



TESIS DE DOCTORADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

**CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE
AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA
ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS.**

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

Autor: Galdo Novo, Sabrina. Vet., Esp.

Director: Dra. Ingrid E. Bergmann, Centro de Virologia Animal, ICT-Milstein-CONICET

Co-Director: Dra. Viviana Malirat. Centro de Virologia Animal, ICT-Milstein-CONICET

Lugar de desarrollo de Tesis:

Servicio Nacional de Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) – Dirección de Laboratorio Animal – Coordinación de Virología – Departamento de Virología Aftosa.

Talcahuano 1660 – Martínez – Buenos Aires.

Centro de Virologia Animal, ICT-Milstein-CONICET

Saladillo 2468 – CABA

Noviembre de 2017

1. AGRADECIMIENTOS	7
2. RESUMEN.....	9
3. ABSTRACT	11
4. ABREVIATURAS	13
5. INTRODUCCIÓN:	17
5.1. La Fiebre Aftosa	17
5.1.1. Definición y agente causal	17
5.1.2. Importancia Económica	18
5.1.3. Sintomatología clínica y patogénesis.	18
5.1.4. Situación Global y Regional	20
5.1.4.1.Situación Mundial.....	20
Figura 1. Mapa oficial del estado de presencia/ausencia con o sin vacunación de FA a nivel mundial.....	22
5.1.4.2.Situación en América del Sur.....	22
5.1.4.3.Situación en el País	24
Figura 2. Mapa del estatus sanitario para la FA en la República Argentina y categorización de zonas según plan de vacunación.	27
5.1.5. Medidas de Control ante sospechas y emergencias.....	28
5.2. El virus de la Fiebre Aftosa	29
Figura 3. Esquema estructural de VFA.....	31
5.2.1. Organización genómica	31
Figura 4. Representación esquemática del virión.	32
Figura 5. Elementos estructurales en la región 5' UTR del VFA.	34
Figura 6. Esquema de la organización genómica de virus de FA y del procesamiento proteolítico de la poliproteína resultante.	37
5.2.2 Ciclo de replicación	38
Figura 7. Ciclo replicativo del VFA.....	40
Figura 8. Cambio de Traducción cap independiente a Cópia de ARN de largo genómico en Picornaviridae. Adaptado de Perera y cols., 2007.....	42
5.3. Variabilidad genética	43
Figura 9. Cuasiespecie viral.	44
5.4. Variabilidad antigénica	45
5.5. Respuesta Inmune frente al VFA.	47
5.6. Vacunas y vacunación para Fiebre Aftosa	49
Figura 10. Esquema de producción para vacunas del VFA.	52

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

5.7. Diagnóstico	56
5.7.1. Detección y caracterización viral.....	56
5.7. Vaccine Matching: Estudios de grado de parentesco antigénico y protección por las cepas vacunales a las cepas de campo	58
5.8. Selección de cepas vacunales	61
6. HIPÓTESIS.....	63
7. OBJETIVOS:	64
8. MATERIALES Y MÉTODOS	65
8.1. Selección y Producción de Stock de Cepas Virales:	65
8.2. Caracterización Genética	67
8.2.1. Extracción de ARN y amplificación de la región que codifica para la proteína VP1 y para el precursor proteico P1.....	67
Tabla 1. Cebadores utilizados para RT-PCR y secuenciación de los VFA tipo O.	68
8.2.2. Secuenciamiento	69
8.2.3. Análisis filogenético de las cepas secuenciadas:.....	70
8.3. Caracterización antigénica.....	70
8.3.1. Fijación de Complemento 50%:.....	70
Figura 11. Representación esquemática del fundamento de la Técnica de Fijación de Complemento.....	72
Figura 12. Esquema de inmunización de los cobayos para producción de suero hiperinmune.....	73
Tabla 2.	76
8.3.2. Perfil Antigénico Mediante Anticuerpos Monoclonales.....	77
8.4. Caracterización inmunogénica:	79
8.4.1. Virus neutralización bidimensional y relación de parentesco (r_1):	79
Figura 13. Esquema de las placas para determinación de título de anticuerpos neutralizantes.....	84
Figura 14. Corte transversal de un pocillo con todos los componentes.....	84
Figura 15. Esquema de las placas para determinación de concordancia vacunal valor 1.....	86
Tabla 3. Correlación entre el título VN (suspensión) y EPP para la cepa vacunal O1/Campos	88
8.5. Prueba de Generalización podal	89
8.6. Aptitud de las cepas de campo como antígeno vacunal:	91
8.6.1. Determinación de rendimiento viral:	91
8.6.2. Determinación de masa antigénica:	92
8.6.3. Ensayos de estabilidad:	95
9. RESULTADOS	96

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

9.1. Selección de las cepas de campo:	96
Figura 16. Localidades donde fueron aisladas las muestras de campos en estudio.	97
9.2. Aislamiento viral en cultivo celular y comportamiento biológico	97
Tabla 4. Comportamiento biológico en cultivo de células BHK-21.....	98
9.3. Caracterización genética de las cepas de campo:	98
9.3.1. Análisis filogenético de las cepas estudiadas	99
FIGURA 17. Árbol filogenético que muestra las relaciones entre los aislamientos tipo O del virus de FA.	101
Tabla 5. Distancias genéticas entre las cepas estudiadas, calculadas para la región que codifica para la proteína VP1 y expresadas en porcentaje de divergencia.....	102
9.3.2. Variación genética en la región que codifica para el precursor polipeptídico P1 de los aislamientos de campo	102
Figura 18. Secuencia de nucleótidos de la región que codifica para el precursor proteico P1 de los aislamientos de campo y de la cepa vacunal O campos. En el alineamiento se muestran las variaciones de nucleótidos con respecto a la cepa vacunal O1Campos.....	105
Tabla 6. A: Matriz de distancias genéticas apareadas entre las cepas,.....	107
9.3.3. Cambios aminoacídicos registrados en la secuencia de la región que codifica para el precursor proteico P1.....	108
Tabla 7. Cambios aminoacídicos presentes en la composición de VP1 de las cepas de campos en relación a O1/Campos	109
Figura 19. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos del precursor proteico P1 deducidas de las secuencias determinadas en la figura 16.....	112
9.4. Caracterización antigénica:.....	113
9.4.1. Caracterización mediante Fijación de Complemento.	113
Tabla 8. Fijación de complemento de las cepas de campo con los diferentes sueros hiperinmunes indicados.....	114
9.4.2. Caracterización antigénica mediante perfiles de reactividad con anticuerpos monoclonales	114
Tabla 9. Coeficiente de correlación para las diferentes cepas estudiadas.	115
Figura 20. Perfiles de AcMs enfrentados a las cepas estudiadas y la cepa vacunal O1/Campos.	119
9.5. Caracterización inmunogénica: Protección heteróloga contra la cepa vacunal mediante pruebas "in vitro" e "in vivo"	119
9.5.1- Pruebas "in vitro": Determinación del valor "r1" y EPP mediante VN.	119
9.5.1.1. Relación de parentesco r1:.....	119
Tabla 10. Títulos de anticuerpos frente al virus homólogo.....	120
Tabla 11. Títulos de VN y valores r1	122

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

9.5.1.2. Expectativa porcentual de protección (EPP):.....	123
Tabla 12. Títulos neutralizantes individuales, promedio y desvío standard (DS) de sueros de bovinos vacunados con vacuna monovalente O1/Campos y sangrados a 30 DPV, enfrentados con los virus indicados	124
Tabla 13. Títulos neutralizantes de sueros individuales vacunados con vacuna tetravalente O1/Campos, C/3/indaial y A/24/cruzeiro y A/Argentina/2001 sangrados a 79 DPV.	125
Tabla 14. Títulos neutralizantes de sueros individuales vacunados con vacuna trivalente O1/Campos, C3/indaial y A24/cruzeiro y sangrados a 79 DPRV.....	126
Gráfico 1. Representación gráfica de Títulos de anticuerpos neutralizantes por virus según cada grupo de bovinos vacunados.	127
Tabla 15. Titulo neutralizante promedio y EPP estimado para el virus homólogo.	128
9.6. Prueba de Generalización Podal	128
Tabla 16. Protección de bovinos vacunados con vacuna tetravalente desafiados con 10000 DIB de la cepa O/SanPedro/Par/11-11 realizada 79 días post vacunación y EPP esperada.....	129
Tabla 17. Discriminación de protección de los bovinos vacunados con vacuna trivalente a la descarga con 10000 DIB de la cepa O/SanPedro/Par/11-11 realizada a 79 días post revacunación.	131
9.8. Aptitud de las cepas de campo como antígeno vacunal:	132
Tabla 18. Aptitudes estudiadas para las cepas como candidatas vacunales.	133
Gráfico 2. Estabilidad de cepas a 37°C.	134
10. DISCUSIÓN	135
11. CONCLUSIONES.....	141
12. RELEVANCIA DEL PLAN PROPUESTO	142
13. BIBLIOGRAFÍA CITADA	143
14. RELACIÓN DEL PLAN CON PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN ACREDITADOS Y/O BECAS OTORGADAS.....	160
14. ANEXOS (OPTATIVO).....	161
Anexo I Soporte Económico	161
Anexo II Producción generada a lo largo de la tesis doctoral	161

1. Agradecimientos

Cuando una tesis doctoral está terminada, es en ese momento en donde se recuerda cada etapa y las personas que, sin su apoyo incondicional y generosa colaboración, no hubiese sido posible lograr alcanzarla.

Esta tesis está dedicada a todas las personas que han estado presentes en esta larga etapa...

El principal agradecimiento es a mi Directora, la Dra. Ingrid Evelyn Bergmann y a mi Co-Directora, la Dra. Viviana Malirat. La solidez de sus conocimientos, la calidad de persona, y el apoyo no solo en el laboratorio, en lo técnico y en la escritura, si no a lo largo de este trayecto ha sido incondicional. Quiero agradecerles, haberme dado la oportunidad de ser su doctorando, lo que para mí ha significado algo más que importante y estoy sumamente agradecida que me hayan compartido todo el conocimiento posible brindado durante todo este tiempo.

En mi institución, el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, al Dr. Maradei quien me dio el espacio desde el inicio para poder realizar este logro y a la Dra. Pedemonte quien siempre me apoyó y colaboró con toda su disposición: incluso cediendo su computadora y oficina en los momentos más difíciles!! Y a mis compañeros de sala con los que comparto día a día.

Me gustaría agradecer en forma especial a la Dra. Ana Bratanich y al resto del grupo de la cátedra de virología de La Facultad de Ciencias Veterinarias de la UBA. Ella fue junto al Dr. Danilo Bucafusco y Dra. Jéscica Diogo quienes me dieron la oportunidad, en viejas épocas, de incursionar en la virología y supieron mostrarme lo apasionante que era este nuevo mundo en aquel momento para mí. Junto con ellos quiero agradecer al MSc Leandro Diaz y al Dr. Sergio Simonetta, que confiaron en mí y que me apoyaron para alcanzar este objetivo más de una vez.

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

Agradezco también a mis amigos de carrera y de vida, MsC. Cecilia Baumberger, Dr. Pablo Teta, Vet. Federico Gonzalez Videla, Vet. Paula Vezquez y Vet. Julieta Corrales.

El especial agradecimiento es para mi familia, con la que sin ella no hubiese llegado a conseguir este logro.

A Nau, mi compañero de vida.

Esperando que este trabajo sea un aporte al sector agradezco eternamente a todos...

Noviembre de 2017

2. Resumen

El virus de la fiebre aftosa produce una de las enfermedades vesiculares más contagiosas en el ganado bovino y otros animales de pezuña hendida. Esta enfermedad, constituye una amenaza latente para los países que son libres, ya que incursiones virales se traducen en una significativa pérdida económica, no solo por merma productiva sino por el cierre de mercados comerciales. La República Argentina es un país reconocido por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) como libre de aftosa sin vacunación al sur del paralelo 42° y libre con vacunación al norte del mismo. El Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), por sus funciones como organismo nacional de control, sumado a su designación como "Laboratorio de referencia de Fiebre Aftosa" por la OIE tiene entre sus funciones más relevantes realizar actividades que aporten al conocimiento profundo del comportamiento del virus. En este contexto, fueron de gran importancia los estudios de caracterización de las cepas responsables por las emergencias de tipo O ocurridas esporádicamente durante los años 2000-2011 en zonas del Cono Sur de Sudamérica ya reconocidas por la OIE como libres de fiebre aftosa con vacunación sistemática. El trabajo que aquí se presenta es el primer estudio de las variantes responsables de las emergencias mencionadas, que incluyó la caracterización genética, antigénica e inmunogénica, con particular énfasis en su relación con la cepa vacunal O1/Campos, en uso en la región. El impacto de los cambios genéticos y antigénicos en la protección por la vacuna en uso fue evaluado a partir de pruebas de protección heteróloga "in vitro" e "in vivo". El análisis filogenético realizado a partir de la secuencia de nucleótidos de la región que codifica para la proteína VP1; las variaciones a nivel aminoacídico registradas en el precursor proteico P1; así como el análisis antigénico realizado en base al perfil de reactividad con un panel de anticuerpos monoclonales muestran que estos aislamientos pertenecen a un único linaje genético, aunque se distinguen algunas variaciones a nivel antigénico. Cuando dichos aislamientos se comparan con la cepa vacunal O1/Campos es posible determinar diferencias considerables tanto a nivel genético como antigénico. A partir de los estudios de protección cruzada "in vitro" con la cepa vacunal O1/Campos mediante valores de r_1 y de expectativa de protección se infiere una respuesta protectora satisfactoria a los 79 días post vacunación o luego de la revacunación, la cual también se alcanzó a los 30 días post vacunación en algunos de los virus estudiados. Los resultados de las pruebas "in vitro" fueron confirmados mediante el desafío "in vivo" a 79 días post vacunación y luego de la revacunación, utilizando como virus de descarga el último aislado viral del año 2011

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

en Paraguay. Se discute el valor de los estudios de protección heteróloga para cubrir los diferentes objetivos en que los resultados serán analizados: profilaxis, vacunación de emergencia y/o incorporación de un nuevo virus de campo en los bancos de antígeno/vacuna. En este contexto, y para cuando se requiere una respuesta inmune más rápida y específica, como es el caso ante una emergencia, se llevaron a cabo pruebas de comportamiento biológico con la cepa utilizada en el desafío, incluyendo el rendimiento de masa antigénica y la estabilidad de las suspensiones virales luego de su inactivación, para evaluar en forma preliminar su posible incorporación dentro del banco de antígenos del País.

3. Abstract

Foot-and-mouth disease virus is responsible for one of the most contagious vesicular diseases in cattle and other cloven-hooved animals. The disease constitutes a latent threat for free countries, since viral incursions entail significant economic losses not only because of production shortages, but also due to the closure of commercial markets. The Argentine Republic is a country recognized by the World Organization for Animal Health (OIE) as free of foot-and-mouth disease without vaccination in the region of latitude 42° south and free with vaccination at the north of it. The National Service for Agrifood Health and Quality (SENASA), being the national official control entity and having been recognized as "Reference Laboratory for foot-and-mouth disease" by the OIE, has among its main activities, the study of foot-and-mouth disease virus in order to contribute to deepen its knowledge. In this context, the characterization of the type O emergencies that occurred sporadically during the years 2000-2011 in areas of the Southern Cone of South America, previously recognized as free of foot and mouth disease with systematic vaccination by the OIE, was of utmost importance. This work presents the first study of the variants responsible for the above-mentioned emergencies, which included genetic, antigenic and immunogenic characterizations, with particular emphasis on their relationship with the vaccine strain O1/Campos, in use in the region. The impact of genetic and antigenic changes on protection by the vaccine in use was evaluated through "in vitro" and "in vivo" heterologous protection tests. Phylogenetic analysis performed on the nucleotide sequence of the VP1 coding region; aminoacid changes recorded in the P1 precursor; and antigenic analysis based on determination of reactivity profiles with a panel of monoclonal antibodies showed that these isolates belong to a single genetic lineage, although some genetic and antigenic differences could be observed. When compared with the vaccine strain O1/Campos, field isolates recorded considerable genetic and antigenic differences. Studies of "in vitro" cross-protection with the vaccine strain O1/Campos gave r1 and expectancy of protection values, from which a satisfactory protective response could be inferred at 79 days post vaccination or after revaccination, and even at 30 days post-vaccination in some of the viruses studied. The results of the "in vitro" tests were confirmed by "in vivo" assays at 79 days post vaccination and after revaccination, using the viral isolate corresponding to the last outbreak occurred in 2011

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

in Paraguay, for challenge. The results of the heterologous protection studies are discussed in view of the different objectives for which they will be analyzed: prophylaxis, emergency vaccination and/or incorporation of a new field virus in the antigen/vaccine banks. In this regard, and when a more rapid and specific immune response is needed, as in the case of an emergency, biological behavior tests were performed with the strain corresponding to the virus used for challenge, including yield of antigenic mass and the stability of the viral suspensions after their inactivation, to preliminarily evaluate its possible incorporation within the national antigen bank.

4. Abreviaturas

aa: aminoácido

AcM: Anticuerpos Monoclonales

ARN: ácido ribonucleico

BEI: Bromoetilenamina Binaria

BHK-21: "Baby Hamster kidney". Línea celular de células de riñón de hámster bebé.

CMH: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

CPFA: Centro Panamericano de Fiebre Aftosa

Cre: "cis-acting replication element". Elemento de replicación en cis

CVP: Comité Veterinario Permanente del Cono Sur

DICT 50%/ml: Dosis infectantes Cultivo de Tejidos 50% por ml.

ECP: Efecto Citopático

ELISA FL: "Liquid phase / Enzyme linked immunosorbent assay". Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas en Fase Líquida.

EPP: Expectativa porcentual de protección.

FA: Fiebre Aftosa

IgA: Inmunoglobulina tipo A

IgG: Inmunoglobulina tipo G

IgM: Inmunoglobulina tipo M

IRES: "internal ribosome entry site". Sitio de entrada interno de ribosoma.

L: Leader

LB: Linfocito tipo B

LT: Linfocito tipo T

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

M&M: Materiales y Métodos

μl: microlitro

ml: mililitro

nm: nanómetro

nt: nucleótido

OIE: Organización Mundial de Sanidad Animal

P1: Precursor proteico de proteínas estructurales P1

P2: Precursor proteico de proteínas estructurales P2

P3: Precursor proteico de proteínas estructurales P3

PBS: (buffer salino fosfato)

PEG: Polietilenglicol

PGP: Prueba de Generalización Podal

PTBT: Proteína de adsorción a tracto de poly pirimidina (polypyrimidine tract binding protein)

rpm: revoluciones por minuto

SAT: Territorios de Sud Africa (South African Territories)

SENASA: Servicio Nacional de Calidad y Sanidad Agroalimentaria

Tyr: Tirosina

UTR: region no codificante (untranslated region)

VFA: Virus Fiebre Aftosa

VN: Virus Neutralización

Vp1: Viral protein 1 (proteína capsidal viral número 1)

Vp2: Viral protein 2 (proteína capsidal viral número 2)

Vp3: Viral protein 3 (proteína capsidal viral número 3)

Vp4: Viral protein 4 (proteína capsidal viral número 4)

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

VPg: Proteína Viral asociada a genoma

NUCLEOTIDOS

A: ADENINA

C: CITOCINA

G: GUANINA

T: TIMINA

AMINOACIDOS

A: ALANINA

C: CISTEINA

D: ACIDO ASPARTICO

E: ACIDO GLUTAMICO

F: FENILALANINA

G: GLICINA

H: HISTIDINA

I: ISOLEUCINA

K: LISINA

L: LEUCINA

M: METIONINA

N: ASPARAGINA

P: PROLINA

Q: GLUTAMINA

R: ARGININA

S: SERINA

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

T: TREONINA

U: SELENOCISTEINA

V: VALINA

W: TRIPTOFANO

Y: TIROSINA

Nota: Las abreviaciones han sido aclaradas entre paréntesis al ser nombradas por primera vez.

5. Introducción:

5.1. La Fiebre Aftosa

5.1.1. Definición y agente causal

La fiebre aftosa (FA) es una enfermedad vesicular aguda, altamente contagiosa e inmunológicamente compleja, de diseminación muy rápida, y que causa grandes pérdidas económicas en la ganadería (revisado en Casas Olascoaga y cols., 1999; Sobrino y Domingo, 2004; Mahy, 2005).

Los primeros registros existentes de esta enfermedad datan del siglo XVI y fueron realizados por G. Fracastorius en 1546. En el siglo XIX fue la primera enfermedad animal asociada a un elemento filtrable (Loeffler y Frosch, 1897), el cual fue luego denominado virus de la FA (VFA).

Afecta principalmente a animales biungulados domésticos tales como bovinos, ovinos, porcinos, caprinos y bubalinos y salvajes, como antílopes y ciervos.

Su agente causal es un virus de genoma ARN el cual, de forma semejante a lo que ocurre con otros virus a ARN, presenta un alto polimorfismo genético y antigénico (Bachrach 1968, Pereira, 1981; Domingo y cols., 1980; Domingo y cols., 2001), verificándose la existencia de siete serotipos con características serológicas diferentes: O, A, C, SAT-1, SAT-2, SAT-3 y Asia1. Debido a estas diferencias, los animales recuperados de la infección o vacunados contra un serotipo viral, son susceptibles a la infección por cepas de otros serotipos, o inclusive por algunas variantes dentro del mismo serotipo (Bachrach, 1968; Brooksby, 1982; Cartwright y cols., 1982).

5.1.2. Importancia Económica

La FA es una de las enfermedades animales que más negativamente impactan la economía a nivel mundial. El impacto socio económico se visualiza tanto a nivel local como nacional, y las pérdidas económicas pueden ser consideradas como directas o indirectas. Las directas se concentran en la pérdida de peso lo que se traduce en reducción en la producción de carne y merma de hasta un 25% en la producción láctea anual del ganado lechero. Se ha reportado hasta un 20% de tiempo extra necesario para alcanzar la madurez reproductiva en bovinos afectados y una reducción del 20% en la producción anual de carne porcina. Además, se deben considerar los costos por los considerables índices de mortalidad en animales jóvenes, el descarte de animales improductivos, interrupción de las actividades, necesidad en algunos casos a recurrir a la importación de animales o sus productos, pérdida de stock genético e interrupción de programas de mejoramiento genético. Las indirectas incluyen las restricciones que se generan por las barreras sanitarias impuestas por parte de los mercados internacionales y dentro del mercado interno, por la interrupción de movimientos de hacienda, los costos del control y erradicación de la enfermedad, tales como compensación a los ganaderos, salarios a veterinarios y personal operacional y de soporte, interrupción de negocios en general, restricciones que afectan al movimiento de personas y al turismo (Huang y cols., 2000; Correa Melo y cols., 2002).

5.1.3. Sintomatología clínica y patogénesis.

Se han descrito varias rutas de entrada del virus, sin embargo, la principal vía de infección natural por el VFA es la vía respiratoria (Brooksby, 1982). La transmisión puede ser por contacto directo, a través de saliva, leche y semen (Hyslop, 1965; Cottral y cols., 1968; Sellers, 1971), o en forma indirecta por transporte mecánico en sustancias contaminadas, tales como restos de animales, equipos agrícolas, personas, ropa, etc. (Cottral y cols., 1960).

La penetración del virus en el animal hospedador se da a través de los epitelios de la boca, nariz o laringe, donde ocurre rápidamente la replicación viral, que produce

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

vesículas o aftas primarias en el morro, lengua y paladar. Luego de 3 o 4 días la infección se generaliza, produciéndose el período de viremia febril (40-41°C), en el cual el virus alcanza los epitelios alejados del punto de entrada, como el espacio interdigital en las patas, y los pezones donde produce aftas secundarias (Schudel, 1986). Posteriormente, las vesículas aumentan de tamaño y se rompen, produciendo la sintomatología clásica de salivación abundante, reducción de la movilidad; dificultad de alimentación, ordeño y lactancia (Shahan, 1962) y otros síntomas característicos como diarrea y debilidad muscular, que llevan a una importante pérdida de peso y consecuentemente de producción. Durante el período de viremia es posible detectar altos niveles de virus en todas las secreciones, en los aerosoles respiratorios, en sangre, órganos y tejidos (Burrows, 1968).

La severidad de los síntomas clínicos es variable en las diferentes especies hospedadoras, observándose una sintomatología más severa en cerdos, y más leve en ovinos y caprinos, en los que puede incluso pasar inadvertida (Hughes y cols., 2002; Mahy, 2005). A pesar de su alta morbilidad, la FA presenta un bajo índice de mortalidad (Pereira, 1981), no superando el 5% en animales adultos; aunque puede llegar hasta valores de 50% en animales muy jóvenes afectados de miocarditis asociada al VFA (Timoney, 1988).

Además, en algunas especies como en el bovino puede establecerse luego de la fase aguda de la enfermedad, que puede durar entre 2 a 3 semanas, una infección persistente en la cual el virus replica en el tracto orofaríngeo (Van Bakkum y cols., 1969). Se ha descrito la recuperación de virus a partir de la zona orofaríngea de animales persistentemente infectados hasta 30 meses luego de la infección en los bovinos, o más tiempo en el búfalo y hasta 9 meses en los ovinos (Gebauer y cols., 1988; Dawe y cols., 1994; Malirat y cols., 1994; Salt, 1993, Barros, y cols., 2006). En cerdos, el estado de persistencia no se ha podido demostrar.

Es importante destacar que el estado de infección persistente se produce inclusive en animales vacunados (Sutmöller y Gaggero, 1965; Augé de Mello, Honigman y Fernandes, 1970; Sutmöller Mc Vicar y Cottral, 1968; Hedger, 1970). Esta particularidad genera preocupación en países con planes de erradicación que aplican vacunación sistemática, ya que existen controversias a nivel internacional en cuanto a la posibilidad

de que la vacunación podría enmascarar una posible transmisión de animales infectados persistentemente a animales susceptibles (Bergmann, y cols., 2005).

5.1.4. Situación Global y Regional

5.1.4.1. Situación Mundial

Esta enfermedad se ha registrado a lo largo y ancho de todas las regiones del mundo exceptuando a Nueva Zelanda. Los estudios de epidemiología molecular sugieren que Europa habría actuado como el eje central de la enfermedad desde donde se extendió al resto del mundo, produciéndose dos grandes radiaciones a finales del siglo XVII y principios del XVIII que dieron lugar a las actuales cepas circulantes Euroasiáticas y Sudafricanas (Sobrino y cols., 2001; Tully y Fares, 2008). Hoy en día es una enfermedad endémica en distintas regiones con mayor presencia en Asia y África.

Alrededor del mundo se describieron 7 serotipos distribuidos según regiones (Grubman y Baxt, 2004): O, A y C en Asia, África y América del Sur; Asia1 en el continente homónimo; y los serotipos SAT (Territorios Sudafricanos del inglés "South African Territories") en África, exceptuando al serotipo SAT 1 que se lo ha detectado en regiones como Oriente medio, Grecia y Turquía.

El VFA muta a medida que replica generando una amplia variabilidad de cepas las cuales se han intentado clasificar agrupándolas de diferente modo. La primera clasificación, la cual aún se mantiene, se basó en la observación de falta de reactividad cruzada entre variantes lo cual permitió la clasificación en los 7 serotipos mencionados anteriormente. A medida que surgieron las técnicas moleculares, se comenzó una clasificación en tipos genéticos que coinciden con los serotipos, la cual asimismo permite agrupar las variantes dentro de linajes genéticos dentro de cada tipo, circunscriptos a ciertas regiones geográficas, los cuales fueron denominados topotipos, y dentro de los cuales es posible identificar diferentes linajes. Actualmente, y para referirse a la distribución mundial del VFA, se consideran 7 "*pooles*", cada uno de los cuales contiene los serotipos/topotipos y/o linajes que circulan en una determinada región geográfica, y que reflejarían un cierto grado de aislamiento ecológico que se supone derivado de

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

patrones de comercio, de movimiento de animales o de la existencia de reservorios salvajes específicos en determinadas regiones como es el caso del búfalo africano (Sumption y cols., 2012). Se ha observado que el serotipo O es el que más registros de aislamientos tiene a nivel mundial. Los eventos más relevantes ocurridos en la última década a nivel mundial están resumidos en la publicación de Brito y cols., 2015. En la misma, se destaca la alta prevalencia de registros del VFA principalmente en África, Medio Oriente, Sudeste Asiático y algunas regiones de Asia con mayor presencia de algunos linajes por sobre otros, dentro del serotipo O, representados por los linajes O Cathay, O SEA Myanmar 98, O ME-SA Pansia y Pansia 2 y O ME-SA Ind 2001.

El VFA es una enfermedad difícil de controlar y es por esto que la amenaza de una posible incursión en una zona declarada libre es constante. De hecho, muchas regiones que ya contaban con el reconocimiento por la OIE de zonas libres con vacunación y zonas libres sin vacunación, sufrieron reintroducciones. En el caso de Sudamérica, luego de más de cuatro años sin registros oficiales de la enfermedad, recientemente se ha reportado un brote en Colombia (Reporte público de OIE, 4 de julio de 2017). El mismo se ha identificado dentro del serotipo O. En el caso de Asia, Rusia posee una zona de contingencia desde octubre de 2016, y el sudeste asiático continua con la mayor cantidad de brotes registrados del serotipo O y A. En el caso del continente africano se han reportado en los últimos dos años cepas del serotipo O, A, SAT 1, 2 Y 3 (OIE, 2017).

Todos los años, la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) establece y actualiza el status sanitario de cada país con respecto a esta enfermedad, durante el curso de su Sesión General Anual, que se lleva a cabo en el mes de mayo (OIE, 2017) En la Figura 1 se resume la situación actual de la FA en el mundo según los diferentes status sanitarios reconocidos por la OIE. Los reconocimientos pueden ser de países o regiones libres de la enfermedad con vacunación o sin vacunación. Por el contrario, en caso de declararse eventos de la enfermedad, un país o región entera pueden quedar con su estatus de libre con o sin vacunación suspendido, o bien, pueden declararse zonas de contingencia ante un brote circunscripto a una zona o región determinada. A pesar de esta categorización, hay países cuyo estatus no es conocido ya que no aportan a la declaración de su situación frente a la enfermedad, ante este ente internacional.

OIE Member Countries' official FMD status map

Last update June 2017

[Click on a specific region to zoom in](#)

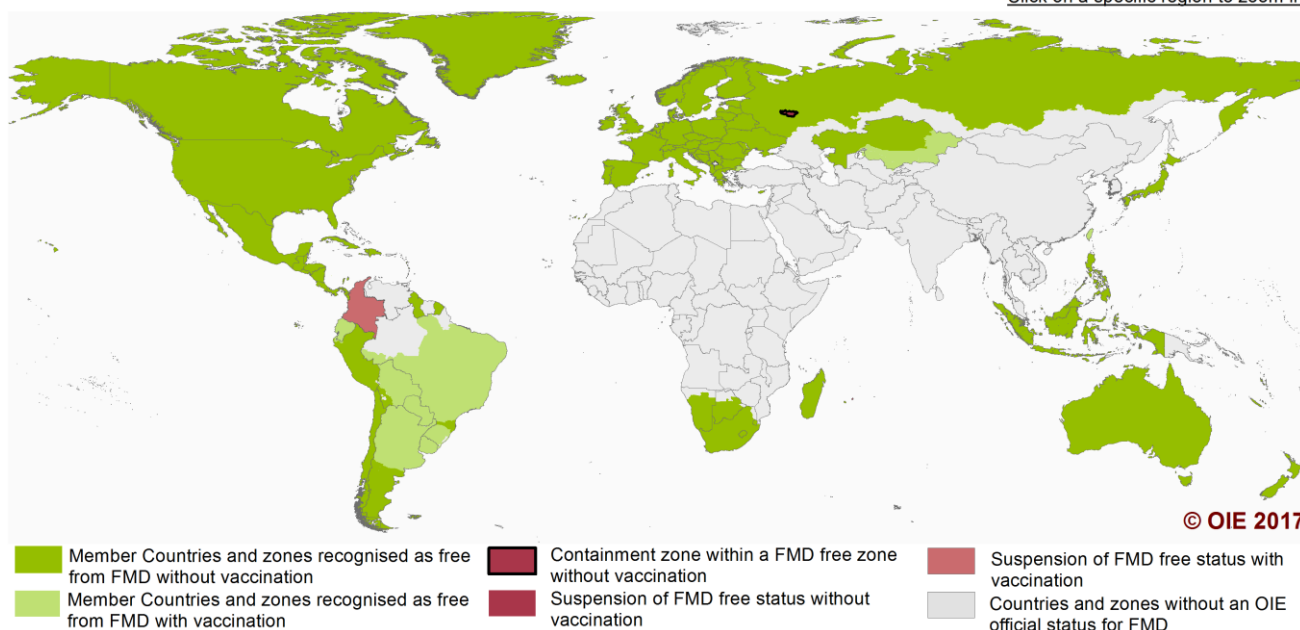


Figura 1. Mapa oficial del estado de presencia/ausencia con o sin vacunación de FA a nivel mundial. En verde oscuro se observan los países o regiones reconocidas como libres de FA sin vacunación. En verde claro se observan los países o regiones reconocidas como libres de FA con vacunación. En púrpura se destacan regiones a las que se les ha suspendido el status de libre sin vacunación y en gris claro las regiones o países que no tienen un estado oficial ante la OIE.

5.1.4.2. Situación en América del Sur

En América del Sur, la FA se introdujo a fines del siglo XIX y fue registrada en forma endémica hasta mediados del siglo XX en la mayoría de los países. A partir de la implementación en el año 1988 del Plan Hemisférico de Erradicación de la Fiebre Aftosa (PHEFA) se producen grandes logros en cuanto al control y erradicación de la misma. En principio los objetivos incluían;

- erradicar la fiebre aftosa del continente sudamericano;
- prevenir su introducción en áreas libres;

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

- prevenir la introducción de fuentes de VFA y otros patógenos exóticos en las nuevas áreas de colonización ganadera, especialmente la región amazónica, al mismo tiempo que respetar la integridad ecológica de esas áreas.

El Plan aparece como consecuencia directa de la toma de conciencia de lo oneroso que resultaba convivir con la fiebre aftosa y en particular, de la percepción de la importancia estratégica de erradicar la FA en la medida que disminuye las pérdidas económicas directas, pero especialmente, en aquellos países con saldos exportables significativos, de las derivadas de la imposibilidad de acceso a un sector importante del mercado de carnes (Astudillo, 1992).

Un antecedente importante del Programa fue la firma del proyecto regional para la erradicación de la FA en la Cuenca del Río de la Plata en junio de 1987. A partir de entonces los programas nacionales y regionales comenzaron a adoptar nuevos modelos de administración siguiendo las directivas de incorporación y participación de la comunidad, regionalización de las acciones y fortalecimiento de las acciones a nivel local. (Astudillo, 1992)

De esta forma el Continente Sudamericano logró un avance en conjunto y llega hoy al actual reconocimiento ante la OIE de libre de FA con o sin vacunación en casi todos los países, con la excepción hasta junio de 2017 de zonas en la Amazonia y del caso particular de Venezuela, donde el estatus de la enfermedad no está claramente definido por falta de reporte (<http://www.oie.int>). Recientemente, en junio de 2017, se ha declarado el caso de VFA serotipo O en Colombia ya descrito en la sección anterior.

A pesar de estos logros, la preocupación relacionada a esta enfermedad sigue presente debido a que se continúan en la actualidad reportando focos en países/regiones que ya habían sido declarados libres, como el caso de las re-emergencias de FA tipo A en Argentina, Uruguay y Sur de Brasil en los años 2000 y 2001 (Mattion y cols., 2004), así como las emergencias con el virus tipo O en el Cono Sur de América del Sur en Argentina, en los años 2000 y 2006, Brasil en los años 2000 y 2005, Bolivia en los años 2003 y 2007, Paraguay en los años 2002, 2011 y 2012 y Uruguay en el año 2000 (Malirat y cols. 2007 y Maradei y cols., 2013). En el área andina, Colombia ha sufrido re-introducciones de VFA tipo O y A en el año 2008 y de tipo O en el 2009 (Malirat y cols.,

2011 y 2012). El último reporte es de junio de 2017, entendiéndose que fue originado a raíz de contrabando de animales provenientes de Venezuela. Debido a esta situación, la vacunación continúa siendo un componente clave en el proceso de erradicación en el continente. Consecuentemente, en el plan de acción 2011-2020 del Programa Hemisférico de Erradicación de la FA (PHEFA) se ha dado continuidad hasta el último año que abarca, a la vacunación antiaftosa en el continente sudamericano. Este tipo de hechos refuerzan la importancia de mantener un sistema de detección y alerta temprano y de aislar y caracterizar las cepas actuantes con el objetivo de poder responder en forma correcta ante una posible incursión.

5.1.4.3. Situación en el País

La República Argentina es un país agroganadero con una población pecuaria principalmente bovina. En marzo de 2016, según el Sistema Integrado de Gestión para la Sanidad Animal (SIGSA - Dirección de Control de Gestión y Programas Especiales - Dirección Nacional de Sanidad Animal – SENASA), el país registró 52.636.778 (SIGSA-SENASA – marzo 2016) cabezas de bovinos y una cantidad considerable de ovinos entre otros biungulados (Pecker 2010).

El primer reporte en el país que registra la primera aparición de la enfermedad data del año 1870 asociada a la importación de bovinos para reproducción desde el Reino Unido durante la segunda mitad del siglo XIX (Pecker, 2007). Históricamente se ha detectado que las ocurrencias de la enfermedad se daban en dos picos anuales que correspondían con las épocas de mayor movimiento de los animales en el calendario productivo.

El Programa Argentino de Control de FA desarrollado entre los años 1990-1997 junto con el cambio de vacunas de tipo acuosas por las oleosas, llevó a la erradicación de la enfermedad logrando en 1997 el estatus oficial otorgado por la OIE en su 65° sesión general de “país libre de FA que practica la vacunación” (Pecker AE, 2010). El buen desarrollo de la campaña de erradicación estaba respaldado por el progresivo descenso en el número de brotes, el último de los cuales fue detectado en abril de 1994, la evidencia aportada por estudios serológicos de la constante disminución de actividad viral y la presencia de una sostenida y potente inmunidad en el ganado. Esto llevó a la

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

suspensión de la vacunación en 1999 y el reconocimiento por parte de la OIE como país libre de FA sin vacunación en el año 2000 (Bergmann y cols., 2005).

En julio del 2000, 14 meses luego de la suspensión de la vacunación, reaparecieron focos de FA en el país (Correa Melo y cols., 2002). La epidemia con serotipo A duró 18 meses y se reportaron más de 2500 focos. El serotipo O fue responsable de unos pocos brotes al comienzo de la epidemia, mientras que el serotipo A circuló hasta enero de 2002. Las medidas tomadas por el SENASA, incluyeron junto con otras medidas preventivas, rifle sanitario, vacunación en anillo, restricción del movimiento de animales y la incorporación de la nueva cepa circulante a la vacuna (Mattion y cols., 2004; König y cols., 2007). Asimismo, se re-estableció la obligatoriedad de vacunación en la zona al norte del paralelo 42°.

En julio de 2003 la Argentina fue reconocida nuevamente por la OIE como país libre de FA con vacunación, estatus que luego perdió al declararse en septiembre de ese año un foco de FA en Tartagal, Salta. La condición de libre con vacunación fue recuperada en enero del 2005, y nuevamente perdida al confirmarse VFA serotipo O en febrero de 2006 en el Departamento de San Luis del Palmar en la provincia de Corrientes (Malirat y cols., 2007). Cabe destacar que a lo largo de todos estos acontecimientos se mantuvo el estatus de libre de FA sin vacunación de la región patagónica, al sur del paralelo 42°, otorgado en mayo de 2003. Luego de intensos trabajos tanto de los productores ganaderos, servicios privados y oficiales de salud animal se logró nuevamente a principios de 2007 el reconocimiento de la OIE de país libre de FA con vacunación al norte del paralelo 42.

La Argentina actualmente es reconocida por la OIE como país libre de FA con vacunación y en la región al sur del paralelo 42° como libre de FA sin vacunación, estatus al cual se han incorporado a partir de junio del 2008 la región denominada Patagonia Norte B (Río Negro y Neuquén) y en mayo de 2014, las zonas de Patagonia Norte A (zona mayoritariamente comprendida entre el Río Colorado y Río Negro), y el Valle de Calingasta (provincia de San Juan).

Las zonas reconocidas actualmente como libres con vacunación incluyen, la zona denominada centro norte, restituida la última vez luego del brote de O/Corrientes/Arg/06 en el año 2007; la región denominada cordón fronterizo, que incluye áreas fronterizas de países limítrofes establecida a partir de un acuerdo entre la OIE y los países del Comité

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

Veterinario Permanente del Cono Sur (CVP), y que ocupa una franja de alrededor de 25 km de ancho (Figura 2)

El estatus del país se ratifica todos los años ante la OIE, con la actualización anual de los resultados de la vigilancia epidemiológica.

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

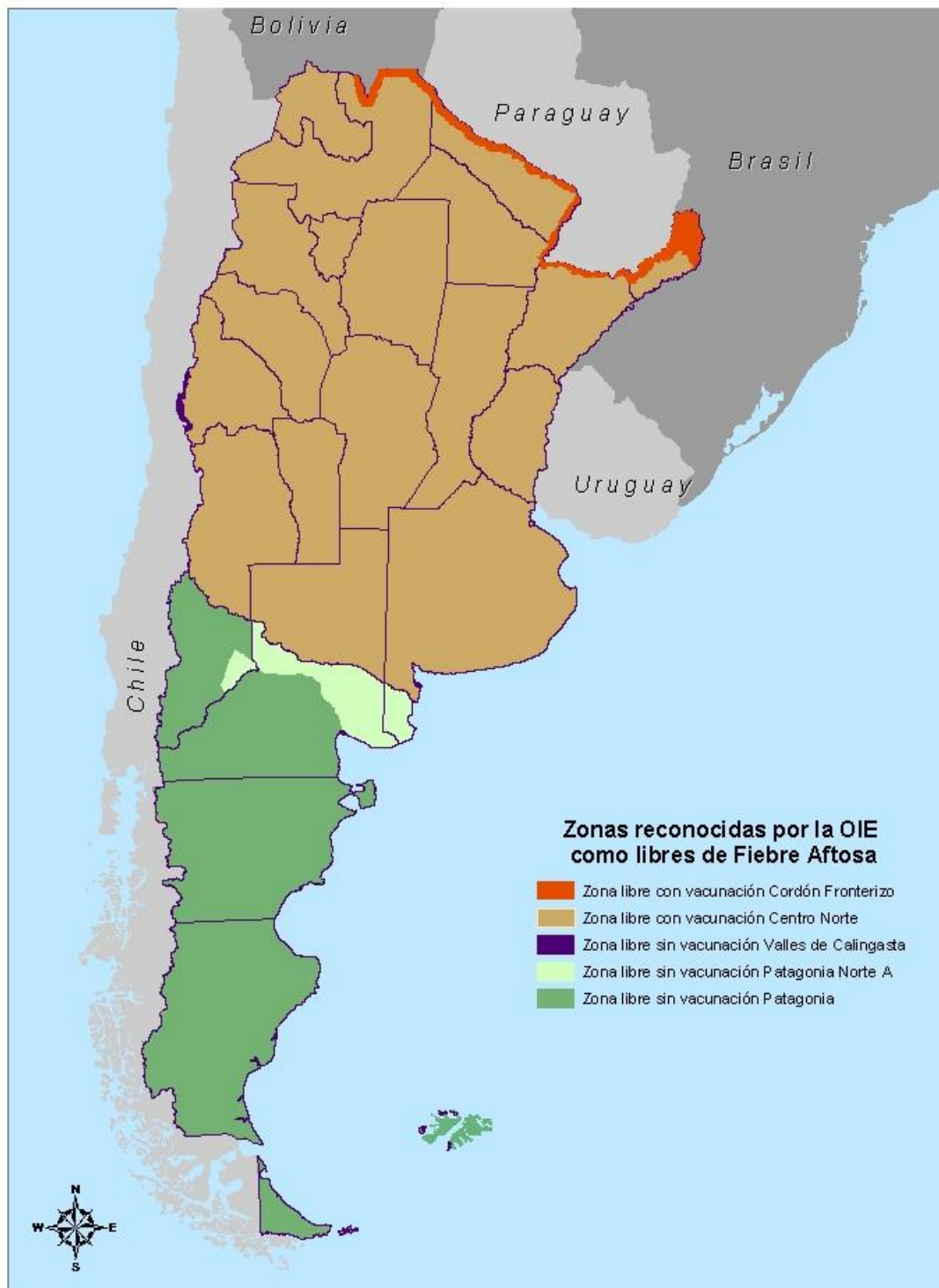


Figura 2. Mapa del estatus sanitario para la FA en la República Argentina y categorización de zonas según plan de vacunación. obtenido de www.senasa.gov.ar

5.1.5. Medidas de Control ante sospechas y emergencias.

Las medidas que se toman para el control de posibles brotes en un área libre de FA siguen las pautas generales de la estrategia global de lucha contra la FA. Como primera barrera, los sistemas de detección temprana son indispensables para poder llevar un control en tiempo y forma de los episodios, debiéndose reforzar además con controles estrictos de animales en las fronteras.

Una sospecha de FA debe ser objeto de notificación obligatoria e inmediata a la autoridad sanitaria competente más próxima a la localidad donde se encuentre, en un período de tiempo no mayor a 24 horas. La notificación de una sospecha de FA se puede obtener directamente desde el propietario o responsable de animales susceptibles, quien los transporte o cuide de ellos. Los Veterinarios Oficiales o privados, personal de los servicios de inspección de los mataderos o frigoríficos, personal de laboratorios oficiales o privados, responsables de ferias de ganado, cualquier autoridad nacional, regional o local, y diferentes actores del sector agropecuario, y cualquier ciudadano que tengan relación o conocimiento de animales sospechosos o productos derivados de tales animales, están obligados a notificar cualquier dato sobre sospecha de la enfermedad.

Frente a la notificación de una sospecha de FA, la autoridad sanitaria debe darle trámite inmediato al proceso de recepción con el fin de poder verificarla o desestimarla en un plazo no mayor a 12 - 24 horas. El predio afectado será considerado como sospechoso de FA hasta que el veterinario oficial efectúe la intervención primaria y descarte la sospecha de la enfermedad. Al recibir la denuncia, el funcionario de la oficina sanitaria local debe registrar información relevante. Luego de esto inmediatamente se deben comunicar a los directores responsables del organismo de control oficial. En el caso de Argentina, esto está reglamentado por SENASA bajo lo que se conoce como Sistema de Registro y Notificación de Enfermedades Denunciables de los animales. La FA entre otras enfermedades denunciables, están declaradas en la Resolución SENASA Nº 540/2010.

En caso de una denuncia, los pasos a seguir son, atender e investigar el evento de la denuncia, incluyendo una entrevista al predio y toma de muestras. Si se descarta la sospecha se cierra la misma.

En caso de confirmación de ocurrencia de brote de FA la acción y obligación por parte de los entes sanitarios responsables es la de poner en acción el SINAESA (Sistema Nacional de Emergencias Sanitarias) detallado en la Resolución SENASA Nº 779/1999. Dicha resolución detalla cómo se compone un equipo de emergencia sanitaria y es activado ante la detección de enfermedades persistentes, exóticas o situaciones epidemiológicas que así lo justifiquen, tanto dentro del Territorio Nacional como en países limítrofes, cuando éstas impliquen riesgo sanitario. Está constituido tanto por profesionales de diferentes extracciones, como por paratécnicos y administrativos. Las acciones consisten en alertar en forma temprana y establecer medidas de biocontención del posible brote, mediante la interdicción del predio sospechoso y de los predios vecinos o con alto riesgo de exposición al rebaño sospechoso (procedencia o destino), interrumpiendo todos los movimientos y controlando con una cuarentena estricta el ingreso/egreso no solo de animales sino también de personas y equipos. Mediante el trabajo coordinado entre el ente sanitario los médicos veterinarios a cargo y los trabajadores del predio, se procede a la eliminación de los productos, y en el caso de productores de leche se da aviso a las plantas industrializadoras. A su vez, se suspenden las concentraciones de ganado y se efectivizan las comunicaciones a las autoridades sanitarias locales primero, y luego, internacionales (OIE). Finalmente se suspende la comercialización de los productos derivados de la producción con países importadores (OPS/OMS 2007).

Asimismo, se inicia un proceso de identificación y caracterización exhaustiva de la cepa viral actuante, aplicando las metodologías de diagnóstico que se detallan más adelante.

5.2. El virus de la Fiebre Aftosa

El virus de FA, es un miembro de la familia *Picornaviridae* (Mahy, 2005), género *Aphthovirus* (Fauquet y cols., 2005). Según la clasificación taxonómica del Comité

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

Internacional de Taxonomía Viral (International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)) esta familia contiene 35 géneros, entre ellos el género *Aphthovirus* que incluye 4 especies: VFA; de la rinitis A bovina; de la rinitis B bovina y de la rinitis A equina (ICTV, 2016).

La partícula viral posee como ácido nucleico ARN de cadena simple y polaridad positiva contenido en una cápside icosaédrica de aproximadamente 24 nm con 60 copias de las proteínas VP1, VP2, VP3 Y VP4. Dichas proteínas capsidales provienen de la expresión de un precursor proteico número 1 (P1) y una vez sintetizadas interactúan entre sí. Una copia de VP1, una de VP0 (VP2+VP4) y una de VP3 se agrupan para formar un protómero como estructura inicial (Figura 3), cinco de los cuales se agrupan, formando un pentámero. Doce pentámeros se asocian con una molécula de ARN para formar la cara externa de la partícula viral. Se considera que el clivaje de VP0, que origina a VP2 y VP4, da lugar a la formación de la partícula viral madura. La proteína VP4 es la encargada de estabilizar la cápside y se encuentra del lado interno de los protómeros (Figura 6).

El virión intacto presenta un peso molecular de $8,4 \times 10^6$ Da (Strohmaier and Adam, 1976), y un coeficiente de sedimentación de 140S (Figura 3). Las cápsides de VFA son extremadamente sensibles a las altas temperaturas y, a diferencia de lo que ocurre con otros picornavirus, también al pH ácido (Brown, 1972; Newman y cols., 1979). Un pH menor a 6.5 ya es suficiente para inactivar la partícula viral. El porcentaje de ARN en relación a la composición completa del virión es del 31,5%.

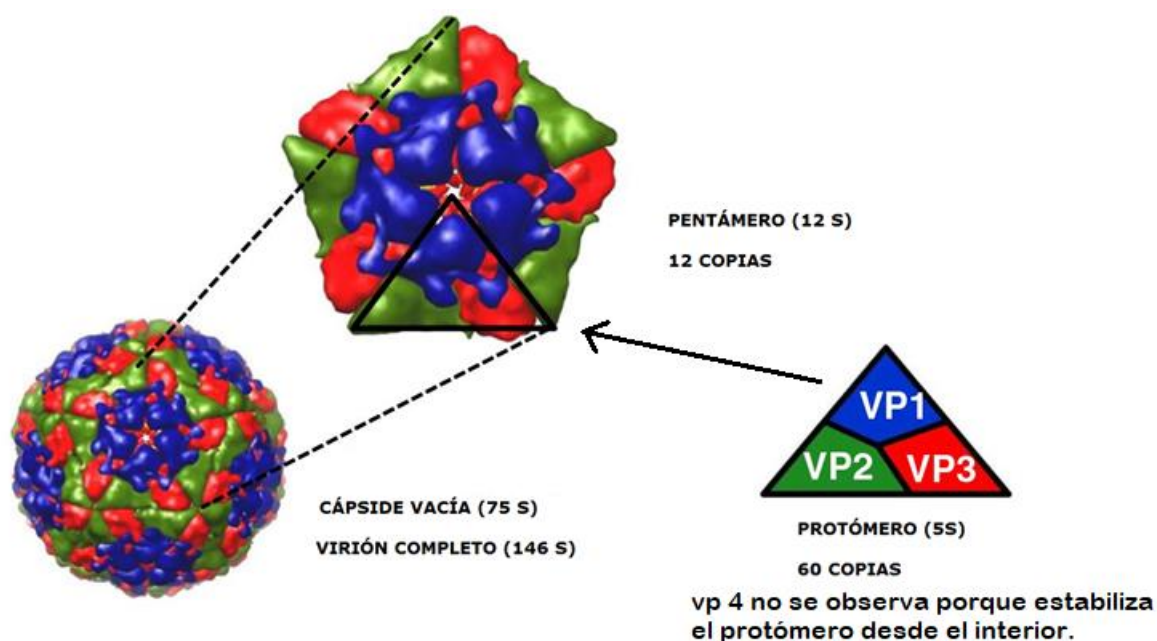


Figura 3. Esquema estructural de VFA.

Se observan las proteínas virales VP1, VP2, VP3 que se agrupan en protómeros cinco copias de los cuales conforman los pentámeros del virión, 12 de los cuales dan lugar a la cápside. VP4 se localiza internamente por ello no se grafica en la imagen. El virión completo es la partícula 146S (Adaptado de Jamal y Belsham 2013).

5.2.1. Organización genómica

El ácido nucleico del virus consiste en una simple cadena de ARN de polaridad positiva conformada por aproximadamente 8.200 nucleótidos (nt). El ARN se encuentra desnudo rodeado directamente por la cápside (Figura 4).

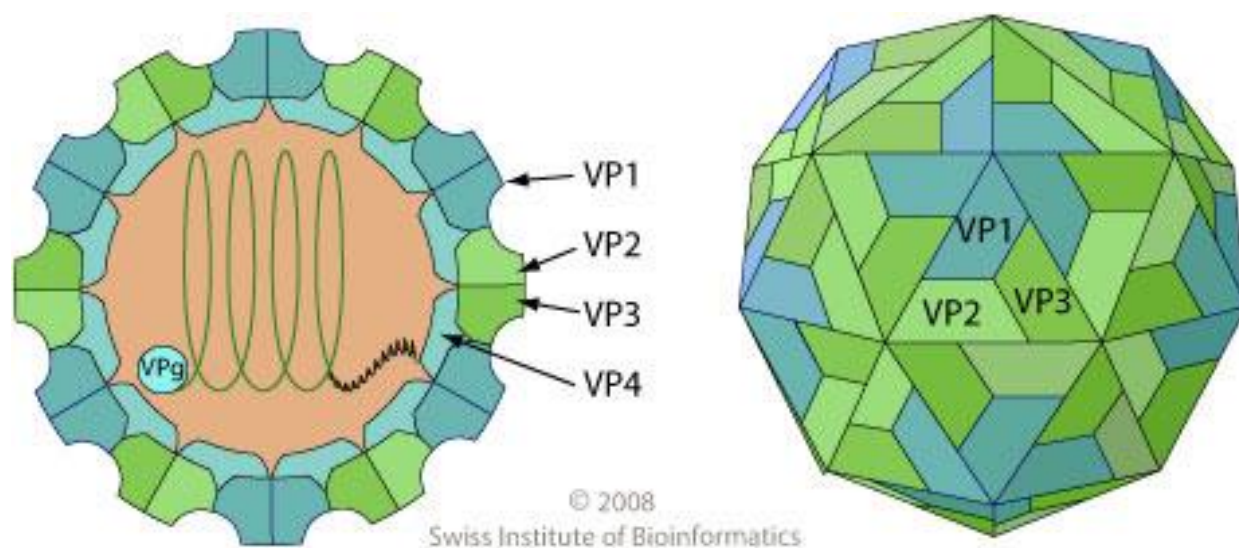


Figura 4. Representación esquemática del virión.
Imagen adaptada de SIB (Swiss institute of bioinformatics)

El genoma viral está flanqueado en ambos extremos por dos regiones no codificantes (UTR: Untranslated Region): 5'UTR y 3' UTR que incluyen elementos reguladores con complejas estructuras secundarias y terciarias (Belsham, 2005; Carrillo y cols., 2005; Flint y cols., 2009). Entre estas dos regiones se localiza la región codificante, con una única fase de lectura abierta (ORF). El extremo 5' se une covalentemente a una proteína viral, VPg, (virion protein genome) la cual juega un rol importante en la iniciación de la replicación del ARN. (Paul y cols., 1998; Paul, 2002; Nayak y cols., 2005; Ferrer-Orta y cols. 2006). Carece de una estructura cap propia de los ARN mensajeros eucariontes, la cual tiene como función el reconocimiento por los ribosomas para iniciar la traducción de proteínas. Como estrategia alternativa posee un IRES (de las siglas en inglés Internal Ribosome Entry Site; Sitio de entrada interna del ribosoma) que es una estructura secundaria del ARN que es reconocida directamente por los ribosomas para ser traducido a poliproteína.

La región 5' UTR, de aproximadamente 1300 nt contiene, varias subregiones que, en el sentido 5' al 3', son las siguientes (Figura 5):

Fragmento S: secuencia de 360 nt, la cual podría ejercer un papel en la regulación entre traducción y replicación (Escarmís y cols., 1992; Witwer y cols., 2001) y en interacciones ARN/ARN con el extremo 3' (Serrano y cols., 2006). También se describe que podría llegar a cumplir un rol preventivo contra exonucleasas celulares con el fin de mantener

la estabilidad y capacidad replicativa del ARN viral (Mason y cols., 2003). Esta secuencia tiene regiones complementarias lo que la hacen capaz de interactuar, plegarse y conformar una estructura secundaria generando un gran stem-loop (Gao y Cols., 2016).

Tracto de poli(C): región de longitud variable (Costa Giomi, y cols., 1984) y cuyo significado en relación a su posible rol en la virulencia es controvertido (Zibert y cols., 1990, de la Torre y cols., 1988; Diez y cols., 1990; Rieder y cols., 1993, Escarmis y cols., 1998). Algunas investigaciones en genomas virales manipulados revelaron que una cierta longitud mínima de 12 nucleótidos del poly(C) es requerida para que el virus replique, aunque aún no se ha evidenciado que el tracto de poli (C) sea un factor de virulencia (Bai y cols., 2008).

Pseudonudos: consiste en 2 a 4 estructuras terciarias repetidas comprendidas en una región de aproximadamente 250 nt, río abajo en el marco de lectura al poli(C) (Pleij, 1990; Escarmís y cols., 1995), cuya funcionalidad se desconoce.

Cre ("cis-acting replication element"): estructura altamente estable tipo "stem-loop" de aproximadamente 55 nt. El "loop" a través de un motivo altamente conservado (AAACA), actúa de molde para la uridilación de la proteína VPg (Mason y cols., 2002, 2003; Rieder y cols., 2000; Nayak y cols., 2006), la cual uridilada (VPgpU ó VPgpUpU) sirve de cebador para una correcta iniciación para la síntesis de la hebra positiva de ARN, esencial para la replicación (Paul y cols., 2003). El VFA es el único miembro de la familia *Picornaviridae*, en el que el cre se ubica en la región no codificante (Liu, Wimmer y Paul, 2009; Steil y Barton, 2009).

IRES: región de 462 nt, altamente estructurada, media la síntesis de proteínas virales de manera cap-independiente (Kuhn y cols., 1990; Belsham & Sonenberg, 1996, Jang y cols., 1990, Martinez-Salas y cols., 2002, Pelletier & Sonenberg, 1989; Belsham & Brangwyn, 1990).

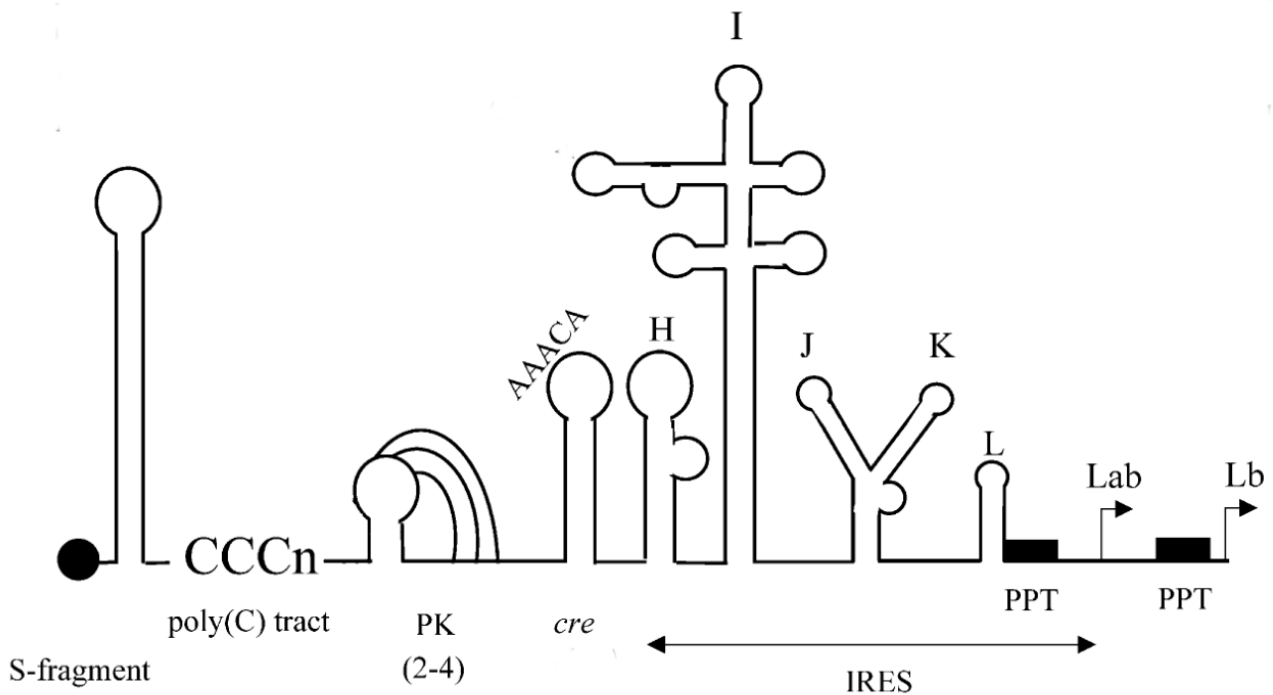


Figura 5. Elementos estructurales en la región 5' UTR del VFA.

Se representa un esquema de las estructuras de los elementos descriptos. La organización de estructuras se presenta de izquierda a derecha en el sentido de marco de lectura de 5' a 3'. En ese orden encontramos el fragmento – S (s-fragment), el tracto de poly C (poly C tract), los pseudonudos (PK) que pueden variar de 2 a 4 estructuras, el elemento de replicación en *cis* (cre), con su secuencia “AAACA”, el IRES se representa mediante 5 dominios de las letras H a L. Finalmente hacia 3' observamos el promotor donde río debajo de cada uno hay un AUG (PPT) que como alternativa expresa la proteasa L en una versión Lab o Lb según desde que AUG comienza la lectura (Figura obtenida de Belsham 2005).

La región codificante constituye la mayor parte del genoma viral, con aproximadamente 7.000 nt que da origen a una única poliproteína de alrededor de 2.330 aminoácidos (aa), cuya traducción puede comenzar en dos codones AUG funcionales, separados entre sí por 84 nt (Beck y cols., 1983; Carroll Rowlands y Clarke, 1984; Forss y cols., 1984). A medida que la traducción progresa, la poliproteína es procesada por proteasas virales, dando origen a 4 precursores L, P1, P2 y P3, que finalmente, y tras el procesamiento completo (Figura 6), van a dar a lugar a las proteínas virales maduras (Palmenberg, 1990). Las regiones L, P2 y P3 codifican precursores y proteínas maduras no capsidales, mientras que la región P1 codifica las proteínas capsidales que componen la cápside del virión. Es interesante observar que en el virión maduro las proteínas que pueden encontrarse son las capsidales originadas a partir del precursor proteico P1 y VPg y 3D que se originan del precursor proteico 3.

Los precursores se organizan como descripto a seguir:

L: esta región codifica a la primera proteína traducida a partir de la poliproteína viral, que es la proteasa "leader" (L). Presenta dos formas alternativas, Lab o Lb, dependiendo de cuál sea el codón de iniciación utilizado (AUG1 o AUG2) (Beck y cols., 1983; Forss y cols., 1984). La proteína L tiene actividad proteolítica y cataliza su propia separación de la poliproteína. Además, cliva el factor celular de iniciación de la traducción eIF4F, dependiente de cap, lo que contribuye a una reducción drástica de la síntesis de proteínas celulares (shut-off) en las células infectadas (Devaney y cols., 1988; Medina y cols., 1993). Esta proteasa es un importante determinante de la virulencia. Estudios previos han mostrado que virus que han sido deletados para L muestran solo una leve disminución en la tasa de replicación, pero la habilidad de causar lesiones disminuye dramáticamente en la inoculación intradérmica (Mason y cols., 1997) y no causa sintomatología al ser administrado en forma de aerosol. Es por esto que no se considera un factor esencial para la replicación, pero es indispensable para la patogénesis del VFA.

P1-2A: Hacia el extremo 3' de la región L se encuentra la región P1, que codifica para las cuatro proteínas capsidales cuyos genes se denominan: 1A (VP4), 1B (VP2), 1C (VP3) y 1D (VP1). El autoclivaje de la proteína L, libera el extremo N-terminal del precursor P1-2A, cuyo extremo C-terminal se produce por la autocatálisis de la proteína 2A. Más tarde la acción de la proteasa 3C sobre este precursor escinde la proteína 2A del precursor P1 para dar lugar a las proteínas capsidales VP4 y VP2 (en forma de su precursor VP0), VP3 y VP1 que integrarán la cápside viral (Racaniello, 2006). Los polipéptidos VP4 y VP2 maduros son originados por clivaje de VP0 durante el proceso de maduración de la cápside (Curry y cols., 1997).

P2: Este precursor origina las proteínas 2B y 2C, involucradas en la replicación. Como mencionado, el procesamiento de la proteína 2A ocurre junto con el precursor P1-2A. Como mencionado, esta proteína, un péptido de 16 aa de longitud, cataliza la escisión de P1-2A del precursor 2BC (Ryan y cols., 1991; Ryan & Flint, 1997). La proteasa viral 3C procesa el precursor 2BC generando 2B y 2C, que junto con la proteína 2A del virus integran la región P2. La proteína 2B contiene los determinantes del rango de huésped, ha sido asociada en VFA al bloqueo de secreción de proteínas cuando se coexpresa con

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

2C (Moffat y cols., 2007) pero no por sí sola (de Jong y cols., 2008). La proteína 2C está involucrada en la síntesis de ARN con posible actividad helicasa (Porter, 1993).

P3: La región P3 codifica las proteínas no capsidales 3A, tres copias en "tándem" de 3B (VPg), la proteasa 3C, y la polimerasa viral (3D), que es una ARN polimerasa ARN dependiente. La proteína 3C es la responsable de la mayoría de los clivajes de procesamiento primario y secundario de este precursor proteico (Porter, 1993). En Picornavirus, la proteína 3A participa en la síntesis del ARN viral (Gromeier y cols., 1999, Takeda y cols., 1986), y en el anclaje a membranas, alterando su permeabilidad (Xiang y cols., 1998), inhibe la secreción de proteínas celulares (Doedens & Kirkegaard, 1995). Se ha demostrado que deleciones o alteraciones en la secuencia de 3A pueden afectar a la virulencia del VFA y la patogenia de la enfermedad (Giraud y cols., 1990; Beard & Mason, 2000) o contribuir a la expansión del rango de hospedador (Nuñez y cols., 2001). En el genoma del VFA existen tres copias en tándem del gen 3B, que codifica para la proteína VPg (King y cols., 1980), que es uridilada y se une covalentemente al extremo 5' del ARN genómico del virus, y está implicada en la iniciación de la síntesis del ARN y probablemente también en encapsidación (Rowlands, 1995). La uridilación de VPg en picornavirus es necesaria para iniciar la síntesis del ARN viral (Klump y cols., 1990, Gerber, Wimmer y Paul, 2001; Paul, 2000). El proceso de uridilación en aftovirus es estrictamente dependiente de la presencia del precursor viral 3CD, del cre y de 3D (Nayak y cols., 2005; Nayak y cols., 2006). La proteína 3C, como se mencionó, es la responsable de la mayoría de los clivajes de los distintos precursores. Asimismo, lleva a cabo la proteólisis de algunas proteínas celulares como la histona H3 (Falk y cols., 1990; Tesar & Marquardt, 1990) o los factores del inicio de la traducción eIF4A y eIF4GI (Belsham y cols., 2000). La proteína 3D, que como hemos mencionado es la ARN polimerasa dependiente de ARN, es responsable de la replicación del ARN viral (Newman y cols., 1979), aunque los requerimientos específicos para el reconocimiento de las moléculas de polaridad positiva y negativa se desconocen. 3D también se encarga de la uridilación de 3B (Nayak y cols., 2005).

La región 3' no codificante se encuentra tras el codón de terminación de la poliproteína y presenta una longitud de aproximadamente 90 nt, estructurada en dos "stem-loops" (SLs) (Mason y cols., 2003; Witwer y cols., 2001), seguida de una cola de poli(A) de longitud variable (Chatterjee y cols., 1976; Sangar y cols., 1977). El poli(A) interviene en el inicio de la síntesis de ARN de polaridad negativa, a través de los residuos

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

de adenilato terminales que actúan como molde con el que se aparea el iniciador 3B-pUpU; su eliminación afecta la infectividad del ARN de VFA (Sáiz y cols., 2001). Asimismo, interviene, a través de una serie de proteínas que se unen a él, en la circularización del genoma necesaria para que tenga lugar la replicación (Barton y cols., 2001; Herold y Andino, 2001).

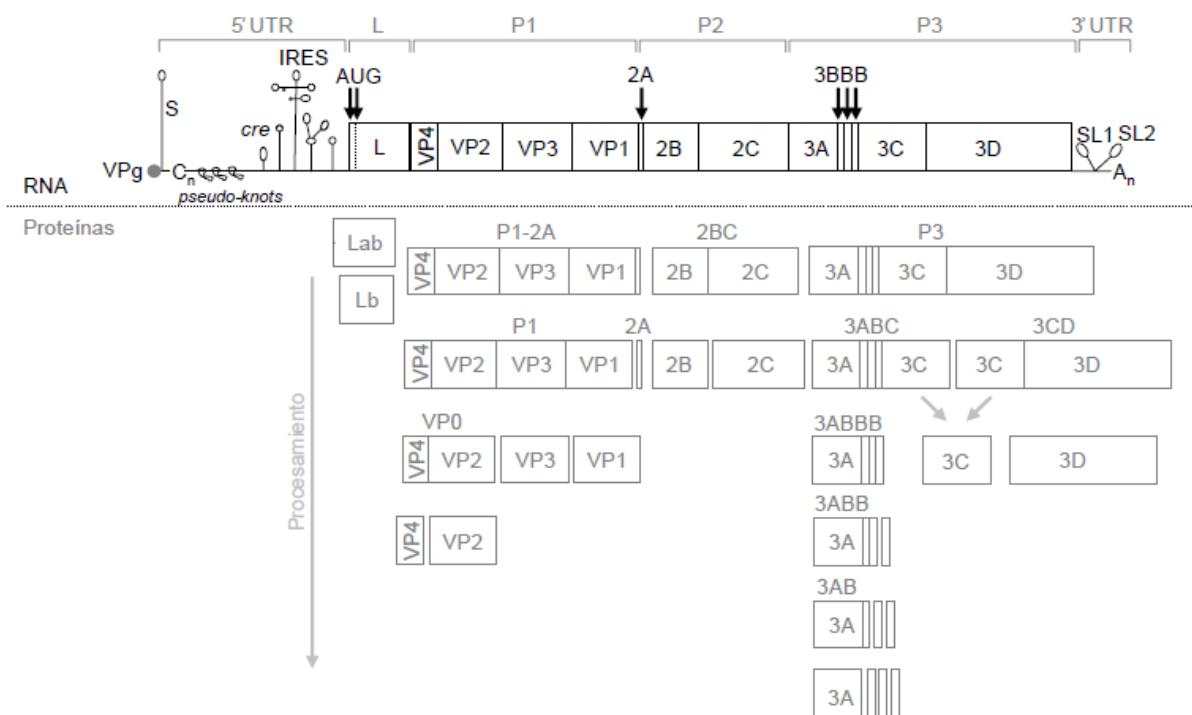


Figura 6. Esquema de la organización genómica de virus de FA y del procesamiento proteolítico de la poliproteína resultante. En la parte superior se detalla la organización genómica de la molécula del ARN viral con su marco abierto de lectura flanqueado por las regiones 5' y 3'. En la parte inferior de la imagen se observan los productos proteicos que se obtienen tras el clivaje de los precursores. Se describe el poly A y el polyC indicados como "A_n" y "C_n". (Texto adaptado de Ryan y cols. 2004)

5.2.2 Ciclo de replicación

El ARN genómico del VFA es infeccioso (Belsham & Bostock, 1988), por lo que no requiere de las proteínas virales para iniciar el ciclo replicativo, que ocurre a nivel citoplasmático (Figura 7). En general el ciclo de replicación del VFA es corto, aproximadamente 6 horas. Este ciclo es lítico con generación de efecto citopático (ECP), presentando como efecto más destacado la reorganización de membranas subcelulares (Rueckert, 1996; Knox y col., 2005; Monaghan y col., 2004). Alteraciones bioquímicas incluyendo inhibición de la traducción y transcripción del hospedador también son observadas (Rueckert, 1996).

La primera etapa del ciclo replicativo (Figura 7) es el proceso de adsorción del virus a la membrana celular. Este proceso es reversible y precisa de cationes bivalentes como Ca^{2+} y Mg^{2+} (Cavanagh y col., 1977). La adsorción es mediada por la proteína capsidal VP1, a través del tripéptido compuesto por los residuos de Arg-Gly-Asp (sitio RGD) generalmente en las posiciones 145, 146 y 147, en el bucle GH de la proteína VP1 (Fox y col., 1989), responsable por la ligación virus-célula. El tripéptido RGD se encuentra conservado en los distintos serotipos y se expone en la superficie del virión (Logan y col., 1993; Baxt y Becker, 1990). Los aa situados en las posiciones 203-213 también parecen participar durante el proceso de interacción con los receptores celulares. La unión a las células se realiza a través de receptores celulares que para el VFA son familia de integrinas (Burman y col., 2006). El bucle de unión al receptor coincide con el sitio antigénico principal del VFA (Mateu y col., 1996). En poblaciones del virus adaptadas a replicar en cultivos celulares tras pasajes seriados, se ha descrito el uso de receptores alternativos (Baranowski y col., 2000).

Tras su unión a integrinas, el virión es introducido en la célula mediante un mecanismo de endocitosis dependiente de clatrina (O'Donnell y col., 2005; Berryman y col., 2005; Martin-Acebes y col., 2007).

Posteriormente, el virus internalizado se localiza en un compartimento endosomal ácido (Carrillo y col., 1984), el pH permite el desensamble de la cápside en pentámeros liberando VP4 (Vasquez y cols., 1979) produciéndose la ruptura de las partículas virales 140S en subunidades pentaméricas 12S, liberando al citoplasma su ARN unido covalentemente a la proteína 3B (Baxt, 1987; Curry y col., 1995).

Aún no está claro si se requiere o no la remoción de la proteína VPg para la traducción (Ambros y cols., 1978; Golini y cols., 1980). La traducción como se mencionó antes, se realiza a partir de un sitio interno (IRES) de compleja estructura secundaria capaz de unirse al ribosoma (Belsham, 1992), y a ciertas proteínas celulares, como PTBP (Luz y Beck, 1990), ITAF45 (Martínez-Salas y cols., 2001) y PCBP (Blyn y cols., 1997). La proteasa L también procesa al factor celular de inicio de la traducción, eIF4G, impidiendo que el ribosoma reconozca la estructura cap de los ARN celulares, y, por lo tanto, su traducción (Devaney y cols., 1988). Las proteasas virales anteriormente descritas, proteolizan además otras proteínas de la célula infectada que participan en procesos necesarios para la viabilidad celular, como factores de transcripción, histonas (H3), proteínas implicadas en el tráfico de membranas y reguladores del ciclo celular (ciclina A y ciclina B2), entre otros (Ryan y cols., 2004).

Una vez iniciada la traducción, esta prosigue generando la poliproteína que se procesa cotraduccionalmente por la acción en cis y trans de las diversas proteasas virales, dando origen a los diferentes productos intermedios y a las proteínas virales maduras descritas (Figura 7).

La replicación tiene lugar en zonas concentradas con membranas vesiculares que provienen del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi. Se encuentra asociada a la cara citoplasmática de estos compartimentos celulares (Barco y Carrasco, 1995; Schlegel y cols., 1996; Teterina y cols., 1997; Bolten y cols., 1998). El mecanismo es a través de un intermediario replicativo, que consiste en un ARN de polaridad (-), sintetizado por la ARN polimerasa ARN dependiente, que se utiliza como molde para la síntesis de nuevas cadenas de ARN de polaridad (+) (Sangar, 1979). La replicación ocurre en complejos citoplasmáticos de ensamblaje, donde, tanto la producción de ARN viral como la producción de las proteínas virales, dependen de las funciones de las proteínas virales y de estructuras conservadas del ARN viral. Las nuevas cadenas positivas podrán ser traducidas, encapsidadas (formando una nueva partícula viral) o servir de molde para nuevas cadenas de polaridad (-) (Baltimore y col., 1966). El precursor 3AB actúa en el reclutamiento de la proteína 3D y del precursor 3CD hacia la membrana (Paul 2002). Este último tiene actividad de proteasa, y facilitaría la unión de 3D al ARN viral a través de distintos dominios de la proteína 3C (Harris y cols., 1994). El modelo propuesto para representar el proceso supone un tapiz de moléculas de polimerasa 3D recubriendo la membrana externa del retículo endoplasmático, formando una malla catalítica (Lyle y

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

cols., 2002). La mayoría de las proteínas no estructurales y sus precursores, junto con el ARN, también participarían de esta estructura, llamada "complejo de replicación" (Parsley y cols., 1997; Xiang y cols., 1995; Barnejee y cols., 2001; Echeverri y cols., 1995; Paul y cols., 1994; Giachetti y cols., 1992), el cual facilita el proceso replicativo, localizando en la misma estructura celular a todos los componentes necesarios para la replicación del ARN viral (Bienz y cols., 1992). La proteína 3Dpol sintetiza tanto la cadena positiva como la negativa del ARN viral y cataliza también la uridilación de la proteína 3B, para que éste actúe como iniciador de la síntesis de ARN de polaridad positiva. Su estructura ha sido resuelta mediante cristalografía de rayos X (Ferrer-Orta y cols., 2006; Ferrer-Orta y cols., 2004; Ferrer-Orta y cols., 2007).

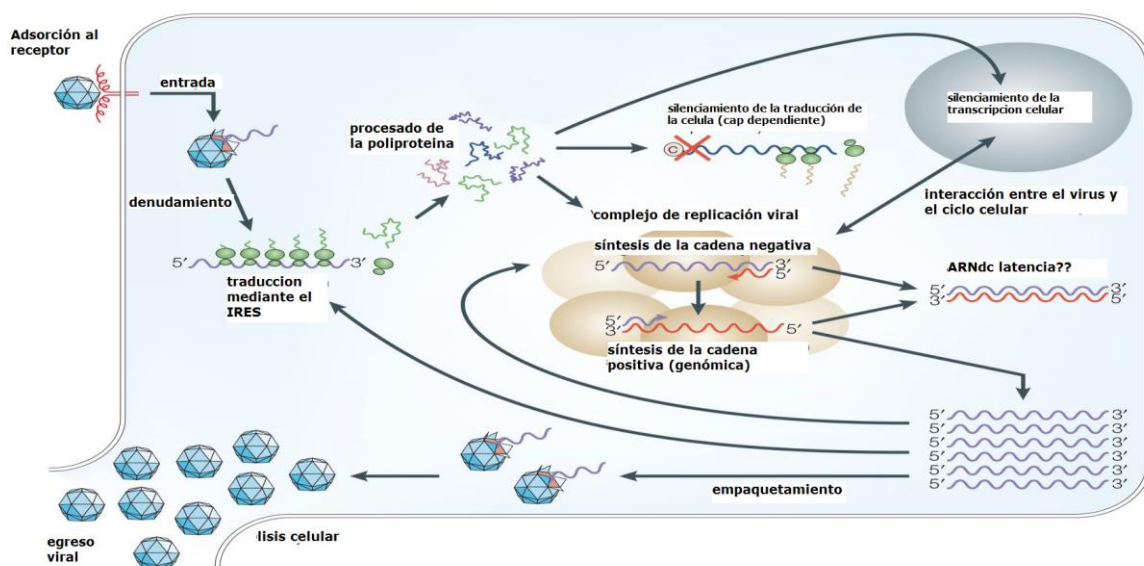


Figura 7. Ciclo replicativo del VFA.

Se esquematizan los eventos principales del ciclo viral. (Adaptado de Whitton y cols., 2005)

La proteína VPg unida covalentemente a todas las moléculas de ARN viral (Ambros y Baltimore, 1978), actúa en el inicio de la replicación (Paul y cols., 1998; Ferrer-Orta y cols., 2006). El primer paso para la iniciación de la síntesis del ARN viral es la uridilación de VPg por parte de 3D, mediante la cual se adiciona un residuo de uridina-5´-

monofosfato (UMP) a la Tyr que se encuentra en posición 3 del péptido VPg (Ferrer-Orta y cols., 2006, Nayak y cols., 2005, Paul y cols., 1998). El mecanismo de uridilación difiere en función de la polaridad del ARN a sintetizar. Para la síntesis de ARN negativo la uridilación sería mediada por el poli-A (Murray y Barton, 2003; Paul y cols., 2003), mientras que la uridilación que utiliza como molde la estructura del "cre", solo sería necesaria en la síntesis de ARN+ (Murray y Barton, 2003). Sin embargo, otros autores han relacionado la uridilación de 3B mediada por "cre" a la síntesis de ARN de ambas polaridades (Van Ooij y cols., 2006). El proceso de uridilación es estimulado por el precursor 3CD (Perera, 2007; Paul y cols., 2003).

Varios modelos tratan de explicar el inicio de la síntesis de las moléculas de polaridad negativa y todos ellos contemplan el hecho de que el ARN genómico sirve de molde para la síntesis de unas pocas moléculas de ARN-, para lo cual la proteína 3B serviría de cebador. Estas cadenas de ARN- serían, a su vez, molde para la síntesis de nuevas moléculas de ARN+, que llevarían también unidas covalentemente en su extremo 3' a la proteína 3B uridilada empleada como cebador en dicha síntesis. Debido a este mecanismo, en el interior de la célula infectada se acumula mayor cantidad de moléculas de ARN+ que de ARN-. Para que comience la síntesis de la cadena negativa de ARN es necesario que cese la traducción de la molécula de ARN (Gamarnik y Andino, 1998) (Figura 8).

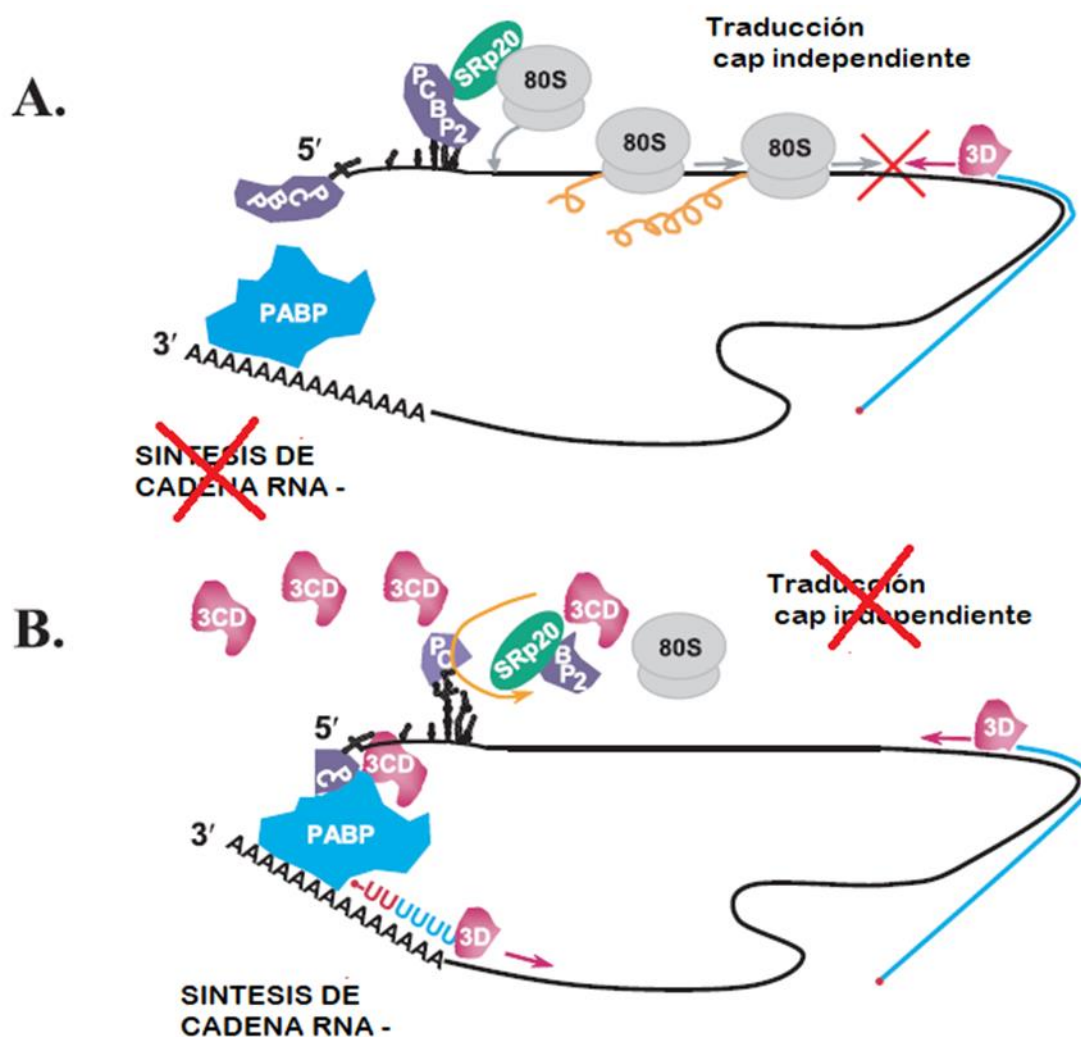


Figura 8. Cambio de Traducción cap independiente a Copia de ARN de largo genómico en Picornaviridae. Adaptado de Perera y cols., 2007.

Modelo esquemático del cambio de traducción cap-independiente a replicación del ARN viral para poliovirus. A) Condiciones que favorecen la traducción del ARN viral: el ARN se une a los ribosomas, porción 80s, que elongan las cadenas de poli proteína que se originan (líneas curvas en color naranja). El inicio de la traducción esta facilitado por la unión de la proteína celular PCBP2 al IRES del virus (estructuras graficadas en negro en extremo 5'). B) Tras el aumento de productos originados por la traducción de la poli proteína y su posterior clivaje, se genera un acumulo de proteína 3CD o 3C si se encuentra clivada. Este evento genera que 3CD pueda clivar a PCBP2 (flecha en naranja). El clivaje de este factor celular inhibe la unión de los ribosomas al IRES, por lo que se reducen los niveles de formación del complejo de iniciación de la traducción favoreciendo la interacción de un factor que se origina por el clivaje de PCBP2 con el tracto de poly A mediante la unión a otro factor celular llamado PABP. Esta interacción activa la síntesis de la cadena ARN negativa. Las flechas grises indican la dirección de los ribosomas en la traducción. Las flechas rojas indican la dirección de la 3D que es la ARN polimerasa. Las líneas azules representan la cadena ARN negativa que se va generando con VPg (punto rojo). La secuencia UUUUUU representa el tracto de poly U que hace de cebador para la copia de la cadena ARN negativa.

El ciclo de replicación finaliza con los procesos de encapsidación de la molécula de ARN genómico y de la maduración de la cápside, mediante el clivaje del precursor VP0, dando lugar a las proteínas VP4 y VP2. El clivaje de VP0 es autocatalítico y es esencial para la formación de virus infeccioso (Knipe y cols., 1997).

5.3. Variabilidad genética

El VFA, al igual que otros virus de genoma a ARN, tiene una alta capacidad de variación resultado de la baja eficiencia o ausencia de actividad correctora (*proofreading*) de la ARN polimerasa viral.

Esta alta variabilidad genera poblaciones de VFA que han sido definidas como distribuciones dinámicas complejas de mutantes relacionados entre sí, a las cuales se las denomina *cuasiespecies* (revisión en Domingo y cols., 2006). En estas poblaciones de cuasiespecies existe un equilibrio entre la alta tasa de mutación y una continua competición entre las mutantes, que resulta en la mayor adaptabilidad de aquellas con más eficacia biológica o "fitness" frente a las diferentes presiones selectivas del ambiente. Se han utilizado otros términos para describir esta estructura poblacional viral, como espectro mutante, nube, etc. La *cuasiespecie* se define como una colección de genomas relacionados, pero no idénticos, expuestos a un proceso continuo de variación genética (Figura 9). Durante el mismo, se produce una competencia y selección de los individuos de la población que se comporta como un grupo único viral en donde progresan los mutantes más aptos (Domingo and Shuster, 2016; Eigen y Shuster 1979, Nowak 1992).

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

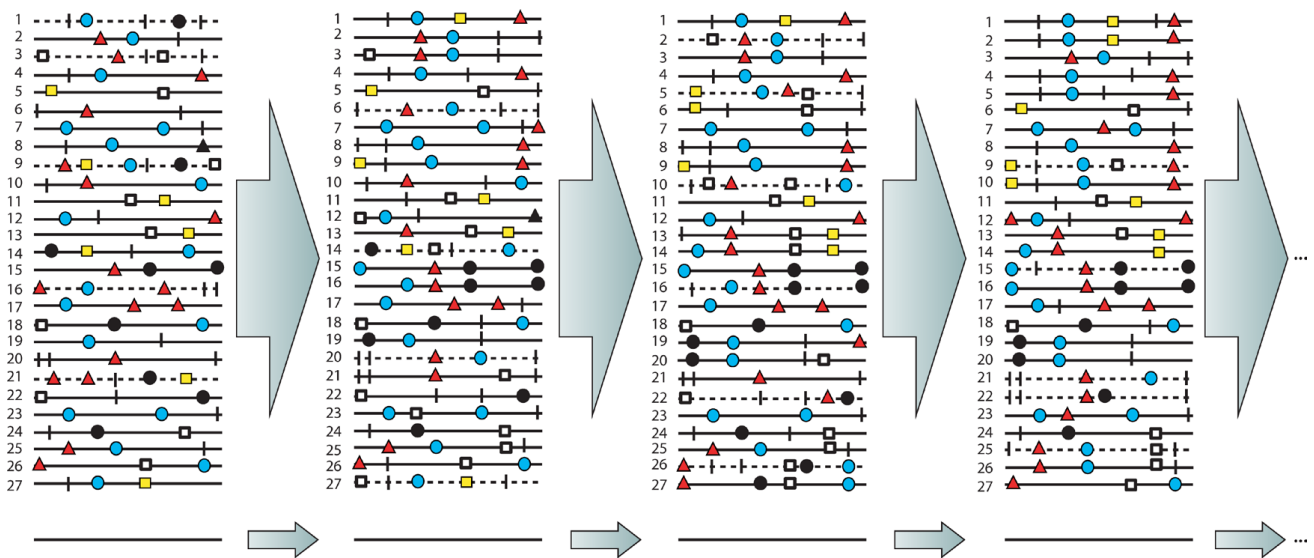


Figura 9. Cuasi-especie viral.

Representación evolutiva de una cuasi-especie viral. Los genomas se representan mediante líneas horizontales con símbolos geométricos que esquematizan mutaciones. Los genomas de líneas punteadas, son aquellos que no producen una progenie viable que se perpetúe en el futuro Adaptada de Domingo y cols., 2012.

Las variaciones a nivel genómico implican eventualmente cambios a nivel fenotípico que se manifiestan como cambios en dominios relevantes de las proteínas capsidales del virus que interactúan con los componentes del sistema inmunológico y también como sustituciones de aa en las proteínas no capsidales, alterando manifestaciones tales como rango de huéspedes, virulencia, entre otras. La generación de variaciones ocurre tanto en infecciones "in vivo" como "in vitro", y da lugar a una gran capacidad adaptativa, que ha llevado, en el VFA, "in vivo", al escape de la respuesta inmune del huésped e "in vitro", se han observado cambios fenotípicos como la adquisición de resistencia a anticuerpos monoclonales (AcMs) (Lea y cols., 1994), a fármacos (Sierra y cols., 2007), a vacunas peptídicas (Taboga y cols., 1997), o cambios en rango de hospedador (Giraud y cols., 1990; Nuñez y cols., 2001), o de virulencia que derivan de cambios genéticos mínimos. "in vitro", cuando se somete a los virus a pasajes en cultivos celulares, también se observan estos cambios (Carrillo y col., 1989; Diez y col., 1989). Asimismo, se han recuperado variantes genéticas a lo largo de infecciones persistentes en animales inoculados experimentalmente (Gebauer y cols., 1988, Malirat y cols., 1994). Inclusive es posible encontrar en la literatura, trabajos que evidencian la existencia de poblaciones genéticamente heterogéneas durante un brote (Piccone y cols., 1988, Malirat y cols., 2007). Además de este tipo de mutaciones que llevan a un *drift* antigénico, hay estudios

(Heath y cols., 2006) que evidencian la ocurrencia de recombinaciones en “hotspots” los extremos 3´ y 5´ de la región P1.

5.4. Variabilidad antigénica

La variación a nivel genético registrada en el VFA se refleja a nivel antigénico, existiendo los 7 serotipos anteriormente descritos, dentro de los cuales se encuentran variantes. La infección con un tipo viral no protege contra otros, e incluso se ha evidenciado que tampoco hay protección en algunos casos entre variantes de un mismo tipo. La protección cruzada entre variantes es independientemente de cuán emparentadas genéticamente estén las mismas, inclusive cuando las mismas están considerablemente emparentadas genéticamente entre sí, por ejemplo, cuando se producen reemplazos en sitios antigénicos importantes (Paton 2005, Mattion y cols., 2004, Hernandez y cols., 1992., Brooksby, 1992., Catwright y cols., 1982.).

Los principales determinantes de la variación antigénica se localizan en el gen que codifica para la proteína VP1 (Bachrach y cols., 1975), que es la que presenta la mayor tasa de fijación de mutaciones, calculada entre 10^{-3} y 10^{-5} por sitio nucleotídico por replicación de su genoma (Mahy y cols., 2013, Drake y Holland, 1999; Grubman y Baxt, 2004). El principal sitio antigénico, implicado en la neutralización de la infectividad viral, se localiza en el “loop” G-H de VP1, localizado en las posiciones 140-160 aproximadamente, dependiendo del serotipo (Strohmaier y cols., 1982; Bittle y cols., 1982; Pfaff y cols., 1988; Mateu y Verdaguer 2004; revisión en Baranowski y cols., 2001). El triplete RGD, que como mencionamos anteriormente interviene en el reconocimiento del receptor, se localiza en la zona central de este “loop”. También han sido identificados otros sitios relevantes en la región P1.

Los sitios antigénicos funcionales identificados para algún serotipo en particular no siempre se observaron en otros, o no son totalmente equivalentes. Sin embargo, considerando el conjunto de resultados obtenidos hasta hoy (Matheu M., 2016), se puede concluir que las mutaciones de escape a anticuerpos utilizadas para definir sitios antigénicos funcionalmente independientes tienden a agruparse en varias regiones separadas de la superficie de la cápside. Para el serotipo O en general se consideran cinco sitios funcionalmente independientes (sitios 1-5) identificados en ensayos de neutralización cruzada (McCullough et al., 1987a; Xie et al., 1987; Stave et al., 1988;

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

Pfaff et al., 1988; McCahon et al., 1989; Kitson et al., 1990; Crowther et al., 1993; Barnett et al., 1998; Aktas and Samuel, 2000; Asfor et al., 2014). El sitio 1, que mencionamos más arriba, compuesto por el bucle GH (sitio 1a) y extremo C terminal (sitio 1b) de VP1. El sitio 2 se define por mutaciones en los bucles BC o EF de VP2. Los sitios antigénicos 3 y 4 se reconocen, respectivamente por en el bucle BC de la VP1 BC y el "nudo" BB de la VP3. El sitio 5 está definido por una mutación específica en el bucle GH de VP1.

Tami y cols., (2003) demostraron cómo el virus co-evoluciona antigénicamente y los cambios que ocurren a nivel de las proteínas capsidales, en particular en el sitio RGD que es ligando viral, modificando la afinidad por receptores celulares "*in vivo*" sugiriendo que la presión selectiva que ejerce la respuesta inmune humoral del huésped jugaría un rol importante en la selección y continuidad de las variantes antigénicas. Esta selección estaría mediada por la presión ejercida por la respuesta inmune (anticuerpos y linfocitos T citotóxicos CD8+) (Curry y cols., 1996, Diez y cols., 1990). A nivel molecular el evento ocurrido es el cambio de aa generados en forma azarosa en los sitios antigénicos de los residuos superficiales capsidales. Siguiendo este evento, se puede originar una variante antigénica en donde puede ocurrir que el sitio antigénico relevante puede interaccionar en forma totalmente distinta con la respuesta inmune preexistente. (Baranowski y cols., 2003; Domingo, 2016). Para comprender la dinámica de la evolución de los sitios antigénicos del VFA en un modelo endémico de la enfermedad Sarangi y cols., (2013), realizaron un estudio de simulación "*in vitro*" por pasajes virales del tipo O incubado con suero vacunal como presión de selección. Los resultados evidenciaron una caída de un logaritmo en el título neutralizante para las variantes mutantes en relación a la cepa original, sin embargo, la caída de título neutralizante no puede correlacionarse con el número de cambios nucleotídicos que se fijaron nivel genético.

Esto se explica por el hecho que un cambio simple a nivel genético puede tener efectos drásticos en la antigenicidad viral, mientras otras veces la combinación de seriadas sustituciones puede ser de naturaleza compensatoria para lograr un mismo tipo de propósito por parte del virus (Mateu y cols., 1990). Adicionalmente, a los sitios antigénicos mencionados anteriormente, autores como Asfor y cols., 2014 han identificado también la existencia de otros epítopes que confieren protección que aún no han sido revelados como el sitio 191 de la VP2.

Un mecanismo adicional para la variación antigénica en ausencia de selección inmune (que no requiere que los residuos de un sitio antigénico estén implicados) se relaciona con a las fluctuaciones de mutantes asociados con el *drift* antigénico o la selección positiva dirigida a sitios distintos de los sitios antigénicos (Domindo y cols., 1993). Es decir, que la variabilidad antigénica no está dada solo por la presión de selección positiva de la respuesta inmune.

5.5. Respuesta Inmune frente al VFA.

El VFA, es un patógeno intracelular obligatorio que depende para su supervivencia de huéspedes susceptibles donde replicar. Durante la infección de un virus citopático como el VFA que replica rápidamente causando extenso daño celular, se induce una rápida respuesta inmune del huésped cuyos mecanismos se han relacionado principalmente a la respuesta humoral, aunque también se describe una importante respuesta celular. Las células inmunitarias innatas desempeñan un papel crítico en el procesamiento del antígeno viral de forma tal que activan el sistema inmune a través de la respuesta de anticuerpos y de defensa mediada por linfocitos T.

La inducción de una respuesta inmune humoral específica implica el reconocimiento de epítopes presentes en la partícula viral por parte de los linfocitos B para producir anticuerpos específicos. Niveles de anticuerpos IgM específicos en suero se detectan a partir del cuarto día de la infección, o inclusive más temprano en animales inoculados intradermolingualmente, y del tipo IgG entre 4-7 días (Francis & Black, 1983; Salt, 1993). Los animales infectados presentan altos niveles séricos de anticuerpos específicos con actividad neutralizante, que según la especie pueden persistir hasta 18 meses luego de la infección (Wigdorovitz y Sadir, 1996). Se ha descrito una buena correlación entre los niveles de anticuerpos específicos medidos "in vitro" y la protección "in vivo" (Van Bekkum, 1969; Van Maanen and Terpstra, 1989; Robiolo, y cols., 1995 y 2010).

La respuesta inmune humoral se basa en la existencia de Acs que bloquean la unión del virus a la célula huésped y su entrada, o sea neutralizantes, y los mismos son eficaces frente a los virus durante la fase extracelular, uniéndose a la envoltura o cápside del

virus. En la neutralización solamente intervienen las regiones del anticuerpo que se unen al antígeno, por lo cual, la misma puede estar mediada por cualquier isotipo presente en la circulación y en las secreciones mucosas. La relación entre los anticuerpos neutralizantes y la protección contra la enfermedad está bien establecida. Los epítopes reconocidos por los anticuerpos neutralizantes se encuentran en motivos proteicos expuestos en la superficie de la partícula viral, haciendo que la opsonización sea importante para el reconocimiento por el macrófago, llevando a la eliminación de la amenaza infecciosa. Los sitios neutralizantes referidos anteriormente del VFA han sido identificados y descritos exhaustivamente mediante anticuerpos monoclonales. La mayoría son discontinuos o conformacionales al contrario de lo que se registra para los epítopes de células T.

La respuesta inmune en mucosas es importante debido a la ruta oro-faríngea como principal vía de infección natural del VFA (Alexandersen & Donaldson, 2002; Francis & Black, 1983). La detección de anticuerpos IgA específicos en fluido oro-faríngeo, como inducción de una respuesta inmune local y sistémica, ha sido descrita en cerdos inmunizados con altas dosis de virus inactivado o con péptidos sintéticos. Esta detección se ha correlacionado recientemente con la inducción de una respuesta protectora eficiente (Cubillos y cols., 2008; Parida y cols., 2007).

En forma concomitante a la respuesta humoral, se produce el reconocimiento de los epítopes por parte de los linfocitos T que luego del procesamiento de los antígenos, se presentan en las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) tipo II, este paso asegura la estimulación de los linfocitos T "helper" (colaboradores) para que se produzcan factores de crecimiento y diferenciación como interleuquinas, factores proinflamatorios, entre otros. Las células críticas como presentadoras de antígenos son las células dendríticas, quienes presentan tanto a los linfocitos T como los linfocitos B. Aunque no se conoce con exactitud, se sabe que los linfocitos T citotóxicos también juegan un rol importante en la respuesta inmune frente al VFA.

El VFA, como consecuencia del proceso infeccioso, induce una respuesta inmune protectora en el huésped frente a posteriores contactos con el virus. Esta respuesta inmune es estimulada específicamente y proporcionará una eficiente protección frente a reinfecciones con la misma variante viral o variantes que estén relacionadas antigénicamente (Collen, 1994; McCullough y cols., 1992).

5.6. Vacunas y vacunación para Fiebre Aftosa

Desde la primera descripción del VFA, se contempló la preparación de vacunas que confirieran protección frente a la enfermedad. Las vacunas contra el VFA, que se usan en la actualidad y han contribuido a erradicar la enfermedad en numerosos países se elaboran a partir de la inactivación química de partículas virales producidas principalmente en cultivos celulares. Se han realizado intentos de elaborar otros tipos de vacunas mediante la aplicación de nuevas herramientas biotecnológicas que han tenido mayor o menor éxito a pequeña escala en investigación, pero sin rendimiento productivo en el desarrollo para vacunación sistemática.

Las partículas virales se obtienen por infección de cultivos de células BHK-21, a nivel industrial (Stoker y Macpherson 1964), utilizando cepas de diferentes serotipos cuya selección depende de la circulación o riesgo de circulación existente o identificado (Rweyemamu, 1984; Paton y cols., 2005, Mattion y cols., 2009) (Figura 12). Los sobrenadantes de los cultivos se clarifican con cloroformo o por filtración para remover los restos celulares. Seguidamente, las suspensiones virales, se inactivan con etilenimina binaria (BEI) (Bahnmann, 1975; Bahnmann 1990, Barteling, 2004), lo cual se realiza en dos etapas para garantizar una completa inactivación. Luego de un primer tratamiento con BEI, la suspensión es transferida a un nuevo tanque donde es nuevamente sometido al tratamiento con el inactivante. La inactivación es controlada mediante tres pasajes secuenciales del virus en recipientes adecuados (rolers) con las mismas células en las que se produjo, para verificar que no haya partículas activas remanentes (Figura 10).

Posteriormente, las partículas virales inactivadas son concentradas y purificadas utilizando diferentes métodos, entre ellos la adsorción en gel de hidróxido de aluminio (Abaracón y cols., 1982), ultrafiltración (Barteling, 2002), precipitación con polietilenglicol (Panina y de Simone, 1973) y otros procedimientos como cromatografía (Doel, 2003). La elección del método de concentración/purificación, varía con el productor de vacunas y el resultado final puede influenciar en la calidad y características de la vacuna. Asimismo, dichos procedimientos, permiten minimizar la presencia de componentes virales no capsidales que, caso presente, podrían interferir con métodos

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

utilizados en serovigilancia. El antígeno purificado puede conservarse a bajas temperaturas hasta su uso en la formulación de la vacuna, o también como integrantes del Bancos de Antígenos.

A pesar de la comprobada eficacia de las vacunas inactivadas, la duración de la protección, los títulos de anticuerpos neutralizantes, y la afinidad promedio de la respuesta inducida por una vacuna, es siempre más baja a la inducida por la infección natural (Doel, 2003). Para superar esta dificultad, en la formulación de las vacunas, en general, se utilizan adyuvantes. Los mismos, actúan como vehículos y como inmunoestimuladores, pudiendo ser de tipo oleosos o acuosos para el producto final tales como el adyuvante incompleto de Freund (Freund y cols., 1948), o más recientemente, la saponina. En este sentido ha sido demostrado que los adyuvantes oleosos confieren estados de protección más duraderos (Smitsaart y cols., 2000). El adyuvante acuoso de hidróxido de aluminio con agregado de saponina fue efectivo para erradicaciones en la década del 80 y del 90. Los adyuvantes oleosos son formulados como emulsiones simples agua-en-aceite utilizando aceites minerales y emulsificantes derivados del manitol, sorbitan y ácido oleico purificado de origen vegetal (Aucouturier y cols., 2001). El uso de este tipo de vacunas frente a las acuosas generó como una de las ventajas una duración mayor de la inmunidad, que se tradujo en menor frecuencia de vacunaciones y mayor eficacia en la respuesta inmune de los vacunados (Sutmoller y cols., 2003). Algunos elaboradores también utilizan emulsiones oleosas dobles agua-en-aceite-en-agua que tienen atributos similares a las anteriores (Cox y Barnett, 2009).

Debido a que la producción de la vacuna debe realizarse a partir de antígeno concentrado que es inactivado, se debe considerar que, en la actualidad para la producción de antígeno, se requiere de zonas biocontenidas equivalentes a un nivel de bioseguridad 4 para la OIE (BSL4 OIE).

Otra condición esencial para la eficacia de las vacunas, es la integridad de las partículas virales 140S (OIE, 2012).

Las vacunas inactivadas convencionales presentan algunas desventajas, entre las cuales la necesidad de manipulación de virus infeccioso es una de las más notorias, por lo que se ha trabajado desde hace bastante tiempo en diferentes aproximaciones para

el desarrollo de nuevas vacunas. Por ejemplo, se han realizado estudios con vacunas basadas en péptidos sintéticos (Anderer and Schlumberger, 1965; Cubillos y cols., 2008; Taboga y cols., 1997; Francis, 1990; Bittle y cols., 1982, Shieh y cols., 2001; Mulcahy y cols., 1990, Zamorano y cols., 1994), en donde se ha demostrado que puede mejorarse la respuesta inmune asociándolos a epitopes T-colaboradores (Th) promiscuos (Wang y cols., 2002), o bien diseñando péptidos de modo tal que se logre la correcta exposición de sitios antigénicos discontinuos (Villen y cols., 2002); también se ha abordado la generación de vacunas a subunidades proteicas, mediante la inoculación de proteínas inmunogénicas producidas por técnicas de ADN recombinante (Strohmaier y cols., 1982 Abelson, 1982 Broekhuijsen y cols., 1986), incluyendo proteínas de fusión con antígenos foráneos, y nuevas vacunas atenuadas (Chinsangaram y cols., 1998; Mason y cols., 1997). Otras metodologías incluyen vacunas producidas a partir de partículas virales vacías (VLPs) (Abrams y cols., 1995; Lewis y cols., 1991 Grubman y cols., 1993) Si bien se cuenta con resultados promisorios, hasta la fecha ninguna de estas metodologías se ha mostrado completamente satisfactoria.

Recientemente se han iniciado estudios para analizar el uso de vectores virales no replicativos junto con estrategias de prime-and-boost, que se muestran como una alternativa interesante de aplicación de inmunógenos recombinantes de nueva generación en la lucha contra la fiebre aftosa (D'Antuono y cols., 2010; Romanutti y cols., 2013).

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

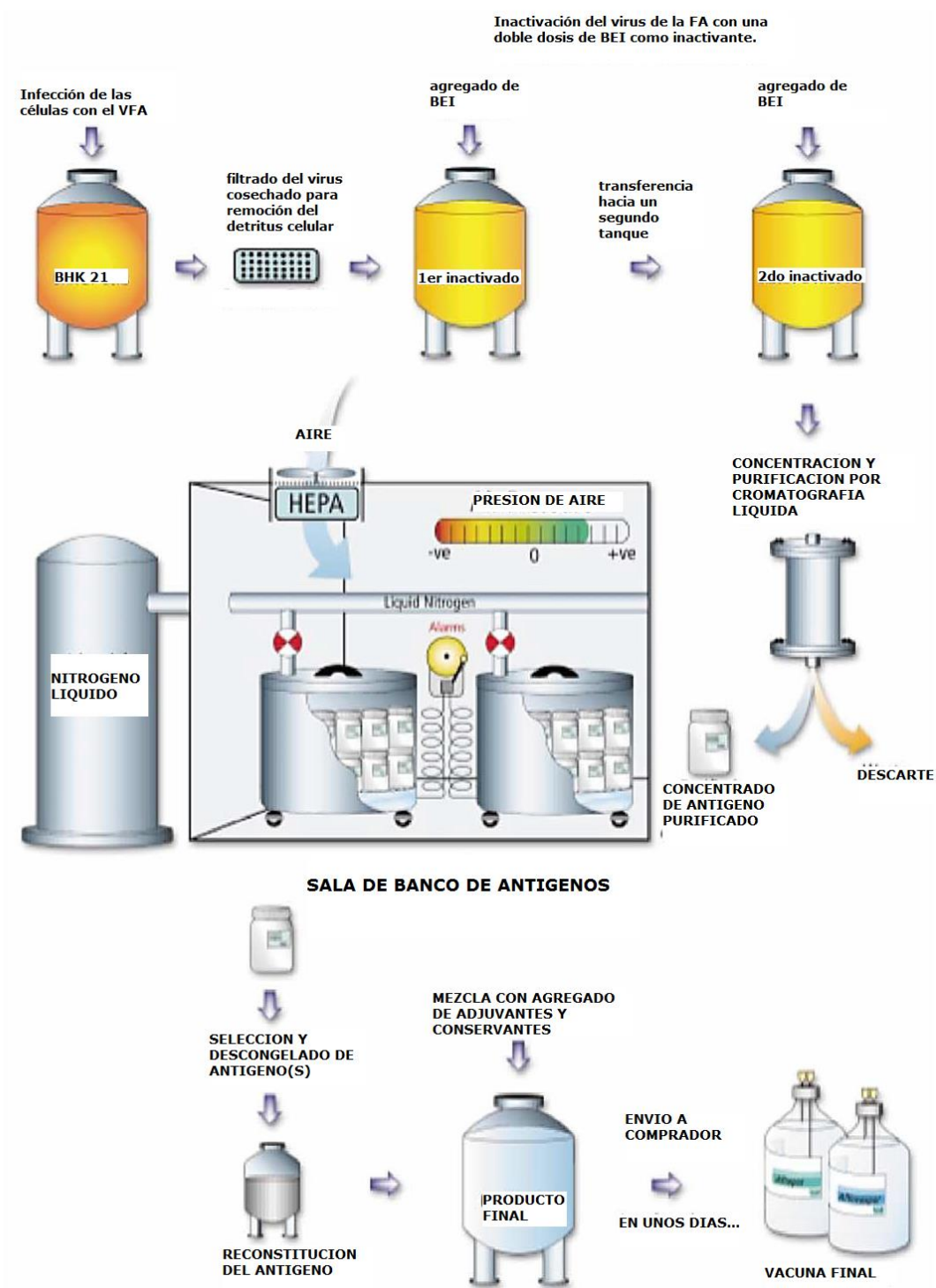


Figura 10. Esquema de producción para vacunas del VFA.

Los antígenos se crecen en tanques fermentadores de gran volumen, se inactivan con BEI y se purifican. (Adaptado de Doel., 2013)

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

La vacunación es un componente esencial de los programas de control, prevención y erradicación y también es una de las medidas a aplicar en caso de reintroducción de la enfermedad en áreas ya libres.

En Sudamérica la vacunación frente al VFA ha sido importante desde los primeros programas nacionales creados en la década de 1960 y del gran avance en los procesos de producción que tuvieron lugar a partir de ese tiempo. Las cepas virales se adaptaron al crecimiento en suspensión celular, obteniendo una producción de gran escala en fermentadores (Telling y Elsworth, 1965). Los adjuvantes se modificaron agregando al hidróxido de aluminio que era utilizado otros adjuvantes como la saponina. La inactivación tradicional con formaldehído fue reemplazada por inactivantes de primer orden como el BEI (Bahnemann y cols., 1975) lo que brindó mayor seguridad a la vacuna, evitando previos brotes de la enfermedad ocurridos debido a posibles inactivaciones incompletas de las vacunas aplicadas (Beck y Strohmaier, 1987) o a escapes de los laboratorios productores en situaciones donde los requisitos de bioseguridad no eran cubiertos en el pasado. Posteriormente, en la década del 70 se desarrollaron métodos para concentrar y purificar los antígenos inactivados incluyendo la precipitación con polietilenglicol y la ultrafiltración (Morrow y cols., 1974).

En la década de los 90, se obtuvieron avances en relación al aseguramiento y control de calidad de la vacuna. También se implementaron requerimientos de Bioseguridad y Biocustodia lo que llevo a grandes inversiones en infraestructura en los laboratorios tanto productores como los de control y capacitación del personal (Smitsaart y Bergmann, 2016).

En los últimos tiempos un concepto incorporado es el conocido como de las "3 R": Reducción, Reemplazo y Refinamiento. En pos de este objetivo los servicios veterinarios buscan reemplazar los métodos de control de vacuna "in vivo" por aquellos "in vitro". para el caso del VFA estudios se han realizado para intentar reemplazar las pruebas "in vivo" mediante pruebas "in vitro", a partir del establecimiento de correlaciones de ambos enfoques.

Si bien la vacuna fue amplia y exitosamente utilizada para el control de la enfermedad en áreas endémicas, la conveniencia de su aplicación durante emergencias generó opiniones controvertidas. Las mismas se respaldaban en el hecho que la vacunación protege contra la infección clínica, pero no impide el establecimiento del estado de

persistencia asintomática, y consecuentemente que la vacunación podría esconder circulación viral. Estas dudas dieron lugar a grandes sacrificios sanitarios y pérdidas económicas considerables, como ocurrido en los brotes de Reino Unido durante 2001 (Thompson y cols., 2002), generando una fuerte oposición al sacrificio en masa logrando el entendimiento de la vacuna como un elemento trascendental.

En la última década se observó una transformación en cuanto a la aceptación de los beneficios de la vacunación como una alternativa a la política de sacrificio sanitario, particularmente luego de la recurrencia de la enfermedad en áreas libres (Bergmann y cols., 2005). Esta aceptación creciente conocida como “vacunación para la vida” ha sido en parte debida al advenimiento en la década del 90 de pruebas de diagnóstico que permiten detectar infección inclusive en animales vacunados. Estas pruebas detectan anticuerpos contra proteínas no capsidales del virus (PNC), las cuales son inducidas durante la replicación viral, pero no en los animales vacunados (Neietzert y cols., 1991- Brocchi y cols., 2006). La amplia experiencia obtenida en América del Sur a partir de los muestreos serológicos de actividad viral en animales vacunados, permitió quebrar el mito de que la vacunación no era efectiva y enmascaraba portadores asintomáticos, lo que respaldó la aceptación por la OIE del status de áreas libres con vacunación, impulsando por un lado el uso de la vacunación como alternativa al sacrificio sanitario luego de focos (Código Sanitario para Animales Terrestres, OIE) y por otro lado a mantener la vacunación preventiva en áreas libres pero con riesgo de introducciones.

Cabe mencionar que un plan de erradicación, no solo debe incluir campañas de vacunación sino también, los animales vacunados deben estar controlados por los entes u organismos oficiales operando con capacidad técnica y edilicia para diagnosticar y para controlar la vacuna, contando con el acuerdo de los productores de animales (Smitsaart y Bergmann, 2016).

En relación a los antígenos vacunales, se mencionó anteriormente que no existe protección cruzada entre los diferentes serotipos del VFA e inclusive en algunos casos tampoco entre variantes del mismo serotipo. Consecuentemente, la identificación de las diferentes cepas que se usarán en la formulación de la vacuna es de importancia para controlar la enfermedad (Mattion y cols., 2004).

En el proceso de selección de una potencial cepa vacunal se debe investigar preliminarmente: el rendimiento de la cepa para una producción, cantidad óptima de

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

dosis infecciosas por cantidad de células, estabilidad de la cepa, tiempo de inactivación a diferentes temperaturas de incubación, entre otros. Para ello, se realizan ensayos previos infectando cultivos celulares en multicapa a multiplicidades de infección diferentes para estudiar el rendimiento de producción viral. Finalmente, al conocer la multiplicidad óptima de infección se realizan ensayos a pequeña escala. Cada cepa vacunal tiene una determinada cinética de inactivación que influye en el tiempo óptimo de concentración viral durante su multiplicación, es por esto que las cepas que forman parte del banco de antígenos deben ser estudiadas y caracterizadas previamente.

En América del Sur las vacunas contienen los serotipos O y A y algunos países incluyen el serotipo C, utilizándose las cepas O1/Campos, A/24 Cruzeiro y C/3 Indaial. Además, Argentina incorpora la cepa A/Argentina/2001.

En general estas cepas han sido capaces de brindar una cobertura inmunológica satisfactoria cuando se aplican programas de vacunación sistemática. Sin embargo, cambios en la antigenicidad e inmunogenicidad que pueden ocurrir, particularmente en áreas endémicas, resultan de gran importancia para los programas de control dado que el nivel de protección de una población vacunada depende no solo de la potencia de la vacuna y de los esquemas de revacunación aplicados, sino también de la protección cruzada entre la cepa vacunal y la cepa de campo. Consecuentemente el conocimiento de las cepas que prevalecen en el campo, su distribución y evolución genética y antigénica, y particularmente la evaluación de la eficacia de la cepa de la vacuna en uso para controlar la enfermedad es de gran importancia.

En algunos casos la selección, reemplazo o inclusión de una cepa de vacuna apropiada es necesaria para la aplicación exitosa de los programas de vacunación en regiones afectadas, así como para el establecimiento y mantenimiento de bancos de antígeno para ser usados en el caso de nuevas incursiones de FA. Para el caso del serotipo O, los eventos ocurridos a nivel mundial, en su mayoría han podido ser cubiertos, con cepas inactivadas conformando vacunas, que provienen generalmente de dos grandes grupos. Uno representado por la cepa vacunal O1/Campos ampliamente utilizada en América del Sur y las cepas de origen europeo tales como O1 BFS 1860, O1 Kaufbeuren y otras, que son genéticamente casi idénticas a la cepa sudamericana, que se han usado en el control en aquel continente y el otro grupo representado por la cepa vacunal O/Manisa que es actualmente utilizada en el continente asiático, el medio oriente y África. Esto resalta la

importancia de utilizar cepas que no solo se puedan escalar a nivel productivo, sino que posean un gran espectro antigénico y que conformen, sobre todo, vacunas de buena calidad.

5.7. Diagnóstico

5.7.1. Detección y caracterización viral

La FA es una enfermedad cuya declaración es obligatoria ante la OIE. Inicialmente, el diagnóstico se basa en el reconocimiento de los signos clínicos típicos de la enfermedad aguda. Sin embargo, dichos signos clínicos pueden ser confundidos con los que producen otras enfermedades vesiculares, por ejemplo, estomatitis vesicular, la enfermedad vesicular del cerdo, el exantema porcino, la diarrea viral bovina. Asimismo, existen manifestaciones subclínicas o inaparentes en algunos hospedadores. Es por estas razones, que la confirmación del diagnóstico de VFA en el laboratorio es esencial.

El diagnóstico actualmente se basa en el aislamiento mediante pasajes seriados en cultivos celulares del virus obtenido a partir del fluido de las vesículas que es la muestra ideal para coleccionar, o en su defecto, tejido epitelial asociado a las lesiones. También pueden utilizarse sangre, suero, leche, hisopados y líquido esofágico (éste último para caso de sospechas en donde no se observan signos y síntomas evidentes) y su posterior identificación.

Para propagar el virus y así obtener material necesario para futuras caracterizaciones, se utilizan líneas celulares o cultivos primarios de alta sensibilidad. Las células más utilizadas incluyen las BTy (cultivo primario de tiroides bovina) (Snowdon 1966) y células de riñón porcino como las IBRS-2 (DeCastro 1964) y la línea celular de riñón de hámster BHK-21 clon 13. Más recientemente se ha generado otro tipo de células que expresen en forma estable las dos subunidades de la $\alpha\beta 6$ (receptor viral), como las LFBK- $\alpha\beta 6$ de células de riñón bovino (LaRocco y cols., 2013). Estas células han probado ser hasta ahora las más sensibles para replicar el virus, siguiéndoles en su sensibilidad los cultivos primarios (LaRocco y cols., 2013). En Argentina, el aislamiento y amplificación viral se realiza en las instalaciones de Bioseguridad Nivel 4 OIE pertenecientes a la Dirección de

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

Laboratorios del Servicio Nacional de Sanidad Animal y Calidad Agroalimentaria (Dilab-SENASA).

En caso de observarse efecto citopático, la presencia de VFA debe ser confirmada y se debe establecer el serotipo involucrado.

La confirmación de VFA se basa en su identificación a partir de la detección de antígenos virales mediante Fijación de Complemento, Virusneutralización, ELISA o del ácido nucleico viral mediante RT-PCR o RT-PCR en tiempo Real (Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, OIE 2012; AlonsoA., 1986). El ELISA es la técnica más ampliamente difundida y utilizada.

Cabe mencionar que actualmente también es aceptado como identificación de VFA, la detección de anticuerpos contra proteínas no capsidales (PNC), las cuales solo intervienen en la replicación, siempre y cuando estos anticuerpos hayan sido detectados en animales con manifestación de signos clínicos compatibles con la enfermedad, y estén epidemiológicamente relacionados con una sospecha o un brote confirmado de fiebre aftosa (OIE, 2012).

Una vez que se ha confirmado la presencia de VFA, se lleva a cabo una caracterización más profunda tanto antigénica mediante perfiles de reactividad por ELISA utilizando AcMs, como genética mediante el análisis filogenético de la secuencia de nucleótidos que codifican para la proteína VP1, Este último es importante para apoyar en los estudios del origen del virus causante del foco. En los casos en que se utiliza la vacunación como medida de control, se debe realizar un análisis de la protección heteróloga (vaccine matching) de la cepa actuante por las vacunas en uso. Para ello pueden realizarse pruebas "in vitro", como relaciones de parentesco en base a títulos de anticuerpos evaluados mediante la prueba de ELISA o títulos neutralizantes establecidos mediante virus neutralización. Además, se pueden realizar pruebas "in vivo" como la protección al desafío con la cepa circulante de animales vacunados.

5.7. Vaccine Matching: Estudios de grado de parentesco antigénico y protección por las cepas vacunales a las cepas de campo

La diversidad tanto genética como antigénica del virus genera debates a la hora de la selección y eficacia de las vacunas inactivadas que contienen cepas específicas (Mattion y cols., 2004). Ya se describió que no hay protección cruzada entre los diferentes serotipos del VFA e incluso dentro del mismo tipo puede haber nuevas variantes que no sean protegidas por otra de su mismo serotipo. Este hecho puede truncar la capacidad de las vacunas de proteger efectivamente cepas heterólogas del mismo serotipo en caso de nuevas incursiones. Este tipo de situación puede originarse en escenarios endémicos, con inmunidad deficiente, sea por baja cobertura de vacunación o por la deficiente eficacia de la vacuna por falta de protección cruzada de la cepa vacunal con la cepa de campo (Brooksby, 1982; Cartwright y cols., 1982; Mattion y cols., 2004; Nagendrakumar y cols., 2011; Upadhyaya y cols., 2014).

La importancia de tener cepas apropiadas que compongan la vacuna se ilustra en el ejemplo en Argentina durante los brotes del serotipo C en 1984 y 1985, donde la incorporación de la cepa C85 en la vacuna redujo significativamente el número de brotes (Bergmann y cols., 1988). Más recientemente, en la región podemos enunciar el caso durante las emergencias ocurridas en 2000-2001 con el serotipo A donde se incluyó el antígeno A Argentina 2001 y se obtuvo un rápido control de los brotes (Mattion y cols., 2004).

En este contexto uno de los principales desafíos para la aplicación efectiva de una vacuna bajo el concepto de "Vacunación para la vida" es establecer cuándo desarrollar una nueva cepa vacunal. En este punto una cepa que sea de mayor espectro de cobertura podría ser apropiada para planes de vacunación sistemática, mientras que para un uso en caso de emergencia una cepa vacunal emparentada lo más cercanamente posible a la heteróloga podría ser más adecuada, aunque por lo general esta eventualidad no es fácil de darse. En este sentido, un antígeno de un banco que sea formulado en una vacuna de calidad puede utilizarse no solo para cubrir una vacunación sistemática sino para casos de emergencia ante una incursión. Este concepto está en línea con estudios anteriores como por ejemplo el caso del control mediante vacunación con la cepa O1/Campos para ayudar en el control de la epidemia devastadora que se produjo en cerdos con la cepa O/Taiwan/1997 (Chen y cols., 1999; Yang y cols., 1999). La decisión

de incorporar o remplazar un antígeno vacunal diferente en la vacuna, es compleja, ya que no solo depende de la protección cruzada, sino que también depende de la calidad/potencia de la vacuna (Smitsaart y Bergmann, 2016).

Los resultados de los tests de *vaccine matching* son de gran relevancia, siempre que sean llevados a cabo considerando las cepas actuantes en el campo, incluyendo la heterogeneidad genética y antigénica. Consecuentemente es recomendable coleccionar y caracterizar aislamientos de campo de diferentes episodios, regiones y tiempos. Generalmente, se realiza un primer grupo de ensayos para determinar la relación genética entre las cepas de campo y las cepas vacunales disponibles a través del gen que codifica para VP1 o el precursor proteico P1 y su parentesco antigénico por perfil de anticuerpos monoclonales (AcMs). La caracterización genética y el establecimiento de perfiles antigénicos pueden indicar que un aislamiento es similar con otro para el cual ya se conoce la protección que confiere la vacuna, y así evitar estudios subsiguientes para establecer relaciones entre las cepas de campo y las de vacuna. Asimismo, estas caracterizaciones pueden apuntar a la emergencia de nuevas cepas para las cuales se requieren estudios más precisos de parentesco.

Como se describió anteriormente, aunque los estudios genéticos son relevantes para detectar diferencias en los virus de campo con respecto a las cepas vacunales, no es posible al presente predecir el impacto de cambios aminoacídicos en la antigenicidad. Cuando se da una situación en la que la caracterización genética y antigénica revelan que la cepa de emergencia tiene cambios potenciales en sitios inmunogénicos, otro tipo de ensayos deben realizarse para establecer la relación antigénica / inmunogénica del virus de campo con la cepa vacunal (Mattion y cols., 2004). Este tipo de ensayos se puede realizar con aislamientos de campo representativos, seleccionados, por ejemplo, de un análisis filogenético previo.

En la actualidad existen métodos "*in vitro*" que se usan para cuantificar las diferencias antigénicas entre cepas y que, potencialmente podrían ser aplicados para estimar la probable protección cruzada a partir del parentesco serológico establecido evaluando los títulos de anticuerpos de muestras de sueros de animales vacunados contra la cepa vacunal y la cepa aislada de campo (Brehm y cols., 2008; Paton y cols., 2005). El método más aceptado para establecer dichas relaciones es entonces, la virusneutralización usando sueros de animales a 21-30 días luego de vacunados a partir

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

de los cuales se confeccionan *pool*es de sueros de referencia contra cada cepa vacunal, mediante los que se obtiene un título para las cepas aisladas que al realizar un cálculo matemático, se obtiene una relación indirecta conocida como valor r_1 que indica si ese aislamiento está cercanamente relacionado o no a la cepa vacunal utilizada. La relación de parentesco entre el aislado de campo y la cepa de vacuna se expresa como valor " r_1 ":
 $r_1 = \text{antilog}_{10} (\text{Título de anticuerpos del pool de sueros frente al antígeno heterólogo} - \text{Título de anticuerpos del pool de sueros frente al antígeno homólogo (cepa vacunal)})$.
Igualmente, es posible calcular la expectativa de protección que relaciona el título serológico y la probabilidad de protección, establecida a partir de tablas de correlación asociando títulos de anticuerpo con protección contra la cepa homóloga de vacuna.

Como alternativa a la neutralización, el alcance de una prueba de ELISA para evaluar el parentesco entre las cepas de campo y las vacunales y para predecir la protección cruzada es aún un tema a estudiar. Una gran ventaja de la prueba de ELISA comparada con la virusneutralización es que no requiere utilizar virus vivo, es rápida, repetible y reproducible y no depende de la disponibilidad de cultivos celulares. Si bien, en líneas generales se considera que los anticuerpos neutralizantes establecidos por el método de virus neutralización, se correlacionan mejor con la protección, los anticuerpos no neutralizantes pueden ser protectivos también en forma inespecífica (Dunn y cols., 1998) y otros factores de la respuesta inmune pueden tener impacto en la protección (Cox y cols., 2003). En este contexto, para el serotipo A, se ha descrito que el método de ELISA de fase líquido es más exacto y reproducible para predecir protección que la virus neutralización, además de no estar afectado por la variabilidad que implica el cultivo celular (Tekleghiorghis y cols., 2014).

Al presente el método más confiable para evaluar protección es el desafío "*in vivo*". La OIE describe dos métodos, la PD50 que usa grupos de por lo menos 5 bovinos inoculados con diferentes dosis de vacuna (Goris y cols., 2007) y la PGP (prueba de generalización podal) que es el método más utilizado en América del Sur y ha probado ser más preciso en comparación con el método anterior (Vianna Filho y cols., 1993, Goris y cols., 2008). El mismo consiste en vacunar la especie blanco y luego desafiar por exposición al aislado viral contra el cual se requiere que la vacuna proteja. Sin embargo, ambos enfoques requieren el uso de virus vivo y consecuentemente instalaciones apropiadas de bioseguridad. Además, estos procedimientos son lentos y caros y requieren expertos. Igualmente, en lo posible y por materia de bienestar animal, el uso

de animales para estos estudios debe evitarse cuando son posibles alternativas "*in vitro*", como las descritas anteriormente.

5.8. Selección de cepas vacunales

Como se ha mencionado anteriormente, la selección de cepas vacunales apropiadas es sumamente importante. Para la selección de cepas para ser incorporadas a los bancos de antígenos/vacunas se debe considerar amplio espectro de cobertura, buena estabilidad del antígenos buena adaptabilidad a la replicación en cultivo celular y producción a gran escala, entre otros. Es por esto que los estudios de "aptitud de las cepas de campo como antígenos vacunales" son indispensables. En nuestro país, la producción de vacunas se realiza a partir de cepas vacunales cuyas semillas maestras son caracterizadas y distribuidas a los laboratorios privados por el SENASA con control a nivel nacional. En otras regiones la armonización y composición de la vacuna puede ser en cambio variable, ya que, en algunos casos, hay falta de información porque las cepas vacunales están bajo el dominio de los entes productores de vacunas de origen privado que recelan la disponibilidad principalmente por eventuales conflictos de interés. La decisión de hacer modificaciones en la composición de las vacunas tiene un perfil multifacético en donde las actividades implicadas son multidisciplinarias, incluyendo diferentes campos de la ciencia como veterinarios de campo, epidemiólogos, economistas, virólogos, y otros.

Los epidemiólogos, por un lado, deben estar al tanto de cualquier circulación o presencia viral que se los proveerá un sistema de vigilancia epidemiológica efectivo y deben conocer si la vacuna se está aplicando de forma correcta. Los veterinarios de campo deben investigar los brotes y recolectar muestras apropiadas. Los laboratorios, deben determinar las características de la variante implicada en el estudio y realizar un algoritmo diagnóstico que les permita inferir si la vacuna va a proteger o no a la cepa de campo. Los productores de vacuna deberán entonces producir y proveer la vacuna y de ser necesario tener disponibilidad de la cepa vacuna, así como el correspondiente panel de sueros con el objetivo de poder realizar ensayos que permitan determinar y evaluar la protección heteróloga. Para lograr esto deberán llevar a cabo diferentes estudios que permitan determinar la capacidad de la cepa para crecer en suspensión celular con un

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

adecuado rendimiento viral, la estabilidad del virus antes y después de la inactivación, la inmunogenicidad y la protección que induzca el antígeno una vez formulado dentro de la vacuna, qué condiciones de inactivación soporta el antígeno en cuanto a su estabilidad, entre otros. Todas estas actividades, como se puede apreciar, demandan un tiempo considerable y no siempre son fáciles de lograr (Barteling y cols., 2004; Doel, 2003), requiriendo de la cooperación entre diferentes actores y una activa intermediación de los laboratorios oficiales y de referencia que son los que definen las políticas y lineamientos en estas cuestiones.

6. Hipótesis

Teniendo en cuenta: la alta variabilidad del VFA; la situación de la Argentina de País libre con y sin vacunación reconocido por la OIE; la presencia de emergencias presentes y ocurridas en el último tiempo en regiones ya declaradas libres del Cono Sur, con el consecuente riesgo para el país, y la limitada caracterización de los mismos, especialmente antigénica y referente a la protección que confieren las vacunas en uso hacia estas cepas emergentes, se presenta la siguiente hipótesis de trabajo:

La hipótesis de trabajo es que utilizando técnicas apropiadas y realizando un algoritmo adecuado de ensayos de diagnóstico, se consiga caracterizar las últimas cepas circulantes en la región cono sur de América del Sur en los últimos años, y establecer el parentesco genético y antigénico entre ellas y en particular con la cepa vacunal, y la protección generada por la vacuna conteniendo la cepa vacunal O1/Campos, para generar un esquema de procedimientos que faciliten información en apoyo a las medidas de control y las políticas sanitarias de la región.

7. Objetivos:

Objetivos Generales:

Caracterizar las últimas cepas de campo de los brotes del serotipo O de FA ocurridos en los últimos años en las regiones libres del Cono Sur para generar información que aporte datos en apoyo a las medidas de control y las políticas sanitarias de la región

Objetivos Particulares:

Realizar la caracterización genética y el análisis filogenético de las cepas de serotipo O aisladas de los últimos brotes del Cono Sur mediante el secuenciamiento del gen que codifica para el precursor P1 completo

Realizar la caracterización antigénica de las cepas del serotipo O aisladas de los últimos brotes del Cono Sur, mediante el establecimiento de perfiles de reactividad con un panel de anticuerpos monoclonales

Establecer parentesco antigénico de las cepas aisladas de los últimos brotes del Cono Sur con respecto a la cepa vacunal O1/Campos, por medio de ensayos "in vitro": ELISA y Virus neutralización; estimar el nivel de protección esperado

Realizar estudios de protección heteróloga "in vivo" mediante Pruebas de Generalización Podal

Correlacionar los resultados obtenidos de las pruebas de protección heteróloga "in vitro" e "in vivo".

Evaluar las características biológicas de las cepas serotipo O características de los brotes del Cono Sur, como posibles candidatos para inclusión en bancos de antígenos

8. Materiales y Métodos

8.1. Selección y Producción de Stock de Cepas Virales:

Las muestras virales utilizadas se detallan a continuación:

O/Corrientes/Arg/06

O/SanPedro/Par/11

O/Misiones/Arg/00

O/Corrientes/Arg/00

O1/Campos (Cepa vacunal)

La muestra de epitelio O/SanPedro/Par/11, colectada a partir del último brote en el Cono Sur, ocurrido en Paraguay, fue suministrada por personal del Servicio Nacional de Calidad y Salud Animal (SENACSA, Paraguay). El resto de las muestras pertenecen al cepario del laboratorio NBS (Nivel de Bioseguridad) 4 OIE, de SENASA. Para el caso de las muestras O/Misiones/Arg/00, O/Corrientes/Arg/00 y O/Corrientes/Arg/06 se utilizaron las muestras de epitelio aisladas de campo. Para los ensayos con el virus O1/Campos se realizó un stock a partir de un primer pasaje viral perteneciente a dicho cepario.

Las muestras de campo, transportadas en medio Valleé, se procesaron en Cabina de Seguridad Biológica tipo II, en el laboratorio de bioseguridad nivel 4 OIE, del SENASA. Se separó aproximadamente 1g del material y se trituró en mortero estéril, con agregado de medio EAGLE hasta alcanzar una dilución 1:5 (peso/volumen). En casos de materiales muy duros, para facilitar el triturado se agregó arena estéril. El resto de la muestra se almacenó en medio Valleé a -20 ± 5 °C.

Con el material procesado se realizó un ciclo de congelado/descongelado (60 minutos a -80 °C) para disrupción del material celular. Se centrifugó a 2.500 rpm a temperatura

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

de 6 ± 2 °C durante 15 minutos, clarificando la suspensión viral del debris celular. El sobrenadante se fraccionó y se congeló a -80 ± 5 °C en crioviales de 3,6 ml.

Para la amplificación viral y preparación de los stocks virales, se utilizó la línea celular BHK-21 (baby hámster kidney) clon 13, que proviene de riñón de hámster (*Mesocricetus auratus*) recién nacido (1 día de edad), catálogo de la American Type Culture Collection (ATCC), N°CCL-10 (ATCC, 2017). Estas células han sido certificadas por la Asociación Banco Argentino de Células (ABAC), como libres de micoplasmas y virus adventicios. Se trabajó con N° de pasajes celulares entre 87 y 88. Las células fueron crecidas en medio MEM - D (Medio mínimo esencial modificado por Dulbecco) adicionadas con 10% de suero fetal bovino, mantenidas a 37 °C en estufa con 5% de CO₂.

La amplificación del virus se llevó a cabo infectando con 1 ml de suspensión viral, monocapas confluentes (80%-100%) de células BHK-21 crecidas en recipientes plásticos de 75 cm² por no más de 48hs. Luego de 1 hora de adsorción en estufa a 37 °C y 5% CO₂, se lavó el inoculo y se añadió medio MEM - D sin adición de suero fetal bovino y se continuó la infección en las mismas condiciones. Se controló diariamente para observación al microscopio óptico, hasta las 48 horas post-infección. Las células infectadas por el VFA exhiben alteraciones morfológicas comúnmente denominadas efecto citopático (ECP) que consisten en redondeamiento celular con alteración y redistribución de las membranas internas celulares. Si el virus tiene una buena adaptación al cultivo celular, producirá la total destrucción de las células con desprendimiento de la monocapa celular. El número de pasajes necesarios para la amplificación viral depende de la concentración viral en la muestra original y realizando siempre el menor número de pasajes suficientes para lograr un desprendimiento total de la monocapa celular ECP completo en 24 horas post-infección, que en general se obtiene luego de 2-3 pasajes a partir del material original de campo.

Todos los pasajes que fueron presentando ECP del 100% de la monocapa celular se procesaron para su fraccionamiento, conservación y stock en el cepario y siguiente pasaje en cultivo celular. Para ello, los frascos de cultivo con las monocapas totalmente desprendidas se sometieron a un ciclo de congelado/descongelado (30 minutos a -80 °C) para disrupción del material celular. La suspensión obtenida se centrifugó a 2.500 rpm a temperatura de 6 ± 2 °C durante 15 minutos, clarificando la suspensión viral de *debris* celular. El sobrenadante se fraccionó en crioviales de 1 ml con su rótulo

correspondiente incluyendo los siguientes datos: tipo viral/nombre/país de origen/año de aislamiento, pasaje en cultivo celular, fecha de ampollado. Ej. O/Misiones/Arg/00 II BHK FA 14/2/2012). Los crioviales se congelaron a -80 ± 5 °C en cajas correctamente identificadas en forma individual por stock, dentro de un ultrafreezer.

Cada stock viral se tituló en células BHK-21 clon 13. Un título mínimo de $10^{6.0}$ DICT50%/ml (Dosis infectantes en cultivo de tejidos 50% por mililitro) fue considerado para obtener un stock viral útil para llevar a cabo las pruebas realizadas. En caso de detectar títulos menores, nuevos pasajes virales fueron realizados.

8.2. Caracterización Genética

8.2.1. Extracción de ARN y amplificación de la región que codifica para la proteína VP1 y para el precursor proteico P1

Los procedimientos para la extracción del ARN total utilizados son los publicados por Malirat y cols., 2007. Brevemente, 150 μ l del material obtenido de los macerados de epitelio referidos en la sección 8.1., fueron inactivados con Trizol® (Invitrogen), para poder seguir su procesamiento en laboratorio con nivel de seguridad P2 y se realizó la extracción del ARN total, utilizando columnas de afinidad QIAmp Viral RNA kit® (QIAGEN), siguiendo el protocolo del fabricante.

La transcripción reversa se realizó a partir del ARN total utilizando 50 ng de cebadores randómicos, 200 unidades de la enzima transcriptasa reversa (Superscript III Reverse transcriptase®, Invitrogen), 20 mM de Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM de KCl, 2.5 mM de MgCl₂, 10 mM de ditioneitol y 0.6 mM de cada uno de los dNTPs en un volumen final total de 25 μ l. Se procedió a incubar a 42 °C por 60 minutos, y luego 70 °C, durante 15 minutos. Los cebadores empleados para amplificar la región que codifica para la proteína VP1 (Malirat y cols., 2007), y para el precursor P1 se detallan en la Tabla 1. Los tamaños de los productos de la amplificación esperados fueron de 790 y 2414 pares de bases,

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

cuando se usaron los cebadores "1C-564F" y "primer d" y "VFA-O-1544F" y "VFA-O-3192R" para VP1 y P1, respectivamente.

Para la reacción de amplificación se utilizó el protocolo que se describe a continuación: se prepararon mezclas de 50 µl conformados por: 5 µl de cADN, 0,5 µM de cada cebador, 2.5 unidades de Platinum Taq DNA Polymerase® (Invitrogen), 0,2 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) y 1,5 mM MgCl₂ en 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems). Para la región que codifica para la VP1 las condiciones de amplificación fueron; una incubación por 5 minutos a 94 °C, seguida de 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 60 °C por 45 segundos y 72 °C por 2 minutos, cada ciclo y una extensión final a 72°C por 5 minutos. La amplificación de la región que codifica para el precursor P1 se llevó a cabo mediante una incubación durante 5 minutos a 94 °C, seguida de 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 58 °C por 45 segundos y 72 °C por 3 minutos cada uno; y finalmente 5 minutos para la extensión a 72°C.

Tabla 1. Cebadores utilizados para RT-PCR y secuenciación de los VFA tipo O.
† Posición nucleotídica para el genoma de O1/Campos (Genbank acceso no. AJ320488).

Identificación	Secuencia del Cebador (5' → 3')	Sentido	Gen	Posición †	Uso	Blanco
VFA-O-1544F	TTCGCGTGTGTACCTCC	Directo	1B	1532-1539	PCR/ Secuenciado	P1
1C-564F	AATTACACATGGCAAGGCCGACGG	Directo	1C	3157-3180	PCR/ Secuenciado	VP1
VFA-O-3192R	CCGTCGGCCTTGCCATGTGTAATT	Reverso	1D	3157-3180	Secuenciado	P1
Primer d	GAAGGGCCCAGGGTTGGACTC	Reverso	2A/2B	3926-3946	PCR/ Secuenciado	P1 y VP1

8.2.2. Secuenciamiento

Las bandas correspondientes a los productos de la amplificación se escindieron de geles de agarosa al 1% y se purificaron utilizando columnas de afinidad (QIAEX II Gel Extraction kit®, QIAGEN o alternativamente Wizard SV Gel and PCR Clean-up System, Promega) y el material recuperado se cuantificó mediante espectrofotometría a 260 nm utilizando un Nanodrop® o por comparación de intensidad de bandas con el marcador de masa y peso molecular "molecular weight marker®" (Invitrogen), mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

Las secuencias nucleotídicas se obtuvieron en reacciones separadas con cada uno de los cebadores, a partir del material purificado utilizando el kit Big Dye Terminator 3.1 Cycle Sequencing Kit® (Applied Biosystems), según el procedimiento indicado por el comerciante, en una reacción de secuenciamiento cíclico, llevada a cabo en un termociclador incubando para la amplificación de P1 a 96 °C, 1 minuto, y luego, realizando 30 ciclos de desnaturalización a 96 °C, 10 segundos; hibridación a 50 °C, 5 segundos y extensión a 60 °C, 4 minutos. Los productos de reacción obtenidos se purificaron por medio de precipitación con etanol/EDTA. Para la lectura en secuenciador automático de capilar, 3500 Genetic Analyzer® (Applied Biosystems), las muestras se resuspendieron en formamida al 10%.

Para la amplificación de VP1 se realizó una programación de 40 ciclos a 94°C durante 45 segundos, luego 50°C durante 30 segundos y finalmente 60°C durante 4 minutos, para el termociclado.

Luego de producida la reacción de secuenciamiento, los productos se purificaron y la lectura de las mismas se obtuvo en el secuenciador automático ABI Prism 3500 Genetic Analyzer.

8.2.3. Análisis filogenético de las cepas secuenciadas:

Una vez obtenidas las secuencias se editaron en forma manual en computadora personal para evitar errores de lectura en los picos del cromatograma, utilizando el programa BioEdit (versión 7.2.6.1). El alineamiento de las secuencias y su análisis filogenético se realizó utilizando el programa MEGA, versión 7.0 (Kumar S. y cols., 2016). Los tres amplicones que se obtuvieron utilizando la combinación de primers antes descripta, se solapan entre sí con lo que se aseguró que no se pierda ninguna región de la secuencia esperada.

El análisis filogenético se realizó comparando las secuencias obtenidas para la región que codifica para la proteína VP1 (Knowles y cols., 2016) Para la determinación del modelo evolutivo más apropiado al conjunto de datos disponible para el análisis filogenético, se evaluaron 24 diferentes modelos aplicando el criterio de información bayesiano (BIC) y el criterio de Akaike. Los resultados obtenidos con el programa MEGA, versión 7.0, indicaron que el modelo de Kimura de 2 parámetros, usando una distribución discreta de Gamma para ajustar la no uniformidad de las velocidades evolutivas entre los sitios analizados (K2+G), era el que mejor se ajustaba a los datos.

Utilizando este modelo, se calculó la matriz de distancias entre las distintas secuencias y se construyeron los árboles filogenéticos de máxima verosimilitud no enraizados, usando también el programa MEGA y realizando el cálculo de errores aplicando un remuestreo (iteraciones) de 1000 réplicas por el método del Bootstrap.

8.3. Caracterización antigénica

8.3.1. Fijación de Complemento 50%:

8.3.1.1. FUNDAMENTO

La técnica de Fijación de Complemento (FC) fue desarrollada en los años 1940, resultando una herramienta diagnóstica de importancia en las primeras clasificaciones de los diferentes subtipos de VFA circulando en el campo (Broosky, 1982). Permitió

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

diferenciar variantes, originalmente clasificadas como subtipos de VFA perteneciente a un mismo serotipo. La técnica se basa en la capacidad del complemento (sistema formado por una serie de proteínas plasmáticas que participan en la eliminación de agentes patógenos mediante lisis) de activarse ante estímulos como la presencia de complejos antígenos-anticuerpos. La prueba de fijación de complemento 50% (FC50%) utiliza como sistema indicador la lisis por el complemento de eritrocitos sensibilizados con hemolisina. La activación ("fijación") del complemento por el anticuerpo unido al antígeno hace que se generen complejos de ataque de membrana. Si la muestra a analizar contiene VFA, reaccionará con los anticuerpos del suero hiperinmune de cobayo específico, induciendo la activación del complemento que se consumirá en el proceso. Al agregar luego, el sistema revelador, consistente en el inmunocomplejo glóbulos rojos de carnero-hemolisina de conejo (anticuerpos anti glóbulos rojos de carnero), no se producirá hemólisis por haberse consumido el complemento en la etapa anterior. Por lo tanto, en una muestra positiva, no se producirá hemólisis, mientras que en una muestra negativa si (Figura 11).

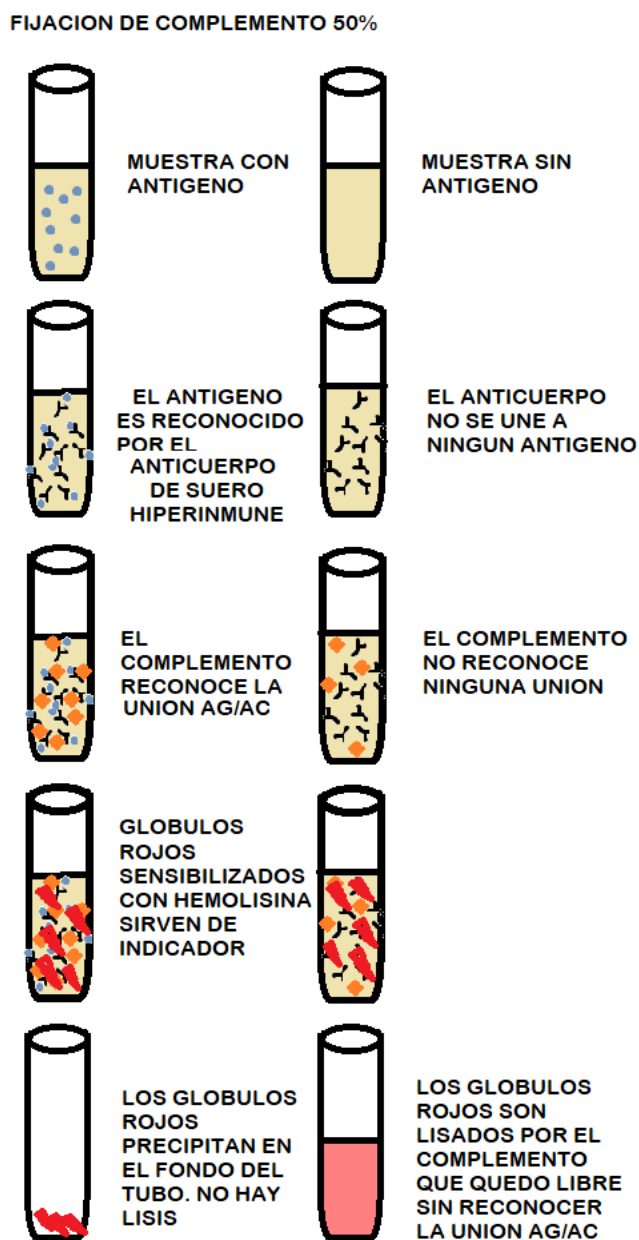


Figura 11. Representación esquemática del fundamento de la Técnica de Fijación de Complemento.

AC: Anticuerpo, AG: Antígeno.

8.3.1.2. Materiales y reactivos

i. Suero Hiperinmune de Cobayo

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

Para la producción de los sueros hiperinmunes se utilizaron cobayos (*Cavia porcellus*) con un peso aproximado de 600gr, en buen estado de salud y nutrición provenientes del bioterio de la Dirección General de Laboratorio Animal de SENASA.

Los mismos se controlaron con el fin de chequear que su estado de salud fuera bueno y luego de anestesiados vía IM 0,6 – 1 ml/kg con Ketamina en combinación con Xilacina se inocularon con el antígeno deseado.

Como antígeno se utilizó Vacuna comercial monovalente oleosa con una masa antigénica entre 15 a 20 µg/dosis para el caso de O1/Campos. En el caso del suero hiperinmune preparado para O/Corrientes/Arg/06 se amplificó y produjo el virus, el cual se inactivó y finalmente se purificó en gradientes de sacarosa obteniendo el antígeno concentrado que fue preparado en PBS (buffer salino fosfato) y adyuvante de Freund completo (SIGMA cat N° F 5881).

El suero hiperinmune para O/SanPedro/Par/11 no pudo obtenerse por cuestiones que se detallarán en los estudios realizados en la sección “aptitud de las cepas de campo como antígeno vacunal”.

El esquema de inmunización es el que se detalla en la figura 12

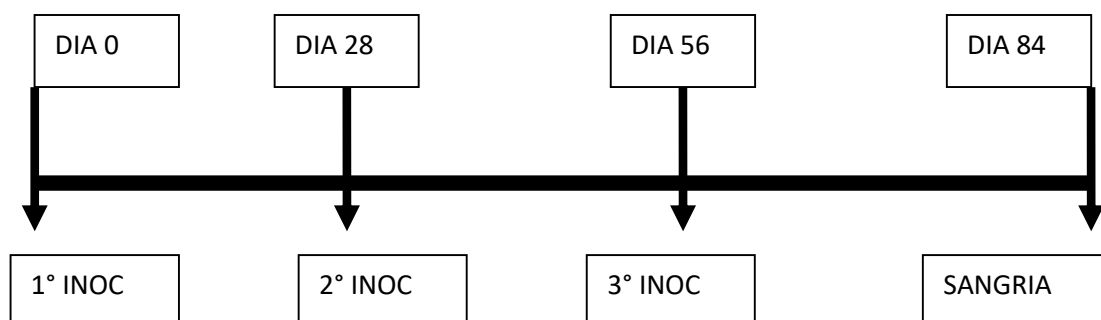


Figura 12. Esquema de inmunización de los cobayos para producción de suero hiperinmune.

Se realizaron tres inmunizaciones con un intervalo de 28 a 30 días entre cada una. La sangría final se realizó a los 28 días post vacunación de la tercera inoculación.

Los animales finalmente se sangraron con un ayuno previo de 12 horas y anestesia con Dióxido de carbono en saturación en cámara entre el 80% y 100% con 20% de oxígeno durante 20 minutos. El sangrado, a blanco, se realizó vía intracardiaca desde lateral. Una vez obtenida la sangre se la dejó coagular durante 20 minutos y se lo dejó refrigerar 60 minutos más. Finalmente, se centrifugó durante 20 minutos a 2000 rpm y se extrajo el suero el cual fue titulado, tipificado y subtipificado mediante la prueba de fijación de complemento 50%.

Nota. El suero hiperinmune polivalente O1/Campos fue provisto por el Centro Panamericano de FA (PANAFTOSA).

ii. Complemento

El complemento se lo obtuvo directamente a partir del suero de cobayos sangrados vía intracardiaca previamente anestesiados con dióxido de carbono en saturación en cámara entre el 80% y 100% con 20% de oxígeno durante 20 minutos. Una vez obtenida la sangre se la dejó coagular durante 20 minutos y se lo dejó refrigerar 60 minutos más. Finalmente, se centrifugó durante 20 minutos a 2000 rpm y se extrajo el suero

iii Sistema Hemolítico

Está constituido por glóbulos rojos de carnero y hemolisina sensibilizada contra glóbulos rojos de carnero. La hemolisina anti-glóbulos rojos de carnero, se obtuvo por inoculación de sangre de carnero en un conejo y posterior sangrado del mismo para la obtención del suero hemolítico sensibilizado (conteniendo IgG anti-glóbulos rojos de carnero).

Para lograr el sistema hemolítico, se mezclaron glóbulos rojos de carnero en solución tampón barbital o borato al 2%, al que se le agregó el suero anti-glóbulos rojos de carnero al título de uso, quedando así una suspensión final al 1%.

8.3.1.3. Procedimiento

Se colocaron 0,2ml de cada una de las muestras y controles positivos en los tubos correspondientes, incluyendo el control de muestra. El control positivo consistió en suspensiones virales de las cuales se conoce el tipo y subtipo. Luego, se colocaron 0,2ml de las diluciones de trabajo de cada uno de los sueros hiperinmunes en los tubos de las muestras correspondiente al suero que se está cargando y 0,2ml en los tubos de control de sueros. Seguidamente, se colocaron 0,2ml de complemento previamente titulado en todos los tubos salvo en el control de Sistema Hemolítico (Control SH). Finalmente, se agregaron 0,2ml de solución tamponada barbital o borato al 2% en los tubos de control de antígeno y control de suero hiperinmune, 0,4ml en el control de complemento y 0,6ml en el control sistema hemolítico. Se incubó en baño termostático a 37°C ($\pm 0,2^{\circ}\text{C}$) por 30 minutos. Transcurrido el período de incubación, se agregaron 0,40 ml del sistema hemolítico a todos los tubos, y se volvió a incubar 30 minutos a $37 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ en baño termostático. Seguidamente se clarificó en centrifuga a 3000 rpm durante 3 minutos.

A modo de resumen, los antígenos que provenían de pasajes celulares se los preparó en dilución 1:1. Para tipificar se utilizaron sueros polivalentes preparados a partir de antígenos que han estado o se encuentran presentes en la región. En la tabla 2 se observa el esquema de reactivos y cantidades utilizadas como así también los controles que se utilizan.

Todos los tubos utilizados en la prueba se leyeron en espectrofotómetro Coleman Jr. II Modelo 6/20 a 545 nm de longitud de onda. El cero del aparato se ajustó con el control de Sistema Hemolítico (S.H.), donde al no habersele colocado complemento no se produce el proceso de hemólisis. Considerando que la lectura de densidad óptica del control de la muestra con complemento y sin suero hiperinmune, corresponde al 100% de hemólisis, el % de hemólisis se calculó aplicando la siguiente fórmula:

% de hemólisis:

Una muestra con un % de hemólisis menor al 50 % se considera positiva para el tipo o subtipo viral de suero hiperinmune utilizado.

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

Siendo el valor de hemólisis inversamente proporcional al valor de FC, obtenemos el % de FC, restándole a 100 el % de hemólisis obtenido:

$$\%FC = 100 - \% \text{ Hemólisis}$$

Tabla 2. Prueba de tipificación del VFA mediante fijación de complemento 50%. Reactivos y cantidades utilizadas en mililitros y controles que se utilizan para la tipificación.

REACTIVOS	Antígeno MUESTRA	CONTROL de Antígeno	Control de Suero hiperinmune	Control de Complemento	Control de sistema hemolítico sin complemento (autocolor)
Buffer Barbitol 1x	-	0.2 ml	0.2 ml	0.4 ml	0.6 ml
Antígeno.	0.2 ml	0.2 ml	-	-	-
Suero hiperinmune	0.2 ml	-	0.2 ml	-	-
4 Unidades Hemolisantes de Complemento 50	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml	-

Una vez preparado el antígeno con el anticuerpo se incubó 30 minutos a 37 ± 0.5 °C en baño María. Se agregaron 0.40 ml de sistema correspondiente a todos los tubos, se incubó nuevamente 30 minutos a 37 ± 0.5 °C en baño María, se centrifugó a 3000 r.p.m durante 3 minutos (6 ± 2 °C) y se realizó una lectura en espectrofotómetro a 545 nm.

8.3.1.4. Interpretación

La prueba se interpreta como positiva cuando no se produce hemólisis de los glóbulos rojos por el suero hiperinmune y negativa cuando se produce la hemólisis de los mismos. En la lectura en el espectofotómetro, un antígeno se considera positivo cuando su DO es como máximo 0,10 puntos menos que la DO del control de antígeno (Con complemento).

8.3.2. Perfil Antigénico Mediante Anticuerpos Monoclonales

8.3.2.1 Fundamento

La caracterización antigénica se basa en establecer el perfil de reactividad de cada muestra estudiada frente a un panel de 21 anticuerpos monoclonales (AcMs), mediante un ensayo de ELISA de captura. Los perfiles obtenidos son comparados con el obtenido con la cepa vacunal O1/Campos. Dichos AcMs, fueron generados contra las cepas O1/Caseros, O1/Campos y O/Taiwán, y constituyen el panel de referencia para cepas del serotipo O (Seki y cols., 2009). El uso de este panel resulta de gran utilidad para detectar en forma rápida y sensible diferencias antigénicas, inclusive entre cepas genéticamente relacionadas (Maradei y cols., 2014).

El fundamento consiste en que el reconocimiento de un antígeno determinado, por un anticuerpo policlonal, es enfrentado a diferentes AcMs que se unen al reconocer epitopes determinados. La unión del AcM es revelado con un conjugado anti-ratón que produce una reacción de color la cual es detectada por un lector arrojando como resultado una Densidad Óptica (OD) determinada.

8.3.2.2 PROCEDIMIENTO

ELISA

La reactividad de las muestras de referencia y de campo con el panel de AcM se estableció mediante un ensayo de ELISA (Seki y cols., 2009), microplacas de 96 pocillos (Greiner) fueron sensibilizadas con suero policlonal hiperinmune de conejo, específico contra el VFA tipo O durante toda la noche a 4 °C, el cual actuó como anticuerpo de captura. Las diferentes muestras virales fueron adicionadas e incubadas 1 hora a 37 °C. Luego del lavado se adicionó cada AcM específico de ratón, y se incubó 1 hora a 37 °C. La reactividad del AcM con los virus capturados se estableció mediante incubación durante 1 hora a 37 °C con un suero anti ratón conjugado con peroxidasa. La reactividad enzimática se reveló con una solución substrato/cromóforo H₂O₂/ABTS (2,2-azino-bis(3-ethyl-benzothiazoline-6 ácido sulfónico, sal di amonio, Sigma, USA) dejándola actuar durante 30 minutos. Un pocillo sin antígeno viral para cada AcM fue incluido en cada ensayo, para ser utilizado como blanco. Finalmente, se leyó la placa a 415 nm en el lector de ELISA

Los 21 anticuerpos monoclonales que compusieron el panel utilizado se denominan para la cepa O1/Campos: 1H10, 1B9-3, 17, G8, 2B3, 3H10, para la cepa O1/Caseros: 3, 74, 69, 26F y para la cepa O Taiwán: 3A1, 3D1, 4B2, 1A11, 3A2, 2F8, 1B3, 2D4, 1B9, 2C9, 3G10 (Seki y cols., 2009).

8.3.2.3. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados fueron analizados mediante perfiles de reactividad y coeficientes de correlación. Para establecer el perfil de reactividad, se graficaron los valores de OD obtenidos con cada muestra y con cada AcM, luego de sustraer el valor del blanco. A partir de los gráficos se visualiza el perfil de reactividad particular para cada virus con el panel de 21 AcMs, comparando el perfil obtenido con cada una de las muestras de campo entre sí y con el perfil correspondiente a la cepa vacunal de referencia.

Los coeficientes de correlación se establecieron a partir de cálculos matemáticos que correlacionan los valores de absorbancia de ELISA para cada muestra contra otra muestra de campo o con la cepa de referencia. Para ello se utilizó el método de cuadrados

mínimos para ajustar una función lineal a los datos medidos y obtener el coeficiente de correlación (cc).

Si los perfiles antigénicos son idénticos los puntos caerán en una línea casi recta y el cc, será cercano a 1. Por el contrario, si los perfiles antigénicos son diferentes, los puntos estarán alejados y el cc se acercará a 0 (Seki y cols., 2009).

8.4. Caracterización inmunogénica:

8.4.1. Virus neutralización bidimensional y relación de parentesco (r1):

8.4.1.1. FUNDAMENTO

La neutralización viral se define como la pérdida de la capacidad infectante de un virus por la reacción del mismo con un anticuerpo respectivo.

El procedimiento básico consiste en mezclar diluciones apropiadas de suero y virus, incubarlas en ciertas condiciones e introducir la mezcla en un sistema susceptible en el que se evalúa la infectividad residual.

En este caso, se realizó una virusneutralización bidimensional, que consiste en enfrentar diferentes concentraciones de virus con diluciones seriadas de suero las cuales luego de una hora de incubación a 37°C se les agregan células en suspensión para permitir que el virus no neutralizado se adsorba e ingrese en las mismas, revelándose 72 hs más tarde evidenciando si hay ECP o no. Esto permite obtener el título neutralizante del suero (la más alta dilución (o menor cantidad de suero) que protege de la infección se denomina título virusneutralizante) para cada concentración viral, pudiéndose calcular luego por regresión lineal el título neutralizante del suero para una concentración exacta de virus, en este caso a exactamente 100 DICC 50% del virus (Rweyemamu y Hingley, 1984).

8.4.1.2. Materiales

i- Virus y títulos obtenidos,

Para las virus- neutralizaciones se utilizaron los stocks con los títulos expresados como DICT50%/ml que se detallan junto al número de pasaje utilizado, en la sección de resultados 9.2.

ii- Producción de Sueros Bovinos utilizados

Se utilizaron bovinos de raza Hereford de 18-24 meses de edad, provenientes de áreas sin vacunación. Los animales fueron vacunados y/o revacunados, por personal del departamento de control de vacunas de SENASA con vacunas mono o polivalentes, bajo diferentes esquemas de vacunación, en los tiempos y condiciones indicados para cada caso.

Sueros Monovalentes O1/Campos 30DPV: 16 animales inmunizados con vacuna O1/Campos (20 µg / dosis), sangrados 30 días post vacunación).

Sueros Tetravalentes, 79 DPV: 16 animales con vacuna tetravalente formulada con antígeno O1/Campos, A 24 cruzeiro, A Argentina 2001 y C3 indaial, sangrados a 79 días post vacunación (DPV).

Sueros Trivalentes, 79 DPRV: para cada grupo se inmunizaron 16 animales con vacuna trivalente formulada con antígeno O1/Campos, A 24 cruzeiro y C3 indaial, un grupo sangrado a 79 días post vacunación (DPV) y el otro re-vacunado a 30 DPV y sangrado a 79 días post revacunación.

El sangrado de los bovinos se realizó en vena yugular con agujas de uso veterinario de 18g por 1,5pulgadas con tubos tipo Vacutainer® de vacío, sin anticoagulante y con adaptador para sangrado de un volumen aproximado de 10 ml, obteniéndose aproximadamente un volumen final de 4 ml de suero. Los sueros fueron inactivados en

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

baño termostático por incubación a 56 °C durante 30 minutos, y alicuotados para uso (reservados a 4 °C) y almacenados a -20 °C

La vacuna monovalente utilizada fue desarrollada por Biogénesis Bagó en conjunto con SENASA para uso experimental, y la trivalente fue una vacuna de uso comercial producida en Argentina para exportación.

iii- Producción de Pooles para establecimiento de valor r1

Se constituyó un pool de sueros a partir de los sueros monovalentes O1/Campos 30 DPV. Para ello, se determinó previamente en forma individual el nivel de anticuerpos neutralizantes por VN de 16 sueros bovinos obtenidos de animales vacunados con vacunas monovalentes O1/Campos y sangrados a 30 DPV frente a la cepa homóloga. Una vez obtenido el título de los mismos, se seleccionaron cinco sueros con títulos VN medio a altos, según las recomendaciones de por OIE ("Manual de Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres: OIE World Organisation for Animal Health," 2012, Mattion y cols., 2009), se homogeneizó el preparado, se fraccionó en tubos eppendorff de 1 ml y se almacenaron a -20 °C congelados en freezer. Antes de ser utilizados, los sueros se inactivaron a 56°C por 30 minutos.

iv- Cultivos celulares:

Se utilizó una suspensión de cultivo celular BHK-21 clon 13 (ATCC, 2017) con una concentración de 3×10^5 células/ml en medio MEM-D (GIBCO) con 10 % de suero fetal bovino filtrado e irradiado, provista por el Departamento Cultivo de tejidos del INTA, Castelar.

v- Titulación de cepas virales

Para realizar un ensayo como virusneutralización se debe tener previamente titulado el stock viral. Esto es para conocer que dilución se debe hacer para obtener la cantidad de dosis infectantes deseadas a las que se va a enfrentar el suero a testear.

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

Para ello se realizan tres titulaciones en ensayos individuales y con los tres resultados se obtiene una media de título. Dicha media va a ser considerada para realizar la dilución deseada al momento de la virusneutralización.

Es importante tener en cuenta que para cada dilución viral utilizada en el ensayo de virusneutralización siempre se realiza lo que se conoce como una "*back titration*" que es una retitulación de chequeo. Esta titulación se realiza con el objetivo de corroborar que las dosis infectantes que estamos utilizando luego de la dilución viral, sean las correctas.

La titulación, mediante determinación de Dosis Infectantes en Cultivo de Tejidos 50% / ml utilizando el cálculo de Spearman – Kärber, se realiza a partir de diluciones seriadas del virus en MEM-D sin suero fetal bovino y dichas diluciones se siembran en varias repeticiones en placas de 96 pocillos. Una vez sembrado el virus (100 µl por pocillo) se agrega suspensión celular, en las condiciones descriptas en esta sección en el ítem iv (100 µl por pocillo). La lectura se realiza a las 72 horas, identificando a los pocillos con ECP como positivos, y negativos a aquellos en donde la monocapa está formada. Alternativamente pueden utilizarse monocapas preformadas, considerando que la lectura en este caso se realizará a las 48 horas.

El cálculo que se realiza es el siguiente, y se expresa como el logaritmo en base 10.

$$\text{Log negativo de la dilución más baja} - (1/n^{\circ} \text{ de repeticiones} \times n^{\circ} \text{ de protegidos} - 0,5) \times \text{Log factor de dilución}$$

8.4.1.3. Procedimiento

i. Virusneutralización bidimensional:

Para los ensayos de virus neutralización se utilizaron células sembradas en microplacas de 96 pocillos, infectadas en el momento del agregado de la suspensión, y dejando proceder la infección en medio con 5% de suero fetal bovino, incubadas en estufa a 37 °C y 5% CO₂.

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

Las virusneutralizaciones se realizaron según el ensayo descrito por (Rweyemamu, 1984; Rweyemamu y cols., 1976); y el "Manual de Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres: OIE World Organisation for Animal Health," 2012).

El ensayo consistió en una neutralización bidimensional, en la cual se determinó, como mencionado, el título de cada suero por el método de Spearman Kärber. Los sueros se enfrentaron a cada muestra viral previamente titulada, utilizando 3 dosis de virus (33, 100 y 350 dosis infectantes por pocillo) para establecer, mediante curva de regresión lineal, el título neutralizante correspondiente a 100 DICT50%.

A seguir se detallan el procedimiento para la obtención de los referidos títulos de anticuerpos en sueros:

Dilución de los sueros:

Preparación de la dilución de sueros en la Placa: se colocaron 50 µl por pocillo de diluciones en base 2 comenzando por la dilución 1/4 y finalizando en 1/128, de cada uno de los sueros (por cuádruplicado). Para cada ensayo se incluye un suero control positivo, en las mismas condiciones (Figura 13 y 14).

Preparación de la suspensión viral de trabajo:

A partir del título viral conocido se realizó la dilución necesaria para trabajar con 33, 100 y 350 dosis infectantes por pocillo. De estas suspensiones virales se inocularon 50µl/pocillo (Figura 14).

Al agregar la suspensión viral, las diluciones finales de suero fueron: 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 y 1/256.

En cada ensayo se utiliza un control de título viral (re titulación de las dosis infectantes) o lo que se conoce como "*back titration*" (ver ítem v. en esta sección), que se utiliza tanto como control sin suero, así como para eventuales correcciones de título viral en la curva de regresión y un control celular, en el que se adiciona medio de cultivo en lugar de suspensión viral según el esquema de placa (Figura 13).

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

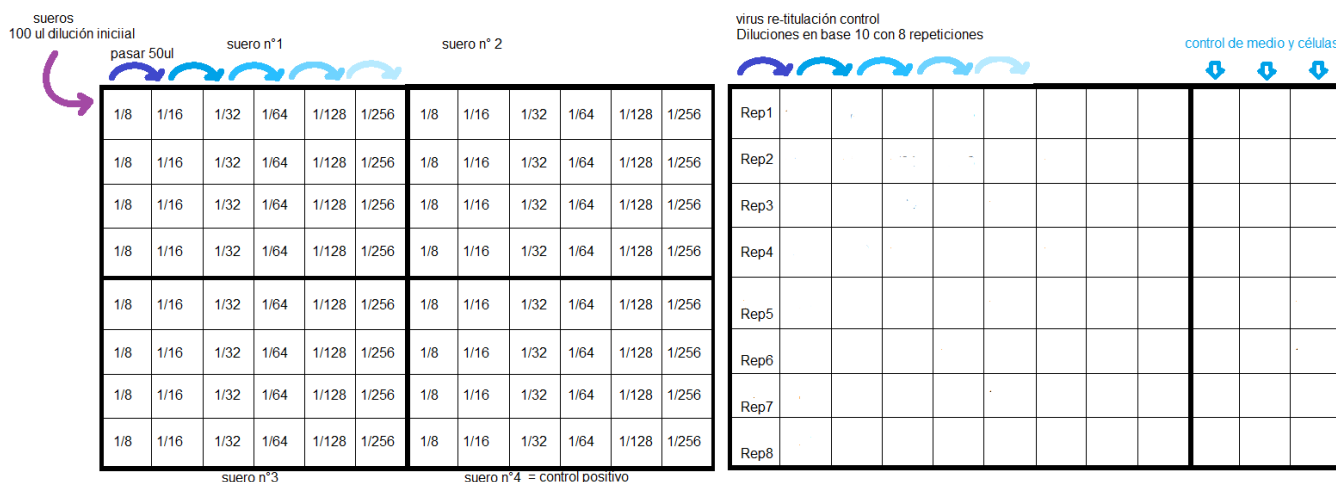


Figura 13. Esquema de las placas para determinación de título de anticuerpos neutralizantes.

Cada suero se repitió 3 veces con cada una de las tres dosis infectantes a utilizar en tres placas diferentes. El control positivo se diluye igual que el resto de los sueros. En forma separada se destina una placa a la re-titulación viral y se dejan los controles de células para corroborar que la monocapa este confluyente.

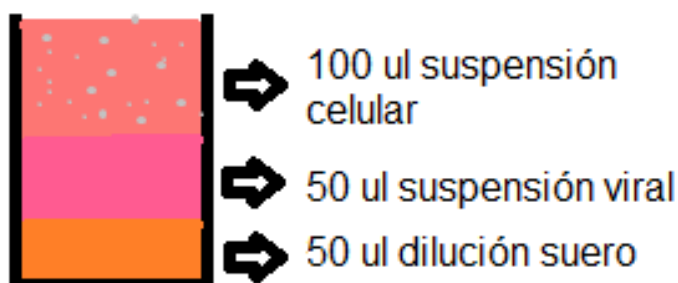


Figura 14. Corte transversal de un pocillo con todos los componentes.

Las placas conteniendo la mezcla suero-virus y la de control viral se incubaron en estufa a 37 °C con 5% de CO2 durante 1 hora. Luego se inocularon 100 µl/pocillo de la suspensión celular en todas las placas. Se continuó la incubación a 37 °C con 5% de CO2 durante 72 horas, realizando una pre-lectura a las 48 horas. La observación de ECP será considerado como un pocillo no protegido (el virus puede replicar en las células porque no fue neutralizado por los anticuerpos presentes en la muestra), mientras que la observación de monocapa intacta será considerado como un pocillo protegido (el virus

no puede replicar en las células porque fue neutralizado por los anticuerpos presentes en la muestra). El título neutralizante de cada suero se calculó a partir del recuento de los orificios protegidos (monocapa celular intacta), aplicando el método de Spearman Kärber.

8.4.1.4. Interpretación de resultados

i. Virusneutralización bidimensional:

Como resultado de la virusneutralización bidimensional obtendremos un título para cada suero testado. Los mismos pueden interpretarse como negativos o positivos según la interpretación que se da en el "Manual de Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres: OIE World Organisation for Animal Health," 2012. El mismo enuncia que en la sección 2.1.1. del capítulo de Fiebre Aftosa (2.1.8.) en el ítem ix lo siguiente;

"La interpretación de las pruebas puede variar entre laboratorios respecto al umbral de corte positivo/negativo. Los laboratorios deben establecer sus propios criterios respecto a los reactivos estándar que pueden obtenerse del laboratorio de referencia de Pirbright. En general, un título de 1/45 o más de la dilución final del suero en la mezcla del suero y el virus se considera positivo. Un título de menos de 1/16 se considera negativo. Para la certificación de animales individuales para el comercio internacional, los títulos de 1/16 a 1/32 se consideran dudosos, y se necesitan más muestras de suero para realizar más pruebas. Los resultados se consideran positivos, si la segunda muestra presenta un título de 1/16 o superior. Cuando el objetivo es la serovigilancia del rebaño como parte de un estudio serológico estadísticamente válido, puede resultar adecuado un corte de 1/45. Los títulos de corte para evaluar la protección inmunológica proporcionada por la vacunación deben establecerse a partir de la obtención de los resultados de la prueba de potencia con la vacuna y especie diana pertinentes".

ii. Relación serológica (r_1):

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

El valor r1 estima la relación de parentesco que hay entre una cepa vacunal conocida y una nueva cepa de campo. Se utiliza para comparar y determinar cuan similar es un virus a otro, por ejemplo; un aislamiento de campo en relación a una cepa vacunal utilizada. Se puede calcular a partir del título obtenido por virus neutralización. Para el cálculo del valor r1 es necesario contar con un pool de sueros, a los cuales, previamente, se les determinó individualmente el título neutralizante contra la cepa homóloga (ver ítem 8.4.1.2.iii.).

El título neutralizante se determina para el pool de sueros frente al antígeno homólogo y al heterólogo. El esquema y diseño del ensayo en este caso es diferente al descrito para la titulación viral en el ítem 8.4.1.3.i, ya que tenemos un suero solamente, que es el pool conformado, al cual se lo diluye inicialmente sembrando 100 µl en la primera fila de pocillos y luego se realizan diluciones seriadas en base dos en la placa de 96 pocillos (Figura 15) Al suero diluido se lo enfrenta a las 100 dosis infectantes +/- dos diluciones de 0.5 logaritmo de diferencia. De estas suspensiones virales se inoculan 50µl/orificio. Se deja incubar durante 1 hora a 37°C con atmosfera con 5% de CO2 y finalmente se le agregan 100 µl de suspensión celular (idéntica estructura que la figura 13).

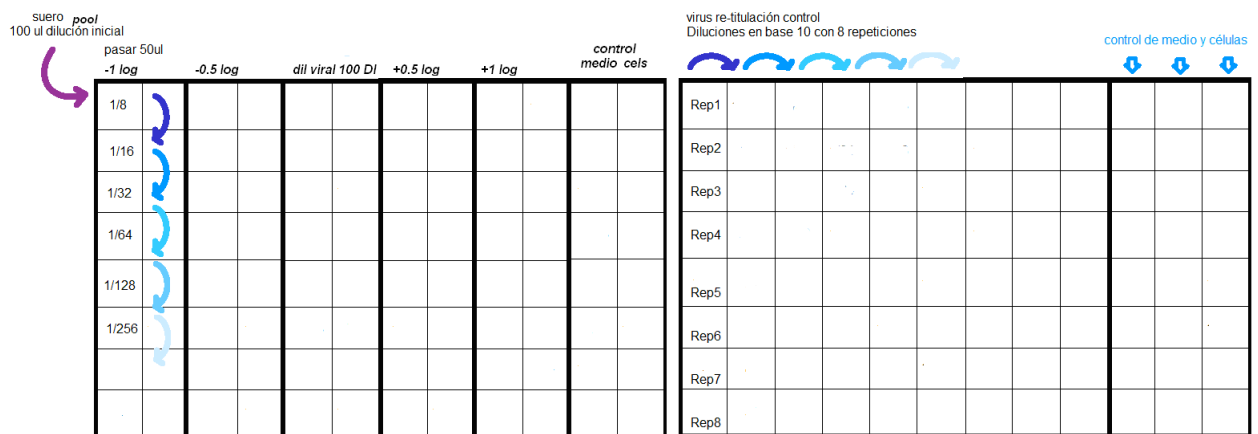


Figura 15. Esquema de las placas para determinación de concordancia vacunal valor 1.

El pool se diluye una única vez ej. DI 1:4 y en la placa se inoculan 100 µl en la primer fila. Luego se realizan diluciones en base 2 hacia la última fila inferior. El pool se enfrentará a 5 diluciones virales. Las últimas dos columnas se reservan para un control de medio y un control de células. En forma separada se destina una placa a la re-titulación viral y se dejan los controles de células para corroborar que la monocapa este confluyente.

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

A las 72 horas se realiza la lectura con el mismo criterio que para el ítem anterior determinando el título del pool del suero para cada dilución viral. Con cada punto se construirá una curva de la que se extrapolará el título correspondiente a las 100 dosis virales exactas.

La relación r_1 se calcula una vez obtenidos los títulos del pool de referencia correspondientes a las 100 dosis infectantes virales para el virus homólogo como para el/los virus heterólogo/s testado/s como:

$$r_1 = \frac{\text{antilog}_{10} (\text{Título de anticuerpos del pool de sueros frente al antígeno heterólogo})}{\text{Título de anticuerpos del pool de sueros frente al antígeno homólogo (cepa vacunal)}}$$

Valores de r_1 mayores a 0,3: indican que la cepa aislada de campo, o cepa heteróloga, es suficientemente similar a la cepa vacunal y probablemente la vacuna proteja a la cepa de campo.

Valores de r_1 menores a 0,3: sugieren que la cepa aislada o cepa heteróloga es muy diferente a la cepa vacunal por lo que probablemente la vacuna no proteja contra ella.

iii. - Expectativa porcentual de protección (EPP):

La EPP estima la probabilidad con la que un grupo de 16 bovinos vacunados sean protegidos al desafío con 10,000 dosis infectivas de virus ("Manual de Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres: OIE - World Organisation for Animal Health," 2012). Dicha probabilidad se obtiene usando como referencia tablas

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

previamente confeccionadas que correlacionan el título serológico (obtenido por Virus neutralización, en este caso) con la protección clínica (Sub-Proyecto para la Correlación de las Técnicas de Control de Potencia de las Vacunas contra Fiebre Aftosa en los países de la Cuenca del Río de la Plata, 1994).

En la Tabla 3 se puede observar la correlación entre los títulos VN obtenidos por la prueba de virus neutralización con suspensión celular y la EPP para la cepa vacunal O1/Campos. Para clasificar un animal vacunado como protegido o no protegido, basado en el conocimiento de los resultados serológicos, se utilizó el modelo logístico como una función discriminadora. Una EPP \geq al 75% indica que ese animal estará protegido contra la cepa viral homóloga. Siguiendo los datos de la tabla, para obtener una EPP \geq 75%, se debe contar con un título VN \geq a 1,65.

Tabla 3. Correlación entre el título VN (suspensión) y EPP para la cepa vacunal O1/Campos

Tabla 1: VN - Suspensión													
Título	EPP	Título	EPP	Título	EPP	Título	EPP	Título	EPP	Título	EPP	Título	EPP
0.58	7.68	1.00	24.95	1.42	58.68	1.84	85.02	2.26	95.78	2.68	98.91	3.10	99.73
0.60	8.16	1.02	26.21	1.44	60.27	1.86	85.84	2.28	96.04	2.70	98.98	3.12	99.74
0.62	8.67	1.04	28.84	1.46	61.84	1.88	86.63	2.30	96.28	2.72	99.04	3.14	99.76
0.64	9.20	1.06	30.21	1.48	63.38	1.90	87.37	2.32	96.51	2.74	99.10	3.16	99.77
0.66	9.77	1.08	31.62	1.50	64.90	1.92	88.08	2.34	96.73	2.76	99.16	3.18	99.79
0.68	10.37	1.10	33.07	1.52	66.39	1.94	88.76	2.36	96.93	2.78	99.21	3.20	99.80
0.70	11.00	1.12	34.54	1.54	67.84	1.96	89.40	2.38	97.12	2.80	99.26	3.22	99.81
0.72	11.66	1.14	36.05	1.56	69.27	1.98	90.01	2.40	97.30	2.82	99.31	3.24	99.83
0.74	12.36	1.16	37.58	1.58	70.65	2.00	90.59	2.42	97.47	2.84	99.35	3.26	99.84
0.76	13.09	1.18	39.15	1.60	72.00	2.02	91.14	2.44	97.62	2.86	99.40	3.28	99.85
0.78	13.86	1.20	40.73	1.62	73.31	2.04	91.65	2.46	97.77	2.88	99.43	3.30	99.86
0.80	14.67	1.22	42.33	1.64	74.58	2.06	92.15	2.48	97.91	2.90	99.47	3.32	99.87
0.82	15.51	1.24	43.95	1.66	75.81	2.08	92.61	2.50	97.91	2.92	99.50	3.34	99.88
0.84	16.40	1.26	45.58	1.68	77.00	2.10	93.05	2.52	98.04	2.94	99.53	3.36	99.88
0.86	17.32	1.28	47.22	1.70	78.15	2.12	93.46	2.54	98.28	2.96	99.56	3.38	99.89
0.88	18.29	1.30	48.87	1.72	79.26	2.14	93.86	2.56	98.39	2.98	99.59	3.40	99.90
0.90	19.29	1.32	50.52	1.74	80.32	2.16	94.23	2.58	98.49	3.00	99.60	3.42	99.90
0.92	20.34	1.34	52.17	1.76	81.34	2.18	94.57	2.60	98.59	3.02	99.62	3.44	99.91
0.94	21.43	1.36	53.81	1.78	82.32	2.20	94.90	2.62	98.67	3.04	99.67	3.46	99.92
0.96	22.56	1.38	55.44	1.80	83.26	2.22	95.21	2.64	98.76	3.06	99.69	3.48	99.92
0.98	23.74	1.40	57.07	1.82	84.16	2.24	95.50	2.66	98.84	3.08	99.71	3.50	99.92

Una vez obtenido los títulos neutralizantes de anticuerpos individuales como descrito en el ítem 8.4.1.3.i, se realizó el promedio de ellos y de ese promedio se extrapola el valor de EPP correspondiente a la Tabla 3.

El porcentaje resultante de la correlación correspondiente con el título de anticuerpo indica la probabilidad con la que un grupo de 16 bovinos vacunados sean protegidos al desafío con 10,000 dosis infectivas del virus testado. Por ejemplo, una EPP de 75%, nos estaría indicando que ese porcentaje de animales en el grupo estarían protegidos frente al desafío con el virus.

8.5. Prueba de Generalización podal

8.5.1. Fundamento

La prueba de generalización podal consiste en evaluar la protección clínica de animales a los 90 días luego de vacunar a un grupo de animales, los mismos se desafían mediante la inoculación con virus vivo y al cabo de 7 días pos inoculación, se los observa para evidenciar si fueron efectivamente protegidos o no clínicamente, mediante un porcentaje de protección grupal alcanzada.

Para la ejecución de esta prueba y teniendo en cuenta la preocupación en relación al bienestar animal, el número de animales involucrados para este tipo de pruebas, los costos, y los riesgos que se corren para realizar la prueba "in vivo", se debió seleccionar una sola cepa. La selección de la cepa de campo O/SanPedro/Par/11 para realizar el desafío "in vivo" se basó en los resultados obtenidos a partir de los cuales se constató que la misma era la más genética, antigénica e inmunogénicamente alejada de la cepa vacunal.

8.5.2. Procedimiento:

i. Vacunas utilizadas

Para la prueba se utilizaron vacunas que fueron elaboradas mediante propagación de cepas virales de FA en suspensiones celulares de BHK 21 clon 13. Se colectaron los

sobrenadantes, se clarificaron con cloroformo y se inactivaron con etilenamina binaria (BEI) según lo descrito por Bahnemann, 1975. Las suspensiones inactivadas se concentraron y purificaron con polietilenglicol 6000. Las vacunas se prepararon en emulsiones oleosas según lo descrito por Mattion y cols., 2004. Antes del desafío se realizó un ELLISA competitivo en fase líquida para estimar la EPP.

ii. Vacunación y Desafío de los animales

Para la PGP se llevó a cabo el procedimiento descrito por Mattion y cols., 2004 y Goris y cols., 2008. Para resumir brevemente, se vacunaron novillos de raza hereford de entre 18 y 24 meses a los que se les corroboró primero que fueran libres de anticuerpos para FA. Estos animales se compraron desde la región libre sin vacunación de FA en Patagonia. A los bovinos se los inoculó con la dosis establecida de vacunas comerciales, tetravalente, conteniendo la cepa O1/Campos. Se utilizaron dos grupos de 16 animales, uno se vacunó y desafió 79 días post vacunación. El otro grupo se revacunó a 30 días post vacunación y se desafió 79 días luego de la revacunación. Luego de la vacunación los animales fueron llevados a boxes biocontenidos bajo nivel de seguridad 4 OIE y se los dejó descansar al menos 48 horas. En este caso, se utilizaron las instalaciones localizadas en el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) en Castelar. Para el desafío se utilizó la cepa O/San Pedro/Par/11 con 10000 dosis letales en ratón lactante 50%. La misma se inoculó intradermolingual.

Como controles de la prueba se dejaron dos testigos sin vacunar los cuales enfermaron luego de la infección y mostraron lesiones podales características causadas por la enfermedad. Las lecturas del desafío se realizaron siete días luego del desafío en donde se examinó la presencia o ausencia de lesiones podales en todos los animales. Esto se realizó por volteo en brete neumático, observando todas las extremidades de los animales, así como también, el morro y los sitios de inoculación del inóculo viral en la lengua.

8.5.3. Interpretación de los Resultados

Los animales con lesiones en al menos una de las extremidades fueron clasificados como “no protegidos”. Se consideró como se indica en la Resolución SENASA 351/2006, que una vacuna es protectora cuando el 75% de los animales no presentan lesión alguna en las extremidades.

8.6. Aptitud de las cepas de campo como antígeno vacunal:

8.6.1. Determinación de rendimiento viral:

8.6.1.1. Fundamento

Con la finalidad de evaluar la aptitud de las cepas de campo como potenciales integrantes de bancos de antígenos de VFA, se realizaron pasajes virales en monocapas de células BHK-21 crecidas en rollers, a diferentes multiplicidades de infección (MOI's "Fields Virology," 2007). Para determinar el rendimiento viral. Se registraron los tiempos en los cuales se desprendió la monocapa y se detalló si fue progresivo o completo.

Una cepa candidata vacunal es aquella que registra el máximo rendimiento (expresado en título viral) cuando se infectan células a la menor MOI posible.

8.6.1.2. Procedimiento

El estudio preliminar a escala de investigación se realiza en cultivo de células BHK-21 clon 13 en suspensión en frascos tipo rollers de 2 litros de capacidad. Cuando se llega a una concentración aproximada de $10^{6.5}$ células/ml luego de su cultivo. Al observarlo al microscopio se ven las células que van creciendo unas sobre otras en forma redondeada cubriendo toda la superficie del roller. El conteo de células debe realizarse en un roller del que se tomara una alícuota y se registraran la cantidad de células en cámara cuentaglóbulos de Neubauer. Se puede hacer un recuento coloreándolas con una solución al 0.8% de trypan blue. Esta tinción es una coloración vital, atravesando las membranas celulares dañadas, con lo que permite diferenciar células muertas (azules) de vivas. Se obtiene entonces el número de células presentes por mililitro de medio. El roller de capacidad de 2 litros se mantiene con aproximadamente 200 ml de medio. Es decir que cada roller contendrá aproximadamente unos 300 millones de células.

Con este dato se calcula la MOI que en forma sintética es el número de dosis infectantes 50% por cada célula presente en el cultivo.

$$\text{MOI} / (\text{células/ml} \times \text{vol. total}) = \text{vol. inóculo virus} \times \text{título infectante virus}$$

Cada cepa viral tendrá un rendimiento diferente. Es decir que cada infección a determinadas MOI producirá un título viral diferente luego de producida la infección y que se desprendan todas las células. Como referencia la cepa de O1/Campos está bien estudiada y se sabe que MOI normalmente se utiliza que produce el mayor rendimiento.

8.6.1.3. Interpretación de los Resultados

En base a los títulos infecciosos y tiempo de infección de cada virus se establecen tres o cuatro MOI de rango amplio para definir el MOI más apropiado a usar en producción de antígenos. El mayor título viral obtenido con la menor MOI utilizada para la infección, demuestra el rendimiento de la cepa. Este valor se busca con la idea de que al momento de escalar la producción los volúmenes del inóculo con el que se busca infectar el "batch" sea el menor posible.

8.6.2. Determinación de masa antigénica:

8.6.2.1. Fundamento

La masa antigénica que produce un virus como resultado de la infección viral medida como la masa de partículas 140S/ml que se pueden determinar en el antígeno concentrado, es también un importante parámetro cuando se considera a una cepa como posible candidato vacunal. Este dato es útil para saber si el virus producido en escala industrial es suficientemente estable para resistir los procesos de producción (incluyendo la inactivación con bromoetilenamina, purificación, concentración, etc.).

8.6.2.2. Procedimiento

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

Para la determinación de la concentración de partículas 140S, se realizó una producción de suspensión viral de aproximadamente 2 litros de cada una de las cepas estudiadas. Las mismas previamente se inactivaron dos veces según el protocolo adaptado de Bahnemann, 1975. Se realizó un control de inactivación mediante cinco pasajes celulares seriados y controlando la inocuidad del último pasaje del material inactivado por fijación de complemento.

La suspensión viral inactivada se reservó refrigerada a 4°C hasta su posterior proceso. Para ello, se clarificó la suspensión con una concentración final de cloroformo al 0.5% y se centrifugó durante 20 minutos a 10.000 rpm a 4°C. Luego se concentró mediante centrifugación durante 3 horas y media en ultracentrífuga (Beckman ultracentrifuge XL-80) a 25.000 rpm.

Se descartó el sobrenadante y se re-suspendió el pellet de partículas virales obtenidas en buffer NET (Tris 50Mm, NaCl 100Mm y EDTA 2Mm).

Se prepararon gradientes de sacarosa en un gradientímetro (Gradient mixer Sigma Aldrich) compuestos de una solución de sacarosa al 20% y otra más concentrada al 45%. Finalmente, en cada gradiente se sembró la muestra de virus concentrado obtenido. Se ultra-centrifugó durante 3 horas y media a 28.000 rpm.

El gradiente una vez centrifugado se leyó en un espectrofotómetro UV con celda de recolección continua a 260 nm detectando así el pico en la lectura de absorbancia de las partículas 140 s.

La metodología para dicha determinación se realizó con parte de los equipos del Instituto Milstein. La Dra. Blanca Robiolo asesoró en los cálculos y el Técnico Daniel Ruspi en el uso de los equipos.

8.6.2.3. Interpretación de los Resultados

El coeficiente de extinción para el VFA que registra 1 densidad óptica de absorbancia, a 260 nm, corresponde a 40 µg/ml de ARN viral. Conociendo esto, se realiza el siguiente cálculo para determinar en la lectura del pico, su superficie en el papel y a cuantas unidades de densidad óptica equivale:

$$1 \text{ UDO} = d \cdot \frac{(p \cdot L)}{R}$$

En donde:

d= distancia que recorre el papel donde fue graficada la lectura cuantos centímetros equivalen a cada mililitro colectado

p= paso óptico de la celda (este es un valor fijo que depende de la celda de lectura continua que se posea).

R= rango de Absorbancia de la lectura. El recomendado es 0.2

L= ancho en centímetros del papel desde que comienza a leer en el tiempo 0 hasta que finaliza la lectura

Una vez obtenido ese cálculo que resulta una unidad numérica en cm², se hace el equivalente a

$$1\text{UDO}=133.33 \text{ ug de VFA} = x \text{ cm}^2$$

8.6.3. Ensayos de estabilidad:

8.6.3.1. Fundamento

Los ensayos de estabilidad consisten en determinar la resistencia que presenta una cepa viral a diferentes tratamientos. Cuando un antígeno se produce con el objetivo de ser un constituyente vacunal, este debe resistir a diferentes eventos, entre ellos, la inactivación a BEI con su correspondiente incubación a 37°C, refrigerado luego de la inactivación a 4°C, entre otros. Esta resistencia se mide mediante la pérdida del título viral. Es importante estudiar la estabilidad en todas las etapas que va sufriendo una suspensión viral para su estudio como antígeno vacunal, en este caso, en forma preliminar se ensayó la estabilidad a 37°C con el objetivo de asegurarse que una cepa al ser inactivada con BEI resiste la incubación a dicha temperatura.

8.6.3.2. Procedimiento

En forma preliminar, se realizaron ensayos de estabilidad viral mediante titulación (DICT 50%/ml) luego de incubación a 37°C durante diferentes tiempos. Se toma un volumen de la suspensión viral titulada, se la fracciona en diferentes alícuotas y se las expone todas al tratamiento que va a sufrir el inóculo. En este caso, se las incubó a 37°C. A diferentes tiempos, se va retirando una alícuota y se van guardando a -80°C para su posterior titulación. La curva de estabilidad para cada cepa estudiada se obtiene graficando el título viral obtenido en función del tiempo al que fue determinado.

8.6.3.3. Interpretación de los resultados

Un virus estable producirá una curva que descenderá en forma lenta a lo largo del tiempo. Esto nos indica que el virus es resistente al tratamiento al que lo estamos exponiendo. Por el contrario, un virus cuya curva de título desciende abruptamente nos indica que es muy sensible a dicho tratamiento.

9. Resultados

9.1. Selección de las cepas de campo:

Considerando la importancia que revistieron las emergencias en áreas ya reconocidas como libres en el Cono Sur, se estudiaron aislamientos colectados de dichas emergencias entre los años 2000 y 2011 en las siguientes localidades. Entre paréntesis se detalla la fecha de toma de muestra.

- O/SanPedro/Par/11, San Pedro, Paraguay. (28/09/11)
- O/Corrientes/Arg/06, San Luis del Palmar, Provincia de Corrientes, Argentina. (05/02/2017)
- O/Misiones/Arg/00; Posadas, Provincia de Misiones, Argentina. (septiembre 2000)
- O/Corrientes/Arg/00; Mercedes, Provincia de Corrientes, Argentina. (Julio 2000)
- O1/Campos (Cepa vacunal).

En el siguiente mapa (Figura 16) se muestran los sitios de toma de muestras.

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

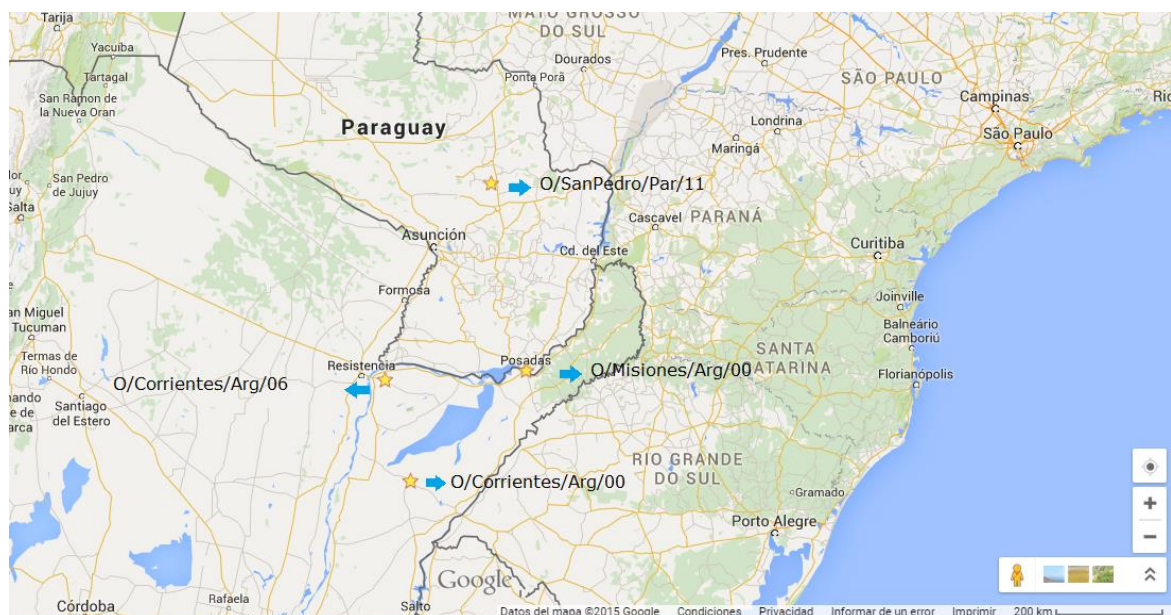


Figura 16. Localidades donde fueron aisladas las muestras de campos en estudio.

9.2. Aislamiento viral en cultivo celular y comportamiento biológico

Las muestras estudiadas se procesaron como se ha indicado en materiales y métodos sección 8.1. Todas se adaptaron eficientemente al cultivo de células de BHK-21, produciendo efecto citopático característico de redondeamiento celular con desprendimiento total de la monocapa entre las 24 y 48 horas, alcanzando títulos satisfactorios. Sin embargo, fue posible observar un comportamiento biológico diferente para el virus O/Corrientes/Arg/06 el cual presenta un ECP menos virulento en células BHK-21 en relación a los otros aislamientos. En la tabla 4 se resumen los datos de aislamiento y comportamiento biológico para las diferentes muestras analizadas. Para el caso del aislamiento O/Corrientes/Arg/06 se continuaron pasajes virales hasta el número VI observándose siempre el mismo tipo de ECP.

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

Tabla 4. Comportamiento biológico en cultivo de células BHK-21

VIRUS	O1/CAMPOS	O/SANPEDRO/ PAR/11	O/CORRIENTES/ ARG/06	O/CORRIENTES/ ARG/00	O/MISIONES/ ARG/00
Pasaje utilizado	II	III	II	IV	V
TÍTULO (DCIT _{50%} / ml)	10 ^{6.8}	10 ^{6.8}	10 ^{6.3}	10 ^{6.8}	10 ^{6.8}
ECP	+++	+++	++	+++	+++

+++ : Levanta toda la monocapa y en diluciones más altas se observa el típico ECP de FA en racimo de uvas.

++ : Se observan células redondeadas. No llega a levantar toda la monocapa.

9.3. Caracterización genética de las cepas de campo:

Se llevó a cabo la caracterización genética de las muestras estudiadas lo cual permite relacionar los diferentes aislamientos con gran exactitud e inferir el posible origen de los focos. Para el análisis filogenético se utilizó la secuencia del gen que codifica para la proteína capsidal VP1 que se utiliza en la mayoría de los estudios filogenéticos para el VFA (Malirat y cols., 2007; Mohapatra y cols., 2002). La secuencia completa de P1, que incluye a las otras proteínas capsidales, además de la VP1, fue analizada en relación a los cambios de aminoácidos que se detectaron, y particularmente su localización con respecto a los sitios antigénicos. En todos los casos se incluyeron cepas de interés para las comparaciones

La determinación de las secuencias de nucleótidos se llevó a cabo para todos los aislamientos utilizados en éste trabajo, a pesar de que para alguno de ellos se contaba con la información a partir de las secuencias depositadas en el GenBank. De ésta forma esperamos poder asociar de forma inequívoca las variaciones encontradas a nivel

genético con los diferentes comportamientos antigénicos e inmunogénicos que se registran en las secciones que corresponden más adelante

9.3.1. Análisis filogenético de las cepas estudiadas

Como se ha mencionado anteriormente, la región que codifica para la proteína VP1 (región 1D) es la más variable dentro del genoma, y en este sentido, y considerando que la misma contiene los determinantes antigénicos más importantes, en la región que se utiliza normalmente en los estudios evolutivos y filogenéticos

Las secuencias de VP1 correspondientes a las cepas de campo O/Corrientes/Arg/06, O/Corrientes/Arg/00, y O/Misiones/Arg/00 y a la cepa vacunal O Campos son idénticas a las reportadas en el Genbank bajo los números de acceso, DQ834727, AM180029, AM180025, y K01201, respectivamente.

La secuencia determinada para la cepa O/SanPedro/Par/11, de la cual no había registro en el GenBank, es original de esta tesis doctoral y ha sido publicada bajo el número de acceso JX514427 (Maradei y cols., 2013).

Para el análisis filogenético se incluyeron secuencias de VP1 obtenidas del Genbank correspondientes a cepas epidemiológicamente relevantes del Cono Sur y de otras regiones de América del Sur y del mundo.

En la figura 17 se muestra el dendograma derivado del análisis, llevado a cabo como se describió en Materiales y Métodos, en el cual se observa que todos los aislamientos recuperados de los brotes ocurridos en el Cono Sur entre los años 2000 y 2011 pertenecen al topotipo Euro-SA, y que se agrupan en un único linaje, separado de los linajes que agrupan cepas aisladas en países de la Región Andina.

En la tabla 5 se presenta una matriz con los valores de distancias genéticas pareadas entre los diferentes aislamientos para la secuencia nucleotídica que codifica para VP1. Las mismas fueron calculadas utilizando el modelo de Kimura de 2 parámetros y expresadas como porcentaje de divergencia. Como puede observarse, las cepas que se agrupan en el linaje del Cono Sur presentan un grado de homología entre ellas, que en promedio alcanza el 92%. Entre estos aislamientos, las muestras O/Corrientes/Arg/06

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

y O/SanPedro/Par/11, que corresponden a las dos últimas emergencias muestran homología genética del 94,7%, y una proximidad con aislamientos colectados anteriormente en Bolivia en los años 2000, 2001 y 2003 y en Paraguay en el año 2003, con valores de homología que van desde el 93% hasta el 96,6%. Cuando se comparan estos aislamientos correspondientes a emergencias del Cono Sur con la cepa vacunal O1 campos, se observa una divergencia genética promedio de 18,2%. De las cepas estudiadas, la más distanciada genéticamente del virus O Campos es la muestra O/SanPedro/Par/11, con un valor de 19,1% de divergencia con la cepa vacunal en el gen codificante para VP1.

A partir de la topología del dendograma (Figura 17) se observa que las cepas O/Corrientes/Arg/06 y O/SanPedro/Par/11 están directamente relacionadas, lo cual permite inferir que ambas emergieron de un ancestral común.

Los dos aislamientos estudiados del año 2000 mostraron resultados similares a los publicados por König y cols., 2007. Las muestras estudiadas se presentan dentro de un subgrupo, en donde también encontramos aislamientos del mismo período recolectados en Uruguay. La diferencia nucleotídica entre los dos aislamientos del año 2000 es del 7,3% entre sí y en relación a la cepa O1/Campos de 17,7% y 18,0% para O/Corrientes/Arg/00 y O/Misiones/Arg/00 respectivamente. La cepa O/Misiones/Arg/00 tiene más del 99% de homología con el aislamiento del mismo año en Uruguay, no así la cepa O/Corrientes/Arg/00.

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

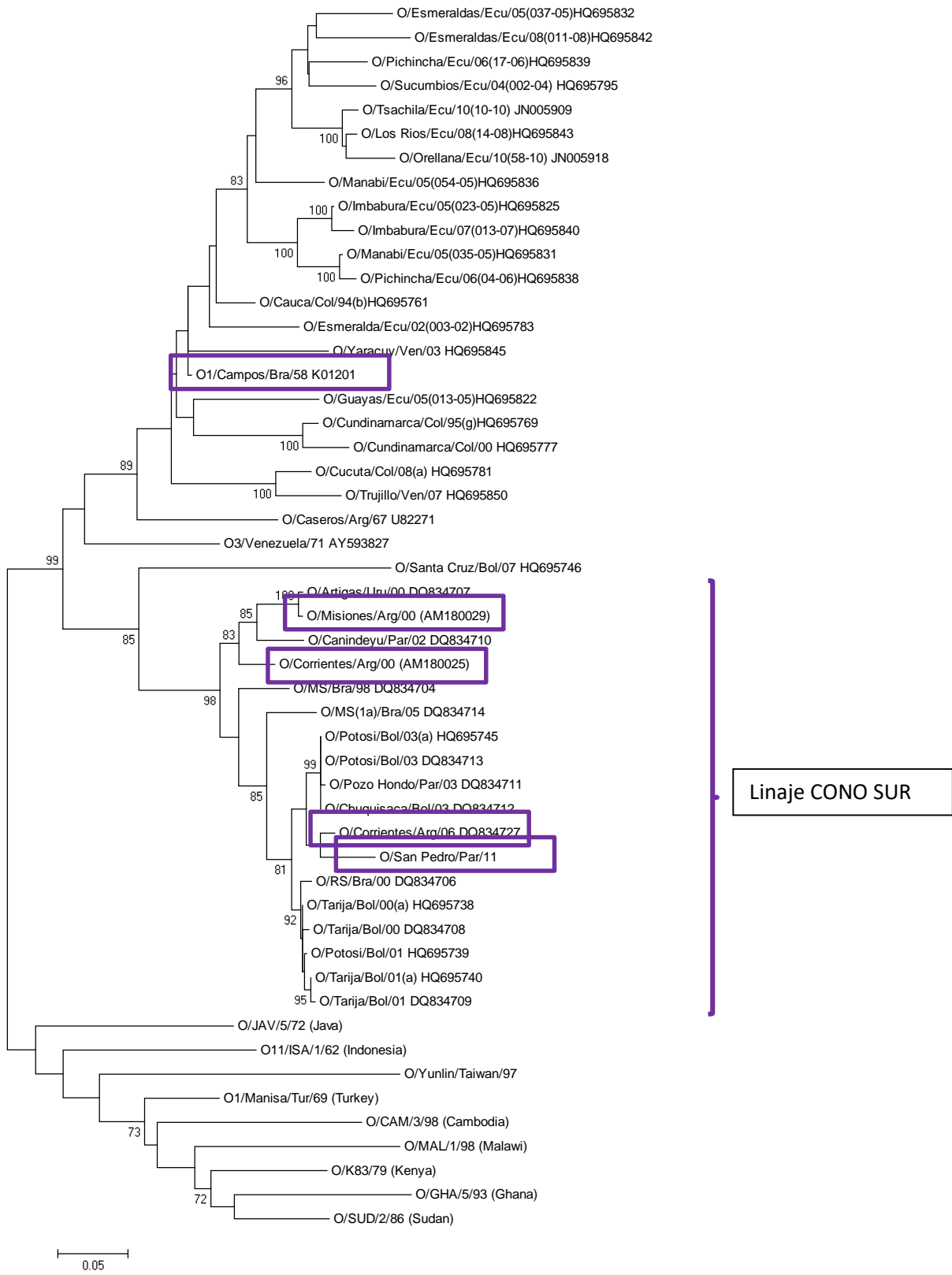


FIGURA 17. Árbol filogenético que muestra las relaciones entre los aislamientos tipo O del virus de FA. Las distancias genéticas se calcularon en base a la secuencia del gen VP1 con 639 nucleótidos. La construcción se encuentra descrita en materiales y métodos, se agregaron los números de entrada a GenBank de las secuencias utilizadas. En recuadro azul se identifica la cepa O1/Campos, en los recuadros violetas se observan los aislamientos estudiados. Los nombres están identificados con la región o provincia seguidos de tres letras que identifican al país y el año en el que se obtuvo el aislamiento.

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

Tabla 5. Distancias genéticas entre las cepas estudiadas, calculadas para la región que codifica para la proteína VP1 y expresadas en porcentaje de divergencia.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1 O1/Campos																		
2 O/Corrientes/Arg/00	17,7%																	
3 O/Misiones/Arg/00	18,0%	7,3%																
4 O/Corrientes/Arg/06	18,6%	11,3%	12,3%															
5 O/San_Pedro/Par/11	19,1%	10,9%	12,5%	5,3%														
6 O/MS/Bra/98_DQ834704	17,0%	8,8%	10,2%	10,4%	9,6%													
7 O/RS/Bra/00_DQ834706	18,3%	10,4%	11,0%	4,9%	6,9%	8,6%												
8 O/Artigas/Uru/00_DQ834707	18,2%	7,3%	0,6%	12,7%	12,9%	10,2%	11,4%											
9 O/Tarija/Bol/00_DQ834708	17,8%	10,0%	10,2%	4,9%	6,4%	8,2%	1,6%	10,6%										
10 O/Tarija/Bol/00(a)_HQ695738	17,4%	9,9%	10,0%	4,4%	6,0%	8,1%	1,1%	10,4%	0,5%									
11 O/Tarija/Bol/01_DQ834709	18,3%	10,7%	10,8%	5,1%	6,8%	9,2%	2,1%	11,2%	1,5%	1,0%								
12 O/Potosi/Bol/01_HQ695739	17,9%	10,3%	10,4%	4,8%	6,4%	8,5%	1,5%	10,8%	0,8%	0,3%	1,0%							
13 O/Tarija/Bol/01(a)_HQ695740	17,9%	10,3%	10,4%	4,8%	6,4%	8,8%	1,8%	10,8%	1,1%	0,6%	0,3%	0,6%						
14 O/Canindeyu/Par/02_DQ834710	18,7%	7,7%	7,3%	11,9%	10,9%	10,9%	9,6%	7,3%	8,8%	8,7%	9,8%	9,1%	9,5%					
15 O/Pozo_Hondo/Par/03_DQ834711	18,6%	9,5%	11,0%	3,5%	7,0%	9,4%	4,0%	11,5%	3,9%	3,5%	4,2%	3,9%	3,9%	10,5%				
16 O/Chuquisaca/Bol/03_DQ834712	18,4%	9,7%	11,2%	3,4%	6,8%	9,6%	3,9%	11,7%	3,9%	3,4%	4,0%	3,7%	3,7%	10,7%	0,5%			
17 O/Potosi/Bol/03_DQ834713	18,4%	9,7%	11,2%	3,4%	6,8%	9,6%	3,9%	11,7%	3,9%	3,4%	4,0%	3,7%	3,7%	10,7%	0,5%	0,0%		
18 O/Potosi/Bol/03(a)_HQ695745	18,4%	9,7%	11,2%	3,4%	6,8%	9,6%	3,9%	11,7%	3,9%	3,4%	4,0%	3,7%	3,7%	10,7%	0,5%	0,0%	0,0%	
19 O/MS(1a)/Bra/05_DQ834714	18,1%	10,6%	10,2%	8,1%	9,0%	9,0%	6,6%	10,6%	6,9%	6,6%	6,9%	7,0%	6,6%	10,8%	7,1%	7,3%	7,3%	7,3%

9.3.2. Variación genética en la región que codifica para el precursor polipeptídico P1 de los aislamientos de campo

El análisis de las secuencias nucleotídicas de las muestras estudiadas y su comparación con la cepa vacunal, no registra deleciones ni inserciones a lo largo de la región que codifica para el precursor P1 (Figura 18).

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
O1Campos
O SAN PEDRO PAR 11
O MISIONES ARG 2000
O CORRIENTES ARG 2006
O CORRIENTES ARG 2000
      90      100     110     120     130     140     150     160
O1Campos
O SAN PEDRO PAR 11
O MISIONES ARG 2000
O CORRIENTES ARG 2006
O CORRIENTES ARG 2000
      170     180     190     200     210     220     230     240
O1Campos
O SAN PEDRO PAR 11
O MISIONES ARG 2000
O CORRIENTES ARG 2006
O CORRIENTES ARG 2000
      250     260     270     280     290     300     310     320
O1Campos
O SAN PEDRO PAR 11
O MISIONES ARG 2000
O CORRIENTES ARG 2006
O CORRIENTES ARG 2000
      330     340     350     360     370     380     390     400
O1Campos
O SAN PEDRO PAR 11
O MISIONES ARG 2000
O CORRIENTES ARG 2006
O CORRIENTES ARG 2000
      410     420     430     440     450     460     470     480
O1Campos
O SAN PEDRO PAR 11
O MISIONES ARG 2000
O CORRIENTES ARG 2006
O CORRIENTES ARG 2000
      490     500     510     520     530     540     550     560
O1Campos
O SAN PEDRO PAR 11
O MISIONES ARG 2000
O CORRIENTES ARG 2006
O CORRIENTES ARG 2000
      570     580     590     600     610     620     630     640
O1Campos
O SAN PEDRO PAR 11
O MISIONES ARG 2000
O CORRIENTES ARG 2006
O CORRIENTES ARG 2000
      650     660     670     680     690     700     710     720
O1Campos
O SAN PEDRO PAR 11
O MISIONES ARG 2000
O CORRIENTES ARG 2006
O CORRIENTES ARG 2000
      730     740     750     760     770     780     790     800
O1Campos
O SAN PEDRO PAR 11
O MISIONES ARG 2000
O CORRIENTES ARG 2006
O CORRIENTES ARG 2000
      810     820     830     840     850     860     870     880
O1Campos
O SAN PEDRO PAR 11
O MISIONES ARG 2000
O CORRIENTES ARG 2006
O CORRIENTES ARG 2000

```

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

```

      890      900      910      920      930      940      950      960
O1Campos
O SAN PEDRO PAR 11
O MISIONES ARG 2000
O CORRIENTES ARG 2006
O CORRIENTES ARG 2000
      970      980      990      1000     1010     1020     1030     1040
O1Campos
O SAN PEDRO PAR 11
O MISIONES ARG 2000
O CORRIENTES ARG 2006
O CORRIENTES ARG 2000
      1050     1060     1070     1080     1090     1100     1110     1120
O1Campos
O SAN PEDRO PAR 11
O MISIONES ARG 2000
O CORRIENTES ARG 2006
O CORRIENTES ARG 2000
      1130     1140     1150     1160     1170     1180     1190     1200
O1Campos
O SAN PEDRO PAR 11
O MISIONES ARG 2000
O CORRIENTES ARG 2006
O CORRIENTES ARG 2000
      1210     1220     1230     1240     1250     1260     1270     1280
O1Campos
O SAN PEDRO PAR 11
O MISIONES ARG 2000
O CORRIENTES ARG 2006
O CORRIENTES ARG 2000
      1290     1300     1310     1320     1330     1340     1350     1360
O1Campos
O SAN PEDRO PAR 11
O MISIONES ARG 2000
O CORRIENTES ARG 2006
O CORRIENTES ARG 2000
      1370     1380     1390     1400     1410     1420     1430     1440
O1Campos
O SAN PEDRO PAR 11
O MISIONES ARG 2000
O CORRIENTES ARG 2006
O CORRIENTES ARG 2000
      1450     1460     1470     1480     1490     1500     1510     1520
O1Campos
O SAN PEDRO PAR 11
O MISIONES ARG 2000
O CORRIENTES ARG 2006
O CORRIENTES ARG 2000
      1530     1540     1550     1560     1570     1580     1590     1600
O1Campos
O SAN PEDRO PAR 11
O MISIONES ARG 2000
O CORRIENTES ARG 2006
O CORRIENTES ARG 2000
      1610     1620     1630     1640     1650     1660     1670     1680
O1Campos
O SAN PEDRO PAR 11
O MISIONES ARG 2000
O CORRIENTES ARG 2006
O CORRIENTES ARG 2000

```


CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

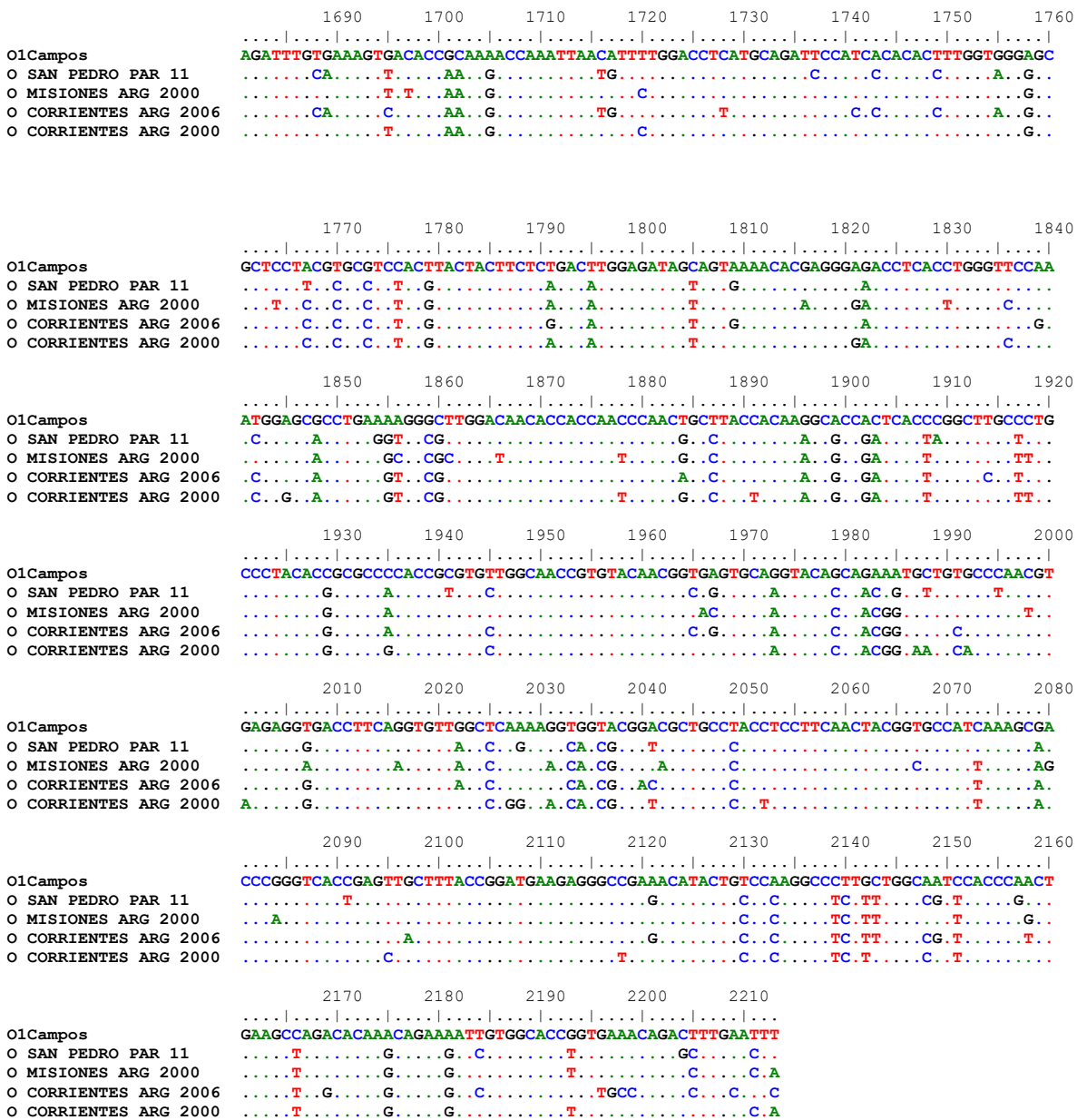


Figura 18. Secuencia de nucleótidos de la región que codifica para el precursor proteico P1 de los aislamientos de campo y de la cepa vacunal O campos. En el alineamiento se muestran las variaciones de nucleótidos con respecto a la cepa vacunal O1Campos.

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

Los cambios nucleotídicos totales en la región P1 registraron el valor máximo de divergencia con la cepa vacunal para la cepa O/San Pedro/Par/11 con un valor de 17,79% (tabla 6). Para el resto de los aislamientos, la divergencia con la cepa vacunal fue de 16,65%, 16,25% y 15,8% para las cepas O/Corrientes/Arg/06, O/Misiones/Arg/00 y O/Corrientes/Arg/00 respectivamente. Asimismo, se realizó el cálculo de las distancias genéticas entre las cepas estudiadas, obteniéndose valores de divergencia similares a los observados con el análisis para VP1 (tabla6A).

Comparando los genes que codifican para cada una de las proteínas capsidales de las cepas estudiadas en relación a la cepa vacuna O1/Campos, se encontraron cambios en 45 de los 254 sitios nucleotídicos que comprende el gen que codifica para VP4 representando una variabilidad total para el gen del 17,7%; para el gen que codifica para VP2, se encontraron cambios en 139 de los 653 sitios nucleotídicos, representando una variabilidad total para el gen del 21,2%, similar a la observada para el gen que codifica para VP4. Para el gen que codifica para VP3, se contabilizaron cambios en 151 de los 659 sitios totales representando una variabilidad para el gen del 22,9% y para el gen que codifica para VP1, cambios nucleotídicos en 163 de los 639 sitios totales, representando una variabilidad para el gen del 25,5%(Tabla 6B). Como era de esperar el gen que codifica para VP1 es el de mayor variabilidad encontrada. La distribución de las mutaciones se concentra en las zonas hipervariables de los genes.

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

Tabla 6. A: Matriz de distancias genéticas apareadas entre las cepas, para el precursor proteico P1, mediante la estimación de la Divergencia Evolutiva entre las Secuencias estudiadas. Se muestra el porcentaje de sustituciones por sitio entre las distintas secuencias. Se utilizó para el análisis un modelo compuesto de máxima similitud (Tamura y cols., 2004). B: Cambios nucleotídicos discriminados por gen capsidal (y su proporción), registrados para las cuatro cepas estudiadas en relación a la cepa vacunal O1/Campos.

A

O1Campos

O_SAN_PEDRO_PAR_11	17,79%			
O_MISIONES_ARG_2000	16,25%	11,75%		
O_CORRIENTES_ARG_2006	16,65%	5,84%	9,96%	
O_CORRIENTES_ARG_2000	15,80%	11,22%	5,91%	9,82%

B

	VP4	VP2	VP3	VP1
Cantidad de Nucleótidos	254	653	659	639
Cambios nucleotídicos contabilizados	45	139	151	163
Proporción de cambios nucleotídicos	17,7%	21,2%	22,9%	25,5%

9.3.3. Cambios aminoacídicos registrados en la secuencia de la región que codifica para el precursor proteico P1.

La comparación de las variaciones a nivel de aa se realizó a partir de la traducción de la secuencia de nucleótidos de la región que codifica para el precursor proteico P1.

Como se observa en la figura 19 y tabla 7 dentro del análisis de los 2213 nucleótidos que codifican para el precursor proteico P1 completo, se registraron 493 (22,27%) nucleótidos con mutaciones de los cuales 80 cambios nucleotídicos resultaron en cambios no sinónimos.

Observando dentro del gen que codifica para VP1 de 639 nucleótidos, 163 registraron mutaciones con respecto a la cepa vacunal, de los cuales solamente 36 resultaron en cambios no sinónimos. Los cambios registrados en la proteína VP1 fueron los más abundantes, inclusive concentrados en los sitios antigénicos identificados según Asfor y cols. 2014 (Tabla 7). Dentro de la secuencia del gen que codifica para VP1 se puede notar una mayor concentración de los cambios con respecto a la cepa vacunal O1/Campos, localizada en región hipervariable de VP1 que correspondería al sitio antigénico 1 (entre los aminoácidos 656-682 de P1). Aproximadamente 28% de las mutaciones en VP1 que resultan en cambios de aminoácidos se concentran en este fragmento constituido solamente por 27 aminoácidos.

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

Tabla 7. Cambios aminoacídicos presentes en la composición de VP1 de las cepas de campos en relación a O1/Campos. Se identifican los sitios antigénicos importantes según Asfor y cols., 2014. En gris claro se observa un cambio de un tipo aminoacídico para la posición, en gris medio un segundo tipo aminoacídico registrado y en gris oscuro un tercer tipo.

	Posición Aminoacídica VP1																																					
	4	9	13	24	25	28	33	36	40	43	45	46	50	58	76	79	83	85	96	108	112	133	135	137	138	139	140	141	153	155	158	172	173	194	197	212		
aislamiento																																						
O1/Campos	A	D	A	I	Q	Q	S	M	V	T	Q	N	I	S	L	A	E	D	K	H	L	E	R	S	R	N	A	V	Q	V	T	T	R	I	T			
O/SanPedro/Par/11	E	S	V	R	H	A	L	A	L	A	K	D	V	M	V	M	N	V	I	I	G	K	T	N	S	S	V		A	S	A	S		V	S			
O/Misiones/Arg/00	T	S	V		H	A	L	L	I	K	D			M	V	K	N	A		I	T	K	T	N	G				A	K	A	Q		A				
O/Corrientes/Arg/06	S	V		H	A	L	L	A	K	D	V	P		M	V	N	V		I	I	G	K	T	N	G		A		A	P			V	S				
O/Corrientes/Arg/00	S	V		H	A	L	L	A	K	D	K		M	V	M	N	V		I	I	K	T	N	G		A		A	R	A	S							

Realizando un análisis de los cambios en aminoácidos que componen las cuatro VP codificadas en el precursor P1 y particularmente referido a los sitios antigénicos 1 a 5 identificados según Asfor y cols., 2014 (Figura 19), podemos evidenciar que el sitio antigénico 1, que como describimos anteriormente forma parte de epitopes que conforman el *loop* G-H y el dominio C-terminal de VP1 junto con dos *loops* presentes en VP2, registra cambios en relación a la cepa vacunal para casi todas las cepas. El sitio 5, formado por la posición 149 de VP1 que al igual que el sitio 1 también perteneciente al *loop* G-H no presentó cambios. También se registraron cambios en los sitios antigénicos 2, 3 y 4.

Particularmente se registran cambios en las posiciones 658, 660, 661 y 662 (correspondientes a los aminoácidos 135, 137, 138 y 139 de VP1), en las cuatro cepas estudiadas. El virus O/SanPedro/Par/11 presenta cambios aminoacídicos diferentes a los registrados para el resto de las cepas.

En la posición 656 (equivalente a la posición 133 de VP1 en la tabla 7) el cambio observado es de un aminoácido de carga negativa por otro de carga neutra E→G, para O/SanPedro/Par/11 y O/Corrientes/Arg/06 y E→T para el caso de O/Corrientes/Arg/00. En la posición 661 (equivalente a la posición 138 de VP1 en la tabla 7) el cambio aminoacídico es R → N para las cuatro cepas de campo estudiadas, un aminoácido de carga positiva por uno neutro. También se observan cambios de aminoácidos de cargas neutras a positivas en las posiciones 676 y 681 (equivalente a posiciones 153 y 158 en la tabla 7) para las cepas del año 2000. Los cambios de cargas podrían implicar un cambio del plegamiento a nivel proteico, lo cual podría explicar una diferencia en los sitios neutralizantes, aunque estudios de modelado deberían realizarse para evaluar si el sitio antigénico presenta un cambio conformacional debido a los cambios aminoacídicos.

Los sitios antigénicos 2 y 3 se forman de residuos del *loop* B-C en VP2 y VP1. En el sitio 2 podemos observar en la posición 158 del polipéptido P1 (correspondiente al residuo 73 de VP2) un cambio para la cepa O/SanPedro/Par/11 en relación a la cepa vacunal D→ N , este cambio es un cambio de un aminoácido con carga negativa a uno con carga neutra. Este lugar es importante ya que el aminoácido 157 (72 en VP2) está

reportado como un sitio que define no sólo la antigenicidad, sino que se relaciona con la patogenicidad del virus para otros serotipos como el Asia 1 (Xue y cols., 2012). En el sitio 3 se observan cambios en la posición 568 (posición 45 en de la proteína VP1), donde todas las cepas cambian en relación a la cepa vacunal de un aminoácido neutro a uno con carga positiva, Q→K, y la posición 569 (posición 46 de VP1) donde ocurre lo mismo para todas las cepas pero con un cambio de carga neutra a carga negativa: N→D.

El sitio antigénico 4 cuya posición 58 fue reportada como un sitio crítico para VP3 no presentó cambios, pero si se observaron otros cambios para este sitio que es importante resaltar, algunos de ellos implicaron cambios de cargas aminoacídicas para la cepa O/SanPedro/Par/11 y O/Corrientes/Arg/06. Las posiciones 359, 361, 362, 363 y 379 de P1, incluidas en el sitio se vieron modificadas. El cambio de la posición 359 es de igual carga. Los sitios 361, 362 y 379 presentaron cambios para O/SanPedro/Par/11 y O/Corrientes/Arg/06 en relación a la cepa vacunal, detallados en ese orden; E→G (carga negativa por neutra), G→D o G→E respectivamente (carga neutra por negativa) y Q→R (carga neutra por positiva). La posición 363 presento cambios en relación a la cepa vacunal para la cepa O/Misiones/Arg/00 con un cambio de igual carga pero para O/Corrientes/Arg/00 un cambio G→D (carga neutra por negativa).

Adicionalmente a los sitios antigénicos mencionados, otros autores han identificado también la existencia de otros epítopes que confieren protección o que son antigénicamente relevantes. Podemos mencionar en la posición 219, correspondiente a la 134 de VP2 cambios de K→G/E/D y en la posición 222 que se corresponde con la 137 de VP2 el cambio L→K (cambio de carga neutra a positiva) para todas las cepas. Estos cambios coinciden con reportes de otros autores en particular para la posición 134 que es un sitio neutralizante para el serotipo O (Mahapatra y cols., 2015) y que han sido encontrados también en el serotipo A, el cambio en esta posición podría ser antigénicamente interesante, ya que podría estar implicado en la falta de neutralización por parte de los anticuerpos dirigidos a ese sitio (Upadhyaya y cols., 2014 y Thomas y cols., 1988).

Es de interés notar que, aunque se registraron cambios de nucleótidos en 17,7% de las posiciones nucleotídicas de VP4, ninguna de estas mutaciones resultó en cambios de aminoácidos.

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

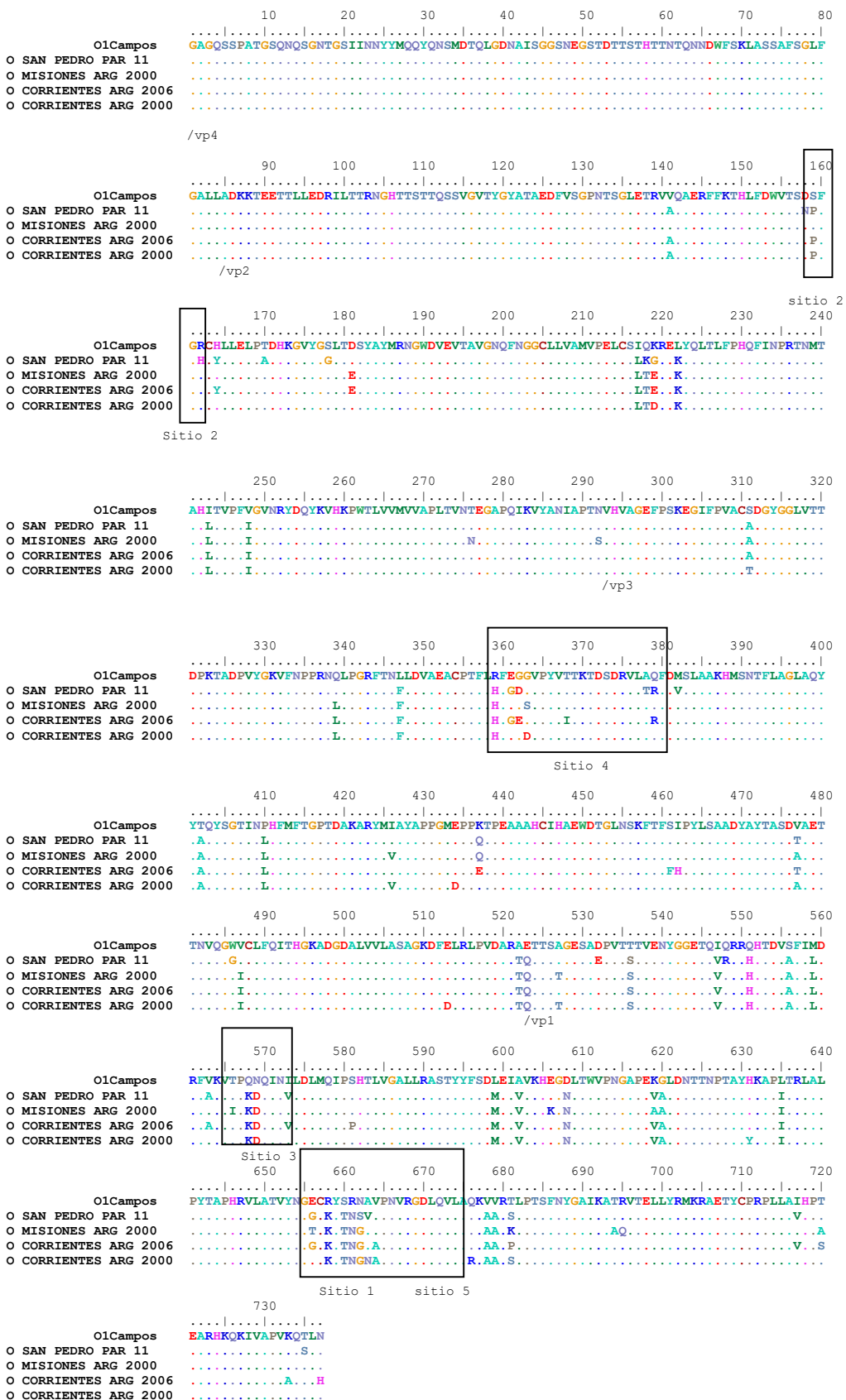


Figura 19. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos del precursor proteico P1 deducidas de las secuencias determinadas en la figura 16.

9.4. Caracterización antigénica:

Los resultados genéticos son útiles para inferir datos de evolución y origen viral, pero no permiten predecir el comportamiento antigénico. En este sentido se llevó a cabo la caracterización antigénica preliminar mediante Fijación de Complemento 50% (FC), y seguidamente evaluando el perfil de reactividad con un panel de 21 AcM, como se describió en materiales y métodos.

9.4.1. Caracterización mediante Fijación de Complemento.

Se realizó la FC de las muestras estudiadas para obtener datos de la tipificación y subtipificación por medio de esta técnica. Los resultados (Tabla 8) indican que todas las cepas estudiadas son fijadas por el suero polivalente "tipo O". La cepa O1/Campos es fijada por el suero hiperinmune homólogo no así frente al resto de los sueros. Las cepas del año 2000 son fijadas únicamente por el suero hiperinmune de O1/Campos. En el caso de O/Corrientes/Arg/06 es fijado por su suero homólogo y no por el resto de los sueros testeados y el virus O/SanPedro/Par/11 no fija con ningún suero monovalente.

Los resultados indican que las cepas de campo del año 2000 estarían más relacionadas con la cepa vacunal O1/Campos que las otras dos cepas estudiadas

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

Tabla 8. Fijación de complemento de las cepas de campo con los diferentes sueros hiperinmunes indicados.

Antígeno	Suero hiperinmune						
	O/CAMPOS/POLIVALENTE	O1/CAMPOS	O/CORRIENTES/ARG/06	O/ECUADOR/2010	A/24/CRUZEIRO	A/ARGENTINA/2001	C3/INDAIAL
O1/CAMPOS	<u>17</u>	<u>15</u>	80	82	82	82	82
O/CORRIENTES/ARG/06	<u>48</u>	<u>68</u>	<u>16</u>	72	82	80	78
O/SANPEDRO/PAR/11	<u>37</u>	69	80	76	80	81	80
O/CORRIENTES/ARG/00	<u>26</u>	<u>30</u>	78	N/d	80	80	80
O/MISIONES/ARG/00	<u>30</u>	<u>38</u>	78	N/d	80	80	80

En negrita subrayado se pueden observar los valores que han resultado positivos a la fijación, es decir que son reconocidos por el sistema. N/d No determinado.

9.4.2. Caracterización antigénica mediante perfiles de reactividad con anticuerpos monoclonales

Una caracterización antigénica más precisa fue obtenida mediante la determinación de perfiles de reactividad con un panel de anticuerpos monoclonales (AcMs), desarrollados para el VFA, evaluando la reactividad que presentan los mismos con las diferentes cepas de campo mediante la técnica de ELISA.

Los virus aislados de las muestras de campo y el prototipo vacunal O1/Campos se enfrentaron en un ELISA de captura con el panel de 21 AcMs generados contra cepas de referencia del serotipo O, representadas por los virus O1/Campos y O1Caseros. También se incluyeron AcMs desarrollados contra la cepa viral O Taiwán (Seki y col., 2009).

Inicialmente se evaluó el efecto de los pasajes celulares en el perfil de reactividad. No se observaron cambios en los perfiles de reactividad al panel de AcMs tanto con el

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

epitelio como con los pasajes en cultivo celular, ya sea primer o segundo pasaje en células BHK, si bien, como es de esperar, se registró variación en la intensidad del patrón de reactividad de los diferentes aislamientos. Este hecho indica que los pasajes en cultivo celular no indujeron cambios antigénicos detectables (datos no mostrados).

El perfil de reactividad de las cuatro cepas estudiadas, y los cc de las cepas entre sí y con respecto al virus vacunal O1/Campos se muestran en la Figura 20 y tabla 9. Todos los aislamientos, muestran perfiles de reactividad claramente diferentes a los de la cepa vacunal, con valores de cc que varían entre 0.58 y 0.84. Cuando se comparan los diferentes aislamientos entre sí, se registran valores de cc que varían entre 0.58 y 0.84, este último valor registrado entre las cepas de campo O/SanPedro/Par/2011 y O/Corrientes/Arg/2006, lo cual sugiere, que ambas cepas de campo están antigénicamente relacionadas en concordancia con lo observado a partir del análisis genético

Tabla 9. Coeficiente de correlación para las diferentes cepas estudiadas.

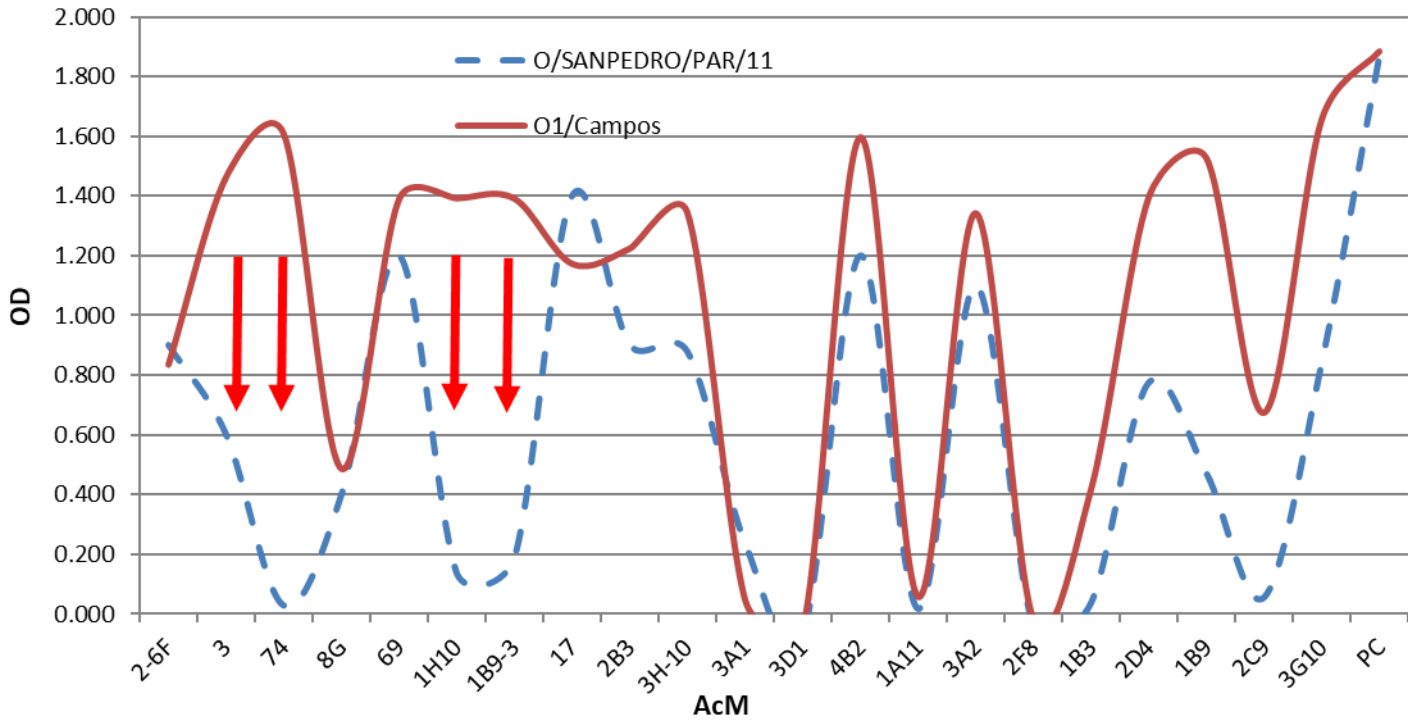
O1/Campos	O/Corrientes/Arg/00	O/Corrientes/Arg/06	O/Misiones/Arg/00	O/SanPedro/Par/11	
1,00					O1/Campos
0,66	1,00				O/CORRIENTES/ARG/00
0,73	0,65	1,00			O/CORRIENTES/ARG/06
0,65	0,58	0,69	1,00		O/MISIONES/ARG/00
0,61	0,77	0,84	0,63	1,00	O/SANPEDRO/PAR/11

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

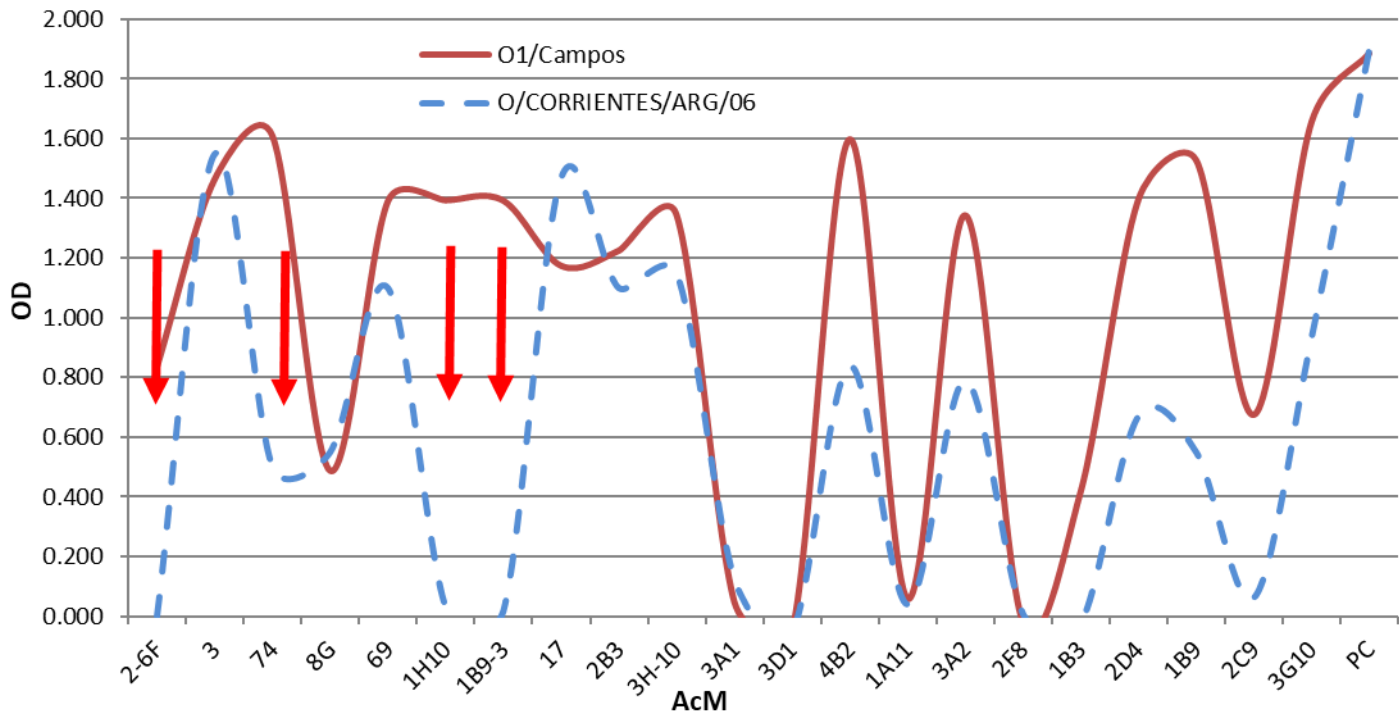
El análisis de la reactividad individual con cada AcM (Figura 20), indica claras diferencias entre la cepa vacunal y las cepas de campo. Particularmente, todas las cepas de campo pierden la reactividad registrada para la cepa vacunal O1/Campos con los anticuerpos 1H10 y 1B9-3, siendo en éste último caso una pérdida parcial para el virus O/Misiones/Arg/00. La reactividad que se observa en el virus O1/Campos con el AcM 74, con capacidad neutralizante, se pierde en los virus O/San Pedro/Par/11, O/Corrientes/Arg/06 y O/Misiones/Arg/00. Adicionalmente pierden reactividad los virus O/San Pedro/Par/11 y O/Corrientes/Arg/00 con el AcM 3; el virus /Corrientes/Arg/06 con el AcM 2-6F y el virus O/Misiones/Arg/00 con el AcM 69. Los perfiles de reactividad registrados con los 11 AcM producidos contra el virus O/Taiwán fueron relativamente homogéneos entre el virus O1/Campos y los aislamientos de campo. Particularmente, la baja reactividad observada para el O1/Campos con los AcM 3A1, 3D1, 1A11 y 2F8 también se registra en los virus de campo.

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

A

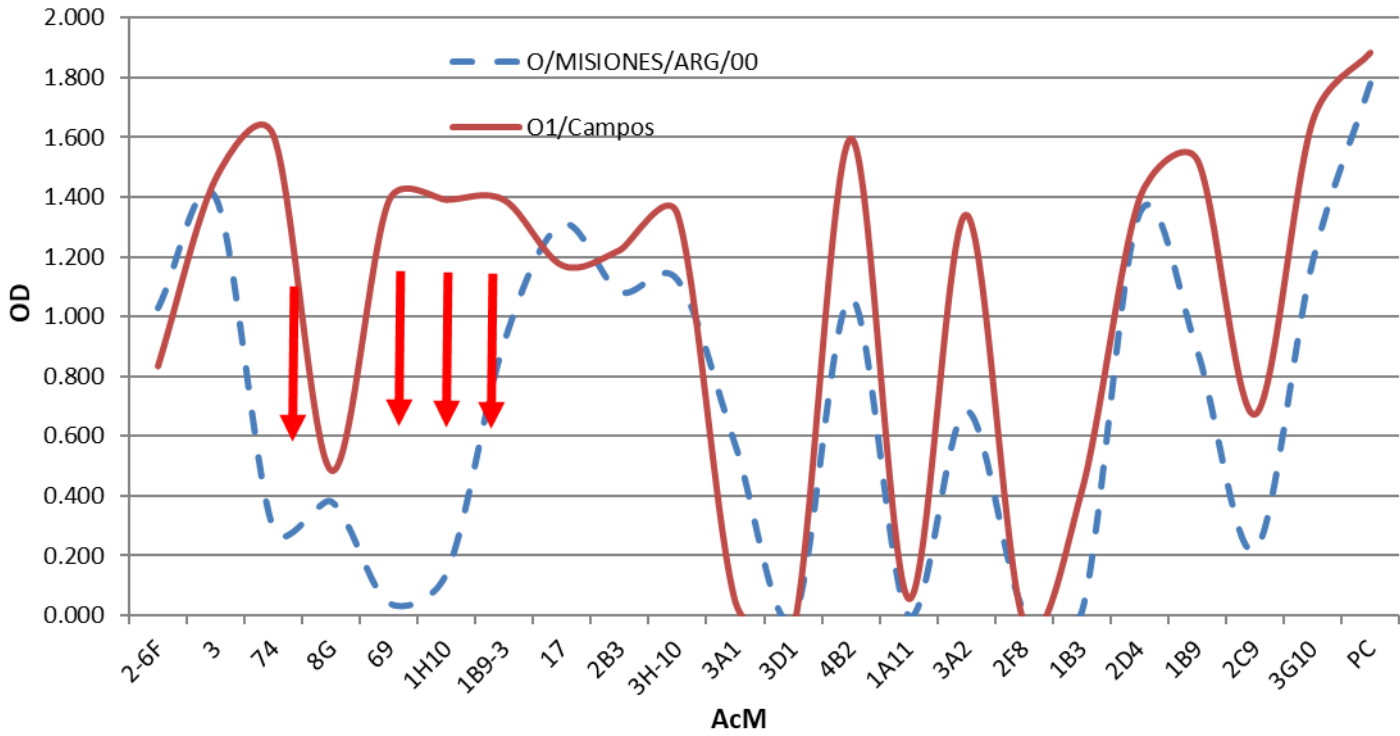


B



CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

C



D

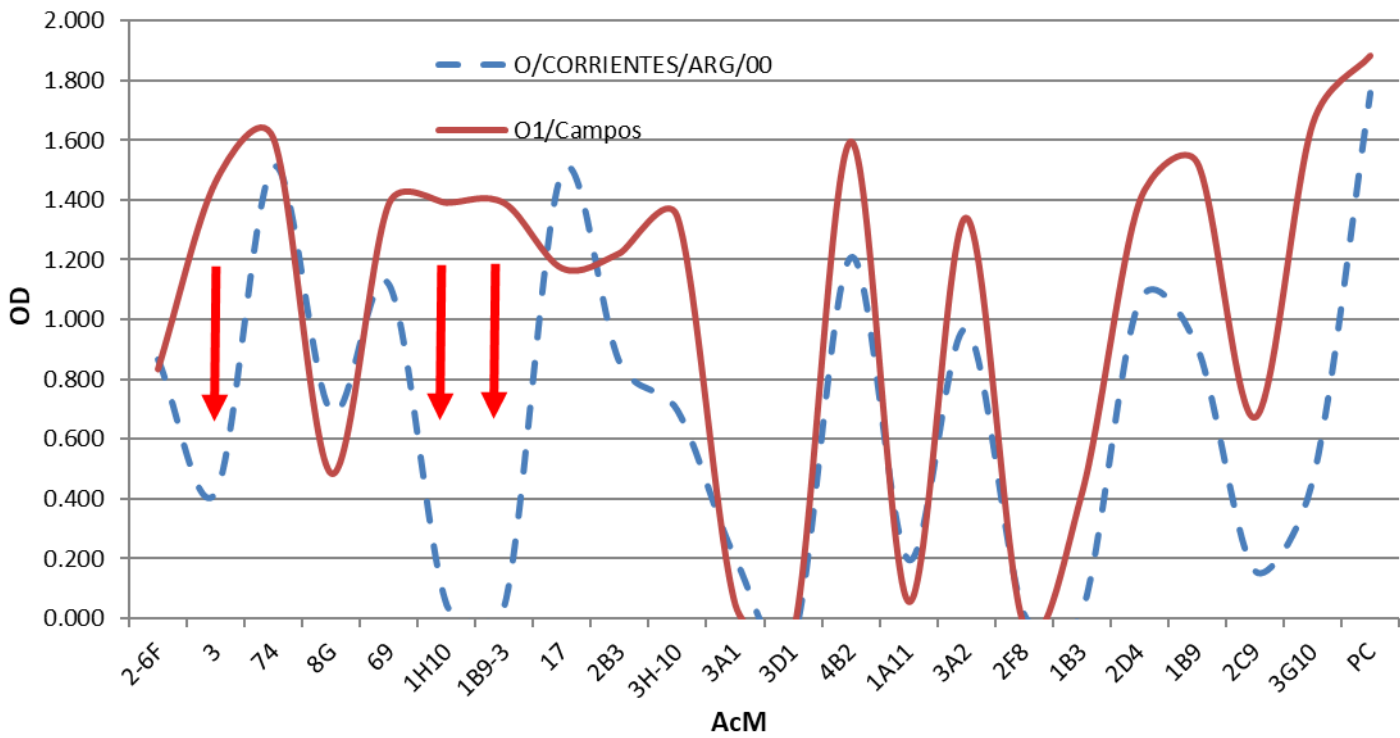


Figura 20. Perfiles de AcMs enfrentados a las cepas estudiadas y la cepa vacunal O1/Campos.

Perfil de reactividad de las cepas virales estudiadas frente a los AcM indicados. A: O/SanPedro/Par/11, B: O/Corrientes/Arg/06, D: O/Corrientes/Arg/00 y E: O/Misiones/Arg/00. Las flechas largas indican las diferencias de reactividad entre los aislamientos de campo y la cepa vacunal O1/Campos que son descriptas en el texto, las flechas cortas indican pérdida parcial de reactividad en relación al virus O1/Campos. Se observa también la comparación de las cepas más cercanas antigénicamente C: O/SanPedro/Par/11, O/Corrientes/Arg/06 y F: O/Corrientes/Arg/00, O/Misiones/Arg/00.

9.5. Caracterización inmunogénica: Protección heteróloga contra la cepa vacunal mediante pruebas “*in vitro*” e “*in vivo*”

9.5.1- Pruebas “*in vitro*”: Determinación del valor “*r1*” y EPP mediante VN.

9.5.1.1. Relación de parentesco *r1*:

Teniendo en cuenta que la caracterización genética y el establecimiento de perfiles antigénicos mediante AcMs señalaron la emergencia de nuevas cepas con diferencias considerables respecto a la cepa vacunal O1/Campos, se llevaron a cabo estudios de parentesco antigénico/inmunogénico “*in vitro*” entre los aislamientos de campo y dicha cepa vacunal de uso en la región. El método “*in vitro*” más aceptado para establecer el parentesco antigénico es la relación *r1*. Como señalado en materiales y métodos, dicha relación se expresa como el antilog₁₀ (Título de anticuerpos del pool de sueros frente al antígeno heterólogo – Título de anticuerpos del pool de sueros frente al antígeno homólogo (cepa vacunal)) (Rweyemamu y col., 1977). Se calculó el título mediante la prueba de virusneutralización (VN), utilizando un pool de 5 sueros colectados de animales luego de 30 días de haber sido vacunados con vacuna monovalente homóloga a la cepa vacunal en estudio.

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

El pool de sueros se conformó como explicado en la sección de Materiales y Métodos 8.4.1.2. iii. En la tabla 10 se detallan los títulos obtenidos por VN frente al antígeno homólogo con cada uno de los 16 sueros utilizados para la selección de los sueros que conformarían el pool.

Tabla 10. Títulos de anticuerpos frente al virus homólogo

Suero (No de caravana del bovino)	Título VN
41	2,04
42	2,26
43	1,73
44	1,54
45	1,68
46	1,91
47	2,34
48	1,71
49	1,69
50	2,05
51	2,09
52	1,9
53	1,64
54	1,47
55	2,1
56	2,22

Como se puede observar, hay diferencia entre los títulos individuales los cuales varían en valores de 1,47 a 2,34. El mínimo de sueros que debe conformar un pool según el manual de OIE es de 5. Los mismos deben poseer un título alto / medio alto. En este caso, para el serotipo "O", el pool se confeccionó con los sueros caravana número 41-42-47-55-56. Para el caso de O1/Campos, y tomando como referencia correlaciones previas (Olascoaga y cols., 1991), una EPP del 75% se corresponde con un título neutralizante de 1,65. En este sentido, títulos aproximadamente de entre 2,00 y 2,40 se consideraron apropiados para la constitución del pool.

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

Una vez constituido el pool, se procedió a determinar el título neutralizante tanto frente a la cepa vacunal (homóloga) como a las cepas de campo (heterólogas). En la tabla 11 se muestran los valores de los ensayos individuales, así como el promedio de los títulos neutralizantes correspondientes, que resultaron en 2,24 y 2,40 para la cepa homóloga (ensayos 1-6 y 5-11, respectivamente); 1,64 para O/Corrientes/Arg/06 y 1,32 para la cepa O/San Pedro/Par/11. Los valores r_1 calculados a partir de estos títulos fueron 0,13 y 0,18 para O/San Pedro/Par/11 y O/Corrientes/Arg/06, respectivamente, indicando que las muestras de campo mencionadas son antigénicamente alejadas de la cepa vacunal. Para el caso de las cepas de campo del año 2000, los títulos neutralizantes promedio para la cepa homóloga fueron de 2,40 (resultado promedio de (ensayos 3, 11 y 12); y 2,04 para la cepa O/Misiones/Arg/00 y 2,06 para la cepa O/Corrientes/Arg/00 llevando a valores de r_1 de 0,45 y 0,48 respectivamente, indicando una mayor relación antigénica con la cepa vacunal, que la registrada para las cepas O/Corrientes 2006 y O/Paraguay 2011.

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

Tabla 11. Títulos de VN y valores r1

Virus	O1/CAMPOS	O/CORRIENTES/ARG/06	O/SAN PEDRO/PAR/11	O/MISIONES/ARG/00	O/CORRIENTES/ARG/00				
Ensayo	Título Neutralizante	Título Neutralizante	r₁	Título Neutralizante	r₁	Título Neutralizante	r₁	Título Neutralizante	r₁
VN1	2,67	1,66	0,10						
VN2	2,38	1,7	0,21						
VN3	2,28	1,71	0,27			1,91	0,43	2,11	0,68
VN4	2,45	1,62	0,15						
VN5	2,14	1,33	0,15	1,08	0,09				
VN6	2,49	1,79	0,20	1,63	0,14				
VN7	2,28			1,22	0,09				
VN8	2,47			1,64	0,15				
VN9	1,91			0,91	0,10				
VN10	1,98			1,32	0,22				
VN11	2,40			1,43	0,11	2,03	0,43	2,00	0,40
VN12	2,51					2,20	0,49	2,08	0,37
PROMEDIO (1 A 6)	2,40	1,64	0,18						
DS	0,18	0,16	0,06						
PROMEDIO (5 A 11)	2,24			1,32	0,13				
DS	0,23			0,27	0,05				
PROMEDIO	2,40					2,04	0,45	2,06	0,48
DS	0,12					0,15	0,03	0,06	0,17

9.5.1.2. Expectativa porcentual de protección (EPP):

Adicionalmente a la prueba que relaciona títulos heterólogos frente a títulos homólogos (r_1), una prueba indirecta utilizada para evaluar la capacidad protectora de una vacuna es el ensayo que permite inferir en forma más directa que el r_1 , la probabilidad con la que un grupo de bovinos vacunados serían protegidos al desafío con 10.000 dosis infectivas de virus vacunal, llamada prueba de Expectativa de Protección Podal (EPP).

Se calculó la EPP, tanto para el virus homólogo como para las cepas heterólogas a partir de los valores individuales de los títulos de virusneutralización obtenidos. Se utilizaron tres grupos de 16 sueros de animales vacunados con tres vacunas y esquemas de vacunación diferentes: 16 sueros de animales vacunados con vacuna monovalente O1/Campos y sangrados a 30DPV; 16 sueros de animales vacunados con vacuna trivalente (O1/Campos, A24/Cruzeiro y C3/Indaial) sangrados a 79 DPV, y 16 sueros de animales vacunados con vacuna trivalente (O1/Campos, A24/Cruzeiro y C3/Indaial), revacunados a 30DPV y sangrados a 79 DPRV.

En las tablas 13, 14 y 15 se muestran los valores individuales y el promedio de los títulos obtenidos con los tres grupos de 16 sueros, según los esquemas indicados anteriormente. Este promedio del título neutralizante es el que se utiliza para extrapolar el valor de EPP, utilizando las tablas de correlación (como se explicó en materiales y métodos).

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

Tabla 12. Títulos neutralizantes individuales, promedio y desvío standard (DS) de sueros de bovinos vacunados con vacuna monovalente O1/Campos y sangrados a 30 DPV, enfrentados con los virus indicados

Suero (No de caravana del bovino)	O1/CAMPOS	O/Corrientes/Arg/06	O/SanPedro/Par/11	O/Corrientes/Arg/00	O/Misiones/Arg/00
41	2,04	1,33	1,27	1,36	1,69
42	2,26	1,32	1,25	1,67	1,99
43	1,73	1,37	1,29	1,6	1,62
44	1,54	1,33	1,22	1,26	1,32
45	1,68	1,36	1,36	1,34	1,47
46	1,91	1,34	1,21	1,47	1,62
47	2,34	1,32	1,24	1,82	2,02
48	1,71	1,29	1,32	1,3	1,47
49	1,69	1,33	1,32	1,34	1,51
50	2,05	1,3	1,25	1,43	1,54
51	2,09	1,31	1,21	1,42	1,55
52	1,9	1,28	1,25	1,44	1,6
53	1,64	1,26	1,38	1,31	1,33
54	1,47	1,33	1,4	1,29	1,26
55	2,1	1,33	1,33	1,57	1,52
56	2,22	1,29	1,28	1,54	2,22
PROMEDIO	1,90	1,32	1,29	1,45	1,61
DS	0,27	0,03	0,06	0,16	0,26

Como se puede observar, para el grupo de bovinos primovacunados sangrados a 30 DPV (tabla 12), el promedio de los títulos de los sueros fue de 1,90 cuando se enfrentaron con la cepa homóloga (vacunal), correspondiendo a una EPP de 87,37%. Los títulos obtenidos cuando se enfrentaron con virus heterólogos resultaron considerablemente menores: 1,29, 1,32, 1,45 y 1,61 para los virus O/San Pedro/Par/11, O/Corrientes/Arg/06, O/Corrientes/Arg/00 y para O/Misiones/Arg/00 respectivamente correspondiendo a valores de EPP de 48,87%, 50,52%, 61,6% y 71,66%. Estos valores se encuentran por debajo del valor de corte establecido (75% equivalente a un título de 1,65) para el cual se espera protección.

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

Es importante señalar que los datos para la cepa homóloga indicaron una apropiada potencia de la vacuna (Título neutralizante de 1,90 y una EPP correspondiente de 87,37%)

Tabla 13. Títulos neutralizantes de sueros individuales vacunados con vacuna tetravalente O1/Campos, C/3/indaial y A/24/cruzeiro y A/Argentina/2001 sangrados a 79 DPV.

Suero (No de caravana del bovino)	O1/CAMPOS	O/Corrientes/Arg/06	O/SanPedro/Par/11	O/Corrientes/Arg/00	O/Misiones/Arg/00
322	1,94	1,47	1,34	1,43	1,62
323	2,46	1,76	1,49	1,95	1,97
324	2,31	2,09	2,02	2,43	2,27
325	2,48	1,97	1,57	2,16	1,92
326	2,34	1,72	1,57	1,74	1,76
327	2,14	1,72	1,57	1,67	1,51
328	2,46	2,16	1,79	2,41	2,43
329	2,34	1,91	1,79	1,82	2,35
330	2,24	1,84	1,57	1,93	2,02
331	2,44	2,05	2,02	2,16	2,35
332	2,4	1,92	1,79	2,19	2,44
333	1,58	1,41	1,41	1,43	1,89
334	2,44	1,78	1,64	2,21	2,37
335	2,17	1,97	1,72	2,09	2,12
336	2,41	2,06	2,09	1,31	1,27
337	2,45	2,04	1,79	2,15	2,16
PROMEDIO	2,29	1,87	1,70	1,94	2,03
DS	0,24	0,21	0,22	0,35	0,35

Para el grupo de sueros de bovinos vacunados con vacuna tetravalente y sangrados a 79 DPV (tabla 13), los promedios de los títulos neutralizantes obtenidos fueron de 1,70, 1,87, 1,94 y 2,03 para los virus O/San Pedro/Par/11, O/Corrientes/Arg/06, O/Corrientes/Arg/00 y O/Misiones/Arg/00 respectivamente, correspondiendo a valores de EPP de 78,15%, 86,63%, 88,76% y 91,8. Esto nos indica que se podría esperar una protección satisfactoria cuando se utiliza una vacuna

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

tetravalente luego de transcurridos 79DPV. El título neutralizante para la cepa homóloga fue de 2,29 correspondiente a una EPP de 96,28%.

Tabla 14. Títulos neutralizantes de sueros individuales vacunados con vacuna trivalente O1/Campos, C3/indaial y A24/cruzeiro y sangrados a 79 DPRV.

Suero (No de caravana del bovino)	O1/CAMPOS	O/Corrientes/Arg/06	O/SanPedro/Par/11	O/Corrientes/Arg/00	O/Misiones/Arg/00
4951	2,04	1,97	1,87	2,2	1,95
4952	1,76	1,39	1,87	1,99	1,78
4953	1,49	1,33	1,64	1,56	1,45
4954	1,75	1,37	1,64	1,78	1,5
4955	2,22	1,86	1,57	2,06	2,28
4956	2,19	1,98	1,94	2,29	2,12
4957	2,43	2,06	2,17	2,35	2,28
4958	2,26	1,72	1,72	2,11	2,19
4959	1,93	1,57	1,94	2,1	1,77
4960	2,43	2,28	2,32	2,18	1,77
4961	2,32	1,84	1,94	2,28	2,14
4962	2,03	1,68	1,79	2,03	1,89
4963	1,84	1,67	1,57	1,92	1,69
4964	2,18	2,07	1,94	2,29	1,96
4965	2,04	1,74	1,87	2,26	2,27
4968	1,85	1,52	1,94	1,96	1,87
PROMEDIO	2,05	1,75	1,86	2,09	1,93
DS	0,27	0,28	0,20	0,21	0,27

Se estimó la EPP utilizando un grupo de animales revacunados con vacuna trivalente sangrados a 79 DPRV (Tabla 14). El promedio del título neutralizante para la cepa vacunal resultó 2,05 correspondiendo a una EPP de 91,9%. Los títulos neutralizantes obtenidos con las cepas de campo fueron 1.86, 1.75, 2.09 y 1.93 para los virus O/SanPedro/Par/11, O/Corrientes/Arg/06, O/Corrientes/Arg/00 y O/Misiones/Arg/00 respectivamente, con valores correspondientes de EPP de 85.84%, 89.4%, 93.45% y 88.42% indicando una protección apropiada.

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

En el Gráfico 1 y Tabla 15 se resumen los valores del promedio de título y de EPP para los virus estudiados con cada grupo de sueros.

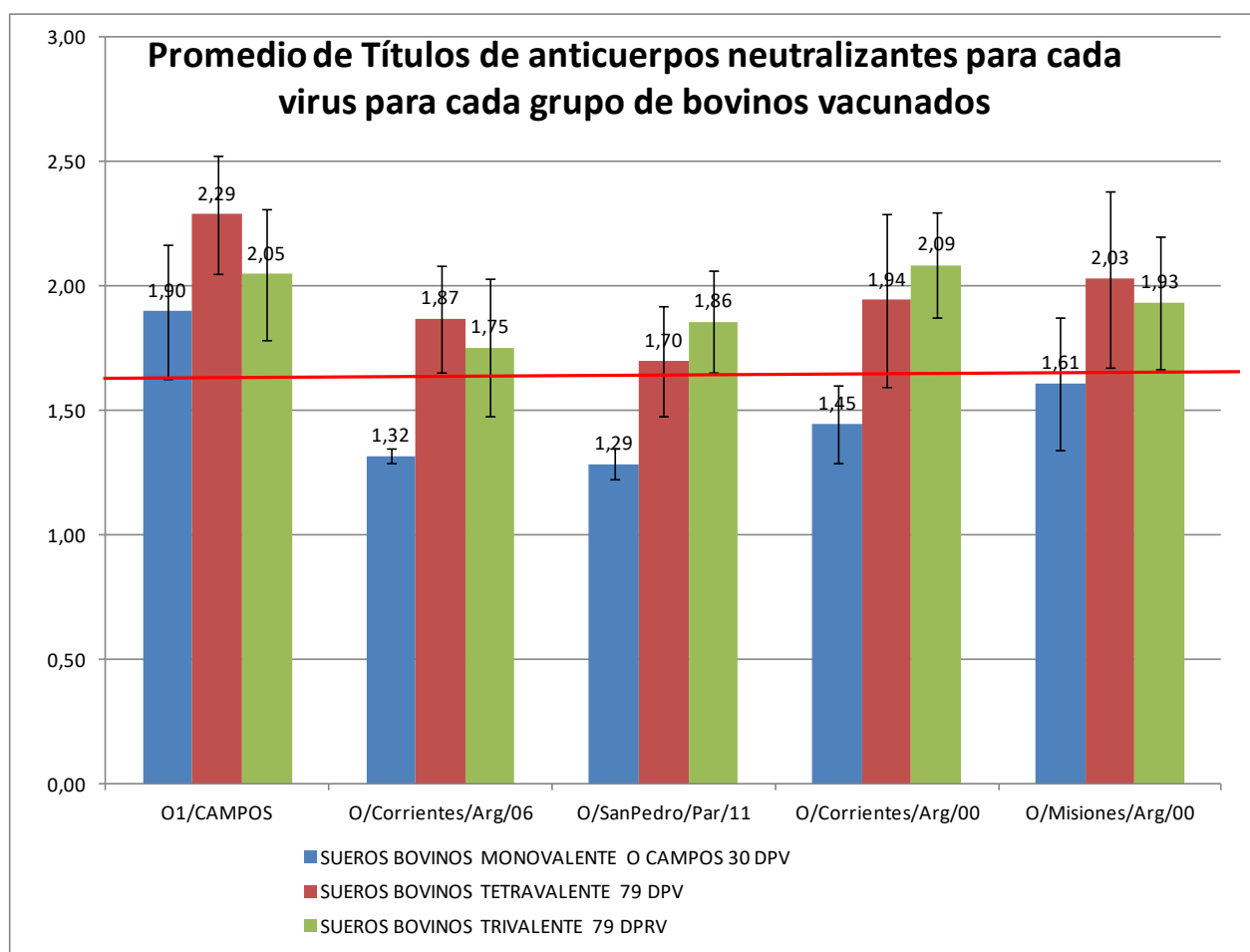


Gráfico 1. Representación gráfica de Títulos de anticuerpos neutralizantes por virus según cada grupo de bovinos vacunados.

La línea horizontal roja indica el título correspondiente a 1.65 que es equivalente a una EPP del 75% para la cepa O1/Campos.

Tabla 15. Titulo neutralizante promedio y EPP estimado para el virus homólogo.

Virus	TITULO NEUTRALIZANTE			EPP(%)		
	30 DPV	79 DPV	79 DPRV	30 DPV	79 DPV	79 DPRV
O1/Campos	1,90	2,29	2,05	87,37	96,28	91,9
O/San Pedro/Par/11	1,29	1,7	1,86	48,87	78,15	85,84
O1/Campos	1,90	2,29	2,05	87,37	96,28	91,9
O/Corrientes/Arg/06	1,32	1,87	1,95	50,52	86,63	89,4
O1/Campos	1,90	2,29	2,05	87,37	96,28	91,9
O/Corrientes/Arg/00	1,45	1,94	2,09	61,06	88,76	93,45
O1/Campos	1,90	2,29	2,05	87,37	96,28	91,9
O/Misiones/Arg/00	1,61	2,03	1,93	72,66	91,8	88,42

Como puede observarse, si bien a 30 DPV la protección con vacuna monovalente no fue satisfactoria, cuando se evaluó a 79 DPV utilizando vacuna tetravalente o en bovinos revacunados con vacuna trivalente se alcanzó una protección satisfactoria

9.6. Prueba de Generalización Podal

Los resultados obtenidos mostraron que las cepas causantes de las últimas emergencias estaban dentro de un único linaje genético alejado de la cepa vacunal. A partir del estudio con AcM se observó un perfil antigénico diferente de estas cepas con la cepa vacunal siendo el aislamiento O/SanPedro/Par/11-11 la que presentaba las diferencias más marcadas. Este resultado se refuerza con los bajos valores de relación r_1 (0,13) y de EPP (48,87%) para vacuna monovalente O1/Campos a 30 DPV que sugerirían la falta de protección de dicha cepa con la vacuna en uso. Estas observaciones fueron la base para la selección de esta cepa para realizar los estudios de desafío.

Se llevaron a cabo dos pruebas independientes utilizando las vacunas comerciales de uso oficial, una tetravalente y otra trivalente, descritas en la sección anterior donde se muestran los resultados de virusneutralización.

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

Se detallan en la tabla 16 los resultados de protección de bovinos vacunados con la vacuna tetravalente y desafiados con la cepa de campo O/SanPedro/Par/11-11 a 79 DPV. Como puede observarse 12 animales de 16 resultaron protegidos al desafío arrojando una protección del 75% para un grupo de bovinos vacunados con una dosis de vacuna comercial tetravalente conteniendo como parte de los antígenos al virus O1/Campos, 79 días post vacunación.

Tabla 16. Protección de bovinos vacunados con vacuna tetravalente desafiados con 10000 DIB de la cepa O/SanPedro/Par/11-11 realizada 79 días post vacunación y EPP esperada.

CARAVANA	O1/CAMPOS	O/SanPedro/Par/11	DESCARGA O/SanPedro/Par/11
322	1,94	1,34	NP
323	2,46	1,49	P
324	2,31	2,02	P
325	2,48	1,57	P
326	2,34	1,57	NP
327	2,14	1,57	P
328	2,46	1,79	P
329	2,34	1,79	P
330	2,24	1,57	NP
331	2,44	2,02	P
332	2,4	1,79	P
333	1,58	1,41	NP
334	2,44	1,64	P
335	2,17	1,72	P
336	2,41	2,09	P
337	2,45	1,79	P
PROMEDIO	2,29	1,70	12/16=75%
DS	0,24	0,22	
EPP	96,28%	78,15%	

NP= No Protegido y P= Protegido.

Asimismo, se evaluó la protección de los bovinos vacunados con vacuna trivalente y desafiados con la cepa de campo a 79 DPRV. Como puede observarse en la tabla 17, en este caso se alcanzó un valor de protección de 87,5% (14 animales protegidos de 16 estudiados).

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

La potencia de las vacunas utilizadas para estos ensayos fue confirmada mediante ELISA de fase líquida y su correspondiente correlación con un valor de EPP (datos no mostrados) para el virus homólogo, resultó en una EPP de 96,7%, coincidiendo con el valor obtenido por VN de 2,29 (EPP 96,28%), de la tabla anterior. Es importante recordar que las curvas de regresión logística utilizadas para los tests de potencia para el virus O1/Campos han registrado que un título neutralizante de 1,65 se corresponde con una EPP del 75% para el virus homólogo (PANAFTOSA, 1994). Este porcentaje de protección es el valor límite para considerar una protección adecuada en el grupo de animales evaluados con sueros obtenidos a los 30 días post vacunación.

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

Tabla 17. Discriminación de protección de los bovinos vacunados con vacuna trivalente a la descarga con 10000 DIB de la cepa O/SanPedro/Par/11-11 realizada a 79 días post revacunación.

CARAVANA	O1/CAMPOS	O/SanPedro/Par/11	DESCARGA CON O/SanPedro/Par/11
4951	2,04	1,87	P
4952	1,76	1,87	P
4953	1,49	1,64	NP
4954	1,75	1,64	NP
4955	2,22	1,57	P
4956	2,19	1,94	P
4957	2,43	2,17	P
4958	2,26	1,72	P
4959	1,93	1,94	P
4960	2,43	2,32	P
4961	2,32	1,94	P
4962	2,03	1,79	P
4963	1,84	1,57	P
4964	2,18	1,94	P
4965	2,04	1,87	P
4968	1,85	1,94	P
PROMEDIO	2,05	1,86	14/16= 87,5%
DS	0,27	0,20	
EPP	91,9%	85,84%	

NP= No Protegido y P= Protegido.

Como puede observarse la protección "in vivo" estuvo siempre por arriba del 75% indicando que la cepa vacunal bajo estas condiciones estaría protegiendo a los animales ante la infección con O/San Pedro/Par/11. Para el caso de los animales revacunados la protección asciende a 87.5% lo cual es esperable a partir de los datos de protección de los animales vacunados con vacuna tetravalente a 79 días post vacunación.

Es interesante observar que, de los 32 animales desafiados (16 animales vacunados y 16 animales revacunados), 20 animales presentaron títulos neutralizantes por sobre el valor límite de 1,65 que se corresponde con una EPP del 75% para el virus homólogo. Todos estos animales estuvieron protegidos luego del desafío. Los 6 animales que no estuvieron protegidos al desafío viral presentaron siembre títulos neutralizantes menores a 1,65.

9.8. Aptitud de las cepas de campo como antígeno vacunal:

Considerando los r1 y EPP a partir de los cuales se podría inferir que la vacuna no protegería en primovacunados eficazmente para O/Corrientes/Arg/06 y O/SanPedro/Par/11, fue de interés estudiar el comportamiento de estos virus para su eventual incorporación en un banco de vacunas.

Para estudiar el potencial como cepas candidatas vacunales se analizaron; el rendimiento viral, la producción de masa antigénica y la estabilidad de las cepas a 37°C. Como puede observarse en la tabla 18 la cepa O/SAN PEDRO/PAR/11 mostró mejor rendimiento viral que la O/Corrientes/Arg/06, sin embargo, la producción de masa antigénica que ofrece O/SanPedro/Par/11 es demasiado escasa como para considerarla una cepa escalable. Estos resultados indicarían que O/SanPedro/Par/11 no sería una cepa adecuada como para considerarla un posible antígeno vacunal.

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

Tabla 18. Aptitudes estudiadas para las cepas como candidatas vacunales.

+++ : Levanta toda la monocapa y en diluciones más altas se observa el típico ECP de FA en racimo de uvas. ++ : Se observan células redondeadas. No llega a levantar toda la monocapa. n/d No determinado.

VIRUS	O1/CAMPOS	O/SAN PEDRO/PAR/11	O/CORRIENTES/Arg/06
Pasaje del ensayo	III	III	III
ECP	+++	+++	++
TÍTULO OBTENIDO EN MULTICAPA (DICT50% /ml)	10 ^{7.94}	10 ^{7.5}	10 ^{6.0}
MOI con 100% de desprendimiento monocapa	1:1000	1:1000	1:1000
horas hasta desprendimiento total	14	14	14
MASA ANTIGENICA 140 s (ug/ml)	6,8	<1.2	3,8

Asimismo, se evaluó la estabilidad de las cepas estudiadas a 37°C. Para cada cepa parte del pasaje en monocapa titulado, se alicuotó en diferentes crioviales y a diferentes tiempos (ver gráfico 2) se congeló y posteriormente tituló. Se observó que la estabilidad para la cepa vacunal fue la mejor a lo largo del tiempo, siendo de menor estabilidad las cepas de los aislamientos. Se podría inferir que la cepa O/SanPedro/Par/11 tiene una menor estabilidad, pudiendo observa una caída del título viral en forma más abrupta y esto coincide con la escasa masa antigénica obtenida tras su inactivación a 37°C.

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

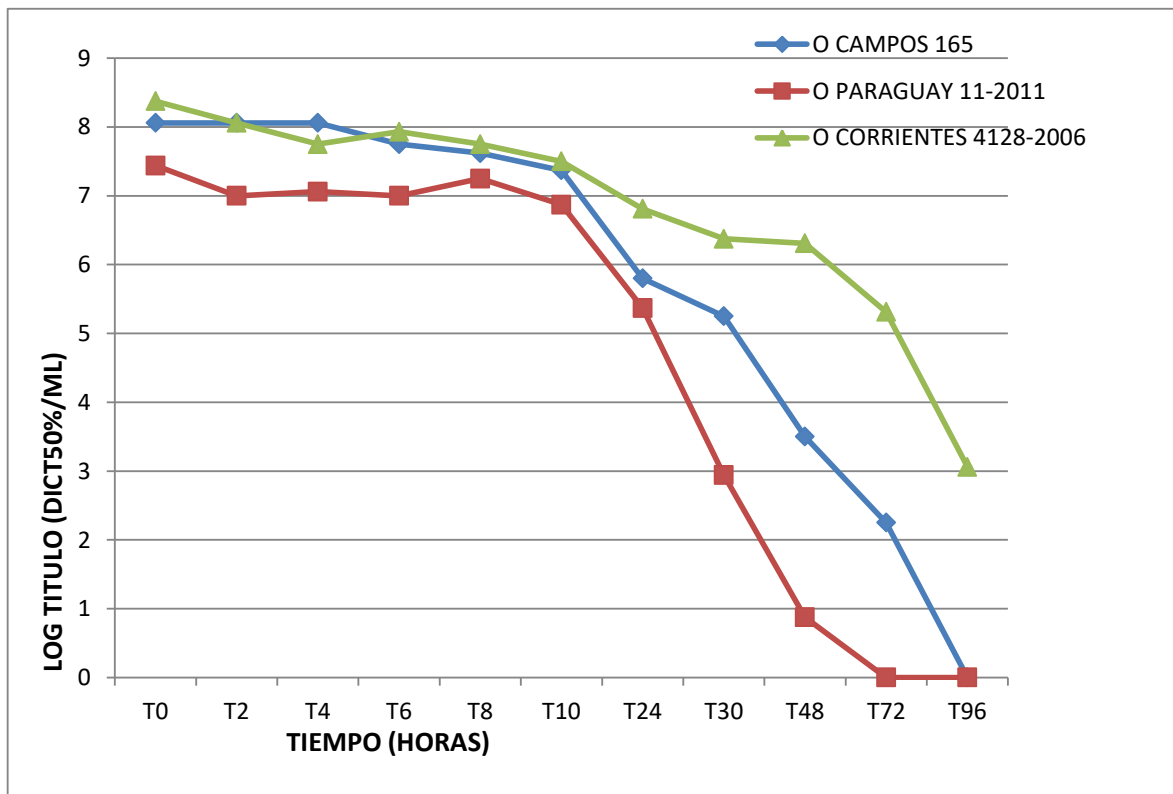


Gráfico 2. Estabilidad de cepas a 37°C.

Se indica el título en DICT50%/ML según las horas de la suspensión viral incubada.

10. Discusión

La reintroducción de la fiebre aftosa en diferentes regiones del Cono Sur de América del Sur, zonas que ya habían sido declaradas por la OIE como libres de la enfermedad, ha tenido un severo impacto en el comercio local y la exportación de animales susceptibles y sus productos. Una profunda caracterización antigénica y genética de las cepas, su distribución y evolución, y en particular la evaluación de la probable eficacia de la cepa de la vacuna actualmente en uso, es sumamente importante para controlar la FA. Este último dato es decisivo para evaluar hasta qué punto las vacunas utilizadas o cepas vacunales almacenadas en los Bancos de Antígenos y Vacunas, son adecuadas para controlar la enfermedad en regiones endémicas, para uso en áreas libres con vacunación preventiva, o para la vacunación ante emergencias después de la introducción del virus en regiones libres, en cuyo caso la obtención de una inmunidad rápida es crítica. La selección o eventual actualización apropiada de la cepa vacunal, es un elemento importante de control tanto cuando se aplican programas sistemáticos de vacunación, como para la confección y mantenimiento de reservas de bancos de antígenos de vacunas para utilizar ante posibles emergencias. Por otro lado, y considerando que la formulación de una nueva vacuna que incluya nuevas cepas o sustituya las cepas en uso, es un proceso largo y costoso, la decisión de incluir o no una nueva cepa, debe sustentarse en una batería de resultados "in vitro" que incluyan amplios estudios de parentesco genético, antigénico e inmunogénico que orienten a la ejecución de pruebas "in vivo", junto con los datos epidemiológicos y las observaciones de los brotes registrados.

El presente estudio describe por primera vez, información extensa tanto de la caracterización genética, como antigénica de los virus de FA subtipo O re-emergentes en áreas ya libres del Cono Sur de América del Sur. Asimismo, se llevó a cabo la evaluación de la concordancia vacunal (vaccine matching), incluyendo ensayos "in vitro" y el desafío "in-vivo" mediante la prueba de generalización podal, en particular, para la cepa O/SanPedro/Par/11, responsable de la última ocurrencia en la región.

Los resultados descritos constituyen un aporte importante para la comprensión de las re-emergencias que tuvieron lugar en esta región entre los años 2000 y 2011, a pesar de haberse registrado una buena cobertura vacunal en la región.

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

Los primeros estudios se orientaron a la caracterización genética de los virus responsables de las emergencias mencionadas y a su comparación con la de otros virus epidemiológicamente relevantes de la región, virus extra regionales y con la cepa vacunal en uso.

El análisis filogenético basado en la secuencia de VP1 completa, indica que todos los virus responsables de las re-emergencias que se produjeron dentro de un período de 11 años en diversas regiones libres de FA en el Cono Sur de América del Sur se encuentran agrupados en un único linaje. Los mismos presentan una diferencia de aproximadamente 18% con la cepa de la vacuna, y difieren de aquellos virus que actualmente circulan en la Región Andina, reflejando los diferentes circuitos pecuarios y escenarios epidemiológicos.

Las relaciones genéticas encontradas entre los aislamientos responsables de estas emergencias que, si bien se agrupan en un único linaje, muestran parentescos genéticos entrecruzados y no solamente cambios progresivos en el tiempo, sugieren la existencia de una variante que, aunque aparece esporádicamente, se ha mantenido activa y evoluciona a lo largo de al menos 11 años, apoyando la idea de que el virus activo está presente en nichos restringidos y re-emerge como un nuevo brote cuando alcanza una población con bajos niveles de inmunidad contra el virus de campo. Esto se visualiza particularmente en las dos variantes registradas en Misiones y Corrientes en el año 2000. Esta situación en una región libre con vacunación sistemática que es aplicada bajo una gestión rigurosa, no sólo refuerza la necesidad de fortalecer la vigilancia activa orientada a identificar eventuales nichos virales, sino también recuerda la necesidad de evaluar en profundidad la eficacia de los programas de vacunación, incluyendo la evaluación de la protección conferida por el virus de la vacuna a la variante actuante en el campo.

Los resultados de secuenciación son apropiados para realizar un seguimiento epidemiológico, siendo relevantes para proporcionar información sobre las posibles fuentes de cepas causantes de los brotes.

Por otro lado, los resultados indican cambios cuantitativos y cualitativos de los virus de campo en comparación con la cepa de la vacuna, que se traducen en cambios a nivel de aa particularmente dirigidos a sitios antigénicos los cuales podrían sugerir la falta de protección cruzada entre la cepa de la vacuna en uso y la cepa de campo.

Sin embargo, no es posible en la actualidad predecir en forma inequívoca el impacto que los cambios genéticos y de aminoácidos tienen en el comportamiento antigénico de los virus (Paton y cols., 2005). De hecho, se ha reportado que aislamientos virales bastante alejados genéticamente pueden tener características antigénicas similares (Barnett y cols., 2001; Hernández y cols., 1992; Samuel y cols., 1988). Por otro lado, virus similares genéticamente podrían enmascarar grandes diferencias antigénicas (Crowther, 1993; Maradei y cols., 2011; Mateu y cols., 1996, 1990).

Consecuentemente, se llevaron a cabo estudios para evaluar el grado de relación antigénica de los virus de campo con la cepa vacunal. Se ha demostrado que el uso de un panel de AcM constituye un instrumento rápido y sensible para evaluar diferencias antigénicas (Maradei y cols., 2011; Mattion y cols., 2004; Seki y cols., 2009).

Utilizando un panel de AcMs cuyo perfil de reactividad con la cepa vacunal es conocido, se llevó a cabo la evaluación del perfil de reactividad y la determinación del coeficiente de correlación con las distintas cepas de campo y la vacunal. Los resultados indicaron, en concordancia con el análisis filogenético, bajos niveles de relación antigénica entre las cepas de campo y la cepa utilizada en la formulación de la vacuna.

En líneas generales, los resultados obtenidos, prevén que han tenido lugar cambios con respecto a la cepa utilizada en la formulación de la vacuna, que justifican la necesidad de realizar ensayos dirigidos a evaluar en qué medida la cepa de vacuna actualmente en uso, O1/Campos, protegerá contra los virus en el campo.

En este sentido, se llevaron a cabo ensayos indirectos para inferir la capacidad de protección de las vacunas mediante la medición de la relación inmunológica entre las cepas de virus evaluadas con paneles conocidos de sueros de animales vacunados a 30 DPV (valores r_1), así como mediante la estimación de la probabilidad de que el ganado este protegido contra un desafío de 10.000 dosis infectivas después de la vacunación (cálculos EPP).

Los resultados mostraron valores r_1 debajo del umbral de 0,3, para las cepas O/SanPedro/Par/11 y O/Corrientes/Arg/06, lo que indica un bajo grado de parentesco

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

entre el O1/ Campos y ambos virus de campo sugiriendo que es poco probable que la cepa de la vacuna proteja eficazmente a los aislamientos de campo. Para las cepas del año 2000 se observaron valores r_1 mayores (0,45 para O/Misiones/Arg/00 y 0,48 para O/Corrientes/Arg/00), indicando una esperable protección vacunal.

Cabe mencionar que se ha encontrado considerable variabilidad y falta de precisión en los valores de concordancia vacunal obtenidos mediante la determinación del valor r_1 establecido en diferentes laboratorios. Esto puede tener varias causas. En primer lugar, la preparación de los pools de sueros de referencia y el uso de diferentes pools para la misma cepa vacunal puede generar una variabilidad considerable en los valores obtenidos en distintos laboratorios (Paton y cols., 2005). En principio, el capítulo de FA del manual de enfermedades terrestres de la OIE, determina que deberían utilizarse títulos medio a altos. Por otro lado, las pruebas utilizadas no siempre se encuentran exhaustivamente estandarizadas en los diferentes laboratorios en donde se ejecutan, llevando a una variabilidad considerable. En este sentido, es aconsejable realizar seriadas repeticiones para obtener una estimación más precisa. A pesar de estos inconvenientes la estimación del valor r_1 realizada en condiciones estandarizadas, como las referidas en éste trabajo, permitió obtener resultados no solo compatibles con los estudios genéticos y antigénicos preliminares, sino también con los subsiguientes análisis de protección heteróloga.

Un punto a tener en cuenta es que los títulos de anticuerpos necesarios para conferir un adecuado nivel de protección pueden variar entre las diferentes cepas virales, por lo tanto, las estimaciones de r_1 son orientativas y deben utilizarse dentro de un algoritmo de pruebas.

En América del Sur se utiliza la expectativa de protección (EPP) como una estimación más directa para determinar la capacidad de protección de una vacuna frente a una cepa de campo. La EPP relaciona directamente los títulos (neutralizantes o por ELISA en fase líquida) a la probabilidad de que los bovinos vacunados estén protegidos a un desafío con 10000 dosis infectantes después de la vacunación. Este valor de EPP se obtiene a

partir de tablas de correlación preexistentes que relacionan los títulos de anticuerpos con la protección.

En concordancia con los resultados de r_1 , los cálculos de EPP también revelaron para los virus de campo O/SanPedro/Par/11 y O/Corrientes/Arg/06 una baja respuesta protectora y una mayor respuesta para O/Misiones/Arg/00 y O/Corrientes/Arg/00 por la vacuna que contiene la cepa O1/Campos, cuando se evalúa 30 días después de la vacunación. Sin embargo, cuando se analizaron sueros de animales colectados a 79 días después de la vacunación, se observó una respuesta protectora aumentada, con valores de EPP que sugieren una protección satisfactoria. Como era de esperar, todos los aislamientos mostraron un aumento de la EPP después de la revacunación.

Los valores estimados de EPP deben tomarse con precaución. Aunque el cálculo de EPP se ha descrito para estimar la concordancia vacunal (Paton y cols., 2005), sus tablas se basan en la asociación de títulos de anticuerpos a los 30 DPV para protección homóloga contra la cepa de la vacuna, y podría no ser estrictamente válida para diferentes condiciones en las que fueron establecidas, como para cepas heterólogas, o para sueros de animales sangrados a diferentes días después de vacunación o revacunación, o diferente calidad de la vacuna, etc.

De todos modos, la experiencia acumulada en varios años en América del Sur (Maradei y cols., 2012, Maradei y cols., 2013) indica que bovinos que presentan títulos de VN mayores a 1,65 ($EPP \geq 75\%$) para las cepas tipo O, desafiados con virus heterólogo, están protegidos.

Si bien los resultados obtenidos de las pruebas de concordancia vacunal "in vitro" sugerían una protección apropiada a 79 DPV, era importante confirmar las inferencias a partir del desafío "in vivo" que continúa siendo la prueba de oro, o sea la más confiable para evaluar la capacidad de una cepa vacunal para proteger contra una cepa heteróloga.

Considerando que las cepas causantes de las emergencias en el Cono Sur constituían un único linaje genético alejado de la cepa vacunal, y siendo la cepa O/SanPedro/Par/11 la que presentaba las diferencias genéticas y antigénicas más marcadas y la representante de la última emergencia ocurrida, la misma fue seleccionada para el desafío en las pruebas "in vivo".

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

Para la Prueba de Generalización Podal (PGP), se vacunaron 16 animales con vacuna tetravalente y se desafiaron a los 79 DPV y, en otro ensayo, los animales se revacunaron con vacuna trivalente y se desafiaron a 79 DPRV.

Los resultados obtenidos sustentan las observaciones de los resultados "in vitro", indicando claramente el potencial de estas pruebas para predecir la protección "in vivo", y su relevancia particularmente en el contexto del bienestar animal. Se debe tener en cuenta que ninguno de los resultados tomados en forma individual deben ser la clave de una decisión a priori sino más bien a través de estos datos se evidencia la necesidad de contar con varios resultados para poder arribar a una posible conclusión.

En general, los resultados presentados refuerzan la importancia de realizar diferentes metodologías dentro de un algoritmo apropiado, capaces de evaluar desde diferentes abordajes el nivel de parentesco de las cepas de campo con respecto a los antígenos vacunales disponibles, la eventual protección conferida. Esto permite dar apoyo a la toma de decisiones de actualización/modificación de formulación de vacunas o de cepas a ser incluidas en los bancos de antígenos.

11. Conclusiones

- Los virus responsables de las re-emergencias que se produjeron en el Cono Sur de América del Sur entre los años 2000-2011 están agrupados en un único linaje.
- Se registran cambios genéticos y antigénicos con respecto a la cepa de la vacuna O1 Campos,
- Se infiere a partir de los datos de protección heteróloga "in vitro" que a 79DPV, así como en condiciones de revacunación, la cepa vacunal O1/Campo protegería ante las cepas causantes de la emergencia en el Cono Sur
- La prueba de desafío "in vivo" confirmó los resultados in vitro
- Los resultados obtenidos sustentan las observaciones de los resultados "in vitro", indicando claramente el potencial de estas últimas para predecir la protección "in vivo".
- Los estudios preliminares para evaluar la posible inclusión en un banco de antígenos de la cepa O/SanPedro/Par/11 evidenciaron que la cepa no sería escalable como antígeno vacunal.
- Ante una incursión del viru de la FA, es necesario una caracterización completa, previo a cualquier decisión. Se debe realizar una batería de ensayos in-vitro que incluyan amplios estudios de parentesco genético, antigénico e inmunogénico que orienten a la ejecución de pruebas in-vivo, junto con los datos epidemiológicos y las observaciones de los brotes registrados.

12. Relevancia del Plan propuesto

El estudio de las nuevas cepas en la región cono sur aporta conocimiento en apoyo al establecimiento de pautas y consideraciones para la toma de decisiones en marco de las actividades de control y erradicación de la FA, considerando tanto las ocasiones de re-introducción en zonas donde han acontecido brotes, así como también para la vigilancia en nuestro país.

El estudio de las nuevas cepas de campo aisladas permite evaluar la necesidad de inclusión de aquellas más apropiadas como parte del banco de antígenos y vacunas, considerando que el SENASA es un laboratorio de referencia para FA reconocido por la OIE y actúa como banco repositario de antígenos. Además, este estudio brinda un claro conocimiento de las cepas que han circulado en la región. En este contexto sería esencial que se cuente con la actualización continua de cepas que eventualmente deberían ser incorporadas a estos bancos.

Asimismo, mediante los estudios propuestos en este plan de tesis se espera contribuir a la validación de las metodologías “*in vitro*” para estudios de protección heteróloga.

13. Bibliografía citada

- Aktas S, Samuel AL. Identification of antigenic epitopes on the foot and mouth disease virus isolate O1/Manisa/Turkey/69 using monoclonal antibodies. Rev Sci Tech. 2000 Dec;19(3):744-53
- Alonso A. Manual de Diagnostico de Laboratorio de las Enfermedades Vesiculares, Panaftosa. 1986.
- Ambros V, Baltimore D. Protein is linked to the 5' end of poliovirus RNA by a phosphodiester linkage to tyrosine. J Biol Chem. 1978 Aug 10;253(15):5263-6
- Asfor AS, Upadhyaya S, Knowles NJ, King DP, Paton DJ, Mahapatra M. Novel antibody binding determinants on the capsid surface of serotype O foot-and-mouth disease virus. J Gen Virol. 2014 May;95(Pt 5):1104-16.
- Augé de Melo P, Astudillo V, Gomes I, Campos Garcia JT. Immune response of adult cattle vaccinated with oil-adjuvanted foot-and-mouth disease vaccines. Bol Cent Panam Fiebre Aftosa 1977. 26:27-9.
- Augé de Melo P, 1982. The use of oil-adjuvanted foot-and-mouth disease vaccine in endemic areas. Bol Cent Panam Fiebre Aftosa 1982. 45:33-42
- Augé de Mello P, Honigman MN, Fernandes MV, Gomes I. Further information on the survival of modified foot-and-mouth disease virus in cattle. Bull Off Int Epizoot. 1970 May-Jun;73(5):489-505.
- Bachrach HL. Foot-and-mouth disease. Annu Rev Microbiol 1968. 22:201-44.
- Bahnemann HG. Binary ethylenimine as an inactivant for foot and mouth disease and its application for vaccine production. Arch Virol 1975;47(1):47-56
- Bao W. Virulence comparison of genetic engineering virus containing different length poly(C) tract of foot-and-mouth disease virus 2008 Dec;48(12):1654-8.
- Bai X, Li P, Sun P, Li Y, Bao H, Lu Z, Cao Y, Guo J, Liu Z. Virulence comparison of genetic engineering virus containing different length poly(C) tract of foot-and-mouth disease virus. Wei Sheng Wu Xue Bao. 2008 Dec;48(12):1654-8.

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

- Baranowski E, Ruiz-Jarabo CM, Lim F, Domingo E. Foot-and-mouth disease virus lacking the VP1 G-H loop: the mutant spectrum uncovers interactions among antigenic sites for fitness gain. *Virology*. 2001 Sep 30;288(2):192-202.
- Barros JJ, Malirat V, Rebello MA, Costa EV, Bergmann IE. Genetic variation of foot-and-mouth disease virus isolates recovered from persistently infected water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Vet Microbiol*. 2007 Feb 25;120(1-2):50-62.
- Barteling SJ, Swam H. (1996). The potent aqueous and double oil emulsion foot-and-mouth disease type O1 vaccines from European Vaccine Banks probably protect against all other O1 strains. *Rep Res Gr Eur Com Contr FMD 1996*. Kibbutz Ma'ale Hachamisha (Israel), 90-96.
- Barton DJ, O'Donnell BJ, Flanagan JB. 5' cloverleaf in poliovirus RNA is a cis-acting replication element required for negative-strand synthesis. *EMBO J*. 2001 Mar 15;20(6):1439-48.
- Beard CW, Mason PW. Genetic determinants of altered virulence of Taiwanese foot-and-mouth disease virus. *J. Virol*. 2000. 74:987-991.
- Beck E, Forss S, Strebel K, Cattaneo R, Feil G. Structure of the FMDV translation initiation site and of the structural proteins. *Nucleic Acids Res*. 1983 Nov 25;11(22):7873-85.
- Beck E and Strohmaier K. Subtyping of European foot-and-mouth disease virus strains by nucleotide sequence determination. *J. Virol*. 1987. 61, 1621-1629
- Belsham GJ. Dual initiation sites of protein synthesis on foot-and-mouth disease virus RNA are selected following internal entry and scanning of ribosomes "in vivo". *EMBO J*. 1992. 11, 1105-1110
- Belsham GJ. Translation and replication of FMDV RNA. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005. 288:43-70. Review.
- Belsham GJ, Brangwyn JK. 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*. 1990 Nov;64(11):5389-95.
- Belsham GJ, Sonenberg N. RNA-protein interactions in regulation of picornavirus RNA translation. *Microbiol Rev*. 1996 Sep;60(3):499-511. Review.
- Belsham GJ, Sonenberg N. Picornavirus RNA translation: roles for cellular proteins. *Trends Microbiol*. 2000 Jul;8(7):330-5. Review. Erratum in: *Trends Microbiol* 2000 Oct;8(10):472.

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

- Bergmann IE, Malirat V, Falczuk AJ. Evolving perception on the benefits of vaccination as a foot and mouth disease control policy: contributions of South America. *Expert Rev Vaccines*. 2005 Dec;4(6):903-13.
- Berryman S, Clark S, Monaghan P, Jackson T. Early events in integrin alphavbeta6-mediated cell entry of foot-and-mouth disease virus. *J Virol*. 2005 Jul;79(13):8519-34.
- Bittle JL, Houghten RA, Alexander H, Shinnick TM, Sutcliffe JG, Lerner RA, Rowlands DJ, Brown F. Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. *Nature*. 1982 Jul 1;298(5869):30-3. No abstract available.
- Blyn LB, Towner JS, Semler BL, Ehrenfeld E. Requirement of poly(rC) binding protein 2 for translation of poliovirus RNA. *J Virol*. 1997 Aug;71(8):6243-6.
- Brito BP, Rodriguez LL, Hammond JM, Pinto J, Perez AM. Review of the Global Distribution of Foot-and-Mouth Disease Virus from 2007 to 2014. *Transbound Emerg Dis*. 2015 May 20. doi: 10.1111/tbed.12373
- Brocchi E, Bergmann IE, Dekker A, Paton DJ, Sammin DJ, Greiner M, Grazioli S, De Simone F, Yadin H, Haas B, Bulut N, Malirat V, Neitzert E, Goris N, Parida S, Sørensen K, De Clercq K. Comparative evaluation of six ELISAs for the detection of antibodies to the non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine*. 2006 Nov 17;24(47-48):6966-79. Epub 2006 May 6.
- Brooksby JB. Portraits of viruses: Foot-and-mouth disease virus. *Intervirology* 1982. 18:1-23
- Brown F. Structure-function relationships in foot-and-mouth disease virus. *Adv Exp Med Biol*. 1972;31(0):19-28.
- Burman A, Clark S, Abrescia NG, Fry EE, Stuart DI, Jackson T. Specificity of the VP1 GH loop of Foot-and-Mouth Disease virus for alphav integrins. *J Virol*. 2006 Oct;80(19):9798-810.
- Burrows R. The persistence of foot-and mouth disease virus in sheep. *J Hyg (Lond)*. 1968 Dec;66(4):633-40.
- Carrillo EC, Rojas ER, Cavallaro L, Schiappacassi M, Campos R. Modification of foot-and-mouth disease virus after serial passages in the presence of antiviral polyclonal sera. *Virology*. 1989 Aug;171(2):599-601.
- Carrillo C, Tulman ER, Delhon G, Lu Z, Carreno A, Vagnozzi A, Kutish GF, Rock DL. Comparative genomics of foot-and-mouth disease virus. *J Virol*. 2005 May;79(10):6487-504.

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

- Carroll AR, Rowlands DJ, Clarke BE. The complete nucleotide sequence of the RNA coding for the primary translation product of foot and mouth disease virus. *Nucleic Acids Res.* 1984 Mar 12;12(5):2461-72.
- Cartwright B, Chapman WG, Sharpe RT. Stimulation of heterotypic antigens of foot-and-mouth disease virus antibodies in vaccinated cattle. *Res Vet Sci* 1982. 32:338-42.
- Casas Olascoaga R, Gomez I, Rosenberg F J, Auge de Melo P, Astudillo V, Magallanes N. *Fiebre Aftosa.* 1º Ed. Editorial Atheneu. São Pablo. 1999
- Cavanagh D, Sangar DV, Rowlands DJ, Brown F. Immunogenic and cell attachment sites of FMDV: further evidence for their location in a single capsid polypeptide. *J Gen Virol.* 1977 Apr;35(1):149-58.
- Chatterjee NK, Polatnick J, Bachrach HL. Cell-free translation of foot-and-mouth disease virus RNA into identifiable non-capsid and capsid proteins. *J Gen Virol.* 1976 Sep;32(3):383-94.
- Chen BJ, Sung WHT, Shieh HK. Managing an animal health emergency in Taipei China: foot and mouth disease. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 1999;18(1):186-92.
- Correa Melo E, Saraiva V, Astudillo V. Review of the status of foot and mouth disease in countries of South America and approaches to control and eradication. *Rev sci tech Off Int Epiz* 2002;21 (3):429-36.
- Costa Giorni MP, Bergmann IE, Scodeller EA, Auge de Mello P, Gomes I, La Torre JL. Heterogeneity of the polyribocytidylic acid tract in aphthovirus: biochemical and biological studies of viruses carrying polyribocytidylic acid tracts of different lengths. 1984, *J Virol.* 51: 799-805
- Cottral GE, Bachrach HL. Foot-and-mouth disease viremia. *Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc.* 1968;72:383-99.
- Cottral GE, Cox BF, Baldwin DE. The survival of foot-and-mouth disease virus in cured and uncured meat. *Am J Vet Res.* 1960 Mar;21:288-97.
- Crowther JR, Rowe CA, Butcher R. Characterization of monoclonal antibodies against a type SAT 2 foot-and-mouth disease virus. *Epidemiol Infect.* 1993 Oct;111(2):391-406.
- Curry S, Fry E, Blakemore W, Abu-Ghazaleh R, Jackson T, King A, Lea S, Newman J, Stuart D. Dissecting the roles of VP0 cleavage and RNA packaging in picornavirus capsid stabilization: the structure of empty capsids of foot-and-mouth disease virus. *J Virol.* 1997 Dec;71(12):9743-52.
- Dawe PS, Flanagan FO, Madekurozwa RL, Sorensen KJ, Anderson EC, Foggin CM, Ferris NP, Knowles NJ. Natural transmission of foot-and-mouth disease virus from African buffalo

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

(*Syncerus caffer*) to cattle in a wildlife area of Zimbabwe. *Vet Rec.* 1994 Mar 5;134(10):230-2

- de Jong AS, de Mattia F, Van Dommelen MM, Lanke K, Melchers WJ, Willems PH, van Kuppeveld FJ. Functional analysis of picornavirus 2B proteins: effects on calcium homeostasis and intracellular protein trafficking. *J Virol.* 2008 Apr;82(7):3782-90.
- de la Torre JC, Martínez-Salas E, Diez J, Villaverde A, Gebauer F, Rocha E, Dávila M, Domingo E. Coevolution of cells and viruses in a persistent infection of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J Virol.* 1988 Jun;62(6):2050-8.
- Devaney MA, Vakharia VN, Lloyd RE, Ehrenfeld E, Grubman MJ. Leader protein of foot-and-mouth disease virus is required for cleavage of the p220 component of the cap-binding protein complex. *J. Virol.* 1988. 624407-4409.
- Díez J, Dávila M, Escarmís C, Mateu MG, Dominguez J, Pérez JJ, Giralt E, Melero JA, Domingo E. Unique amino acid substitutions in the capsid proteins of foot-and-mouth disease virus from a persistent infection in cell culture. *J Virol.* 1990 Nov;64(11):5519-28.
- Diez J, Mateu MG, Domingo E. Selection of antigenic variants of foot-and-mouth disease virus in the absence of antibodies, as revealed by an in situ assay. *J Gen Virol.* 1989 Dec;70 (Pt 12):3281-9.
- Doedens JR, Kirkegaard K. Inhibition of cellular protein secretion by poliovirus proteins 2B and 3A. *EMBO J.* 1995. 14, 894-907.
- Doel T. FMD Vaccines. Review. *Virus Research.* 2003. 91:81-99
- Domingo E, Schuster P. Quasispecies: From Theory to Experimental Systems. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2016. 392.
- Domingo E, Biebricher C, Eigen M, Holland JJ. Quasispecies and RNA virus evolution: principles and consequences. Landes Bioscience, Austin, TX. 2001
- Domingo E, Dávila M, Ortín J. Nucleotide sequence heterogeneity of the RNA from a natural population of foot-and-mouth-disease virus. *Gene* 1980;11;3:333-34
- Domingo E, Martín V, Perales C, Grande-Pérez A, García-Arriaza J, Arias A. Viruses as quasispecies: biological implications. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006. 299:51-82. Review.
- Drake JW, Holland JJ. Mutation rates among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Nov 23;96(24):13910-3.

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

- Eigen M, Schuster P. The hypercycle. A principle of natural self-organization. 1979. Berlin: Springer.
- Escarmís C, Carrillo EC, Ferrer M, Arriaza JF, Lopez N, Tami C, Verdaguer N, Domingo E, Franze-Fernández MT. Rapid selection in modified BHK-21 cells of a foot-and-mouth disease virus variant showing alterations in cell tropism. *J Virol*. 1998 Dec;72(12):10171-9.
- Escarmís C, Dopazo J, Dávila M, Palma EL, Domingo E. Large deletions in the 5'-untranslated region of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *Virus Res*. 1995 Feb;35(2):155-67.
- Escarmís C, Toja M, Medina M, Domingo E. Modifications of the 5' untranslated region of foot-and-mouth disease virus after prolonged persistence in cell culture. *Virus Res*. 1992 Nov;26(2):113-25.
- Falk MM, Grigera PR, Bergmann IE, Zibert A, Multhaup G, Beck E. Foot-and-mouth disease virus protease 3C induces specific proteolytic cleavage of host cell histone H3. *J Virol*. 1990 Feb;64(2):748-56.
- Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. *Virus Taxonomy*, VIIIth Report of the ICTV. 2005 Elsevier/Academic Press, London.
- Ferrer-Orta C, Arias A, Agudo R, Pérez-Luque R, Escarmís C, Domingo E, Verdaguer N. The structure of a protein primer-polymerase complex in the initiation of genome replication. *EMBO J*. 2006 Feb 22;25(4):880-8. Epub 2006 Feb 2.
- Ferrer-Orta C, Arias A, Perez-Luque R, Escarmís C, Domingo E, Verdaguer N. Structure of foot-and-mouth disease virus RNA-dependent RNA polymerase and its complex with a template-primer RNA. *J Biol Chem*. 2004 Nov 5;279(45):47212-21. Epub 2004 Aug 3.
- Flint M, Tscherne DM. Cellular receptors and HCV entry *Methods Mol Biol*. 2009;510:265-77.
- Forss S, Strebel K, Beck E, Schaller H. Nucleotide sequence and genome organization of foot-and-mouth disease virus. *Nucleic Acids Res*. 1984 Aug 24;12(16):6587-601.
- Gamarnik AV, Andino R. Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes Dev*. 1998 Aug 1;12(15):2293-304.
- Gao Y, Sun S, Guo C. Biological function of Foot-and-mouth disease virus non-structural proteins and non-coding elements. *Virology Journal*. 2016. 13:107
- Gebauer F, de la Torre JC, Gomes I, Mateu MG, Barahona H, Tiraboschi B, Bergmann I, de Mello PA, Domingo E. Rapid selection of genetic and antigenic variants of foot-and-mouth disease virus during persistence in cattle. *J Virol*. 1988 Jun;62(6):2041.

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

- Gerber K, Wimmer E, Paul AV. Biochemical and genetic studies of the initiation of human rhinovirus 2 RNA replication: identification of a cis-replicating element in the coding sequence of 2A(pro). *J Virol.* 2001 Nov;75(22):10979-90.
- Giraudo AT, Beck E, Strebel K, de Mello PA, La Torre JL, Scodeller EA, Bergmann IE. Identification of a nucleotide deletion in parts of polypeptide 3A in two independent attenuated aphthovirus strains, *Virology.* 1990. 177(2): 780-783
- Golini F, Semler BL, Dorner AJ, Wimmer E. Protein-linked RNA of poliovirus is competent to form an initiation complex of translation "in vitro". *Nature.* 1980 Oct 16;287(5783):600-3.
- Goris N, Maradei E, D Aloia RD, Fondevila N, Mattion N, Perez A, y colsy cols. Foot-and-mouth disease vaccine potency testing in cattle using homologous and heterologous challenge strains: Precision of the "Protection against Podal Generalisation" test. *Vaccine* 2008; 26:3432-7.
- Gromeier M, Bossert B, Arita M, Nomoto A, Wimmer E. Dual stem loops within the poliovirus internal ribosomal entry site control neurovirulence. *J Virol.* 1999. 73:958-964.
- Grubman, MJ & Baxt, B. Foot and mouth disease. *Clin Microbiol Rev.* 2004 Apr;17(2):465-93.
- Heath L, Van der Walt E, Varsani A, Martin D. Recombination Patterns in Aphthoviruses Mirror Those Found in Other Picornaviruses. *J Virol,* 2006; 80 (23): 11827-11832.
- Hedger RS. Observations on the carrier state and related antibody titres during an outbreak of foot-and-mouth disease. *J Hyg (Lond).* 1970 Mar;68(1):53-60.
- Hernhndez J, Martinez MA, Rocha E, Domingo E, Mateu M. Generation of a subtype-specific neutralization epitope in foot-and-mouth disease virus of a different subtype. *Journal of General Virology* (1992), 73, 213-216.
- Herold J, Andino R. Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. *Mol Cell.* 2001 Mar;7(3):581-91.
- Huang CC, Lin MH, Lin SY.,. Characteristics of foot-and-mouth disease virus in Taiwan. *J. Vet. Med. Sci.* 2000;62; 677-679.
- Hughes GJ, Mioulet V, Kitching RP, Woolhouse ME, Alexandersen S, Donaldson AI. Foot-and-mouth disease virus infection of sheep: implications for diagnosis and control. *Vet Rec.* 2002 Jun 8;150(23):724-7. Review
- Hyslop NS, Fagg RH. Isolation of variants during passage of a strain of foot-and-mouth disease virus in partly immunized cattle. *J Hyg (Lond)* 1965 Sep;63(3):357-368.

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

- Jang SK, Wimmer E. Cap-independent translation of encephalomyocarditis virus RNA: structural elements of the internal ribosomal entry site and involvement of a cellular 57-kD RNA-binding protein. *Genes Dev.* 1990 Sep;4(9):1560-72.
- King AM, Sangar DV, Harris TJ, Brown F. Heterogeneity of the genome-linked protein of foot-and-mouth disease virus. *J Virol.* 1980 Jun;34(3):627-34.
- Klump WM, Bergmann I, Müller BC, Ameis D, Kandolf R. Complete nucleotide sequence of infectious Coxsackievirus B3 cDNA: two initial 5' uridine residues are regained during plus-strand RNA synthesis. *J Virol.* 1990 Apr;64(4):1573-83.
- Knipe T, Rieder E, Baxt B, Ward G, Mason PW. Characterization of synthetic foot-and-mouth disease virus provirions separates acid-mediated disassembly from infectivity. *J Virol.* 1997 Apr;71(4):2851-6.
- Knowles NJ, Wadsworth J, Bachanek-Bankowska K, King DP. VP1 sequencing protocol for foot and mouth disease virus molecular epidemiology. *Rev Sci Tech.* 2016 Dec;35(3):741-755.
- König GA, Palma E, Maradei E, Piccone ME. Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus types A and O isolated in Argentina during the 2000-2002 epizootic. *Vet Microbiol* 2007. 124:1-15
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol.* 2016 Jul;33(7):1870-4.
- Kühn R, Luz N, Beck E. Functional analysis of the internal translation initiation site of foot-and-mouth disease virus. *J Virol.* 1990 Oct;64(10):4625-31.
- LaRocco M, Krug PW, Kramer E, Ahmed Z, Pacheco JM, Duque H, Baxy B, Rodriguez LL. A continuous bovine kidney cell line constitutively expressing bovine $\alpha\beta 6$ integrin has increased susceptibility to foot-and-mouth disease virus. *J Clin Microbiol.* 2013 Jun 51; 6:1714-1720.
- Lea S, Hernández J, Blakemore W, Brocchi E, Curry S, Domingo E, Fry E, Abu-Ghazaleh R, King A, Newman J, y cols. The structure and antigenicity of a type C foot-and-mouth disease virus. *Structure.* 1994 Feb 15;2(2):123-39.
- Liu Y, Wimer E, Paul A. Cis-acting RNA elements in human and animal plus-strand RNA viruses. Review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms.* 2009, 1789;9-10;495-517
- Loeffler F, Frosch P. Berichte der Kommission zur Erforschung der Maul- und Klauenseuche bei dem Institut für Infektionskrankheiten in Berlin. *Zbl. Bakt. I/Orig* 1897; 22: 257-259, 1898; 23: 371-391

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

- Ludi A, Rodriguez L. Novel Approaches to Foot-and-Mouth Disease Vaccine Development. *Dev Biol (Basel)*. 2013. 135:107-16.
- Luz N, Beck E. A cellular 57 kDa protein binds to two regions of the internal translation initiation site of foot-and-mouth disease virus. *FEBS Lett*. 1990 Sep 3;269(2):311-4. Erratum in: *FEBS Lett* 1990 Oct 29;273(1-2):261.
- Ma YB, Hao CX, Chang HY. Nucleotide mismatches of foot-and-mouth disease virus during replication. *Genet Mol Res*. 2013 Apr 2;12(2):1022-7.
- Mahapatra M, Yuvaraj S, Madhanmohan M, Subramaniam S, Pattnaik B, Paton D, Srinivasan A, Parida S. Antigenic and genetic comparison of foot-and-mouth disease virus serotype O Indian vaccine strain, O/IND/R2/75 against currently circulating viruses. *Vaccine*. 2015 Jan 29; 33(5): 693–700.
- Mahy BW. Introduction and history of foot-and-mouth disease virus. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005. 288:1-8.
- Malirat V, Bergmann IE, de Mendonça Campos R, Conde F, Quiroga JL, Villamil M, Salgado G, Ortiz S. Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus type A in South America. *Vet Microbiol*. 2012 Jul 6;158(1-2):82-94.
- Malirat V, de Barros JJ, Bergmann IE, Campos Rde M, Neitzert E, da Costa EV, da Silva EE, Falczuk AJ, Pinheiro DS, de Vergara N, Cirvera JL, Maradei E, Di Landro R. Phylogenetic analysis of foot-and-mouth disease virus type O re-emerging in free areas of South America. *Virus Res*. 2007 Mar;124(1-2):22-8.
- Malirat V, De Mello PA, Tiraboschi B, Beck E, Gomes I, Bergmann IE. Genetic variation of foot-and-mouth disease virus during persistent infection in cattle. *Virus Res*. 1994 Oct;34(1):31-48.
- Malirat V, Franca de Barros JJ, Bergmann IE, Mendonca Campos R, Neitzert E, Veiga da Costa E, y cols. Phylogenetic analysis of foot-and-mouth disease virus type O re-emerging in free areas of South America. *Virus Res* 2007. 124:22-8.
- Maradei E, Malirat V, Beascochea CP, Benitez EO, Pedemonte A, Seki C, Novo SG, Balette CI, D'Aloia R, La Torre JL, Mattion N, Toledo JR, Bergmann IE. Characterization of a type O foot-and-mouth disease virus re-emerging in the year 2011 in free areas of the Southern Cone of South America and cross-protection studies with the vaccine strain in use in the region. *Vet Microbiol*. 2013 Mar 23;162(2-4):479-90.
- Martín-Acebes MA, González-Magaldi M, Sandvig K, Sobrino F, Armas-Portela R. Productive entry of type C foot-and-mouth disease virus into susceptible cultured cells

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

- requires clathrin and is dependent on the presence of plasma membrane cholesterol. *Virology*. 2007 Dec 5;369(1):105-18.
- Martínez-Salas E, Ortín J, Domingo E. Sequence of the viral replicase gene from foot-and-mouth disease virus C1-Santa Pau (C-S8). *Gene*. 1985;35(1-2):55-61.
 - Martínez-Salas E, López de Quinto S, Ramos R, Fernández-Miragall O. IRES elements: features of the RNA structure contributing to their activity. *Biochimie*. 2002 Aug;84(8):755-63.
 - Martínez-Salas E, Fernández-Miragall O. Picornavirus IRES: structure function relationship. *Curr Pharm Des*. 2004;10(30):3757-67.
 - Mason PW, Piccone ME, McKenna TS, Chinsangaram J, Grubman MJ. Evaluation of a live-attenuated foot-and-mouth disease virus as a vaccine candidate. *Virology*. 1997. ;227:96-102.
 - Mason PW, Bezborodova SV, Henry TM. 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*. 2002 Oct;76(19):9686-94.
 - Mason PW, Pacheco JM, Zhao QZ, Knowles NJ. Comparisons of the complete genomes of Asian, African and European isolates of a recent foot-and-mouth disease virus type O pandemic strain (PanAsia). *J Gen Virol*. 2003 Jun;84(Pt 6):1583-93.
 - Mateu MG, Verdaguer N. Functional and structural aspects of the interaction of foot-and-mouth disease virus with antibodies. Edited by Sobrino, F.;Domingo, E. from book *Foot and mouth disease: current perspectives 2004* pp. 223-260
 - Mateu MG, Martínez MA, Capucci L, Andreu D, Giralt E, Sobrino F, Brocchi E, Domingo E. A single amino acid substitution affects multiple overlapping epitopes in the major antigenic site of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *J Gen Virol*. 1990 Mar;71 (Pt 3):629-37.
 - Mattion N, Goris N, Willems T, Robiolo B, Maradei E, Beascochea CP, Perez A, Smitsaart E, Fondevila N, Palma E, De Clercq K, La Torre J. Some guidelines for determining foot-and-mouth disease vaccine strain matching by serology. *Vaccine*. 2009 Jan 29;27(5):741-7.
 - Mattion N, König G, Seki C, Smitsaart E, Maradei E, Robiolo B, y cols. 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* 2004. 22:4149-62.
 - Medina M, Domingo E, Brangwyn JK, Belsham GJ. The two species of the foot-and-mouth disease virus leader protein, expressed individually, exhibit the same activities. *Virology*. 1993 May;194(1):355-9.

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

- Mohapatra JK, Sanyal A, Hemadri D, Tosh C, Sabarinath GP, Venkataramanan R. Sequence and phylogenetic analysis of the L and VP1 genes of foot-and-mouth disease virus serotype Asia1. *Virus Res.* 2002 Aug;87(2):107-18.
- Moffat K, Knox C, Howell G, Clark SJ, Yang H, Belsham GJ, Ryan M, Wileman T. Inhibition of the secretory pathway by foot-and-mouth disease virus 2BC protein is reproduced by coexpression of 2B with 2C, and the site of inhibition is determined by the subcellular location of 2C. *J Virol.* 2007 Feb;81(3):1129-39. Epub 2006 Nov 22.
- Morrow, A.W., Whittle, C.J., and Eales, W.A. (1974). A comparison of methods for the concentration of foot-and-mouth disease virus for vaccine preparation. *Bull. Off. Int. Epiz.* 81, 1155–1167.
- Nagendrakumar SB, Srinivasan VA, Madhanmohan M, Yuvaraj S, Parida S, Di Nardo A, Horsington J, Paton DJ. Evaluation of cross-protection between O1 Manisa and O1 Campos in cattle vaccinated with foot-and-mouth disease virus vaccine incorporating different payloads of inactivated O1 Manisa antigen. *Vaccine.* 2011. 29, 1906–1912.
- Nayak A, Goodfellow IG, Belsham GJ. Factors required for the Uridylylation of the foot-and-mouth disease virus 3B1, 3B2, and 3B3 peptides by the RNA-dependent RNA polymerase (3Dpol) "in vitro". *J Virol.* 2005 Jun;79(12):7698-706.
- Nayak A, Goodfellow IG, Woolaway KE, Birtley J, Curry S, Belsham GJ. Role of RNA structure and RNA binding activity of foot-and-mouth disease virus 3C protein in VPg uridylylation and virus replication. *J Virol.* 2006 Oct;80(19):9865-75.
- Neitzert E, Beck E, de Mello PA, Gomes I, Bergmann IE. Expression of the aphthovirus RNA polymerase gene in *Escherichia coli* and its use together with other bioengineered nonstructural antigens in detection of late persistent infections. *Virology.* 1991 Oct;184(2):799-804.
- Newman JFE, Cartwright B, Doel TR, Brown F. Purification and identification of the RNA-dependent RNA polymerase of foot-and-mouth disease virus. *J. Gen. Virol.* 1979. 45, 497–507
- Nowak MA. What is a quasispecies? *Trends. Ecol. Evol.* 1992. 7, 118–121.
- Núñez JI, Baranowski E, Molina N, Ruiz-Jarabo CM, Sánchez C, Domingo E, Sobrino F. A single amino acid substitution in nonstructural protein 3A can mediate adaptation of foot-and-mouth disease virus to the guinea pig, *J. Virol.* 2001. 75(8): 3977-3983
- OIE, Informe final de la 81a Sesión General de la OIE, 26 - 31 de mayo de 2013. http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/About_us/docs/pdf/E_IF_2013_public.pdf

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

- Olascoaga RC, Alonso Fernández A, Astudillo V, Augé de Melo P, Young Torres A, Gomes I, Kanashiro MM, Vianna Filho YL, Fernández G, Baltar J. Correlación de técnicas de control de potencia de la vacuna antiaftosa, Proyecto OPS, Cuenca del Plata, CEE. 1991 Rio de Janeiro.
- Organización Panamericana de la Salud. Manual de Procedimientos para la Atención de Ocurrencias de Fiebre Aftosa y Otras Enfermedades Vesiculares. 2007. Proyecto BID/PANAFTOSA – OPS/OMS para los países del MERCOSUR ampliado. Rio de Janeiro.
- PAHO/WHO, PANAFTOSA, 2011a. Informe Annual Laboratorio, 2010 (Rio de Janeiro, Pan American Foot-and-Mouth Disease Center. http://new.paho.org/panaftosa/index.php?option=com_content&task=view&id=149&Itemid=246.
- PAHO/WHO, PANAFTOSA, 2011b. Situación de los Programas de Erradicación de la Fiebre Aftosa en América del Sur, 2010. (Rio de Janeiro, Pan American Foot-and-Mouth Disease Center <http://bvs1.panaftosa.org.br/local/file/textoc/sit2010esp.pdf>
- Palmenberg AC. Proteolytic processing of picornaviral polyprotein. Annu Rev Microbiol. 1990. ;44:603-23. Review
- Park JH. Requirements for improved vaccines against foot-and-mouth disease epidemics. Clin Exp Vaccine Res. 2013 Jan;2(1):8-18.
- Paul, A V. Possible unifying mechanism of picornavirus genome replication, . Semler and E. Wimmer (ed.), Molecular biology of picornaviruses. ASM Press, Washington, D.C.2002 P. 227-246.
- Paul AV, Mugavero J, Yin J, Hobson S, Schultz S, van Boom JH, Wimmer E. Studies on the attenuation phenotype of polio vaccines: poliovirus RNA polymerase derived from Sabin type 1 sequence is temperature sensitive in the uridylylation of VPg. Virology. 2000 Jun 20;272(1):72-84.
- Paul AV, Mugavero J, Molla A, Wimmer E. Internal ribosomal entry site scanning of the poliovirus polyprotein: implications for proteolytic processing. Virology. 1998 Oct 10;250(1):241-53.
- Paul AV, Peters J, Mugavero J, Yin J, van Boom JH, Wimmer E. Biochemical and genetic studies of the VPg uridylylation reaction catalyzed by the RNA polymerase of poliovirus. J Virol. 2003 Jan;77(2):891-904.
- Paul AV, van Boom JH, Filippov D, Wimmer E. Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase. Nature. 1998 May 21;393(6682):280-4.

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

- Paton DJ, Valarcher JF, Bergmann IE, Matlho OG, Zakharov VM, Palma EL, y cols. Selection of foot-and-mouth disease vaccine strains – a review. *Rev sci tech Off Int Epiz* 2005;24(3):981-93
- Pecker, Alberto E. Fiebre Aftosa. Su Paso Por la Argentina. Buenos Aires, Argentina; 2010 SENASA ISBN 978-987-9429-07-5; segunda edición.
- Pelletier J, Sonenberg N. Internal binding of eucaryotic ribosomes on poliovirus RNA: translation in HeLa cell extracts. *J Virol.* 1989 Jan;63(1):441-4.
- Pereira HG. Subtyping of foot-and-mouth disease virus. In *Developments in Biological Standardization*, 1966. 35;333-363. (Edited by C. Mackowiak & R. H. Regamey. Basel: S. Karger)
- Pereira HG. Foot-and-mouth disease. In Gibbs E.P.G., editors. *Virus diseases of food animals*, New York: Academic Press Inc; Vol. 2, 1981, p. 333-63.
- Perez Beascochea C, Galdo Novo S, D´Aloia R, Esteves J, Maradei E. Virus de Fiebre Aftosa A Argentina 2001: Correlación de títulos de anticuerpos neutralizantes con la protección al desafío viral "in vivo" por medio de la Expectativa Porcentual de Protección. Desarrollo de una curva de correlación de tipo Logit –Congreso Argentino de Microbiología XIII - Asociación Argentina de Microbiología- Buenos Aires – 23 - 26 de septiembre de 2013
- Periolo O, Seki C, Grigera P, Robiolo B, Fernandez G, Maradei E, La Torre J. Large scale use of liquid-phase blocking sandwich ELISA for the evaluation of protective immunity against aphthovirus in cattle vaccinated with oil-adjuvanted vaccines in Argentina. *Vaccine* 1993. 11:754 60
- Pfaff E, Thiel HJ, Beck E, Strohmaier K, Schaller H. Analysis of neutralizing epitopes on foot-and-mouth disease virus. *J Virol.* 1988 Jun;62(6):2033-40.
- Piccone ME, Kaplan G, GiavedoniL, Domingo E, Palma EL. VP1 of serotype C foot-and-mouthdisease viruses: long-term conservation of sequences. *J. Virol.* 1988. 62: 1469-1473
- Pleij CW. Pseudoknots: a new motif in the RNA game. *Trends Biochem Sci.* 1990 Apr;15(4):143-7. Review.
- Polatnik, Bachrach. *Appl. Microbiol.* 1964, 12, 368-376
- Racaniello V. Picornaviridae: the viruses and their replication. In *Field Virology*. P. Howley and D. Knipe, Eds. Lippinkott, Williams and Wilkins, 2001. Philadelphia.
- Racaniello VR. One hundred years of poliovirus pathogenesis. *Virology.* 2006 Jan 5;344(1):9-16. Review.

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

- Rieder E, Bunch T, Brown F, Mason PW. Genetically engineered foot-and-mouth disease viruses with poly(C) tracts of two nucleotides are virulent in mice. *J Virol.* 1993 Sep;67(9):5139-45.
- Rieder E, Paul AV, Kim DW, van Boom JH, Wimmer E. Genetic and biochemical studies of poliovirus cis-acting replication element cre in relation to VPg uridylylation. *J Virol.* 2000 Nov;74(22):10371-80.
- Robiolo B, Grigera P, Periolo OH, Seki C, Bianchi I T, Maradei E, La Torre J. – Assesment of foot and mouth disease vaccine potency by liquid- phase blocking ELISA: a proposal for an alternative to the challenge procedure in Argentina- *Vaccine* 1995; 13:1346-52.
- Rowlands DJ. Rhinoviruses and cells: molecular aspects. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995 Oct;152(4 Pt 2):S31-5.
- Rweyemamu MM. Antigenic variation in foot-and-mouth disease: studies based on the virus neutralization reaction. *J Biol Standards.* 1984. 12(3):323-37.
- Rweyemamu MM y Astudillo VM. Global perspective for Foot and Mouth Disease Control. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 2002. 21 (3), 765-773
- Rweyemamu MM, Pay TWF, Parker MJ. Serological differentiation of foot-and-mouth disease virus strains in relation to selection of suitable vaccine viruses. *Dev Biol Stand* 1977. 35:205-14.
- Ryan MD, Donnelly MLL, Flint M, Cowton VM, Luke G, Hughes LE, Knox C, de Felipe P. Foot-and-Mouth Disease Virus Proteinases. In *Foot-And-Mouth Disease: current perspectives.* E. Domingo & F. Sobrino (eds).2004. Horizon Scientific Press, Norfolk, England. pp. 53-76.
- Ryan MD, Flint M. Virus-encoded proteinases of the picornavirus super-group. *J Gen Virol.* 1997. Apr;78 (Pt 4):699-723.
- Ryan M, King AMQ, Thomas GP. Cleavage of foot-and-mouth disease virus polyprotein is mediated by residues located within a 19 amino acid sequence. 1991. *Journal of General Virology*, 72, 2727-2732.
- Sáiz M, Gómez S, Martínez-Salas E, Sobrino F. Deletion or substitution of the aphthovirus 3' NCR abrogates infectivity and virus replication. *J Gen Virol.* 2001 Jan;82(Pt 1):93-101.
- Samuel AR, Knowles NJ. Foot-and-mouth disease type O viruses exhibit genetically and geographically distinct evolutionary lineages (topotypes). *J Gen Virol.* 2001. 82:609-21.
- Salt JS. The carrier state in foot and mouth disease--an immunological review. *Br Vet J.* 1993. May-Jun;149(3):207-23. Review.

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

- Sangar DV, Black DN, Rowlands DJ, Brown F. Biochemical mapping of the foot-and-mouth disease virus genome. *J Gen Virol.* 1977. May;35(2):281-97.
- Sarangi LN, Mohapatra JK, Subramaniam S, Sanyal A, Pattnaik B. Antigenic site variation in foot-and-mouth disease virus serotype O grown under vaccinal serum antibodies "in vitro" *Project Directorate on Foot-and-Mouth Disease, Mukteswar-Kumaon, Nainital 263138, Uttarakhand, India
- Schudel AA, Carrillo BJ, Wyler R, Metzler AE. Infections of calves with antigenic variants of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurological disease. *Zentralbl Veterinarmed B.* 1986. May;33(4):303-10.
- Seki C, Robiolo B, Periolo O, Iglesias M, D'Antuono A, Maradei E, y cols. Rapid methodology for antigenic profiling of FMDV field strains and for the control of identity, purity and viral integrity in commercial virus vaccines using monoclonal antibodies. *Vet Microbiol.* 2009. 133:239-51.
- Sellers RF, Herniman KA, Mann JA. Transfer of foot-and-mouth disease virus in the nose of man from infected to non-infected animals. *Vet Rec.* 1971 Oct 16;89(16):447-9.
- Serrano P, Pulido MR, Sáiz M, Martínez-Salas E. The 3' end of the foot-and-mouth disease virus genome establishes two distinct long-range RNA-RNA interactions with the 5' end region. *J Gen Virol.* 2006. Oct;87(Pt 10):3013-22.
- Shahan MS. The virus of foot-and-mouth disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1962 Nov 30;101:444-54.
- Sierra M, Airaksinen A, González-López C, Agudo R, Arias A, Domingo E. Foot-and-mouth disease virus mutant with decreased sensitivity to ribavirin: implications for error catastrophe. *J Virol.* 2007. Feb;81(4):2012-24. Epub 2006 Dec 6.
- Sobrino F y Domingo E. Foot and Mouth Disease: Current Perspectives. Informa Healthcare. Primer Ed. 2004.
- Sobrino F, Sáiz M, Jiménez-Clavero MA, Núñez JI, Rosas MF, Baranowski E, Ley V. Foot-and-mouth disease virus: a long known virus, but a current threat. *Vet Res.* 2001. Jan-Feb;32(1):1-30. Review.
- Steil BP, Barton DJ. Cis-active RNA elements (CREs) and picornavirus RNA replication. *Virus Res.* 2009. Feb;139(2):240-52.
- Strohmaier K, Adam KH. Structure of foot-and-mouth disease virus. *Zentralbl Veterinarmed B.* 1976. Jun;23(5-6):483-506.
- Strohmaier K, Franze R, Adam KH. Location and characterization of the antigenic portion of the FMDV immunizing protein. *J Gen Virol.* 1982. Apr;59(Pt 2):295-306.

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

- Sumption K, Domenech J, Ferrari G. Progressive control of FMD on a global scale. *Vet Rec.* 2012 Jun 23;170(25):637-9.
- Sutmoller P, Gaggero A. Foot-and mouth diseases carriers. *Vet Rec.* 1965. Aug 14;77(33):968-9.
- Sutmoller P, McVicar JW, Cottral GE. The epizootiological importance of foot-and-mouth disease carriers. I. Experimentally produced foot-and-mouth disease carriers in susceptible and immune cattle. *Arch Gesamte Virusforsch.* 1968. 23(3):227-35.
- Taboga O, Tami C, Carrillo E, Núñez JI, Rodríguez A, Saíz JC, Blanco E, Valero ML, Roig X, Camarero JA, Andreu D, Mateu MG, Giralt E, Domingo E, Sobrino F, Palma EL. A large-scale evaluation of peptide vaccines against foot-and-mouth disease: lack of solid protection in cattle and isolation of escape mutants. *J Virol.* 1997. Apr;71(4):2606-14.
- Takeda N, Kuhn RJ, Yang CF, Takegami T and Wimmer E. Initiation of poliovirus plus-strand RNA synthesis in a membrane complex of infected HeLa cells. *J Virol.* 1986. 60, 43–53.
- Tami C, Taboga O, Berinstein A, Núñez JI, Palma EL, Domingo E, Sobrino F, Carrillo E. Evidence of the coevolution of antigenicity and host cell tropism of foot-and-mouth disease virus "in vivo". *Journal of Virology.* 2003. 77, 1219–1226.
- Telling RC, Elsworth R. Submerged culture of hamster kidney cells in a stainless steel vessel. *Biotechnol. Bioeng.* 1965. 7, 417–434.
- Tesar M, Marquardt O. Foot-and-mouth disease virus protease 3C inhibits cellular transcription and mediates cleavage of histone H3. *Virology.* 1990 Feb;174(2):364-74.
- Timoney JF Protecting against 'strangles': a contemporary view. *Equine Vet J.* 1988 Nov;20(6):392-4.
- Thomas AA, Woortmeijer RJ, Puijk W, Barteling SJ. Antigenic sites on foot-and-mouth disease virus type A10. *Journal of Virology.* 1988;62(August (8)):2782–2789.
- Thompson D, Muriel P, Russell D, Osborne P, Bromley A, Rowland M, Creigh-Tyte S, Brown C. Economic costs of the foot and mouth disease outbreak in the United Kingdom in 2001. *Rev. Off. Int. Epizoot.* 2002. 21, 675–687.
- Tully DC, Fares MA. The tale of a modern animal plague: tracing the evolutionary history and determining the time-scale for foot and mouth disease virus. *Virology.* 2008 Dec 20;382(2):250-6. doi: 10.1016/j.virol.2008.09.011. Epub 2008 Oct 21.
- Upadhyaya S, Ayelet G, Paul G, King DP, Paton DJ, Mahapatra M. Genetic basis of antigenic variation in foot-and-mouth disease serotype A. viruses from the Middle East. *Vaccine* 2014. 32, 631–638.

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

- Vasquez C, Denoya CD, La Torre JL, Palma EL. Structure of foot-and-mouth disease virus capsid. *Virology*. 1979 Aug;97(1):195-200.
- van Bekkum JG, Fish RC, Nathans I. Immunologic responses in Dutch cattle vaccinated with foot-and-mouth disease vaccines under field conditions: neutralizing antibody responses and immunity to O, A, and C types. *Am J Vet Res*. 1969 Dec;30(12):2125-9
- Wild TF, Burroughs JN, Brown F. Surface structure of foot-and-mouth disease virus. *J Gen Virol*. 1969 Apr;4(3):313-20.
- Witwer C, Rauscher S, Hofacker IL, Stadler PF. Conserved RNA secondary structures in Picornaviridae genomes. *Nucleic Acids Res*. 2001 Dec 15;29(24):5079-89.
- World Organisation for Animal Health. Foot and mouth disease. In: OIE Standards Commission. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 7TH ed. Paris, France: Office International des Epizooties; 2012
- Xiang W, Cuconati A, Hope D, Kirkegaard K, Wimmer E. Complete protein linkage map of poliovirus P3 proteins: interaction of polymerase 3Dpol with VPg and with genetic variants of 3AB. *J Virol*. 1998 Aug;72(8):6732-41.
- Xue M, Wang H, Li W, Zhou G, Tu Y, Yu L. Effects of amino acid substitutions in the VP2 B-C loop on antigenicity and pathogenicity of serotype Asia1 foot-and-mouth disease virus. *Virology Journal*2012. 9:191
- Yang PC, Chu RM, Chung WB, Sung HT. Epidemiological characteristics and financial costs of the 1997 foot-and-mouth disease epidemic in Taiwan. *Vet Rec* 1999. 145:731-4.
- Zibert A, Maass G, Strebel K, Falk MM, Beck E. Infectious foot-and-mouth disease virus derived from a cloned full-length cDNA. *J Virol*. 1990 Jun;64(6):2467-73.

14. Relación del Plan con Proyectos de Investigación acreditados y/o Becas otorgadas.

- Esta tesis se complementó con actividades desarrolladas en el marco del proyecto PID 0017/2012: "DESARROLLO, VALIDACIÓN Y APLICACIÓN DE MÉTODOS INMUNOENZIMÁTICOS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE RIESGO DE FIEBRE AFTOSA EN APOYO A LAS POLITICAS DE VACUNACIÓN PARA LA VIDA"

14. Anexos (optativo)

Anexo I Soporte Económico

El soporte económico de la doctorando fue cubierto por la percepción mensual bajo relación de dependencia de SENASA de la doctorando, de este fueron abonados los cursos y capacitaciones necesarias. Las pruebas y los materiales consumibles fueron cubiertos dentro del presupuesto anual de compras de la misma institución.

Los gastos en relación a las pruebas cuyos resultados fueron utilizados como información para el PID 0017/2012 fueron cubiertos por dicho subsidio.

Anexo II Producción generada a lo largo de la tesis doctoral

ARTICULOS CIENTIFICOS PUBLICADOS

Protective effects of high-potency FMDV O 1 Manisa monovalent vaccine in cattle challenged with FMDV O/SKR/2010 at 7 or 4 days post vaccination. J Horsington, C Beascochea Perez, E Maradei, **S Galdo Novo**, Jose L. Gonzales, N B Singanalur, P Bonastre, W Vosloo. vaccine August 2017 IN PRESS DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.07.102

Antigenic and immunogenic spectrum of Foot-and- Mouth Disease vaccine strain O 1 Campos against representative viruses of topotypes that circulated in Asia over the past decade. **Galdo Novo S.**, Malirat V., Maradei E.D., Espinoza A.M., Smitsart E., Pedemonte A.R., Mattion N., Bergmann I.E. Vaccine. 2017 Apr 25;35(18):2303-2307

Viral diagnostic criteria for feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus infections in domestic cats from Buenos Aires, Argentina. **Galdo Novo S.**, Bucafusco D., Diaz LM., Bratanich AC., Rev Arg Microbiol 2016 Nov 5.

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

Effects of lambda-carrageenan on equid herpesvirus 3 "in vitro". M.A. Vissani · **S. Galdo Novo** · M. Ciancia · O. Zabal · E. Thiry · A. Bratanich · M. Barrandeguy. Article · Apr 2016 · Journal of Equine Veterinary Science

Antiviral activity of lambda-carrageenan prepared from red seaweed (*Gigartina skottsbergii*) against BoHV-1 and SuHV-1. Jesica V. Diogo, **Sabrina Galdo Novo**, Marcelo J. González, Marina Ciancia, Ana C. Bratanich. Res Vet Sci. 2014 Nov 15. pii: S0034-5288(14)00311-7. doi: 10.1016/j.rvsc.2014.11.010.

Emergence of antigenic variants of Foot-and-Mouth Disease Virus Serotype O in Ecuador and preliminary evaluation of a field strain as a vaccine candidate. Eduardo Maradei, Viviana Malirat, Claudia Perez Beascochea, Ana María Espinoza, **Sabrina Galdo Novo**, Eliana Smitsaart, Gustavo Salgado, Nora Mattion, Jorge Rodríguez Toledo, Ingrid E. Bergmann. Vaccine. 2014 May 1;32(21):2446-51. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.02.092. Epub 2014 Mar 10.

Characterization of a type O foot-and-mouth disease virus re-emerging in the year 2011 in free areas of the Southern Cone of South America and cross-protection studies with the vaccine strain in use in the region. Eduardo Maradei, Viviana Malirat, Claudia Perez Beascochea, Elizabeth Oviedo Benitez, Andrea Pedemonte, Cristina Seki, **Sabrina Galdo Novo**, Cristina I. Balette, Ricardo D'Aloia, José L. La Torre, Nora Mattion, Jorge Rodríguez Toledo, Ingrid E. Bergmann. - Veterinary Microbiology - Vet Microbiol. 2012 Nov 7. pii: S0378-1135(12)00587-1

PRESENTACIONES EN CONGRESOS

Immunogenic spectrum of foot and mouth disease O1/Campos south American strain against currently circulating Asian topotypes. Efficacy against challenge with recent O/SKR/Jincheon field isolate. **Galdo Novo, S**; Malirat, V; Maradei, E; Espinoza, A M; Smitsaart, E; Pedemonte, A; Ham A; Jaejo, K; Jida, C; Taffarel A; Mattion N; Bergmann, I. GFRA (Global Foot and Mouth Disease Research Alliance) Scientific Meeting, Seoul, Republic of Korea, October 2017. (Abstract accepted)

Galdo Novo S; Palermo J; Diaz L; Ronchi R; Sánchez M; Bucafusco D; Bratanich AC; Schenone H; Schenone N. Efecto antiviral de extractos naturales de plantas obtenidas del bosque misionero frente a Herpesvirus porcino tipo 1. XXXVI Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Virología. 5 y 6 de Diciembre de 2016, Buenos Aires, Argentina.

Diaz, L; **Galdo Novo, S**; Palacios, C; Bratanich, A; Bucafusco, D. Generación de una Proteína Quimérica Recombinante para su Utilización en el Diagnóstico de VIF. XXXVI Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Virología. 5 y 6 de Diciembre de 2016, Buenos Aires, Argentina.

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

S Galdo Novo, V Malirat, IC Balette, C Seki, A Pedemonte, ED Maradei, IE Bergmann. CARACTERIZACION GENETICA Y ANTIGENICA DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA TIPO O RESPONSABLES DE LOS ÚLTIMOS BROTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA. XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología y XIV Congreso Argentino de Microbiología. 26 al 30 de septiembre de 2016. Rosario, Argentina.

MA, Vissani, **S, Galdo Novo**, M, Ciancia, O, Zabal, E, Thiry, A, Bratanich, M, Barrandeguy. Effects of lambda-carrageenan on equid herpesvirus 3 "in vitro". 10th International Equine Infectious Disease Conference. 4 al 8 de abril de 2016, Buenos Aires, Argentina.

Paula Bonastre, Jacquelyn Horsington, Andrea Pedemonte, Eduardo Maradei, Ricardo D' Aloia, Claudia Perez Beascochea, **Sabrina Galdo Novo**, Enrique Lago, Daniela Pereyra, Angeles Ponde, Mercedes Maradei, Valeria Gonzalez Thomas, Pilar Muntadas, Graciela Cadenazi, Gabriela Madonni, Wilna Vosloo COMPARISON BETWEEN RT-PCR REAL TIME AND VIRUS ISOLATION FOR TESTING EARLY PROTECTION OF O1 MANISA DOUBLE OIL EMULSION EMERGENCY VACCINE IN CATTLE AGAINST HETEROLOGOUS CHALLENGE. 2nd SCIENTIFIC INTERNATIONAL CONGRESS ON FOOT AND MOUTH DISEASE, El Cairo, Egypto.

Galdo Novo S, Espinoza AM, Cardillo S, Maradei E, Guinzburg M, Lago Aladro E, Perez Beascochea C. PHYSICO-CHEMICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF TYPE O FOOT AND MOUTH DISEASE STRAINS ISOLATED FROM SOUTH AMERICAN OUTBREAKS (2006 TO 2011). X Encontro de Virologia do Mercosul XXVI Congresso Brasileiro de Virologia. 11 al 14 de octubre de 2015, Florianópolis, SC, Brasil.

V Malirat, E Maradei, C Pérez Beascochea, **S Galdo Novo**, I Balette, R D'Aloia, C Seki, ER Caffarena, D Antunes, IE Bergmann. VIRUS DE AFTOSA: CEPAS CIRCULANTES EN LA REGIÓN Y SU RELACIÓN CON LAS CEPAS INCLUIDAS EN LA FORMULACIÓN DE LAS VACUNAS. Congreso Argentino de Virología 2015. 23 AL 26 DE JUNIO DE 2015, Buenos Aires, Argentina.

Díaz, Leandro M. Bucafusco, Danilo O. **Galdo Novo, Sabrina**. Bratanich, Ana C. DESARROLLO DE UN MÉTODO DE DIAGNÓSTICO INDIRECTO PARA LA DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA FELINA. 2014 Congreso de la Asociación Argentina de Inmunología Veterinaria, Buenos Aires, Argentina.

Claudia Perez Beascochea, **Sabrina Galdo Novo**, Ricardo D' Aloia, Elizabeth Oviedo Benitez, Gustavo

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

Salgado, Jorge Rodríguez Toledo, Viviana Malirat, Ingrid Bergmann, Eduardo Maradei. "Assessment of correlation between "in vivo" and "in vitro" tests for FMDV O strain vaccine matching studies in endemic and free areas of South America" - 2013 GFRA (Global Foot and Mouth Disease Research Alliance), "Epidemiology, Surveillance, Transmission and Control of FMD in Endemic Settings of Africa" – 8 al 10 de Octubre. Arusha, Tanzania.

Sergio Duffy, Norberto Fondevila, Claudia Pérez Beascochea, Emilio León, Natalia Aznar, Carlos Garro, **Sabrina Galdo Novo**, Eduardo Maradei, Gustavo Monti. REDUCTION IN THE TRANSMISSION OF THE VIRUS OF FOOT AND MOUTH DISEASE IN VACCINATED CATTLE. - 2013 GFRA (Global Foot and Mouth Disease Research Alliance), "Epidemiology, Surveillance, Transmission and Control of FMD in Endemic Settings of Africa" – 8 al 10 de Octubre. Arusha, Tanzania.

Perez Beascochea, C., **Galdo Novo, S.**, D'Alaia R., Esteves, J., Maradei, E. Virus de Fiebre Aftosa A Argentina 2001: Correlación de títulos de anticuerpos neutralizantes con la protección al desafío viral "in vivo" por medio de la Expectativa Porcentual de Protección. Desarrollo de una curva de correlación de tipo Logit –Congreso Argentino de Microbiología XIII - Asociación Argentina de Microbiología- Buenos Aires – 23 al 26 de septiembre de 2013

D Bucafusco, **S Galdo Novo**, L Díaz, A Bratanich. EVALUACIÓN DE LA UTILIDAD DE LA TÉCNICA DE PCR PARA DIAGNÓSTICO DE RUTINA DE LOS VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA FELINA Y LEUCEMIA FELINA. - XIX REUNION CIENTIFICO TECNICA – Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico – Buenos Aires - 7,8 y 9 de noviembre de 2012

A. Bratanich; N. Gomez; N. Aznar; I. Correas; C. Baumberger; **Galdo Novo, S.**; Loiza, M.; R. Bokenhans. ESTUDIO PRELIMINAR SOBRE LA CIRCULACIÓN DEL VIRUS DE INFLUENZA CANINA EN BUENOS AIRES. - XIX REUNION CIENTIFICO TECNICA – Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico – Buenos Aires - 7,8 y 9 de noviembre de 2012

Sergio Duffy; Norberto Fondevila; Claudia Pérez Beascochea; Emilio León; Natalia Aznar; Carlos Garro; **Sabrina Galdo Novo**; Eduardo Maradei; Gustavo Monti. REDUCCION DE LA TRANSMISION DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EN BOVINOS VACUNADOS. 1º Encuentro Nacional de Epidemiología Veterinaria (ENEPI 2012) 10 al 13 de Julio de 2012.

Galdo Novo S., Bucafusco D., Díaz L., Bratanich A.C. EVALUACION DE UNA NESTED POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) PARA DIAGNOSTICO DE RUTINA DEL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA FELINA Y LEUCEMIA FELINA Y ANALISIS DE AISLAMIENTO LOCALES. X Congreso Argentino de Virología, Buenos Aires, 26 al 29 de Septiembre de 2011

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EMERGENTES EN EL CONO SUR DE SUDAMERICA ENTRE 2000-2011 Y SU PROTECCIÓN POR VACUNAS. – SABRINA GALDO NOVO

Bucafusco D., **Galdo Novo S.**, Bratanich A. APLICACIÓN DE UNA TECNICA DE NESTED-PCR (Polymerase chain reaction) PARA EL DIAGNOSTICO DEL VIRUS DE LA LEUCEMIA FELINA. X Congreso Nacional de AVEACA 2010, Buenos Aires, 8 al 10 de Septiembre de 2010