

Comunicación breve**USO DE UNA PROTEÍNA RECOMBINANTE DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA, LA POLIMERASA 3D, EN UNA PRUEBA DE INMUNODIFUSIÓN EN GEL DE AGAR**

Bergmann Ingrid E.¹, Malirat Viviana¹, Falczuk Abraham², Sondahl Magnus S.¹

¹Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS)

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

²Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA)

Av. Fleming 1653, Martínez, Buenos Aires, Argentina

En este estudio, se examinó la efectividad del uso del polipéptido 3D recombinante, obtenido en su forma nativa en una prueba de IDGA (IDGA-3D), para uso en la detección de anticuerpos específicos de infección con VFA, independientemente de la condición de vacunación. Los resultados indican que en relación a la tradicional prueba de IDGA-VIAA, la IDGA 3D ofrece, particularmente cuando se evalúan sueros de bajo título, un método más consistente, con especificidad comparable, y por lo menos la misma sensibilidad. Ninguno de los antígenos ofreció una ventaja particular con respecto a la definición de las bandas de precipitación. El reemplazo del VIAA por la proteína 3D recombinante tiene considerables atracciones, dado que proporciona un suministro ilimitado de material inocuo, económico, de fácil purificación y consistente, eliminando la presencia potencial de antígenos no específicos de células BHK o componentes de la cápside del VFA

El término “antígeno asociado a la infección viral” (VIAA) para el virus de la fiebre aftosa (VFA) se refiere convencionalmente a un complejo de proteínas no-estructurales identificado por Cowan y Graves (5), cuyo principal componente es la ARN polimerasa viral, proteína 3D (13).

La primera técnica descrita para la detección de anticuerpos anti-VIAA como indicio de infección previa con el VFA fue la prueba de inmunodifusión en gel de agar (IDGA) (8). Debido a la baja sensibilidad de este test, Alonso y colaboradores (3), desarrollaron un ensayo inmunoenzimático de ELISA en fase líquida (ELISA-VIAA) para identificar y cuantificar los anticuerpos contra el VIAA del VFA. Sin embargo, la mayor sensibilidad alcanzada mediante la aplicación de este tipo

Solicitar separatas al:

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS).

de ensayo, en comparación con el IDGA-VIAA, generó un aumento en el número de resultados VIAA-positivos en ganado vacunado y reinmunizado con vacunas que contienen altas concentraciones de antígenos no purificados del VFA. Asimismo, la limitada reproducibilidad observada en las pruebas de VIAA (6), (I. Bergmann y colaboradores, comunicación personal) parece ser una propiedad inherente a la naturaleza semi-purificada de las preparaciones de VIAA, que están sujetas a variación en la calidad del antígeno entre los diferentes lotes. Además, la producción del antígeno convencional VIAA-VFA se realiza por purificación parcial a partir de suspensiones del virus producidas en cultivo de células de riñón de hamster jóvenes (BHK), para lo cual se requiere una unidad de laboratorio de alta seguridad, para el manejo del VFA (1,9).

Para superar las limitaciones mencionadas, el reemplazo del VIAA por un antígeno recombinante del VFA, la polimerasa 3D, tiene considerables atracciones, dado que proporciona un suministro ilimitado de material inocuo, económico, fácilmente purificable y consistente. Asimismo, este enfoque elimina la presencia potencial de cualquier antígeno no específico en las preparaciones del VIAA, como pueden ser proteínas derivadas de células BHK o componentes de la cápside del VFA, y que pueden ser reconocidos en la prueba de IDGA-VIAA por el suero de animales inoculados con vacunas producidas en BHK, llevando a resultados falso-positivos. En este estudio, se examinó la efectividad del uso del polipéptido 3D recombinante, obtenido en su forma nativa, construido y purificado como descrito previamente (10), en una prueba de IDGA (IDGA-3D), para la detección de anticuerpos específicos de infección con VFA,

independientemente de la condición de vacunación.

El estudio comparativo del uso del VIAA tradicional y del polipéptido recombinante 3D en la prueba de IDGA indica que ninguno de los dos antígenos ofreció ninguna ventaja particular con respecto a la definición de las bandas de precipitación. No se observó diferencia en la posición, intensidad, velocidad de formación y visibilidad de las bandas de precipitación.

La alta especificidad de la prueba de IDGA-3D puede ser observada por los resultados negativos obtenidos con 250 sueros de bovinos provenientes de áreas libres de FA. Por lo tanto, la alta especificidad del IDGA-VIAA fue mantenida al usar el antígeno recombinante.

El análisis mediante IDGA-3D de 60 sueros de bovinos involucrados en focos, sangrados entre 20 y 40 días después de la confirmación de la enfermedad, demostró resultados positivos. Por lo tanto, no se registra ninguna diferencia en la sensibilidad del test de IDGA-3D con respecto a la prueba IDGA-VIAA. La titulación de los sueros reactivos por la prueba de IDGA-3D daba valores entre 1 a 3 veces mayores que los conseguidos con la prueba de IDGA-VIAA, dependiendo de la preparación de VIAA utilizada. El análisis de sueros colectados secuencialmente de 4 bovinos persistentemente infectados indicó que independientemente del lote de 3D utilizado, la prueba de IDGA-3D detecta anticuerpos indicativos de replicación viral hasta aproximadamente 280 días después de la infección. Dicha fase de la infección pudo detectarse con una única de las cuatro

preparaciones de VIAA estudiadas. Estos resultados indican claramente la mayor consistencia de los resultados de IDGA obtenidos con el antígeno recombinante 3D, cuando comparados con aquellos obtenidos con la preparación del VIAA tradicional, particularmente al evaluar sueros de bajo título.

Seguidamente, los estudios se dirigieron a determinar si el IDGA-3D conseguía eliminar los resultados positivos obtenidos con el test de IDGA-VIAA con sueros de animales luego de la vacunación (2). Con este objetivo se examinó la reactividad de sueros con un número inesperadamente alto de resultados positivos por IDGA-VIAA. Se estudiaron muestras de bovinos sistemáticamente vacunados provenientes de regiones libres de FA durante por lo menos los últimos 3 años, que mostraban resultados positivos en el IDGA-VIAA aún en 61% (147/240) de los sueros obtenidos de animales > 2 años, y en 11% (22/207) de aquellos colectados de bovinos < de 2 años (pero mayores de seis meses), nacidos después del último foco de FA. De los sueros IDGA-VIAA-positivos en la población mayor y menor de 2 años de edad, 91% y 41%, respectivamente, reaccionaron también con la proteína recombinante 3D. La positividad total se redujo a 55% y 4% en los animales > y < de 2 años, respectivamente. Asimismo, se analizó la reactividad de sueros con un número inesperadamente alto de resultados IDGA-VIAA-positivos (78 de 90) obtenidos 30 días después de que una única dosis de vacuna fuera aplicada 120 días después de la vacunación inicial. Los antígenos de la vacuna habían sido obtenidos a partir de células BHK infectadas, crecidas en frascos roller y, a diferencia de lo que ocurre en los procedimientos de producción standard, estos

antígenos no se clarificaron y se concentraron cuatro veces. De los 78 sueros VIAA-positivos, 7 negativizaron en el IDGA-3D. También fueron analizados sueros experimentales de dos grupos de 20 bovinos, cada uno vacunado y revacunado dos veces en intervalos de 60-días, con vacunas preparadas con antígenos producidos en cultivos de células en suspensión y concentrados hasta 18 y 54 µg/5ml de dosis. La mayoría de los animales que eran IDGA-VIAA-positivos entre 15 y 30 días después de la revacunación confirmaron reactivos por IDGA-3D.

Los datos indicaron claramente que algunos de los resultados falso positivos por IDGA-VIAA en sueros de animales post-vacunados fueron eliminados por IDGA-3D. En la mayoría de los casos, sin embargo, la reactividad se mantuvo y probablemente representa existencia de anticuerpos anti-3D inducidos contra la ARN polimerasa presente en las preparaciones de la vacuna. De hecho, resultados de Rowlands y colaboradores (14) mostraron que antisuero producido en cobayos que habían recibido partículas purificadas de virus inactivo reaccionaban con antígeno VIAA aislado del virus. Una evidencia más reciente obtenida por microscopía electrónica indicó que la proteína 3D es un componente de por lo menos 20-30% de las partículas virales (11). La falta de reactividad contra 3D en muchos de los animales vacunados puede deberse a una concentración insuficiente del polipéptido 3D en las suspensiones virales, así como a la sensibilidad relativamente baja de la prueba de IDGA. En este contexto, el mismo antígeno recombinante 3D utilizado en pruebas inmunoenzimáticas (10), claramente mostró que existen anticuerpos contra 3D en el suero

de muchos animales vacunados. Tales reactividades son particularmente evidentes después de la revacunación. O'Donnell y colaboradores (12), usando otra proteína 3D recombinante expresada en bacteria demostró resultados positivos para anticuerpos anti-3D en forma transitoria en sueros de animales inmunizados con vacunas provenientes de uno de los dos productores probados. Teniendo en cuenta: a) las observaciones arriba expresadas; b) que los métodos para purificación y concentración de antígeno pueden variar ampliamente entre los laboratorios de América del Sur que fabrican las vacunas; c) que, bajo condiciones de campo se espera alta inmunidad poblacional en áreas con programas avanzados de erradicación; y d) que la inducción de anticuerpos luego de la inmunización puede estar afectada por la edad del animal, por 'boosters' provocados por infecciones anteriores, y por los ciclos de vacunación, los antígenos 3D/VIAA deben usarse con reserva, por lo menos, cuando se requieren ensayos muy sensibles.

Se ha logrado gran progreso al conseguir distinguir inequívocamente, en el campo, animales infectados de los no infectados, independientemente de su estado de vacunación, mediante el uso de antígenos virales no capsídicos obtenidos por ingeniería genética, adicionales al 3D, en un ensayo de EITB (4), o en pruebas de ELISA (7). A pesar de su alta sensibilidad, estas pruebas eliminaron un número grande de resultados VIAA/3D-IDGA-positivos debidos a vacunación y revacunación. Esta máxima sensibilidad puede mantenerse, considerando que el análisis simultáneo de varios antígenos permite mantener también una alta especificidad. Debido a la alta sensibilidad y especificidad, estos

ensayos permiten la confirmación de ausencia de actividad viral según recomendación de la Oficina Internacional de Epizootias, para el reconocimiento internacional de región libre de FA. La aplicación de herramientas tan sensibles es también pertinente durante los procesos de erradicación previos a la suspensión de la vacunación y también como un dato adicional en el análisis de riesgo para la selección de animales destinados a importación/exportación.

A pesar de que para este último propósito, la prueba de IDGA no posee la sensibilidad suficiente, aún así es una herramienta útil en muchos laboratorios, como un dato adicional en los estudios que se realizan periódicamente para determinar la prevalencia e incidencia de anticuerpos contra VIAA/3D en la población animal susceptible a la enfermedad, así como para establecer si un rebaño ha tenido o no contacto reciente con el virus de la FA. Para estos casos el uso de un antígeno recombinante garantiza la inocuidad, y en relación al IDGA-VIAA tradicional ofrece un método más consistente, con especificidad comparable, y por lo menos la misma sensibilidad.

REFERENCIAS

1. Alonso A, Sondahl MS. Preparación y concentración de los antígenos 140 S, 12 S y VIA del virus de la fiebre aftosa. Bol Cent Panamerican Fiebre Aftosa 1975; (17-18): 1-6.
2. Alonso Fernández A, Gomes I, Bahnemann H. The induction of antibodies against VIAA in cattle vaccinated and revaccinated with inactivated foot-and-mouth disease vaccine. Bol Cent Panamerican Fiebre Aftosa 1988; (54): 43-50.
3. Alonso Fernández A, Gomes MPD, Martins MA, Sondahl MS. Detection of foot-and-mouth disease

- virus infection associated antigen antibodies: comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay and agar gel immunodiffusion test. *Prev Vet Med* 1990; 9: 233-240.
4. Bergmann IE, 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 non-structural viral antigens. *Am J Vet Res* 1993; 6:825-841.
 5. Cowan KM, Graves JG. A third antigenic component associated with FMD infection. *Virology* 1966; 30: 528-540.
 6. Mackay DKJ, Madekurozwa RL. Assessment of the VIAA ELISA for FMD. Report for the Community Reference Laboratory for FMD. Pirbright: Institute for Animal Health; 1992.
 7. Mackay DKJ, Forsyth M, Davies PR, Berlinzani A, Belsham GJ, Flint M, Ryan MD. Differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease using a panel of recombinant non-structural proteins in ELISA. *Vaccine* 1994; 16:446-459.
 8. McVicar JW, Sutmoller P. Foot-and-mouth disease: the agar gel diffusion precipitin test for antibody to virus infection-associated (VIA) antigen as a tool for epizootiologic surveys. *Am J Epidemiol* 1970; 92:273-278.
 9. Morgan DO, Moore DM, McKercher PD. Purification of foot-and-mouth disease virus infection-associated antigen. In: Proceedings Eighty-Second Annual Meeting of the United States Animal Health Association; 1978 Oct 29-31, Nov 1-3, Buffalo, New York. Richmond, Virginia: USAHA; 1978. pp. 277-283.
 10. Neitzert E, Beck E, Augé de Mello P, Gomes I, Bergmann IE. Expression of the aphthovirus RNA polymerase gene in *E. coli* and its use together with other bioengineered non-structural antigens in detection of late persistent infections. *Virology* 1991; 184:799-804.
 11. Newman JFE, Piatti PG, Gorman BM, Burrage TG, Ryan MD, Flint M, Brown F. Foot-and-mouth disease virus particles contain replicase protein 3D. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:733-737.
 12. O'Donnell VK, Boyle DB, Sproat K, Fondevila AF, Schudel AA, Smitsaart EN. Detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus using a liquid-phase blocking sandwich ELISA (LPBE) with a bioengineered 3D protein. *J Vet Diagn Invest* 1996; 8: 143-150.
 13. Polatnik J, Arlinghaus RA. Foot-and-mouth disease virus-induced RNA polymerase in baby hamster cells. *Virology* 1967; 31: 601-608
 14. Rowlands DJ, Cartwright B, Brown F. Evidence for an internal antigen in foot-and-mouth disease virus. *J Gen Virol* 1969; 4:479-487.
-