

# GFRA NEWS



El boletín oficial de la Alianza Global de Investigación en FA



## EN ESTE NÚMERO

### NOTICIAS Y OPINIONES

- **Ocurren** cosas buenas cuando los socios de la GFRA trabajan juntos
- **El** nuevo laboratorio de referencia de la UE para FA
- **Contribuciones** de la reunión de la GFRA a nuestras carreras
- **Investigación** sobre FA en Argentina: el valor de las redes

### INVESTIGACIÓN

- **Seguir** al líder: la actividad enzimática de la Lpro del VFA y su papel en contrarrestar al huésped
- **Nueva** herramienta de subtipado rápido para el VFA
- **¿Cuándo** termina? Dinámica de extinción del estado de portador
- **El** papel de la integridad de las partículas de VFA en serología.

## LA GFRA EN BANGKOK 2019: discusiones sobre la Fiebre Aftosa

por Alejandra Capozzo

Uno de los objetivos de las reuniones de GFRA es discutir la ciencia detrás de la fiebre aftosa. Nuestras reuniones bienales sirven para reunirnos, compartir nuestra investigación y debatir los aspectos relacionados con los nuevos hallazgos. Esto es algo difícil de lograr durante este tipo de encuentros, ya que los horarios son ajustados y muchas veces, no queda tiempo para preguntas. En muchas ediciones previas tuvimos sesiones de discusión notablemente interesantes durante los cierres, muchas veces liderados por el Dr. Cyril Gay, uno de los fundadores de GFRA. Estas discusiones fueron muy apreciadas por la audiencia y nos dieron una idea de lo que más se necesitaba: espacio para compartir nuestras ideas y opiniones.

En este sentido, nuestra última reunión en Bangkok fue organizada para maximizar las discusiones. El comité científico, dirigido por Mariano Pérez-Filgueira de Argentina, decidió dejar tiempo para las discusiones al final de cada sesión. Para ello, se organizó una "sala de estar" en el escenario, donde todos los oradores tomaron asiento y la audiencia fue ordenándose para hacer sus preguntas a través de los micrófonos de pie ubicados en los pasillos. Fue sorprendente ver la dinámica de esta actividad y la forma en que fluía a medida que se volvía más y más familiar para la audiencia. Cada sesión comenzó con una breve introducción realizada por los presidentes. Esto ayudó a poner un marco para la sesión.

Así, cada charla pudo continuar sin interrupciones y al final los moderadores y oradores (investigadores principales, científicos jóvenes, estudiantes graduados), todos se sentaron juntos en la "sala de discusión", respondiendo y compartiendo ideas con la audiencia. Sin duda, un desafío para los jóvenes, particularmente aquellos de países que no hablan inglés, que lucharon un poco pero valoraron la oportunidad.

Fue sorprendente ver la dinámica de esta actividad y la forma en que fluía a medida que se volvía más y más familiar para la audiencia.



*Anna Ludi, Cecilia Turco, Dachrit Nulibol, Yanmin Li, Michiel Harmsen y Pamela Opperman, discutiendo durante una de las sesiones de diagnóstico de la reunión*

Supimos por los comentarios de los asistentes que esta modalidad fue bien aceptada y valorada. Mantendremos esta idea para nuestra próxima reunión de GFRA que se celebrará en Buenos Aires en 2021. Incluiremos, por supuesto, el toque de la hospitalidad argentina, un buen Malbec y una excelente carne asada. Esperamos verlos a todos en Buenos Aires, para seguir manteniendo viva "la discusión sobre la fiebre aftosa".

## NOTICIAS Y OPINIONES



### Ocurren cosas buenas cuando los socios de la GFRA trabajan juntos

por Wilna Vosloo

Investigadores del Laboratorio Australiano de Sanidad Animal (AAHL) y del Friedrich-Loeffler-Institut (FLI) en Alemania están investigando conjuntamente medidas para garantizar el transporte seguro de muestras de tejido epitelial de granjas infectadas, sin comprometer la integridad de la muestra. Estos estudios sobre protocolos simples pero efectivos de inactivación o preservación servirán para evitar la propagación del VFA durante el transporte de muestras de brotes en países libres de FA, como Alemania y Australia. Además, garantizará que los laboratorios estatales, donde se pueden analizar estas muestras, no sean puestos en cuarentena cuando reciban muestras positivas, y puedan continuar con su trabajo de diagnóstico.



*Nagendra Singanallur del AAHL, feliz en el laboratorio del FLI*

Estos estudios sobre protocolos simples pero efectivos de inactivación o preservación servirán para evitar la propagación del VFA durante el transporte de muestras de brotes en países libres de fiebre aftosa

Los dos socios de GFRA también están investigando la supervivencia del VFA en diferentes condiciones ambientales para ayudar con el modelado de dispersión. Estos datos nos ayudarán a rastrear mejor las posibles fuentes de transmisión de virus durante los brotes, teniendo en cuenta las condiciones climáticas (temperatura y humedad) en momentos específicos.

En el transcurso de los últimos dos años, los investigadores de AAHL visitaron y trabajaron con expertos de la FLI durante períodos prolongados, y establecieron relaciones valiosas que fomentaron la discusión de nuevas colaboraciones beneficiosas para Alemania y Australia. Esta fructífera colaboración es un ejemplo de dos socios de la GFRA de diferentes continentes que combinan recursos para alcanzar un objetivo común y de beneficio mutuo para mejorar las medidas de control de la fiebre aftosa.



## El nuevo laboratorio de referencia de la Unión Europea para Fiebre Aftosa

*por el Laboratorio de Referencia de la UE para FA (FMD EURL)*

En 2019, el nuevo Laboratorio de referencia de la Unión Europea para la Fiebre Aftosa, organizó el primer Test de Proficiencia (PT) Europeo (EU-PT) en nombre de la Comisión Europea, Dirección General de Salud y Protección del Consumidor (DG-SANTE). Esta reunión fue abierta a todos los Laboratorios Nacionales de Referencia (NRL) y a los Laboratorios Oficiales (OfL) de los Estados miembros de la UE, pero también a los de los países candidatos a la UE y países vecinos. Treinta y siete laboratorios participaron en este PT, y la EuFMD financió el envío de paneles a 7 laboratorios de países vecinos. La innovación de este PT se basó en el uso de LEILA, la herramienta de gestión y monitoreo en línea para las pruebas entre laboratorios desarrollada por ANSES. Esta plataforma en línea está específicamente dedicada a la organización de PT, desde el proceso de registro hasta la difusión de resultados individuales, lo que permite una comunicación eficiente entre los participantes y el EURL en todo momento (<https://leila.anses.fr>). En el ejercicio se presentó el escenario de un brote de fiebre aftosa, brindándoles a los participantes la posibilidad de solicitar diferentes paneles de muestras para procesar con todas las técnicas que consideraran apropiadas y desearan probar (aislamiento viral, biología molecular, serología, etc.). Este EU-PT ayudó a una mejor comprensión de las fortalezas y necesidades de cada laboratorio de la UE, brindándole al EURL las herramientas para ayudarlos mejor en su tarea como NRL o OfL de la UE.

La innovación de este primer test de proficiencia europeo se basó en el uso de LEILA, una herramienta de gestión y monitoreo en línea para pruebas entre laboratorios desarrollada por ANSES y específicamente dedicada a la organización de PT

Los resultados de este EU-PT, así como los resultados del FMD EU-PT 2018 realizado por el Instituto Pirbright se discutieron durante el Taller anual (WS) realizado por el FMD EURL a principios de octubre. Todos los NRL y OfL que participaron en el EU-PT de 2019 fueron invitados a reunirse en el campus de ANSES en Maisons-Alfort para el evento. Este año, el evento fue un taller conjunto VSV-FMDV-SVDV, que reunió a 56 participantes de toda Europa y el mundo durante dos días.

El programa del evento incluyó debates sobre los resultados de los PT de 2018 y 2019, los avances en métodos analíticos y en el conocimiento teórico de las enfermedades y los agentes virales, actualizaciones sobre la epidemiología de las enfermedades, diagnóstico diferencial y resultados de las encuestas de campañas vacunales realizadas en países vecinos de la UE. Los invitados de los países vecinos de la UE, así como de los EE. UU., brindaron su experiencia sobre su situación epidemiológica local y comentarios sobre las diferentes iniciativas presentes en cada territorio para combatir la fiebre aftosa y la VSV. La organización del taller de dos días fue apoyada por la Comisión Europea, representada por el Dr. Alf Füssel, quien asistió y presidió este Taller VSV-FMD-SVDV.



*Foto grupal de los participantes durante el primer Test de Proficiencia Europeo (EU-PT)*

El Dr. Füssel recibió un regalo de jubilación firmado por todos los participantes como un reconocimiento por su compromiso junto con los laboratorios europeos de FA a lo largo de los años. También se ofreció un regalo al Dr. Donald King y a la Dra. Anna Ludi en nombre de los laboratorios europeos de FA, para agradecerles por los muchos años de gran trabajo que lograron como EURL. El EURL para la FA quisiera agradecer a todos los oradores por sus interesantes presentaciones y por las excelentes discusiones durante estos dos días, y a la CE por su apoyo. Estas discusiones permitieron establecer una visión común de los desafíos enfrentados y exponer los problemas y expectativas de los laboratorios de la UE de VSV-FA-SVDV. Como resultado, se espera que la comunicación sobre esos temas ayude a reforzar la red europea de vigilancia de la FA en el futuro.



## Contribuciones de la reunión de la GFRA a nuestras carreras

por María Cruz Miraglia, Cecilia Turco y Guido Molina

La reunión científica de GFRA nos dio la posibilidad de mejorar nuestras capacidades para hacer presentaciones orales en un idioma extranjero, así como para debatir y responder las preguntas de expertos en fiebre aftosa de todo el mundo. Si bien antes hemos investigado sobre diferentes aspectos de la inmunidad, las herramientas biotecnológicas, la biología molecular y la virología general, nuestro trabajo se ha centrado en el VFA solo los últimos 2 años. La experiencia de interactuar cara a cara con expertos de la investigación de la FA fue uno de los beneficios más importantes de esta conferencia y produjo un gran impacto en el desarrollo de nuestra carrera científica. También consideramos que el intercambio de conocimiento que surgió de las opiniones, preguntas y comentarios de los participantes condujo a nuevos análisis de los resultados con una perspectiva diferente.

Para continuar trabajando en el desarrollo de herramientas para la prevención y el control de la fiebre aftosa, fue muy enriquecedor conocer los diferentes enfoques que se emplean actualmente en todo el mundo y los desafíos para abordar el diseño y el uso de vacunas en diferentes regiones.

Una de las misiones de la GFRA es establecer y mantener asociaciones de investigación globales para generar conocimiento científico y descubrir herramientas para prevenir, controlar y erradicar con éxito la fiebre aftosa. En este contexto, los programas de financiación son esenciales y permiten a los nuevos investigadores la posibilidad de interactuar y debatir con otros profesionales en este campo. El apoyo financiero otorgado por el comité organizador de la GFRA permitió a Cecilia, María Cruz y Guido, becarios posdoctorales de Argentina, asistir a la reunión científica de GFRA en Bangkok, Tailandia. En este informe, estos tres jóvenes investigadores del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) en Buenos Aires, comparten parte de sus trabajos y nos cuentan cómo esta oportunidad les influyó, tanto personal como profesionalmente.

Todo este aprendizaje es primordial para decidir el curso de nuestros proyectos. Más aún, algunos expertos nos dieron sugerencias muy útiles habiendo ya recorrido estos mismos caminos antes, con enfoques diferentes pero con objetivos similares. Específicamente, las opiniones sobre el modelo de ratón o la complejidad de la inmunología porcina fueron temas muy interesantes. Algunas compañías biotecnológicas también estuvieron presentes y pudimos hablar con sus representantes y mantener en contacto después de la reunión. Esta interacción fue beneficiosa para ambas partes y, en nuestro caso, aprender en términos de la regulación y estabilidad para un antiviral o una vacuna fueron especialmente útiles para el curso de nuestras investigaciones.

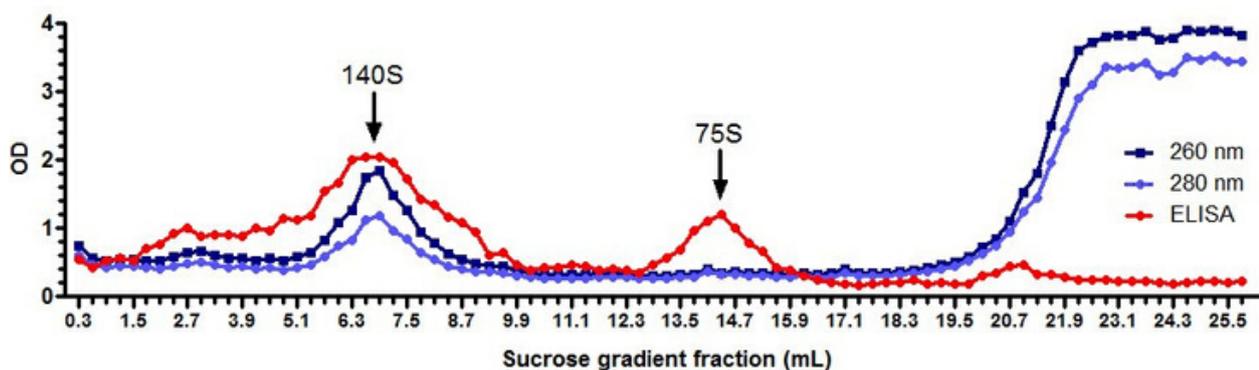


*Guido Molina, Marie Gismondi, Maria Cruz Miraglia, Guido König, Alejandra Capozzo, Mariano Perez Filgueira y Cecilia Turco, la delegación de INTA en la reunión científica de la GFRA en Bangkok, Tailandia*

Como becarios postdoc, no tenemos ni estabilidad laboral ni certeza sobre nuestras posibilidades de seguir trabajando en nuestro instituto. Además, la crisis económica de Argentina hace que conseguir una posición de investigación en el país sea extremadamente difícil. En este escenario, la red que construimos durante la reunión científica de GFRA amplió nuestras posibilidades laborales a otros países. Pudimos hablar con varios investigadores de nuestras áreas de interés y los conocimos personalmente. Para algunos de nosotros, esta reunión ha sido un primer paso muy bueno en la búsqueda de futuros puestos de trabajo. También aprendimos que es clave conocer las situaciones epidemiológicas de cada país y sus necesidades particulares para seleccionar las estrategias de control y como, un producto biotecnológico puede no ser adecuado para algunos países y en cambio resultar muy relevante para otros en un contexto diferente. Hemos descubierto cómo el conocimiento sobre la diversidad de situaciones en todo el mundo podría enriquecer la proyección de cada trabajo, la colaboración entre países y la conformación de una mejor red global.

Finalmente, un tercer impacto fue a nivel cultural. Tailandia, el lugar elegido para la reunión científica de GFRA, es un país increíble con gran riqueza cultural. Esto nos generó una gran expectativa, ya que era nuestra primera visita a Asia. Queríamos aprender sobre su estilo de vida, sus tradiciones y hábitos, y probar su típica comida sabrosa y picante. Bangkok nos cautivó con el contraste de las calles, donde los edificios modernos conviven con templos majestuosos, calles intrincadas, mercados coloridos y un tráfico épico. ¡Lo disfrutamos mucho!

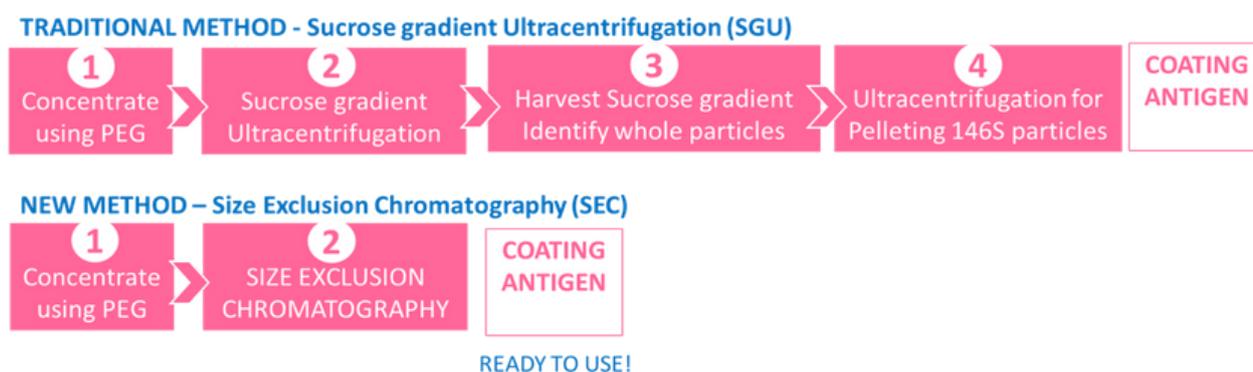
María Cruz Miraglia (becaria posdoctoral de Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, CONICET, en INTA) nos cuenta sobre su presentación en el marco de la sesión de "Patogénesis e Inmunología": "Nuestro trabajo se enfoca en identificar posibles diferencias en la respuesta inmune generada por vacunas oleosas formuladas con la partículas enteras (140S) usadas tradicionalmente o cápsides vacías naturales (75S) del VFA cepa A24/Cruzeiro"



*Partículas enteras (140S) y cápsides vacías naturales (75S) de VFA purificadas de la misma preparación antigénica. ¿La menor capacidad antigénica de las vacunas formuladas con 75S está relacionada con problemas de estabilidad u otras características estructurales? ¡Más experimentos por venir!*

Se presentaron experimentos de inmunización con ambos antígenos en ratones y bovinos, que describen el curso temporal de las respuestas inmunes tanto humorales como celulares. Los resultados en ambos modelos animales indicaron la existencia de diferencias cuantitativas y cualitativas en la respuesta inmune adaptativa inducida por las vacunas contra la fiebre aftosa formuladas con antígenos 146S o 75S. La discusión al final de la sesión se centró en la estabilidad de las partículas vacías en comparación con las partículas virales completas y esta discusión llevó a reconsiderar y rediseñar algunos experimentos para el análisis inmunológico.

Cecilia Turco (becaria postdoctoral en INTA) presentó su trabajo en una de las sesiones de "Diagnóstico", producto de una colaboración entre INTA (grupo de Alejandra Capozzo) y el Laboratorio de Referencia Mundial de FA (grupo de Anna Ludi): "Nuestro objetivo era adaptar una metodología alternativa a la ultracentrifugación en gradiente de sacarosa (SGU) para purificar las partículas virales 146S que se utilizarán como antígeno en los ELISA indirectos. La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) es un método simple 'de baja tecnología' para purificar partículas de antígeno tanto de la vacuna y como de virus de campo cultivado en cultivo celular". De acuerdo con este protocolo simple, la suspensión de virus eluida de la columna (SEC-FMDV) puede usarse directamente como material de recubrimiento para placas ELISA.

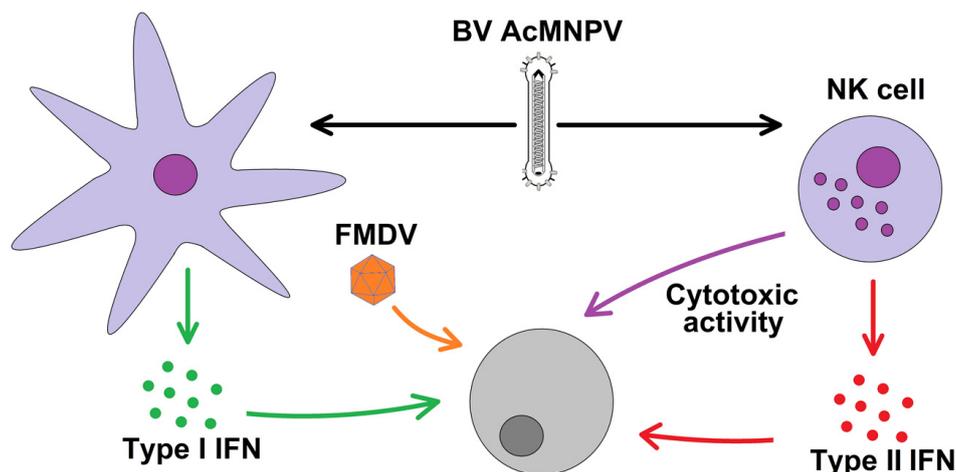


*El proceso de purificación se puede acortar de una semana a un par de horas de trabajo utilizando la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) en lugar de los protocolos tradicionales de ultracentrifugación de sacarosa (SGU)*

La integridad del VFA purificado por SEC fue controlada por SGU y ELISA de antígeno, confirmando que la fracción extraída por SEC contiene solo 146S y eventualmente partículas de 75S. Los comentarios de los expertos llevaron a una investigación más profunda sobre el rendimiento de estas partículas virales obtenidas en relación con el método SGU. Además, la reunión de la GFRA fue importante para reunirse con colaboradores en el Instituto Pirbright y fortalecer los lazos de colaboración para continuar este proyecto.

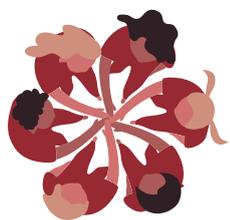
Guido Molina (becario postdoctoral de CONICET en INTA) trabaja en el desarrollo de estrategias antivirales y vacunas de nueva generación contra el VFA. Su presentación durante la sesión "Vacunas" describió el uso del baculovirus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV), un virus que infecta a los insectos, en estrategias antivirales contra el VFA. Dado que las vacunas utilizadas actualmente inducen una respuesta inmune protectora entre 4 y 7 días después de la vacunación, se necesitan estrategias antivirales para reducir la ventana de susceptibilidad en el caso de un brote.

La inyección intravenosa de AcMNPV indujo un estado antiviral en ratones proporcionando protección contra un desafío letal con VFA A/Arg/01 a las 3 horas y 3 días después de la inoculación. Los IFN tipo I inducidos por el AcMNPV y las células NK que producen IFN tipo II, impidieron la aparición de la enfermedad. El AcMNPV también indujo actividad antiviral mediada por IFN- $\alpha$  en células mononucleares porcinas de sangre periférica.



*Los mecanismos inmunes propuestos detrás de la actividad antiviral del AcMNPV observado contra el VFA en cerdos*

Más aún, la inoculación intravenosa de AcMNPV en cerdos promovió la producción de IFN tipo I y II que se detectaron en suero durante las primeras 9 horas después de la inoculación. El perfil de mediadores antivirales inducidos fue capaz de proteger las células no inmunes porcinas (LFBK) contra una infección con VFA, lo que muestra el potencial de AcMNPV para el desarrollo de estrategias antivirales contra VFA en cerdos.



## Investigación sobre FA en Argentina: el valor de las redes

*por Mariano Perez Filgueira*

La historia de la fiebre aftosa demuestra los riesgos y las dificultades para controlar las incursiones y brotes del virus en regiones libres de enfermedades, y Argentina tiene una larga tradición en el tratamiento de esta amenaza, antigua pero actual. Durante las últimas décadas, nuestro país desarrolló una sólida red de instituciones públicas que intervienen en diferentes aspectos del problema, desde el diseño y despliegue de un sólido programa nacional de vacunación y una red de diagnóstico, hasta el apoyo de la investigación básica en diferentes áreas.

Juntos, el SENASA (laboratorio regional de referencia de la OIE para la fiebre aftosa), el CEVAN (Institución del CONICET) y el INTA, también han mantenido una alianza estratégica con el sector privado, implementando varios proyectos de colaboración con el principal fabricante local de vacunas contra la fiebre aftosa, Biogenesis Bagó SA.

Argentina continuará con este enfoque de colaboración, entendiendo que la cooperación entre países permite la sinergia de las capacidades individuales y representa la forma más rápida y eficiente de encontrar respuestas innovadoras para el control de la fiebre aftosa

Poco después de su fundación, la red también promovió asociaciones internacionales, comenzando en 2006 con un proyecto de colaboración con Sciensano (ex-CODA CERVA) de Bélgica, seguido de su participación en el proyecto FP7 FMD-DISCONVAC entre 2009 y 2014. En paralelo, diferentes grupos de investigación del INTA también realizaron proyectos conjuntos con institutos españoles como el INIA y el CBMSO.

La transferencia de ensayos recientemente desarrollados en Argentina también ha formado parte de este intercambio, con varias colaboraciones desde 2014, incluidos el ARC-OVR (Sudáfrica), el Laboratorio Australiano de Sanidad Animal (AAHL-CSIRO), el Instituto Friedrich-Loeffler (FLI, Alemania) y el Instituto Pirbright (Reino Unido). Con esta visión, el INTA también fue una de las primeras instituciones en unirse al GFRA como miembro de pleno en 2008, acompañando también la alianza estratégica con el USDA, a través de diferentes proyectos de colaboración con grupos de investigación en el Centro de Enfermedades Animales de Plum Island (PIADC).

Siguiendo este enfoque, los grupos de investigación argentinos han participado en la construcción de conocimientos fundamentales y aplicados a una variedad de temas de investigación, como la inmunología en torno a la infección por el virus de la fiebre aftosa y la vacunación en modelos de laboratorio y hospedadores naturales, el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico para evaluar la inmunidad a nivel individual y de rebaño, procedimientos experimentales para evaluar la calidad de las vacunas contra la fiebre aftosa, la epidemiología molecular de los brotes de fiebre aftosa, la filogenia y la evolución de la fiebre aftosa, los factores de virulencia asociados con el genoma de ARN, el desarrollo de nuevas vacunas, la protección cruzada de las vacunas y las bases inmunológicas de la protección heteróloga entre las cepas del virus.

En la actualidad, varios laboratorios argentinos están trabajando en actividades de colaboración con científicos de otros laboratorios de referencia e investigación de todo el mundo.

INTA ha llevado a cabo una serie de proyectos con el PIADC-USDA centrados principalmente en la inmunología detrás de la infección y la vacunación contra el VFA en bovinos. En el marco de estos proyectos, se describieron aspectos fundamentales de las respuestas de anticuerpos protectores locales y sistémicos, así como el papel primordial de los anticuerpos neutralizantes en el control de la diseminación sistémica del virus dentro de los animales infectados. El proyecto actual, que involucra también a SENASA y Biogénesis-Bago, se centra en comprender las bases inmunológicas de la protección cruzada entre cepas de VFA en el ganado.



*SENASA, laboratorio regional de referencia de la OIE para FA*

Como laboratorio de referencia regional, SENASA también ha llevado a cabo proyectos de capacitación por "hermanamiento" con su contraparte de Paraguay (SENACSA), patrocinados por la OIE, y regularmente participa y asiste a las Reuniones de la Red de Lab. de Referencia de la FAO/OIE. Un proyecto en curso entre INTA y el Instituto de Investigación de Biotecnología (NRC-BRI) en Canadá, también trabaja en el desarrollo de partículas similares al virus de VFA, para ser utilizadas como posibles antígenos vacunales producidos en un sistema de expresión transitoria en células de mamíferos desarrollado en NRC-BRI.

INTA también forma parte de un consorcio internacional que incluye al ARC-OVR (Sudáfrica), al Instituto Pirbright (Reino Unido) y a la Universidad de Glasgow (Escocia), financiado por la IVVN (Red Internacional de Vacunología Veterinaria). El proyecto tiene como objetivo estudiar el repertorio de anticuerpos generado en búfalos y bovinos inmunizados con diferentes protocolos de vacunación anti-aftosa e identificar anticuerpos de reacción cruzada. Además, el EuFMD ha financiado un trabajo de colaboración entre el Laboratorio de Referencia Mundial para la FA, la Universidad de Glasgow y el INTA para trabajar en la validación de nuevas técnicas serológicas para evaluar la protección heteróloga en huéspedes naturales.

Un proyecto de epidemiología molecular financiado por la Agencia Nacional de Ciencia y Tecnología (Argentina) también se une a la experiencia de la Universidad de Minnesota y del INTA para aplicar herramientas recientemente desarrolladas para medir la transmisión en diferentes virus a través de sus rastros de evolución, utilizando el brote de fiebre aftosa de 2001 en Argentina como modelo.



*De Argentina al mundo. Actividades actuales y recientes entre instituciones argentinas y otros laboratorios que trabajan en fiebre aftosa en todo el mundo*

En el futuro, las instituciones argentinas que trabajan en fiebre aftosa continuarán este enfoque, entendiendo que la cooperación entre países da sinergia a las capacidades individuales y representa la forma más rápida y eficiente de encontrar respuestas innovadoras en la lucha contra este adversario conocido desde hace mucho tiempo.

## TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN

### **Seguir al líder: la actividad enzimática de la Lpro del VFA y su papel en contrarrestar al huésped**

*por Gisselle N. Medina y Teresa de los Santos*

Plum Island Animal Disease Center (PIADC), ARS, USDA, Greenport, NY, 11944, USA. Kansas State University College of Veterinary Medicine, Manhattan, KS 66506, USA

Este artículo proporciona datos resumidos del manuscrito recientemente aceptado en el Journal of Virology (2020) doi:10.1128/JVI.00341-20

Originalmente descrita como la segunda proteasa del VFA, Lpro se separa de la cadena de polipéptidos nacientes en la unión L/VP4 (Strebel y Beck, 1986). Además de su capacidad de procesamiento, Lpro antagoniza al huésped al apuntar a varios factores celulares involucrados en las respuestas inmunes innatas (Fig.1; Medina et al., 2018)) por lo que se la reconoce como una 'proteína de seguridad' (Agol y Gmyl, 2010 ). El descubrimiento de la función contradefensiva de Lpro se examinó originalmente en virus donde se la eliminó (sin líder, LLV) (Piccone et al., 1995), lo que resultó en un virus altamente atenuado tanto en bovinos como en los cerdos (Mason et al., 1997; Chinsangaram et al., 1998; Eschbaumer et al., 2020). Los estudios *in vitro* mostraron que la atenuación del VFA-LLV se correlacionaba con una mayor producción de IFN $\alpha/\beta$  en los sobrenadantes de células infectadas con este virus recombinante, respecto al VFA de tipo salvaje (WT). El bloqueo de la expresión de IFN durante la infección por el VFA se produce fundamentalmente por la proteólisis de los factores de iniciación de la traducción eIF4GI y eIF4GII, evitando la síntesis de proteínas del huésped a nivel del ARNm (Devaney et al., 1988; Steinberger y Skern, 2014). La interrupción de la inducción de IFN también se ha detectado a nivel de transcripción. Durante la infección, Lpro se dirige a los factores de transcripción NF- $\kappa$ B e IRF3/7 para su degradación, lo que resulta en el bloqueo "río abajo" de los efectores de señalización específicos de la respuesta inmune innata antiviral (de los Santos et al., 2007; Wang et al., 2010; Zhu et al., 2010).

Aunque el mecanismo preciso para inducir la degradación de los factores de transcripción por Lpro sigue sin estar claro, se demostró que un dominio putativo de unión de SAP a ADN dentro de Lpro, media su localización nuclear durante la infección. Las mutaciones del dominio de SAP (I83A/L86A) abolieron las capacidades de Lpro para suprimir la expresión de IFN tipo I y degradar las proteínas de señalización durante la infección (de los Santos et al., 2009) manteniendo su actividad proteolítica. Es importante destacar que el examen del mutante Lpro SAP resultó en una atenuación severa en los experimentos en porcinos (Diaz-San Segundo et al., 2012). Lpro también se dirige a la maquinaria de remodelación de la cromatina promoviendo su unión al factor de transcripción ADNP (proteína neuroprotectora dependiente de la actividad) y regula negativamente la actividad del promotor de IFN- $\alpha$  (Medina et al., 2017). Paradójicamente, en estos estudios el procesamiento de ADNP se detectó en momentos posteriores de infección, lo que sugiere que la escisión de ADNP genera productos que pueden mejorar la actividad represiva de la transcripción. Futuros trabajos para mapear los dominios de interacción entre Lpro y la ADNP, pueden ayudar a dilucidar los mecanismos moleculares involucrados en este proceso. Otros blancos celulares de Lpro que antagonizan las respuestas inmunes, incluyen los sensores de ARN citosólicos conocidos como receptores similares al "gen inducible por ácido retinoico" (RIG-I) o RLR.

Estudios recientes han demostrado la interacción entre RLR LGP2 y FMDV Lpro seguido de degradación de LGP2 (Zhu et al., 2017; Rodríguez-Pulido et al., 2018). Estos resultados sugieren que FMDV Lpro puede apuntar a vías de señalización inmune innatas en muchos niveles. Además del procesamiento proteolítico, FMDV Lpro tiene actividad de deubiquitinasa (DUB) (Wang et al., 2011). En estudios de sobreexpresión, Lpro mostró actividad DUB, catalizando la eliminación de ubiquitina (Ub) de sustratos celulares, incluidos RIG-I, TRAF3, TRAF6 y TBK.

Las modificaciones en el dominio SAP de Lpro disminuyeron la actividad de DUB y su capacidad para bloquear la señalización del promotor de IFN- $\beta$  (Wang et al 2011). Otro modificador similar a Ub es el gen estimulado por IFN (ISG) 15 (ISG15) que se conjuga con las proteínas diana en un proceso conocido como ISGylation por la acción consecutiva de tres enzimas que forman la maquinaria de ISGylation (E1-Ube1L, E2-UbcH8 y E3-HERC5). Sin embargo, a diferencia de Ub, ISG15 y la maquinaria de ISGylation son inducidos por IFN tipo I y pueden ser regulados por infección viral (dos Santos y Mansur, 2017).

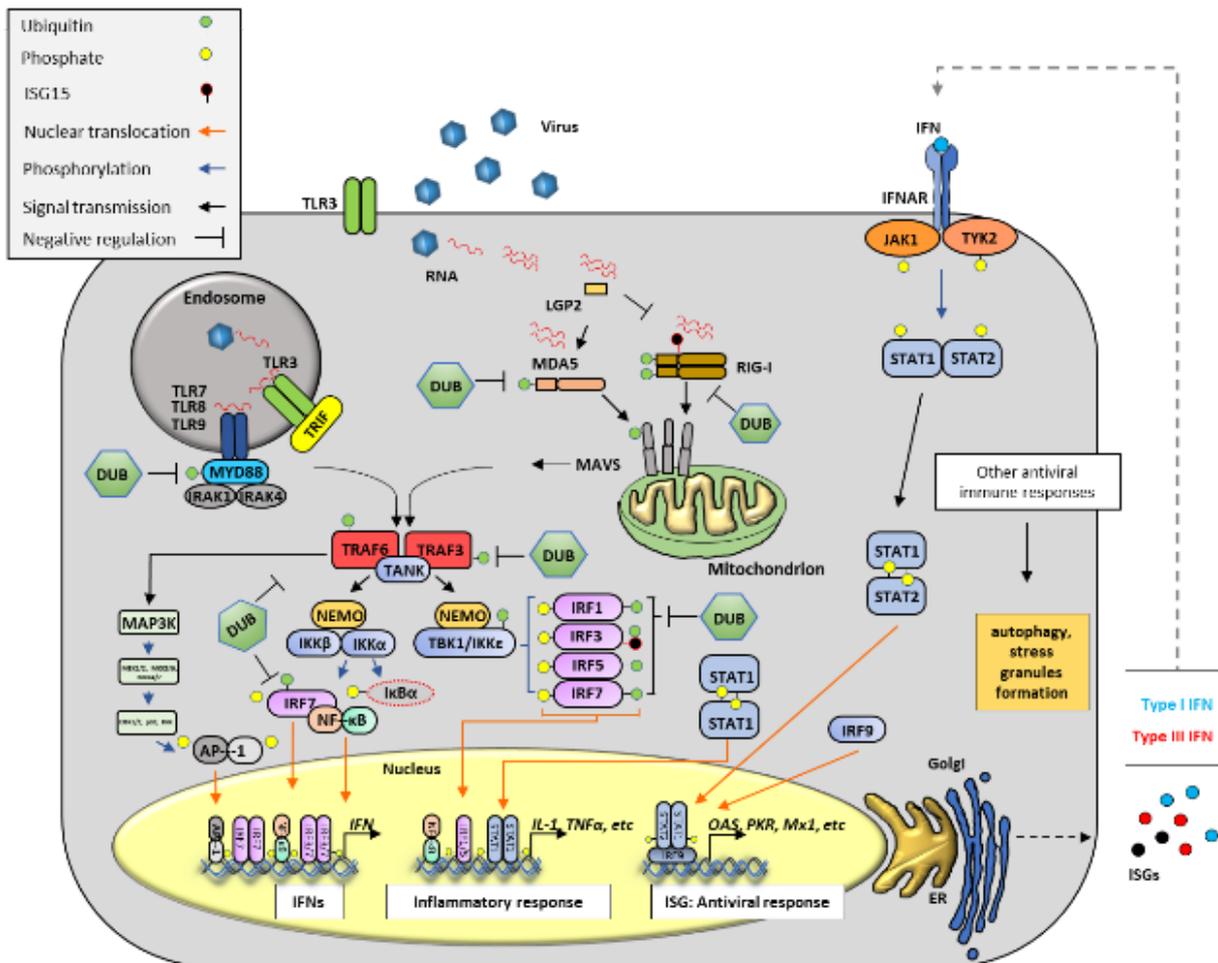


Figura 1: Respuestas inmunes antivirales innatas durante la infección

Estudios recientes realizados en células BHK-21 han demostrado que durante la infección por FMDV, las proteínas celulares sufren desISGilación (Swatek et al., 2018). Curiosamente, los autores demuestran que FMDV recombinante Lpro muestra actividad deISGylasa en sustratos sintéticos y se requieren residuos hidrofóbicos P99 y Leu102 para una actividad deISGylasa eficiente (Swatek et al 2018). En nuestro trabajo reciente realizamos un

análisis estructural de laLpro de VFA, seguido de un modelado molecular para revelar la presencia de un residuo aromático conservado en Lpro, Trp, W105 (Fig.2A), que se requiere para una actividad deISGilasa óptima (Medina et al.,2020). Es importante destacar que la ingeniería de un clon infeccioso que porta esta mutación (LproW105A) produjo un VFA viable con un nivel perceptible de atenuación y una reducción de la actividad de DESISGilación

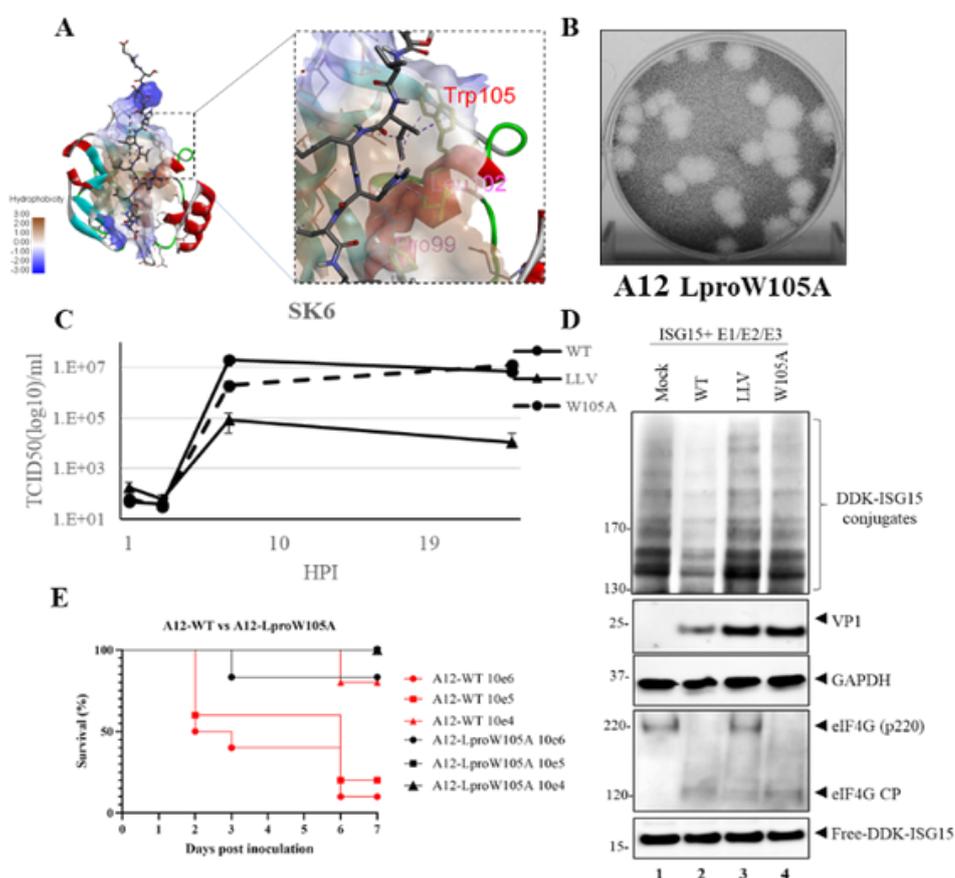


Figura 2: Se requiere un residuo aromático hidrofóbico en el VFA Lpro (W105) para una actividad deISGylasa eficiente. (A) Interacciones de primer plano entre el aminoácido aromático W 105 en rojo y el péptido C-terminal ISG15. (B) Fenotipo de placa de VFA viables que llevan la mutación W105A, evaluada en células BHK-21. (D) células LFPKaVβ6 transfectadas con plásmidos que codifican la maquinaria de ISGylation fueron infectados con el VFA-A12WT, -LLV o LproW105A. A las 6 hpi, se prepararon los lisados celulares y las proteínas se resolvieron en SDS-PAGE al 3-8% seguido de WB para detectar ISG15 libre o conjugado con DDK, la VP1 de VFA, eIF4G y GAPDH. (E) Ratones C57BL/6 se infectaron con VFA cepa A12 WT o A12-LproW105A y las curvas de supervivencia muestran datos hasta el día 7 post-inoculación.

y DUB en comparación con el virus salvaje durante la infección de células porcinas (Fig. 2B-2D). La reducción observada en la actividad de Lpro DUB/deISGylación durante la infección con el VFA LproW105A usando un modelo de ratón, resultó en una reducción de la letalidad en comparación con la inoculación con el virus salvaje (Fig. 2E), lo que sugiere que la incapacidad para eliminar ISG15 confiere atenuación viral *in vivo*. Nuestros estudios revelan que educar /abolir la actividad deISGylasa en Lpro durante la infección hace que el virus se atenúe moderadamente independientemente de su capacidad para bloquear la expresión de IFN tipo I y otros genes estimulados por IFN. Las actividades enzimáticas multifuncionales en el PLP Lpro indican la capacidad de evolución del VFA para contrarrestar la respuesta inmune durante la infección.

Nuestro reciente trabajo demuestra la separación de la función entre la actividad proteolítica Lpro del VFA-en sustratos celulares canónicos como eIF4G- de su función DUB deISGylasa. Lo más importante es que mostramos por primera vez la construcción de un VFA viable con actividad DUB/deISGylasa bloqueada. Aunque se han identificado recientemente otros residuos de Lpro que median su interacción con ISG15 (Swatek et al 2018), proponemos que Lpro W105 es importante para modular la cinética de la infección viral. Los estudios futuros, para comprender la contribución específica de la actividad Lpro DUB/deISGylasa para contrarrestar la respuesta inmune durante la infección por virus, abrirán nuevas vías de investigación interesantes. En última instancia, esto conducirá al desarrollo de vacunas candidatas eficaces atenuadas *in vivo* y otras terapias para controlar la fiebre aftosa.

## REFERENCIAS

- Agol, V. I., and Gmyl, A. P. (2010). *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 867–878. doi:10.1038/nrmicro2452.
- Chinsangaram, J., Mason, P. W., and Grubman, M. J. (1998). *Vaccine* 16, 1516–1522. doi:10.1016/S0264-410X(98)00029
- de los Santos, T., Diaz-San Segundo, F., and Grubman, M. J. (2007). *J. Virol.* 81, 12803–12815. doi:10.1128/JVI.01467-07.
- de los Santos, T., Diaz-San Segundo, F., Zhu, J., Koster, M., Dias, C. C. a, and Grubman, M. J. (2009). *J. Virol.* 83, 1800–10. doi:10.1128/JVI.02112-08.
- Devaney, M. A., Vakharia, V. N., Lloyd, R., Ehrenfeld, E., and Grubman, M. J. (1988). *J. Virol.* 62, 4407–4409.
- Diaz-San Segundo, F., Weiss, M., Perez-Martin, E., Dias, C. C., Grubman, M. J., and de los Santos, T. (2012). *J. Virol.* 86, 1316–1327. doi:10.1128/JVI.05941-11.
- dos Santos, P. F., and Mansur, D. S. (2017). *J. Interf. Cytokine Res.* 37, 246–253. doi:10.1089/jir.2016.0103.
- Eschbaumer, M., Dill, V., Carlson, J. C., Arzt, J., Stenfeldt, C., Krug, P. W., et al. (2020). *Pathogens.* doi:10.3390/pathogens9020129.

- Medina, G. N., Segundo, F. D.-S., Stenfeldt, C., Arzt, J., and de los Santos, T. (2018). *Front. Microbiol.* doi:10.3389/fmicb.2018.02644.
- Piccone, M. E., Rieder, E., Mason, P. W., and Grubman, M. J. (1995). *J. Virol.* 69, 5376–5382.
- Rodríguez-Pulido, M., Sánchez-Aparicio, M. T., Martínez-Salas, E., García-Sastre, A., Sobrino, F., and Sáiz, M. (2018). *PLOS Pathog.* 14, 1–21.
- Steinberger, J., and Skern, T. (2014). *Biological Chemistry* doi:10.1515/hsz-2014-0156.
- Strebel, K., and Beck, E. (1986). *J. Virol.* 58, 893–9.
- Guarne, A., Tormo, J., Kirchwegger, R., Pfistermueller, D., Fita, I., and Skern, T. (1998). *Embo Journal*. Dec 15 1998; 17 7469.
- Mason, P. W., Piccone, M. E., McKenna, T. S., Chinsangaram, J., and Grubman, M. J. (1997). *Virology* 227, 96–102. doi:10.1006/viro.1996.8309.
- Medina, G. N., Azzinaro, P., Ramirez-Medina, E., Gutkoska, J., Fang, Y., Diaz-San Segundo, F., et al. (2020). *J. Virol.* doi:10.1128/JVI.00341-20.
- Medina, G. N., Knudsen, G. M., Greninger, A. L., Kloc, A., Díaz-San Segundo, F., Rieder, E., et al. (2017). *Virology* 505, 12–22. doi:10.1016/j.virol.2017.02.010.
- Swatek, K. N., Aumayr, M., Pruneda, J. N., Visser, L. J., Berryman, S., Kueck, A. F., et al. (2018). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, 2371–2376.
- Wang, D., Fang, L., Li, P., Sun, L., Fan, J., Zhang, Q., et al. (2011). *J. Virol.* 85, 3758–3766. doi:10.1128/JVI.02589-10.
- Wang, D., Fang, L., Luo, R., Ye, R., Fang, Y., Xie, L., et al. (2010). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 399, 72–78. doi:10.1016/j.bbrc.2010.07.044.
- Zhu, J., Weiss, M., Grubman, M. J., and de los Santos, T. (2010). *Virology* 404, 32–40. doi:S0042-6822(10)00271-0 [pii]\r10.1016/j.virol.2010.04.021.
- Zhu, Z., Li, C., Du, X., Wang, G., Cao, W., Yang, F., et al. (2017). *Cell Death Dis.* 8. doi:10.1038/cddis.2017.170

## Nueva herramienta de subtipado rápido para el VFA

por Marco Cacciabue, Pablo Aguilera, María Inés Gismondi y Oscar Taboga

Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular, INTA-CONICET, Hurlingham, Argentina / Universidad Nacional de Luján, Departamento de Ciencias Básicas, Luján, Argentina

En la era del NGS, se produce una gran cantidad de datos de secuencia de forma rápida y continua. En el caso del VFA, las secuencias pueden usarse para la clasificación de virus con fines epidemiológicos y para la selección de cepas de vacunas. El subtipo o cepa de VFA no es trivial: las vacunas actuales no protegen de forma cruzada entre serotipos de VFA e incluso entre subtipos dentro del mismo serotipo. Para facilitar el análisis de secuencias del VFA, presentamos Covidex,

una herramienta de clasificación de aprendizaje automático y código abierto, que no requiere alineamientos. Permite una clasificación rápida y precisa (tasa de error de Oob <1.5%) de genomas virales en grupos predefinidos, todo en una interfaz fácil de usar (1). El programa fue desarrollado originalmente para la clasificación SARS-CoV-2, y ahora se ha extendido al VFA. Covidex se basa en una implementación rápida de "bosque aleatorio" entrenado sobre una base de

datos k-mer compuesta de secuencias del VFA depositadas en GenBank (2, 3). Alternativamente, se pueden usar modelos cargados por el usuario. Al entrenar los algoritmos de clasificación sobre los vectores de frecuencia k-mer sin la necesidad de una alineación de secuencia clásica, Covidex reduce sustancialmente

los requisitos computacionales y de tiempo, y puede clasificar cientos de genomas completos de VFA en segundos. El software esta disponible en:

<https://sourceforge.net/projects/covidex/>

¡Los invitamos a probarlo y sus comentarios serán muy agradecidos!

**Covidex is an ultra fast and accurate subtyping tool of viral genomes. The classification is performed using a random forest model from a k-mer database**

**3 Results will be displayed in a table**

Download the data you can download them

prediccion	probability	label
1 A	1	MH426574.1 Foot-and-mouth disease virus - type A isolate FMDV_B14-112_A24NP11dpi polyprotein gene, partial cds
2 A	1	>MH426573.1 Foot-and-mouth disease virus - type A isolate FMDV_B14-20_A24NP11dpi polyprotein gene, partial cds
3 A	1	>MH426572.1 Foot-and-mouth disease virus - type A isolate FMDV_B14-47_A24/SAL/2dpi polyprotein gene, partial cds
4 A	0.998	>MH426571.1 Foot-and-mouth disease virus - type A isolate FMDV_B14-53_A24NP13dpi polyprotein gene, partial cds
5 A	1	>MH426570.1 Foot-and-mouth disease virus - type A isolate FMDV_B14-41_A24/SER/1dpi polyprotein gene, partial cds
6 A	1	>MH426569.1 Foot-and-mouth disease virus - type A isolate FMDV_B14-44_A24NP14dpi polyprotein gene, partial cds

**4 Stats and MDS plots will also be available**

**1 Load query sequences**

Help

Query file (multi-fasta format)

Browse... FMDV.fasta

Upload complete

Choose viral species

FMDV

**2 Press Run**

RUN Done!

Covidex model generator app

Questions? Contact Admin

Powered by R

Using data from GISAID

Descripción de la app Covidex. Los pasos principales para el análisis de cepa viral se indican en azul. El usuario carga un archivo de secuencia y selecciona el modelo que se aplicará para la clasificación. Los modelos se pueden seleccionar de la lista predeterminada o el usuario puede subirlos. Se muestra la salida del programa (tabla y gráficos).

## REFERENCIAS

-Chang W, Cheng J, Allaire J, Xie Y, McPherson J. 2020. shiny: Web Application Framework for R. Rpackage version 1.4.0.2. <https://CRAN.R-project.org/package=shiny>

-Wright MN, Ziegler A. (2017). Journal of Statistical Software 77

-Breiman L. (2001). Random Forests. Machine Learning 45:5-32

# ¿Cuándo termina? Dinámica de extinción del estado de portador de VFA

por *Miranda R. Bertram, Shankar Yadav, Carolina Stenfeldt, George R. Smoliga, Ethan J. Hartwig, Ian H. Fish, Amy Delgado y Jonathan Arzt*

USDA-ARS, Foreign Animal Disease Research Unit, Plum Island Animal Disease Center, NY, USA / USDA-APHIS, Monitoring and Modeling, Center for Epidemiology and Animal Health, Fort Collins, CO, USA

Este artículo es un breve resumen de un manuscrito enviado para su publicación en *Frontiers in Veterinary Science*, número especial "Investigación sobre FA: unir las brechas con nuevas herramientas" ("FMD Research: Bridging the Gaps with Novel Tools")

## INTRODUCCIÓN

Después de la fase clínica de la fiebre aftosa, una gran proporción de rumiantes permanece infectada de forma persistente durante períodos prolongados. La existencia de este estado portador en rumiantes tiene implicancias prácticas en las regiones endémicas, que son distintas de las prácticas de manejo en las regiones que se esfuerzan por recuperar el estado libre de fiebre aftosa (FA) después de un brote (1). Las prácticas apropiadas para la gestión de los portadores no se han establecido en ninguno de los contextos. Aunque la extinción del estado de portador ocurre continuamente a nivel animal y poblacional, los estudios varían ampliamente en sus estimaciones de la duración de la infección persistente (2-4). La variabilidad entre distintos estudios y enfoques analíticos impide el desarrollo de medidas de control efectivas para dar cuenta de la infección persistente por VFA. Es importante la existencia de modelos

estadísticos robustos para capturar la dinámica de la infección persistente en aras de guiar el control de la FA y las políticas comerciales. Los estudios longitudinales observan directamente la dinámica de la infección persistente en individuos a lo largo del tiempo. Desafortunadamente, estos estudios son laboriosos, requieren mucho tiempo, son caros y son un desafío logístico. En contraste, los estudios transversales tienen tamaños de muestra más grandes y pueden completarse de manera más rápida y económica. Sin embargo, no está claro si los datos transversales son apropiados para modelar la dinámica de la infección persistente. Alternativamente, los enfoques de metanálisis que combinan datos a través de varios estudios longitudinales podrían usarse para mitigar tamaños de muestra pequeños e incorporar diversas condiciones de campo (cepa viral, factores del huésped, cría, factores ambientales) en un resultado más holístico (5).

Los objetivos del presente estudio fueron evaluar la utilidad de dos modelos estadísticos distintos para predecir la probabilidad de infección persistente por el virus de la fiebre aftosa después del brote a nivel de animales portadores / seropositivos individuales, y comparar diferentes métodos analíticos para evaluar la extinción del estado del portador. El estudio actual incorporó datos de tres estudios longitudinales primarios de infección persistente por FMDV en Vietnam e India utilizando un enfoque de metanálisis de datos de participantes individuales (5) para evaluar la dinámica de la infección persistente en las tres poblaciones de estudio. Los modelos lineales mixtos generalizados (GLMM) y los modelos de tiempo de falla acelerado (AFT) se desarrollaron para predecir la probabilidad de infección

persistente en bovinos y búfalos asiáticos (*Bubalus bubalis*) en varios momentos después de un brote de fiebre aftosa.

## MÉTODOS

Los conjuntos de datos primarios incorporados en los análisis se derivaron dentro del alcance de proyectos longitudinales a largo plazo sobre la fiebre aftosa endémica en India (n = 2) y Vietnam (n = 1) entre 2010-2015 (2, 3, 6-8). Para el estudio actual, la infección persistente se definió como la detección de ARN de FMDV en el líquido orofaríngeo (OPF). Todos los animales fueron seropositivos mediante ELISA de anticuerpos anti-NSP al inicio del estudio (2, 6, 7). Todos los animales en los dos estudios de la India eran portadores al comienzo del estudio, según lo determinado por detección de ARN del VFA en líquido orofaríngeo (LOF) (2, 7).

Species	AFT Predictions				GLMM Predictions			
	Months Post-Outbreak				Months Post-Outbreak			
	6	12	18	24	6	12	18	24
India-1 Buffalo	99.5%	40.88%	2.47%	0.24%	91.05%	51.75%	10.16%	1.18%
India-1 Cattle	98.26%	16.49%	0.72%	0.07%	75.21%	24.23%	3.26%	0.35%
India-2 Cattle	99.75%	58.51%	4.9%	0.49%	77.56%	26.70%	3.70%	0.40%
Vietnam Buffalo	99.58%	45.61%	2.98%	0.29%	75.77%	24.79%	3.36%	0.36%
Vietnam Cattle	99.86%	71.08%	8.25%	0.85%	87.21%	41.82%	7.04%	0.79%
<i>Overall</i>	<i>99.23%</i>	<i>50.75%</i>	<i>5.76%</i>	<i>0.82%</i>	<i>80.38%</i>	<i>32.08%</i>	<i>5.17%</i>	<i>0.6%</i>

Tabla 1. Probabilidad pronosticada de infección persistente después de un brote de fiebre aftosa. Se hicieron predicciones a partir de tres estudios longitudinales en Vietnam e India utilizando un modelo de tiempo de falla acelerado (AFT) y un modelo mixto lineal generalizado (GLMM)

Para los propósitos de este estudio, se supuso que no se produjo reintroducción o circulación subclínica del virus en las granjas incluidas en el estudio. La probabilidad de infección persistente se investigó utilizando modelos de tiempo

de falla acelerada (AFT) y modelos lineales mixtos generalizados (GLMM). Para tener en cuenta las diferencias de especies y otra variabilidad relacionada con el sitio de estudio, se creó una variable combinada de estudio y especie (estudio/especie) que se incluyó en ambos modelos.

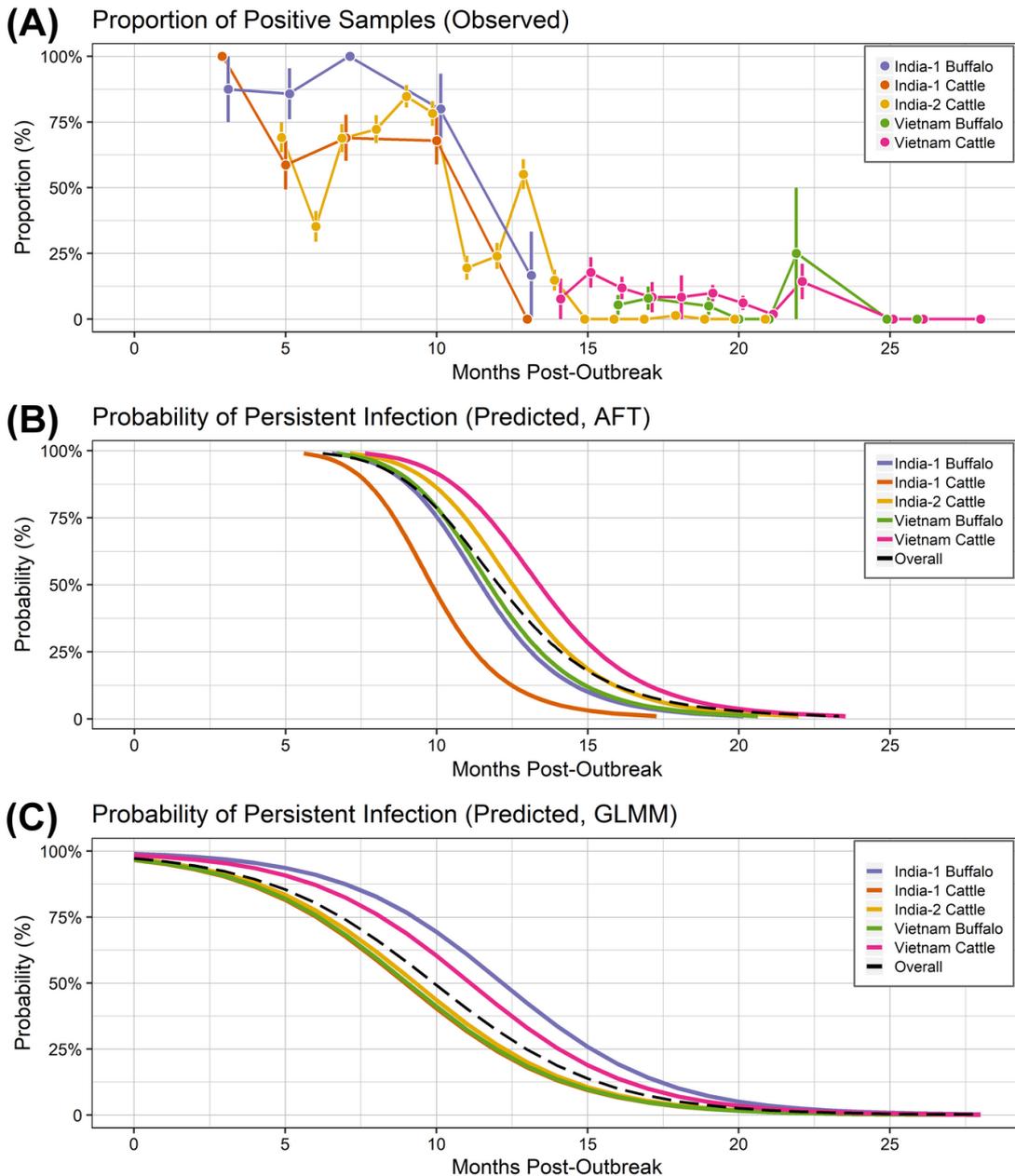


Figura 1. Probabilidad de infección persistente, datos combinados de Vietnam e India. (A) Proporción observada de muestras de OPF positivas para ARN de FMDV. Se muestran el error medio y estándar. (B) Probabilidad pronosticada de infección persistente, modelo AFT. (C) Probabilidad pronosticada de infección persistente, modelo GLMM

Además, la identificación individual del animal se incluyó como una variable aleatoria en el GLMM para tener en cuenta las medidas repetidas en los mismos animales. Las ecuaciones del modelo final se usaron para predecir la probabilidad de detección de ARN del VFA en LOF a los 6, 12, 18 y 24 meses después del brote. Se generaron estimaciones para cada grupo de estudio/especie.

## RESULTADOS

El conjunto de datos final utilizado para investigar la dinámica de extinción de la infección persistente consistió en muestras de 2006 de 345 animales seropositivos o portadores identificados, en los 3 estudios. Se detectó ARN del FMDV en el 90-100% de las muestras a los 3 meses después del brote, y la proporción de muestras positivas disminuyó gradualmente con el tiempo en todos los estudios (Figura 1A). No se detectó ARN del FMDV después de 15 meses después del brote en el estudio India-2, o después de 25 meses después del brote en Vietnam.

Los dos modelos estimaron tendencias similares en la duración de la infección persistente para los grupos de estudio / especies incluidos en los análisis, sin embargo, la importancia de las tendencias difirió entre los modelos. Las probabilidades generales de infección persistente fueron similares a las predichas por los modelos AFT y GLMM: 6 meses: 99% (AFT)/80% (GLMM), 12 meses: 51% (AFT)/32% (GLMM), 18 meses: 6% (AFT)/5% (GLMM), 24 meses: 0.8% (AFT)/0.6% (GLMM) (Tabla 1, Figura 1).

## DISCUSIÓN/CONCLUSIONES

Estos modelos que utilizan conjuntos de datos sólidos y diversos, predicen mayores probabilidades de persistencia que las publicadas anteriormente, lo que sugiere una mayor duración de los portadores después de un brote. La infección persistente con el VFA es un desafío para el control y la erradicación de la enfermedad en las regiones endémicas. Del mismo modo, las regiones libres de FA deben considerar la existencia de portadores al responder a las incursiones del virus. Las políticas comerciales y de control han tratado tradicionalmente la infección persistente como un estado binario (presente/ausente) con una duración fija. Sin embargo, la infección persistente es un proceso dinámico, y las estimaciones cuantitativas de la probabilidad de infección persistente en momentos específicos después del brote pueden proporcionar herramientas para evaluar con mayor precisión los riesgos potenciales que plantean los animales infectados persistentemente, lo que ayudará a guiar los esfuerzos de control.

En general, los dos modelos produjeron predicciones similares en los metanálisis, lo que sugiere que cualquiera de ellos puede ser satisfactorio para describir la dinámica de la extinción del estado de portador del VFA. Los investigadores deben considerar qué modelo es más apropiado para un estudio en particular basado en su diseño, la estructura de datos y si los supuestos del modelo son biológicamente apropiados. Además, los resultados deben interpretarse teniendo en cuenta el modelo utilizado para los análisis.

En este estudio, los modelos AFT y GLMM predijeron probabilidades similares de infección persistente a los 18 y 24 meses después del brote, mientras que la probabilidad de detección de infección persistente fue mayor utilizando el modelo AFT a los 6 y 12 meses después del brote. Debido a que puede sobreestimar las probabilidades en puntos temporales anteriores, el modelo AFT es el enfoque más cauteloso para diseñar políticas para reducir o eliminar el riesgo potencial presentado por animales infectados persistentemente después de un brote de fiebre aftosa. Estos análisis proporcionan un enfoque más personalizado para el desarrollo de

medidas de control para minimizar el riesgo que representan los animales infectados persistentemente. Es probable que los estudios adicionales con tamaños de muestra más grandes y metanálisis ampliados, incluidos más estudios primarios, proporcionen más matices y profundidad a nuestra comprensión de este proceso dinámico, lo que conducirá a una mejor comprensión de la infección persistente por FMDV después de los brotes y cómo predecir y controlar Este estado de enfermedad. Estos temas se tratan con mayor detalle en el artículo de Bertram et al en el número especial de *Frontiers* “FMD Research: Bridging the Gaps with Novel Tools”.

## REFERENCIAS

1. Stenfeldt C, Arzt J. *Pathogens* (2020) 9(3):167. Epub 2020/03/04. doi: 10.3390/pathogens9030167.
2. Hayer SS, Ranjan R, Biswal JK, Subramaniam S, Mohapatra JK, Sharma GK, et al. *Transboundary and Emerging Diseases* (2017) 00:1-8. doi: 10.1111/tbed.12627.
3. Bertram MR, Vu LT, Pauszek SJ, Brito BP, Hartwig EJ, Smoliga GR, et al. *Frontiers in Veterinary Science* (2018) 5(174). doi: 10.3389/fvets.2018.00174.
4. Bronsvort BM, Handel IG, Nfon CK, Sorensen KJ, Malirat V, Bergmann I, et al. *Scientific Reports* (2016) 6:29059. doi: 10.1038/srep29059. PubMed PMID: 27381947; PubMed Central PMCID: PMC4933899.
5. Thompson S, Kaptoge S, White I, Wood A, Perry P, Danesh J. *International journal of epidemiology* (2010) 39(5):1345-59. Epub 2010/05/05. doi: 10.1093/ije/dyq063.
6. de Carvalho Ferreira HC, Pauszek SJ, Ludi A, Huston CL, Pacheco JM, Le VT, et al. *Transboundary and Emerging Diseases* (2017) 64(2):547-63. doi: 10.1111/tbed.12403.
7. Hayer SS, VanderWaal K, Ranjan R, Biswal JK, Subramaniam S, Mohapatra JK, et al. *Transboundary and Emerging Diseases* (2017) 00:1-12. doi: 10.1111/tbed.12774.
8. Brito B, Pauszek SJ, Eschbaumer M, Stenfeldt C, de Carvalho Ferreira HC, Vu LT, et al. *Veterinary Research* (2017) 48(1):24. doi: 10.1186/s13567-017-0424-7.

# El papel de la integridad de las partículas de VFA en serología

por Alejandra Capozzo y Cecilia Turco

Instituto de Virología e Innovaciones Tecnológicas, INTA-CONICET, Hurlingham, Argentina

Este artículo es un resumen de un manuscrito recientemente aceptado en Plos One por Mansilla et al (2020) doi: [10.1371/journal.pone.0232782](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232782)

El objetivo de este trabajo fue evaluar las respuestas humorales en los cerdos vacunados contra el virus de la fiebre aftosa, considerando diferentes aspectos de la respuesta de anticuerpos además de los anticuerpos neutralizantes, como los anticuerpos totales y los isotipos inducidos. Para este propósito, desarrollamos ensayos ELISA indirectos adaptando los ya utilizados para sueros bovinos en nuestro laboratorio (1) y evaluamos el impacto de la integridad de las partículas virales en la serología. Un hecho bien conocido entre los laboratorios de FMDV es que los títulos estimados por los ELISA utilizados actualmente, como ELISA de bloqueo de fase líquida (LPBE) no siempre se correlacionan con los medidos por la prueba de neutralización del virus (VNT). Otros y nosotros hemos propuesto que la falta de correlación es una consecuencia de no medir el marcador de protección correcto (2, 3).

En un estudio reciente que publicamos en PlosOne, demostramos que, además de eso, un problema técnico simple como el uso de partículas virales desarmadas en

pentámeros constitutivos (12S), puede explicar, al menos parcialmente, la baja correlación que a veces se observa (Figura 1); y que este fenómeno puede ser especialmente importante para ciertas cepas lábiles. Es bien conocido y demostrado por nuestro grupo y por otros, que los VFA del serotipo O son menos estables que los del serotipo A (4). Además, diferentes autores han demostrado que las partículas virales desarmadas como pentámeros 12S son menos inmunogénicas y provocan una respuesta neutralizante disminuida (5, 6). Más aún, las partículas 12S pueden exponer los epitopes internos a las células B, pudiéndose generar entonces anticuerpos contra epitopes no expuestos, y por lo tanto no protectores. Para analizar la respuesta inmune en estas condiciones, utilizamos una vacuna caducada que contenía solo la mitad de la cantidad total de antígeno del VFA cepa O1 Campos como partículas completas (146S). Por el contrario, y debido a las características intrínsecas de estabilidad del serotipo A, las partículas de la cepa A24/Cruzeiro conservaron su mayoría su estructura intacta.

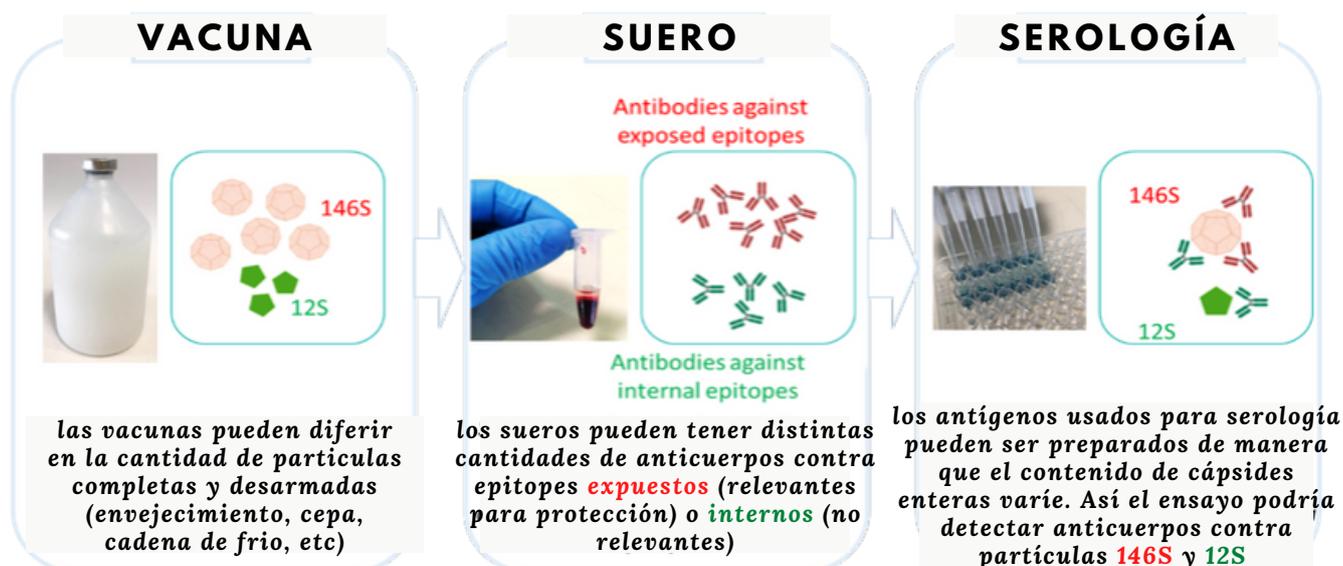


Figura 1. Los pentámeros 12S derivados de partículas enteras se pueden encontrar en las vacunas debido al envejecimiento, la presencia de aditivos, la estabilidad intrínseca de cada cepa, etc. Estos pentámeros pueden inducir anticuerpos contra epítomos que no están relacionados con la protección e incluso pueden ser similares entre diferentes cepas. Si la serología mide los anticuerpos contra los epítomos expuestos, la eficacia de la vacuna se estimará correctamente. Sin embargo, si el ensayo serológico no asegura la ausencia de partículas 12S, la correlación con los títulos neutralizantes será baja.

Cerdos seronegativos se inmunizaron con esta vacuna caducada y se midieron los anticuerpos específicos totales con el ELISA de bloqueo de fase líquida estándar (LPBE). También desarrollamos un ELISA indirecto (IE) utilizando partículas 146S purificadas en gradiente de sacarosa como antígeno de captura, para medir los anticuerpos totales, y los isotipos IgM, IgG1 e IgG2.

Se encontró una buena correlación entre los títulos de VNT y los ELISA de IgG para A24 / Cruzeiro, con el coeficiente de correlación más bajo estimado para los títulos de IgG2. Sin embargo, para la cepa O1/Campos, la presencia de anticuerpos contra epítomos diferentes de los de la cápsida completa, provocada por la presencia de partículas 12S en la vacuna,

impidió una buena correlación entre LPBE y VNT, la cual se mejoró mediante el uso de partículas virales completas (146S) purificadas del VFA O1/Campos en la fase líquida del LPBE (Figura 2). También descubrimos que las partículas 146S pero no las 12S estaban unidas de manera eficiente a las placas ELISA, lo que confirma la eficiencia del IE para detectar anticuerpos contra los epítomos expuestos. Nuestros resultados indican que cualquier prueba serológica que evalúe anticuerpos totales o IgG1 contra epítomos expuestos en partículas 146S intactas se correlaciona con los niveles de anticuerpos neutralizantes en suero en cerdos vacunados, y podría potencialmente reemplazar el VNT, después de la validación.

En función a mencionado anteriormente, recomendamos que los antígenos utilizados para los ensayos serológicos destinados a medir los anticuerpos protectores contra el virus de la fiebre aftosa se controle de forma

tal de garantizar la preservación de las partículas virales completas (146S) y así poder reducir la medición de anticuerpos no relevantes para la protección y que puedan impactar en los resultados finales.

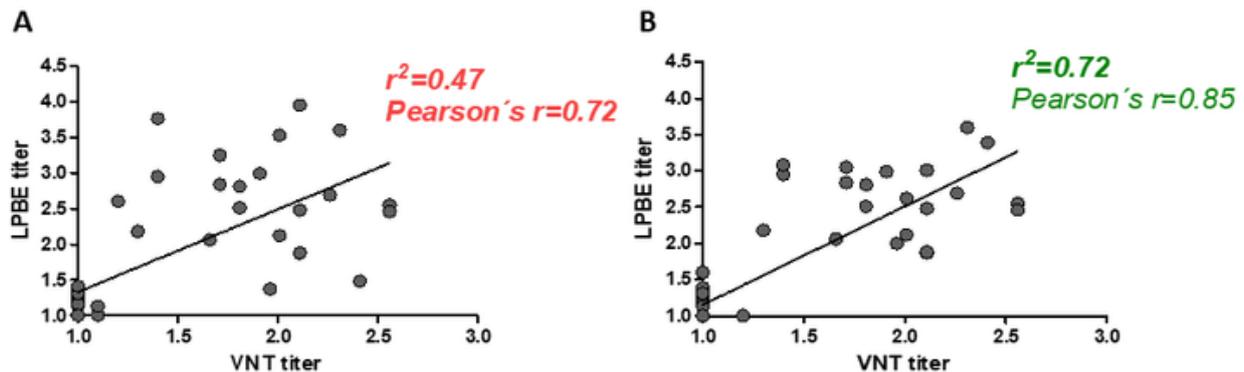


Figura 2. Efecto de la presencia de partículas 12S en la correlación entre los títulos de anticuerpos por ELISA en fase líquida (LPBE) y seroneutralización viral (SNV). Se usaron sueros de animales vacunados con mezclas de partículas de VFA 12S y 146S. El LPBE se realizó con una suspensión de virus (A) o con partículas enteras 146S purificadas (B). Los títulos por LBPE fueron calculados y graficados contra sus correspondientes títulos neutralizantes. Cada punto representa una muestra individual. Los coeficientes de correlación lineal ( $r^2$ ) y los valores  $r$  de Pearson se muestran en cada gráfico. En rojo: mala correlación entre los títulos de SNV y LPBE.

## REFERENCIAS

- (1) Lavoria M, Di-Giacomo S, Bucafusco D, Franco-Mahecha OL, Pérez-Filgueira DM, et al. (2012) Avidity and subtyping of specific antibodies applied to the indirect assessment of heterologous protection against Foot-and-Mouth Disease Virus in cattle. *Vaccine* 30: 6845-6850.
- (2) Paton DJ, Reeve R, Capozzo AV, Ludi A (2019) Estimating the protection afforded by foot-and-mouth disease vaccines in the laboratory. *Vaccine* 37: 5515-5524.
- (3) Brito BP, Perez AM, Capozzo AV (2014) Accuracy of traditional and novel serology tests for predicting cross-protection in foot-and-mouth disease vaccinated cattle. *Vaccine* 32: 433-436.
- (4) Bucafusco D, Di Giacomo S, Pega J, Schammas JM, Cardoso N, et al. (2015) Foot-and-mouth disease vaccination induces cross-reactive IFN- $\gamma$  responses in cattle that are dependent on the integrity of the 140S particles. *Virology* 476: 11-18.
- (5) Doel TR, Chong WK (1982) Comparative immunogenicity of 146S, 75S and 12S particles of FMD virus. *Arch Virol* 73: 185-191.
- (6) Rao MG, Butchiah G, Sen AK (19. Doel TR, Chong WK (1982) Comparative immunogenicity of 146S, 75S and 12S particles of foot-and-mouth disease virus. *Arch Virol* 73: 185-191.94) Antibody response to 146S particle, 12S protein subunit and isolated VP1 polypeptide of FMDV type Asia-1. *Vet Microbiol* 39: 135-143.



# El Comité Ejecutivo de la GFRA 2020-2021

**ALEJANDRA CAPOZZO**

**Directora Ejecutiva**

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina  
capozzo.alejandra@inta.gob.ar

**DACHRIT NILUBOL**

**Presidente Saliente**

Chulalongkorn University, Thailand  
dachrit@gmail.com

**CYRIL GAY**

**Secretaría**

Agricultural Research Service, USA  
cyril.gay@ars.usda.gov

**ANNA LUDI**

**Secretaría**

Pirbright Institute, UK  
anna.ludi@pirbright.ac.uk

**MARIANO  
PEREZ-FILGUEIRA**

**Director Científico**

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina  
perez.mariano@inta.gob.ar

**TOBY TUTHILL**

**Director de Finanzas**

Pirbright Institute, UK  
toby.tuthill@pirbright.ac.uk

**WILNA VOSLOO**

**Vocal**

Australian Animal Health Laboratory, Australia  
wilna.vosloo@csiro.au

**TERESA DE LOS SANTOS**

**Vocal**

Agricultural Research Service, EEUU  
teresa.delosnatos@ars.usda.gov

**PHAEDRA EBLÉ**

**Vocal**

Wageningen Bioveterinary Research, Países Bajos  
phaedra.eble@wur.nl

**FRANK MWIINE**

**Vocal**

Makerere University, Uganda.  
fmwiine@gmail.com

**NAGENDRA SINGANALLUR**

**Vocal**

Australian Animal Health Laboratory, Australia  
nagendra.singanallur@csiro.au