

ENFOQUES MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO EN LABORATORIO DE LA INFECCIÓN PERSISTENTE CON EL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA: REVISIÓN

I.E. BERGMANN, V. MALIRAT

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS)

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

RESUMEN. Se describen nuevos enfoques para mejorar los métodos de identificación de infecciones persistentes con el virus de la fiebre aftosa (VFA). Los mismos consistieron en la detección de fragmentos genómicos específicos del VFA en muestras obtenidas de la región esofágico-faríngea por medio de técnicas de hibridación, aplicadas con o sin previa amplificación del material mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Asimismo, para la identificación de anticuerpos específicos contra el VFA, indicativos de replicación viral, se llevó a cabo el desarrollo de un método inmunoenzimático altamente sensible y específico basado en el uso como sondas serológicas de antígenos no estructurales purificados del VFA, obtenidos por técnicas de ADN recombinante.

La habilidad que tiene el virus de la fiebre aftosa (VFA) de establecer infecciones subclínicas en ciertos hospedadores, como bovinos y otros rumiantes (5,8,15,18,39-41), tiene gran importancia para los programas de prevención, control y erradicación de la FA. En este sentido, la detección de replicación del VFA en animales que no manifiestan síntomas de la enfermedad es tan relevante como el diagnóstico de infección aguda.

La identificación de animales con infección persistente del VFA se realiza actualmente a través de la detección de anticuerpos contra el (los) antígeno(s) asociado(s) a la infección viral (VIAA) mediante el ensayo de inmunodifusión en gel de agarosa (IDGA) (1,10,11,21,26,30), y del aislamiento del virus en cultivo de células a partir del material de fluido esofágico-faríngeo (OP) (8, 20,36,38). Sin embargo, estos métodos no siempre llevan a resultados conclusivos. Se ha establecido experimentalmente que la identificación de anti-

cuerpos anti VIAA no siempre se correlaciona con la recuperación de virus a partir de fluido OP. Asimismo, la detección del estado persistente durante las fases tardías de la infección fue posible solo en raras oportunidades. El virus se recuperó de muestras OP solo ocasionalmente, y la baja sensibilidad del ensayo de IDGA no permitió la identificación de anticuerpos anti VIAA (6,14).

Los programas en vigencia para la erradicación hemisférica de la FA, basados en la regionalización por ecosistemas y flujos comerciales, tienen entre sus principales objetivos la identificación, preservación y ampliación de áreas libres de la enfermedad. El rápido progreso de estos programas, especialmente en la Cuenca del Plata, enfatiza la necesidad de contar con métodos rápidos e inequívocos que permitan demostrar con mayor confiabilidad la ausencia de actividad viral.

Las técnicas de genética molecular han provisto herramientas poderosas para definir nuevos procedimientos para el diagnóstico de una posible infección subclínica. Esta revisión enfocará las estrategias que se han llevado a cabo hasta el

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

presente para mejorar los métodos de identificación de infecciones persistentes de VFA.

CLONADO MOLECULAR DEL cADN OBTENIDO POR TRANSCRIPCIÓN REVERSA DEL ARN DEL VFA

Un requisito fundamental para la introducción de nuevas herramientas de diagnóstico de infección subclínica con el VFA, fue el clonado molecular del ARN monocatenario del virus. Esta técnica consiste básicamente en la inserción de un fragmento de ADN exógeno en un plásmido bacteriano (pedazo de ADN externo al cromosoma bacteriano) el cual contiene un gen de resistencia a un antibiótico, la introducción de dicho plásmido en una bacteria, y posteriormente la selección por medio del antibiótico de aquellas células que se tornaron resistentes al mismo. Las bacterias que contienen el plásmido que lleva el ADN exógeno, en nuestro caso VFA, son fáciles de identificar, si este último es clonado en el medio de un gen de resistencia a un segundo antibiótico, destruyendo su actividad. Estos plásmidos van a conferir resistencia al primero de los antibióticos, pero no al segundo, permitiendo así la identificación de las bacterias que contienen el plásmido recombinante (figura 1).

Para clonar las secuencias del ARN del VFA, debe sintetizarse primero una copia de ADN complementario al ARN (VFA-cADN). Una vez que la secuencia de VFA-cADN de interés se ha clonado en un plásmido, se pueden obtener grandes cantidades del mismo creciendo los cultivos bacterianos y, subsecuentemente, purificando el ADN plasmídico del ADN cromosomal. Esto proporciona cantidades abundantes del cADN, para ser usado como sonda molecular para detectar secuencias genómicas del VFA en ensayos de

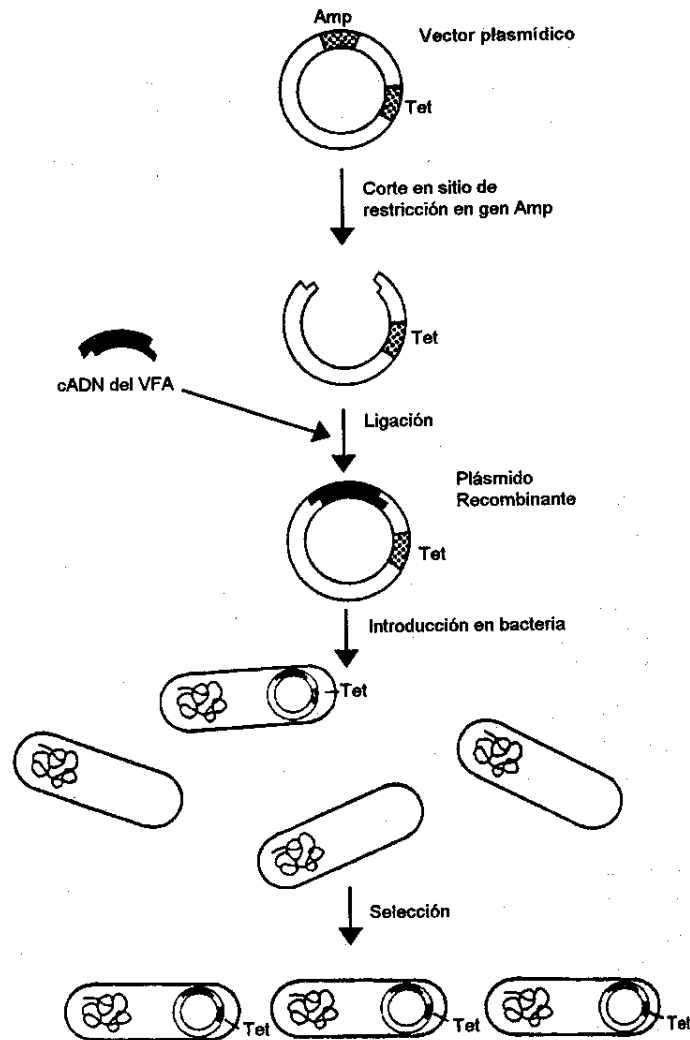


Figura 1. Representación esquemática del clonado de ADN en un plásmido.

hibridación. Además, la colección de distintos fragmentos de VFA-cADN clonados, que codifican para proteínas virales específicas, pueden insertarse en plásmidos bacterianos de expresión, y de esta manera la proteína seleccionada puede ser producida y purificada del lisado bacteriano. Así pueden obtenerse sondas serológicas por bioingeniería.

El ARN monocatenario correspondiente al genoma del VFA fue clonado en el plásmido

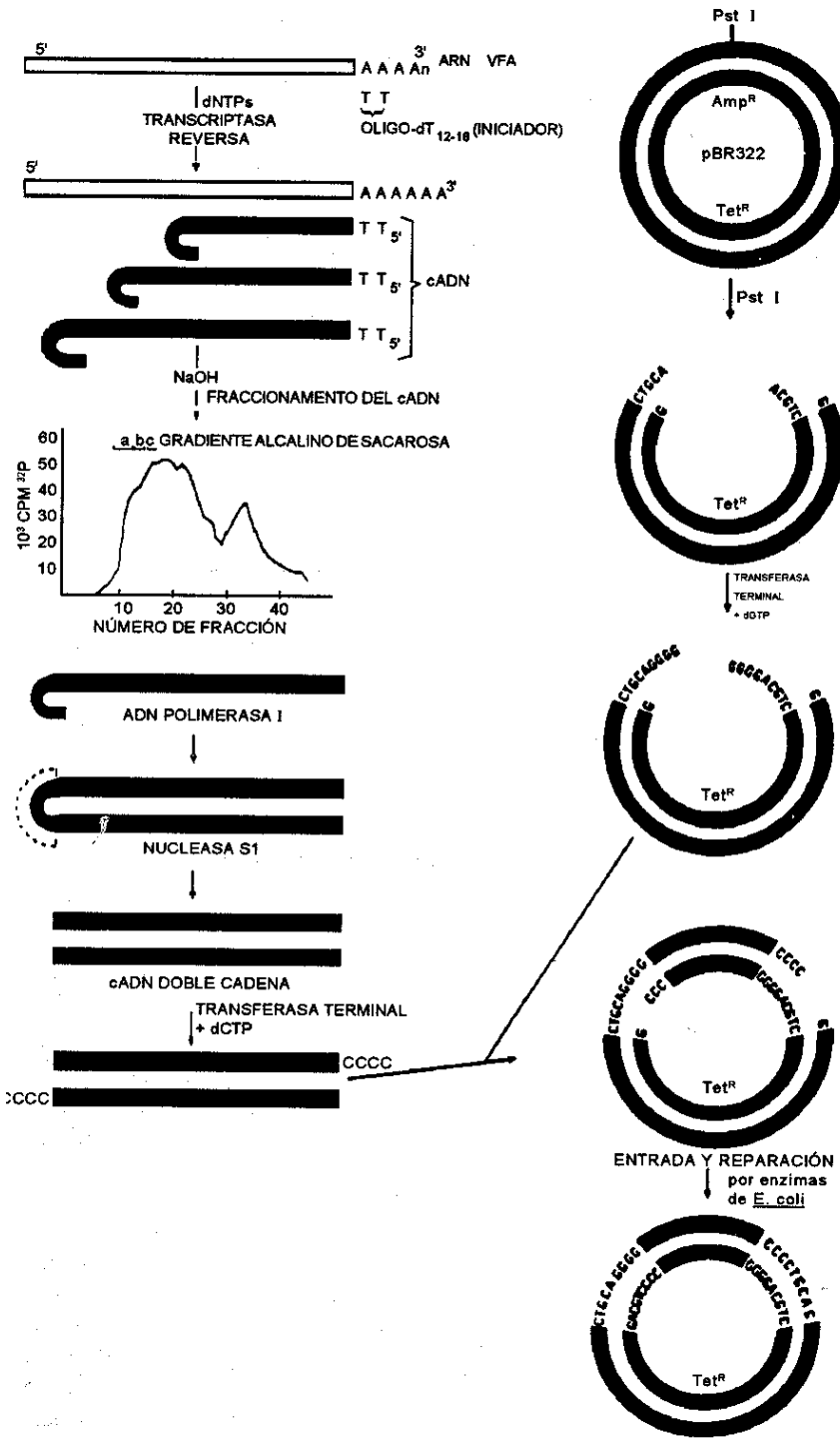


Figura 2. Estrategia de clonado del VFA-cADN. El ARN poliadenilado, purificado, sirvió como templado para la síntesis de la primera cadena de ADN complementario (cADN), usando oligo (dT)₁₂₋₁₈ como iniciador, y transcriptasa reversa. La cadena de ARN del híbrido ARN-cADN fue degradada mediante digestión alcalina. Por medio de un gradiente alcalino, el cADN se separó en tres fracciones de distintos tamaños, a (2000-4000 bases), b (4000-6000 bases) y c (6000-8000 bases). La síntesis de la segunda cadena, a partir de cada una de las fracciones, se realizó mediante la ADN polimerasa I, luego se agregaron pequeñas concentraciones de nucleasa S1 para clivar la estructura de horquilla resultante. El cADN doble-cadena fue terminalizado con homopolímeros de aproximadamente 10 a 15 residuos de dCMP, usando deoxinucleotidil transferasa terminal. Posteriormente, el vector plasmídico pBR322 (el cual contiene un gen de resistencia a ampicilina y otro a tetraciclina) se terminalizó con residuos de dGMP, previa linealización con Pst I, en el sitio de resistencia a ampicilina y se anilló con el oligo(dC)-cADN doble-cadena. Este cADN recombinante se usó para transformar *Escherichia coli* HB101. Los clones tetraciclina resistentes y ampicilina sensibles se seleccionaron por hibridación en colonia. Amp^R: sitio de resistencia a ampicilina. Tet^R: sitio de resistencia a tetraciclina.

pBR322 como se esquematiza en la figura 2. Se obtuvieron clones que cubrían toda la región codificante del genoma.

EL VFA-cADN CLONADO COMO UN REACTIVO DE DIAGNÓSTICO PARA LA DETECCIÓN DEL VFA POR TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Este método de detección se basa en la habilidad de las cadenas complementarias de los ácidos nucleicos, ya sean ADN-ADN, ADN-ARN, o ARN-ARN, de aparearse y formar una molécula bicatenaria. Esta estructura híbrida está formada por dos hebras polinucleotídicas complementarias unidas por puentes de hidrógeno entre pares de bases complementarias. Este dímero es estable en condiciones fisiológicas normales, pero se disocia (desnaturaliza) en las hebras monocatenarias que lo componen cuando es calentado o expuesto a pHs extremos.

Para la detección del VFA, se utiliza una sonda específica de VFA-cADN monocatenaria desnaturalizada la cual hibrida con el ARN viral complementario. La reacción se realiza directamente sobre especímenes (hibridación *in situ*) o luego de inmovilizar el ARN en un soporte sólido (dot-blot o slot-blot). Las sondas se marcan generalmente con radionucleótidos o con biotina, para permitir la detección de los híbridos específicos (figura 3).

Un requisito fundamental para la aplicación de este método como herramienta de detección específica de secuencias genómicas del VFA en fluidos OP de animales potencialmente infectados, es la demostración de que la sonda de cADN viral clonada, marcada radioactivamente, hibrida específicamente con el ácido nucleico viral, y no con ARN total de la región OP. Como se muestra en el ejemplo de la figura 4, cuando ARN total, extraído de muestras de fluidos OP de animales infectados experimentalmente con VFA, se fijó en papel de nitrocelulosa y se hibridó con VFA-cADN clonado marcado con ^{32}P , se observó hibridación específica solamente luego de la infección.

A pesar de que los métodos de hibridación no son tan sensibles como los procedimientos de

ARN/ADN desnaturalizado, proveniente de células infectadas

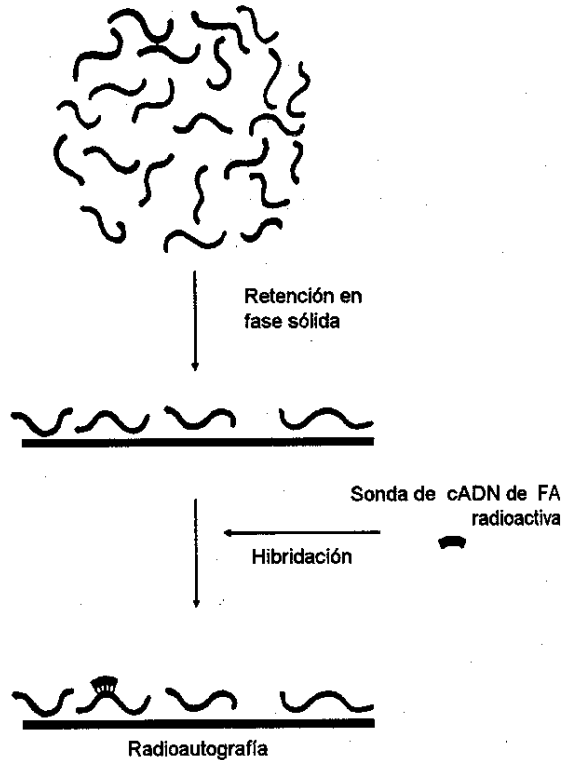


Figura 3. Representación esquemática de la hibridación del ARN, fijado en un soporte sólido, con una sonda de cADN específico.

recuperación viral (25,34), varias muestras correspondientes a etapas avanzadas de la infección, que resultaron positivas por dot-blot, fueron negativas cuando se las ensayó por infectividad en cultivos celulares (ejemplo en la figura 4). Estos resultados son compatibles con los que fueron informados previamente por Rossi y cols. (34) y sugieren que durante la persistencia tardía, pueden producirse grandes cantidades de partículas virales progenie no infectivas. Así, la hibridación de ácidos nucleicos resulta especialmente útil ya que detecta incluso genomas virales inactivos o incompletos que, bajo circunstancias adecuadas, podrían originar virus infectivo.

Asimismo, este método no es afectado por las numerosas dificultades que presenta la técnica

convencional de detección, basada en el aislamiento de virus en cultivo de células a partir de fluidos OP. Por ejemplo, la recuperación viral en cultivos puede verse impedida por la cantidad y calidad del material obtenido, así como por anticuerpos remanentes en las muestras a pesar del tratamiento con TTE (38). Además, variantes seleccionadas debido a la replicación del virus en el animal (9,13,14,23,35,36) podrían crecer dificultosamente y en un rango limitado de cultivos de células. Otra limitación del método de aislamiento en cultivo de células es que un resultado negativo podría requerir tanto cuanto 14 días para confirmarse, mientras que, si ocurre replicación viral, el virus debe identificarse por medio de ensayos suplementarios.

Una ventaja adicional del método de hibridación de ácidos nucleicos, es que se pueden detectar diferentes serotipos del VFA usando una única sonda de cADN clonado. La base molecular de dicha hibridación género-específica es el alto grado de homología que existe entre las secuencias de los ácidos nucleicos de los diferentes serotipos, en regiones genómicas correspondientes a proteínas tales como la polimerasa viral (24). Este amplio espectro de detección facilita enormemente la búsqueda de animales sospechosos. Además, si es preciso, puede llevarse a cabo simultáneamente la tipificación del virus implicado usando sondas de cADN correspondientes a la proteína estructural VP₁ de cada serotipo individual (25).

La hibridación directa en tejidos fijos es también una herramienta valiosa, especialmente para estudios de patogenicidad viral (7), ya que permite la identificación directa de las células blanco infectadas con el virus, así como una estimación de la proporción de células dentro de una sección de tejido que contienen al genoma viral.

AMPLIFICACIÓN ESPECÍFICA DE SEGMENTOS DE ARN GENÓMICO DE VFA

Como fuera mencionado anteriormente, los ensayos de hibridación de ácidos nucleicos no son tan sensibles como los procedimientos de aislamiento de virus. Esta limitación puede superarse actualmente amplificando primero el

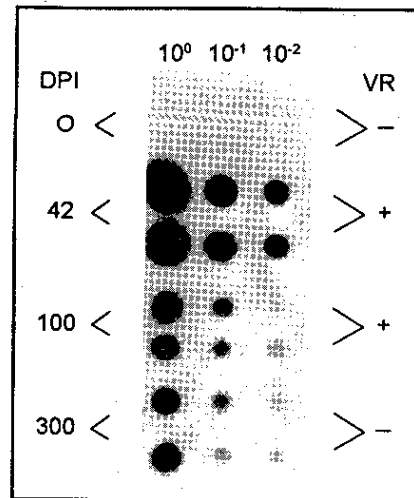


Figura 4. Ejemplos de la hibridación del VFA-cADN con ARN total de fluidos OP de animales persistentemente infectados en forma experimental. En el filtro de nylon se aplicaron, por duplicado, diluciones al décimo del ácido nucleico de fluidos OP de animales previo a o luego de la infección experimental con VFA, y se hibridaron con fragmentos de cADN correspondientes a la región que va desde 6.3 hasta 7.8 kilobases del genoma viral, marcados con ³²P. La exposición autoradiográfica se realizó a -80°C por 18 horas. DPI, días posinoculación. VR, recuperación de virus en cultivos celulares.

material a ser analizado, usando el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (28). En esta técnica, el ADN bicatenario es desnaturizado por calor, y dos oligonucleótidos iniciadores se hibridan a secuencias complementarias en ambos lados del templado. Estos iniciadores, que flanquean la región que será amplificada en el ADN blanco, son extendidos usando la ADN polimerasa Taq, que es termoresistente, duplicando así la secuencia de interés. Como los productos de la extensión de los iniciadores pueden servir como templado en el próximo ciclo, hay una acumulación exponencial de fragmentos específicos cuyos extremos están definidos por las terminaciones 5' de los iniciadores. Así, 20 ciclos pueden rendir una amplificación de aproximadamente un millón de veces (figura 5). El

material amplificado puede visualizarse por electroforesis en gel de agarosa y, posteriormente, caracterizarse.

Para la detección de ARN viral es necesario obtener primero una copia de cADN, por transcripción reversa, que luego es usada como ADN templado en la reacción de PCR.

La transcripción reversa del ARN del VFA se llevó a cabo a partir de células infectadas. Fueron amplificados segmentos de 850 bases que cubrían la región completa de VP₁, y de 2070 bases que cubrían la región genómica que codifica para las proteínas de la cápside VP₃, VP₂ y VP₁, resultando en una banda prominente del tamaño esperado para cada caso (figura 6). Los iniciadores seleccionados correspondían a regiones conservadas del genoma del VFA, de forma tal que fue posible la amplificación de los serotipos O, A y C del VFA. La especificidad del material amplificado fue confirmada por análisis con enzimas de restricción (datos no mostrados). La caracterización también puede llevarse a cabo por hibridación usando una sonda apropiada, y por secuenciamiento de los productos de amplificación (19, 22, 27). Se ha intentado la identificación tipo-específica usando iniciadores serotipo-específicos en la amplificación (33).

Cuando se lo compara con ensayos de infectividad, el PCR es generalmente 10⁴ veces más sensible (4). Esto se atribuye parcialmente a la habilidad del PCR de amplificar a partir de ARN no infectivo.

Si se pretende usar el PCR como herramienta de identificación de animales con infección subclínica, un importante requisito es la adaptación del método a la amplificación y detección de ácidos nucleicos del VFA a partir de muestras de fluidos OP. En este sentido ha sido descrita la amplificación directa a partir de muestras de fluidos OP, omitiendo así la necesidad de purificar el ARN (16). Sin embargo, otros estudios describen la presencia de inhibidores en los fluidos OP, inclusive luego de la purificación del ARN, lo que compromete la alta sensibilidad de esta técnica (4, 17). Esto puede limitar las aplicaciones del PCR en diagnóstico. Se están conduciendo experimentos con el fin de clarificar este punto.

Una gran ventaja de este método rápido y sensible para la detección del VFA, es que la información de la secuencia de nucleótidos puede obtenerse directamente de muestras clínicas sin

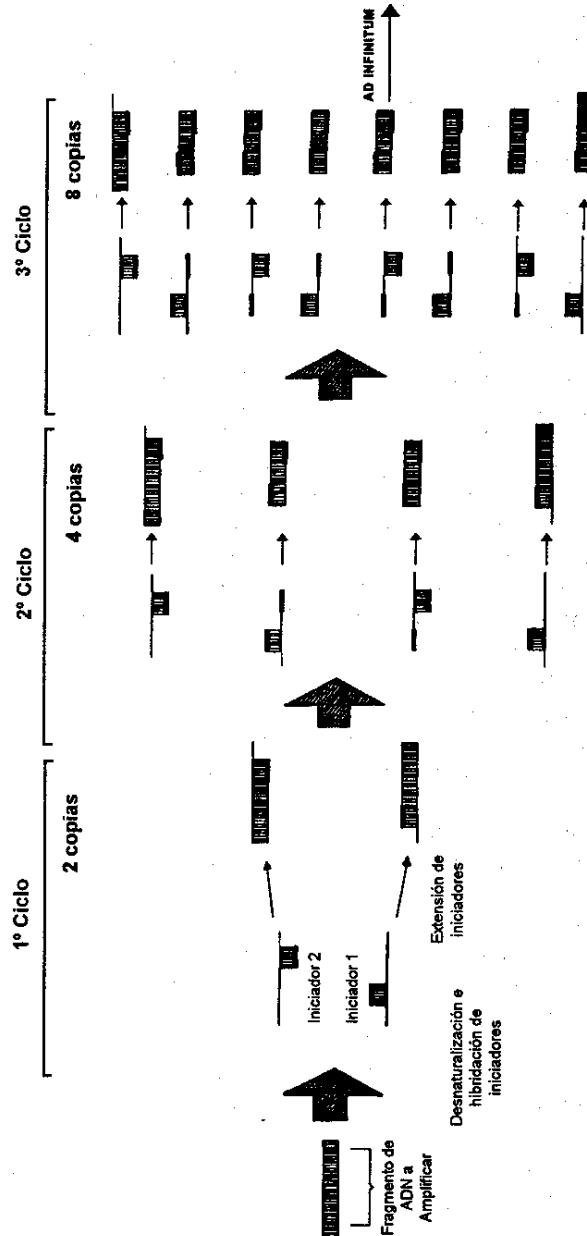


Figura 5. Representación esquemática del método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

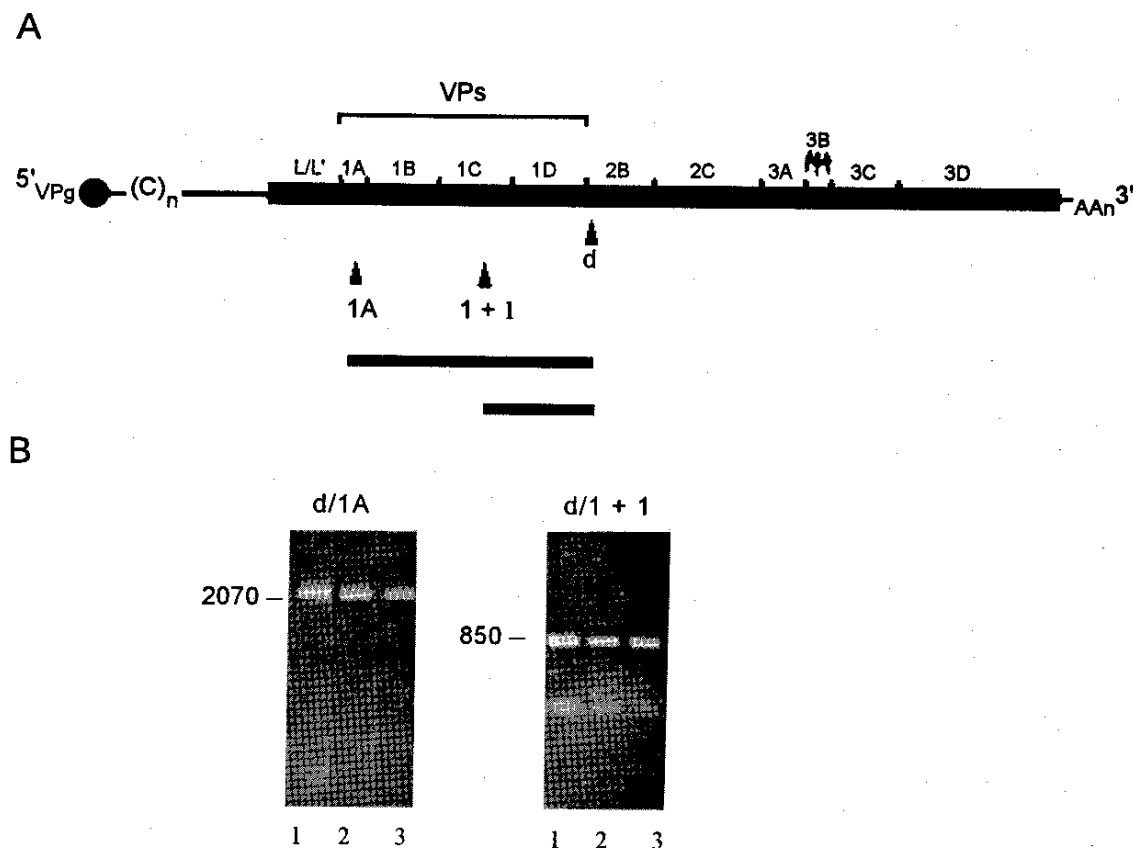


Figura 6. A. Esquema representativo de la región genómica viral, que codifica para las proteínas de la cápside (VPs), que fue usada como plantilla en la amplificación enzimática por PCR. Las flechas marcan la posición de los iniciadores utilizados. El iniciador d contiene una secuencia complementaria al ARN, mientras que los iniciadores 1A y 1+1 contienen la misma secuencia y polaridad que el ARN. Las barras negras indican la extensión y posición de los fragmentos amplificados. B. Geles de 1% de agarosa, teñidos con bromuro de etidio de 1/30 del producto de la reacción de PCR, correspondiente a los cADN de los virus 1) O, Campos Br1/58, 2) A₂₄ Cruzeiro Br1/55 y 3) C3 Indaial Br1/71. Las distintas combinaciones de los iniciadores utilizados, así como el tamaño, (en pares de bases), de los productos esperados, se indican para cada caso.

necesidad previa de amplificación del virus en cultivo de células. Esto elimina la posibilidad de inducir una selección y modificación de las poblaciones virales *in vitro*. Debido a inhibidores potenciales en muestras de OP, esta ventaja puede no ser siempre útil en la caracterización de virus persistentes. Sin embargo, si puede aplicarse a las fases agudas de infección con VFA, durante las

cuales pueden obtenerse cantidades abundantes de virus a partir de tejidos epiteliales de la lengua y del espacio interdental. Así, la amplificación de secuencias de la VP₁, por medio del PCR, en combinación con el secuenciamiento directo del ADN amplificado proporciona un método promisorio para estudios de epidemiología molecular.

NUEVAS HERRAMIENTAS Y REACTIVOS PARA DETECTAR ANTICUERPOS ANTI VFA EN SUERO DE ANIMALES PERSISTENTEMENTE INFECTADOS CON VFA

Una importante limitación encontrada cuando se usa VIAA como sonda serológica para detectar anticuerpos contra antígenos asociados a la infección con VFA, es la necesidad de producirlo en cultivo de células, por ejemplo de riñón de cría de hamster (BHK). Tal antígeno a) es caro, b) tiene una vida media limitada, c) necesita ser estandarizado en cada nuevo preparado, y d) potencialmente contiene antígenos que pueden ser reconocidos por el suero de animales inmunizados con vacunas preparadas a partir de cultivos de células, lo que podría llevar a ensayos falso positivos. De hecho, se han informado resultados positivos obtenidos por IDGA en sueros de animales luego de la vacunación (2, 11, 30). Este problema se acentuó cuando se intentó aplicar una técnica más sensible como ELISA (3).

El reemplazo del VIAA por antígenos no estructurales expresados en bacteria es de considerable interés. Como las proteínas se obtienen a partir de fragmentos genómicos que codifican específicamente para cada una de ellas, su expresión proporciona productos molecularmente definidos. Esto elimina una potencial contaminación con proteínas estructurales o con polipéptidos de BHK, que podrían llevar a resultados positivos con sueros de animales vacunados. La simplicidad con que pueden obtenerse grandes cantidades del material, facilita la purificación a homogeneidad, de tal forma que pueden emplearse métodos inmunoenzimáticos altamente sensibles sin comprometer la especificidad de las reacciones. Además, los cultivos bacterianos requieren menos espacio, tiempo y esfuerzo que los de células eucariotas y son considerablemente más económicos. La absoluta inocuidad del ensayo es particularmente relevante en regiones libres de fiebre aftosa, ya que no hay VFA infectivo o no infectivo involucrado en ninguna etapa del proceso de producción de los antígenos. Esto elimina la necesidad de laboratorios de alta seguridad de elevado costo. Finalmente, pueden prepararse fácilmente sondas serológicas

de cualquier polipéptido no estructural a través de técnicas de ADN recombinante. Así, estudiando la respuesta de anticuerpos del hospedador hacia las diferentes proteínas durante las varias etapas de la persistencia, pueden identificarse cuáles de estos antígenos serían más aptos para un potencial uso en diagnóstico.

USO DE UNA ARN POLIMERASA EXPRESADA EN BACTERIAS EN UN ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO DE ELECTROTRANSFERENCIA (EITB)

Dada la estrecha relación entre el VIAA y la ARN polimerasa viral (3D) (31, 32), se llevaron a cabo intentos de expresar esta última en bacterias.

Para obtener el antígeno más adecuado para ser usado como sonda serológica, fue construido un vector de expresión que incluía ADN que codificaba para la polimerasa 3D completa (29). Este vector llevaba el promotor inducible pL del bacteriófago Lambda, delante de la secuencia consenso de Shine Dalgarno. La polimerasa expresada contenía solo un aminoácido adicional, la metionina N-terminal, y fue purificada a partir de la fracción soluble de los extractos bacterianos por cromatografía en columna de fosfocelulosa seguida de otra columna de poli(U)-Sephara. La proteína 3D purificada fue usada luego en un ensayo de EITB para identificar la presencia de anticuerpos anti-polimerasa en suero de animales persistentemente infectados en forma experimental (29).

El EITB combina la capacidad resolutive de la electroforesis en gel con la sensibilidad y especificidad de las reacciones inmunoenzimáticas. El antígeno no marcado es resuelto mediante una corrida electroforética y transferido a una membrana de nitrocelulosa. Luego de bloquear sitios de unión inespecíficos en la membrana, se lleva a cabo la reacción inmunoenzimática incubando el suero problema (no marcado), seguido de un segundo anticuerpo acoplado a una enzima que funciona como reactivo de detección.

Como se muestra en los ejemplos de la figura 7, la unión de los anticuerpos al antígeno 3D ocurrió durante todo el estado persistente, manteniéndose inclusive a tiempos tardíos. En

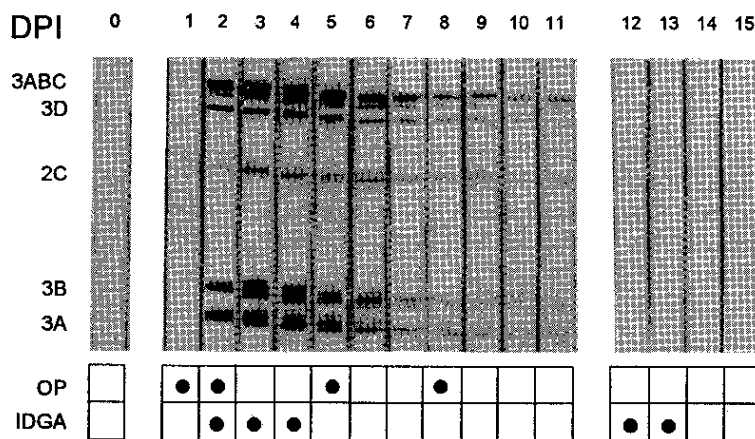


Figura 7. Reactividad de los antígenos no estructurales 3A, 3B, 2C, 3D y 3ABC, producidos por bioingeniería, con suero de animales infectados con VFA. Con un punto de indican el aislamiento de virus de fluidos OP (OP) y las determinaciones positivas de VIAA (IDGA). 7 ng/mm de cada uno de los antígenos no estructurales purificados, obtenidos por expresión en bacteria como se describió anteriormente (29), fueron separados en un gel de poliacrilamida 12,5% (SDS-PAGE). La transferencia electroforética a papel de nitrocelulosa, y la reacción inmunoenzimática, se llevaron a cabo como fue descrito anteriormente (29). Sueros de animales infectados fueron analizados a varios días posinfección (DPI). Calle 1, 7 DPI; calle 2, 42 DPI; calle 3, 154 DPI; calle 4, 231 DPI; calle 5, 280 DPI; calle 6, 315 DPI; calle 7, 448 DPI; calle 8, 546 DPI; calle 9, 602 DPI; calle 10, 644 DPI; calle 11, 742 DPI. Las tiras con controles incluían sueros negativos para VFA provenientes de: bovino previo a la infección (calle 0); animales revacunados a 30 días luego de la primovacunación, calles 12 y 13; regiones libres de FA, calles 14 y 15.

estos tiempos todas las reacciones obtenidas con el ensayo convencional de IDGA fueron negativas y solo ocasionalmente se recuperó virus de fluidos OP. La alta especificidad del EITB fue indicada por la falta de reactividad de suero de animales sin previa exposición al VFA o a sus antígenos virales, incluyendo muestras de animales infectados con una variedad de virus bovinos (6).

A pesar de su mayor sensibilidad, el EITB eliminó un número considerable de resultados positivos generados por IDGA con sueros de animales luego de la vacunación (6). Considerando que el VIAA usado es solo parcialmente purificado de células BHK infectadas, los resultados de IDGA

sugieren que trazas de polipéptidos de la cápside del VFA, o de antígenos de BHK, podrían haber sido reconocidas por el suero de animales inoculados con vacunas producidas en BHK, llevando así a resultados falso-positivos.

Sin embargo, la presencia de polimerasa residual en algunas preparaciones de vacunas fue sugerida por la reactividad ocasional de la proteína 3D expresada con sueros de animales luego de la vacunación. Los intentos para superar esta limitación han incluido el uso adicional de otros antígenos no estructurales virales obtenidos por bioingeniería tal como se describe en la próxima sección.

USO DE LOS ANTÍGENOS NO ESTRUCTURALES 3A, 3B, 2C y 3ABC EXPRESADOS EN BACTERIAS, EN EL EITB

Para obtener los antígenos no estructurales del VFA 3A, 3B, 2C y 3ABC, por medio de técnicas de ADN-recombinante, regiones definidas del genoma del VFA, fusionadas al extremo N-terminal del gen de la polimerasa de MS2, fueron expresadas en bacterias bajo el control del promotor inducible pL del bacteriófago Lambda (37).

Como ocurriera con el polipéptido expresado 3D, la unión de los antígenos anteriormente mencionados a los anticuerpos resultó positiva aun en etapas tardías de la persistencia (figura 7). Nuevamente, no se detectó reacción con sueros de regiones libres de fiebre aftosa, inclusive sueros con alto título de anticuerpos para otros varios virus bovinos, tanto a ARN como a ADN.

Los sueros de animales luego de la vacunación, que resultaron positivos por IDGA usando VIAA, incluyendo aquellos que mostraban una reactividad por EITB con la polimerasa recombinante, no dieron reacción detectable con de los antígenos 3A, 3B, 2C ó 3ABC. Así, se sugiere que el uso tanto de la polimerasa aisladamente cuanto del VIAA usado tradicionalmente, no es adecuado para distinguir si la seropositividad de las muestras de campo es atribuible a infección o vacunación. De hecho, aunque el EITB es considerablemente más sensible, el uso del IDGA llevó a una sobrestimación sustancial de bovinos persistentemente infectados provenientes de regiones endémicas, posiblemente debido a la reactividad de muestras de animales luego de la vacunación. Esto indicó claramente la relevancia del uso de antígenos no estructurales seleccionados del VFA para identificar sueros de animales infectados sin ambigüedades (6).

Otra característica importante de esta técnica es que con un único ensayo serológico puede detectarse la infección con cualquier serotipo del VFA.

Los estudios descriptos demostraron que, a pesar de la alta sensibilidad que posee el EITB para identificar anticuerpos remanentes luego de la

infección, este es un ensayo altamente confiable para eliminar falsos positivos detectados por el IDGA. De esta forma, como el EITB es capaz de identificar la ausencia de actividad viral, su aplicación sería particularmente importante en áreas de América del Sur donde existen programas de erradicación en vigencia, particularmente en regiones que se encuentran próximas al reconocimiento internacional como área libre de FA, y especialmente durante las últimas etapas de vacunación sistemática y las primeras etapas luego de la suspensión de la vacunación. Asimismo, se evitaría un gran número de resultados falso-negativos por IDGA durante las pruebas para importación/exportación, simplificando sustancialmente este proceso.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Aunque las infecciones persistentes del VFA son ampliamente reconocidas, no se han establecido con exactitud, ni la incidencia en el campo, ni la duración real de las mismas. La razón para este insuficiente conocimiento de temas tan importantes, es la dificultad para obtener un diagnóstico inequívoco de tales infecciones.

Las técnicas moleculares han permitido mejorar significativamente el diagnóstico de la persistencia del VFA. De hecho, el método de PCR puede alcanzar una sensibilidad equivalente a 10^{-2} DICT₅₀ (4). Además, el desarrollo de métodos inmunoenzimáticos junto con el uso de sondas serológicas purificadas obtenidas por bioingeniería permiten detectar anticuerpos en sueros de animales infectados persistentemente con VFA en etapas tardías, con alta sensibilidad y especificidad.

La implementación de estos métodos altamente sensibles y específicos sería de enorme importancia para identificar áreas libres de FA, para las pruebas de control de importación/exportación, como así también como herramienta epidemiológica para establecer la incidencia de la persistencia del VFA en el campo. Sin embargo, una interpretación precisa de estos métodos que mejoran tanto la detección del material genómico viral, cuanto la de anticuerpos específicos contra el

virus, debería estar acompañada de un entendimiento profundo de los mecanismos moleculares e inmunológicos que tienen lugar durante el estado persistente en el animal.

Cuando se trata de enfoques inmunoenzimáticos, hay que tener en cuenta que la detección de anticuerpos anti-virus indica una replicación viral que tuvo lugar en el pasado, pero que no necesariamente se mantiene. De hecho, la mayoría de los animales persistentemente infectados con VFA en etapas tardías, con respuesta serológica positiva, no dieron resultados positivos de recuperación viral, medida por el ensayo de infectividad (figura 7) (29). Sin embargo, se han obtenido resultados positivos por hibridación entre estas muestras (figura 4). Aparentemente, esto ocurriría pues la persistencia del VFA podría originar la presencia de una alta proporción de mutantes virales no infectivos o de genomas virales incompletos en fluidos OP, como se demostró para cultivos celulares persistentemente infectados con VFA (12). Esto podría explicar la dificultad que existe para aislar virus infectivo a partir de fluidos OP durante las etapas tardías del estado persistente (14,23,29).

Las técnicas de ADN recombinante no solo han contribuido significativamente para mejorar el diagnóstico de las infecciones subclínicas del VFA, sino que han permitido también un avance importante en el estudio de los mecanismos que tienen lugar durante la replicación del virus en animales persistentemente infectados. Estas investigaciones se encuentran actualmente en una fase muy dinámica.

La interpretación precisa del significado epidemiológico del estado persistente en el campo, será el resultado de combinar un diagnóstico inequívoco junto con un conocimiento profundo de los mecanismos de persistencia viral y transmisión que actúan en el campo.

REFERENCIAS

- ALONSO FERNANDEZ, A., AUGÉ DE MELLO, P., GOMES, I., ROSENBERG, F. El uso del antígeno asociado a la infección viral (VIA) en la detección de ganado expuesto al virus de la fiebre aftosa. / The use of virus-infection-associated antigen (VIA) in the detection of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 17-18:17-22, 1975.
- ALONSO, A., GOMES, I., BAHNEMANN, H.G. La inducción de anticuerpos anti-VIAA en bovinos vacunados y revacunados con vacuna inactivada antiaftosa. / The induction of antibodies against VIAA in cattle vaccinated and revaccinated with inactivated foot-and-mouth disease vaccine. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 54:51-54, 1988.
- ALONSO, A., GOMES, M.P.D., MARTINS, M.A., SÖNDAHL, M.S. Detection of foot-and-mouth disease virus infection-associated antigen antibodies: comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay and agar gel immunodiffusion tests. *Prev. Vet. Med.*, 9:233-240, 1990.
- AMARAL-DOEL, C.M.F., OWEN, N.E., FERRIS, N.P., KITCHING, R.P., DOEL, T.R. Detection of foot-and-mouth disease viral sequences in clinical specimens and ethyleneimine-inactivated preparations by the polymerase chain reaction. *Vaccine*, 11:415-421, 1993.
- AUGÉ DE MELLO, P., HONIGMAN, M.N., FERNANDES, M.V., GOMES, I. Further information on the survival of modified foot-and-mouth disease virus in cattle. *Bull. Off. Int. Epizoot.*, 73:489-505, 1970.
- BERGMANN, I.E., AUGÉ DE MELLO, P., NEITZERT, E., BECK, E., GOMES, I. Diagnosis of persistent aphthovirus infection and its differentiation from vaccination response in cattle by use of enzyme-linked immunoelectrotransfer blot analysis with bioengineered nonstructural viral antigens. *Am. J. Vet. Res.*, 54(6):825-831, 1993.
- BROWN, C.C., MEYER, R.F., OLANDER, H.J., HOUSE, C., MEBUS, C.A. A pathogenesis study of foot-and-mouth disease in cattle, using *in situ* hybridization. *Can. J. Vet. Res.*, 56:189-193, 1992.
- BURROWS, R. Studies on the carrier state of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus. *J. Hyg.*, 64:81-90, 1966.
- COSTA GIOMI, M.P., GOMES, I., TIRABOSCHI, B., AUGÉ DE MELLO, P., BERGMANN, I.E., SCODELLER, E.A., LA TORRE, J.L. Heterogeneity of the polyribocytidilic acid tract in aphthovirus: Changes in the size of the poly(C) of viruses recovered from persistently infected cattle. *Virology*, 162:58-64, 1988.
- COWAN, K.M., GRAVES, J.H. A third antigenic component associated with FMD infection. *Virology*, 30:528-540, 1966.

11. DAWE, P.S., PINTO, A.A. Antibody response to type specific and "virus infection associated" (VIA) antigens in cattle vaccinated with inactivated polyvalent FMD virus in Northern Malawi. *Br. Vet. J.*, 134:504-511, 1978.
12. DE LA TORRE, J.C., DAVILA, M., SOBRINO, F., ORTIN, J., DOMINGO, E. Establishment of cell lines persistently infected with foot-and-mouth disease virus. *Virology*, 145:24-35, 1985.
13. FELLOWES, O.N., SUTMÖLLER, P. Foot-and-mouth disease virus: Biological characteristics of virus from bovine carriers. *Arch. Ges. Virusforsch.*, 30:173-180, 1970.
14. GEBAUER, F., DE LA TORRE, J.C., GOMES, I., MATEU, M.G., BARAHONA, H., TIRABOSCHI, B., BERGMANN, I., AUGÉ DE MELLO, P., DOMINGO, E. Rapid selection of genetic and antigenic variants of foot-and-mouth disease virus during persistence in cattle. *J. Virol.*, 62:2041-2049, 1988.
15. HEDGER, R.S. The isolation and characterization of foot-and-mouth disease virus from clinically normal herds of cattle in Botswana. *J. Hyg.*, 66:27-36, 1968.
16. HÖFNER, M.C., CARPENTER, W.C., DONALDSON, A.I. Detection of foot-and-mouth disease virus RNA in clinical samples and cell culture isolates by amplification of the capsid coding region. *J. Virol. Meth.*, 42:53-62, 1993.
17. HOUSE, C., MEYER, R.F. The detection of foot-and-mouth disease virus in oesophageal-pharyngeal samples by a polymerase chain reaction technique. *J. Virol. Meth.*, 43:1-6, 1993.
18. KAADEN, O.R., EISSNER, G., BÖHM, H.O. Untersuchungen über Maul-und Klauenseuche (MKS)-Virusdauerasscheider bei vakzinierten und experimentell infizierten Rindern. *Zbl. Vet. Med. B.*, 17:485-496, 1970.
19. LAOR, O., TORGENSEN, H., YADIN, H., BECKER, Y. Detection of FMDV RNA amplified by the polymerase chain reaction (PCR). *J. Virol. Meth.*, 36:197-208, 1992.
20. LEEUW, P.W., VANBEKKUM, J.G., TIESSINK, J.W.A. Excretion of foot-and-mouth disease virus in esophageal-pharyngeal fluid and milk of cattle after intranasal infection. *J. Hyg.*, 81:415, 1978.
21. LOBO, C.A., HANSON, R.P., GUTIERREZ, A., BELTRAN, L.E. Serological detection of natural FMD infection in cattle and pigs. *Bull. Off. Int. Epizoot.*, 85:1075-1104, 1976.
22. LOCHER, F., TRATSCHIN, J.D., HOFMANN, M.A., KIHM, U. Rapid diagnosis of FMDV by PCR and characterization of virus isolates by nucleotide sequencing. Meeting Suiza 11.09.1992.
23. 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.
24. MARTINEZ-SALAS, E., ORTIN, J., DOMINGO, E. Sequence of the viral replicase gene from foot-and-mouth disease virus C1-Santa Pau (C-S8). *Gene*, 35:55-61, 1985.
25. McFARLANE, R.G., MOLITOR, T.W., VAKHARIA, V.N. The detection and differentiation of foot-and-mouth disease viruses using solid-phase nucleic acid hybridization. *J. Virol. Meth.*, 27:175-188, 1990.
26. McVICAR, J.W., SUTMÖLLER, P. FMD: The agar gel diffusion precipitin test for antibody to virus-infection associated (VIA) antigen as a tool for epizootologic surveys. *Am. J. Epidemiol.*, 92:273-278, 1970.
27. MEYER, R.F., BROWN, C.C., HOUSE, C., HOUSE, J.A., MOLITOR, T.W. Rapid and sensitive detection of foot-and-mouth disease virus in tissues by enzymatic RNA amplification of the polymerase gene. *J. Virol. Meth.*, 34:113-226, 1991.
28. MULLIS, K.B., FALDONA, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.*, 155:335-350, 1987.
29. NETZERT, E., BECK, E., AUGÉ DE MELLO, P., GOMES, I., BERGMANN, I.E. 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*, 184:799-804, 1991.
30. PINTO, A.A., GARLAND, A.J.M. Immune response to virus-infection-associated (VIA) antigen in cattle repeatedly vaccinated with foot-and-mouth disease virus inactivated by formalin or acetylenimine. *J. Hyg.*, 82:41-50, 1979.
31. POLATNICK, J. Isolation of a foot-and-mouth disease polyuridylic acid polymerase and its inhibition by antibody. *J. Virol.*, 33:774-779, 1980.
32. POLATNICK, J., ARLINGHAUS, R.A. Foot-and-mouth disease virus-induced RNA polymerase in baby hamster kidney cells. *Virology*, 31:601-608, 1967.
33. RODRIGUEZ, A., MARTINEZ-SALAS, E., DOPAZO, J., DAVILA, M., SAIJ, J.C., SOBRINO, F. Primer design for specific diagnosis by PCR of highly variable RNA viruses: typing of foot-and-mouth disease virus. *Virology*, 189:363-367, 1992.

32. POLATNICK, J., ARLINGHAUS, R.A. Foot-and-mouth disease virus-induced RNA polymerase in baby hamster kidney cells. *Virology*, 31:601-608, 1967.
33. RODRIGUEZ, A., MARTINEZ-SALAS, E., DOPAZO, J., DAVILA, M., SAIZ, J.C., SOBRINO, F. Primer design for specific diagnosis by PCR of highly variable RNA viruses: typing of foot-and-mouth disease virus. *Virology*, 189:363-367, 1992.
34. ROSSI, M.S., SADIR, A.M., SCHUDEL, A.A., PALMA, E.L. Detection of foot-and-mouth disease virus with DNA probes in bovine esophageal-pharyngeal fluids. *Arch. Virol.*, 99:67-74, 1988.
35. STRAVER, P.J., BOOL, P.H., CLAESSENS, A.M.J.M., VAN BEKKUM, J.G. Some properties of carrier strains of foot-and-mouth disease virus. *Arch. Ges. Virusforsch.*, 29:113-126, 1970.
36. STRAVER, P.J., VAN BEKKUM, J.G. Plaque production by carrier strains of foot-and-mouth disease virus in BHK monolayers incubated at different temperatures. *Arch. Ges. Virusforsch.*, 37:12-18, 1972.
37. STREBEL, K., BECK, E., STROHMAIER, K., SCHALLER, H. Characterization of foot-and-mouth disease virus gene products with antisera against bacterially synthesized fusion proteins. *J. Virol.*, 57:983-991, 1986.
38. SUTMÖLLER, P., COTTRAL, G.E. Improved techniques for the detection of FMDV in carrier cattle. *Arch. Ges. Virusforsch.*, 21(2):170-177, 1967.
39. SUTMÖLLER, P., GAGGERO, A. Foot-and-mouth disease carriers. *Vet. Rec.*, 77:968-969, 1965.
40. SUTMÖLLER, P., McVICAR, J.W., COTTRAL, G.E. The epizootiological importance of foot-and-mouth disease carriers. I. Experimentally produced foot-and-mouth disease carriers in susceptible and immune cattle. *Arch. Ges. Virusforsch.*, 23:227-235, 1968.
41. VAN BEKKUM, J.G., FRENKEL, H.S., FREDERIKS, H.H.J., FRENKEL, S. Observation on the carrier state of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus. *Tijdschr. Diergeneeskd.*, 84:1159-1164, 1959.