

PREPARACION Y CONCENTRACION DE LOS ANTIGENOS
140 S, 12 S Y VIA DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA

Albino Alonso Fernández y Magnus Stael Sondahl*

INTRODUCCION

Cuatro antígenos han sido diferenciados en cultivos del virus de la fiebre aftosa. El virión o antígeno 140 S (1, 3, 11), el 75 S (7), el 12 S (13) y el antígeno asociado a la infección viral (VIA) (5). Los cuatro antígenos son inmunógenos, fijan complemento y precipitan en gel de agar en presencia de anticuerpos específicos (5, 7). El VIA y los anticuerpos contra este antígeno tienen la particularidad de ser específicos para la fiebre aftosa pero dan reacciones cruzadas entre los diferentes tipos de virus (5, 10).

Para la purificación y concentración del virión se han empleado diversas técnicas basadas en procedimientos físico-químicos, tales como la ultracentrifugación (2, 12) y la precipitación con polietileno glicol (14). Para la preparación de los antígenos 75 S y VIA se ha utilizado el sulfato de amonio y la ultracentrifugación en gradientes (5, 7). Todas estas técnicas requieren equipos especiales no siempre al alcance de la mayoría de los laboratorios de diagnóstico de fiebre aftosa existentes en América del Sur.

En el presente trabajo se describe la preparación de los antígenos VIA, 140 S y 12 S a partir de cultivos del virus de la fiebre aftosa en células BHK-21. El procedimiento es simple, de bajo costo y fácilmente adaptable a las condiciones de los laboratorios de apoyo a los programas de combate a la fiebre aftosa en Sudamérica.

MATERIALES Y METODOS

Virus

Fueron utilizadas las siguientes cepas de virus aftoso: subtipo O₁, Cepa Campos; subtipo A₁₆, Cepa Belém; subtipo A₂₄, Cepa Cruzeiro y subtipo C₃, Cepa Resende.

Con virus obtenidos de epitelio lingual bovino se efectuaron de 4 a 7 pasajes en células BHK-21, Clon 13 (9). Las suspensiones víricas del último pasaje fueron conservadas a -70° C hasta su posterior utilización.

Título infeccioso

Las suspensiones víricas y las diferentes preparaciones fueron tituladas en monocamadas de células BHK-21 después de cultivadas 72 horas.

Preparación de antígeno asociado a la infección viral (VIA)

Células cultivadas en monocamada en botellas de Roux durante 72 horas fueron inoculadas con 1 DI₅₀ BHK de virus por 500 células. Se añadieron 100 ml de medio de Eagle modificado (9), sin suero, continuándose la incubación a 37° C. Cuando la camada celular presentaba evidente efecto citopático (aproximadamente 18 horas posteriores a la inoculación del virus), se substituyó el medio de cultivo por 10 ml de medio de Eagle para obtener una suspensión vírica más concentrada. Seguidamente los cultivos fueron congelados a -20° C y descongelados a temperatura ambiente.

* Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, Caixa Postal 589, ZC-00, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

La suspensión vírica fue centrifugada a 4° C en una centrífuga Internacional modelo PR-1 a 3000 rpm durante 30 minutos. Al sobrenadante (virus crudo) se le adicionó polietileno glicol 6000 PM (PEG) hasta una concentración del 6% p/v y se mantuvo en agitación durante 3 horas a 4° C. La mezcla virus-PEG fue centrifugada a 4° C durante 30 minutos a 3000 rpm. Al sobrenadante se le añadió sulfato de amonio hasta una concentración del 35% p/v, se agitó durante 30 minutos, se mantuvo en reposo durante 18 horas a 4°C y finalmente se centrifugó en refrigeración a 3000 rpm durante 30 minutos.

El centrifugado presentó tres fases: a) una de aspecto oleoso situada en la parte superior; b) una intermedia de consistencia más sólida y c) una fracción inferior de consistencia acuosa. El antígeno VIA fue encontrado en la fracción superior y principalmente en la intermedia, razón por la cual esta última fue utilizada en el presente trabajo. Previamente a su empleo se la resuspendió en un volumen de medio de Eagle igual al 1/10 del original que contenía el virus crudo. Después fue congelada a -70° C, descongelada y centrifugada a 4° C durante 30 minutos a 3000 rpm para eliminar los residuos insolubles.

Preparación del antígeno 140 S

El antígeno 140 S fue recuperado del sedimento obtenido en la centrifugación del virus crudo después de tratado con PEG. Este paso fue realizado en la preparación del antígeno VIA. El sedimento fue resuspendido en un 1/10 del volumen original del virus crudo. Como diluyente se utilizó solución salina fosfatada tampón, pH 7,6 (0,15 M de NaCl, 0,24 M de Na₂HPO₄ y 0,03 M de KH₂PO₄). Los restos insolubles fueron eliminados mediante centrifugación a 4° C durante 30 minutos a 3000 rpm. Este preparado también contiene el antígeno 75 S.

Preparación del antígeno 12 S

El antígeno 12 S fue obtenido a partir de

suspensiones de virus procesadas de la misma manera como se ha descrito en la producción de antígeno VIA pero con la diferencia de que fueron congeladas cuando el estrato celular estaba totalmente destruido. Las suspensiones una vez clarificadas por centrifugación (suspensión cruda) y ajustado el pH a 5,5 fueron mantenidas durante 3 horas a 37°C. Seguidamente fueron centrifugadas nuevamente a 3000 rpm para eliminar el precipitado formado durante el calentamiento. El antígeno 12 S fue concentrado añadiendo al sobrenadante sulfato de amonio hasta una concentración del 35% p/v y manteniéndose la mezcla en agitación magnética durante 3 horas a temperatura ambiente. El precipitado formado fue separado por centrifugación a 3000 rpm durante 30 minutos y resuspendido en salina fosfatada en un volumen igual al 1/20 del de la suspensión original. Seguidamente el concentrado fue dializado contra el mismo tampón y después centrifugado.

Suero

Los sueros hiperinmunes se obtuvieron inoculando cobayos por vía intradermopltar con virus de origen bovino. Los animales con lesiones generalizadas de fiebre aftosa fueron reinoculados 6 semanas después, tres veces cada 4 días. La dosis inoculada fue de 0,2 ml de una suspensión de virus conteniendo 0,07% de saponina y adaptado al cobayo.

Los sueros obtenidos 6 días después de la última inoculación fueron inactivados a 56° C durante 30 minutos y seguidamente conservados a -20° C. Los sueros producidos en estas condiciones contienen anticuerpos predominantes de la clase de las IgG (4, 6, 7).

Doble difusión en gel de agar (DDA)

En un tampón con 0,5 M de glicina, 0,025 M de dietilbarbiturato de sodio, 0,5% de azida sódica y con un pH de 7,8 ajustado con HCL 1N, fue disuelto agar purificado (Difco) al 1%. De esta solución fueron vertidos 16 ml en placas Petri de 90 mm. Una vez solidificado el agar se hicieron cavidades de 4 mm de

diámetro dispuestas de la siguiente manera: una en el centro y seis en la periferia guardando simetría y mediando entre ellas 6 mm. El suero fue colocado en la cavidad central y el antígeno en las de la periferia hasta enrasar las mismas. La reacción fue desarrollada en ambiente húmedo y a una temperatura de unos 28° C. Las lecturas se efectuaron de 2 a 5 días después de colocados los reactivos.

Fijación de complemento (FC)

Se utilizó la titulación en bloque según el siguiente procedimiento. Diluciones de base 2 de suero hiperinmune y de antígeno fueron colocadas en las mismas series de tubos de Kahn (12 x 75 mm) en volúmenes de 0,2 ml. Seguidamente se adicionaron en cada tubo 0,2 ml de una dilución de complemento conteniendo 4 unidades hemolíticas 50%. Los tubos de la reacción juntamente con los controles de cada reactivo utilizado, fueron mantenidos en bañomaria durante 30 minutos a 37° C. Después se añadieron a todos los tubos 0,4 ml de sistema hemolítico, el cual tenía una Densidad Optica de 0,66, unidad determinada en una longitud de onda de 545 m μ con un espectrofotómetro Coleman Junior Modelo 6A. El sistema fue nuevamente incubado otros 30 minutos a 37° C. La fijación se determinó por lectura en el espectrofotómetro de los tubos centrifugados. Para calcular la dilución de antígeno que proporcionaba el 50% de FC fue utilizada la ecuación de Von Krogh, citada por Kabat y Mayer (8).

RESULTADOS

Reacciones en DDA

En la Figura 1 se aprecian dos bandas de precipitación resultantes de las reacciones entre virus crudo de las cepas A₂₄ y O₁ y sus sueros hiperinmunes homólogos. Las bandas desarrolladas con las preparaciones de 140 S y VIA en presencia de los mismos sueros fueron idénticas a las del virus crudo. Se comparó el comportamiento del antígeno VIA

con otro similar preparado en el PIADC*, según la técnica de Cowan y Graves (5). La banda de precipitación del antígeno de PIADC dio una reacción de identidad con la producida por el VIA obtenido según la técnica descrita en este trabajo.

Las suspensiones crudas de las cepas C₃ y A₁₈ utilizadas en la preparación del antígeno 12 S formaron tres bandas de precipitación cuando se las hizo reaccionar con suero hiperinmune homólogo (Fig. 2). Cuando el antígeno fue calentado y precipitado con sulfato de amonio la banda de precipitación correspondiente al VIA no fue observada. La banda del antígeno 140 S no se formó cuando el pH de la suspensión fue ajustado a un valor de 5,5 y después calentado 3 horas a 37° C (Fig. 2).

Titulación de los antígenos 140 S, 12 S y VIA mediante la FC

La Figura 3 muestra los datos de la titulación en bloque de los antígenos 140 S, 12 S y VIA con el suero hiperinmune homólogo C₃. Este suero contiene anticuerpos que reaccionan con los componentes antigénicos 140 S, 12 S y VIA. El título fijador de complemento 50% obtenido con el antígeno 140 S es más alto que el proporcionado por el antígeno 12 S y VIA.

Título infeccioso

El título infeccioso de la suspensión vírica A₂₄ utilizada para la preparación de los antígenos VIA y 140 S fue de 10^{8,1} DI₅₀BHK/ml y el de las preparaciones de VIA y 140 S fue 10^{2,3} y 10⁹ DI₅₀BHK/ml respectivamente.

El preparado de 12 S fue apatógeno para células BHK-21 en la dilución original.

* Gentilmente cedido por el Plum Island Animal Disease Center, Greenport, Long Island, N.Y. 11944, U.S.A.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

El presente estudio fue realizado con la finalidad de obtener los diferentes antígenos del virus de la fiebre aftosa y VIA con el suficiente grado de pureza y concentración para ser usados en pruebas de precipitación en gel de agar. Estas experiencias fueron realizadas utilizando equipos disponibles por todos los laboratorios de diagnóstico de fiebre aftosa en América Latina.⁷

La purificación de los antígenos 140 S y VIA se realizó a partir de suspensiones víricas con la menor degradación posible del virión. La separación de estos dos antígenos y la concentración del 140 S se logró median-

te la precipitación con PEG. El sobrenadante contenía el VIA, el cual fue subsecuentemente concentrado por precipitación con sulfato de amonio. El antígeno 12 S se obtuvo de la degradación del 140 S por medio del calor y tratamiento ácido a pH 5,5. Se concluye que, por medio de estos procedimientos se pueden obtener preparaciones de antígenos factible de ser utilizadas para ensayos cualitativos de anticuerpos anti 140 S, 12 S y VIA mediante la doble difusión en gel de agar. Además permiten analizar la especificidad para estos antígenos de los anticuerpos contenidos en los sueros hiperinmunes utilizados en diagnóstico.

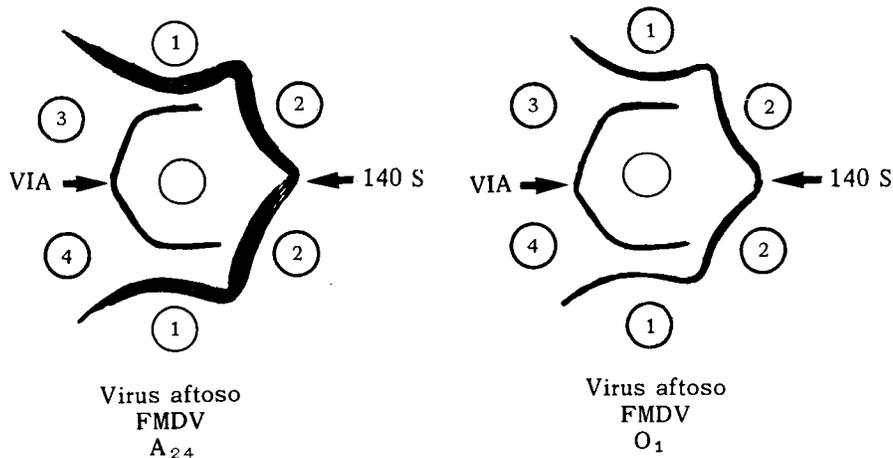


FIGURA 1. Reacción de precipitación en gel de agar con suero hiperinmune (cavidad central), virus crudo (1), preparación 140 S (2), preparación VIA (3) y antígeno VIA de PIADC (4).
 FIGURE 1. Agar gel double diffusion precipitation reactions with hyperimmune serum (contact well) and preparations of crude virus (1), 140 S (2), VIA (3), and VIA from PIADC (4).

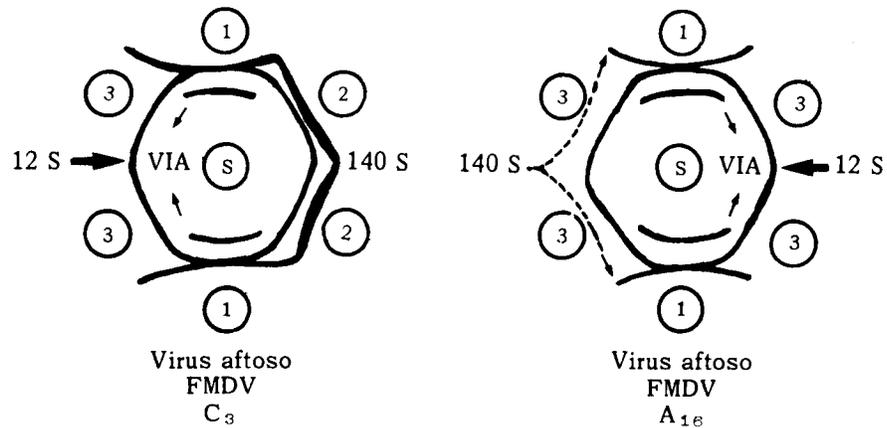


FIGURA 2. Reacción de precipitación en gel de agar con suero hiperinmune (cavidad central), suspensión cruda (1) suspensión calentada y precipitada por sulfato de amonio (2). Suspensión ajustada el pH a 5,5 calentada y precipitada por sulfato de amonio (3).
 FIGURE 2. Agar gel double diffusion precipitation reactions with hyperimmune serum (contact well) and preparation of crude virus (1), ammonium sulfate precipitate (2), and 12 S (3).

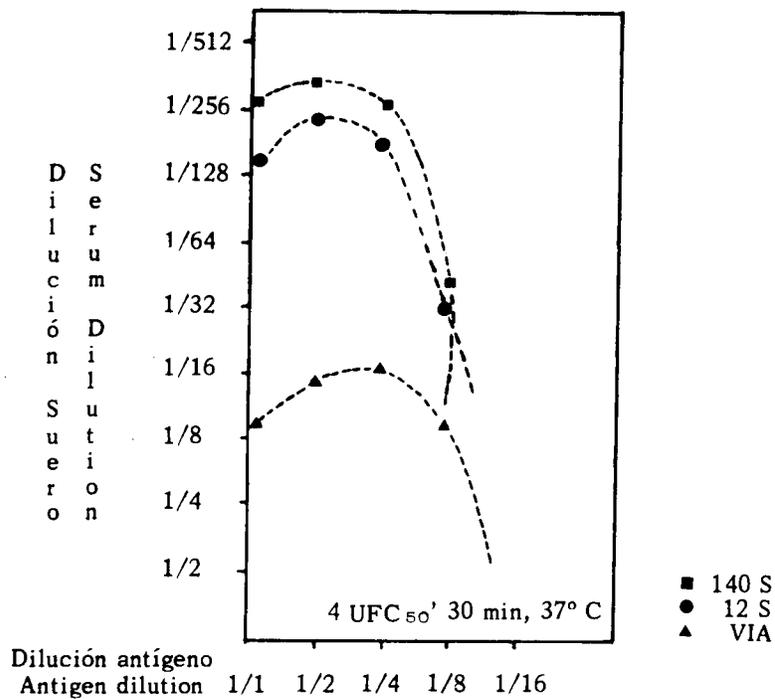


FIGURA 3. Fijación del complemento 50% obtenido con antígenos y suero C₃ Resende. 4 UFC₅₀. 30 min, 37° C.
 FIGURE 3. Complement fixation 50% obtained with antigens and serum C₃ Resende (4 units of complement, 30 min at 37° C).

RESUMEN

Los métodos descritos para la preparación y concentración de antígenos de la fiebre aftosa: 140 S, 12 S y antígeno asociado a la infección viral (VIA), son relativamente simples y económicos y pueden ser utilizados en las condiciones normales en que operan los laboratorios que trabajan en las campañas de control de la fiebre aftosa.

Un medio de cultivo de células BHK-21 fue retirado 18 horas después de la infección con virus aftoso y se agregó un medio nuevo (un décimo del volumen original) seguido de un ciclo de congelación-descongelación. A esta preparación cruda de virus se le agregó 6 g de polietilenglicol (PEG, 6000 PM) por 100 ml y la mezcla fue agitada durante 3 horas a 4° C, seguida de centrifugación a 3000 rpm durante 30 minutos. El sobrenadante y el sedimento se usaron para la concentración de VIA y de antígeno 140 S, respectivamente.

La preparación de VIA se hizo agregando sulfato de amonio al sobrenadante a una concentración final del 35% p/v y agitando por 30 minutos. Se dejó estacionado durante 18 horas a 4° C. Una centrifugación de 3000 rpm durante 30 minutos dio origen a 3 capas: la superior, de tipo oleoso, una fase más sólida intermedia conteniendo la mayor cantidad de VIA y una capa acuosa. La fase media fue recogida y se agregó un medio para cultivo de células para lograr un volumen de 1/10 de la suspensión cruda original de virus. Las partículas insolubles fueron removidas por centrifugación a baja velocidad.

La preparación 140 S se obtuvo resuspendiendo el precipitado de polietilenglicol en un medio de cultivo (1/10 de la suspensión cruda original de virus) y retirando las partículas insolubles también por centrifugación a baja velocidad.

Las preparaciones del antígeno 12 S se obtuvieron de cultivos celulares infectados de células BHK después de completa destrucción

de las capas celulares, clarificación de la suspensión por centrifugación de baja velocidad, acidificación a pH 5,5 por 3 horas a 37° C y una nueva centrifugación de 3000 rpm para retirar cualquier partícula insoluble que hubiera quedado. El antígeno 12 S fue concentrado mediante la adición de sulfato de amonio 35% p/v, agitando por 3 horas a la temperatura ambiente y centrifugando a 3000 rpm durante 30 minutos. El precipitado fue resuspendido en un medio de cultivo celular (1/20 de la suspensión original de virus crudo) y dializada en presencia de una solución salina buffer-fosfato. En una prueba de doble difusión de agar-gel, la preparación de VIA mostró semejanza con la preparación de VIA obtenida por el Laboratorio del Centro de Enfermedades de Animales de Plum Island en los Estados Unidos de América.

El suero hiperinmune difundido frente a la preparación de virus crudo produjo 3 líneas. La línea más cercana al receptáculo que contenía el suero coincidía o se juntaba con la línea del antígeno VIA. La línea del medio y la línea más cercana al orificio con la preparación de virus mostraron ser iguales en las preparaciones 12 S y 140 S, respectivamente. Todas estas preparaciones fijaron el complemento, pero los más altos títulos de fijación del complemento fueron obtenidos con la preparación 140 S. Los títulos de infectividad para las preparaciones de VIA y 140 S fueron de $10^{2,3}$ y 10^9 CT DI_{50}/ml , respectivamente. No se detectó virus infeccioso en las preparaciones de 12 S.

PREPARATION AND CONCENTRATION OF 140 S, 12 S AND VIA
ANTIGENS FROM FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS

ABSTRACT

The methods described for preparing and concentrating 140 S and 12 S foot-and-mouth disease virus (FMDV) and virus-infection-associated (VIA) antigens are relatively simple and economical and can be used under the conditions of FMD laboratories supporting South American anti-FMD campaigns.

A medium of BHK-21 cell cultures was removed 18 hours after infection with FMDV, and fresh medium (one-tenth of the original volume) was added, followed by a freeze-thaw cycle. To this crude virus preparation, 6 g polyethylene glycol (PEG, 6000 MW) per 100 ml were added, and the mixture was shaken for 3 hours at 4° C, followed by centrifugation at 3000 rpm for 30 minutes. The supernatant and sediment were used for the concentration of VIA and 140 S antigens, respectively.

The VIA preparation was produced by adding ammonium sulfate to the supernatant at a final concentration of 35% w/v and shaking for 30 minutes. It was left to stand at 4° C for 18 hours. Centrifugation at 3000 rpm for 30 minutes resulted in 3 layers, the top one oily, a more solid middle phase containing most of the VIA, and an aqueous layer. The middle phase was collected and cell culture medium added to obtain a volume 1/10 of the original crude virus suspension. Insolubles were removed by low-speed centrifugation.

The 140 S preparation was produced by resuspending the PEG precipitate in culture

medium (1/10 of the original crude virus suspension) and removing insolubles by low speed centrifugation.

Preparations of 12 S antigen were obtained from infected BHK cell cultures after complete destruction of the cell layers, clarification of the suspensions by low speed centrifugation, acidification at pH 5.5 for 3 hours at 37° C and again centrifugation at 3000 rpm to remove any insolubles. The 12 S antigen was concentrated by adding ammonium sulfate 35% w/v, shaking for 3 hours at room temperature and centrifuging at 3000 rpm for 30 minutes. The precipitate was resuspended in cell culture medium (1/20 of the original crude virus suspension) and dialyzed against saline phosphate buffer. In agar-gel double diffusion test the VIA preparation showed an identity line with a VIA preparation obtained from the Plum Island Animal Disease Center, New York, USA.

Hyperimmune serum diffused against the crude virus preparation produced 3 lines. The line closest to the serum well coalesced with the VIA line. The middle line and the line closest to the well with the virus preparation showed identity with the 12 S and 140 S preparations, respectively. All these preparations fixed complement, but highest complement fixation titers were obtained with 140 S preparation. Infectivity titers for the VIA and 140 S preparation were $10^{2.3}$ and 10^9 TC ID₅₀/ml, respectively. No infectious virus were detectable in the 12 S preparations.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece la gentileza del Dr. K.M. Cowan por proporcionarnos una muestra de VIA de Plum Island Animal Disease Center y la excelente colaboración del Sr. Deny F. Souza.

BIBLIOGRAFIA

1. BACHRACH, H.L.; BREESE, JR., S.S. Purification and electron microscopy of foot-and-mouth disease virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 97: 659-665, 1958.
2. BACHRACH, H.L.; TRAUTMAN, R.; BREESE, JR., S.S. Chemical and physical properties of virtually pure foot-and-mouth disease virus. *Am. J. vet. Res.* 25: 333-342, 1964.
3. BRADISH, C.J.; HENDERSON, W.M.; KIRKHAM, J.B. Concentration and electron microscopy of the characteristic particle of foot-and-mouth disease. *J. gen. Microbiol.* 22 (2): 379-391, 1960.
4. COWAN, K.M. Immunochemical studies of foot-and-mouth disease. V. Antigenic variants of virus demonstrated by immunodiffusion analyses with 19 S but no 7 S antibodies. *J. Exp. Med.* 129: 333-350, 1969.
5. COWAN, K.M.; GRAVES, J.H. A third antigenic component associated with foot-and-mouth disease infection. *Virology* 30 (3): 528-540, 1966.
6. COWAN, K.M.; TRAUTMAN, R. Immunochemical studies of foot-and-mouth disease. I. Complement fixation reactions with isolated antigenic components. *J. Immunol.* 99 (4): 729-736, 1967.
7. GRAVES, J.H.; COWAN, K.M.; TRAUTMAN, R. Immunochemical studies of foot-and-mouth disease. II. Characterization of RNA-free viruslike particles. *Virology* 34 (2): 269-374, 1968.
8. KABAT, E.A.; MAYER, M.M. Complement and Complement Fixation, in *Experimental Immunochemistry*; Charles C. Thomas (publisher), second edition: 133-139, 1961.
9. MACPHERSON, I.; STOKER, M. Polyoma transformation of hamster cell clones - an investigation of genetic factors affecting cell competence. *Virology* 16 (2): 147-151, 1962.
10. MCVICAR, J.; SUTMOLLER, P. Foot-and-mouth disease: the agar cell diffusion precipitation test for antibody to virus infection-associated (VIA) antigen as a tool for epizootologic surveys. *Am. J. Epid.* 92 (4): 273-278, 1970.
11. PYL, G. Dispersität und Sedimentations Konstante des neurotrop modifizierten Standard-A-Maul-und-Klauenseuche-Virus der weissen Maus. *Arch. Exptl. vet. med.* 10: 358-364, 1956.
12. TRAUTMAN, R.; BREESE, JR., S.S. Isodensity ultracentrifugation of foot-and-mouth disease virus in caesium chloride. *J. gen. Microbiol.* 27 (2): 231-239, 1962.
13. TRAUTMAN, R.; SAVAN, M.; BREESE, JR.; S.S. Partition by zone ultracentrifugation of the two complement-fixing particles in the foot-and-mouth disease virus system. *J. Amer. Chem. Soc.* 81: 4040-4044, 1959.
14. WAGNER, G.G.; CARD, J.L.; COWAN, K.M. Immunochemical studies of foot-and-mouth disease. VII. Characterization of foot-and-mouth disease virus concentrated by polyethylene glycol precipitation. *Arch. ges. Virusforsch.* 30 (4): 343-352, 1970.