post vacunación (dpv) y en el vertical el número de animales de cada grupo. Los animales que no han generado Acs detectables contra el antígeno no estructural 3D se destacan en color gris, aquellos en que los Acs son detectables y considerados positivos se grafican en naranja.

	3D				
	0dpv	30dpv	60dpv	90 dpv	120dpv
C.Neg.	0/4	0/4	2/4	2/4	2/4
V1	0/2	0/2	1/2	2/2	2/2
V2	0/2	0/2	1/2	2/2	2/2
P3	0/4	1/4	1/4	2/4	2/4
P4	0/3	0/3	2/3	2/3	2/3
P5	0/3	0/3	1/3	1/3	1/3
6A	0/3	0/3	0/3	1/3	1/3
6B	0/4	0/4	2/4	2/4	2/4

Fig.41: En la tabla se resume el resultado obtenido para el test ELISA 3D. Se indica para cada una de las vacunas el número de animales positivos sobre el total por grupo para los diferentes dpv.

En todos los grupos vacunales evaluados, incluyendo el grupo control, a partir de los 90dpv hay al menos un animal positivo en cada categoría al analizar las muestras utilizando el ELISA 3D.

R.2.1.1.2.2-Análisis y detección de anticuerpos anti-3AB1 y 3ABC

La capacidad de distintas vacunas comerciales anti-aftosa de inducir Acs anti-PNEs fue determinada mediante 3 ELISA específicos contra 3AB1 o 3ABC (ELISA 3AB1, I-ELISA 3ABC Panaftosa, ELISA 3ABC).

Para las vacunas P4 y V5 (Fig.42.B y C) la totalidad de los animales resultaron seronegativos para los tres test diagnósticos, aun luego de la tercera reinmunización (90 dpv) al igual que la vacuna control negativo (C. Neg) (Fig.42.A).

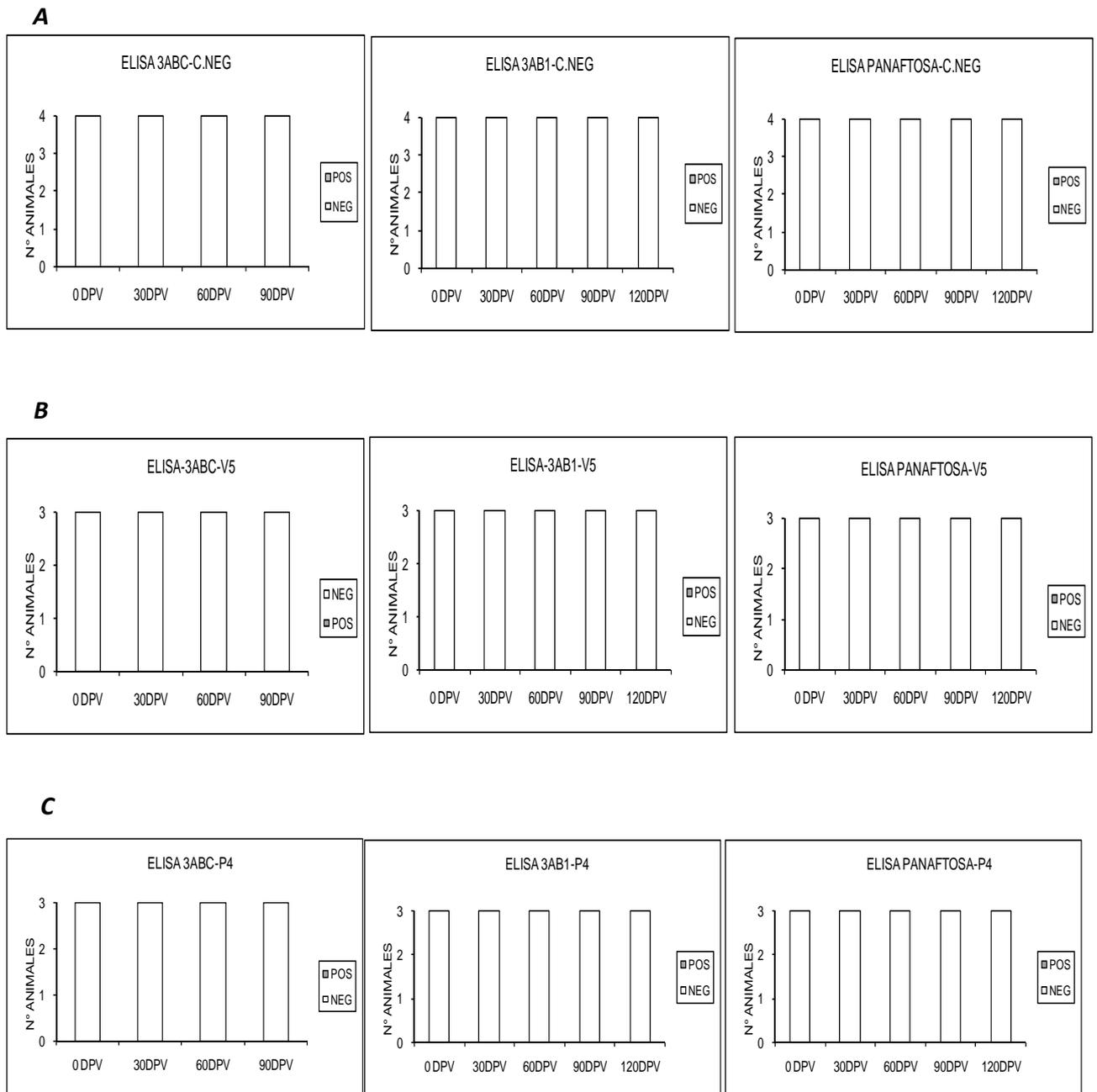


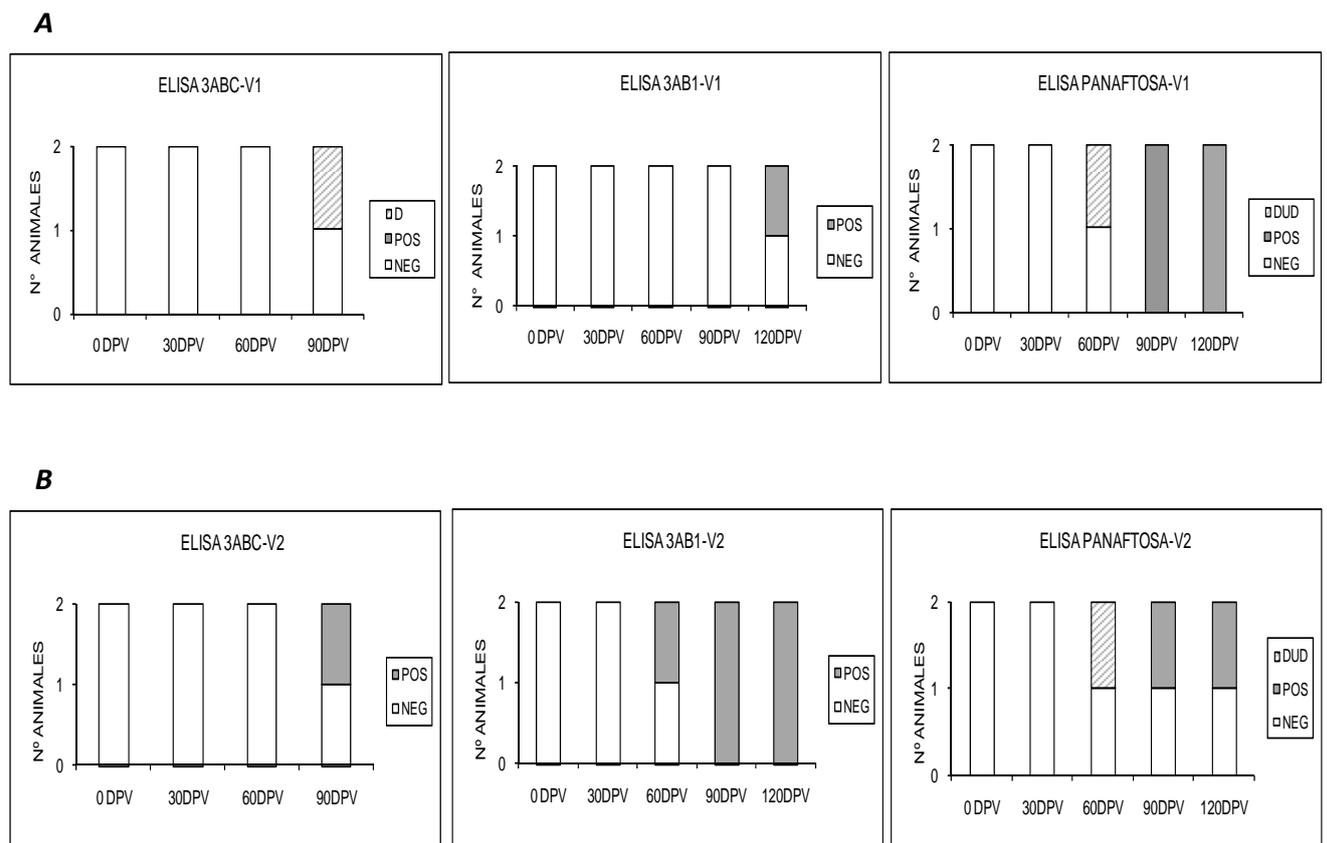
Fig.42: Análisis de las vacunas C.Neg, V5 y P4 (A, B y C). En el eje vertical se representa el número de animales positivos (gris), negativos (blanco) o dudosos; en el eje horizontal los dpv.

En el caso de la vacuna V1 por la técnica 3AB1 se detecta como positivo 1 animal de un total de 2, 30 días posteriores al tercer booster (120dpv), la técnica 3ABC también detecta al

mismo animal luego del segundo booster como dudoso, no pudo medirse su respuesta a los 120dpv. En cuanto al I-ELISA Panaftosa, a los 60 dpv detectó como dudoso al mismo animal y ya para los 90 dpv es determinado como positivo junto con el segundo animal del grupo. (Fig.43.A).

Al analizar la vacuna V2 mediante ELISA 3AB1 a los 60 dpv se detectó 1 animal positivo, siendo todos positivos en los siguientes muestreos. El I-ELISA Panaftosa detectó 1 animal como dudoso a los 60 dpv y positivo a los 90 y 120 dpv. En cambio, el test 3ABC sólo a partir de los 90 dpv es capaz de detectar el mismo suero como positivo (Fig.43.B).

Empleando el test 3ABC no es posible detectar reactividad alguna contra la vacuna P3, incluso luego del tercer booster, sin embargo, tanto el ELISA 3AB1 como el I-ELISA Panaftosa, a partir del segundo booster (60 dpv), indican un mismo suero positivo que se mantiene como tal hasta el final de la experiencia



C

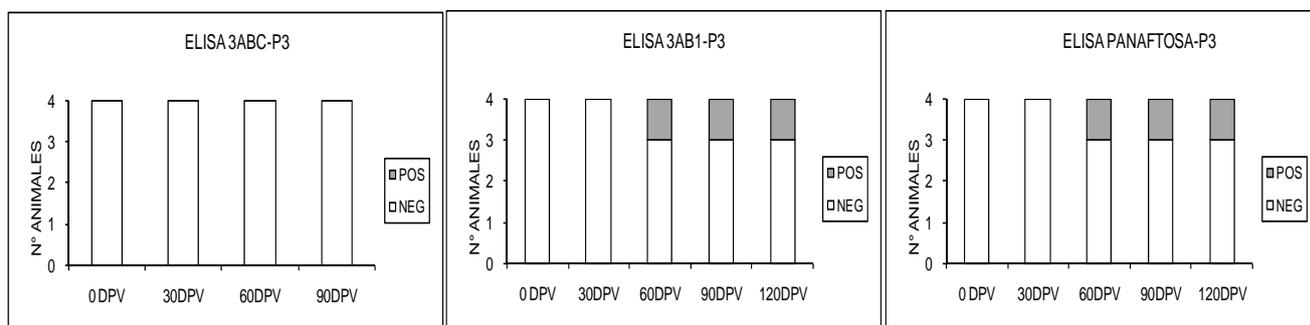


Fig.43: Resultados obtenidos para las vacunas V1, V2 y P3 (A, B y C). En el eje vertical se representa el número de animales positivos (gris), negativos (blanco) o dudosos (rayas); en el eje horizontal los dpv.

La respuesta inmune inducida por la vacunas 6A dan el mismo perfil tanto para el test I-ELISA Panaftosa y como para el ELISA 3AB1: a los 30 dpv la técnica 3AB1 detecta 1 suero positivo de 3 y para I-ELISA Panaftosa este suero es dudoso; siendo todo el grupo 6 A positivo a los 60 dpv por ambas técnicas. El ELISA 3ABC no detecta ningún suero dudoso o positivo a los 30 dpv sin embargo, ya para los 60 dpv para los tres enzimoimmunoensayos la totalidad de animales son positivos (Fig.44.A).

En cuanto a la vacuna 6B a los 30 dpv tanto con el ELISA 3AB1 como con el I-ELISA Panaftosa se detectan 2 animales positivos de 4. Para el mismo tiempo post-vacunación, el ELISA 3ABC fue capaz de detectar 1 animal positivo y 1 dudoso, los mismos que resultaron positivos por los otros 2 inmunoensayos. A partir de los 60 dpv mientras que el ELISA 3AB1 muestra la totalidad de los animales como positivos, el I-ELISA PANAFTOSA es capaz de detectar 3 animales positivos de un total de 4 y el ELISA 3ABC, también establece 3 sueros positivos y 1 negativo a los 60 dpv, el cual se vuelve dudoso a partir de los 90 dpv (Fig.44.B).

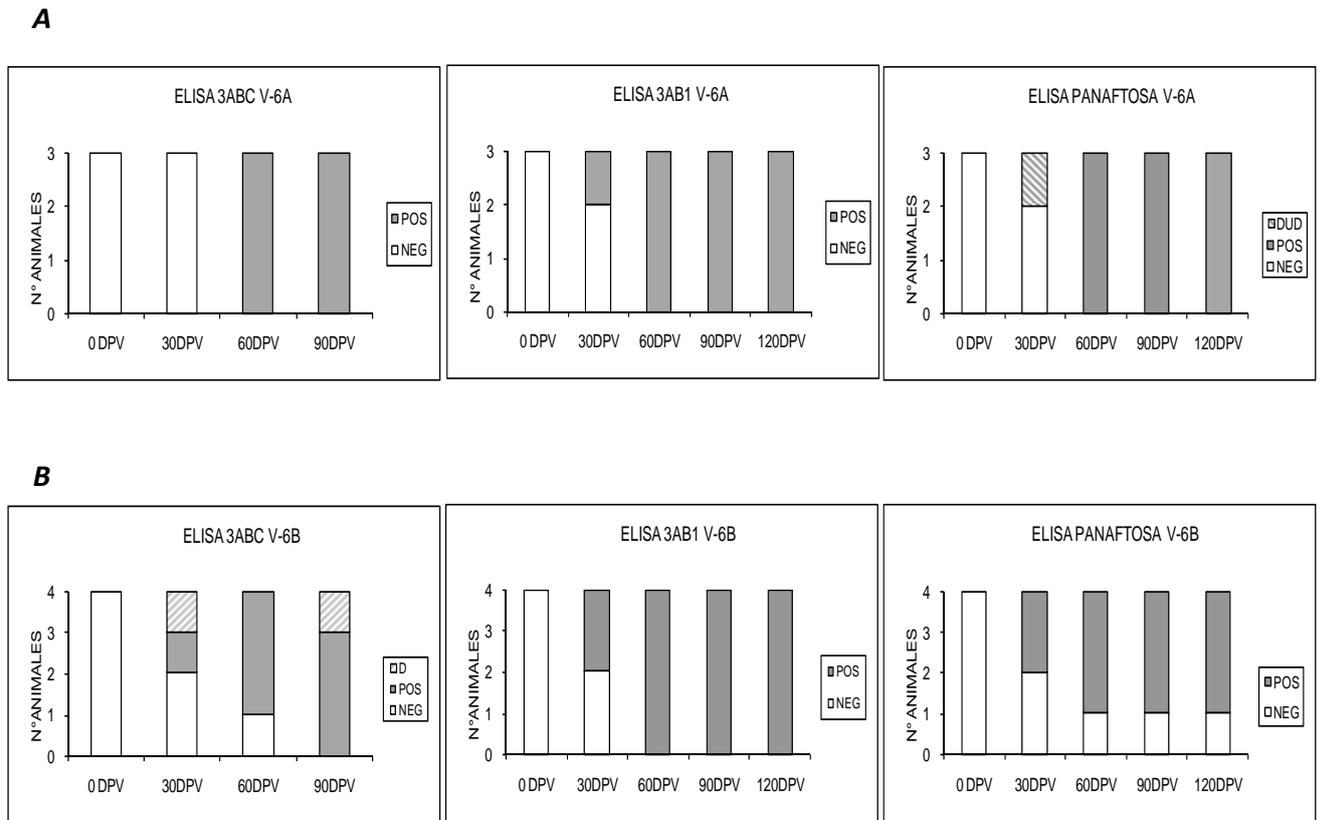


Fig.44: análisis de las vacunas 6 A y 6B (A y B respectivamente). La categoría del estado serológico se definió como animales positivos (gris), negativos (blanco) o dudosos (rayas).

En resumen, de los resultados obtenidos para las vacunas 6A y 6B se observa que prácticamente a los 90 dpv (luego de la tercera inmunización), la totalidad de los animales de cada grupo presentan Acs anti- PNE, lo cual es detectado por todos los 3 tests indicando que posiblemente estas vacunas contengan una masa mayor de proteínas espurias que el resto de las formulaciones analizadas.

A continuación en la figura 45, se resume en una tabla los resultados obtenidos en esta experiencia:

	ELISA 3AB1					ELISA 3ABC					I-ELISA 3ABC				
	0dpv	30dpv	60dpv	90 dpv	120dpv	0dpv	30dpv	60dpv	90 dpv	120dpv	0dpv	30dpv	60dpv	90 dpv	120dpv
C.Neg.	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	ind	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
V1	0/2	0/2	0/2	0/2	1/2	0/2	0/2	0/2	1/2 (1D)	ind	0/2	0/2	1/2 (1D)	2/2	2/2
V2	0/2	0/2	1/2	2/2	2/2	0/2	0/2	0/2	1/2	ind	0/2	0/2	1/2 (1D)	1/2	1/2
P3	0/4	0/4	1/4	1/4	1/4	0/4	0/4	0/4	0/4	ind	0/4	0/4	1/4	1/4	1/4
P4	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	ind	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
P5	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	ind	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
6A	0/3	1/3	3/3	3/3	3/3	0/3	0/3	3/3	3/3	ind	0/3	1/3 (1D)	3/3	3/3	3/3
6B	0/4	2/4	4/4	4/4	4/4	0/4	2/4 (1D)	3/4	4/4 (1D)	ind	0/4	2/4	3/4	3/4	3/4

Fig.45: La tabla muestra los resultados obtenidos con los tres enzimoimmunoensayos (ELISA 3AB1, ELISA 3ABC e I-ELISA 3ABC test de referencia de Panaftosa). En cada fila se colocaron las diferentes vacunas analizadas vs los dpv en cada columna. Para cada dpv se muestran los animales positivos sobre el total de cada grupo (1D denota que a ese tiempo el animal tiene un nivel de Acs dudoso para el test, el cual en todos los casos luego se positiviza). Ind: indica un análisis no determinado (indeterminado).

R.2.1.2-Determinación de la dosis mínima inmunizante de la PNE 3ABC recombinante

Con el objeto de determinar la mínima cantidad (en masa por dosis) de PNE capaz de desencadenar una respuesta de Acs en bovinos, 6 grupos experimentales de 3 animales cada uno fueron inoculados con 670 ng, 170 ng, 104,2 ng, 42,5 ng, 10,6 ng o 2,6 ng de la proteína recombinante 3ABC. Cada grupo se inmunizó a los 0, 30 y 60 dpv y la respuesta inmune inducida fue evaluada a los 0, 30, 60 y 90 dpv por ELISA 3AB1, I-ELISA 3ABC y ELISA 3ABC.

Para realizar este estudio comparativo se analizaron las mismas muestras por los 3 ensayos, siendo los resultados en cada caso procesados y normalizados de acuerdo a los criterios establecidos por el fabricante/institución desarrolladora; utilizando, además, los puntos de corte respectivos recomendados por los mismos.

R.2.1.2.1-Selección de los animales

R.2.1.2.1.1-Análisis serológico y análisis de la no circulación viral

Un total de 18 bovinos cuyas edades oscilaran entre 6 y 12 meses de edad fueron seleccionados para esta experiencia. Estos animales recibieron previamente una dosis de vacuna anti-aftosa aprobada por SENASA. Se realizó al igual que se detalló en la sección R.2.1.1.1.1 el

análisis serológico y el análisis de la no circulación viral. Dichos estudios resultaron negativos lo cual confirma que no había circulación viral en la población.

<i>Grupo</i>	<i>N°</i>	<i>Dosis (ng)</i>	<i>Dosis (mL)</i>	<i>Inmunógeno</i>	<i>Adyuvante</i>
<i>Bovinos</i>					
#1	3	670	2	3ABC recombinante	Oleoso Marcol 52
#2	3	170	2	3ABC recombinante	Oleoso Marcol 52
#3	3	104,2	2	3ABC recombinante	Oleoso Marcol 52
#4	3	42,5	2	3ABC recombinante	Oleoso Marcol 52
#5	3	10,6	2	3ABC recombinante	Oleoso Marcol 52
#6	3	2,6	2	3ABC recombinante	Oleoso Marcol 52

Fig.46: En La Tabla se detallan la cantidad de animales por grupo, la dosis, el inmunógeno empleado y el tipo de adyuvante oleoso empleados en esta experiencia.

R.2.1.2.2-Evaluación de la dosis inmunizante utilizando tres enzimoimmunoensayos

R.2.1.2.2.1-Evaluación por ELISA 3AB1

En la Fig.47 se observa que a partir de los 30 dpv, en los grupos inoculados con las masas mas altas de inmunógeno (670, 170 y 104,2 ng), por lo menos 1 animal es capaz de generar niveles de Acs detectables por la técnica. A los 60 dpv todos los animales de estos grupos presentan niveles de Acs detectables por tanto son positivos. Sólo a partir de los 90 dpv y luego de la tercera inmunización 1 animal de 3 es capaz de generar Acs con la dosis de 42,5 ng, siendo esta la mínima dosis capaz de inducir la respuesta inmune en el modelo bovino, medible por el ELISA 3 AB1.

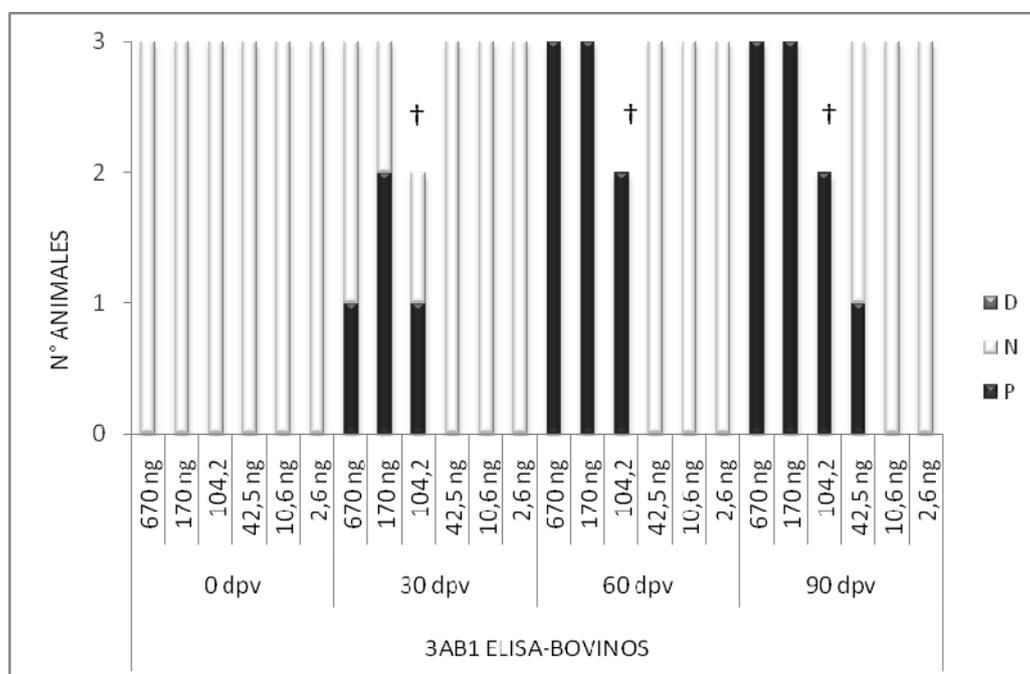


Fig.47: Gráficos de barras para el ELISA 3AB1. 6 grupos de animales que recibieron 3 inmunizaciones con vacunas experimentales formuladas con distintas dosis de la proteína recombinante 3ABC. La dosis de 42,5 ng es la menor la cantidad de proteína capaz de inducir Acs recién a los 90 dpv (después de la 3° inmunización). En el eje horizontal se representan los días post vacunación (dpv) y en el vertical el número de animales de cada grupo. Los animales que no han generado Acs detectables contra el antígeno no estructural se destacan en color blanco (negativos o N), aquellos en que los Acs son detectables y considerados positivos se grafican en negro (positivos o P); †indica que 1 animal del grupo murió.

R.2.1.2.2-Evaluación por I-ELISA 3ABC

El análisis de las muestras con el test de referencia de Panaftosa (I-ELISA 3ABC) arrojó los mismos resultados que el ELISA 3AB1. Por lo tanto, nuevamente se concluye que la mínima cantidad de proteína requerida como inmunógeno en este modelo animal para generar Acs es de 42,5 ng (Fig.48).

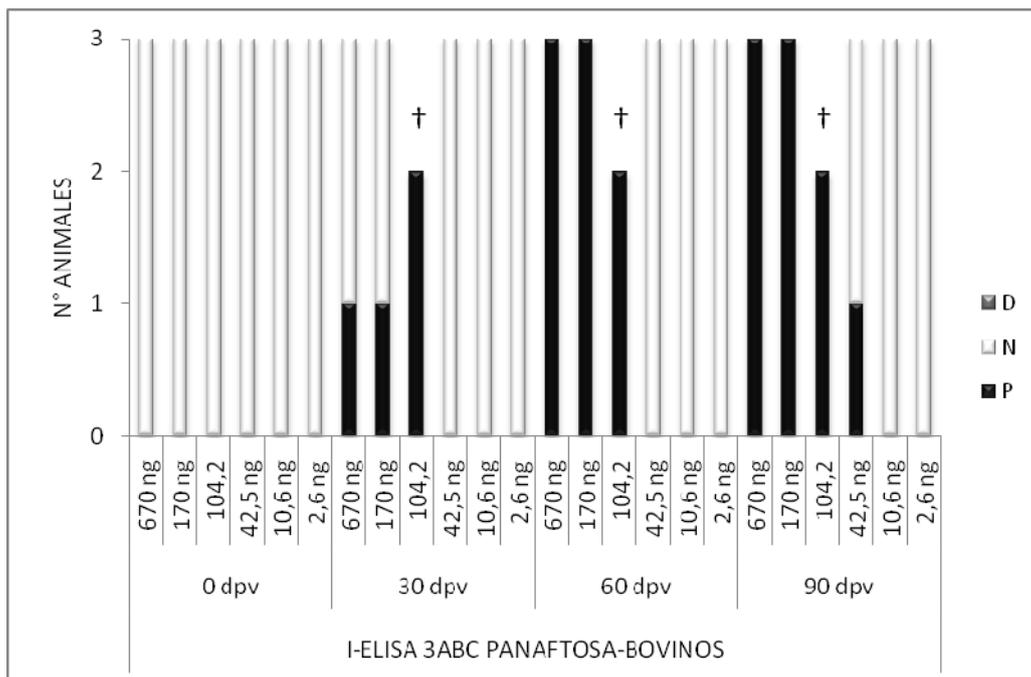


Fig.48: Gráficos de barras para I-ELISA 3ABC de Panaftosa. En este caso también la dosis de 42,5 ng es menor la cantidad de proteína detectada a los 90 dpv y después de la 3° inmunización. En el eje horizontal se representan los días post vacunación (dpv) y en el vertical el número de animales de cada grupo. Los animales que no han generado Acs detectables contra el antígeno no estructural se destacan en color blanco (negativos o N), aquellos en que los Acs son detectables y considerados positivos se grafican en negro (positivos o P); †indica que 1 animal del grupo murió.

R.2.1.2.2.3-Evaluación por ELISA 3ABC

El análisis de las muestras utilizando el ELISA 3ABC indicó que a partir de los 30dpv, al igual que para el test 3AB1 y I-ELISA 3ABC, las dosis más altas de inmunógeno eran capaces de generar niveles detectables de Acs anti-PNE. A partir de los 60 dpv fue posible detectar como positivo 1 animal del grupo inmunizado con 42,5 ng y a los 90 dpv se pudieron detectar Acs anti-PNE en 2 de los 3 animales de este grupo. Este enzimoimmunoensayo fue capaz, además, de detectar una animal dudoso en el grupo inoculado con 10,6 ng. Este suero fue confirmado a los 180 dpv como positivo tanto para este test como para el I-ELISA 3ABC manteniéndose como negativo para el ELISA 3AB1.

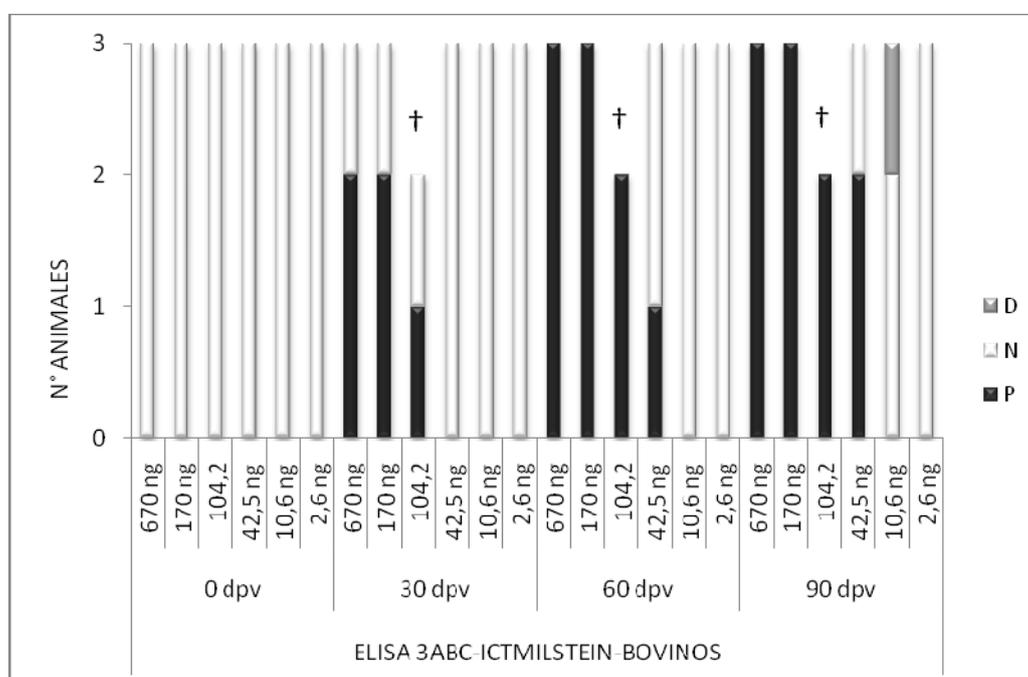


Fig.49: Gráficos de barras para 3ABC ELISA del ICT MILSTEIN. En este caso también para la dosis 10,6 ng es a los 90 dpv el ensayo es detecta un suero dudoso, confirmado posteriormente como positivo. En el eje horizontal se representan los días post vacunación (dpv) y en el vertical el número de animales de cada grupo. Los animales que no han generado Acs detectables contra el antígeno no estructural se destacan en color blanco (negativos o N), aquellos en que los Acs son detectables y considerados positivos se grafican en negro (positivos o P), los dudosos (D) en gris; †indica que 1 animal del grupo murió.

R.2.2-Modelo murino

Habiendo evaluado la respuesta inmune contra PNEs-VFA en bovinos respecto a la presencia de restos de estas proteínas en vacunas y luego de haber determinado la masa mínima de la proteína recombinante 3ABC capaz de desencadenar una respuesta de Acs en bovinos, se propone en este apartado desarrollar un modelo en animales de laboratorio alternativo al uso de grandes animales.

Dado que el modelo ratón ha sido ampliamente utilizado en nuestro Instituto para estudiar tanto la inmunidad contra el VFA y su correlación con el modelo bovino, se seleccionó esta especie para estudiar la respuesta inmune inducida contra PNEs VFA, la cual no había sido descripta en este modelo animal experimental.

Como se vio en la sección R.1.1.6.3.2 los ratones BALB/c adultos respondieron a la inmunización con una PNE recombinante (3AB1), en ese caso se aplicaron un total de 3 inmunizaciones cada 10 días con 0,2 mL de formulación 50% fase acuosa y 50 % fase oleosa (adyuvante completo de Freund para la primera dosis y adyuvante incompleto de Freund para las dosis siguientes). Se pudo concluir que esta especie animal responde a la masa aplicada de 5ug/dosis en cada inmunización y que a partir de los 10 dpv el nivel de Acs anti-PNE está muy por encima del punto de corte (14%) del ELISA 3AB1 para el modelo ratón.

R.2.2.1-Determinación de la dosis mínima inmunizante de la PNE 3ABC recombinante

Con el objeto de determinar y comparar la mínima dosis de la PNE 3ABC recombinante capaz de generar una respuesta inmune humoral en ratones a partir de las dosis evaluadas para el modelo bovino (sección R.2.1.2.2) se procedió a formular vacunas experimentales conteniendo las mismas masa/dosis, a excepción de la dosis de masa 104 ng y se incorporó una dosis intermedia entre las de 42,5 ng y 10,6 ng de masa absoluta 26 ng.

Grupo N° Dosis Dosis Inmunógeno Adyuvante
 Animales (ng) (mL)

#1	5	670	0,2	3ABC recombinante	Oleoso Marcol 52
#2	5	170	0,2	3ABC recombinante	Oleoso Marcol 52
#3	10	42,5	0,2	3ABC recombinante	Oleoso Marcol 52
#4	10	26	0,2	3ABC recombinante	Oleoso Marcol 52
#5	10	10,6	0,2	3ABC recombinante	Oleoso Marcol 52
#6	5	2,6	0,2	3ABC recombinante	Oleoso Marcol 52

Fig.50: En La tabla se detallan la cantidad de animales por grupo, la dosis, el inmunógeno o y el tipo de adyuvante oleoso empleados en esta experiencia.

Como se detalló en la sección M.4.2.1 de materiales y métodos los ratones se dividieron en 6 grupos experimentales, los cuales fueron inoculados por vía intraperitoneal y recibieron un total de 3 inmunizaciones. El muestreo serológico se realizó desde los 0 dpv y se continuó cada 15 días hasta los 60 dpv. Los sueros fueron evaluados por ELISA 3AB1 puesto a punto para el modelo ratón (sección R.1.2). Los resultados obtenidos se resumen en la Fig.51.

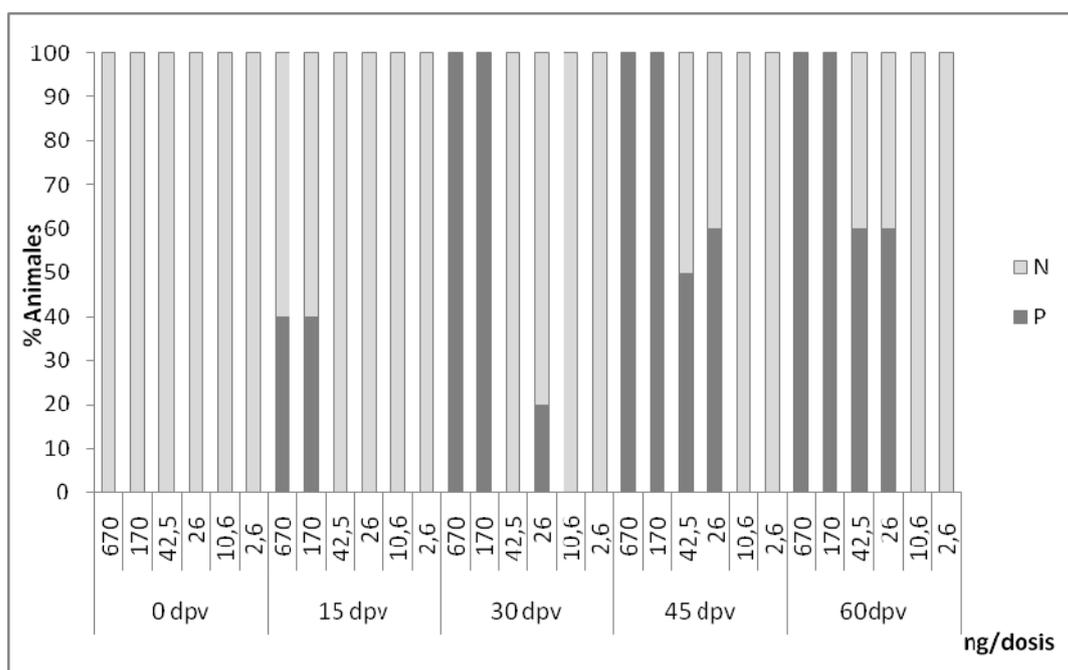


Fig.51: Determinación de la dosis inmunogénica mínima para la PNE 3ABC recombinante. El gráfico de barras esquematiza en el eje vertical los porcentajes de animales positivos (P) o negativos (N) respecto del total de animales por grupo y en el eje horizontal las distintas dosis de la proteína recombinante 3ABC: la medición del nivel de Ac se realizó desde los 0 a los 60 dpv.

Como se observa en la Fig.51 a partir de los 15 dpv, luego de la primera dosis, el 40% de los animales pertenecientes a los grupos inoculados con las masa de inmunógeno mas altas, dan una respuesta positiva y a partir de los 30 dpv la totalidad de estos 2 grupos presentan Acs anti-PNEs; si bien en este tiempo el 20% del grupo 4 (dosis de 26 ng) presenta Acs y el 100% del grupo 3 inoculado con una dosis superior (45 ng) aun es seronegativo, al analizar los resultados a los 45 dpv, luego de la tercer dosis, se observa que en el 50% de los individuos del grupo 3 y en el 60% de los individuos grupo 4 se detectaron Acs anti-PNEs. Los porcentajes de estos 2 últimos grupos se igualan a los 60 dpv alcanzando un 60 % de animales seropositivos en ambos casos.

Los grupos 5 y 6, inoculados con las menores dosis de la proteína recombinante se mantuvieron seronegativos hasta incluso 30 días posteriores a la tercera inmunización (60 dpv).

R.2.2.2-Estudio preliminar de vacunas

Empleando el modelo murino se analizaron 6 vacunas: control negativo, V1, V2, 6B, 6A y 5 previamente evaluadas mediante el modelo bovino.

Los animales fueron inoculados con el 10% del volumen de la dosis aplicada al bovino es decir, 0,2 mL y recibieron un total de 3 inmunizaciones a los 0, 15 y 30 dpv. El muestreo serológico se continuó hasta los 60 dpv. La respuesta humoral anti-PNE-VFA se evaluó por mediante el ELISA 3AB1 (sección R.1.2).

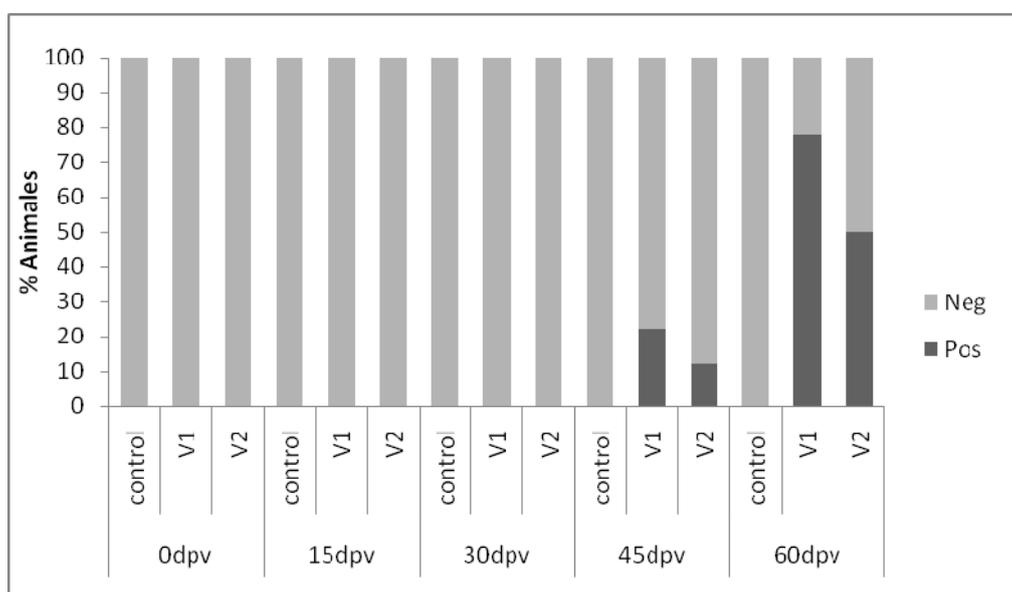


Fig.52: En el gráfico se representa en el eje vertical el porcentaje de animales seropositivos y seronegativos para PNE-VFA para las vacunas control negativo, V1 y V2 y en el eje horizontal se representan los días post vacunación (dpv). Los ratones BALB/c recibieron un total de tres inmunizaciones cada 15 días. El muestreo serológico se continuó hasta los 60dpv.

Como indica la Fig.52, el grupo control negativo no indujo ningún tipo de reacción, en cambio las vacunas V1 y V2 partir de los 45 dpv, es decir luego de la tercer dosis, comienzan a dar reacción positiva en ambos grupos (22 y 12 % de animales positivos respectivamente). A los 60 dpv el porcentaje de animales positivos se incrementa notablemente alcanzando un 78% para la vacuna V1 y un 50 % para la vacuna V2.

Los resultados obtenidos con las vacunas 6A, 6B y P5, las cuales también fueron previamente inoculadas en bovinos se grafican en la Fig.53.

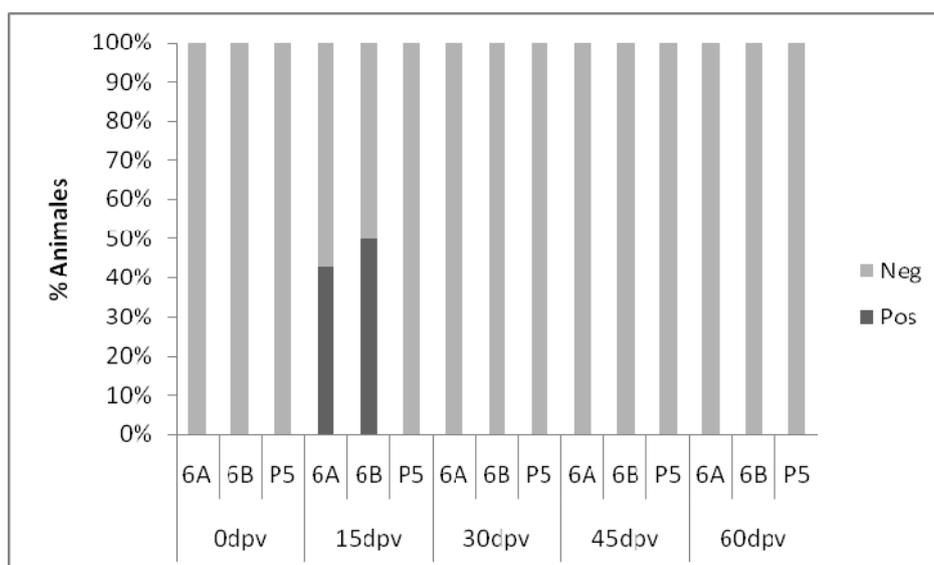


Fig. 53: En el gráfico se representa en el eje vertical el porcentaje de animales seropositivos y seronegativos para PNE-VFA para las vacunas 6A, 6B y P5 y en el eje horizontal se representan los días post vacunación (dpv). Los ratones BALB/c recibieron un total de tres inmunizaciones cada 15 días. El muestreo serológico se continuó hasta los 60dpv.

La vacuna P5 no genera respuesta alguna al analizar la inducción de Acs anti-PNEs al igual que en el modelo bovino. Curiosamente, en las otras dos vacunas se observa a los 15 dpv (luego de la primera inmunización) que el 43% de los animales inoculados con la vacuna 6A y el 50% del grupo inoculado con la vacuna 6B tienen Acs anti-PNE, sin embargo, al continuar con la experiencia no se detectaron niveles de Acs anti-PNE en fechas posteriores a la segunda y tercera inmunización. Al analizar las densidades ópticas brutas obtenidas en el ELISA murino se observa que si bien se aplicó un criterio de normalización de resultados del ensayo como fuera detallado anteriormente (sección R.1.2), mediante el cual se minimizan todo tipo de variaciones, con estas tres vacunas en particular, hubo un pegado totalmente inespecífico del suero de ratón a la tercera columna de la placa de ELISA o blanco (sin antígeno).

Cabe resaltar que en este tipo de enzimoimmunoensayo, como se menciona en la sección R.1.2, los resultados brutos de las dos primeras réplicas de cada muestra de suero son promediados y a este promedio se le debe restar el resultado (D.O.450 nm) del tercer pocillo sin antígeno, por lo tanto, este pegado inespecífico a la tercera columna hace que los resultados porcentuales referidos al CPF estén por debajo del PC del enzimoimmunoanálisis, obteniéndose resultados negativos. Este efecto no disminuyó aún cuando se realizó la titulación de dichos sueros

desde la dilución 1:50 a 1:800 respetando en cada una de las diluciones el formato de normalización, es decir empleando una tercera columna sin antígenos por cada 2 con antígeno para cada una de las diluciones realizadas, (datos no mostrados).

En la tabla de la Fig.54, se resumen la experiencia realizada con vacunas en murinos, indicando el número de animales por grupo, la dosis inoculada y el porcentaje de animales positivos por grupo en los distintos tiempos post vacunación

Vacuna	N° animales	N° Dosis	0dpv	15dpv	30dpv	45dpv	60dpv
(0,2mL)							
<i>Porcentaje de Positivos (%)</i>							
Control	10	3	0	0	0	0	0
V1	10	3	0	0	0	22	78
V2	10	3	0	0	0	12	50
6ª	8	3	0	43	0	0	0
6B	10	3	0	50	0	0	0
P5	4	3	0	0	0	0	0

Fig. 54: en la tabla se presenta el resumen de las experiencias con vacunas en el modelo ratón expresándose el porcentaje de animales positivos a los distintos dpv.

R.3- Modelo in vitro para determinación de PNEs en formulaciones vacunales

R.3.1-Producción de anticuerpos monoclonales

R.3.1.1- Inmunización de ratones con la proteína 3AB1

Con el objeto de producir AcMs se inocularon ratones BALB/c con la proteína. La respuesta inmune fue medida a los 28 días post-inóculo con el fin de proceder posteriormente al proceso de fusión y producción de hibridomas. A los 28 días las diluciones (1: 10000) de los sueros de los ratones inoculados superaron 0.8 unidades de D. O. medida a 450 nm, con un porcentaje relativo al control positivo del 76%. Con esta respuesta inmune los ratones fueron sacrificados a fin de obtener el bazo y poder realizar las fusiones correspondientes.

R.3.1.2-Aislamiento de células híbridas productoras de anticuerpos monoclonales contra la proteína 3AB1

La selección de los hibridomas en crecimiento se realizó en un medio rico en hipoxantina, aminopterina y timina (HAT). A los 15 días fue reemplazado por el medio HT. Cada tres días se realizó la observación al microscopio de la confluencia celular, cuando esta alcanzó un 70% se efectuó el recambio del 50% medio de cultivo. Los puntos de crecimiento de los híbridos fueron vistos a los 8 días aproximadamente y los sobrenadantes fueron analizados tanto por ELISA 3AB1 como por Western blot para Acs anti-PNE 3AB1 del VFA. Se aisló sólo 1 clon positivo.

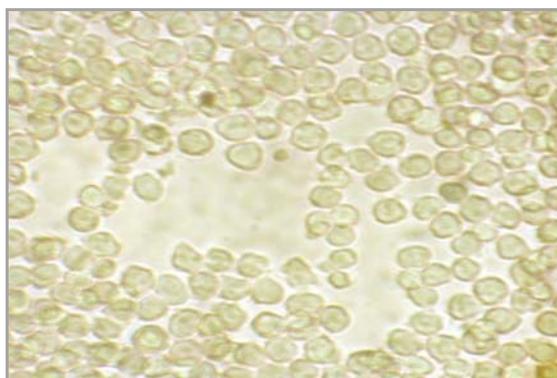


Fig.55: Microscopía de células híbridas secretoras de AcM anti-3AB1. Aumento 40X.

Posteriormente el sobrenadante de dicho clon se sometió a un Western blot y se confirmó su reactividad respecto a la proteína recombinante 3AB1; como control de ensayo se empleó un suero proveniente de un animal infectado experimentalmente con el VFA.



Fig.56: Análisis mediante Western blot del clon secretor de AcMs. Como primer Ac se comparó el producto del sobrenadante del hibridoma seleccionado (AcM anti-3AB1) con un Ac policlonal proveniente de un animal infectado con el VFA. En la última calle se sembró un marcador de peso molecular.

El híbrido positivo se clonó de acuerdo con la técnica de dilución límite y con el fin de aumentar la probabilidad de crecimiento de clones simples, las células fueron diluidas para permitir crecimiento hasta alrededor del 40% de los pozos solamente, lo que equivale estadísticamente a una célula por pocillo. De este modo de la subclonación de los híbridos positivos se obtuvieron AcMs anti-3AB1 secretados.

R.3.1.3-Characterización del anticuerpo monoclonal anti-3AB1

R.3.1.3.1-Determinación de la especificidad de reconocimiento de moléculas antigénicas

Para demostrar la especificidad de reconocimiento de moléculas antigénicas mediante la reacción antígeno-anticuerpo se emplearon membranas de nitrocelulosa después de la separación mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturizantes en presencia de SDS. El AcM anti-3AB1 fue capaz de reconocer específicamente la proteína 3AB1 así como también la PNE 3ABC y no hubo reacción cruzada al sembrar el pellet de *E. coli BL21* sin inducir (sistema de expresión de la proteína recombinante 3AB1), así como tampoco al sembrar la proteína Thiorredoxina (16kDA) obtenida en forma recombinante en el mismo vector de

expresión, plásmido pRSET A en fusión transcripcional con una secuencia de histidinas amino terminal al igual que la PNE del VFA 3AB1.

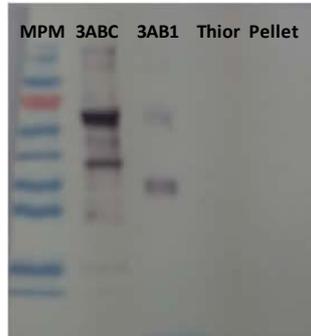


Fig.57: Western blot utilizando como primer Ac el AcM anti-3AB1. Calle 1: Marcador de peso molecular (MPM), Calle 2: proteína recombinante 3ABC (57kDa), Calle 3: proteína recombinante 3AB1 (27kDa); Calle 4: thio redoxina con secuencia de Hist amino terminal, Calle 5: pellet de proteínas de *E. coli* BL21.

R.3.1.3.2-Titulación del anticuerpo monoclonal anti-3AB1

Con el fin de determinar el título del AcM se procedió a determinar la reactividad de dicho Ac contra la proteína homóloga (3AB1 recombinante) purificada y se lo comparó con el Ac policlonal murino monoespecífico y un SNR.

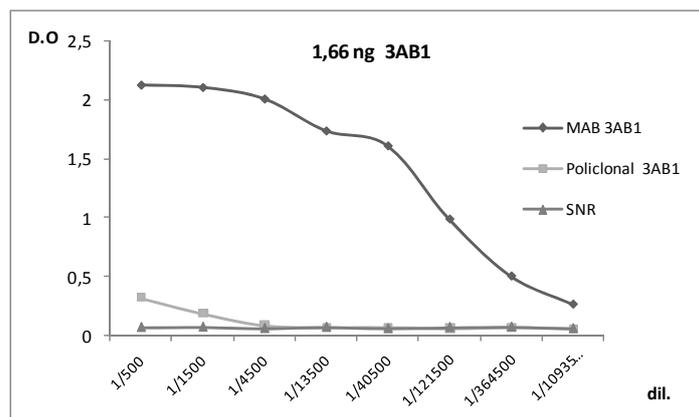


Fig.58: Curva de titulación para el AcM anti-3AB1, suero policlonal monoespecífico anti-3AB1 "M1" y un pool de sueros normales de ratón analizados por la técnica de ELISA 3AB1. En el eje vertical se muestran los resultados obtenidos (densidades ópticas brutas) en función de las diluciones de cada suero (eje horizontal).

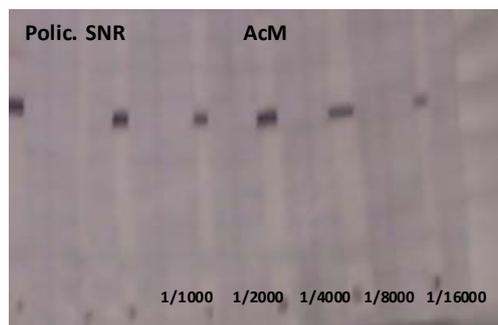


Fig.59: Titulación del AcM anti-3AB1 por Western blot; se evidencia una banda de reconocimiento específico de la proteína 3AB1 en una dilución de hasta 1/16000, el SNR y el suero policlonal mono específico se emplearon en una dilución 1/100.

Se puede observar en el gráfico que los valores máximos de D.O. alcanzados por el AcM anti-3AB1 oscilan en un rango que varía entre 2,1 y 0,5 unidades cuando se emplean 1.66 ng de antígeno empleándose para la mínima unidad de DO una dilución superior a 1/300000. Para la misma masa de proteína en la titulación del Ac policlonal solo las primeras diluciones del mismo arrojan D.O detectables y por encima del PC establecido en el ELISA 3AB1 para el modelo murino. El suero policlonal normal se mantuvo negativo en todas las diluciones. Por Western blot dicho AcM resultó específico en el reconocimiento de la PNE 3AB1 en una dilución de hasta 1/16000.

R.3.1.3.3-Determinación de isotipo del anticuerpo monoclonal anti-3AB1

El AcM seleccionado fue clasificado en términos de la clase de inmunoglobulina mediante ELISA antígeno dependiente, utilizando Ac anti-ratón isotipo-específico

Para ello se puso a punto un ELISA sandwich para los isotipos IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, específicos contra VFA. Como referencia se empleó un AcM anti-3 A de isotipo conocido (IgG1), un AcM anti-histidina de isotipo IgG2a (Amersham[®]) y un Ac policlonal anti-3AB1 proveniente de un ratón que recibió una dosis y dos boosters de 50µg del antígeno 3AB1 a los 15 y 21 dpv, es decir, todos con perfiles diferentes de isotipo.

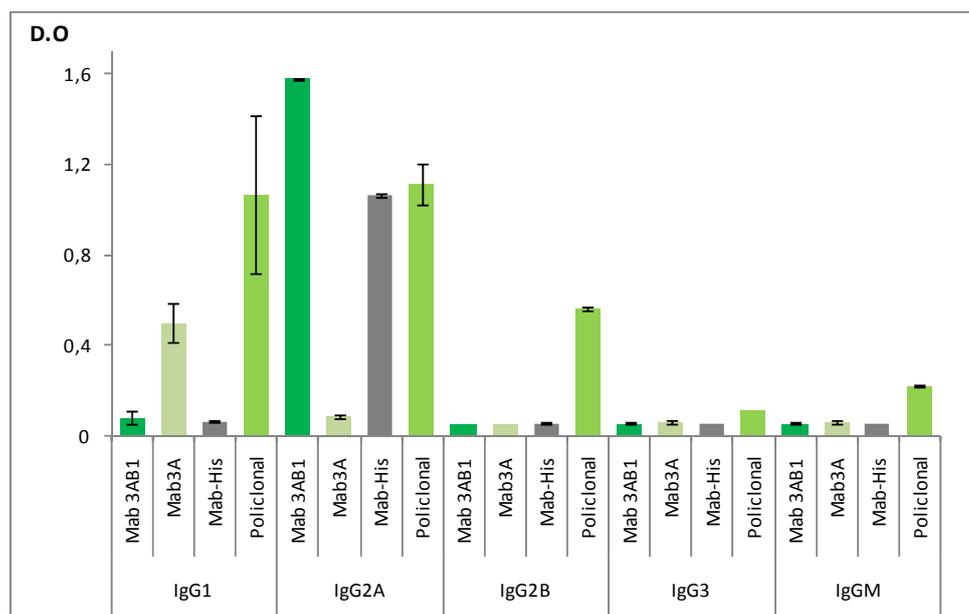


Fig.60: ELISA sandwich utilizado para determinar el isotipo del AcM anti-3AB1. En el eje vertical se representan las D.O a 490 nm, en el eje horizontal los isotipos de los Ac de referencia y del monoclonal obtenido en el presente trabajo.

Los resultados obtenidos muestran que el AcM de referencia anti-3A reconoce por este enzimoimmunoensayo el antígeno 3AB1 pegado a la placa de ELISA y se corrobora su isotipo (IgG1); a su vez el monoclonal anti-histidina de isotipo IgG2a reconoce a la proteína ya que ésta posee en su extremo aminoterminal secuencias de histidinas, por otro lado el Ac policlonal monoespecífico obtenido en la especie murina luego de recibir la segunda dosis de inmunógeno (21 dpv) tiene una respuesta inmune secundaria totalmente desarrollada (isotipos IgG1 e IgG2 a y b) y prácticamente no tiene niveles de inmunoglobulinas de los isotipos IgG3 e IgG M que son los descriptos como tempranos.

Una vez confirmados los isotipos de los Ac de referencia se logró caracterizar el isotipo del AcM anti-3AB1 como perteneciente al isotipo IgG2a.

R.3.1.3.4-Inmunofluorescencia indirecta para identificación de PNEs nativas en células BHK-21 infectadas con el VFA

M. Garcia-Briones y colaboradores (2006), demostraron que es posible seguir tanto la cinética de expresión de las PNEs del VFA mediante inmunoblotting como los patrones de

inmunofluorescencia que dejan dichas proteínas en las células BHK-21 luego de la infección con el virus.

Con este antecedente y con el fin de examinar si el AcM anti-3AB1 era capaz de identificar al antígeno nativo 3AB y a sus precursores, se llevo a cabo la técnica de inmunofluorescencia como fuera descrita en la sección M.1.3.8.4 de materiales y métodos.

De este modo se observaron los patrones de inmunofluorescencia sobre células infectadas con el virus O1 Campos donde el AcM 3AB1 reacciona con los antígenos no estructurales de tipo 3AB nativos lo cual se evidencia por su acumulación en la región juxtenuclear.

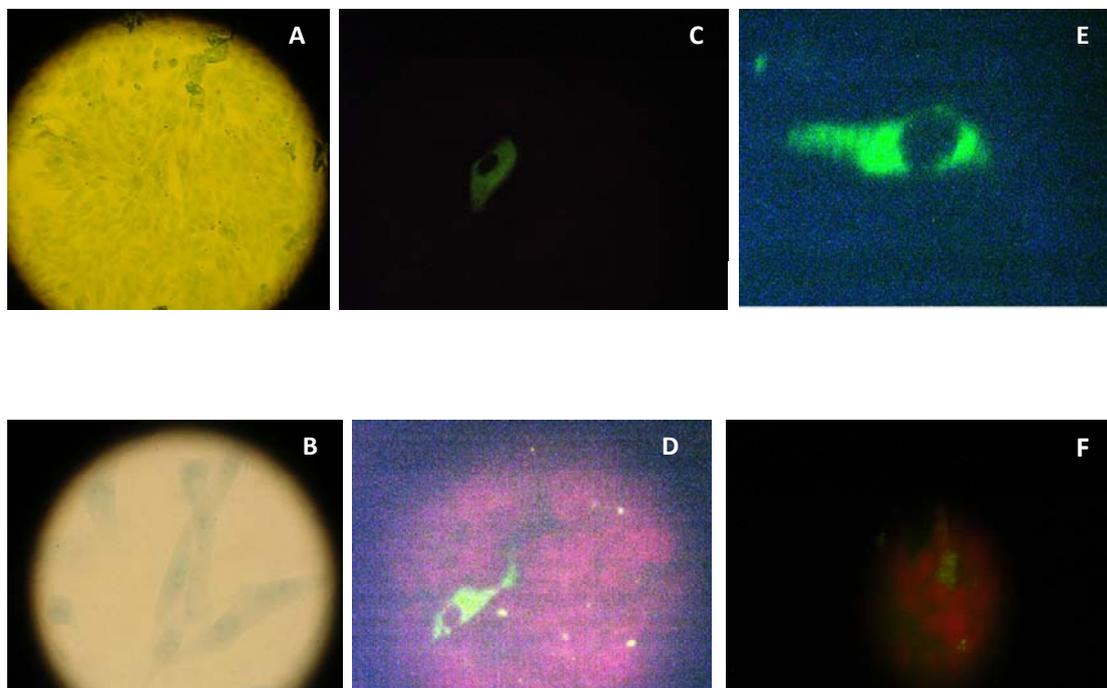


Fig.61: IFI en células BHK-21 luego de 3 hs post infección con el VFA. El AcM anti-3AB1 fue empleado como Ac primario y como control negativo un SNR. A y B microscopia óptica de las células BHK-21 infectadas aumento 10X y 40X. C, D y E microscopía de fluorescencia sobre las mismas células en distintos campos, primer anticuerpo AcM 3AB1. F microscopia de fluorescencia con un suero normal de ratón (control negativo) como primer Ac, donde solo se observan artefactos en el campo.

R.3.2- Desarrollo de ELISA de captura para la detección de proteínas no estructurales

R.3.2.1- Factibilidad

En primera instancia se evaluó la aptitud de un ELISA de tipo captura indirecto para la detección de PNEs-VFA y que permitiera a futuro la evaluación de formulaciones vacunales respecto a la presencia o no de dichas proteínas espurias y así utilizarse como control de los procesos de purificación de PNE en vacunas. La elección de un formato de ELISA de captura permitiría la detección de dichas proteínas desde una mezcla compleja, como lo es una preparación vacunal, aún en baja concentración empleando Ac específicos que incrementarían la sensibilidad de la técnica.

La primera prueba tuvo como objetivo capturar la proteína recombinante 3AB1 empleando los sueros policlonales y AcMs obtenidos en el laboratorio, y bajo las mejores condiciones de tiempos y temperaturas citadas en bibliografía para este tipo de experimentos. Para ello se analizaron 3 sueros policlonales como posibles capturas y un AcM de referencia anti-3A, como detector un cobayo monoespecífico anti-3AB1 y un detector cobayo normal como control.

Captura	Detector Cobayo 3AB1(1:500)	Detector Cobayo Normal (1:500)	Detector Cobayo 3AB1(1:500)	Detector Cobayo Normal (1:500)
	Antígeno capturado			
	3AB1 (1:500)	3AB1 (1:500)	3ABC (1:50)	3ABC (1:50)
Bovino 3AB1 (1:400)	0,29	0,2	0,25	0,19
SNB (1:400)	0,11	0,1	0,11	0,09
Ratón 3AB1 (1:400)	0,24	0,15	0,25	0,2
SNR (1:400)	0,21	0,11	0,12	0,13
Conejo 3AB1 (1:200)	0,27	0,12	0,16	0,16
SNC (1:400)	0,19	0,08	0,14	0,1
AcM-3A (1:400)	1.61	0,2	0,58	0,12

Fig.62: Tabla de D.O brutas, para la puesta a punto del ELISA de captura de PNEs del VFA. En la columna de la izquierda se ubican los sueros específicos empleados como capturantes y sus respectivos sueros controles normales; se capturaron tanto el antígeno 3AB1 como el 3ABC. En las columnas restantes se ubican los detectores empleados (suero de cobayo monoespecífico y suero de cobayo normal) para cada proteína capturada.

Se capturó tanto el antígeno 3AB1 como 3ABC, y se vio que el sistema que emplea un AcM como capturante brinda los mejores resultados con D.O muy superiores a los otros sistemas diseñados. Siendo, por tanto este un enzimoimmunoensayo factible.

Dado que el mejor sistema de captura logrado fue con un AcM de referencia anti-PNE-3A, y habiendo obtenido y caracterizado (secciones R.3.1 y R.3.1.3) el AcM anti-3AB1, se procedió a realizar el ensayo de captura con dicho AcM y compararlo con el AcM de referencia.

Captura	Detector Cobayo 3AB1(1:500)	Detector Cobayo Normal (1:500)	Detector Cobayo 3AB1(1:500)	Detector Cobayo Normal (1:500)	
	Antígeno capturado				
	3AB1(13,3ng)	3AB1(13,3ng)	3AB1(4,3ng)	3AB1(4,3ng)	
AcM-3A (1:500)	1,74	0,09	0,67	0,087	
D.E	0,04	0	0,04	0,002	
CV%	2,5	0	6,7	2,5	
AcM-3AB1 (1:500)	1,5	0,09	0,88	0,083	
D.E	0,003	0,004	0,03	0,003	
CV%	0,23	4,6	3,4	3,2	
		$T= 4,89 p=0,13$		$T=5,82 p=0,15$	

Fig.63: Resultados obtenidos del test de factibilidad de la técnica de ELISA de captura. En la columna de la izquierda se ubican los AcM empleados como capturante, los respectivos D.E y CV% de cada ensayo al emplear distintas masa de la proteína estándar y como detector un cobayo policlonal específico en comparación con un cobayo normal.

Los resultados obtenidos, D.O brutas, se expresaron como D.O promedio dado que se trabajó con un ensayo inter placa por duplicado. Como se detalla en la Fig.63, los resultados arrojaron muy bajos D.E, y un CV% menor al 10% en cada sistema analizado. Al realizar un test comparativo entre las medias estimadas para cada grupo (captura con AcM-3A y AcM-3AB1) se demostró que no había diferencias significativas ($p= 0,13$) entre las medias de ambos grupos; por lo tanto el AcM anti-3AB1 se comporta como el AcM de referencia al ser empleado como Ac capturante.

R.3.2.2- Optimización y estandarización de los reactivos

R.3.2.2.1-Selección del Buffer de captura

Dado que los buffers de captura proporcionan tanto pH como interacciones iónicas distintas que permitirían un mejor pegado del AcM anti-3AB1 a la fase sólida, se evaluaron los tres buffers de captura más empleados en este tipo de tests: carbonato 50mM pH9,6 (BCB), TRIS-HCl 20mM pH 8,5 y PBS pH 7,2 10M. Se realizó un ensayo interplaca por triplicado para dos concentraciones del antígeno a capturar (proteína 3AB1) y como control se emplearon pocillos sin antígeno (back ground).

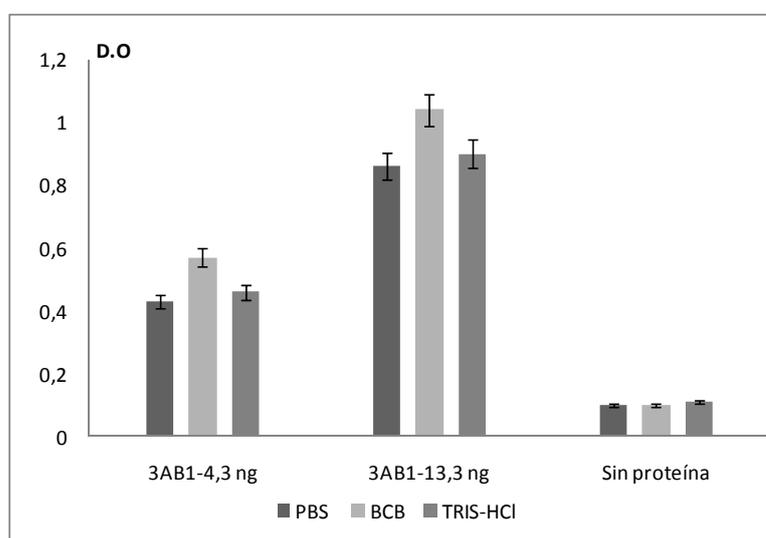


Fig.64: Comparación entre buffers de captura.

Las medias de las D.O obtenidas arrojaron muy bajos D.E y los CV% para cada uno de los buffers empleados se mantuvo por debajo del 10%. Empleando el buffer BCB se obtuvo una D.O de $0,57 \pm 0,02$ para la concentración proteica de 4,3 ng/pocillo y de $1,04 \pm 0,05$ el emplear 13,4 ng/pocillo de dicha proteína, ambos valores de D.O son superiores que los arrojados al utilizar tanto el buffer TRIS-HCl como el PBS motivo por el cual se seleccionó el buffer BCB para este test.

R.3.2.2.2-Ajuste de la dilución de uso del anticuerpo monoclonal anti-3AB1 utilizado como captura

Para establecer la dilución óptima del AcM anti-3AB1 empleado como Ac capturante se realizaron diluciones al medio del mismo versus diferentes masas/pocillo del antígeno a capturar manteniendo el detector cobayo monoespecífico a dilución constante.

3AB1 ng	1/1000			1/2000			1/4000			1/8000			1/16000			sin captura		
	D.O m	D.E	CV%	D.O m	D.E	CV%	D.O m	D.E	CV%									
26,6	1,128	0,011	1,003	1,047	0,026	2,500	0,962	0,026	2,721	0,846	0,048	5,684	0,829	0,016	1,963	0,143	0,011	7,912
13,3	0,870	0,009	1,057	0,786	0,036	4,591	0,726	0,035	4,870	0,619	0,019	3,087	0,637	0,048	7,548	0,097	0,004	4,374
6,65	0,612	0,025	4,159	0,498	0,016	3,269	0,463	0,003	0,611	0,405	0,026	6,468	0,420	0,026	6,237	0,090	0,001	1,571
3,33	0,391	0,004	1,085	0,323	0,005	1,535	0,310	0,010	3,193	0,262	0,001	1,571	0,265	0,013	5,079	0,092	0,004	4,612
1,66	0,265	0,006	2,406	0,220	0,007	3,214	0,219	0,002	0,971	0,197	0,004	1,799	0,185	0,018	9,938	0,087	0,002	2,452
0,83	0,203	0,016	8,031	0,172	0,009	5,360	0,179	0,004	1,981	0,157	0,001	0,452	0,143	0,001	0,496	0,095	0,002	2,245
0,41	0,178	0,004	2,384	0,155	0,001	0,458	0,167	0,005	2,973	0,147	0,007	4,810	0,158	0,014	8,951	0,089	0,008	9,534

Fig.65: Tabla que indica las diluciones del AcM capturante para cada masa/pocillo de antígeno capturado. Las D.O se expresaron como promedios (D.Om) de 4 réplicas; se obtuvieron muy bajos D.E y CV% menores al 10% para cada dilución.

Las primeras tres diluciones del AcM otorgan D.O promedio comparables y a medida que la dilución de dicho Ac es mayor se observan valores menores de D.O indicando que no todo el antígeno disponible estaría siendo capturado. Para cada dilución del AcM respecto de cada masa proteínica se establecieron los respectivos D.E y CV% en un total de 4 réplicas, dichos CV fueron todos menores al 10%.

La incubación de la placa de ELISA con el AcM en el buffer de captura seleccionado quedó establecida en 12 horas a 4°C. A continuación se grafican los resultados obtenidos en la titulación del AcM 3AB1 manteniendo constante la masa de antígeno contante (26 ng) y empleando tanto el suero detector cobayo monoespecífico (1/500) como el conjugado anti-cobayo (1/3000) en dilución constante. La dilución de uso del Ac de captura quedó establecida como 1/2000.

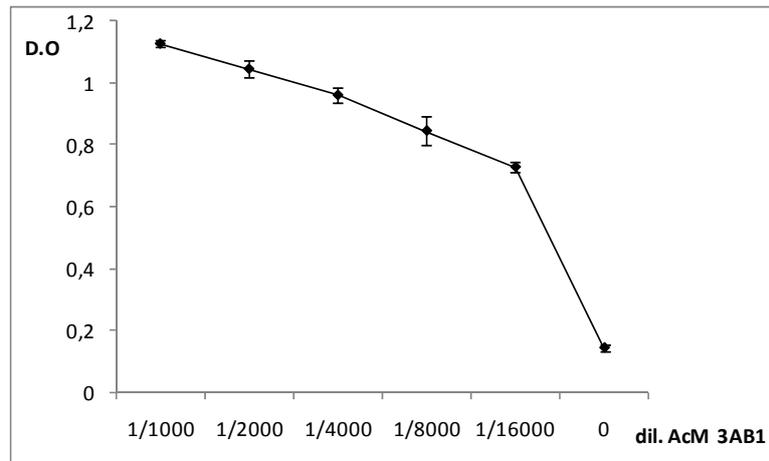
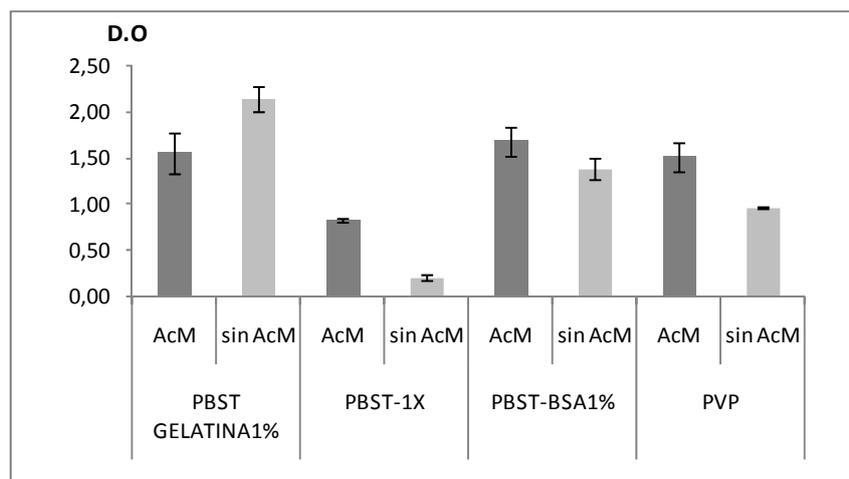


Fig.66: Retitulación del AcM capturante a partir de la cual se seleccionó la dilución de uso del mismo.

R.3.2.2.3- Selección del Buffer de Bloqueo

Con el objeto de disminuir cualquier señal de fondo en el ELISA de captura diseñado, se estudió la etapa de bloqueo, previa a la adición del antígeno en la placa, la cual evitaría a unión inespecífica de cualquiera de los reactivos a emplearse en los pasos subsiguientes. Se analizaron un total de 8 bloqueantes, a todos se les añadió en proporción 1:2000 el detergente no iónico Tween-20 para facilitar el bloqueo de interacciones no deseadas del tipo proteína –proteína inespecífica.



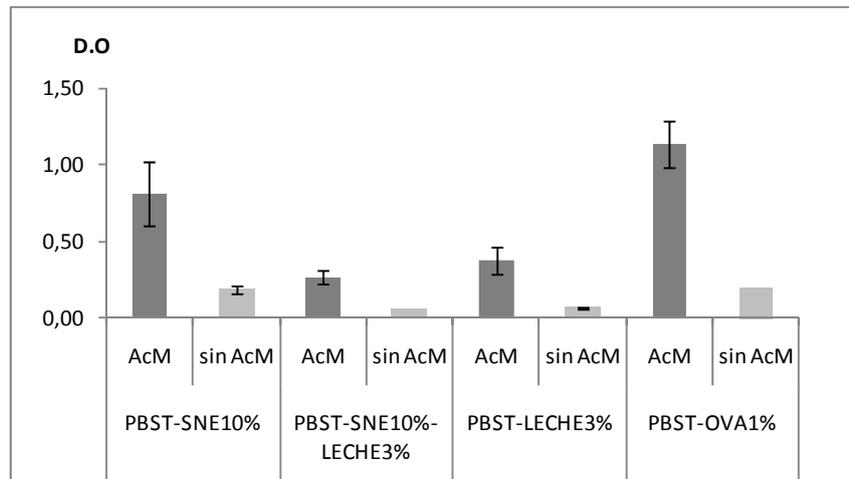


Fig.67: Puesta a punto de ELISA de captura. Para la selección del bloqueante se estudió la aptitud para esta función de 8 buffers. En cada placa se colocó el AcM capturante y en el pocillo control solo buffer de pegada, luego se colocaron los bloqueantes evaluados y se llevó a cabo la reacción inmunológica al sembrar la proteína estándar y el detector correspondiente. El mejor bloqueante resultó el PBS-T-OVA1%.

El agente bloqueador más eficaz fue el tampón PBST-con ovoalbúmina bovina al 1%, este permitió tanto los mayores valores de DO así como también mínimas interacciones inespecíficas en los pocillos donde quedaron sitios libres al no utilizar el Ac capturante utilizados como control de bloqueo.

R.3.2.2.4-Suero de cobayo detector específico y Conjugado anti-IgG de cobayo-peroxidasa

Se desarrolló, según fuera descripto en la sección de materiales y métodos, un suero policlonal de cobayo monoespecífico anti-3AB1. El propósito de su elaboración fue poder contar con un suero detector del ensayo. Se obtuvieron 6 mL de suero, los cuales fueron alicuotados y conservados a -70°C para preservar su estado.

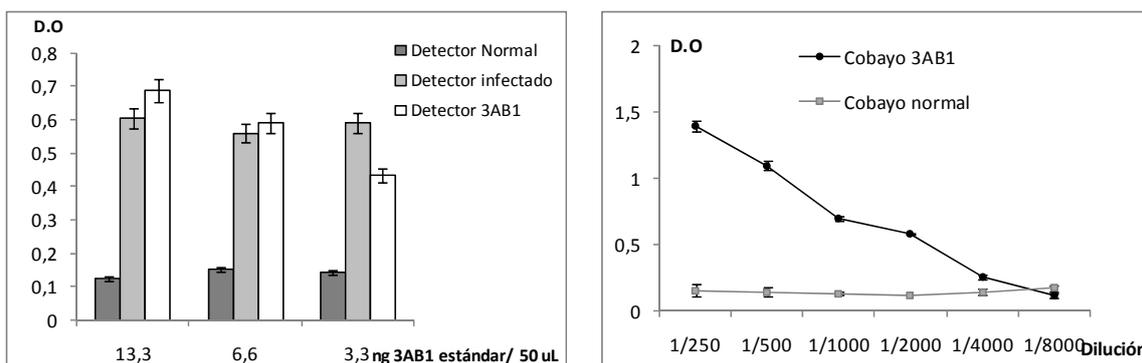


Fig.68: Resultados obtenidos en la titulación del detector del ELISA de captura y su comparación con el suero normal de cobayo y un suero infectado de referencia.

Como se observa en la Fig. 68 es comparable el resultado obtenido al emplear el suero policlonal de cobayo mono específico anti-3AB1 como detector respecto a un suero de un cobayo infectado con el VFA serotipo C referente del Instituto de Virología de INTA en cambio, el grado de reactividad de un suero normal de cobayo es mucho menor.

Posteriormente se realizó, a través del ELISA de captura, la titulación del suero detector. Se prepararon diluciones seriadas al medio del suero en buffer de bloqueo con un 2% de SNR (desde 1:250, hasta 1:8000). Todas las diluciones fueron analizadas con el ELISA de captura. El ensayo se repitió en 3 ocasiones diferentes (días consecutivos). Con todos los datos obtenidos, se realizó una curva de titulación para evaluar el grado de reactividad del suero y se lo comparó con un suero normal de cobayo. La dilución de uso el mismo quedó establecida como 1/500. Del mismo modo se procedió a titular el conjugado anti-IgG de cobayo-peroxidasa KPL® empleándose en la dilución 1/2000.

R.3.2.2.5-Parámetros de calidad del ELISA

Para evaluar las características del sistema se analizaron los parámetros siguientes:

-Repetibilidad (precisión intraensayo): a modo de analizar la variación intraensayo se emplearon un total de 6 placas haciéndose el test por duplicado; para ello se utilizó una placa diferente para cada curva de concentración de la proteína estándar 3AB1 (ng/ μ l); el ensayo se realizó bajo las mismas condiciones de operación, por el mismo analista, con iguales reactivos y

soluciones y en el mismo día. Como se observa en la tabla en ningún caso el CV fue mayor al 20%, por lo que se consideró satisfactoria la reproducibilidad del ELISA.

Proteína Estándar (ug/pocillo)	Placa 1		Placa 2		Placa 3	
	DO media	CV%	DO media	CV%	DO media	CV%
26,6	1,59	2,05	1,63	0,74	1,8	2,78
13,3	1,31	0,7	1,39	0,31	1,44	1,57
6,65	1,03	3,85	0,98	3,04	1,05	2,63
3,32	0,65	5,26	0,67	1,91	0,74	2,01
1,66	0,44	13,9	0,45	4,24	0,5	1,7
0,83	0,31	1,15	0,34	4,41	0,37	0,57
0,41	0,26	5,64	0,28	8,89	0,32	16,4
Proteína Estándar (ug/pocillo)	Placa 4		Placa 5		Placa 6	
	DO media	CV%	DO media	CV%	DO media	CV%
26,6	1,63	0,39	1,59	4,5	1,72	0,49
13,3	1,25	2,84	1,3	0,49	1,27	5,84
6,65	0,86	3,28	0,97	4,02	0,76	5,69
3,32	0,61	1,16	0,6	5,66	0,59	1,57
1,66	0,46	3,21	0,46	6,56	0,42	3,83
0,83	0,37	10,1	0,36	5,37	0,34	1,64
0,41	0,35	2,25	0,28	11,5	0,29	7,44

Resultados del ensayo de precisión

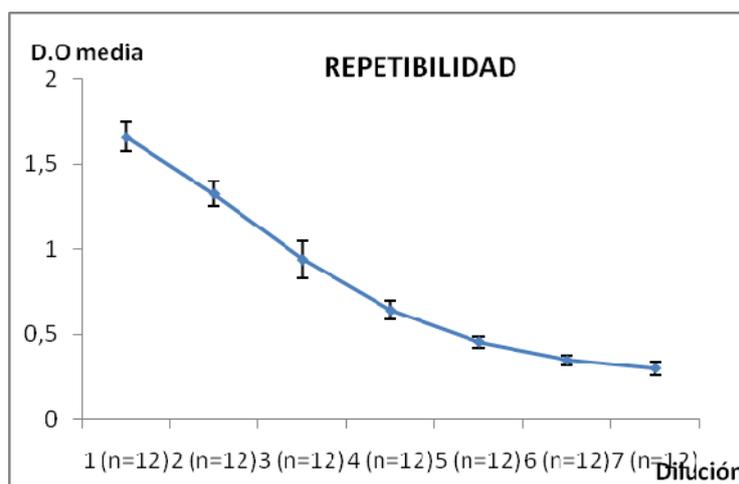


Fig: 69: Repetibilidad del ELISA de captura. En el gráfico se representan la D.O media respecto de cada dilución de la proteína estándar en un total de 12 repeticiones de cada una de ellas.

-*Precisión intermedia (precisión interensayos)*: para evaluar este parámetro se realizó el ensayo por duplicado en cada placa de ELISA, bajo diferentes condiciones de operación, diferentes reactivos, diferentes analistas (dos) y en días distintos, en el mismo laboratorio; se realizaron los cálculos pertinentes en cuanto a la D.O media, el D.E y el CV %. Se consideró como criterio de aceptación un $CV \leq 20\%$. Para evaluar la reproducibilidad (precisión interlaboratorios) se realizó el ensayo igual al anterior bajo diferentes condiciones de operación, dos analistas, diferentes reactivos, en días distintos en otro laboratorio. Para el cálculo final se tomaron los resultados de los 2 analistas del ensayo de precisión intermedia más los obtenidos por los dos analistas del nuevo laboratorio.

El CV% en ningún caso fue mayor del 20% por lo que se consideró una prueba satisfactoria para la muestra estándar estudiada.

Estándar 3AB1 ng	Analista 1		Analista 2		Total		Reproducibilidad
	D.Om	CV%	D.Om	CV%	Precisión interensayos		Precisión interlaboratorios
					D.Om	CV%	CV%
26,6	1,17	10,88	1,18	4,88	1,17	7,29	4,36
13,3	0,91	3,76	0,90	6,57	0,91	4,69	3,10
6,65	0,62	13,65	0,64	6,80	0,63	9,37	4,62
3,325	0,42	5,90	0,41	8,82	0,42	6,50	5,97
1,66	0,30	19,24	0,28	7,21	0,29	14,09	4,93
0,83	0,17	10,89	0,20	5,21	0,19	11,85	0,32
0,41	0,14	0,59	0,17	7,17	0,15	11,20	7,75

Fig.70: Resultado de precisión interensayos y reproducibilidad, se expresan las variancias asociadas a distintas fuentes de variación

-*Límite de detección (L.D)*: a fin de determinar la mínima cantidad detectable por el enzimoimmunoensayo desarrollado se analizaron los valores de absorbancia de los blancos (buffer de bloqueo sin antígeno) y puntos de la curva estándar y se consideró como límite de detección el menor valor de concentración (ng de antígeno/ pocillo) de la curva cuya absorbancia difiriera del blanco; para dicho estudio se realizaron 24 repeticiones de blanco reactivo en placas diferentes y se le calculó la media (X_m) y el desvío estándar (D.E) para cada placa. El límite de detección se calculo por la formula $X = X_m \pm 2 * D.E$ y quedó establecido en 0,30 D.O.

A partir de los datos obtenidos en el mismo ensayo y con el objeto de poder estimar la masa de antígeno en una muestra se realizó un análisis de regresión y se obtuvo una curva de regresión cuadrática.

La curva de la ecuación de regresión resultante quedó definida como $\text{ng}/50\mu\text{l} = -1.2229 + 4.8081X + 0.2991X^2 + 3.8066 X^3$ (donde X es la D.O bruta) cuyo coeficiente de determinación es $R^2 = 0.97$; la prueba de hipótesis que verifica la regresión fue significativa ($p < 0,001$).

En un ensayo paralelo y por duplicado se evaluó la capacidad del ELISA de captura de detectar otra PNE recombinante, la proteína 3ABC de referencia. Se analizaron las mismas concentraciones que para la proteína estándar (3AB1) y el rango de absorbancias obtenido para este antígeno fue similar donde para 0,3 unidades de D.O (LD) se pueden detectar aproximadamente 1,2 ng de antígeno/ 50 μL . El análisis de correlación entre el estándar y la proteína 3ABC de referencia mostró un coeficiente de correlación de 0,9930, por lo tanto, el test permite la capturar específicamente PNEs del VFA.

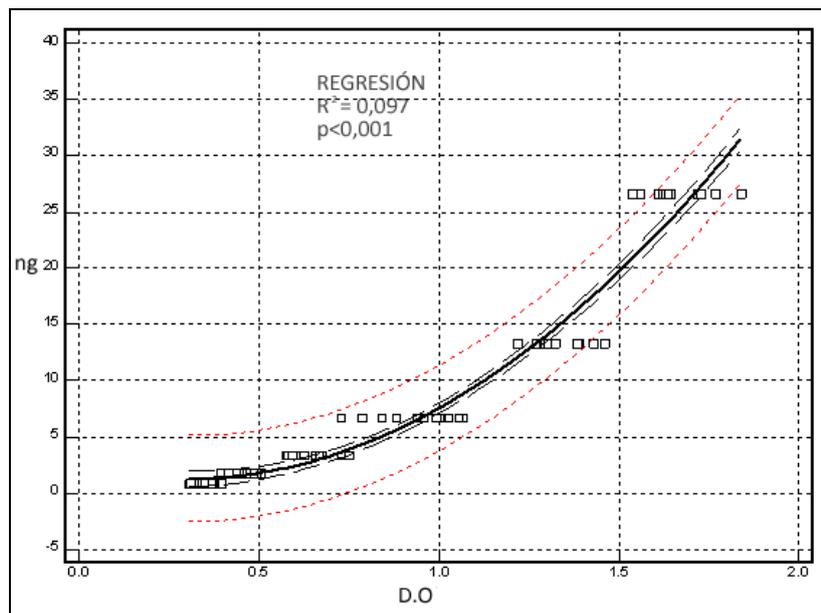


Fig. 71: Curva de regresión. En el eje vertical se muestran lo ng de la proteína estándar obtenidos de diluciones seriadas de la misma y en el horizontal las D.O. brutas obtenidas por medio del ELISA de captura.

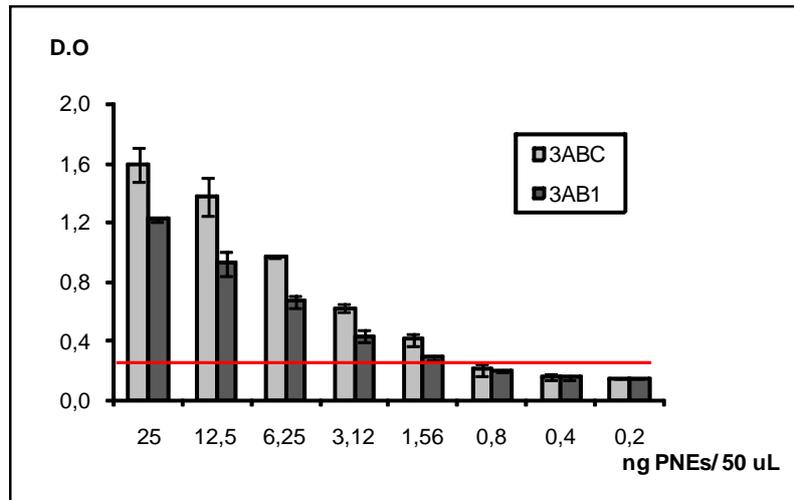


Fig. 72: Curva dosis respuesta. Se comparan las D.O brutas obtenidas para distintas concentraciones (ng/50µL) de proteína estándar respecto de otra PNE.

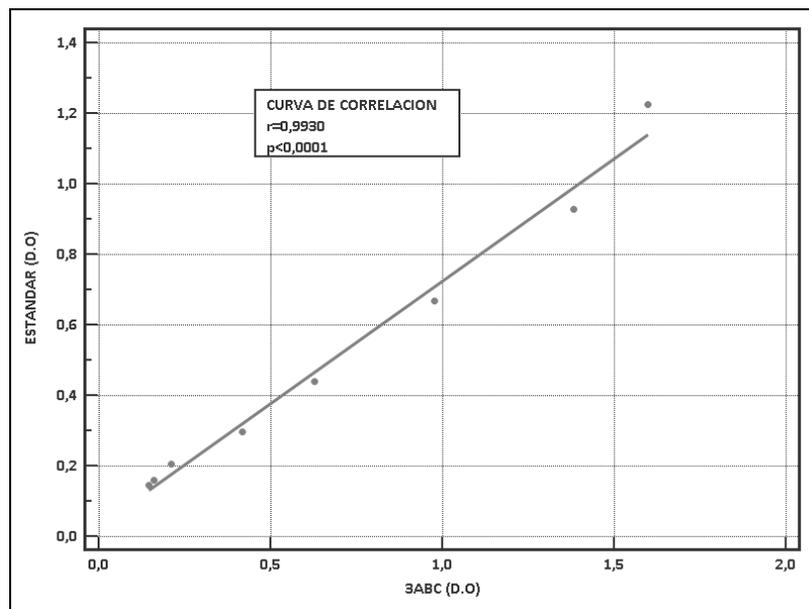


Fig.73: Correlación entre el estándar y la proteína 3ABC (r=0,9930).

R.3.2.2.6-Protocolo final del ELISA de captura para PNEs del VFA

Las condiciones del ELISA de captura finalmente establecidas fueron: sensibilizado de placas Immunolon II con 50 μ L del AcM 3AB1 en dilución 1/2000 en buffer carbonato 50mM pH9,6 luego de 12 hs de incubación a 4°C se lavó la placa 3 veces PBS 0.25X +Tween 1:2000 y se bloqueó durante 60 min. con 70 μ L PBS-T-OVA1% a 37°C con agitación. Posteriormente, una vez descartado el bloqueante, se adicionó el antígeno a capturar (proteína estándar o muestras) en distintas diluciones en PBS-T-OVA1% durante 60 min. a 37°C con agitación. Luego de lavar nuevamente 3 veces con PBS 0.25X +Tween 1:2000 se adicionó el detector cobayo monoespecífico 3AB1 en dilución 1/500 en PBST-OVA1% y 2% SNR incubándose durante 60 min. a 37°C con agitación. Nuevamente se realizaron 3 lavados antes de adicionar el conjugado anti-cobayo en dilución 1/2000 en PBST-OVA1% y 2% SNR incubado durante 30 min. a 37°C. Se efectuaron 4 lavados y se adicionó el cromógeno OPD-H₂O₂ en 150 ppm diluido en buffer citrato pH 5,0. Frenada la reacción con H₂SO₄ 2N se leyó a 492nm.

R.3.3-Utilización del ELISA de captura

R.3.3.1-Evaluación de la presencia de PNEs en formulaciones vacunales experimentales

Cuatro de la vacunas experimentales oleosas que fueran inoculadas e indujeron respuesta inmune humoral tanto en bovinos como en ratones se seleccionaron para ser evaluadas por el ELISA de captura desarrollado.

Previamente se separó la fase acuosa de la fase oleosa vacunal a partir de dos extracciones con el solvente orgánico diclorometano, se efectuaron una serie de lavados que se juntaron con la fase acuosa extraída y se sembraron como antígenos en el test de ELISA.

Si bien para la vacuna #5 la D.O apenas supero la D.O límite en las vacunas restantes se obtuvo una absorbancia mayor al punto de corte establecido, por lo tanto fue posible la detección la PNE presente en la formulación vacunal experimental luego de dos extracciones

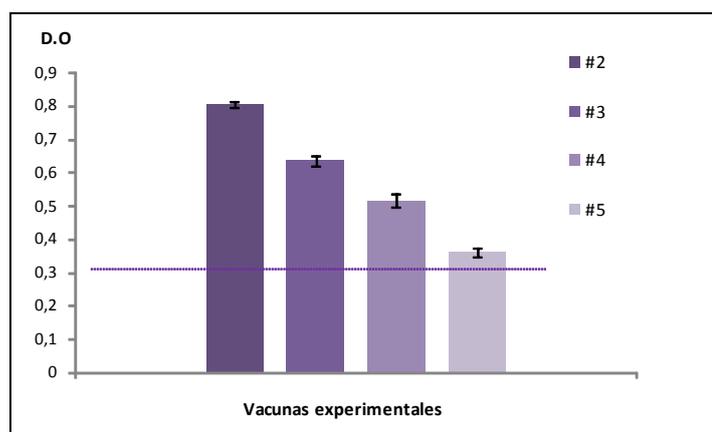


Fig.74: Detección de la PNE recombinante 3ABC en la fase acuosa extraída de vacunas experimentales. En el grafico se representan los valores de D.O en el eje vertical obtenidos para cada extracto empleando el ELISA de captura desarrollado. El valor de D.O para la formulación #5 es border line.

Adicionalmente, se estimó la cantidad de proteína recuperada en la fase acuosa luego de las sucesivas extracciones. En la Fig.75 se esquematizó en una tabla las características de las vacunas utilizadas. Las mismas fueron previamente utilizadas en las experiencias detalladas en las secciones R.2.1.2 y R.2.2.1 correspondientes a los modelos animales donde fuera determinada la dosis mínima inmunizante de la PNE 3ABC. Los valores de absorbancia obtenidos para las vacunas #2, #3 y #4 y sus correspondientes $\mu\text{g}/50\mu\text{l}$ calculados, caen dentro del rango establecido para la proteína estándar. La fase acuosa de la vacuna #5 brindó una D.O apenas por encima del límite de detección obteniéndose una concentración un 25% por debajo del valor de corte de 1,2 ng de antígeno/50 μL calculado.

Vacuna	Formulación oleosa	Dosis inoculada	Fase acuosa	Respuesta inmune	
	3ABC total ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	3ABC ng	3ABC recuperada ($\mu\text{g}/50\mu\text{L}$)	Bovinos	Ratones
#2	0,84	167	4,9	†	†
#3	0,21	42,5	3	†	†
#4	0,13	26	1,9	SE	†
#5	0,05	10,6	0,9	-	-

Fig.75: Datos correspondientes a las formulaciones vacunales experimentales

R.3.3.2-Evaluación de la presencia de PNEs nativas en sobrenadantes de cultivo de células infectadas con el VFA.

Con el objeto de evaluar la performance del ELISA desarrollado en cuanto a la detección de PNEs nativas se partió de un cultivo de células BHK-21 el cual fue infectado con un virus de referencia A2001 ($10^{6.7}$ DICT50%/mL). Luego de producirse el efecto citopático los restos celulares fueron separados del sobrenadante por centrifugación y sin concentrar se evaluó la presencia de PE empleando la técnica de ELISA en fase líquida descrita en la sección M.2.1 de materiales y métodos y posteriormente se realizó el ELISA de captura para la detección de PNEs nativas utilizando diluciones seriadas del sobrenadante celular.

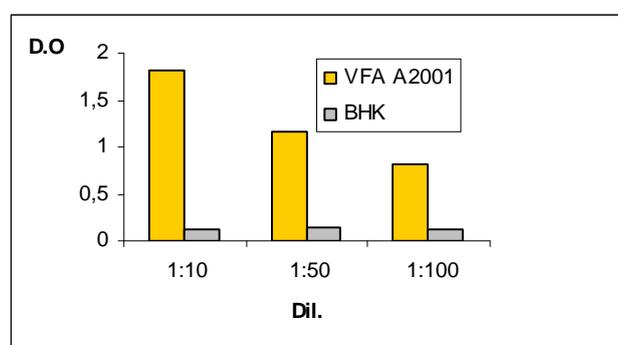


Fig.76: Resultados del ELISA en fase líquida para determinar la presencia de PE en el sobrenadante de células infectadas con VFA comparado con el sobrenadante proveniente de células sin infectar.

Como se observa en el gráfico, se pudo detectar la presencia de proteínas estructurales empleando sueros policlonales específicos anti-VFA, al comparar con el sobrenadante de células BHK-21 sin infectar. Curiosamente, al analizar la presencia de PNEs del VFA tanto el sobrenadante de células no infectadas (control negativo) como el de aquellas que fueran infectadas con el serotipo viral A2001 dieron el mismo perfil de D.O, con valores por debajo del límite de detección. El test resultó válido dado que las diluciones seriadas de la proteína estándar 3AB1 estuvieron dentro de los límites establecidos anteriormente.

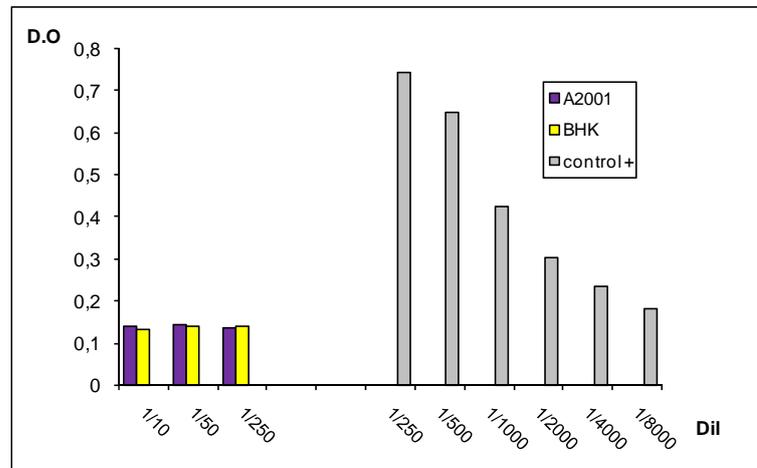


Fig.77: Resultados del ELISA de captura para los sobrenadantes de células infectadas con el VFA serotipo A2001 comparada con células BHK-21 sin infectar (barras coloreadas en violeta y amarillo respectivamente). Hacia la derecha, barras coloreadas en gris, se graficaron diluciones seriadas del control positivo (proteína 3AB1).

Con el sobrenadante de las células BHK infectadas con el serotipo viral A2001 se formularon vacunas experimentales (50% fase acuosa y 50% fase oleosa) las cuales fueron inoculadas tanto en bovinos como en ratones; los animales bovinos recibieron un total de 3 dosis cada 30 días y las muestras de suero fueron obtenidas cada 30 días hasta los 90 dpv. En el caso del modelo de ratón, estos fueron inoculados cada 15 días con un total de 3 dosis y las muestras de suero fueron obtenidas hasta los 45 dpv. En ningún caso los animales resultaron seropositivos para PNEs del VFA (datos no mostrados); como control negativo también se formularon vacunas experimentales con sobrenadantes de células BHK sin infectar y en todos los casos se corroboró la serología positiva para PE del VFA.

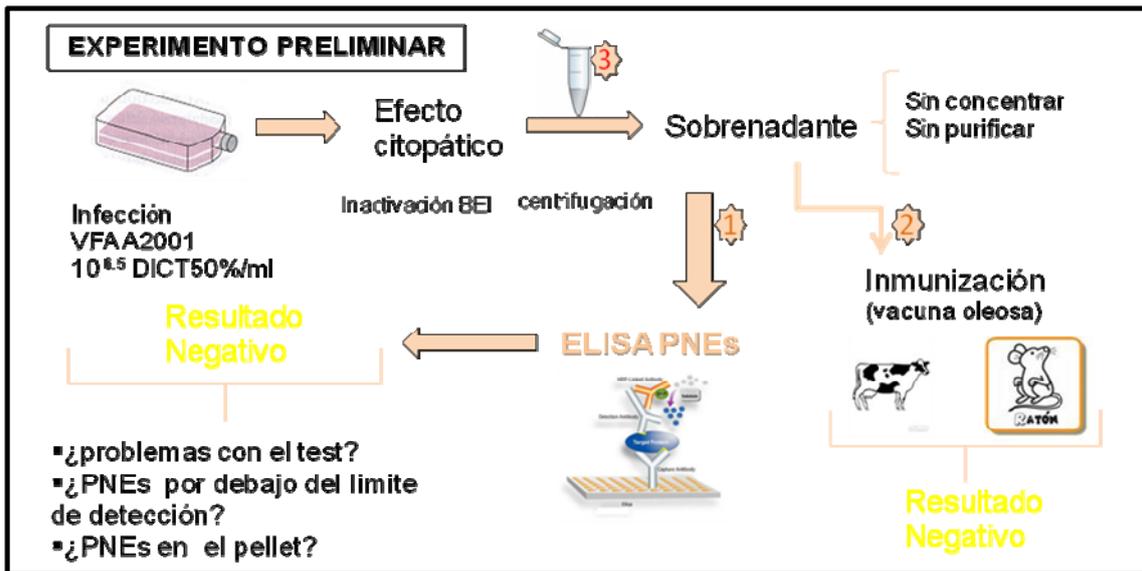


Fig.78: Esquema del protocolo llevado a cabo con el sobrenadante de células BHK-21 infectadas con el VFA. La fracción 1 se analizó por e ELISA de captura para PNEs desarrollado; la fracción 2 fue inoculada en modelos in vivo. La fracción 3 correspondiente al pellet celular fue analizada por Western blot.

Se analizó la posible presencia de PNEs en el pellet de los restos celulares. Para ello luego de sonicar y lavar dicho pellet se lo analizó empleando la técnica de Western blot. Brevemente, se sembraron el sobrenadante de las células infectadas que fuera negativo por la técnica de ELISA de captura, el primer lavado del pellet celular y el pellet sonicado. Como control negativo se realizó el mismo procedimiento con células BHK-21 sin infectar y como control positivo se sembraron las proteínas 3AB1 y 3ABC. Se utilizó como detector el AcM 3AB1 desarrollado en el laboratorio.

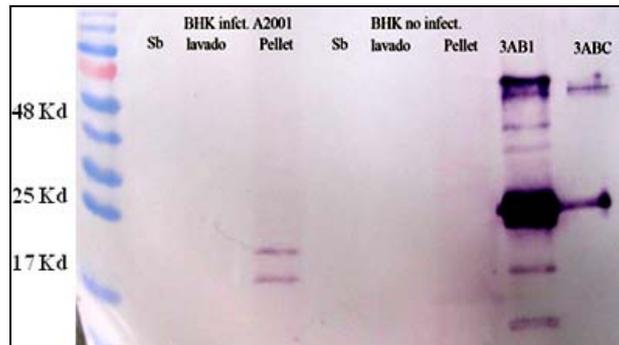


Fig.78: Western blot análisis de la presencia de PNEs en el pellet celular. E tres primeras filas se corrió el sobrenadante celular, un lavado del pellet celular y el pellet de células infectadas con el VFA, a continuación se sembraron las mismas fracciones de células no infectadas y como controles las proteínas 3AB1 y 3ABC. Como primer Ac se empleó el AcM anti-3AB1.

De acuerdo a la Fig.78 donde fuera sembrado el pellet de células infectadas, al ser revelado específicamente con el AcM 3AB1 se observan dos bandas que coincidirían con los pesos teóricos de las PNEs 3AB (20 kda) y 3A(17kD). No se detectó en esta fracción ninguna proteína de peso molecular de alrededor de 48KD (peso teórico de la proteína 3ABC). En el resto de las fracciones sembradas (lavado y sobrenadante de células infectadas y no infectadas) no hubo reacciones inespecíficas y como se esperaba resultaron negativas.

D-Discusión

Discusión

El presente trabajo presenta el desarrollo de métodos para su aplicación al control de vacunas anti-VFA en relación a la presencia de PNEs espurias, ya que este es un requisito indispensable para la aprobación de las formulaciones vacunales que permitan diferenciar animales vacunados de infectados.

D.1-Producción de reactivos y puesta a punto de ensayos para modelos in vivo

En primera instancia se trabajó en la preparación de diferentes reactivos, tales como anticuerpos monoclonales, sueros policlonales específicos y antígenos proteicos. A partir de estos, el trabajo se enfocó en el desarrollo y puesta a punto de técnicas que permitieron centrar la tesis en dos aspectos principales: la evaluación y desarrollo de modelos animales para estudiar la respuesta inmune humoral que inducen las vacunas que contienen trazas de PNEs VFA, y el desarrollo de metodologías *in vitro* que permitan a futuro y en forma rápida, la detección de PNEs en las distintas etapas del proceso de elaboración de la vacuna anti-VFA.

La primera parte de este trabajo presenta la producción y caracterización de la proteína 3AB1 recombinante obtenida de bacterias. La elección de esta proteína se basó en sus características antigénicas similares a las de otros precursores, tales como la proteína 3ABC, que también fueron utilizados como antígeno en diversos ensayos de ELISA comerciales (De Diego et al., 1997; Malirat et al.,; Sorensen et al., 2005; Robiolo et al., 2005). Esta proteína se empleó tanto como reactivo en los ensayos diagnósticos puestos a punto en este trabajo así como también en la producción de AcMs, ya que previamente había sido demostrado que los Acs contra 3AB y sus precursores son los mejores indicadores de infección con el VFA en poblaciones bovinas vacunadas. (Bergman et al, 1993; De Diego et al, 1997; Mackay et al, 1998; Sorensen et al, 1998). Asimismo, la proteína 3AB1, al carecer del dominio 3C (con propiedades auto catalíticas) posee una mayor estabilidad que la proteína 3ABC nativa. (Bergman et al, 1993; De Diego et al, 1997; Mackay et al, 1998; Sorensen et al, 1998).

La construcción realizada en el vector pRSET A 3AB1 fue descrita y desarrollada en el Instituto de Biotecnología de INTA Castelar (Silberstein et al., 1997). A partir de bacterias transformadas con dicho plásmido, se procedió a analizar la presencia del inserto, lo cual quedo confirmado por PCR y análisis de restricción. Como sistema de expresión se utilizó *E.coli* BL21 (Silberstein et al., 1997) ya que es un método simple, de bajo costo y con alta facilidad de ser llevado a gran escala.

Antes de realizar la producción de la proteína 3AB1 se realizó la predicción de los determinantes antigénicos presentes en la misma utilizando el método “in silico” descrito por Kolaskar y Tongaonkar. Se encontraron 2 mutaciones aminoacídicas puntuales en 3 de los 5 epitopes B predichos, las cuales no afectaron el reconocimiento de la proteína por sueros de animales infectados indicando que alguno de esos epitopes B se expresan durante el curso natural de la infección con el VFA.

Como método de purificación y enriquecimiento se empleó una estrategia basada en la separación de la proteína 3AB1 recombinante por SDS-PAGE en geles de formato grande y posterior electroelución de la banda de interés ^(Nanni et al., 2005). Dicha metodología permitió obtener no sólo un alto rendimiento del producto en todos los stocks producidos (sección R.1.1.6.2), sino también obtenerla lo suficientemente purificada como para ser empleada en tests diagnósticos y como inmunógeno.

La caracterización antigénica de la proteína 3AB1 se realizó inicialmente mediante un pequeño panel de sueros bovinos de referencia para la detección de PNEs-VFA, que fueron obtenidos a partir bovinos vírgenes o experimentalmente infectados con el VFA. Los sueros de bovinos infectados de este panel, provinieron de animales en los cuales la infección fue confirmada por sintomatología clínica, aislamiento viral, RT-PCR y serología para detección de PNEs-VFA. Los sueros de bovinos no infectados con el VFA (vírgenes o *nāive*), provinieron de animales de la región libre natural de FA al sur del paralelo 42° de nuestro país. Su estado en este caso, fue confirmado mediante pruebas serológicas basadas en la detección de Acs contra PNEs del VFA.

Como siguiente paso de la caracterización, se empleó el modelo murino, para lo cual se inocularon ratones con 5 µg de 3AB1 recombinante. Los sueros obtenidos fueron capaces de reconocer al antígeno nativo y sus precursores en células BHK-21 infectadas con VFA O1 Campos, tal lo determinado por la técnica de IFI. Los resultados mostraron patrones de inmunofluorescencia característicos para los sueros anti-3AB1 (Briones et al., 2006), a diferencia de los sueros normales que no presentaron reacción alguna. Por último, sueros provenientes de ratones normales o inoculados con proteínas obtenidas a partir de *E. coli* no transformadas y aisladas dentro del mismo rango de movilidad electroforética que la proteína de interés, no presentaron reacción contra el antígeno recombinante 3AB1 mediante la técnica de ELISA indirecto, tal como se discute posteriormente.

A la producción de estos reactivos, siguió la puesta a punto del ELISA indirecto 3AB1 para evaluar sueros murinos. Para esto se tomó como base el desarrollo del ELISA 3AB1 bovino (Nanni et al., 2005) y se definieron los parámetros específicos para el ensayo utilizando esta especie animal. En una primera etapa fueron definidos los controles internos del ensayo: CPF (M1 1:500), CPM (M1 1:1500) y CN; los cuales fueron incluidos en cada placa de ELISA 3AB1 ratón. El CPF se empleó además como suero de referencia respecto del cual se normalizaron los resultados obtenidos para cada una de las muestras analizadas en cada placa (incluyendo el CPM y CN). Como segunda etapa se trabajó sobre la determinación del punto de corte mediante el cual se estableció la categorización dicotómica de los resultados. Para ello, se emplearon un total de 283 sueros normales de ratón provenientes de 3 bioterios de la provincia de Buenos Aires. La totalidad de los sueros fue analizada por el ELISA 3AB1 ratón, procesada y normalizada con relación al CPF. Así, el punto de corte quedó establecido en el 14% del valor del CPF.

Como tercera y última parte dentro de esta primera etapa, se trabajó en la producción de diferentes sueros policlonales de diferentes especies animales (bovinos, ratones y cobayos) de alto título anti-3AB1, los cuales se emplearon como componentes principales de las distintas técnicas descriptas o citadas a lo largo del presente trabajo.

D.2-Modelos in vivo

D.2.1-Bovinos

El Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) división Sanidad Animal bajo la Resolución 351/2006 dictamina la reglamentación que permite el control de las vacunas destinadas a la prevención de la FA en Argentina y dispone que los sueros bovinos empleados en la prueba de potencia se analicen respecto a la presencia de Acs anti-PNEs a los 0 y 60 días post vacunación. El lote vacunal es aprobado cuando hay ausencia de reactores. Ante la presencia de al menos 2 animales reactores en un grupo de 16 bovinos a los 60 dpv (con una vacunación) se realiza un recontrol sobre un nuevo grupo de bovinos vírgenes, de los cuales si para los 60 dpv no hay reactores para PNEs la vacuna es aprobada. Si en cambio, se detectan nuevamente al menos 2 bovinos seropositivos se efectúa una revacunación con una dosis de la vacuna. El lote vacunal finalmente es aprobado si a los 30 días post revacunación no se detectan nuevos animales seropositivos, en caso contrario es rechazado.

Basándonos en esta resolución así como también en las recomendaciones propuestas por la OIE y la EMEA se evaluó bajo condiciones experimentales la posible inducción de Acs anti- PNEs del VFA luego de la vacunación repetida en bovinos.

En nuestra experiencia se utilizaron un total de 7 vacunas polivalentes inocuas e inmunogénicas junto con un control negativo y la población sobre la que se trabajó quedó confirmada seronegativa para PNEs (sección R.2.1.1). En este estudio, se vacunaron terneros en repetidas ocasiones con una dosis de la vacuna contra la FA cada vez, a modo de imitar un régimen de vacunación de rutina en el campo y luego se evaluó las respuestas de las vacunas respecto de la inducción de Acs anti-PNEs VFA. La frecuencia de vacunación fue mucho mayor que la recomendada por los fabricantes aunque actualmente se sabe que vacunaciones repetitivas con intervalos de, aproximadamente 1 mes, pueden genera Acs anti-PNEs, en terneros *naïve*. (Fan Lee et al., 2006)

Para la detección de Acs anti-PNEs se emplearon 4 ELISAs: 3D, 3AB1 desarrollado en nuestro laboratorio, 3ABC desarrollado por el ICT-MILSTEIN y un test de referencia desarrollado por PANAFIOSA. Las mismas muestras fueron analizadas por estos 4 ensayos; los resultados en cada caso fueron procesados y normalizados de acuerdo a los criterios establecidos por el fabricante/institución desarrolladora, utilizando además, los puntos de corte respectivos recomendados por los mismos.

En cuanto a los resultados obtenidos por el ELISA 3D, se vio que la totalidad de las vacunas incluido el control negativo, inducen Acs anti-3D en al menos 1 animal de cada grupo a partir de los 60dpv, es decir, luego de haber suministrado dos vacunaciones (primera inmunización y booster).

Sólo dos vacunas presentaron un perfil diferente: la vacuna P3 que inducen Acs a los 30 dpv, es decir, luego de una única dosis y la vacuna 6A que genera Acs anti- 3D medibles a los 90 dpv (luego de una tercera vacunación).

Se ha reportado que la RNA polimerasa (proteína 3D) es un componente interno de al menos un 20-30% de los virus, así como también se ha discutido si la contaminación endógena o exógena de los viriones con la proteína 3D puede ser responsables de la inducción Acs específicos (Newman et al., 1994) contra esta proteína. La presencia de trazas de esta proteína está influenciada por la metodología de producción del antígeno, la inclusión de pasos de purificación, la concentración del antígeno, así como también por la presencia de los adyuvantes. Por lo tanto,

este es un test adecuado para utilizarse sólo en países o regiones donde no se aplica vacunación y así realizar el correspondiente control epidemiológico poblacional.

En cuanto a la detección de Acs anti-PNEs 3AB1 y 3ABC, 5 de las 7 vacunas analizadas en el modelo bovino indujeron una respuesta inmune humoral específica. Para dos de las vacunas, 6A y 6B, se detectaron animales reactivos con sólo una dosis de vacuna (1 ternero seropositivo inoculado con la vacuna 6A y 2 terneros en el grupo inoculado con la vacuna 6B). Más aún, la totalidad de los bovinos fueron reactivos con una revacunación (60dpv) para los 3 ensayos, con la única excepción de un animal del grupo inoculado con la vacuna 6B, que no fue detectado por el I-ELISA Panaftosa.

El análisis de las vacunas V1, V2 y P3, en cambio, mostró que la respuesta inmune humoral sólo se evidenció, en al menos 1 animal por grupo luego de efectuar 2 a 3 revacunaciones. En particular para la vacuna P3, el ELISA 3ABC no detectó animales seropositivos en ninguno de los dpv evaluados, sin embargo, los otros 2 enzimoimmunoensayos dieron un mismo perfil, detectando 1 de 4 animales reactivos a partir de los 60 dpv (2 inmunizaciones). Es lógico pensar que la mayor carga antigénica de PNEs en la formulación vacunal sería capaz de inducir más tempranamente respuestas humorales detectables y un ejemplo de esto puede ser lo observado para las vacunas 6A y 6B en relación a las restantes vacunas positivas.

Finalmente, dos de las vacunas (P4 y P5) junto con el control negativo no indujeron respuestas detectables a lo largo de toda la experiencia por ninguno de los ensayos utilizados.

Estos resultados fueron consistentes con los obtenidos por Fan Lee, et al. (2006) y Mondragón, et al (2006) donde a partir de protocolos de reinmunización con vacunas anti-FA, fue posible detectar Acs anti-3ABC en los animales vacunados.

La comparación de los 3 ensayos mostró resultados distintos para las mismas muestras, en particular para el ELISA 3ABC que en general detectó la presencia de animales seropositivos para PNEs algo más tarde que el I-ELISA-Panaftosa y el ELISA 3AB1. Si bien estas diferencias podrían reflejar distintos niveles de sensibilidad, es importante mencionar que estos enzimoimmunoensayos han sido diseñados para evaluar el estado epidemiológico de una población y que por lo tanto, su evaluación con números limitados de muestras puede no reflejar efectivamente la sensibilidad y especificidad de los ensayos. Más aún, los resultados obtenidos dependerán también de la cantidad de los antígenos no estructurales presentes en la formulación, así como también de la vía de inoculación y el estado inmune general de cada individuo.

En conjunto, estos resultados indican que la presencia de PNEs, como contaminantes del proceso de producción de las vacunas comerciales, puede generar interferencia con los ensayos utilizados para diferenciar animales vacunados de infectados, y que los protocolos recomendados por los organismos internacionales son útiles para la determinación de la calidad de las vacunas anti-aftosa en este aspecto.

Como siguiente paso, nos propusimos determinar la dosis mínima y el tiempo post vacunación necesarios para la detección de anticuerpos contra una versión recombinante de uno de estos antígenos no estructurales, la proteína 3ABC, en bovinos seronegativos para PNEs. Para esto, se formularon 6 vacunas experimentales que abarcaron un rango de masas antigénicas desde 670 ng/dosis a 2,6 ng/dosis en diluciones de orden 4. Cada grupo de terneros recibió un total de tres inmunizaciones cada 30 días y la respuesta inmune se evaluó hasta los 90 dpv.

Del análisis de estos sueros por los 3 tests se concluyó que a partir de la primera inmunización (30 dpv) las dosis más altas de inmunógeno (670, 170 y 104,2 ng) eran capaces de generar niveles detectables de Acs anti-PNEs. Luego de una segunda dosis (60 dpv) con el test ELISA 3ABC se detectó como positivo 1 de 3 animales inmunizado con 42,5 ng/dosis. Los otros dos enzimoimmunoensayos muestran lo mismo pero a partir de los 90 dpv (luego de efectuada la tercera inmunización) detectando, 1 animal de 3, también con la dosis de 42,5 ng. Esta diferencia observada en los tiempos de detección podría radicar en la sensibilidad inherente a cada test, aunque en todos los casos la dosis mínima inmunizante se hallaría comprendida en el rango que abarca de los 42,5 a los 10,6 ng/dosis.

Si bien las formulaciones comerciales evaluadas previamente difieren respecto a las vacunas experimentales que contienen 3ABC recombinante, tanto por la presencia de otras proteínas como eventualmente por las sustancias inmunomoduladoras incluidas, los experimentos de dosis mínima inmunizante permitirían estimar indirectamente y en forma aproximada la cantidad de PNE 3ABC, y sus derivados, presentes en las vacunas comerciales analizadas. Así, sería posible asimilar las respuestas obtenidas por las vacunas 6A y 6B con dosis entre 670 y 170 ng de PNE, mientras que las de las vacunas V1, V2 y P3 podrían corresponderse con dosis entre 42 y 10 ng de PNE.

D.2.2-Ratones

El estudio del modelo murino como alternativa al uso de bovinos para estas determinaciones, siguió el mismo esquema experimental descrito previamente.

En un primer estudio, se estableció la dosis mínima inmunizante de la proteína recombinante 3ABC. Se formularon un total de 6 vacunas experimentales con dosis comprendidas en el rango que va desde 670 a 2,6 ng de masa absoluta en cada dosis.

Al igual que en el modelo bovino, los grupos que recibieron las cantidades más altas del antígeno (670 y 170 ng/dosis) fueron los primeros en responder luego de recibir la primera dosis. En estos grupos, un 40 % de los animales presentaban Acs específicos. Luego de la tercera dosis tanto el grupo inmunizado con 42,5 ng como el de 26 ng generaron Acs: el 50% y el 60% de los animales fueron positivos respectivamente a los 45dpv, es decir, en la mitad de tiempo de la misma experiencia llevada a cabo en bovinos.

Estos resultados indicarían que la sensibilidad de este modelo es aproximadamente igual a la de los bovinos en relación a la masa mínima contra la que se inducen respuestas detectables. Debido a que el volumen inoculable en los ratones es 10 veces menor al de los bovinos, esto podría generar inconvenientes a la hora de realizar estudios con vacunas comerciales ya que los ratones recibirían 10 veces menos de masa antigénica que los bovinos, siendo posible entonces que las cantidades de PNEs contenidas en esos volúmenes fueran insuficientes para disparar una respuesta humoral detectable.

Para estudiar este aspecto se llevó a cabo un segundo estudio en ratones que consistió en inocular 6 de las vacunas anti-aftosa previamente estudiadas en el modelo bovino, 4 positivas (V1, V2, 6A y 6B) y 2 negativas (P5 y una vacuna control negativo sin contaminaciones de PNEs según los controles oficiales).

Interesantemente, todas las vacunas probadas en ratón repitieron los resultados obtenidos en los bovinos. Tal lo observado previamente, las vacunas 6A y 6B indujeron rápidamente anticuerpos específicos luego de la primera dosis a los 15 dpv. Las muestras obtenidas en tiempos posteriores, luego de las revacunaciones, presentaron sin embargo una alta reactividad inespecífica (contra el blanco) y no fue posible su determinación.

De igual forma a lo observado en bovinos, las vacunas V1 y V2 también generaron Acs anti-PNEs pero sólo luego de 3 inmunizaciones (22% y 12% de ratones seropositivos, respectivamente). En este caso, la reactividad contra el blanco en el ELISA 3AB1 ratón se mantuvo en niveles bajos y fue posible determinar también tiempos posteriores (hasta 60 dpv), cuando se observó un aumento del porcentaje de seropositivos (78% para V1 y 50% para V2). Tanto el control negativo (vacuna libre de PNE) como la vacuna P5 resultaron negativas para todos los tiempos analizados.

La existencia de reactividad inespecífica observada en el ELISA para los animales inoculados con las vacunas 6A y 6B, posiblemente se relacione con el método de producción de estas vacunas que fueron sometidas a un proceso de concentración del antígeno viral, según datos provistos por el fabricante. Este proceso trae como consecuencia la concentración también de otras proteínas celulares, las cuales podrían inducir anticuerpos en los animales provocando esta interferencia en el ELISA 3AB1 ratón, la cual se evidenció más claramente luego de las revacunaciones. En este sentido, las vacunas V1, V2 y P5 fueron producidas sin procesos de concentración previos y no presentaron dicha interferencia, independientemente de que resultaran positivas o negativas al ELISA 3AB1 ratón.

Más allá de este aspecto, es interesante resaltar que todas las vacunas probadas en ratón siguieron un patrón de respuestas muy similar al de los bovinos. Esto se observó aun cuando la dosis aplicada al ratón (0,2 ml) contendría una cantidad de PNEs 10 veces menor que en la de los bovinos, lo cual debería haber provocado que las vacunas 6A y 6B (entre 670 y 170 ng PNE /dosis de 2 ml) indujeran respuestas sólo luego de las revacunaciones, y que las vacunas V1 y V2 (entre 42,5 y 10,6 ng de PNEs por dosis de 2 ml) estuvieran por debajo de la dosis mínima inmunizante en ratón.

Esto indicaría un ajuste diferente entre las curvas de dosis mínima inmunizante y los resultados obtenidos para las vacunas comerciales en bovinos y en ratones. Una hipótesis posible es que la inmunogenicidad en ratones de las versiones nativas de las PNEs asociadas a restos celulares y arrastradas durante el proceso de producción, podría ser mayor que la de los antígenos recombinantes purificados, aun cuando ambos se hayan formulado en los mismos vehículos oleosos. En esto también podría influir la vía de inoculación empleada en ratones (intraperitoneal), que podría ser más efectiva para la presentación antigénica de estas mezclas proteicas complejas que la intramuscular utilizada en bovinos. En cualquier caso, estos resultados demuestran que esta es una estrategia posible, con resultados iniciales alentadores que merecen ser profundizados mediante un mayor número de pruebas comparativas entre bovinos y ratones, empleando inmunógenos vacunales con cantidades controladas de PNEs.

D.3-Modelo in vitro

La última parte del presente trabajo de tesis se enfocó en el desarrollo de un ELISA que pudiera utilizarse como método de control del grado de purificación de PNEs durante el proceso de elaboración de vacunas anti-aftosa. Este tipo de ensayo permitiría procesar varias muestras por

placa y así realizar una evaluación de la pureza de cada formulación a lo largo de las etapas de producción. Adicionalmente, si bien fue seleccionado en principio como un método cualitativo para determinar la presencia de las PNEs en la muestra analizada, también permitiría una estimación de la cantidad de estos antígenos.

El diseño del test se realizó sobre un esquema de ELISA de captura, que mediante placas sensibilizadas con anticuerpos específicos para las PNEs, permitirían analizar suspensiones antigénicas complejas manteniendo buenos niveles de especificidad. La detección en este caso, en el que para el revelado se utiliza una enzima HRP conjugada a un suero anti especie, debería hacerse con un anticuerpo o suero de una especie distinta a la de la captura y que tuviera alta especificidad y afinidad para asegurar en este caso la sensibilidad del ensayo. Con este objetivo se desarrolló un AcM de ratón contra la 3AB1 recombinante y se produjo un suero detector en un cobayo hiperinmunizado con esta misma proteína.

La caracterización del AcM 3AB1 se realizó por WB y ELISA enfrentándolo contra el antígeno homólogo y la proteína recombinante 3ABC. En todos los casos el AcM 3AB1 fue capaz de reaccionar contra estos polipéptidos hasta diluciones de al menos 1/16.000 por WB y 1/300.000 por ELISA. Más aun, mediante la técnica de IFI se demostró que el anticuerpo fue capaz de detectar la proteína nativa, sus derivados y precursores, expresados en células BHK-21 infectadas con VFA.

El suero de cobayo hiperinmunizado con 3AB1 fue seleccionado a partir de su comparación con un suero de cobayo infectado con VFA utilizado como referencia. El protocolo de inmunización repetida favorecería el aumento de la afinidad de los anticuerpos producidos. La caracterización fue realizada por ELISA, observándose resultados equivalentes a los del suero del animal infectado.

Los estudios de factibilidad del ELISA de captura demostraron que el AcM 3AB1 se comporta en forma comparable que el AcM 3A de referencia, no habiendo diferencias significativas entre ambos. Asimismo, la técnica fue capaz de capturar eficientemente tanto el antígeno 3AB1 como el 3ABC.

A continuación, se llevo a cabo la estandarización de los diferentes componentes del test. Como buffer de captura se seleccionó el tampón carbonato 50 mM pH: 9,6, y como bloqueante PBST-OVA1%. Para cada etpa del ensayo fueron seleccionadas las mejores condiciones en cuanto a tiempos y temperaturas de incubación.

El grado de dispersión de la técnica se estudió empleando una curva estándar de 7 puntos a partir de una concentración de 26,6 ng/pocillo hasta 0,41 ng/pocillo del antígeno 3AB1. El análisis intraensayo arrojó un CV menor al 10%, y se obtuvo un CV% de entre 10 y 20 % tanto para el análisis interensayo como para el análisis de reproducibilidad, por lo que puede valorarse como buena la precisión alcanzada en estas pruebas.

La cantidad mínima de antígeno detectable fue de 1,2 ng/pocillo, siendo este límite de detección adecuado para nuestros propósitos, si se tiene en cuenta el rango de cuantificación empleado (curva estándar). Por último, el análisis de correlación entre el estándar 3AB1 y la proteína de referencia 3ABC de concentración conocida, indica la similitud de detección entre los 2 antígenos (Fig.66), dando idea del grado de identidad de los valores analíticos obtenidos con un método y el contenido real del parámetro (exactitud).

Utilizando el ELISA de captura se analizó cualitativamente el remanente del antígeno 3ABC en las fases acuosas extraídas de 4 de las vacunas experimentales formuladas con cantidades conocidas de antígeno que fueran inoculadas en bovinos y ratones. Estas determinaciones demostraron que luego de dos extracciones fue posible recuperar parte del antígeno no estructural en la formulación oleosa. La cantidad del antígeno recuperado luego de las extracciones y estimado mediante el ELISA de captura no fue proporcional a la concentración del mismo presente en la formulación vacunal experimental. Así, de las vacunas con mayor concentración de inmunógeno (0,84, 0,21 y 0,13 µg/mL, correspondientes a las dosis de 170, 42,5 y 26 ng/dosis, respectivamente) pudo obtenerse, por cálculo, aproximadamente una cantidad de similar de antígeno 3ABC, por lo que puede inferirse que la determinación está condicionada por el método extractivo utilizado.

Sin embargo, en el caso de la vacuna con 0,05 µg/mL (10,6 ng/dosis) de proteína 3ABC, al estimar la concentración proteica post extracción, se observó que la misma estaba por debajo del límite de detección, asimilándose entonces que en vacunas con concentraciones antigénicas de este orden, la PNE no es recuperable para ser detectada por el método analítico desarrollado. Cabe mencionar que esta dosis de 10,6 ng inoculada en ambos modelos animales, tampoco fue inductora de anticuerpos específicos aun al efectuar revacunaciones.

Por último, se realizó la infección de una suspensión de células BHK-21 con el VFA para determinar con el ELISA de captura PNEs nativas desde el sobrenadante celular. Del mismo se

analizaron diluciones seriadas sin concentrar y como control negativo se utilizó un sobrenadante proveniente de células BHK-21 sin infectar.

Curiosamente, aún cuando fue corroborada la presencia de proteínas de cápside del VFA, no se detectó la presencia de PNEs nativas en estas muestras puesto que los valores de absorbancia del experimento fueron iguales a los del control negativo. Tres fracciones, correspondientes al pellet celular, un lavado del mismo y al sobrenadante celular fueron analizadas por WB empleando como detector el AcM 3AB1, detectándose la asociación de las PNEs virales nativas a los restos celulares del pellet y no a las otras 2 fracciones.

De estos resultados puede inferirse que parte de las PNEs del tipo 3A y 3AB serían capturadas por los restos celulares durante la clarificación en los procesos de elaboración de las vacunas anti-aftosa y por lo tanto no, estarían incluidas en el antígeno vacunal. Sin embargo, cuando la partícula viral es concentrada, hasta valores superiores al 80X, es posible que ese concentrado también contenga proteínas remanentes de menor peso molecular como lo son las PNEs, las cuales sí estarían incluidas en el antígeno de la vacuna. En esto último radica la importancia de evaluar la presencia de estas proteínas espurias en los fluidos de elusión de las distintas etapas de producción de las vacunas anti-aftosa.

En este sentido, es importante remarcar que este test fue diseñado para el análisis de PNEs en los fluidos provenientes de las distintas etapas de elaboración de vacunas anti-aftosa y es sólo en estas fracciones donde podría aplicarse como test de control del grado de purificación de las mismas. Así, es probable que la falta de detección de PNEs nativas en el sobrenadante celular se deba entonces a que estas, al estar asociadas a estructuras de membrana, hayan sido arrastradas hacia otras fracciones que se descartan en el proceso de producción.

Por lo tanto, el estudio detallado de la performance del ELISA debería realizarse a través del análisis de sobrenadantes de células BHK-21 infectadas y luego de ser altamente concentrados, tal como sucede con las formulaciones vacunales comerciales.

Conclusiones

Conclusiones

- La presencia de trazas de PNEs en vacunas anti-aftosa generan interferencias con los enzimoimmunoensayos disponibles en la actualidad para diferenciar animales infectados de vacunados.
- La dosis mínima inmunizante de proteína 3ABC recombinante se halla entre 42,5 y 10,6 ng tanto en bovinos como en ratones.
- Si bien las curvas dosis respuestas evaluadas para PNE recombinantes fueron similares en bovinos y ratones, el modelo ratón pareció ser más sensible al evaluar la presencia de PNEs en vacunas comerciales.
- El ELISA de captura permitiría evaluar el grado de purificación de PNEs, presentes en la fracción soluble, en las distintas etapas del proceso de elaboración de una vacuna anti-aftosa.



Bioq. Myrian V. Trotta



Dr. Mariano Pérez Filgueira

Bibliografía

Bibliografía

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

Aggarwal,N., Zhang,Z., Cox,S., Statham,R., Alexandersen,S., Kitching,R.P. and Barnett,P.V. (2002). *Experimental studies with foot-and-mouth disease virus, strain O, responsible for the 2001 epidemic in the United Kingdom.* Vaccine, 20, 2508-2515.

Agol,V.I., Paul,A.V. and Wimmer,E. (1999). *Paradoxes of the replication of picornaviral genomes.* Virus Res., 62, 129-147.

Alexandersen, S., Oleksiewicz, M. B. y Donaldson, A. I. (2001). *The early pathogenesis of foot-and-mouth disease in pigs infected by contact: a quantitative time-course study using TaqMan RT-PCR.* J Gen Virol 82, 747-55.

Alexandersen,S., Brotherhood,I. and Donaldson,A.I. (2002). *Natural aerosol transmission of foot-and-mouth disease virus to pigs: minimal infectious dose for strain O1 Lausanne.* Epidemiol. Infect., 128, 301-312.

Alexandersen,S., Zhang,Z., Donaldson,A.I. and Garland,A.J. (2003). *The pathogenesis and diagnosis of foot-and-mouth disease.* J. Comp Pathol., 129, 1-36.

Alfonso Clavijo, Peter Wright, Paul Kitching. (2004). *Developments in diagnostic techniques for differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease.* The Veterinary Journal, 167, 9–22.
Ambros,V., Pettersson,R.F. and Baltimore,D. (1978). *An enzymatic activity in uninfected cells that cleaves the linkage between poliovirus RNA and the 5' terminal protein.* Cell, 15, 1439-1446.

Andino,R., Rieckhof,G.E. and Baltimore,D. (1990). *A functional ribonucleoprotein complex forms around the 5' end of poliovirus RNA.* Cell, 63, 369-380.

Barton,D.J., O'Donnell,B.J. and Flanagan,J.B. (2001). *5' cloverleaf in poliovirus RNA is a cis-acting replication element required for negative-strand synthesis.* EMBO J., 20, 1439-1448.

Bastos, A. D., Bertschinger, H. J., Cordel, C., van Vuuren, C. D., Keet, D. Bengis, R. G., Grobler, D. G. and Thomson G. R., (1999). *Possibility of sexual transmission of foot-and-mouth disease from African buffalo to cattle.* Vet. Rec. 145, 77–79.

Beard,C.W. and Mason,P.W. (2000). *Genetic determinants of altered virulence of Taiwanese foot-and-mouth disease virus.* J. Virol., 74, 987-991.

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

- Bergmann,I.E., De Mello,P.A., Neitzert,E., Beck,E. and Gomes,I.** (1993). *Diagnosis of persistent aphthovirus infection and its differentiation from vaccination response in cattle by use of enzyme-linked immunoelectrotransfer blot analysis with bioengineered nonstructural viral antigens.* Am. J. Vet. Res., 54, 825-831.
- Bergmann,I.E., Malirat,V., Neitzert,E., Beck,E., Panizzutti,N., Sanchez,C. and Falczuk,A.** (2000). *Improvement of a serodiagnostic strategy for foot-and-mouth disease virus surveillance in cattle under systematic vaccination: a combined system of an indirect ELISA-3ABC with an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay.* Arch. Virol., 145, 473-489.
- Bergmann,I.E., Malirat,V., Neitzert,E. and Correa,M.E.** (2003). *Vaccines and companion diagnostic tests for foot-and-mouth disease virus. An overview of the experience in South America.* Dev. Biol. (Basel), 114, 59-65.
- Bergmann,I.E, Neitzert,E, Malirat,V. de Mendoca R, Pulga M, Muratovik, R, Quintino, D, Morgado M, Olivera, D, de Luca Neto, D.** (2006). *Development of an inhibition ELISATest for the Detection of Non-Capsid Polyprotein 3ABC in viral Suspensios Destined for Inactivated Foot-and-Mouth Disease Vaccines.* NewDiagnostic Technology, 126, 241-250.
- Bienz,K., Egger,D., Troxler,M. and Pasamontes,L.** (1990). *Structural organization of poliovirus RNA replication is mediated by viral proteins of the P2 genomic region.* J. Virol., 64, 1156-1163.
- Brocchi,E., Bergmann,I.E., Dekker,A., Paton,D.J., Sammin,D.J., Greiner,M., Grazioli,S., De,S.F., Yadin,H., Haas,B., Bulut,N., Malirat,V., Neitzert,E., Goris,N., Parida,S., Sorensen,K. and de,C.K.** (2006). *Comparative evaluation of six ELISAs for the detection of antibodies to the non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus.* Vaccine, 24, 6966-6979.
- Brown,C.C., Olander,H.J. and Senne,D.A.** (1992). *A pathogenesis study of highly pathogenic avian influenza virus H5N2 in chickens, using immunohistochemistry.* J. Comp Pathol., 107, 341-348.
- Brown,C.C., Piccone,M.E., Mason,P.W., McKenna,T.S. and Grubman,M.J.** (1996). *Pathogenesis of wild-type and leaderless foot-and-mouth disease virus in cattle.* J. Virol., 70, 5638-5641.
- Brown,F.** (2003). *The history of research in foot-and-mouth disease.* Virus Res., 91, 3-7.
- Bruderer,U., Swam,H., Haas,B., Visser,N., Brocchi,E., Grazioli,S., Esterhuysen,J.J., Vosloo,W., Forsyth,M., Aggarwal,N., Cox,S., Armstrong,R. and Anderson,J.** (2004). *Differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth-disease: evaluation of an ELISA based on recombinant 3ABC.* Vet. Microbiol., 101, 187-197.
- Burrows,R.**(1968). *The persistence of foot-and mouth disease virus in sheep.* J. Hyg. (Lond), 66, 633-640.
- Callis, J. J. (1979).** *Foot-and-mouth disease--a world problem.* Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc, 261-9.
- Cao,X., Bergmann,I.E., Fullkrug,R. and Beck,E.** (1995). *Functional analysis of the two alternative translation initiation sites of foot-and-mouth disease virus.* J. Virol., 69, 560-563.

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

Chung,W.B., Sorensen,K.J., Liao,P.C., Yang,P.C. and Jong,M.H. (2002). *Differentiation of foot-and-mouth disease virus-infected from vaccinated pigs by enzyme-linked immunosorbent assay using nonstructural protein 3AB as the antigen and application to an eradication program.* J. Clin. Microbiol., 40, 2843-2848.

Condy,J.B., Hedger,R.S., Hamblin,C. and Barnett,I.T. (1985). *The duration of the foot-and-mouth disease virus carrier state in African buffalo (i) in the individual animal and (ii) in a free-living herd.* Comp Immunol. Microbiol. Infect. Dis., 8, 259-265.

Cottral, G. E., and H. L. Bachrach. 1968. *Food-and-mouth disease viremia.* Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc 72,383-99.

Davies,O.L. (1967). *Design and Análisis of Industrial Experiments.*

Dawson, Saunders and Trapp (1997). *Bioestadística Médica..*

De Diego,M., Brocchi,E., Mackay,D. and De,S.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, 2021-2033.

Devaney,M.A., Vakharia,V.N., Lloyd,R.E., Ehrenfeld,E. and Grubman,M.J. (1988). *Leader protein of foot-and-mouth disease virus is required for cleavage of the p220 component of the cap-binding protein complex.* J. Virol., 62, 4407-4409.

Domingo,E., Escarmis,C., Baranowski,E., Ruiz-Jarabo,C.M., Carrillo,E., Nunez,J.I. and Sobrino,F. (2003). *Evolution of foot-and-mouth disease virus.* Virus Res., 91, 47-63.

Donaldson, A. I. y Ferris, N. P. (1980). *Sites of release of airborne foot-and-mouth disease virus from infected pigs.* Res Vet Sci., 29, 315-9.

Donaldson,A.I. (1986). *Aerobiology of foot-and-mouth disease (FMD): an outline and recent advances.* Rev Sci Tech OffInt Epiz., 5, 315-321.

Donaldson,A.I. and Alexandersen,S. (2002). *Predicting the spread of foot and mouth disease by airborne virus.* Rev Sci Tech, 21, 569-575.

Donaldson,A.I., Gibson,C.F., Oliver,R., Hamblin,C. and Kitching,R.P. (1987). *Infection of cattle by airborne foot-and-mouth disease virus: minimal doses with O1 and SAT 2 strains.* Res. Vet. Sci., 43, 339-346.

Draper N.R. and Smith H. (1966). *Applied Regression Analysis.* John Wiley & Sons Inc.

Escarmis,C., Dopazo,J., Davila,M., Palma,E.L. and Domingo,E. (1995). *Large deletions in the 5'-untranslated region of foot-and-mouth disease virus of serotype C.* Virus Res., 35, 155-167.

- Espinoza,A., Maradei, E., Mattion, N., Cadenazzi, G., Maddonni,G., Robiolo,B., La Torre, J., Bellinzoni, R., Smitsaart, E.** (2004). *Foot-and-mouth disease polyvalent oil vaccines inoculated repeatedly in cattle do not induce detectable antibodies to non-structural proteins when evaluated by various assays.* Vaccine 23, 69–77.
- Fan Lee , Ming-Hwa Jong , Der-Wei Yang.** (2006). *Presence of antibodies to non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus in repeatedly vaccinated cattle.* Veterinary Microbiology.
- Fracastorius,H.** (1546). *De Contagione et Contagiosis Morbis et Curatione.* Venecia, Italy.
- Garnik,A.V. and Andino,R.** (1997). *Two functional complexes formed by KH domain containing proteins with the 5' noncoding region of poliovirus RNA.* RNA., 3, 882-892.
- García-Briones, M., Rosas, M., González-Magaldi, M., Acebes, M., Sobrino, F., Armas-Portela, R.**(2006). *Differential distribution of non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus in BHK-21 cells.* Virology, 349, 409-421.
- Gebauer,F., de la Torre,J.C., Gomes,I., Mateu,M.G., Barahona,H., Tiraboschi,B., Bergmann,I., De Mello,P.A. and Domingo,E.** (1988). *Rapid selection of genetic and antigenic variants of foot-and-mouth disease virus during persistence in cattle.* J. Virol., 62, 2041-2049.
- Gillette, R. W.** (1987). *Alternatives to pristane priming for ascitic fluid and monoclonal antibody production.* J. Immunol. Methods, 99, 21-23.
- Giraud,A.T., Sagedahl,A., Bergmann,I.E., La Torre,J.L. and Scodeller,E.A.** (1987). *Isolation and characterization of recombinants between attenuated and virulent aphthovirus strains.* J. Virol., 61, 419-425.
- Grubman,M.J.** (1980). *The 5' end of foot-and-mouth disease virion RNA contains a protein covalently linked to the nucleotide pUp.* Arch. Virol., 63, 311-315.
- Grubman,M.J. and Baxt,B.** (2004). *Foot-and-mouth disease.* Clin. Microbiol. Rev., 17, 465-493.
- Grubman,M.J., Robertson,B.H., Morgan,D.O., Moore,D.M. and Dowbenko,D.** (1984). *Biochemical map of polypeptides specified by foot-and-mouth disease virus.* J. Virol., 50, 579-586.
- Hamblin,C., Armstrong,R.M. and Hedger,R.S.** (1984). *A rapid enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of foot-and-mouth disease virus in epithelial tissues.* Vet. Microbiol., 9, 435-443.
- Hamblin,C., Barnett,I.T. and Crowther,J.R.** (1986a). *A new enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus. II. Application.* J. Immunol. Methods, 93, 123-129.
- Hamblin,C., Barnett,I.T. and Hedger,R.S.** (1986b). *A new enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus. I. Development and method of ELISA.* J. Immunol. Methods, 93, 115-121.

Hames,B.D. and Rickwood,D. (1990). *Gel Electrophoresis of Proteins. A Practical Approach.* The Practical Approach Series.

Hedger,R.S. (1968). *The isolation and characterization of foot-and-mouth disease virus from clinically normal herds of cattle in Botswana.* J. Hyg. (Lond), 66, 27-36.

Herold,J. and Andino,R. (2001). *Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge.* Mol. Cell, 7, 581-591.

House, J. A. y Mebus, C. A. (1998). *Foot-and-mouth disease. En Foreign Animal Diseases* pág. 213-224. Editado por C. o. F. A. D. i. t. U. S. A. H. Association. Richmond, VA, USA: Pat Campbell & Associates and Carter Printing Company.

Jackson,T., King,A.M., Stuart,D.I. and Fry,E. (2003). *Structure and receptor binding.* Virus Res., 91, 33-46.

Jacobson,R.H. (1998). *Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases.* Rev. Sci. Tech., 17, 469-526.

Kitching, R. P. (1999). *Foot-and-mouth disease: current world situation.* Vaccine 17,1772-4.

Kitching, P. and Hughes G. H., (2002). *Clinical variation of foot and mouth disease: sheep and goats.* Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot. 21, 505-512

Klump,W., Marquardt,O. and Hofschneider,P.H. (1984). *Biologically active protease of foot and mouth disease virus is expressed from cloned viral cDNA in Escherichia coli.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 81, 3351-3355.

Knowles,N.J. and Samuel,A.R. (2003). *Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus.* Virus Res., 91, 65-80.

Knowles, N.J., Davies, P.R., Henry, T., O'Donnell, V., Pacheco, J.M., Mason, P.W. (2001). *Emergence in Asia of foot-and-mouth disease viruses with altered host range: characterization of alterations in the 3A protein.* J. Virol. 75(3), 1551-6.

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

Locher,F., Suryanarayana,V.V. and Tratschin,J.D. (1995). *Rapid detection and characterization of foot-and-mouth disease virus by restriction enzyme and nucleotide sequence analysis of PCR products.* J. Clin. Microbiol., 33, 440-444.

Loeffler, F. Y Frosch, P. (1964). *Report of the Commission for Research on foot-and-mouth disease. En Selected papers on virology.* Pág. 64-68. Editado por N. Hahon: Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall

Mackay,D.K., Forsyth,M.A., Davies,P.R., Berlinzani,A., Belsham,G.J., Flint,M. and Ryan,M.D. (1998). *Differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease using a panel of recombinant, non-structural proteins in ELISA.* Vaccine, 16, 446-459.

- Malirat,V., Neitzert,E., Bergmann,I.E., Maradei,E. and 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.* Vet. Q., 20 Suppl 2, S24-S26.
- Mason,P.W., Bezborodova,S.V. and Henry,T.M.** (2002). *Identification and characterization of a cis-acting replication element (cre) adjacent to the internal ribosome entry site of foot-and-mouth disease virus.* J. Virol., 76, 9686-9694.
- Mason,P.W., Grubman,M.J. and Baxt,B.** (2003). *Molecular basis of pathogenesis of FMDV.* Virus Res., 91, 9-32.
- Mattion,N., Konig,G., Seki,C., Smitsaart,E., Maradei,E., Robiolo,B., Duffy,S., Leon,E., Piccone,M., Sadir,A., Bottini,R., Cosentino,B., Falczuk,A., Maresca,R., Periolo,O., Bellinzoni,R., Espinoza,A., Torre,J.L. and Palma,E.L.** (2004). *Reintroduction of foot-and-mouth disease in Argentina: characterisation of the isolates and development of tools for the control and eradication of the disease.* Vaccine, 22, 4149-4162.
- McVicar, J. W. y Sutmoller, P.** (1972). *Experimental foot-and-mouth disease in sheep and goats: an epizootiological model.* Arch Gesamte Virusforsch 38, 85-96.
- Medina,M., Domingo,E., Brangwyn,J.K. and Belsham,G.J.** (1993). *The two species of the foot-and-mouth disease virus leader protein, expressed individually, exhibit the same activities.* Virology, 194, 355-359.
- Miller,J.C. and Miller,J.N.** (1993). *Estadística para Química analítica.* Addison Wesley Iberoamericana.
- Dus Santos,M., Wigdorovitz, A., Maradei, E., Periolo, O., Smitsaart, E., Borca, M., Sadir, A. M.** (2000). *A Comparison of Methods for Measuring the Antibody Response in Mice and Cattle following Vaccination against Food and Mouth Disease.* Veterinary Research Communications, 24, 261-273.
- Moonen,P., van der,L.E., Chenard,G. and Dekker,A.** (2004). *Comparable sensitivity and specificity in three commercially available ELISAs to differentiate between cattle infected with or vaccinated against foot-and-mouth disease virus.* Vet. Microbiol., 99, 93-101.
- Mondragón, N., Vera, V., MV, Restrepo, G.** (2006). *Evaluación de dos formulaciones de vacuna anti-aftosa oleosa bivalente (O1 campos y A24 cruzeiro), preparadas con dos sistemas diferentes de purificación y concentración.* Rev Col Cienc Pec, Vol. 19:4.
- Moorhouse,P.D. and Hugh-Jones,M.E.** (1981). *Serum Banks.* The Veterinary Bulletin, 51, 277-290.
- Nanni,M., Alegre,M., Compared,D., Taboga,O. and Fondevila,N.** (2005). *Novel purification method for recombinant 3AB1 nonstructural protein of foot-and-mouth disease virus for use in differentiation between infected and vaccinated animals.* J. Vet. Diagn. Invest, 17, 248-251.
- Neff,S., Mason,P.W. and Baxt,B.** (2000). *High-efficiency utilization of the bovine integrin alpha(v)beta(3) as a receptor for foot-and-mouth disease virus is dependent on the bovine beta(3) subunit.* J. Virol., 74, 7298-7306.

- Newman,J.F., Piatti,P.G., Gorman,B.M., Burrage,T.G., Ryan,M.D., Flint,M. and Brown,F.** (1994). *Foot-and-mouth disease virus particles contain replicase protein 3D*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 91, 733-737.
- Nomoto,A., Kitamura,N., Golini,F. and Wimmer,E.** (1977). *The 5'-terminal structures of poliovirion RNA and poliovirus mRNA differ only in the genome-linked protein VPg*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, 74, 5345-5349.
- Nunez,J.I., Baranowski,E., Molina,N., Ruiz-Jarabo,C.M., Sanchez,C., Domingo,E. and Sobrino,F.** (2001). *A single amino acid substitution in nonstructural protein 3A can mediate adaptation of foot-and-mouth disease virus to the guinea pig*. J. Virol., 75, 3977-3983.
- O'Donnell,V.K., Pacheco,J.M., Henry,T.M. and Mason,P.W.** (2001). *Subcellular distribution of the foot-and-mouth disease virus 3A protein in cells infected with viruses encoding wild-type and bovine-attenuated forms of 3A*. Virology, 287, 151-162.
- OIE** (2006). *Foot and mouth disease*. In OIE Standards Commission (ed.), Manual of standards for diagnostic tests and vaccines for Terrestrial Animals. Paris, France.
- OIE** (2007). http://www.oie.int/esp/info/es_fmd.htm - Sitio visitado en Febrero del 2007.
- Parida,S., Anderson,J., Cox,S.J., Barnett,P.V. and Paton,D.J.** (2006). *Secretory IgA as an indicator of oro-pharyngeal foot-and-mouth disease virus replication and as a tool for post vaccination surveillance*. Vaccine, 24, 1107-1116.
- Parida,S., Cox,S.J., Reid,S.M., Hamblin,P., Barnett,P.V., Inoue,T., Anderson,J. and Paton,D.J.** (2005). *The application of new techniques to the improved detection of persistently infected cattle after vaccination and contact exposure to foot-and-mouth disease*. Vaccine, 23, 5186-5195.
- Parida,S., Fleming,L., Gibson,D., Hamblin,P.A., Grazioli,S., Brocchi,E. and Paton,D.J.** (2007). *Bovine serum panel for evaluating foot-and-mouth disease virus nonstructural protein antibody tests*. J. Vet. Diagn. Invest, 19, 539-544.
- Paton,D.J., de,C.K., Greiner,M., Dekker,A., Brocchi,E., Bergmann,I., Sammin,D.J., Gubbins,S. and Parida,S.** (2006). *Application of non-structural protein antibody tests in substantiating freedom from foot-and-mouth disease virus infection after emergency vaccination of cattle*. Vaccine, 24, 6503-6512.
- Pilipenko,E.V., Gmyl,A.P., Maslova,S.V., Svitkin,Y.V., Sinyakov,A.N. and Agol,V.I.** (1992). *Prokaryotic-like cis elements in the cap-independent internal initiation of translation on picornavirus RNA*. Cell, 68, 119-131.
- Pizzi,J.C.** (1998). *Fiebre Aftosa en la Argentina*. Eudeba.
- Pizzi,J.C.** (2000). *Estudio General de la Fiebre Aftosa*. Eudeba.
- Racaniello, V. R.** (2001). *Picornaviridae: The Viruses and Their Replication*. En Fields Virology. Editado por D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman y S. E. Straus. Philadelphia, PA, USA: Lippincott Williams & Wilkins. 165.

- Reid,S.M., Ferris,N.P., Hutchings,G.H., Samuel,A.R. and Knowles,N.J.** (2000). *Primary diagnosis of foot-and-mouth disease by reverse transcription polymerase chain reaction*. J. Virol. Methods, 89, 167-176.
- Reid,S.M., Forsyth,M.A., Hutchings,G.H. and Ferris,N.P.** (1998). *Comparison of reverse transcription polymerase chain reaction, enzyme linked immunosorbent assay and virus isolation for the routine diagnosis of foot-and-mouth disease*. J. Virol. Methods, 70, 213-217.
- Rieder,E., Bunch,T., Brown,F. and Mason,P.W.** (1993). *Genetically engineered foot-and-mouth disease viruses with poly(C) tracts of two nucleotides are virulent in mice*. J. Virol., 67, 5139-5145.
- Robertson,B.H., Grubman,M.J., Weddell,G.N., Moore,D.M., Welsh,J.D., Fischer,T., Dowbenko,D.J., Yansura,D.G., Small,B. and Kleid,D.G.** (1985). *Nucleotide and amino acid sequence coding for polypeptides of foot-and-mouth disease virus type A12*. J. Virol., 54, 651-660.
- Robiolo,B., Griega,P.R., Periolo, O., Seki, C., Bianchi, T., Maradei, E., La Torre, J.** (1995). *Assessment of foot and mouth disease vaccine potency by liquid phase blockig ELISA: a proposal for an alternative to the challenge procedure in Argentina*. Vaccine, Vol. 13. N°14. pp 1346-1352.
- Robiolo,B., Seki, C., Fondevilla,N., Grigera,P., Scodeller, E., Periolo, O., La Torre, J., Mattion, N.** (2005). *Analysis of the immune response to FMDV structural and non-structural proteins in cattle in Argentina by the combined use of liquid phase and 3ABC-ELISA tests*. Vaccine.
- Rowlands,D.J., Harris,T.J. and Brown,F.** (1978). *More precise location of the polycytidylic acid tract in foot and mouth disease virus RNA*. J. Virol., 26, 335-343.
- Rueckert,R.R. and Wimmer,E.** (1984). *Systematic nomenclature of picornavirus proteins*. J. Virol., 50, 957-959.
- Ryan, M. D., G. J. Belsham, and A. M. King.** (1989). *Specificity of enzyme-substrate interactions in foot-and-mouth disease virus polyprotein processing*. Virology 173, 35-45.
- Ryan,M.D., King,A.M. and Thomas,G.P.** (1991). *Cleavage of foot-and-mouth disease virus polyprotein is mediated by residues located within a 19 amino acid sequence*. J. Gen. Virol., 72 (Pt 11), 2727-2732.
- Sagedahl,A., Giraud,A.T., De Mello,P.A., Bergmann,I.E., La Torre,J.L. and Scodeller,E.A.** (1987). *Biochemical characterization of an aphthovirus type C3 strain Resende attenuated for cattle by serial passages in chicken embryos*. Virology, 157, 366-374.
- Salt,J.S.** (1993). *The carrier state in foot and mouth disease--an immunological review*. Br. Vet. J., 149, 207-223.
- Sambrook,J., Fritsch,E.F. and Maniatis,T.** (1989). *Molecular Cloning*. In: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Samuel,A.R. and Knowles,N.J.** (2001). *Foot-and-mouth disease type O viruses exhibit genetically and geographically distinct evolutionary lineages (topotypes)*. J. Gen. Virol., 82, 609-621.

Sangar,D.V., Newton,S.E., Rowlands,D.J. and Clarke,B.E. (1987). *All foot and mouth disease virus serotypes initiate protein synthesis at two separate AUGs.* Nucleic Acids Res., 15, 3305-3315.

Sangar,D.V., Rowlands,D.J., Harris,T.J. and Brown,F. (1977). *Protein covalently linked to foot-and-mouth disease virus RNA.* Nature, 268, 648-650.

Schneider-Schaulies,J. (2000). *Cellular receptors for viruses: links to tropism and pathogenesis.* J. Gen. Virol., 81, 1413-1429.

Sellers, R. F. y Parker, J. (1969). *Airborne excretion of foot-and-mouth disease virus.* J Hyg (Lond) 67, 671-7.

Silberstein,E., Kaplan,G., Taboga,O., Duffy,S. and Palma,E. (1997). *Foot-and-mouth disease virus-infected but not vaccinated cattle develop antibodies against recombinant 3AB1 nonstructural protein.* Arch. Virol., 142, 795-805.

Sobrino,F., Saiz,M., Jimenez-Clavero,M.A., Nunez,J.I., Rosas,M.F., Baranowski,E. and Ley,V. (2001). *Foot-and-mouth disease virus: a long known virus, but a current threat.* Vet. Res., 32, 1-30.

Sorensen,K.J., de,S.K., Dyrting,K.C., Grazioli,S. and Haas,B. (2005). *Differentiation of foot-and-mouth disease virus infected animals from vaccinated animals using a blocking ELISA based on baculovirus expressed FMDV 3ABC antigen and a 3ABC monoclonal antibody.* Arch. Virol., 150, 805-814.

Sorensen,K.J., Madsen,K.G., Madsen,E.S., Salt,J.S., Nqindi,J. and Mackay,D.K. (1998). *Differentiation of infection from vaccination in foot-and-mouth disease by the detection of antibodies to the non-structural proteins 3D, 3AB and 3ABC in ELISA using antigens expressed in baculovirus.* Arch. Virol., 143, 1461-1476.

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

Sutmoller,P. and Casas,O.R. (2003). *The risks posed by the importation of animals vaccinated against foot and mouth disease and products derived from vaccinated animals: a review.* Rev. Sci. Tech., 22, 823-835.

Sutmoller,P. and McVicar,J.W. (1976). *Pathogenesis of foot-and-mouth disease: clearance of the virus from the circulation of cattle and goats during experimental viraemia.* J. Hyg. (Lond), 77, 245-253.

Toja,M., Escarmis,C. and Domingo,E. (1999). *Genomic nucleotide sequence of a foot-and-mouth disease virus clone and its persistent derivatives. Implications for the evolution of viral quasispecies during a persistent infection.* Virus Res., 64, 161-171.

Thompson, G. R., Vosloo, W. and Bastos A. D., (2003). *Foot and mouth disease in wildlife.* Virus Res. 91, 145-161.

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

Van Bakkum,J.G., Frenkel,H.S., Frederiks,H.H.J. and Frekel,S. (1959). *Observation in the carrier state of cattle exposed to foot and mouth disease virus.* Tijdschr. Diergeneeskde., 84, 1159-1164.

Vangryspere,W. and De Clercq,K. (1996). *Rapid and sensitive polymerase chain reaction based detection and typing of foot-and-mouth disease virus in clinical samples and cell culture isolates, combined with a simultaneous differentiation with other genomically and/or symptomatically related viruses.* Arch. Virol., 141, 331-344.

van Vlijmen, H., Curry, S., Schaefer, M. y Karplus, M. (1998). *Titration calculations of foot-and-mouth disease virus capsids and their stabilities as a function of pH.* J Mol Biol 275, 295-308.

Vasquez,C., Denoya,C.D., La Torre,J.L. and Palma,E.L. (1979). *Structure of foot and mouth disease virus capsid.* Virology, 97, 195-200.

Wimmer,E. (1982). *Genome-linked proteins of viruses.* Cell, 28, 199-201.

Zweig,M.H. and Campbell,G. (1993). *Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine.* Clin. Chem., 39, 561-577.

Índice

Abreviaturas	1
Objetivo General	3
Objetivos Específicos	3
Hipótesis de trabajo	3
I-1-La Fiebre Aftosa	5
I.2- Distribución geográfica mundial de la enfermedad	6
I.3- La situación en Argentina	10
I.4- Importancia económica	16
I.5- Huéspedes susceptibles	17
I.6- EL Virus de la Fiebre Aftosa	18
I.6.1- La familia Picornaviridae	18
I.6.2-Organización del genoma	19
I.6.2.1-Región no codificante 5'	20
I.6.2.1.1-Proteína "cap"	20
I.6.2.1.2-Fragmento S, poli(C), "pseudoknot" y estructuras "cre"	21
I.6.2.2-Región codificante.....	21
I.6.2.2.1 Síntesis de proteínas virales	21
I.6.2.2.1.1-Proteasa Líder (L ^{pro}).....	21
I.6.2.2.1.2-Proteínas estructurales	22
I.6.2.2.1.3-Proteínas no estructurales	22
I.6.2.2.1.3.1-2A/B/C.....	22
I.6.2.2.1.3.2-3A/B	23
I.6.2.2.1.3.3-3C proteasa (3Cpro)	23
I.6.2.2.1.3.4-3D polimerasa (3Dpol)	24
I.6.2.2.1.3.5-Región no codificante 3'.....	24
I.7-Ciclo de infección	24
I.8-Variabilidad antigénica.....	25
I.9-Patogenia de la Fiebre Aftosa	26
I.9.1-El estado agudo de infección	26
I.10-Vías de transmisión	27
I.11-Período de incubación	28
I.12-Sitios de infección	28
I.13-Excreción viral	30
I.14-El estado portador en FA	31
I.15-Control y erradicación.....	32
I.16-Diagnóstico de la infección con VFA	33
I.16.1-Diagnóstico clínico	33
I.16.2-Diagnóstico de laboratorio.....	34
I.16.2.1-Detección viral	34
I.16.2.2-Detección de anticuerpos contra proteínas estructurales del VFA	35
I.16.2.3-Detección de anticuerpos contra PNEs del VFA.....	35
I.17-Profilaxis.....	38
I.18-Producción de la vacuna del VFA y su control	40
I.18.1-Producción	40
I.18.2-Pruebas sobre el producto vacunal final.....	47
I.19-Importancia del presente trabajo	49
M.1-Producción de reactivos para las diferentes técnicas y ensayos.....	52
M.1.1-Proteína recombinante 3AB1	52
M.1.1.1-Aislamiento de colonias individuales y extracción de DNA plasmídico Minipreparación	52
M.1.1.2-Detección de la presencia del inserto en las bacterias transformadas	52
M.1.1.2.1-Colony PCR.....	52
M.1.1.2.2-Digestión con enzimas de restricción	53

M.1.1.3-Secuenciación de la porción codificante para la proteína 3AB1 presente en el plásmido pRSET A-3AB1-his	53
M.1.1.3.1-Análisis de secuencia	54
M.1.1.4-Predicción de determinantes antigénicos en la proteína 3AB1	54
M.1.1.5-Expresión de la proteína 3AB1 recombinante	55
M.1.1.6-Producción de stock de proteína recombinante 3AB1 por el método de SDS-PAGE / Electroelución.....	55
M.1.1.7-Characterización de la proteína recombinante 3AB1 obtenida	56
M.1.1.7.1-Electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) evidenciada por tinción con Coomassie blue	56
M.1.1.7.2-Western blot de la proteína 3AB1	57
M.1.1.7.3-Cuantificación proteica.....	58
M.1.1.7.4-Titulación de proteína 3AB1 como antígeno para ser utilizado en la técnica de ELISA	58
M.1.1.7.5-Inmunogenicidad de la proteína recombinante 3AB1	58
M.1.1.7.5.1-Detección de la proteína 3AB1 nativa y/o sus precursores por inmunofluorescencia	59
M.1.1.7.5.2 Detección de anticuerpos anti 3AB1 en ratones	59
M.1.2-Producción de sueros policlonales	59
M.1.2.1-Suero bovino positivo	59
M.1.2.2-Suero murino utilizado como control positivo interno de la técnica de ELISA 3AB1	60
M.1.2.3-Suero de cobayo	60
M.1.2.4-Sueros normales y de referencia	60
M.1.3-Producción de anticuerpos monoclonales	61
M.1.3.1-Inmunización de ratones	61
M.1.3.2-Células de mieloma.....	61
M.1.3.3-Obtención de células de bazo.....	61
M.1.3.4- Fusión de células en suspensión.....	62
M.1.3.5-Detección de anticuerpo monoclonales en el sobrenadante de cultivo	62
M.1.3.6- Clonado	62
M.1.3.7-Producción de líquido ascítico	63
M.1.3.8-Characterización del anticuerpo monoclonal anti-3AB1	63
M.1.3.8.1-Determinación de la especificidad de reconocimiento de moléculas antigénicas.....	63
M.1.3.8.2-Titulación de anticuerpo monoclonal anti-3AB1	63
M.1.3.8.3-Determinación de isotipo del anticuerpo monoclonal anti-3AB1	63
M.1.3.8.4-Inmunofluorescencia indirecta para identificación de PNEs nativas en células BHK-21 infectadas con el VFA	64
M.2-Test serológicos utilizados en el presente trabajo	64
M.2.1-Detección de anticuerpos contra proteínas estructurales por ELISA en fase líquida.....	64
M.2.2-Detección de anticuerpos contra PNEs	65
M.2.2.1- ELISA 3D	65
M.2.2.2-I-ELISA 3ABC (Panaftosa)	66
M.2.2.3-ELISA 3ABC (ICT-MILSTEIN)	66
M.2.2.4-ELISA 3AB1	67
M.2.2.5-Puesta a punto del ELISA 3AB1 ratón	68
M.2.2.5.1-Determinación del punto de corte ELISA 3AB1 ratón	69
M.2.2.5.2-Suero control interno ELISA 3AB1 ratón.....	69
M.3-Extracción de ARN y PCR para detectar virus en muestras de líquido esófago faríngeo	69
M.4-Modelos in vivo para control de la presencia de proteínas no estructurales en vacunas	71
M.4.1- Modelo Bovino.....	71
M.4.1.1 Selección de Animales	71
M.4.1.2-Muestras.....	71
M.4.1.3-Inmunógenos	71
M.4.1.3.1-Vacunas polivalentes	71

M.4.1.3.2-Vacunas experimentales.....	72
M.4.1.4-Prueba experimental	72
M.5.1.4.1-Determinación de la presencia de PNEs en vacunas.....	72
5.1.4.2-Determinación de la dosis mínima inmunizante de la PNE 3ABC recombinante	73
M.4.1.5-Tests Serológicos empleados.....	74
M.4.2-Modelo Murino.....	74
M.4.2.1-Determinación de la dosis mínima inmunizante de la PNE 3ABC recombinante.....	74
M.4.2.2-Estudio preliminar en vacunas	75
M.5-Modelo in vitro para determinación de proteínas no estructurales en formulaciones vacunales	76
M.5.1-Desarrollo de ELISA de captura para la detección de proteínas no estructurales.	76
M.5.1.1-Factibilidad.....	76
M.5.1.2-Optimización y estandarización de los reactivos.....	76
M.5.1.2.1-Selección del Buffer de captura.....	76
M.5.1.2.2-Ajuste de la dilución de uso del anticuerpo monoclonal anti-3AB1 utilizado como captura	77
M.5.1.2.3-Selección del Buffer de Bloqueo.....	77
M.5.1.2.4-Suero de cobayo detector específico y Conjugado anti-IgG de cobayo-peroxidasa	77
M.5.1.2.6 Parámetros de calidad del ELISA.....	77
M.5.1.2.7-Protocolo final del ELISA de captura.....	78
M.5.2-Utilización del ELISA de captura	78
M.5.2.1-Evaluación de la presencia de PNEs en formulaciones vacunales experimentales.....	78
M.5.2.1.1-Extracción de la PNE 3ABC desde formulaciones oleosas experimentales.....	78
M.5.2.2-Evaluación de la presencia de PNEs nativas en sobrenadantes de cultivo de células infectadas con el VFA	79
M.5.2.2.1-Infección de células BHK-21 con el VFA.....	79
R.1-Producción de reactivos para las diferentes técnicas y ensayos	81
R.1.1-Proteína recombinante 3AB1.....	81
R.1.1.1-Detección de la presencia del inserto en las bacterias transformadas y análisis de restricción	81
R.1.1.2-Secuenciación de la porción codificante para la proteína 3AB1 presente en el plásmido pRSET A-3AB1-his	82
R.1.1.3-Predicción de determinantes antigénicos en la proteína 3AB1	84
R.1.1.4-Expresión de la proteína 3AB1 recombinante	85
R.1.1.5-Producción de stock de proteína recombinante 3AB1 mediante enriquecimiento por el método de SDS-PAGE / Electroelución.....	87
R.1.1.6-Characterización de la proteína recombinante 3AB1 obtenida	88
R.1.1.6.1-Electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) evidenciada por tinción con Coomassie blue y Western blot.....	88
R.1.1.6.2-Cuantificación y Rendimiento	90
R.1.1.6.3-Inmunogenicidad de la proteína recombinante 3AB1.....	91
R.1.1.6.3.1-Detección de la proteína 3AB1 nativa y/o sus precursores por inmunofluorescencia.....	91
R.1.1.6.3.2-Detección de anticuerpos anti-3AB1 en ratones.....	92
R.1.2-Puesta a punto del ELISA 3AB1 ratón	92
R.1.2.1-3AB1 como antígeno para ser utilizado en la técnica de ELISA	92
R.1.2.2-Control de ensayo positivo	92
R.1.2.3-Criterio de normalización de resultados del ensayo	95
R.1.2.4-Criterios de validez del ensayo	96
R.1.2.5-Determinación del punto de corte del ensayo	96
R.2-Modelos in vivo para control de la presencia de PNEs en vacunas	98
R.2.1-Modelo Bovino.....	98
R.2.1.1-Estudio de vacunas	98
R.2.1.1.1-Selección de los animales	98

R.2.1.1.1.1-Análisis serológico y análisis de la no circulación viral	98
R.2.1.1.2-Análisis de la detección de anticuerpos contra PNEs	100
R.2.1.1.2.1-Análisis y detección de anticuerpos anti-3D	100
R.2.1.1.2.2-Análisis y detección de anticuerpos anti-3AB1 y 3ABC	102
R.2.1.2-Determinación de la dosis mínima inmunizante de la PNE 3ABC recombinante	107
R.2.1.2.1-Selección de los animales	107
R.2.1.2.1.1-Análisis serológico y análisis de la no circulación viral	107
R.2.1.2.2-Evaluación de la dosis inmunizante utilizando tres enzimoimmunoensayos	109
R.2.1.2.2.1-Evaluación por ELISA 3AB1	109
R.2.1.2.2.2-Evaluación por I-ELISA 3ABC	110
R.2.1.2.2.3-Evaluación por ELISA 3ABC	111
R.2.2-Modelo murino	112
R.2.2.1-Determinación de la dosis mínima inmunizante de la PNE 3ABC recombinante	112
R.2.2.2-Estudio preliminar de vacunas	115
R.3- Modelo in vitro para determinación de PNEs en formulaciones vacunales	118
R.3.1-Producción de anticuerpos monoclonales	118
R.3.1.1- Inmunización de ratones con la proteína 3AB1	118
R.3.1.2-Aislamiento de células híbridas productoras de anticuerpos monoclonales contra la proteína 3AB1	118
R.3.1.3- Caracterización del anticuerpo monoclonal anti-3AB1	119
R.3.1.3.1-Determinación de la especificidad de reconocimiento de moléculas antigénicas	119
R.3.1.3.2-Titulación del anticuerpo monoclonal anti-3AB1	120
R.3.1.3.3-Determinación de isotipo del anticuerpo monoclonal anti-3AB1	121
R.3.1.3.4-Inmunofluorescencia indirecta para identificación de PNEs nativas en células BHK-21 infectadas con el VFA	122
R.3.2- Desarrollo de ELISA de captura para la detección de proteínas no estructurales	124
R.3.2.1- Factibilidad	124
R.3.2.2- Optimización y estandarización de los reactivos	126
R.3.2.2.1-Selección del Buffer de captura	126
R.3.2.2.2-Ajuste de la dilución de uso del anticuerpo monoclonal anti-3AB1 utilizado como captura	127
R.3.2.2.3- Selección del Buffer de Bloqueo	128
R.3.2.2.4-Suero de cobayo detector específico y Conjugado anti-IgG de cobayo-peroxidasa	129
R.3.2.2.5-Parámetros de calidad del ELISA	130
R.3.2.2.6-Protocolo final del ELISA de captura para PNEs del VFA	135
R.3.3-Utilización del ELISA de captura	135
R.3.3.1-Evaluación de la presencia de PNEs en formulaciones vacunales experimentales	135
R.3.3.2-Evaluación de la presencia de PNEs nativas en sobrenadantes de cultivo de células infectadas con el VFA	137
Discusión	142
D.1-Producción de reactivos y puesta a punto de ensayos para modelos in vivo	142
D.2-Modelos in vivo	144
D.2.1-Bovinos	144
D.2.2-Ratones	147
D.3-Modelo in vitro	149
Conclusiones	154
Bibliografía	156
Índice	

