

HETEROGENEIDAD ENTRE TRES CEPAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA, SUBTIPO A₂₄ CRUZEIRO USADAS PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS

J. J. TRINIDAD¹, V. MALIRAT², I. E. BERGMANN²

¹Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires

Avda. Chorroarín 280, Buenos Aires 1427, Argentina

²Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS)

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

Resumen. Tres cepas del virus de la fiebre aftosa (FA), subtipo A₂₄ Cruzeiro, usadas para la producción de vacunas, se compararon entre sí por mapeamiento T₁ (*fingerprinting*) y por electroforesis en geles de poliacrilamida de las proteínas de la cápside. A pesar de resultar indistinguibles por ensayos de fijación de complemento, el mapeamiento T₁ mostró variaciones genómicas entre ellas, que alcanzaron valores de hasta 4.0%. Estas diferencias se reflejaron en la movilidad electroforética de la principal proteína inmunogénica VP₁. En una de las cepas, los padrones de migración de las proteínas estructurales VP₂ y VP₃ también fueron afectados. Los resultados ilustran la diversidad genómica potencial entre cepas usadas para la producción de vacunas contra la FA.

El control de la fiebre aftosa (FA) en regiones endémicas se basa, en parte, en la inmunización sistemática con vacunas inactivadas químicamente. A pesar de ser efectivas, su producción y uso se ven afectados por la extensa diversidad antigénica del virus. Existen 7 tipos serológicamente distinguibles, distribuidos en forma no uniforme en el mundo (21). En la mayoría de las regiones, vacunas para dos o más serotipos son usadas de rutina en la profilaxis.

Cada serotipo comprende un número siempre creciente de subtipos, los que surgen con mayor frecuencia dentro del grupo A (20, 23). No todas las variantes dentro de un subtipo proporcionan protección cruzada. Contrariamente, vacunas derivadas de ciertas cepas pueden proteger contra virus pertenecientes a más de un subtipo (11, 19). Esto ilustra la necesidad de seleccionar cepas vacu-

nales que sean capaces de neutralizar efectivamente un rango de muestras de campo tan amplio como sea posible. De hecho, generalmente se acepta que nuevas variantes antigénicas que surgen en el campo pueden controlarse usando vacunas que inducen anticuerpos con amplio rango de reactividad.

Una vez que la variante de la cepa vacunal adecuada ha sido seleccionada, la preocupación mayor es asegurar su estabilidad durante la producción de la vacuna. Este proceso generalmente involucra múltiples ciclos de crecimiento en cultivos celulares. Sin embargo, durante el pasaje del virus en líneas celulares se ha demostrado variación potencial del VFA. Así, diversos autores (5, 10, 15), observaron variantes de placa asociadas con cambios antigénicos luego de pasajes en células de riñón de cría de hamster (BHK), mientras que Sobrino y cols. (25), describieron el surgimiento de variantes genómicas.

Debido a que la diversidad es en sí misma el resultado de la variación genética (revisión en Domingo y cols.8), la aplicación de métodos moleculares constituye una valiosa herramienta

Solicitar separatas al:

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS)

para estudios de variabilidad, ya que éstos son capaces de identificar mutaciones genómicas que pueden llevar a cambios antigénicos.

Para obtener información preliminar acerca del impacto que la diversidad del VFA tiene en cepas vacunales individuales, fueron analizadas los mapas T_1 del ARN genómico, y la movilidad electroforética en geles de poliacrilamida (PAGE) de las proteínas estructurales, de tres cepas vacunales subtipo A_{24} Cruzeiro. Como muestran los resultados, ha sido posible establecer diferencias genéticas sustanciales entre dos de las cepas estudiadas.

MATERIALES Y METODOS

Células y virus

En este estudio fueron usadas tres cepas virales pertenecientes al subtipo A_{24} Cruzeiro, y designadas A_{24} Cruzeiro Brasil 1/55 (A_{24} 1/55), A_{24} Cruzeiro Brasil 2/55 (A_{24} 2/55), y A_{24} Cruzeiro Brasil 3/55 (A_{24} 3/55). Las dos primeras, han sido usadas en la producción de vacunas en el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, siendo la cepa A_{24} 1/55 la que se encuentra actualmente en uso. La cepa A_{24} 3/55 fue obtenida del Animal Virus Research Institute, Pirbright, Reino Unido. Los virus fueron pasados en cultivos de monocapas de células BHK-21, clon 13, el mínimo número de veces requerido para los estudios.

Aislamiento del ARN y mapeamiento T_1

El marcado radioactivo del ARN del VFA con ^{32}P y la extracción del ARN citoplasmático fueron llevados a cabo como fuera descrito anteriormente (1). 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 (2).

Electroforesis en geles de poliacrilamida de las proteínas estructurales de los virus

Las proteínas estructurales fueron preparadas para cada cepa, mediante infección de monocapas

de células BHK-21 a una multiplicidad de infección de 10 UFP/célula. Luego de registrado efecto citopático completo, el medio, congelado y clarificado, fue agitado con triclorotrifluoreto al 10% y centrifugado a 10.000 x g durante 15 min a 4°C, y el sobrenadante ajustado a una concentración final de tampón NET (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA).

Los virus se concentraron por centrifugación a través de un colchón de sacarosa al 20% en tampón NET, a 95.000 x g, 3 h a 4°C. El *pellet* fue resuspendido en el mismo tampón, y seguidamente purificado por sedimentación en gradiente de sacarosa, de acuerdo con Denoya y cols., (6).

Los viriones (2 µg) fueron desintegrados por tratamiento a 90°C durante 2 min en un tampón conteniendo 80 mM Tris-HCl, pH 6,8, 10% dodecil sulfato de sodio (SDS), 8M urea, 1,2 M 2-mercaptoetanol, 20% glicerol y 0,02% de azul de bromofenol. Las proteínas fueron resueltas por electroforesis en SDS-12,5% PAGE, (14) conteniendo urea 8M (SDS-urea-PAGE).

RESULTADOS

Fingerprinting T_1 de los ARNs de las cepas vacunales A_{24}

La Figura 1A muestra los mapas T_1 de los ARNs de las cepas vacunales A_{24} 1/55 y A_{24} 2/55. Una representación esquemática de las diferencias entre las dos cepas se resume en la Fig. 1B. Los oligonucleótidos adicionales y faltantes se catalogaron y los resultados se presentan en la parte C de la figura. En forma similar, se presentan las comparaciones entre las cepas A_{24} 1/55 y A_{24} 3/55, así como entre las cepas A_{24} 2/55 y A_{24} 3/55 en las Figs. 2 y 3, respectivamente.

A pesar de que los tres virus son indistinguibles por ensayos de fijación de complemento, cada ARN posee oligonucleótidos únicos, y el número de cambios totales de oligonucleótidos estimado como fuera descrito por Nakajima y col. (16) varió entre 2,5 (entre las cepas A_{24} 1/55 y A_{24} 3/55) y 32,5 (entre las cepas A_{24} 2/55 y A_{24} 3/55). Estas diferencias representan variaciones en 0,3-4,0% de nucleótidos en el genoma (Cuadro 1).

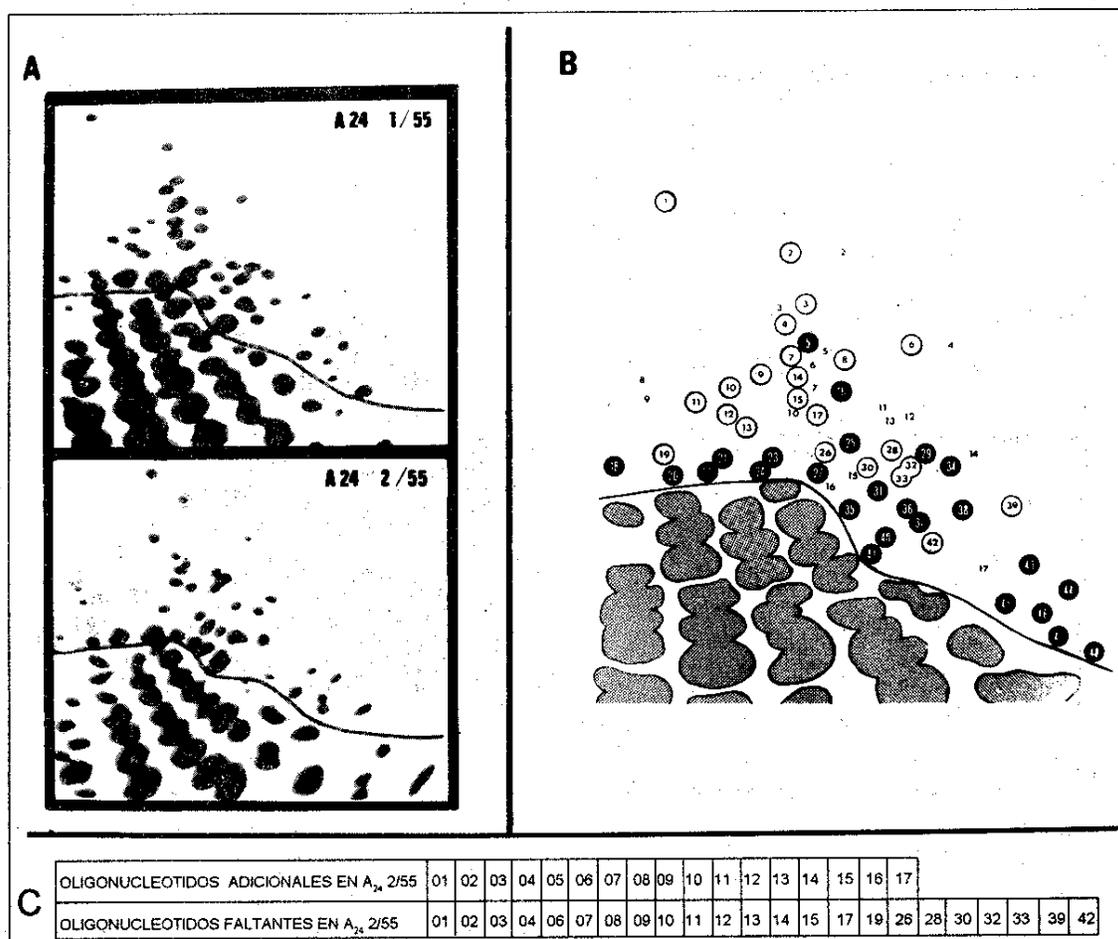


FIGURA 1. Comparación de los *fingerprints* de los oligonucleótidos resistentes a T₁ de los ARNs de los VFA A₂₄ 1/55 y A₂₄ 2/55. **A.** Autoradiografía de los oligonucleótidos marcados con ³²P y resistentes a ribonucleasa T₁ de los ARNs indicados. **B.** Análisis comparativo de los *fingerprints* de los virus indicados en la figura. La identidad de manchas (oligonucleótidos) en las diferentes muestras fue confirmada, cuando fue preciso, por medio de co-electroforesis de mezclas conteniendo cantidades equivalentes de digestos de ARNasa T₁. La línea negra marca un límite arbitrario entre los oligonucleótidos pequeños y los grandes, éstos últimos (48 en la cepa A₂₄ 1/55) usados en las comparaciones. Códigos para el análisis comparativo: los círculos negros numerados corresponden a oligonucleótidos presentes en ambas cepas. Los números circulados en fondo blanco y los números no circulados representan oligonucleótidos presentes solamente en la cepa A₂₄ 1/55 ó A₂₄ 2/55, respectivamente. **C.** Catálogo de oligonucleótidos adicionales y faltantes de la cepa A₂₄ 2/55 con respecto a la A₂₄ 1/55. Solo se incluyen aquellos en los que se observaron diferencias.

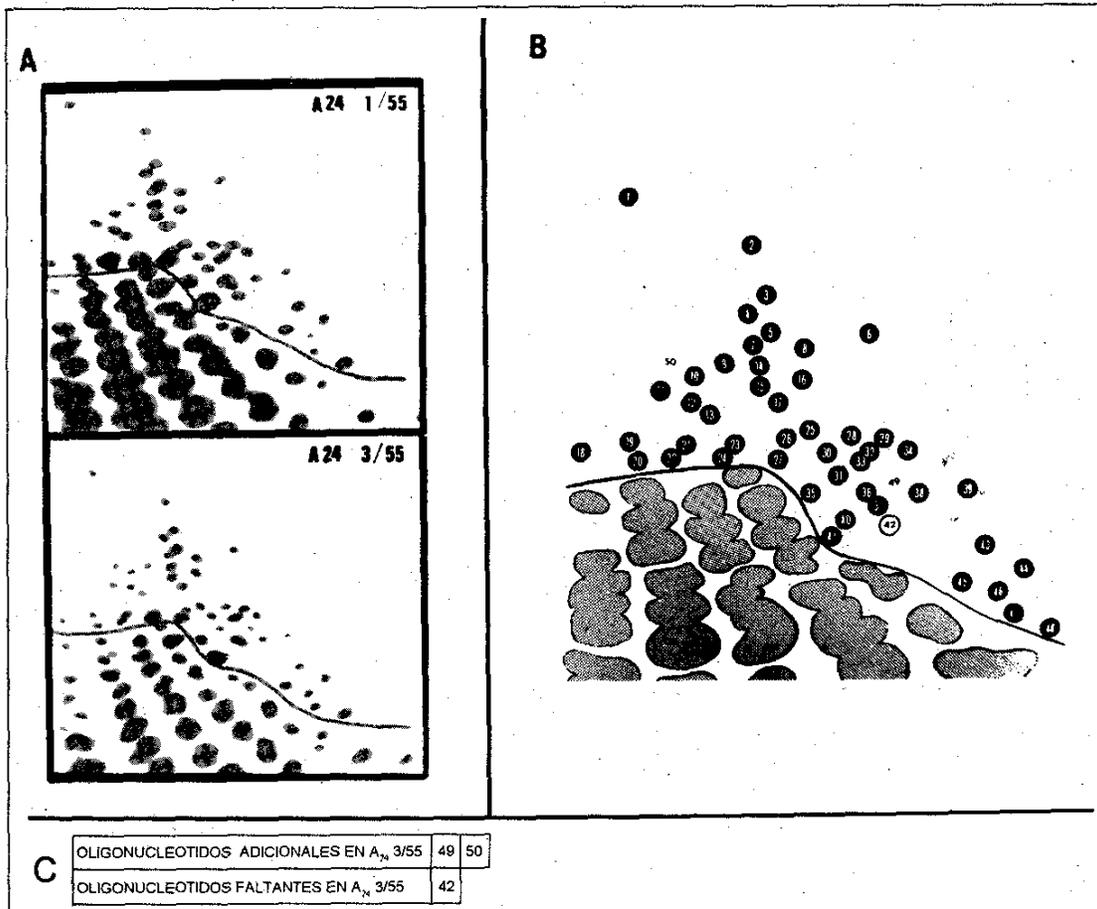


FIGURA 2. Comparación de los *fingerprints* de los oligonucleótidos resistentes a T₁ de los ARNs de las cepas de VFA A₂₄ 1/55 y A₂₄ 3/55. Las especificaciones son como en la Fig. 1.

A. Autoradiografía de los oligonucleótidos marcados con ³²P y resistentes a ribonucleasa T₁ de los ARNs indicados.

B. Los números circulados en fondo blanco indican a oligonucleótidos presentes solamente en la cepa A₂₄ 1/55; los números sin circular denotan oligonucleótidos pertenecientes solamente a la cepa A₂₄ 3/55.

C. Catálogo de oligonucleótidos adicionales y faltantes de la cepa A₂₄ 3/55 con respecto a la cepa A₂₄ 1/55.

En los virus A_{24} 1/55 y A_{24} 3/55, los polipéptidos estructurales VP_2 (1B) y VP_3 (1C) mostraron padrones de migración indistinguibles. Sin embargo, se observó una movilidad electroforética aumentada de estas proteínas, cuando las cepas mencionadas se compararon con la A_{24} 2/55.

DISCUSION

Los resultados presentados en este trabajo proporcionan evidencia de la heterogeneidad entre cepas del VFA subtipo A_{24} usadas en la producción de vacunas. Esta variación genética afectó a la proteína inmunogénica VP_1 , como muestran los resultados de SDS-urea-PAGE (Fig. 4), y de secuenciamiento de nucleótidos (manuscrito en preparación).

A pesar de que no se dispone de información detallada acerca de los pasajes en cultivo de células a que fueron sometidas estas cepas vacunales, los cambios observados pueden ser atribuidos a sus diferentes historias de crecimiento.

De hecho, se ha demostrado el surgimiento de variantes genéticas con propiedades antigénicas y/o inmunogénicas alteradas durante la replicación del VFA en cultivos celulares (12, 13, 24, 25) inclusive luego de una extensiva purificación por plaqueo (27), o en ausencia de anticuerpos específicos contra el virus (7).

Asimismo, se ha descrito variación genética como el resultado de la adaptación del VFA a diferentes sistemas celulares susceptibles. Rowlands y cols. (22) informaron que un número de variantes de la región de VP_1 reconocida como inmunogénica, eran seleccionadas luego de un único pasaje en células BHK de una cepa de VFA, subtipo A_{12} , derivada de bovino. También se describieron (26) variaciones en esta región, entre distintos clones de cADN de los subtipos A_3 y A_{24} . Bolwell y col. (4) mostraron la selección de una variante antigénica del VFA, A_{22} Iraq 24/64, que contiene tres diferencias de codificación de la proteína de la cápside VP_2 , luego de la adaptación del virus de cultivo celular en monocapa a suspensión. La cepa adaptada a monocapa inducía anticuerpos que neutralizaban efectivamente un rango más amplio de variantes de campo, que la adaptada a suspensión.

CUADRO 1. Comparaciones apareadas entre las tres cepas.

	A_{24} 1/55	A_{24} 2/55	A_{24} 3/55
A_{24} 1/55	-	31,5	2,5
A_{24} 2/55	3,8	-	32,5
A_{24} 3/55	0,3	4,0	-

Nota: Cambios totales de oligonucleótidos (arriba a derecha) estimados como fuera descrito por Nakajima y cols., (16), y porcentaje de variación calculado suponiendo que se analiza el 10% del genoma, y que los oligonucleótidos grandes son representativos del genoma completo (abajo a izquierda).

Consecuentemente, y concordando con los resultados presentados en este trabajo, las cepas vacunales pueden mostrar diferencias entre lotes, de acuerdo a su historia de pasajes. La heterogeneidad entre preparaciones virales usadas para la producción de vacunas en España también ha sido informada (9).

Resultados previos de Cowan y cols., (5) sugirieron que la fijación de cambios antigénicos relevantes puede impedir la inmunogenicidad esperada de las vacunas. Estos autores asociaron los cambios antigénicos ocurridos al cultivar VFA en células BHK, con una disminuida habilidad para inmunizar contra el virus parental. En contraposición, Parry y cols. (17), no encontraron correlación entre variantes antigénicas y aparente desempeño en pruebas de potencia, de 18 cepas vacunales adaptadas a células BHK en suspensión. Se están continuando los estudios para establecer si las modificaciones observadas en las tres cepas vacunales analizadas en este trabajo, afectaron su inmunogenicidad.

A pesar de que la heterogeneidad es inherente a las poblaciones de VFA, el surgimiento de nuevas variantes antigénicas durante la producción de vacunas podría minimizarse reduciendo el número de ciclos de crecimiento viral, en un sistema *seed lot*. Sin embargo, en el caso del procedimiento de Frenkel, esto no es practicable y se ha registrado variación luego de los continuos pasajes que son inherentes al sistema (18).

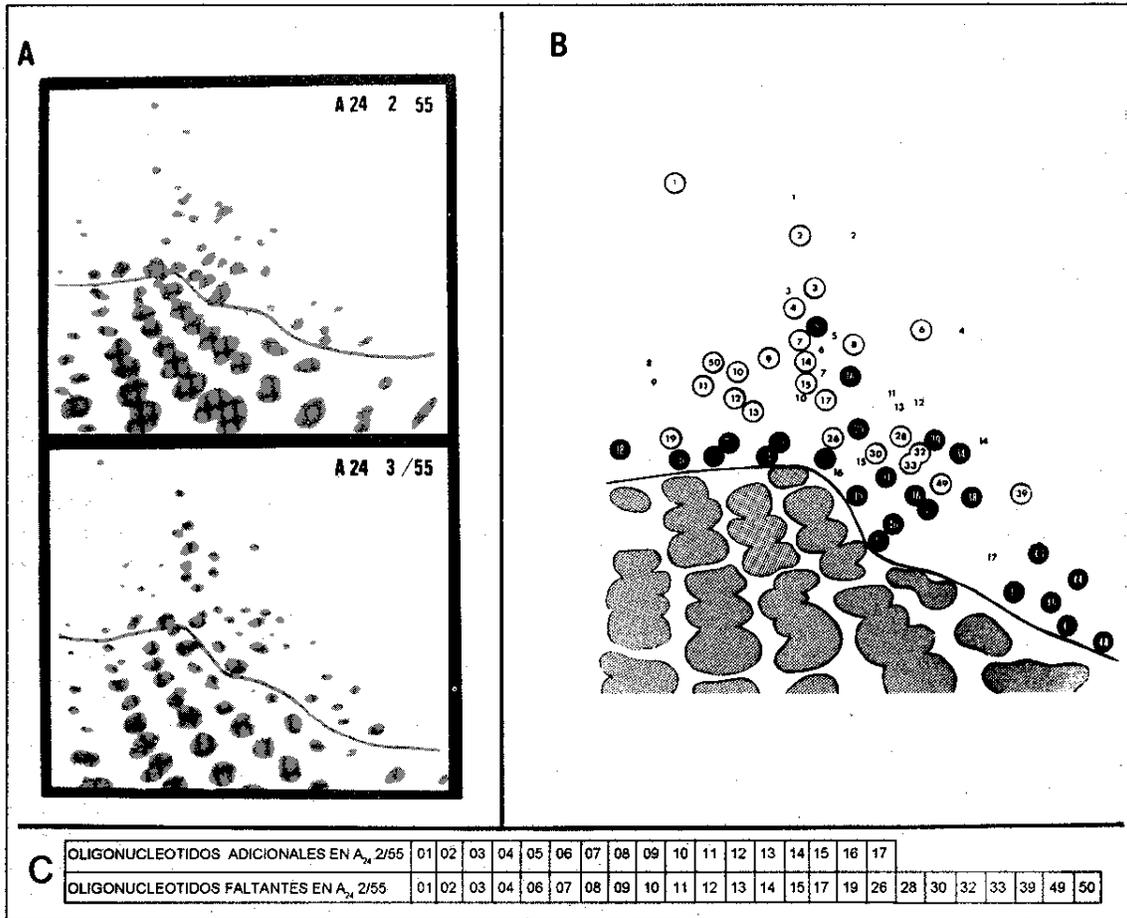


FIGURA 3. Comparación de los fingerprints de los oligonucleótidos resistentes a T_1 de los ARNs de las cepas de VFA $A_{24} 2/55$ y $A_{24} 3/55$. Las especificaciones son como en la Fig. 1.

A. Autorradiografía de los oligonucleótidos marcados con ^{32}P y resistentes a ribonucleasa T_1 de los ARNs indicados.

B. Los números circulados en fondo blanco indican a oligonucleótidos presentes solamente en la cepa $A_{24} 3/55$; los números sin circular denotan oligonucleótidos pertenecientes solamente a la cepa $A_{24} 2/55$.

C. Catálogo de oligonucleótidos adicionales y faltantes de la cepa $A_{24} 2/55$ con respecto a la cepa $A_{24} 3/55$.

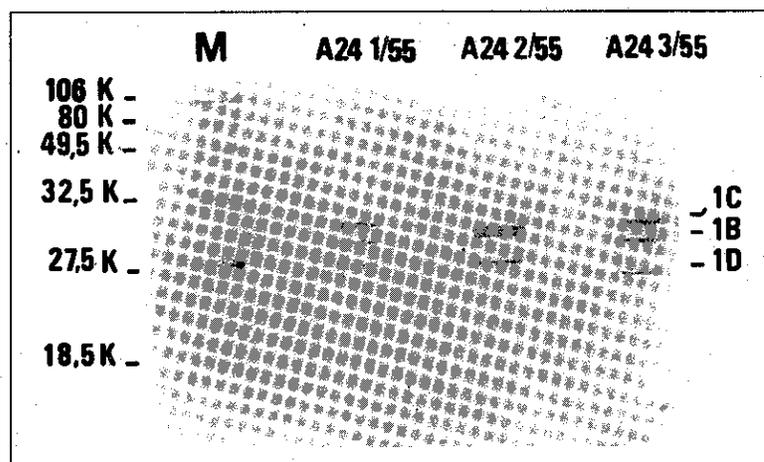


FIGURA 4. Análisis de los polipéptidos estructurales de las cepas estudiadas en SDS-urea-PAGE. M: Marcadores de peso molecular.

Debe notarse que, aunque ni los mapas T₁ ni el análisis por SDS-urea-PAGE pueden correlacionarse con inmunogenicidad y/o protección *in vivo*, resultaron herramientas útiles para un control preliminar de la estabilidad de la cepa vacunal. Adicionalmente, la caracterización molecular permite una precisa correlación entre cepas vacunales y los virus que surgen en el campo (3).

Desde un punto de vista práctico, estos estudios enfatizan la necesidad de controlar los *stocks* de virus usados para la producción (y el desafío) de las vacunas. Esto es particularmente importante en vista de la nueva tendencia de seleccionar cepas vacunales de amplio espectro (incluso para serotipos altamente lábiles como el A), para su uso en regiones geográficas extensas, como Sudamérica.

RECONOCIMIENTOS

Los autores desean agradecer a Pedro Jeovah Vieira Pereira y Maria Aparecida Affonso Boller por la excelente asistencia técnica.

El autor principal presentó este trabajo en cumplimiento parcial de los requisitos para el título de *Magister* en Salud Animal de la Universidad de Buenos Aires.

REFERENCIAS

1. AUGÉ DE MELLO, P., OLASCOAGA, R.C., 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: 105-110, 1986.
2. BERGMANN, I.E., TIRABOSCHI, B.H., BOLLER, M.A.A., MALIRAT, V., PEREIRA, P.J.V., AUGÉ DE MELLO, P. 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: 39-42, 1989.
3. BERGMANN, I.E., TIRABOSCHI, B., MAZZUCA, G., FERNANDEZ, E., MICHAIOFF, 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: 245-252, 1988.
4. BOLWELL, C., BROWN, A.L.L., BARNETT, P.V., CAMPBELL, R.O., CLARKE, B.E., PARRY, N.R. Host cell selection of antigenic variants of foot-and-mouth disease virus. *J. Gen. Virol.*, 70: 45-57, 1989.
5. COWAN, K.M., EROL, N., WHITEHEAD, A.P. Heterogeneity of type Asia 1 foot-and-mouth disease virus and BHK-21 cells and the relationship to vaccine preparation. *Bull. Off. int. Epiz.*, 81: 1271-1289, 1974.

6. DENOYA, C.D., SCODELLER, E.A., GIMÉNEZ, B.H., VASQUEZ, C., LA TORRE, J.L. Foot-and-mouth disease virus. Stability of its ribonucleic acid. *Virology*, 84: 230-235, 1978.
7. DIEZ, J., MATEU, M.G., DOMINGO, E. Selection of antigenic variants of foot-and-mouth disease virus in the absence of antibodies, as revealed by an "in situ" assay. *J. Gen. Virol.*, 70: 3281-3289, 1989.
8. DOMINGO, E., MATEU, M.G., MARTINEZ, M.A., DOPAZO, J., MOYA, SOBRINO, F. Genetic variability and antigenic diversity of foot-and-mouth disease virus. In: KURSTAK, E., MARUSYK, R.G., MURPHY, F.A., VAN REGENMORTEL, M.H.V. (Eds.). *Applied Virology Research*. New York, Plenum, 1990, pp. 233-266.
9. GONZALEZ, M., MATEU, M.G., MARTINEZ, M.A., CARRILLO, C., SOBRINO, F. Comparison of capsid protein VP1 of the viruses used for the production and challenge of foot-and-mouth disease vaccines in Spain. *Vaccine*, 10: 731-734, 1992.
10. HARRIS, T.J.R., BROWN, F. Biochemical analysis of a virulent and an avirulent strain of foot-and-mouth disease virus. *J. Gen. Virol.*, 34: 87-105, 1977.
11. HYSLOP, N. St. G., DAVIE, J., CARTER, S.P. Antigenic differences between strains of foot-and-mouth disease virus of type SAT 1. *J. Hyg.*, 61: 217-230, 1963.
12. LA TORRE, J.C. de, DAVILA, M., SOBRINO, F., ORTIN, J., DOMINGO, E. Establishment of cell lines persistently infected with foot-and-mouth disease virus. *Virology*, 45: 24-35, 1985.
13. LA TORRE, J.C. de, MARTINEZ-SALAS, E., DIEZ, J., VILLAVARDE, A., GEBAUER, F., ROCHA, E., DAVILA, M., DOMINGO, E. Co-evolution of cells and viruses in a persistent infection of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J. Virol.*, 62: 2050-2058, 1988.
14. LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685, 1970.
15. MELOEN, M. Localization on foot-and-mouth disease (FMDV) of an antigenic deficiency induced by passage in BHK cells. *Arch. Virol.*, 51: 99-306, 1976.
16. 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.
17. PARRY, N.R., RWEYEMAMU, M.M., PAY, T.W.F. Studies of plaque variants of foot-and-mouth disease vaccine virus. *Bull. Off. Int. Epiz.*, 89: 929-943, 1978.
18. PAY, T.W.F. Variation in foot-and-mouth disease: application to vaccination. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 2 (3): 701-723, 1983.
19. PEREIRA, H.G. Subtyping of foot-and-mouth disease virus. *Dev. Biol. Stand.*, 35: 167-174, 1977.
20. PEREIRA, H.G. Antigenic variation in relation to epidemiology and control of foot-and-mouth disease. *Br. Vet. J.*, 138: 58-62, 1978.
21. 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. pp. 333-363.
22. ROWLANDS, D.J., CLARKE, B.E., CARROLL, A.R., BROWN, F., NICHOLSON, B.H., BITTLE, J.L., HOUGHTEN, R.A., LERVER, R.A. Chemical basis of antigenic variation in foot-mouth disease. *Nature*, 306: 694-697, 1983.
23. RWEYEMAMU, M.M. Antigenic variation in foot-and-mouth disease: studies based on the virus neutralization reaction. *J. Biol. Stand.*, 12: 323-337, 1984.
24. SAIZ, J.C., GONZALEZ, M.J., MORGAN, D.O., CARD, J.L., SOBRINO, F., MOORE, D.M. Antigenic comparison of different foot-and-mouth disease virus types using monoclonal antibodies defining multiple neutralizing epitopes on FMDV A5 subtypes. *Virus Res.*, 13: 45-60, 1989.
25. SOBRINO, F., DAVILA, M., ORTIN, J., DOMINGO, E. Multiple genetic variants arise in the course of replication of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *Virology*, 128: 310-318, 1983.
26. WEDDELL, G.N., YANSURA, D.G., DOWBENKO, D.J., HOATLIN, M.E., GRUBMAN, M.J., MOORE, D.M., KLEID, D.G. Sequence variation in the gene for the immunogenic capsid protein VP₁ of foot-and-mouth disease virus type A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 2618-2622, 1985.
27. XIE, Q.C., McCAHON, D., CROWTHER, J.R., BELSHAM, G.J., McCULLOUGH, K.C. Neutralization of foot-and-mouth disease virus can be mediated through any of at least three separate antigenic sites. *J. Gen. Virol.*, 68: 1637-1647, 1987.