

CARACTERIZACIÓN SEROLÓGICA Y MOLECULAR DE CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA, SEROTIPO O, AISLADAS A PARTIR DE BROTES OCURRIDOS ENTRE 1958 Y 1983 EN BRASIL Y ARGENTINA

V. MALIRAT, I.E. BERGMANN, A. ALONSO, P.J.V. PEREIRA, M.A.A. BOLLER

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS)

Caixa Postal 589, 20001-970 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

RESUMEN. La caracterización genética de cepas del virus de la fiebre aftosa representativas de brotes importantes del serotipo O, ocurridos entre 1958 y 1983 en el sudeste de Brasil y el centro-este de Argentina, fue obtenida usando mapas de oligonucleótidos resistentes a T₁. Los resultados obtenidos constituyen la base de un banco de datos para ser aplicado en estudios epidemiológicos.

El control de la fiebre aftosa (FA) en regiones endémicas se ve comprometido por la considerable variabilidad de este virus (16), la cual es responsable por su compleja serología. Existen siete tipos inmunológicamente diferentes del VFA: O, A, C, SAT-1, SAT-2, SAT-3 y Asia-1 (22), cada uno de los cuales comprende un número siempre en aumento de subtipos (21,24).

En América del Sur, la vigilancia continua de la situación en el campo para detectar el surgimiento de nuevas variantes, se encuentra limitada básicamente a los ensayos serológicos clásicos (3). Debido a que estos métodos no proporcionan datos definitivos acerca de las relaciones entre cepas de brotes individuales, las fuentes a partir de las cuales se está diseminando la infección pueden ser difíciles de identificar. Dicha información se torna más relevante en vista del éxito de los programas

de erradicación vigentes en los países sudamericanos.

En contraposición a los ensayos serológicos, las técnicas moleculares tales como el *fingerprinting* de oligonucleótidos resistentes a ARNasa T₁ (10,14) o el secuenciamiento rápido (23), que analizan la estructura genética primaria del virus, permiten una medida más precisa del grado de relación entre cepas virales, constituyéndose en una valiosa herramienta epidemiológica para seguir el comportamiento de las cepas en el campo.

El análisis por *fingerprinting* ha sido especialmente útil para estudiar relaciones evolutivas entre cepas semejantes (12,13,15,18,25). Inclusive, su aplicación diagnóstica ha sido claramente demostrada para el VFA. De hecho, ha sido utilizado para determinar que existen relaciones cercanas entre la mayoría de las cepas europeas de campo y las vacunales (11,17).

Para las cepas sudamericanas, se han registrado los mapas T₁ de los virus prototipo usados actualmente en la producción de vacunas (5,9), y por medio de ellos se ha establecido

Solicitar separatas al:
Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS).

heterogeneidad dentro de una de estas cepas (26). También fueron registrados mapas T_1 de virus subtipo C_3 aislados en Argentina entre 1981 y 1986 (7). El presente informe extiende este análisis a varias cepas de brotes de campo relevantes del serotipo O que ocurrieron entre 1958 y 1983 en Argentina y Brasil.

Las cepas virales, obtenidas de la colección del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, fueron pasadas en cultivos en monocapa de células de riñón de cría de hamster, el número mínimo de veces necesario para proveer ARN suficiente para los análisis. En la mayoría de los casos esto involucró tres o cuatro pasajes a partir del material de campo, sin previo clonado por plaqueo. La preparación del ARN marcado con ^{32}P a partir del citoplasma de células infectadas se llevó a cabo como fue descrito anteriormente (5). El método usado para la separación de los oligonucleótidos resistentes a T_1 fue una modificación de técnicas anteriores y se realizó como fuera descrito (8).

Fueron estudiados seis aislamientos representativos de diferentes episodios ocurridos durante un período de veinticinco años, en el sudeste de Brasil y el centro-este de Argentina. Estos fueron obtenidos de animales infectados en las localidades y fechas indicadas en el cuadro 1. Las comparaciones serológicas de estas muestras entre sí establecieron un amplio espectro de relaciones que no eran proporcionales al tiempo transcurrido entre los aislamientos (figura 1). Esto se ve en la relativa similitud del virus $O_1 C/58$ con el $O_1 Arg/77$ y el $O_1 Iri/83$ aislados con 19 y 25 años de diferencia, respectivamente, y la marcada diferencia entre las cepas $O_1 Cas/67$ y $O_1 Br/70$, recuperadas con tres años de diferencia.

En la figura 2 se presentan los *fingerprints* de los ARNs de estos seis virus. La figura 3 muestra una representación esquemática de las diferencias entre cada uno de ellos y la cepa temprana $O_1 C/58$. Estas comparaciones revelaron padrones que diferían en varias manchas, excepto para el virus

Cuadro 1. Cepas representativas del VFA, aisladas en Argentina y Brasil entre 1958 y 1983

Cepa	Origen Localidad, Provincia, País	Fecha de aislamiento (Mes/Año)
$O_1 C/58$	Campos, Rio de Janeiro, Brasil	01/1958
$O_1 Cas/67$	Caseros, Buenos Aires, Argentina	01/1967
$O_1 Br/70$	Bagé, Rio Grande do Sul, Brasil	09/1970
$O_1 Arg/77$	No registrado, Argentina	11/1977
$O_1 Br/80$	Dom Pedrito, Rio Grande do Sul, Brasil	06/1980
$O_1 Iri/83$	Hipólito Irigoyen, Buenos Aires, Argentina	09/1983

Abreviaciones:

$O_1 C/58$, $O_1 Campos Br 1/58$; $O_1 Cas/67$, $O_1 Caseros-Arg 2/67$; $O_1 Br/70$, $O_1 RS Brasil/70$; $O_1 Arg/77$, $O_1 Argentina/77$; $O_1 Br/80$, $O_1 RS Brasil/80$; $O_1 Iri/83$, $O_1 Irigoyen Argentina/83$.

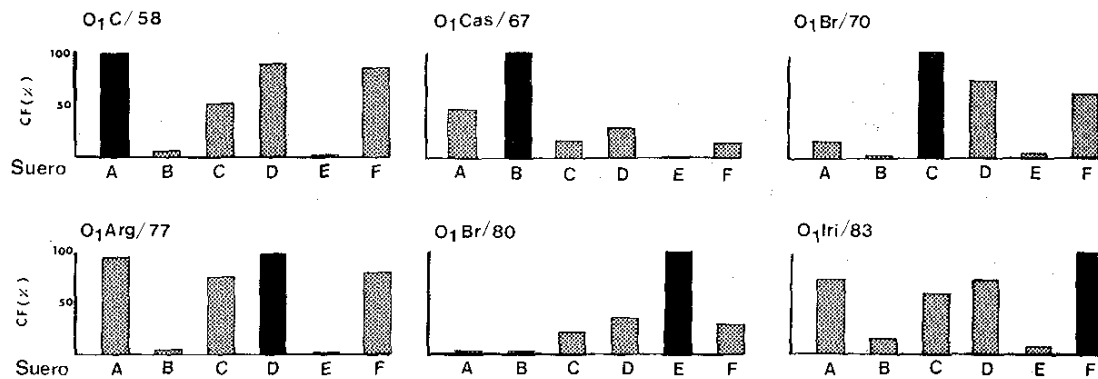


Figura 1. Análisis serológico de los virus indicados. Las relaciones serológicas se estudiaron por ensayo de fijación del complemento al 50% de hemólisis (CF) con los siguientes sueros: A, O₁ C/58; B, O₁ Cas/67; C, O₁ Br/70; D, O₁ Arg/77; E, O₁ Br/80; F, O₁ Iri/83.

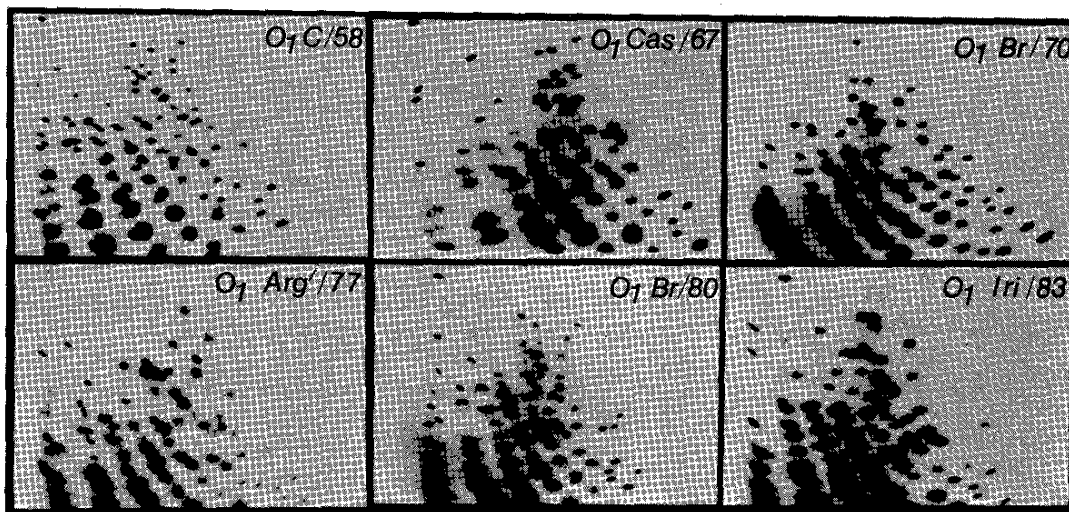


Figura 2. Mapas bidimensionales de oligonucleótidos resistentes a ARNasa T₁ del ARN marcado con ³²P de las cepas correspondientes

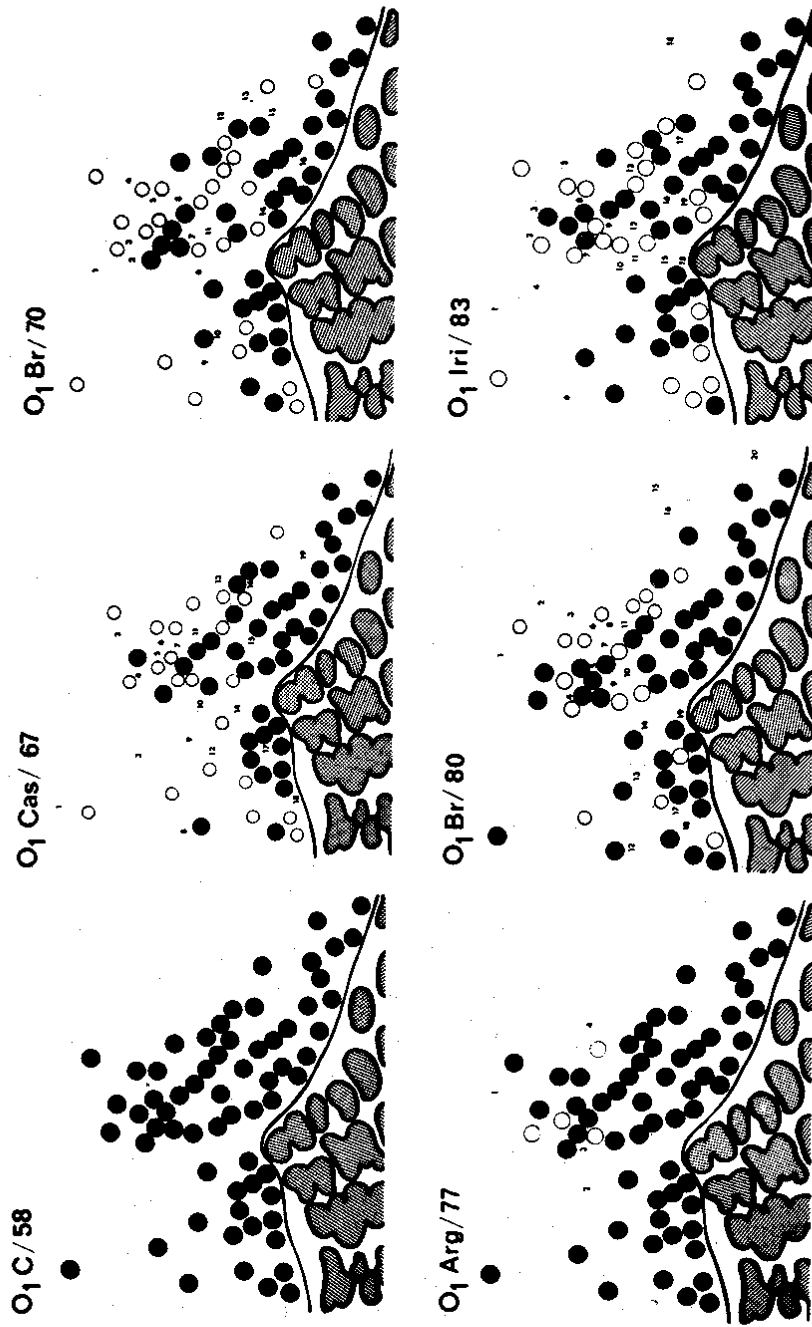


Figura 3. Comparaciones esquemáticas de los mapas T₁ de las cepas indicadas, respecto de la cepa temprana O₁ C/58. Los criterios de análisis son como fuera descrito (18). Las diferencias se determinaron comparando la migración de los oligonucleótidos individualmente y en mezclas conteniendo cantidades equivalentes de ambos digestos de T₁. Simbología del análisis comparativo: los círculos llenos corresponden a oligonucleótidos comunes a ambas cepas comparadas, los círculos vacíos representan manchas del virus O₁ C/58 ausentes en el aislado de campo comparado; los números sin circular representan manchas ausentes en la cepa temprana O₁ C/58 pero presentes en la muestra comparada

O₁ Arg/77, que mostró un mapa T₁ bastante similar al de la cepa temprana, con solamente cuatro manchas adicionales y cuatro faltantes. Los valores deducidos a partir de la figura 3, calculados como se informó previamente (20), indicaron que la homología genética fue siempre mayor al 96% (O₁ Cas/67, 96,2%; O₁ Br/70, 96%; O₁ Arg/77, 99,3%; O₁ Br/80, 96,5% y O₁ Iri/83, 96,2%), que cae dentro del intervalo esperado en el cual es posible comparar las variaciones de los mapas T₁ de diferentes ARNs (1).

Así como se observó con los datos serológicos, el grado de variación no fue proporcional al tiempo transcurrido entre aislamientos. Inclusive, no parece haber acumulación de oligonucleótidos variantes en aislamientos consecutivos. Los resultados de la secuencia de nucleótidos permitieron extraer conclusiones semejantes (18).

Estos padrones de variación sugieren que los aislamientos de campo podrían representar fluctuaciones de poblaciones heterogéneas, con una gama de relaciones que van desde cercanas hasta distantes de la secuencia consenso. Estas poblaciones podrían evolucionar independientemente unas de otras y serían seleccionadas bajo ciertas condiciones epidemiológicas. En el caso del virus O₁ Arg/77, una explicación alternativa también podría ser la reintroducción accidental de virus vacunales en el campo, como ha sido sugerido para varias cepas causantes de brotes en Europa (6,11).

A partir de los datos presentados, es claro que, en contraste con la situación en Europa, los aislamientos de VFA en América del Sur mostraron una considerable diversidad genética. Resultados semejantes han sido demostrados entre aislamientos de campo del tipo C, representativos de brotes en Argentina (7), del tipo O en Perú, Colombia y Venezuela (Malirat y col., manuscrito en preparación) y en otras regiones endémicas (4,19).

En general, las diferencias en los mapas T₁ se asocian con los cambios antigénicos, revelados por fijación del complemento (figura 1), y por la reactividad en una prueba ELISA con un panel seleccionado de anticuerpos monoclonales (2). Sin embargo, considerando la alta precisión de la caracterización molecular por *fingerprinting*, es

útil incluir esta información en un banco de datos de cepas del VFA actuantes en América del Sur. La misma favorecerá futuros estudios epidemiológicos acerca de la diseminación y mantenimiento del VFA en esta región.

REFERENCIAS

1. AARONSON, R.P., YOUNG, J.F., PALESE, P. Oligonucleotide mapping: evaluation of its sensitivity by computer-simulation. *Nucl. Acids. Res.*, 10: 237, 1982.
2. ALONSO, A., GOMES, M.P.D., RAMALHO, A.K., ALLENDE, R., BARAHONA, H., SÖNDAHL, M.S., OSORIO, F.A. Characterization of foot-and-mouth disease virus by monoclonal antibodies. *Viral Immunology*, 6 (3): 219-228, 1993.
3. ALONSO, A., GOMES, I., SÖNDAHL, M.S. Serological and immunological relationships among type A foot-and-mouth disease strains in South America. *Develop. Biol. Standard.*, 35: 231-235, 1977.
4. ANDERSON, E.C., UNDERWOOD, B.O., BROWN, F. Variation in foot-and-mouth disease virus isolates in Kenya: an examination of field isolates by T₁ oligonucleotide fingerprinting. *Vet. Microb.*, 10: 409-423, 1985.
5. AUGÉ DE MELLO, P., CASAS OLASCOAGA, R., COSTA GIOMI, M.P., ALONSO FERNANDEZ, A., SCODELLER, E.A., LA TORRE, J.L., BERGMANN, I.E. RNA fingerprinting of South American prototype aphthovirus strains. *Vaccine*, 4 (2): 105-110, 1986.
6. BECK, E., STROHMAIER, K. Subtyping of European foot-and-mouth disease virus strains by nucleotide sequence determination. *J. Virol.*, 61 (5): 1621-1629, 1987.
7. BERGMANN, I.E., TIRABOSCHI, B., MAZZUCA, G., FERNANDEZ, E., MICHALOFF, C.A., SCODELLER, E.A., LA TORRE, J.L. Serological and biochemical analysis of foot-and-mouth disease virus (serotype C₃) isolated in Argentina between 1981 and 1986. *Vaccine*, 6 (3): 245-252, 1988.
8. BERGMANN, I.E., TIRABOSCHI, B.H., BOLLER, M.A.A., MALIRAT, V., PEREIRA, P.J.V., AUGÉ DE MELLO, P. Desarrollo de un método más simple y rápido para el análisis bidimensional de oligonucleótidos del virus de la

- fiebre aftosa: minifingerprint de ARN./Development of a more rapid and simple procedure for two-dimensional oligonucleotide analysis of foot-and-mouth disease virus: RNA minifingerprinting. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 55: 35-42, 1989.
9. BERGMANN, I.E., MALIRAT, V., PEREIRA, P.J.V. Caracterización molecular de cepas del virus de la fiebre aftosa usadas para la producción de vacunas en Sudamérica./Molecular characterization of foot-and-mouth disease virus strains used for vaccine production in South America. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 58: 109-127, 1992.
 10. BISHOP, D.H.L. The application of RNA fingerprinting and sequencing to viral diagnosis. *Cur. Top. Microbiol. Immunol.*, 104: 259, 1983.
 11. CARRILLO, C., DOPAZO, J., MOYA, A., GONZALEZ, M., MARTINEZ, M.A., SAIZ, J.C.M., SOBRINO, F. Comparison of vaccine strains and the virus causing the 1986 foot-and-mouth disease outbreak in Spain: epizootiological analysis. *Virus Research*, 15: 45-56, 1990.
 12. CLEWLEY, J.P., BISHOP, D.H.L., KANG, C.Y., COFFIN, J., SCHNITZLEIN, W.M., REICHMANN, M.E., SCHOPE, B.E. Oligonucleotide fingerprints of RNA species obtained from rhabdoviruses belonging to the vesicular stomatitis virus subgroup. *J. Virol.*, 23: 152-166, 1977.
 13. CLEWLEY, J.P., GENTSCH, J., BISHOP, D.H.L. Three unique viral RNA species of snowshoe hare and La Crosse bunyaviruses. *J. Virol.*, 22: 459-468, 1977.
 14. CLEWLEY, J.P., BISHOP, D.H.L. Oligonucleotide fingerprinting of viral genomes. In: *New Developments in Practical Virology*. New York, Ed. Howard C., 1982. p. 231.
 15. COELEN, R.J., MACKENZIE, J.S. Genetic variation of Murray valley encephalitis virus. *J. gen. Virol.*, 69: 1903-1912, 1988.
 16. DOMINGO, E., MATEU, M.G., MARTINEZ, M.A., DOPAZO, J., MOYA, A., SOBRINO, F. Genetic variability and antigenic diversity of foot-and-mouth disease virus. In: KURSTAK, E., MARUSTK, R.G., MURPHY, F.A., VAN REGENMORTEL, M.H.V. (Eds.). *Applied Virology Research*. New York, Plenum, 1990. v. 2, p. 233-266.
 17. KING, A.M.Q., UNDERWOOD, B.O., MCCAHERN, D., NEWMAN, J.W., BROWN, F. Biochemical identification of viruses causing the 1981 outbreak of foot-and-mouth disease in UK. *Nature*, 293: 479-480, 1981.
 18. MALIRAT, V., AUGÉ DE MELLO, P., TIRABOSCHI, B., BECK, E., GOMES, I., BERGMANN, I.E. Genetic variation of foot-and-mouth disease virus during persistent infection in cattle. *Virus Research*, 34: 31-48, 1994.
 19. MARTINEZ, M.A., DOPAZO, J., HERNANDEZ, J., MATEU, M.G., SOBRINO, F., DOMINGO, E., KNOWLES, N.J. Evolution of the capsid protein genes of foot-and-mouth disease virus: antigenic variation without accumulation of amino acid substitutions over six decades. *J. Virol.*, 66 (6): 3557-3565, 1992.
 20. NAKAJIMA, K., DESSELBERGER, U., PALESE, P. Recent human influenza A (H1N1) viruses are closely related genetically to strains isolated in 1950. *Nature*, 274: 334-339, 1978.
 21. PEREIRA, H.G. Antigenic variation in relation to epidemiology and control of foot-and-mouth disease. *Br. Vet. J.*, 138: 58-62, 1978.
 22. PEREIRA, H.G. Foot-and-mouth disease. In: GIBBS, E.P.J. (Ed.) *Virus disease of food animals*. New York, Academic Press, 1981. v. 2. p. 333-363.
 23. ROWLANDS, D.J., CLARKE, D.E., CARROLL, A.R., BROWN, F., NICHOLSON, B.H., BITTLE, J.L., HOUGHTEN, R.A., LERNER, R.A. Chemical basis of antigen variation in foot-and-mouth disease virus. *Nature*, 306: 694-697, 1983.
 24. RWEYEMAMU, M.M. Antigenic variation of foot-and-mouth disease: studies based on the virus neutralization reaction. *J. Biol. Stand.*, 12: 323-337, 1984.
 25. TRENT, D.W., GRANT, J.A., ROSEN, L., MONATH, T.P. Genetic variation among Dengue 2 viruses of different geographic origin. *Virology*, 128: 271-284, 1983.
 26. TRINIDAD, J.J., MALIRAT, V., BERGMANN, I.E. Heterogeneidad entre tres cepas del virus de la fiebre aftosa, subtipo A₂₄ Cruzeiro usadas para la producción de vacunas./Heterogeneity among three foot-and-mouth disease subtype A₂₄ Cruzeiro virus strains used for the production of vaccines. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 58: 71-86, 1992.