

## CARACTERIZACIÓN DETALLADA DE ALGUNOS ANTICUERPOS MONOCLONALES QUE RECONOCEN SITIOS ANTIGÉNICOS EN EL VP<sub>1</sub> DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA

T.R. DOEL, M.M. KANASHIRO, J.L. da SILVA

*Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS)*  
Caixa Postal 589, 20001-970 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

**RESUMEN.** La mayoría de los anticuerpos monoclonales (AcMs) desarrollados contra las cepas O<sub>1</sub>, Campos, A<sub>24</sub>, Cruzeiro y C<sub>3</sub>, Indaial de la fiebre aftosa y que previamente mostraron reacción con el VP<sub>1</sub> en "Western Blots", reconocieron péptidos sintéticos correspondientes a la secuencia 141-158 de esta proteína. Un número significativo de los AcMs que reconocieron péptidos sintéticos, lo hicieron de forma heteróloga u homóloga. Así, muchos de los AcMs A<sub>24</sub>, Cruzeiro reconocieron un péptido O<sub>1</sub>, Kaufbeuren y atribuyeron su reacción cruzada a la región 141-158 del VP<sub>1</sub>. Un AcM C<sub>3</sub>, Indaial reconoció péptidos correspondientes a tres serotipos y la actividad cruzada fue atribuida a la secuencia 200-213 del VP<sub>1</sub>. Generalmente, la reacción cruzada de un AcM dado se observó con el virus y con el péptido, pero no con los dos antígenos.

Anticuerpos monoclonales (AcMs) desarrollados contra la fiebre aftosa han sido extensivamente usados en investigaciones aplicadas y fundamentales. Aplicaciones notables incluyen la definición de sitios antigénicos en el virus (10) y la diferenciación de cepas, particularmente con respecto al relacionamiento entre cepas de campo y cepas de vacuna. En estas últimas, generalmente se usan paneles de AcMs como soporte de los datos obtenidos con reaccionantes policlonales. Mientras que el valor de estos paneles en la discriminación entre virus estrechamente relacionados o en la detección de pequeñas variaciones antigénicas es indiscutible, la exacta relevancia de la información

obtenida para los aspectos prácticos en el diagnóstico y control de la infección no es tan clara.

Una razón para esto es que los AcMs escogidos pueden no ser totalmente representativos de la reacción de los anticuerpos policlonales de una determinada especie, a la vacunación o a la infección con fiebre aftosa. En verdad, la combinación de consideraciones técnicas e inmunológicas fundamentales, tornan difícil que cualquier laboratorio pueda desarrollar una colección comprensible de AcMs. Vale considerar que la evidencia de por lo menos cinco sitios antigénicos del tipo O de la fiebre aftosa se obtuvo de cuatro laboratorios diferentes (3,11). Otra complicación es la tendencia a seleccionar AcMs y paneles de AcMs basados en su capacidad de neutralizar virus *in vitro*. Aunque no se pretende desvalorizar la neutralización en sí, existen AcMs y sueros policlonales con gran poder neutralizante *in vitro*, pero que son conside-

---

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

rablemente menos efectivos en pruebas de protección *in vivo* y vice-versa (15).

Resulta claro, entonces, que las colecciones de AcMs deben ser caracterizadas en forma comprensible, para asegurarse de que las interpretaciones que se hagan tengan sentido. Con este objetivo, en el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (PANAFTOSA) se ha mantenido un programa continuo para desarrollar y caracterizar completamente AcMs contra las cepas más importantes de América del Sur. Una publicación previa (1) describió el alcance de las propiedades de los AcMs desarrollados contra las cepas O<sub>1</sub> Campos, A<sub>24</sub> Cruzeiro y C<sub>3</sub> Indaial, incluyendo su capacidad para reconocer epítopes independientes de conformación, según deducido de las reacciones de proteínas de virus desnaturalizados, así como de virus completos, o epítopes independientes de conformación, según deducido de la reacción de virus individuales. En este estudio hemos ampliado el trabajo con estos y otros AcMs para examinar el reconocimiento de algunos péptidos sintéticos, especialmente con referencia a la identificación de secuencias unidas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

*Péptidos sintéticos.* Estos fueron o bien gentilmente cedidos por el Dr. Richard DiMarchi (Eli Lilly Research Laboratories, Indianapolis, EE.UU.), o preparados por uno de los autores (T.R.Doel) en el Institute for Animal Health, UK y donados por el Dr. Mike Parkhouse. Los péptidos fueron sintetizados por los métodos de fase sólida T-boc.

Casi todo el análisis básico fue realizado con tres péptidos basados en las secuencias VP<sub>1</sub> de las cepas O<sub>1</sub> Kaufbeuren, A<sub>24</sub> Cruzeiro y C<sub>3</sub> Indaial de la fiebre aftosa (12). Cada péptido incorporó dos regiones antigénicas de la secuencia VP<sub>1</sub>, y los péptidos O<sub>1</sub> Kaufbeuren y A<sub>24</sub> Cruzeiro contenían aminoácidos adicionales entre las dos secuencias y en cada extremo (7). O sea:

El péptido O<sub>1</sub> fue C-C-X<sub>O</sub>-P-P-S-Z<sub>O</sub>-P-C-G  
El péptido A<sub>24</sub> fue C-C-X<sub>A</sub>-P-P-S-Z<sub>A</sub>-P-C-G

donde C,G,P y S son códigos de una letra para cisteína, glicina, prolina y serina y:

X<sub>O</sub> es la secuencia 200-213 de la cepa O<sub>1</sub> K de la fiebre aftosa y es:

R-H-K-Q-K-I-V-A-P-V-K-Q-T-L

X<sub>A</sub> es la secuencia equivalente de la cepa A<sub>24</sub> Cruzeiro de la fiebre aftosa y es:

R-H-K-Q-K-I-I-A-P-A-K-Q-L-L

Z<sub>O</sub> es la secuencia 141-158 de la cepa O<sub>1</sub> K de la fiebre aftosa y es:

V-P-N-L-R-G-D-L-Q-V-L-A-Q-K-V-A-R-T

Z<sub>A</sub> es la secuencia equivalente de la cepa A<sub>24</sub> Cruzeiro de la fiebre aftosa y es:

G-S-G-R-R-G-D-M-G-S-L-A-A-R-V-V-K-Q

El péptido C<sub>3</sub> tiene la construcción Z<sub>C</sub>-X<sub>C</sub> donde

Z<sub>C</sub> es la secuencia 134-160 de la cepa C<sub>3</sub> Indaial de la fiebre aftosa y es:

T-G-T-T-A-Y-T-A-S-A-R-R-G-D-L-A-H-L-A-A-A-H-A-R-H-L-P

X<sub>C</sub> es la secuencia 196-213 de la cepa C<sub>3</sub> Indaial de la fiebre aftosa y es:

P-A-G-D-R-H-K-Q-P-L-I-A-P-A-K-Q-L-L

Otros péptidos usados incluyeron las secuencias individuales 141-158 y 200-213 de los virus O<sub>1</sub> y A<sub>24</sub>, y superposición de grupos de péptidos correspondientes a los péptidos C-C-X<sub>O</sub>-P-P-S-Z<sub>O</sub>-P-C-G y C-C-X<sub>A</sub>-P-P-S-Z<sub>A</sub>-P-C-G. Cada grupo se formó por el procedimiento de "tea-bags" (bolsistas de té) (9) y se compuso de 29 péptidos 12-mer, con cada péptido superpuesto al próximo en la secuencia por 11 aminoácidos.

*Anticuerpos monoclonales.* La mayoría de los AcMs usados en este estudio ya fueron descritos (1,17). El AcM OC3 (anti-O<sub>1</sub> Caseros) fue gentilmente cedido por la Dra. Sandra Farias, Universidad Federal, Porto Alegre, Brasil. El AcM B2 (anti-O<sub>1</sub> Suiza 1965) fue descrito originalmente por Crowther et al. (4).

*Inmunoensayos.* La prueba de ELISA se efectuó como descrita anteriormente (7), con pequeñas variaciones. Resumiendo, placas de plástico (Nunc Immunoplate 1\*) se revistieron, a 4°C, con 3 µg/ml de péptidos sintéticos en 15 mM de tampón/bicarbonato, pH 9,6, por una noche. Al día siguiente, a las placas se adicionaron diluciones de AcMs y se incubaron a 37°C por 30 minutos. Después de una incubación con inmunoglobulina antiratón conjugada con peroxidasa de rabanito, se detectaron reacciones positivas con O-fenilenediamina/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La proteína portadora usada en el diluyente para el conjugado de enzimas y AcMs, fue ovalbúmina al 1% en PBS, conteniendo 0,05% v/v de Tween 20.

## RESULTADOS

El cuadro 1 resume algunas de las propiedades de los AcMs en este estudio, incluyendo su capacidad para reconocer péptidos sintéticos correspondientes a dos secuencias del VP<sub>1</sub>. Con respecto a esta última propiedad, en el cuadro 1 se distinguen claramente dos reacciones. Ninguno de los AcMs, caracterizados previamente como reconocedores de epítopes dependientes de conformación (1), reconoció los péptidos homólogos del VP<sub>1</sub> ni, cuando ensayados, ninguno de los péptidos heterólogos. La otra categoría de AcMs, caracterizada previamente como independiente de conformación por su reacción con el VP<sub>1</sub> en experimentos en "Western Blotting", reconoció los péptidos en forma consistente y, en particular, la región 141-158, como se dedujo con péptidos correspondientes a secuencias más cortas. Un número de AcMs, no caracterizado previamente sobre su reconocimiento de epítopes dependientes o independientes de conformación, se probaron a ciegas contra los péptidos. Aquellos que reconocieron uno de los péptidos, también se mostraron capaces de unirse a los homólogos del VP<sub>1</sub> en experimentos en "Western Blotting", mientras que

los que no reconocieron ningún péptido no se unieron a ninguna de las proteínas estructurales desnaturalizadas del virus (no se presentan los resultados). Así, la unión de péptidos representa un método fácil y rápido para iniciar la agrupación de un número mayor de AcMs.

Experimentando primero con el reconocimiento específico de serotipos, los AcMs O<sub>1</sub> 11HC10, 36AF8 y 36BE8 reaccionaron con "tea-bag" de péptidos 12-mer O<sub>1</sub> cubriendo el locus Arg-Gly-Asp (RGD) en la región 141-158 del VP<sub>1</sub>. El perfil obtenido con el AcM 11HC10 se muestra en la figura 1 y difiere un poco de los del 36AF8 y del 36BE8 en términos del número de péptidos reconocidos alrededor de la secuencia RGD. Así, el 11HC10 reaccionó fuertemente con solo tres péptidos, mientras que el 36AF8 y el 36BE8 tuvieron reacciones más amplias, similares a las de los AcMs OC3 mostrados en la figura 1. Los perfiles para los AcMs B2 y OC3 se muestran por su importancia histórica en relación a la definición de los sitios antigénicos del virus O<sub>1</sub> que envuelven al VP<sub>1</sub> 140-160, específicamente los sitios 1 y 5, respectivamente (3). Todos los AcMs A<sub>24</sub> que reconocieron los péptidos A<sub>24</sub> grandes, indicados en el cuadro 1, con la posible excepción del 31FE7 que no fue probado, también reconocieron la secuencia 141-158-Pro-Cys-Gly del A<sub>24</sub>. En general, la reacción de los AcMs A<sub>24</sub> con un grupo de "tea-bag" de péptidos A<sub>24</sub> fue baja, aunque el 31DF4 reconoció fuertemente un péptido dentro de la secuencia 141-158 (cuadro 1). El fracaso para definir con más precisión los aminoácidos reconocidos por los AcMs A<sub>24</sub> puede deberse a los tamaños/conformaciones relativos de los "tea-bags" de péptidos 12-mer y la secuencia 141-158-Pro-Cys-Gly. Muchos de los AcMs C<sub>3</sub> que fueron caracterizados como reconociendo un epítipo continuo (VP<sub>1</sub> en el "Western Blotting"), reaccionaron fuertemente al péptido C<sub>3</sub> que contenía las regiones 140-158 y 200-213 del VP<sub>1</sub>. Todos estos AcMs, excepto el 7JA1, reconocieron un péptido menor correspondiente a la secuencia 140-160 (resultados no mostrados y ref. 14).

Un rasgo importante de muchos de los AcMs fue la capacidad de reconocer uno o ambos péptidos

\* La mención de firmas comerciales o de sus productos es solamente para identificación y no constituye endoso por los autores o sus organizaciones.

**Cuadro 1. Resumen de las propiedades de los anticuerpos monoclonales (AcMs)**

AcMs O <sub>1</sub> CAMPOS								
AcMs	Tipo <sup>a</sup>	Sero- <sup>b</sup>		Prueba <sup>c</sup>	Reacción con péptidos <sup>d</sup>			Secuencia
		Neut	Prot		O <sub>1</sub>	C <sub>3</sub>	A <sub>24</sub>	
12BB5	CON	<1.2	3.25	N	0	-	-	
36AC6	CON	>3.6	2.5	N	0	-	-	
12FA5	CON	<1.2	0.88	N	0	-	-	
12DB7	CON	1.9	2.83	N	0	-	-	
13EG1	CON	<1.2	0	N	0	-	-	
11HC10	VP <sub>1</sub>	<3.5	4.27	Y	++++	0	0	PPSVPNLRGDLQ
11AD6	CON	<1.2	2.35	N	0	-	-	
12GG11	CON	<1.2	0	N	0	-	-	
36AF8	VP	-	-	-	++++	++	?	PPSVPNLRGDLQ
36BE8	VP <sub>1</sub>	-	-	-	++++	?	?	PPSVPNLRGDLQ
AcMs A <sub>24</sub> CRUZEIRO								
31EF12	CON	1.8	4.25	Y	-	-	0	
32DH3	CON	<1.2	4.25	Y	-	-	0	
31DF4	VP <sub>1</sub>	3.4	4.03	Y	++++	0	++++	LPPSGSGRRGDM
32AA5	VP <sub>1</sub>	<1.2	0.85	Y	++++	0	++++	
31FA4	VP <sub>1</sub>	<1.2	3.15	Y	++++	?	++++	
16EC11	VP <sub>1</sub>	<1.2	3.0	Y	0	0	++++	
31GA6	CON	<1.2	3.85	Y	0	0	0	
31GA3	VP <sub>1</sub>	<1.2	3.35	-	0	0	++++	
31DB8	VP <sub>1</sub>	<1.2	4.02	-	++++	0	++++	
31DC7	VP <sub>1</sub>	<1.2	2.24	-	+++	0	++++	
31DE3	VP <sub>1</sub>	<1.2	3.0	-	+++	0	++	
31EH2	CON	1.5	2.75	-	0	0	0	
31FE7	VP <sub>1</sub>	<1.2	3.1	-	++++	0	++++	
31CG4	VP <sub>1</sub>	<1.2	1.25	-	+++	0	++	
31ED1	CON	1.4	4.5	-	0	0	0	
31EA12	CON	1.3	2.0	-	0	0	0	
AcMs C <sub>3</sub> INDAIAL								
7FC12	VP <sub>1</sub>	3.3	3.0	Y	0	++++	0	
7LA5	CON	<1.2	4.25	N	-	0	-	
7CA8	VP <sub>1</sub>	>3.6	3.25	Y	0	+++	0	
7CH1	CON	1.9	3.75	Y	-	0	-	
7AB5	VP <sub>1</sub>	3.5	> 4.75	Y	0	++	0	
7DF10	CON	1.5	4.32	N	-	0	-	
1BH8	VP <sub>1</sub>	1.9	2.22	Y	0	+++	?	
2LC9	VP <sub>1</sub>	<1.2	1.7	Y	0	++++	0	
7EE6	VP <sub>1</sub>	3.4	3.07	Y/N	0	+++	0	
7AH1	VP <sub>1</sub>	<1.2	0.6	-	0	++++	0	
7CA11	VP <sub>1</sub>	3.5	3.6	Y/N	0	++++	0	
7JA1	VP <sub>1</sub>	<0.61	0.46	-	++++	++++	++++	KIVAPVKQTLPP
7JD1	VP <sub>1</sub>	>3.61	3.5	-	0	++++	?	

*Adaptado de la Ref. 1.*

<sup>a</sup> Tipo. Indica el tipo de antígeno con el cual el AcM reacciona. Todos los AcMs fueron seleccionados inicialmente por el reconocimiento del virus en ELISA, pero fueron discriminados subsecuentemente sobre su reacción (VP<sub>1</sub>) o no reacción (CON) con la proteína VP<sub>1</sub> en "Western Blotting".

<sup>b</sup> Título del AcM en pruebas de seroneutralización en cultivos de tejidos (Neut) e seroprotección en ratones (Prot).

<sup>c</sup> Reacción de AcM con virus tratado con tripsina. Y indica que la unión del anticuerpo al virus tratado con tripsina es anulada.

<sup>d</sup> El péptido de O<sub>1</sub> fue C-C-X<sub>5</sub>-P-P-S-Z<sub>5</sub>-P-C-G, el péptido de A<sub>24</sub> fue C-C-X<sub>4</sub>-P-P-S-Z<sub>4</sub>-P-C-G y el péptido de C<sub>3</sub> tenía la construcción de Z<sub>3</sub>-X<sub>3</sub>. Se dan las secuencias reconocidas con péptidos de "tea-bags" y corresponden al péptido que dio el pico del valor de absorbancia. Para más informaciones ver Materiales y Métodos. La reacción obtenida en una escala de 0 (sin unión del AcM al péptido) a ++++ unión fuerte.

- experimento no realizado.

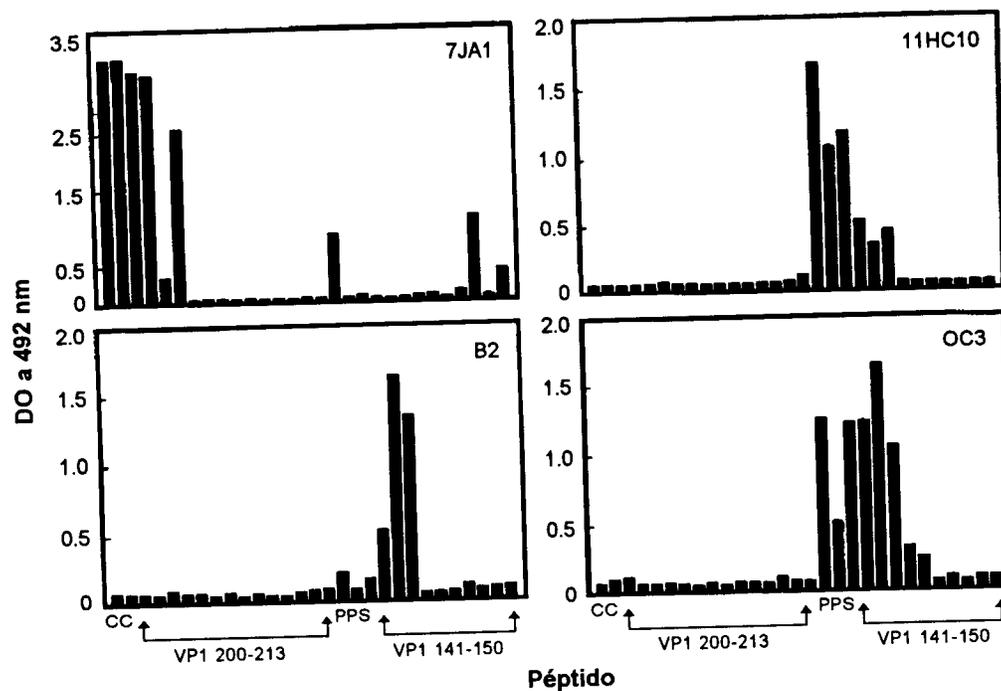


Figura 1. ELISA y cuatro AcMs contra "tea-bags" de péptidos. Cada panel muestra 29 péptidos 12-mer, basados en péptidos C-C-X<sub>A</sub>-P-P-S-Z<sub>A</sub>-P-C-G ó C-C-X<sub>O</sub>-P-P-S-Z<sub>O</sub>-P-C-G (ver Materiales y Métodos). El 12-mer en el extremo izquierdo del panel es C-C-(200-209), a la derecha del cual están los péptidos C-(200-210), (200-211), (201-212), (202-213), (203-214)-P etc. Por tanto, el péptido en el extremo derecho es (150-158)-P-C-G. Los AcMs 11HC10, B2 and OC3 fueron ensayados contra el péptido O<sub>1</sub> Kaufbeuren, mientras que el AcM 7JA1 fue ensayado contra el péptido A<sub>24</sub> Cruzeiro.

heterólogos descritos en el cuadro 1. Por ejemplo, el AcM O<sub>1</sub>, 36AF8 reconoció tanto el péptido C<sub>3</sub> Indaial como el péptido homólogo. Según los datos de "tea-bags" de péptidos con estos AcMs, resulta sugestivo que la reacción cruzada ocurre dentro de la región 141-158 del VP<sub>1</sub>. El mismo AcM también tuvo reacción cruzada con los virus heterólogos en la prueba de ELISA, pero en un grado mucho menos significativo que en la reacción homóloga (resultados no mostrados). Con excepción del 16EC11 y del 31GA3, todos los AcMs A<sub>24</sub> independientes de conformación reconocieron el péptido serotipo O<sub>1</sub> en extensión igual o similar a la secuencia homóloga. Basados en la fuerte reacción de los AcMs A<sub>24</sub> con la secuencia A<sub>24</sub> 141-158-Pro-Cys-Gly y en la débil, pero significativa reacción de la mayoría de los AcMs A<sub>24</sub> con el péptido O<sub>1</sub>

equivalente, esta reacción cruzada se atribuyó al sitio o sitios dentro de esta secuencia. Es interesante notar que todos los AcMs A<sub>24</sub> independientes de conformación reconocieron fuertemente un péptido O<sub>1</sub> con la estructura general (141-158)-Pro-Cys-Gly, o sea, la forma dimérica de la secuencia 141-158 del O<sub>1</sub>, sugiriendo la importancia del tamaño del péptido o consideraciones esteéricas en los resultados de la prueba de ELISA. Por razones que por el momento no son claras, la única reacción observada cuando los AcMs de reacción cruzada A<sub>24</sub> se probaron contra el grupo de "tea-bags" de péptidos O<sub>1</sub>, fue una reacción baja pero significativa con los péptidos 12-mer al extremo C de la secuencia 141-158-Pro-Cys-Gly, específicamente QVLAQKVARTPCy el AcM 31DC7, o sea, una reacción diferente a la observada con el

31DF4 y el grupo de homólogos en "tea-bag". El nivel de reacción cruzada observada con los AcMs  $A_{24}$  y con los péptidos  $O_1$  y  $A_{24}$  no se reflejó en las pruebas de ELISA con los diferentes virus, en las que poca o ninguna reacción fue observada. Solamente uno de los AcMs  $C_3$  reaccionó con más de un péptido. La figura 2 muestra que el 7JA1 reconoció cada uno de los tres péptidos con igual intensidad, pero fue relativamente específico en sus reacciones con el virus  $C_3$ . En contraposición, otro AcM  $C_3$ , el 7EE6, reconoció solo el péptido  $C_3$ , pero su reacción cruzada fue considerablemente mayor con los tres virus en la prueba de ELISA (figura 2). Manteniendo esta especificidad con el péptido, el 7EE6 solo neutralizó los virus homólogos  $C_3$  en pruebas de seroneutralización de

suero. El AcM 7JA1 también reconoció los grupos de "tea-bags" de  $O_1$  y  $A_{24}$  en la región 200-213 del péptido (figura 1) y es el único ejemplo claro, en este trabajo, de reacción en este sitio. En la prueba de ELISA (figura 1), el 7JA1 también mostró reacción con varios péptidos en la secuencia Pro-Ser-141-158-Pro-Cys-Gly, aunque la fuerza con estos péptidos fue considerablemente más débil que con las secuencias 200-213. En este último, los valores de DO fueron arriba de 2.

## DISCUSIÓN

La complejidad antigénica del virus de la fiebre aftosa se ha demostrado en diversos estudios utilizando AcMs (2,3,10,11,14,16). Mateu et al.

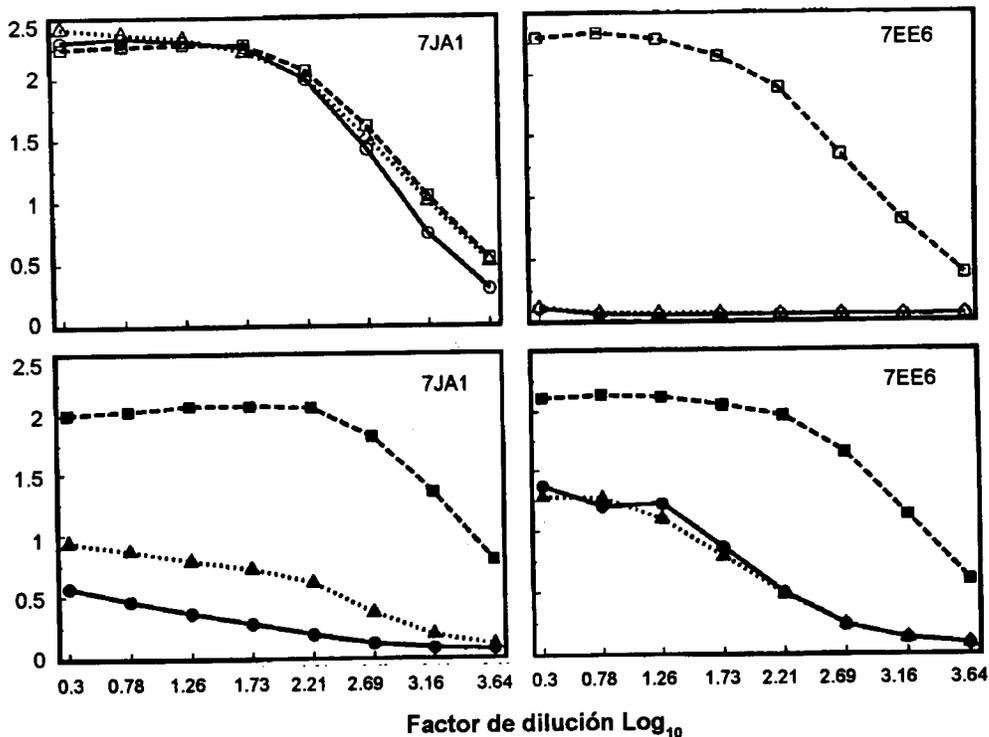


Figura 2. ELISA y dos AcMs  $C_3$  Indaial (7JA1 y 7EE6) contra tres péptidos sintéticos y tres virus. Cuadrados abiertos y cerrados son el péptido  $Z_c-X_c$  del  $C_3$  Indaial y el virus respectivamente. Triángulos abiertos y cerrados son el péptido  $C-C-X_A-P-P-S-Z_A-P-C-G$  del  $A_{24}$  y el virus respectivamente. Círculos abiertos y cerrados son el péptido  $C-C-X_O-P-P-S-Z_O-P-C-G$  del virus  $O_1$  Kaufbeuren y del virus  $O_1$  Campos respectivamente. Para las secuencias completas de péptidos ver Materiales y Métodos.

(14) estudiaron 31 AcMs sudamericanos aislados y 15 europeos aislados del serotipo C contra un gran espectro de los AcMs antiviral C, que incluyeron muchos de los indicados en el cuadro 1. Estos sugieren la existencia de, por lo menos, 12 epítopes involucrados en la neutralización de virus de este serotipo. Recientemente, relataron que 23 de los 36 AcMs probados reconocieron el VP<sub>1</sub> y distinguieron por lo menos 13 epítopes del virión independientes de conformación, implicados en la neutralización del virus tipo C de la fiebre aftosa (13). Más aún, por lo menos 10 epítopes sobrepuestos distinguibles se atribuyeron a residuos 138-150 del VP<sub>1</sub>. Kitson et al. (10) secuenciaron virus O<sub>1</sub> de la fiebre aftosa resistentes a AcMs neutralizantes individuales o múltiples, basado en que éstos propusieron cuatro sitios principales para este serotipo. El sitio 1 fue asociado con aminoácidos en la secuencia 140-160 del VP<sub>1</sub> y su extremo C (residuo 208) y se consideró como un epítope esencialmente independiente de conformación, mientras que los otros tres sitios se consideraron sitios naturalmente conformacionales. El sitio 2 involucró los residuos 70-77 y 131 del VP<sub>2</sub>; el sitio 3, los residuos 43-48 del VP<sub>1</sub>, y el sitio 4, el residuo 58 del VP<sub>3</sub>. Utilizando el AcM OC3 y un mutante resistente al OC3, Crowther et al. (3) propusieron recientemente un quinto sitio independiente de conformación. Sin embargo, el reconocimiento de la región 141-158 del VP<sub>1</sub> por el AcM OC3 (este trabajo) y los cambios en los aminoácidos observados en esta secuencia en el mutante resistente al OC3 (3), indican una asociación próxima entre los sitios 1 y 5 del serotipo O<sub>1</sub>. Kitson et al. (10) también actualizaron la literatura de los sitios antigénicos del serotipo A. El sitio 1 consistía de residuos 140-160 del VP<sub>1</sub>, así como implicaba varios aminoácidos en el extremo C del VP<sub>1</sub>. Los residuos 175 y 178 del VP<sub>3</sub> también fueron implicados para el virus A<sub>12</sub>. El sitio 2 involucraba residuos solo dentro del VP<sub>2</sub>; el sitio 3, aminoácidos alrededor de la posición 170 del VP<sub>1</sub>, y el sitio 4 implicaba los residuos 58-61, 69-70, 136-139 y 195 del VP<sub>3</sub>. La variabilidad en la cantidad de sitios antigénicos definidos por serotipo se debe a varios factores. Por ejemplo, algunos autores han informado sitios

múltiples para una secuencia dada (13), considerada por otros como un sitio individual. También, el número de sitios informados para una cepa de virus dada puede reflejar la intensidad de las investigaciones y el número de AcMs disponibles.

Una cuestión clave en estos estudios es la importancia de los sitios identificados para la protección del hospedero. Ciertamente, por muchos años el sitio 1 ha sido considerado importante, con base en observaciones como la considerable disminución en la inmunogenicidad de las vacunas después del tratamiento del virus con tripsina (5) y su capacidad de proteger animales con péptidos sintéticos representando este sitio (7). Con el serotipo O, también existe evidencia persuasiva de Crowther et al. (3), sugiriendo la importancia de todos los 4/5 sitios antigénicos de este serotipo. Su trabajo demostró que el reconocimiento por el suero de ganado vacunado o postinfectado contra cepas emparentadas solo fue negado por un virus mutante escapado de un AcM en que todos los 4/5 sitios antigénicos habían cambiado. Existe evidencia de aislados de campo que sitios diferentes del sitio 1 pueden ser importantes en la protección. Feigelstock et al. (8) atribuyeron el fracaso de la cepa vacunal C<sub>3</sub> Resende Br/55 para proteger el ganado contra el aislado de campo C<sub>3</sub> Argentina/84, a cambios en la secuencia en tres sitios antigénicos diferentes del VP<sub>1</sub> 135-160 y 200-213.

En este trabajo, un número considerable de AcMs, principalmente entre aquellos contra los virus A<sub>24</sub> y C<sub>3</sub>, reconocieron el VP<sub>1</sub> 141-158. Esto tiene implicaciones para los grupos de AcMs usados para analizar virus sometidos a PANAFTOSA (1). Por ejemplo, de los ocho AcMs A<sub>24</sub> y uno C<sub>3</sub> normalmente usados para examinar virus serotipos A, cinco reconocieron el VP<sub>1</sub> 141-158. De los nueve AcMs C<sub>3</sub> normalmente usados, cinco reconocieron el VP<sub>1</sub> 141-158. Esto no quiere decir que cada uno de los cinco AcMs dentro de un grupo reconozca exactamente el mismo epítope. En realidad, los datos de Mateu et al. (13) demostraron por lo menos 10 epítopes distinguibles dentro del VP<sub>1</sub> 138-150 y los únicos padrones observados por Alonso et al. (1), cuando examinaron las reacciones de los AcMs contra un número grande de virus, sugieren que los AcMs estaban reconociendo

epítopes distinguibles. Así, la presente observación enfatiza la necesidad de caracterizar completamente las colecciones de AcMs en general y, específicamente, los AcMs mantenidos en PANAFTOSA, a fin de agruparlos en el contexto de sitios antigénicos de importancia (relevantes). Esto debe incluir los AcMs que neutralizan débilmente o que no neutralizan en absoluto, dado el hecho de que la neutralización *in vitro* no es necesariamente correlacionada con la protección *in vivo* (cuadro 1; ref. 15). Sin embargo, Mateu et al. (14) hicieron la interesante observación de que todos los AcMs del serotipo C no neutralizantes en su trabajo, reaccionaron igual con todos los virus C aislados, sudamericanos y europeos, probados. De esto dedujeron que los epítopes reconocidos por estos AcMs eran altamente conservados y, por lo tanto, inadecuados para tener, serológicamente, alguna importancia. Los esfuerzos se dirigen ahora a la producción de AcMs resistentes a mutaciones que permitan la agrupación de los AcMs y, con secuencias seleccionadas, la identificación de los sitios antigénicos implicados.

Muchos de los AcMs reconocieron más de un serotipo al nivel del péptido, mientras que el reconocimiento de virus fue, invariablemente, de un serotipo específico. Esto fue notable con los AcMs A<sub>24</sub>, ocho de los cuales reconocieron los péptidos O<sub>1</sub> y A<sub>24</sub>, mientras que dos fueron serotipo específico en el sentido péptido. La reacción cruzada observada en los dos serotipos, O y A, fue atribuida a la región 141-158 del VP<sub>1</sub>, en contraste con la alta actividad cruzada del AcM C<sub>3</sub> 7JA1, que reconoció claramente los péptidos en la región 200-213 (este trabajo; ref. 13). Existen varios aspectos sobre reacción cruzada que merecen más comentarios. A pesar de la ausencia de actividad cruzada y/o protección cruzada entre serotipos después de una infección o vacunación múltiple con virus completos, resulta claro que los anticuerpos con reacción cruzada pueden ser estimulados bajo algunas circunstancias. Por ejemplo, el AcM neutralizante 7EE6 reconoce un determinante común a los tres serotipos, si bien que con extensiones diferentes. Además, el 7JA1 reconoce la región 200-213 del VP<sub>1</sub> de, por lo menos, tres serotipos que, en la forma de péptido sintético Cys-

Cys-(200-213)-Pro-Pro-Ser-(141-158)-Pro-Cys-Gly, estimula anticuerpos antipéptidos con reacción cruzada y protección cruzada en la infección de un cobayo (6,7). También es interesante notar que los sitios de reacción cruzada fueron identificados en la región 141-158 del VP<sub>1</sub> por algunos de los AcMs A<sub>24</sub> y O<sub>1</sub> de este estudio. La cuestión más intrigante es si será posible diseñar nuevas vacunas que permitan la presentación de partículas de virus convencionales o, más probablemente, antígenos sintéticos o recombinantes, para el sistema inmunológico del hospedero, de manera que estimule, de preferencia, la población de los anticuerpos deseados.

## REFERENCIAS

1. 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 Immunol.*, 6 (3): 219-228, 1993.
2. BARNETT, P.V., OULDRIDGE, E.J., ROWLANDS, D.J., BROWN, F., PARRY, N. Neutralizing epitopes of type O foot-and-mouth disease virus. I. Identification and characterization of three functionally independent, conformational sites. *J. Gen. Virol.*, 70: 1483-1491, 1990.
3. CROWTHER, J.R., FARIAS, S., CARPENTER, W.C., SAMUEL, A.R. Identification of a fifth neutralizable site on type O foot-and-mouth disease virus following characterization of single and quintuple monoclonal antibody escape mutants. *J. Gen. Virol.*, 74: 1547-1554, 1993.
4. CROWTHER, J.R., McCULLOUGH, K.C., DE SIMONE, F., BROCCHI, E. Monoclonal antibodies against FMDV: applications and potential use. In: *FAO. Report of a Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease*. Brescia, Italy, 26-28 June 1984.
5. DOEL, T.R., COLLEN, T. Qualitative assessment of 146S particles of FMDV in preparations destined for vaccines. *J. Biol. Standard.*, 10: 69-81, 1982.
6. DOEL, T.R., DOEL, C.M.F.A., STAPLE, R.F., DIMARCHI, R. Cross-reactive and serotype specific antibodies against foot-and-mouth disease

- virus generated by different regions of the same synthetic peptide. *J. Virol.*, 66: 2187-2194, 1992.
7. DOEL, T.R., GALE, C., do AMARAL, C.M.C.F., BROOKE, G., MULCAHY, G., DIMARCHI, R. Heterotypic protection induced by synthetic peptides corresponding to three serotypes of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.*, 64: 2260-2264, 1990.
  8. FEIGELSTOCK, D., MATEU, M.G., PICCONE, M.E., DE SIMONE, F., BROCCCHI, E., DOMINGO, E., PALMA, E.L. Extensive antigenic diversification of foot-and-mouth disease virus by amino acid substitutions outside the major antigenic site. *J. Gen. Virol.*, 73: 3307-3311, 1992.
  9. HOUGHTEN, R.A. General method for the rapid solid phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interactions at the level of individual amino acids. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 82: 5131-5135, 1985.
  10. KITSON, J.D.A., McCAHON, D., BELSHAM, G.J. Sequence analysis of monoclonal antibody resistant mutants of type O foot-and-mouth disease virus: evidence for the involvement of the three surface exposed capsid proteins in four antigenic sites. *Virology*, 179: 26-34, 1990.
  11. McCAHON, D., CROWTHER, J.R., BELSHAM, G.J., KITSON, J.D.A., DUCHESNE, M., HAVE, P., MELOEN, R.H., MORGAN, D.O., DE SIMONE, F. Evidence for at least four antigenic sites on type O foot-and-mouth disease virus involved in neutralisation: identification by single and multiple site monoclonal antibody resistant mutants. *J. Gen. Virol.*, 70: 639-645, 1989.
  12. MAKOFF, A.J., PAYNTER, C.A., ROWLANDS, D.J., BOOTHROYD, J.C. Comparison of the amino acid sequence of the major immunogen from three serotypes of foot-and-mouth disease virus. *Nucleic Acid Res.*, 10: 8285-8295, 1982.
  13. MATEU, M.G., MARTINEZ, M.A., CAPUCCI, L., ANDREU, D., GIRALT, E., SOBRINO, F., BROCCCHI, 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.*, 71: 629-637, 1990.
  14. MATEU, M.G., SILVA, J.L., ROCHA, E., BRUM, D.L., ALONSO, A., ENJUANES, L., DOMINGO, E., BARAHONA, H. Extensive antigenic heterogeneity of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *Virology*, 167: 113-124, 1988.
  15. MULCAHY, G., PULLEN, L.A., GALE, C., DIMARCHI, R.D., DOEL, T.R. Mouse protection test as a predictor of the protective capacity of synthetic foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine*, 9: 19-24, 1991.
  16. PARRY, N.R., BARNETT, P.V., OULDRIDGE, E.J., ROWLANDS, D.J., BROWN, F. Neutralizing epitopes of type O foot-and-mouth disease virus. II. Mapping three conformational sites with synthetic peptide reagents. *J. Gen. Virol.*, 70: 1493-1503, 1989.
  17. SILVA, J.L., KANASHIRO, M.M., BRUM, D.L. Producción y caracterización de anticuerpos monoclonales contra la fiebre aftosa. Production and characterization of monoclonal antibodies against foot-and-mouth disease virus. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 59: 77-92, 1993.

Anuncio

**Actividades de adiestramiento en el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS)**

*Seminarios - Cursos - Adiestramientos en Servicio*

*Área de laboratorios:*

- Diagnóstico Diferencial de Enfermedades Vesiculares
- Producción de Vacuna Oleosa
- Producción de Anticuerpos Monoclonales
- Técnicas de Biología Molecular
- Cría y Manejo de Animales de Laboratorio

*Área de Epidemiología, Infraestructura y Servicios:*

- Vigilancia Epidemiológica de Enfermedades Vesiculares
- Desarrollo de Programas de los Servicios de Salud Animal