

Tesis de Posgrado

Mecanismos de la respuesta inmune al virus de la fiebre aftosa, (VFA) activo e inactivado en un modelo murino experimental

López, Osvaldo Jorge

1988

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

López, Osvaldo Jorge. (1988). Mecanismos de la respuesta inmune al virus de la fiebre aftosa, (VFA) activo e inactivado en un modelo murino experimental. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2156_Lopez.pdf

Cita tipo Chicago:

López, Osvaldo Jorge. "Mecanismos de la respuesta inmune al virus de la fiebre aftosa, (VFA) activo e inactivado en un modelo murino experimental". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1988.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2156_Lopez.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

TEMA DE TESIS

"MECANISMOS DE LA RESPUESTA INMUNE AL VIRUS
DE LA FIEBRE AFTOSA (VFA) ACTIVO E INACTIVADO
EN UN MODELO MURINO EXPERIMENTAL"

Autor: Osvaldo Jorge Lopez.

Director: Dr. Alejandro A. Schudel

Co-director: Dr. Claudio Bidau.

Lugar de trabajo: Instituto de Virología. Centro de
Investigaciones en Ciencias Veterinarias. INTA. Castelar

Tesis presentada para optar al título de
Doctor en Ciencias Biológicas.

2.156
Ej. 2

A mis padres, quienes no pudieron estudiar pero q
su trabajo, lograron que yo lo hici
A Kuky, quien siempre estuvo a mi lado.
A Nicolás, quien alegra mi vida.

AGRADECIMIENTOS:

...Al personal del Inst. de Virología. C.I.C.V. INTA. Castelar, sin cuya colaboración no se hubiera podido realizar este trabajo y especialmente a Ana María Hernández, Carmen S. Maciel y Antonio R. Varone.

...A la Dra. Ana M. Sadir por su constante apoyo y estímulo a lo largo de todo este trabajo.

...Al Dr. Alejandro Schudel quien siempre a estado a disposición.

...A la Dra. Christiane D. Pasqualini gracias a quien me inicié en la Inmunología.

...Al Dr. Manolo Borca quien siempre me brindó su apoyo.

...A la Dra. Marta Braun quien guió mis primeros pasos.

...A los Dres. Carlos Suarez y Marcos Rodríguez por su valiosa revisión crítica del manuscrito.

...A Diana, Alicia y demás integrantes de la Unidad de Radiobiología de la CNEA.

idos parciales de esta tesis han sido ace
icación en la Revista Veterinary Microbi

ABREVIATURAS

AN: Anticuerpos neutralizantes.

CML: Cultivo mixto de linfocitos.

DIMRA 100%: Dosis infectante mínima ratón adulto 100%.

DIRL 50%: Dosis infectante ratón lactante 50%.

e.v.: endovenoso.

GRC: Glóbulos rojos de carnero.

HSV 1: Virus Herpes simplex tipo 1.

IFN: interferón.

IN: Índice neutralizante.

i.d.: intradérmico, i.m.: intramuscular, i.p.: intraperitoneal.

LCM: Virus de la linfo coriomeningitis de ratón.

MME: Modelo murino experimental.

NK: Células Natural Killer.

O₁ Cs: Virus aftoso subtipo O₁ Campos.

T_H, T_H1, T_C: Linfocitos T colaboradores, de hipersensibilidad retardada y citotóxicos.

TTE: Tricloro trifluoroetano.

s.c.: subcutáneo.

VA: Virus activo.

VFA: Virus de la Fiebre Aftosa.

VI: Virus inactivado.

VSV: Virus de la estomatitis vesicular.

INDICE

| | |
|----------|---|
| I | <u>PROPOSITOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL</u> |
| II | <u>INTRODUCCION</u> |
| II.1 | <u>FIEBRE AFTOSA</u> |
| II.1.1 | HISTORIA Y DISTRIBUCION |
| II.1.2 | SIGNOS CLINICOS |
| II.1.3 | TRANSMISION |
| II.1.3.1 | <u>Vectores</u> |
| II.1.3.2 | Transmisión indirecta |

| | | PAG. |
|------------|--|------|
| II.1.5 | MEDIDAS DE CONTROL | 13 |
| II.2 | <u>VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA</u> | |
| II.2.1 | CLASIFICACION | 16 |
| II.2.2 | PROPIEDADES FISICO-QUIMICAS | 17 |
| II.2.3 | CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS..... | 19 |
| II.2.4 | CICLO BIOSINTETICO | 20 |
| II.2.5 | CARACTERISTICAS ANTIGENICAS E INMUNOGENICAS | 22 |
| II.2.6 | VACUNAS | |
| II.2.6.1 | <u>Vacunas en uso</u> | 26 |
| II.2.6.2. | <u>Vacunas experimentales</u> | |
| II.2.6.2.1 | Vacunas a peptidos..... | 28 |
| II.2.6.2.2 | Otras tecnologías..... | 31 |
| II.3 | <u>RESPUESTA INMUNE A VIRUS</u> | |
| II.3.1 | INFECCIONES VIRALES | 33 |
| II.3.2 | MECANISMOS DE RESPUESTA INMUNE | |
| II.3.2.1 | <u>Generalidades</u> | 36 |
| II.3.2.2 | <u>Respuesta inmune de ratones a virus</u> | 41 |
| II.3.2.2.1 | Respuesta inmune inespecifica | 42 |
| II.3.2.2.2 | Infección | 43 |

| | | PAG. |
|------------|---|------|
| II.3.2.2.3 | Respuesta inmune específica | 45 |
| II.3.3 | RESPUESTA INMUNE AL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA..... | 50 |
| III | <u>MATERIALES Y METODOS</u> | |
| III.1 | RATONES..... | 54 |
| III.2 | VIRUS..... | 54 |
| III.3 | CELULAS..... | 54 |
| III.4 | OBTENCION DEL VIRUS..... | 55 |
| III.5 | OBTENCION DEL VIRUS INACTIVADO..... | 55 |
| III.6 | EXTRACCION DE SANGRE..... | 56 |
| III.7 | OBTENCION DE PLASMA..... | 57 |
| III.8 | TITULACIONES..... | 57 |
| III.9 | DETECCION DE VIRUS INFECTIVO..... | 59 |
| III.10 | DESAFIO VIRAL..... | 60 |
| III.11 | DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI-VIA..... | 60 |
| III.12 | INMUNIZACIONES..... | 61 |
| III.13 | TITULACION DE SUERO HEMAGLUTINANTE..... | 61 |
| III.14 | INMUNODEPRESION..... | 62 |
| III.15 | COCULTIVO DE CELULAS..... | 62 |
| III.16 | OBTENCION DE SUERO ANTI-THY..... | 63 |
| III.17 | CARACTERIZACION DE POBLACIONES | |

| | | PAG. |
|----------|--|------|
| | CELULARES..... | 64 |
| III.18 | SUSPENSIONES CELULARES..... | 65 |
| III.19 | TRANSFERENCIA PASIVA..... | 67 |
| III.20 | TRANSFERENCIA ADOPTIVA..... | 69 |
| III.21 | RECONSTITUCION DE ANIMALES IRRADIADOS.... | 69 |
| III.22 | ESTADISTICA..... | 70 |
| | | |
| IV | <u>RESULTADOS</u> | |
| | | |
| IV.1 | <u>DETERMINACION DE LA CAPACIDAD INMUNIZANTE DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA ACTIVO E INACTIVADO</u> | |
| | | |
| IV.1.1 | DETERMINACION DE LA RELACION ENTRE INDICE NEUTRALIZANTE Y PROTECCION..... | 71 |
| | | |
| IV.1.1.1 | <u>Desafío a ratones inmunizados con virus activo.....</u> | 72 |
| | | |
| IV.1.1.2 | <u>Desafío a ratones inmunizados con virus inactivado.....</u> | 72 |
| | | |
| IV.1.1.3 | <u>Desafío a ratones inmunizados por transferencia pasiva.....</u> | 73 |

| | PAG. |
|------------|---|
| IV.1.1.3.1 | Dosis respuesta en la protección al desafío viral..... 73 |
| IV.1.1.3.2 | Eliminación de la viremia..... 74 |
| IV.1.2 | DETERMINACION DE LA DURACION DE INMUNIDAD POR INMUNIZACION CON EL VIRUS ACTIVO E INACTIVADO |
| IV.1.2.1 | <u>Duración de la inmunidad en ratones inmunizados con virus activo</u> |
| IV.1.2.1.1 | Cinética de anticuerpos neutralizantes luego de la infección..... 75 |
| IV.1.2.1.2 | Persistencia de la capacidad de transferir inmunidad adoptiva a receptores irradiados..... 77 |
| IV.1.2.2 | <u>Duración de la inmunidad en ratones inmunizados con virus inactivado.</u> |
| IV.1.2.2.1 | Cinética de anticuerpos neutralizantes luego de la inmunización con virus inactivado..... 79 |
| IV.1.2.2.2 | Persistencia de la capacidad de transferir inmunidad adoptiva a receptores irradiados..... 80 |

| | | |
|------------|---|----|
| IV.2 | <u>ESTUDIO DE LAS CAUSAS INVOLUCRADAS EN LA DIFERENTE DURACION DE INMUNIDAD AL VIRUS ACTIVO E INACTIVADO.</u> | |
| IV.2.1 | PERSISTENCIA VIRAL EN EL MODELO MURINO EXPERIMENTAL | |
| IV.2.1.1 | <u>En ratones conyaescientes persistentemente inmunodeprimidos.....</u> | 83 |
| IV.2.4.2 | <u>Cocultivo celular.....</u> | 84 |
| IV.2.4.3 | <u>Transferencia de celulas a receptores irradiados.....</u> | 84 |
| IV.2.2 | ESTUDIO DE LA MEMORIA INMUNE | |
| IV.2.2.1 | <u>Transferencia de celulas de bazo a receptores normales no desafiados.</u> | |
| IV.2.2.1.1 | Con celulas inmunocompetentes provenientes de dadores inmunizados con virus activo..... | 85 |
| IV.2.2.1.2 | Con celulas inmunocompetentes provenientes de dadores inmunizados con virus inactivado..... | 86 |

| | | |
|------------|--|-----|
| IV.2.2.2 | <u>Reconstituciones de animales inmunodeprimidos con poblaciones de celulas inmunocompetentes.</u> | |
| IV.2.2.2.1 | <u>Con celulas provenientes de ratones atimicos.....</u> | 87 |
| IV.2.2.2.2 | <u>Con celulas B purificadas provenientes de ratones inmunizados con virus inactivado.....</u> | 88 |
| V | <u>DISCUSION.....</u> | 90 |
| VI | <u>CONCLUSIONES.....</u> | 103 |
| VII | <u>RESUMEN.....</u> | 104 |
| VIII | <u>BIBLIOGRAFIA</u> | |

I. PROPOSITOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL

La Fiebre Aftosa es la enfermedad viral del ganado que mayor impacto económico ocasiona a la Argentina, no sólo por los perjuicios directos a las especies afectadas, sino también por las pérdidas indirectas debido al cierre de mercados de exportación que representarían ingresos de divisas para nuestro país.

Los planes de control de la Fiebre Aftosa en la Argentina se basan en la aplicación de programas de control epidemiológico definido de acuerdo al sistema productivo y cuyo elemento principal es la inmunización preventiva. La principal limitante de los inmunógenos en uso es la corta duración de la inmunidad que confieren.

Existe gran cantidad de información sobre la epidemiología de la enfermedad y la biología del virus. Estos conocimientos han sido y son muy importantes en la lucha contra esta noxa. Sin embargo, es muy poco lo que se conoce sobre la relación virus-huesped y su respuesta inmune.

En los últimos años se han realizado importantes avances en la obtención de inmunógenos por ingeniería genética, que no han resultado satisfactorios a la fecha, pues la respuesta inmune que inducen es breve e insuficiente para conferir protección.

El propósito de este trabajo es abordar el problema desde el

otro elemento de la ecuación epidemiológica, el huésped, y tiene como objetivo considerar los mecanismos de respuesta inmune específica que el hospedador pone en funcionamiento frente a la inmunización con virus activo e inactivado.

Se parte de la hipótesis de que, si conocemos cuales son los mecanismos involucrados en la respuesta específica a ambos inmunógenos, podría modularse la respuesta al virus inactivado para llevarla a un nivel de mayor protección y mas prolongada duración de la inmunidad.

Se seleccionó un modelo murino de infección al virus de la Fiebre Aftosa por lo detallado del conocimiento que se posee sobre el sistema inmune del ratón, la posibilidad que brinda este animal de manipular sus poblaciones celulares inmuno-competentes in vivo y la experiencia ganada en investigaciones previas realizadas en nuestro laboratorio (Fernández, F. et al, 1985; Borca, M. et al, 1986).

Los resultados obtenidos podrán ser utilizados para un estudio posterior en el huésped natural bovino, con el objeto de, luego de la etapa experimental, aportar nuevos elementos para la elaboración de vacunas con mayor poder inmunogénico.

Para cumplir el propósito general propuesto se debió alcanzar primero los siguientes objetivos parciales:

1. Caracterización de la relación entre el nivel de anticuerpos neutralizantes (IN) y protección al desafío viral.
2. Determinación de la duración de inmunidad al virus activo e inactivado.
3. Estudio de la persistencia de virus luego de la infección.
4. Caracterización de las poblaciones celulares inmunocompetentes involucradas en la memoria inmunológica al virus activo e inactivado.

El diseño experimental utilizado consistió en:

1. Inmunización de ratones de distintas cepas con virus activo e inactivado.
2. Desafío de los ratones activa y pasivamente inmunizados con el virus activo e inactivado.
3. Reconstitución de animales inmunodeprimidos con células totales de bazo provenientes de ratones singéneos inmunizados con ambos inmunógenos.
4. Búsqueda in vivo e in vitro de virus persistente en órganos de ratones convalescientes.
5. Transferencia de células inmunocompetentes a receptores normales sin desafío posterior con el antígeno.
6. Reconstitución de receptores inmunodeprimidos con poblaciones celulares provenientes de animales inmunizados.

II. INTRODUCCION

II.1 FIEBRE AFTOSA

II.1.1 HISTORIA Y DISTRIBUCION

En 1897 se describió al agente causal de la Fiebre Aftosa como un virus debido a que atravesaban filtros que retenían a las bacterias (Loeffler, F. y Frosch, P., 1897).

El registro mas antiguo de esta enfermedad corresponde a una observación hecha en 1546 (Fracastorius, H., 1546), que describe un brote de enfermedad en bovinos ocurrido en Italia con la misma presentación clínica que hoy conocemos de la Fiebre Aftosa.

La Fiebre Aftosa es, probablemente, la enfermedad del ganado doméstico que mayor daño económico causa en el mundo, no sólo por su amplia distribución sino también por la rapidez de su diseminación y su alta morbilidad (Brown, F. et al, 1984).

Sus huéspedes naturales son los biungulados y las mayores pérdidas económicas ocurren en bovinos y porcinos. En general la mortalidad es baja en animales adultos aunque en animales jóvenes puede llegar al 50% (aftosa cardíaca). El principal

perjuicio económico se debe a la disminución de la productividad que puede alcanzar hasta un 25 % (Brooksby, J., 1968).

La enfermedad es enzoótica en todos los continentes con excepción de Oceanía. En Nueva Zelanda nunca se registró por causa de su aislamiento geográfico y una efectiva vigilancia sanitaria (Morgan, D. et al,1984).

En Australia se registró por última vez en 1872, en Norteamérica en 1929, en Canadá en 1952 y en México en 1953 (Blackwell, J.,1980).

En E.E.U.U., a partir de 1930, se establecieron severas restricciones a la importación de ganado susceptible, carne fresca y productos derivados de países con Fiebre Aftosa. A partir de esta fecha sólo se registró una epizootia entre 1946-1953 que fue controlada con una rígida campaña de control y erradicación, precedida de una intensa campaña propagandística, en la que se invirtieron 150 millones de dólares (Bachrach, H.,1968).

En la actualidad son considerados libres de Fiebre Aftosa también algunas regiones de Europa Occidental y, desde 1987 Chile, que logró la erradicación, en base a una rígida legislación sanitaria y ayudado por su aislamiento geográfico (Schudel, A. et al,1986).

II.1.2 SIGNOS CLINICOS

La Fiebre Aftosa es una enfermedad aguda, febril y muy contagiosa, producida por el virus de la Fiebre Aftosa. Se caracteriza por ser epiteliotrópica con aparición de vesículas en los epitelios de boca, nariz, y rodete coronario (Shahan, M. et al,1962). Todos los animales biungulados son susceptibles a la enfermedad. En bovinos se observan las vesículas mas frecuentemente sobre la lengua y patas; en las vacas lecheras es frecuente la presencia de vesículas sobre las ubres y pezones (Burrows, R. et al,1971). Tambien se presentan lesiones en el rumen y corazón. Durante la infección se produce una diabetes pasajera ya que el virus infecta tambien al páncreas (Barboni, E. et al,1962). En porcinos la mayoría de las lesiones se encuentran en patas y hocico. En ovinos, caprinos y ciervos, las lesiones de las patas son importantes; mientras que las de la boca pueden ser pequeñas y pasar inadvertidas (Callis, J. et al,1980).

La infección en bovinos se asocia generalmente con un intenso babeo de saliva espumosa y el epitelio elevado que cubre las vesículas linguales se rompe invariablemente debido a la degeneración hidrópica de las células epiteliales, dejando áreas de tejido vivo al descubierto. Las lesiones de la boca dificultan severamente o impiden la alimentación de los animales y las lesiones de las patas, que normalmente son invadidas por

bacterias, provocan cojera y dificultades en el desplazamiento (Shahan, M., 1962).

La enfermedad ha sido descrita en animales salvajes tales como ciervos, antilopes, pecaríes, jirafas, elefantes (Arambulo, P. et al,1977), camellos (Moussa, A. et al,1987) y carpinchos los que podrían jugar un papel muy importante como reservorios y diseminadores de la enfermedad (Gomes, I. et al,1984).

Existen pocos registros confiables sobre la susceptibilidad de humanos (Traum, J.,1948) aunque algunos primates han sido infectados experimentalmente (Schudel, A. et al,1982), por lo que se la considera como una zoonosis menor (Acha, P. et al,1977).

El virus puede mantenerse activo por 1 día en la región nasofaríngea o sobre ropa, por lo que el hombre podría actuar como vehículo transmisor de la enfermedad (Sellers, R., 1970;Hislop, N., 1972).

Cuando se detecta un brote con características de enfermedad vesicular debe hacerse un diagnóstico de laboratorio para diferenciar entre Fiebre Aftosa, Estomatitis Vesicular (Rhabdoviridae) o Exantema Vesicular Porcino (Picornaviridae). Las técnicas más empleadas son fijación de complemento y ELISA, siendo la primera hasta hoy, la prueba de referencia para la determinación de tipo y subtipo del VFA (Alonso Fernandez, A. et al,1973) .

Estas pruebas, complementadas por otras como la de secuenciación rápida (Perez, O. et al,1987), mapeo de oligonucleótidos por electroforesis bidimensional (Frisby,D. et al,1976) y mapeo de epitopes por anticuerpos monoclonales (Thomas,A. et al,1988) son muy útiles para la identificación de variantes y estudios epidemiológicos.

Experimentalmente se pueden infectar perros, gallinas, gatos, ratas, conejos, ratones, cobayos y primates no humanos (Schudel, A. et al,1982; Arambulo,F.,1977).

II.1.3 TRANSMISION

II.1.3.1 Vectores

La transmisión de la Fiebre Aftosa se hace principalmente por medio del animal infectado, especialmente durante la fase febril temprana cuando el virus está presente en la mayoría de los órganos, secreciones (saliva, lágrimas, leche y semen) y excreciones (sudor, orina, heces) (Burrows,R.,1968; Cottral,G. et al,1968). La diseminación entre animales en estrecha proximidad ocurre probablemente a través del virus contenido en la saliva y en las lesiones podales, que permanecen infecciosas durante 9 a 11 días (Scott,F.,1966). Se ha determinado la presencia de hasta 10^6 DIRM. 50% en saliva de bovinos infectados

16 hs antes, y a las 38 hs p.i. el título alcanza $10^{8.5}$ DURL 50% (Hyalop,N.,1965).

En semen se ha encontrado VFA desde antes de que aparezcan signos clínicos de la enfermedad y hasta 10 d.p.i. Los mismos autores han demostrado que la enfermedad puede ser transmitida a través de inseminación artificial (Cottral,G. et al,1968).

No se ha identificado ningún insecto que sea vector importante de esta enfermedad. Aunque, experimentalmente se ha demostrado que garrapatas alimentadas de animales infectados pueden, también ser infectadas (Kuznetsova,G. et al,1966).

II.1.3.2 Transmisión indirecta

El virus excretado se mantiene por largos intervalos en sangre seca, en reses muertas, sobre heno, tierra, y otros objetos, que sirven como reservorio de la infección (Moller, J. et al, 1942). La infectividad de virus en productos cárneos es afectada por la maduración normal de la carne 4°C, ya que el pH en el tejido muscular baja en 72 hs a 5.3-5.7 (Cottral,G. et al, 1966), lo cual es suficiente como para producir la inactivación del virus en el músculo (Henderson,N.,1948). El congelamiento rápido impide este proceso y la supervivencia de VFA en carne tratada de esta forma es de hasta 6 meses (Cottral,G. et al, 1966). El tratamiento de esta carne con

procedimientos combinados en los que se aplica radiación gama produce un marcado descenso de la infecciosidad residual (Lasta, J. et al, 1988). Esta tecnología podría ser utilizada por países con Fiebre Aftosa endémica como la Argentina para exportar carne a países libres de esta enfermedad.

En Europa, los pájaros y los vientos (Shahan, M., 1962) han sido implicados en el transporte de virus desde largas distancias. Se ha demostrado que se puede recuperar virus del aire alrededor de bovinos desde 14 días antes que aparezcan los primeros síntomas clínicos y hasta 14 días después (Hyslop, N., 1965). También se ha informado sobre la capacidad potencial de transmisión de la enfermedad por virus presente en el aire (Sellers, R., 1971).

II.1.4 PATOGENIA

II.1.4.1 Vías de entrada y lugares de replicación del virus

Los bovinos pueden ser infectados experimentalmente por la inoculación por vía i.d. en el epitelio lingual y con una mayor dosis vía i.m., s.c., traqueal, i.p., e.v., nasal, mamaria, uterina y oral. Estos datos sugieren que el virus presente en el aire, agua y pastos pueden producir infecciones naturales (Sellers, R., 1971).

No puede descartarse tampoco la infección de animales jóvenes de hembras que se encuentran amamantando o por vía sexual tanto de hembras como de machos.

La infección a cobayos requiere la adaptación del virus al huésped experimental. Para ello, se necesitan varios pasajes (seis) en el nuevo huésped. Un virus "cobayizado" luego de inyectado por la vía intra dermo plantar produce lesiones similares a las de los bovinos en patas. Por este motivo esta es la especie que se ha utilizado en las pruebas de potencia de vacunas (Terpstra,C. et al,1976). Luego de la inoculación por la vía i.d., se ha detectado por técnicas de inmunoperoxidasa al antígeno asociado a la infección viral (VIA) en glándulas mamarias, hígado, lengua y almohadilla plantar (Wool,S. et al., 1982)

La infección de ratones lactantes menores de 11 días produce la muerte por paraplegia espástica siendo esta una prueba de referencia para titular virus o anticuerpos neutralizantes (Skinner,H.,1953)

Los ratones adultos de varias cepas pueden infectarse experimentalmente por distintas vías: i.p., e.v., i.c. (Fernandez,com. pers.). La infección experimental produce una enfermedad subclínica caracterizada por una corta viremia que no se extiende mas allá de 3 días p.i., siendo el páncreas el órgano primario de replicación (Fernández,F. et al 1985).

En el bovino, luego de la infección experimental, ya sea por

via intranasal o e.v., se puede detectar VFA en líquido esofagofaríngeo y tejidos linfoides y del tracto digestivo luego de 4 hs p.i. (Sutmoller,P et al,1976a). Posiblemente, el virus se multiplique también en glándula mamaria, pituitaria, páncreas y tejido muscular cardíaco (Sutmoller,P. et al 1976b).

II.1.4.2 Persistencia de la infección

Si bien la Fiebre Aftosa es una enfermedad aguda, luego de la recuperación se ha observado que una proporción variable de bovinos permanecen persistentemente infectados estableciéndose el estado de portador sano (Sutmoller,P. et al,1967).

El primer aislamiento de virus proveniente de bovinos portadores se realizó a partir de líquido esofagofaríngeo y produjo Fiebre Aftosa cuando se inoculó en ratones lactantes y bovinos (Van Bekum,J. et al,1959).

Sin embargo, los intentos de demostrar experimentalmente contagio de bovinos portadores a bovinos susceptibles han fracasado (Graves,J. et al,1971, Garcia Olano,H. et al,1976).

La duración del estado portador varía según los informes y parecería depender del tipo viral utilizado en la infección. Según Burrows(Burrows, R,1968), la persistencia es de 15 meses en bovinos y de 4 meses en ovinos. Otros autores (Sadir,A. et al, 1988) sólo han detectado virus en bovinos, hasta los 3

meses p.i. en líquido esofagofaríngeo por infectividad luego del tratamiento del material extraído con Tricloro trifluoroetano para disociar los complejos inmunes (Brugh, M et al, 1977). Sin embargo utilizando una sonda molecular en estos animales se detectó ARN viral hasta los 560 días p.i. (Rossi, M. et al, 1988).

En experimentos en los que se utilizó VFA C₂ se recuperó virus por infectividad hasta los 539 dpi. En este caso también se detectaron variaciones en la secuencia nucleotídica del ARN viral correlacionada con variación antigénica detectable con anticuerpos monoclonales (Gebauer, F. et al, 1988).

Estos cambios en antigenicidad debidos a la presión selectiva del sistema inmune del huésped portador y la alta tasa de mutación del VFA (Pringle, C., 1964) podría ser la causa de la aparición de nuevos subtipos en la naturaleza (Fagg, R. et al, 1966).

II.1.5 MEDIDAS DE CONTROL

La Fiebre Aftosa es una enfermedad compleja debido a los múltiples factores que coadyuvan en su presentación. La distribución geográfica, el sistema productivo, el amplio rango de huéspedes, la variabilidad del virus, la morbilidad de la enfermedad, la existencia de portadores sanos y su complejidad inmunológica son factores a considerar. Por lo tanto, el

planeamiento de medidas de control dependerá de la región donde se pretende encarar la lucha en base al clima, aislamiento geográfico, tipo de producción ganadera, condiciones económicas, sociales, comerciales y culturales (Rosemberg,F.,1986).

En los países donde se ha erradicado la enfermedad, en la última etapa siempre se utilizó el rifle sanitario (Bruner,D. et al,1966). En algunos países europeos donde la enfermedad es enzoótica o están sometidos a introducción de virus desde el exterior, se utiliza la cuarentena y vacunación en los alrededores del foco (Bruner,D.,1966). En la mayoría de los países donde la enfermedad es enzoótica se utiliza la vacunación sistemática.

En América del Sur se aplica una vacuna trivalente (con virus O, A y C) cada cuatro meses a los bovinos y cada 6 meses a los ovinos.

En la Argentina se vacuna en todo el territorio a partir de 1965 con un programa que implica la vacunación sistemática de todos los bovinos en los meses de febrero, junio y octubre, el control de los movimientos de ganado y, el aislamiento de focos con medidas de higiene y profilaxis (COSALFA,1981).

Si bien estas medidas han sido un gran avance en la lucha contra la Fiebre Aftosa, no han impedido que todavía existan epidemias como la ocurrida en 1987 en nuestro país (Perez,O. et al,1987).

Actualmente se está llevando a cabo un plan piloto en el

Partido de Ayacucho con el objeto de evaluar la eficacia de una vacuna preparada con adyuvante oleoso bajo control del Servicio Nacional de Salud Animal y la colaboración de INTA, la Prov. de Bs. As. y la participación de los productores. Los resultados hasta la fecha son alentadores. Es importante destacar que cuando se censó la hacienda se comprobó que el 33 % de la misma no estaba registrada y por lo tanto no estaba vacunada. Por ello no puede sorprender la aparición de un brote en ganado con esta deficiente cobertura sanitaria (Claver, J. SENASA, Argentina, com. pers.).

II.2 VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA

II.2.1 CLASIFICACION

El VFA se clasifica dentro de la familia de los Picornaviridae que incluye virus pequeños, sin envoltura, con ARN infeccioso de cadena simple. La replicación y ensamblado ocurre en el citoplasma y el virus es liberado por lisis celular. Los picornavirus se han aislado de muchas especies animales y háy una gran cantidad de patógenos entre ellos, tanto en humanos como en animales (Rueckert,R.,1985).

Si bien al microscopio electrónico los miembros de esta familia son indistinguibles, lo son en base a sus características fisicoquímicas, serológicas y manifestaciones clínicas en sus huéspedes susceptibles (Cooper,P. et al,1978).

La familia se divide en cuatro generos y un grupo no clasificado:

- i. **Cardiovirus:** incluye los mengovirus y el virus de la encefalomiocarditis (EMC).
- ii. **Enterovirus:** incluye a los virus responsables de la poliomielitis, Hepatitis A, Cocksakie y Echovirus en humanos; enterovirus de animales y poliovirus de ratón.
- iii. **Rhinovirus:** incluye a los rinovirus humanos y bovino.
- iv. **Aftovirus:** incluye los 7 tipos de VFA con mas de 65

subtipos (Schudel A. et al, 1986).

v. No definidos: incluye al rinovirus equino y virus de insectos.

Cada especie se divide en tipos y subtipos distinguibles serológicamente. (Rueckert, R., 1985).

II.2.2 PROPIEDADES FISICO QUIMICAS

Los Aftovirus y Rhinovirus son lábiles a pH ácido y esta característica los diferencia de los otros dos grupos de la familia. La densidad de flotación en gradiente de ClCs es la mayor con respecto a los demás generos de la familia. Los aftovirus y los rhinovirus se distinguen por una densidad mayor en gradiente de cloruro de Cesio, característica que estaría relacionada con diferencias en la estructura de los diferentes grupos. La mayor densidad del VFA podría deberse a la capacidad de intercambiar mayor cantidad de iones Cs que los demás miembros de la familia (Terry, G., 1982). Esta interpretación resulta consistente con los resultados obtenidos por difracción de rayos X en los que se ha determinado que, la proteína estructural VP1, deja espacios libres en los vertices de la cápside de VFA, lo que no ocurre en polio ni rhinovirus, y esto permitiría la entrada del ion Cs al virión (Fox, G. et al, 1987).

La diferencia de estabilidad en medio ácido también está relacionada con diferencias morfológicas y estructurales (Newman,F.,1973). Se cree que esta propiedad representaría una adaptación a la biología de los grupos, ya que por ejemplo, los Enterovirus deben pasar por las condiciones altamente ácidas del sistema digestivo para llegar al intestino, mientras que los Rhino y Aftovirus se replican en los tractos esofagofaríngeo y nasal (Mc Vicar,J. et al,1976) donde las condiciones del medio no son tan drásticas. Por otro lado, esta labilidad, podría ser también una ventaja adaptativa ya que estos virus se encuentran entre los más contagiosos conocidos (Rueckert,R.,1985). Quizás, esto está relacionado con el fenómeno de internalización celular (Maldhus,I. et al,1984).

No se ha encontrado evidencias de presencia de lípidos en su cápside, por lo que los solventes orgánicos no tienen efecto sobre este virus. En cambio el tratamiento con desnaturalizantes proteicos como el fenol produce la liberación del ARN infeccioso (Bachrach,H.,1968).

En el cuadro 1 se describen algunas de las características físico-químicas del VFA.

CUADRO 1

CARACTERÍSTICAS FÍSICO QUÍMICAS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA

| | Peso mol. x 10 ⁶ | Diámetro | Coef. S | en ClCs | Estabilidad | % Proteína | % ARN | Subunidades |
|----------------------|--------------------------------|----------|---------|---------|-------------|------------|-------|-------------|
| | | | | g/ml. | a pH=6 | | | |
| Virión | 8.4 | 24 nm | 146 | 1.43 | No | 69 | 100 | 12 |
| Cápside | 4.7 | 21 nm | 75 | 1.31 | No | 100 | 0 | 12 |
| Capsómeros | 0.45 | | 12 | 1.30 | Si | 100 | 0 | 1 |
| ARN pol. ARN dep. | 0.1 | | 3 | 1.30 | Si | 100 | 0 | |
| Material Genético | 2.6 | | 37 | 1.67 | Si | 0 | 100 | |

Referencias: Rueckert, R. et al, 1971; Denoya, C. et al, 1978; Vazquez, C. et al, 1979;

Rueckert, R., 1984; Fox, L. et al, 1987.

II.2.3. CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS

El virión completo tiene un PM de 8.4×10^6 D y un coeficiente de sedimentación de 140 S (Ruekert,R.,1971). La composición química corresponde a un 31 % de RNA y un 69 % de proteínas (Rueckert,R.,1976). La cápside tiene una estructura icosaédrica simétrica (Bachrach,H. et al,1958). Cada virión está compuesto por 60 protómeros que corresponden a las proteínas estructurales VP1, VP2, VP3 y VP4 en una relación 1:1:1:1. El PM aproximado de las proteínas es de 30000 D para las tres primeras y 10000 D para VP4 (Bachrach,H. et al,1973). En el virión completo pueden identificarse 1 ó 2 copias de VP0 (precursor de VP2 y VP4) (Jacobson,M. et al,1968).

Cada cara del icosaedro está formada por cinco trimeros de VP1, 2 y 3 y, en la cubierta interior, asociado con el ARN, se encuentra VP4 (Talbot,P. et al,1973).

Dentro de la cápside se encuentra un antígeno viral asociado a la infección (VIA) que es la ARN polimerasa ARN dependiente (3 S) y un polipeptido (VPg) que bloquea al extremo 5' del RNA por unión covalente al nucleótido pUp (Sangar,D. et al,1977).

Por tratamiento con pH menor de 7, el virión se disocia en subunidades proteicas con un coeficiente de sedimentación de 12 S, que corresponden a pentámeros de VP1, VP2 y VP3, y un precipitado insoluble que contiene a la VP4 (Burroughs,J. et al,1971).

Existe otra partícula que se halla luego de la infección y que corresponde a cápsides sin ARN con un coeficiente de sedimentación de 75 S y compuesta por VP1, VP3 y VP0 (Van der Woude, G. et al, 1972).

La infectividad del RNA libre es 10^4 veces menor que el virión (Denoya, C. et al, 1978). La molécula del RNA, de aproximadamente 8450 bases, actúa como templado para la producción de cadenas complementarias, como mensajero en la producción de proteínas o ser encapsidada en la cápside naciente (Sangar, D., 1979). De igual manera que los ARN eucarióticos se encuentra una cadena de poli A en el extremo 3' (Chatterje, N. et al, 1976). Se ha descrito además una cadena poli C cerca del 5' terminal (Brown, F. et al, 1974), con variaciones importantes en la longitud. Se cree que existe una relación entre la longitud de esta cadena y la virulencia (Harris, T. et al, 1977.)

II.2.4 CICLO BIOSINTETICO

La infección en cultivos celulares se inicia con una fase de adsorción influenciada por los iones presentes y que coincide con la hipótesis de que se debe a una interacción proteína-proteína. (Thorne, H., 1962)

No se conoce al/los receptores celulares responsables de la

unión del virión a la células (Melnick, J., 1985).

En cultivos de células de riñón de cerdo se demostró que existen entre 30-100 receptores por célula para el virus (Brown, F. et al, 1962).

La proteína viral involucrada en la unión al receptor sería la VP1 pues es la única sensible a la tripsina y el tratamiento del virión con esta enzima disminuye notablemente la infectividad (Cavanagh, D. et al, 1977).

La penetración es un proceso activo ya que el virión no penetra en células muertas, a pesar de permanecer fijado a ellas (Brown, F. et al, 1962).

Como en todos los Picornavirus, la replicación se inicia en un punto cercano al extremo 5', que resulta en una poliproteína con un rápido clivaje proteolítico (Pledger, R., 1961). Otros autores han reportado la presencia de dos posibles sitios de iniciación de la poliproteína (Burroughs, J., 1984; Clarke, B. et al, 1985).

Los cuatro productos primarios de la traducción son, en dirección 5'-3': la pequeña proteína P20a; la poliproteína P88 (de la que derivan todas las proteínas estructurales) la proteína P52, cuyos productos de clivaje se cree que corresponden a proteasas y la proteína P100 que es la precursora de la VPg, una proteasa y la ARN pol-ARN dep (Grubman, M. et al, 1984).

El proceso de ensamblaje de las proteínas estructurales y su

unión con el ARN, conduce a la formación de virus maduros (Grubman, M. 1984).

En células de riñón de ternero infectadas con alta multiplicidad de infección, el período de eclipse es de 100-110 minutos (Polatnick, J. et al, 1960).

A los 150 minutos comienza la liberación de virus que coincide con la cesación de la fase logarítmica de la producción y a los 300-330 minutos cesa la respiración celular (Pledger, R., 1961).

La liberación de las partículas maduras se produce por lisis celular probablemente por razones mecánicas (Rueckert, R., 1976).

No se ha informado sobre la expresión de antígenos en membrana de la célula infectada en la familia Picornaviridae. Aunque recientemente se ha demostrado que el virus Cocksakie B3 podría llegar a producir algún tipo de perturbación en la membrana de células infectadas por expresión de moléculas que no presentan las células no infectadas (Lutton, L. et al, 1986).

II.2.5 CARACTERÍSTICAS ANTIGENICAS E INMUNOGENICAS

En el cuadro 2 se detallan las principales características antigénicas e inmunogénicas del VFA y sus componentes.

El virión infeccioso (146 S) es el principal responsable de la formación de anticuerpos neutralizantes (Brown, F. et al,

1963). La partícula 75 S tiene iguales características inmunogénicas y su presencia en vacunas contribuye significativamente en su eficacia, debido principalmente a la mayor estabilidad en pH bajo (Doel, T. et al, 1982; Rweyemamu, M. et al, 1981).

Cuadro 2

| Partícula | Inmunoge- nicidad | Especifi- cidad | Fij. de C' complem. | Inmunoprec. en agar |
|-----------|----------------------|--------------------|------------------------|------------------------|
| 146 S | ++++ | Subtipo | + | + |
| 75 S | ++++ | | + | + |
| 12 S | + | No | + | + |
| 3 S | + | No | | + |

Referencias:

Brown, F. et al, 1963; Cowan, K. et al, 1967; Cowan, K. et al, 1968a y b; Rowlands, D. et al, 1975;

La producción de anticuerpos neutralizantes por VFA tratado con tripsina, se ve marcadamente reducida (Rowlands, D. et al,

1971; Baterling, S. et al, 1979).

Esto coincide con el hallazgo de que la VP1 es la proteína mas inmunogénica ya que además es la única sensible a la tripsina. Por aislamiento y purificación de péptidos estructurales que luego fueron utilizados para inmunizar animales, se ha corroborado esta observación (Bachrach, H. et al, 1975; Laporte, J. et al, 1973).

Sólo los anticuerpos anti-146 S son completamente específicos de tipo; en contraposición, la partícula 12 S puede ser neutralizada, parcialmente, por un antisuero heterotípico (Brown, F. et al, 1958), lo que indica que se mantiene algún grado de especificidad de tipo (Ceglonsky, N., 1965).

Sin embargo, los capsómeros 12 S son muy poco inmunogenicos y presentan bandas de no identidad en la reacción de precipitación en agar (Ouchterlony) (Graves, J. et al, 1968). Aunque, se ha demostrado que la adsorción de suero anti-140 S con partículas 12 S disminuye la reactividad con 146 S, lo que implica que existen determinantes antigénicos comunes (Cowan, K. et al, 1968b). Esto se corroboró mediante experimentos en los que se demostró que partículas 12 S heterotípicas, son capaces de inducir una respuesta 2° en cobayos previamente inmunizados con partículas 146 S (Cartwright, 1980).

Esta diferencia en reactividad, que es común para muchos virus (Van Regenmortel, M., 1966) se debe a diferencias en la estructura 2°, 3° o 4° de las proteínas que componen el virión

por la posible aparición de criptotopes (epitopes enmascarados en el virión completo) y/o a la aparición de neotopes (nuevos epitopes conformacionales) por las modificaciones producidas en el virión (Cowan,K.,1973).

La partícula 75 S presenta inmunidad cruzada con la 12 S y 146 S (Graves,J. et al,1968) y es buen inmunógeno (Morgan,D. et al,1970).

El clonado del gen codificante para la proteína VP1 (Kupper,H et al, 1981) ha corroborado los estudios realizados sobre subunidades en cuanto a su inmunogenicidad y antigenicidad (Laporte,J. et al,1973). Se ha comprobado la gran variabilidad del segmento VP1, relacionada probablemente con el escape a los anticuerpos neutralizantes in vivo (Carrillo,E, et al,1988). Se han determinado los principales sitios inmunogenicos de la VP1 que corresponden a los aminoácidos 140-156 y 200-213 (Boothroyd,J. et al,1981, Kupper,H. et al, 1981).

Sin embargo investigaciones recientes llevadas a cabo con anticuerpos monoclonales han determinado la existencia de otros epitopes asociados a la infectividad resistentes al tratamiento con tripsina asociados o no a VP1 (Mc Cullough,K. et al, 1987).

La proteína p56 (ARN pol-ARN dep), induce la producción de anticuerpos (Polatnick,J.,1980). Se la denomina antígeno VIA acrónimo compuesto por las iniciales en inglés de "antígeno asociado a la infección", ya que sólo se encuentran anticuerpos anti-VIA en animales donde se ha replicado el virus. Por este

motivo la detección de estos anticuerpos en animales susceptibles es indicadora de infección y denota la aparición de brotes (Rosemberg,F. et al,1974). Desde el punto de vista inmunológico el antígeno VIA es idéntico para los distintos tipos virales (Cowan,K. et al,1966).

La prueba de referencia para la tipificación y subtipificación) del VFA ha sido la fijación de Complemento. Actualmente se trata de sustituir por un método de ELISA en fase líquida mas simple y rápido (Roeder.P. et al,1987).

II.2.6 VACUNAS

II.2.6.1 Vacunas en uso

Las primeras vacunas contra VFA se elaboraron con epitelio lingual bovino proveniente de animales infectados, inactivadas con formol y adyuvadas con hidróxido de Aluminio (Belin,C., 1953).

En 1951 se desarrolló un método de inoculación de epitelio lingual in vitro a escala industrial (Frenkel,H., 1951) .

Debido al costo del sustrato, en la década de 1960 se desarrolló la producción de vacunas en células de la línea BHK 21 (Mowat,G.,1962). No obstante, en algunos países se sigue utilizando el método Frenkel.

La inactivación del virus se realizó tradicionalmente con formaldehído (Bachrach, H. et al, 1957) o más recientemente con el inactivante de primer orden acetilendiamida (AEI) (Schmidt, S et al, 1936; Banehmann, H., 1974).

La vacuna en uso en Argentina se produce en base a virus inactivado y contiene como mínimo en la misma dosis los 3 tipos existentes en el país (O, A y C).

El control de inocuidad se realiza por inoculación intradermolingual en bovinos susceptibles (Brooksby, J., 1968) o bien por inyección en ratones lactantes (Fernandes, M., 1972).

La potencia de la vacuna inactivada está relacionada con la integridad de las partículas 146 S (Doel, T. et al, 1982b).

La formulación del antígeno se hace por adsorción a hidróxido de Aluminio en suspensión acuosa. La inmunidad conferida por estas vacunas es de corta duración pero la introducción de adyuvantes oleosos ha permitido el aumento en la duración de inmunidad hasta seis meses post-vacunación (INTA PIADC 1977).

Con el objeto de aumentar la duración de inmunidad se ha intentado el empleo de vacunas a virus atenuado. Para ello se han utilizado cepas atenuadas por pasajes en pollos, conejos y cultivos celulares (Callis, J., 1988); pero la persistencia en bovinos portadores y la susceptibilidad de terneros o cerdos, sumado a las fluctuaciones génicas existentes en una población de VFA que permiten una rápida evolución viral (De la Torre, J., 1985), determinan su impracticabilidad (Brooksby, J., 1982).

Sin embargo, algunos autores consideran que, el uso de nuevas tecnologías como son la secuenciación del genoma y el uso de anticuerpos monoclonales, abren la posibilidad del desarrollo de cepas atenuadas con escasa probabilidad de reversión (Giraud, A. et al, 1988).

II.2.6.2 Vacunas experimentales

II.2.6.2.1 Vacunas a peptidos

Las vacunas a virus inactivado presentan la desventaja de su inestabilidad térmica (Doel, T. et al, 1981), una vida media corta y la posibilidad de escape de virus infeccioso de laboratorio (King, A. et al, 1981). Con el objeto de producir vacunas que eliminen estos inconvenientes y disminuir el costo, se han ensayado en los últimos diez años vacunas elaboradas con péptidos inmunogénicos por síntesis química (Bittle, J. et al, 1982) e ingeniería genética (Kupper, H. et al, 1981).

Los resultados obtenidos hasta el presente con estas vacunas experimentales, no han sido satisfactorios ya que, para inducir una respuesta similar a la producida por virus inactivado son necesarias varias inoculaciones (Di Marchi, R. et al, 1986, Francis, M. et al, 1987a). Con este tipo de vacunas no existe

correlación entre producción de anticuerpos neutralizantes y protección, tanto en animales de experimentación como en el bovino. Se ha demostrado que mediante la inmunización con el péptido es posible inducir un IN₅₀, sin embargo, este alto nivel de anticuerpos no implica que los animales se encuentran protegidos frente a un desafío viral (Murdin,A.,1986; Murdin,A. et al,1987a). Esto se contrapone con lo que ocurre cuando se inmuniza con virus inactivado en ganado (Pay,,T. et al,1987) o en cobayos (Knudsen,R. et al,1983). En estos dos sistemas existe correlación entre respuesta en anticuerpos neutralizantes a la dosis de 146 S y el grado de protección conferida por la presencia de estos.

Además, con el péptido, la respuesta es muy variable entre animales, no sólo de la misma especie sino también dentro de cepas singeneicas (Murdin,A. et al,1987b).

En todos los casos los péptidos utilizados para inmunizar han sido los correspondientes a la zona de VP1 capaz de inducir anticuerpos neutralizantes (Boothroyd,J. et al,1981), sin embargo, la presencia de otros anticuerpos, como por ejemplo los opsonizantes, podrían jugar un rol destacado en la protección en el bovino (Mc Cullough,K. et al,1985a).

A esto debe sumarse que la conformación espacial de los péptidos utilizados puede ser muy diferente a la presente en el virión completo, como se ha demostrado por el empleo de anticuerpos monoclonales (Mc Cullough,K. et al,1987). Por último,

en estas vacunas se utiliza sólo una fracción del virus lo que puede implicar un reconocimiento significativamente distinto con respecto a la partícula viral entera.

En varios modelos experimentales se ha intentado solucionar el problema por diferentes métodos:

Utilizando proteínas de fusión con péptidos de VP1 (Winther, M. et al, 1986), Uniendo estas proteínas de manera de formar dímeros o tetrameros con las mismas (Broekhuisen, M. et al, 1987); Acoplado epitopes T helper de proteínas foráneas a la secuencia mas inmunogénica de VP1 (Francis, M. et al, 1987); Fusionando esta misma secuencia a la proteína del core del virus de la Hepatitis B (Newton, S. et al, 1987) etc. Los resultados han sido alentadores en cuanto a la producción de anticuerpos neutralizantes y en algunos casos protección frente a la descarga. Sin embargo, estos resultados han resultados han sido muchas veces erráticos (Brown, F., 1988).

A estas desventajas, debe sumarse algunos datos experimentales recientes que indican que, cambios de un aminoácido en la zona mas inmunogénica de la proteína VP1, deprime totalmente la respuesta al péptido (Brown, F. Pir bright, Lab., Inglaterra com. pers). Debe agregarse que recientemente se ha demostrado con mutantes obtenidos por presión selectiva de anticuerpos monoclonales que en el VFA existen dos sitios inmunodominantes, el ya conocido correspondiente a la secuencia 140-160 de VP1 y

un segundo epitope no sensible al tratamiento con tripsina que incluye principalmente residuos de VP3 (Thomas,A. et al,1988).

Estos resultados erráticos tienen una explicación en la escasa información existente en relación a la respuesta del huésped al virus activo e inactivado y/o sus péptidos (Francis,M. et al,1987a)

El método hasta hoy utilizado es el de ensayo y error, ya que es muy poco lo que se conoce sobre la respuesta inmune al VFA (Murdin,A.,1986).

II.2.6.2.2 Otras tecnologías

Por técnicas de ingeniería genética se ha insertado la secuencia de la proteína VP1 correspondiente a un virus tipo 0 al ADN de Vaccinia (Newton,S. et al,1986). El virus recombinante se utilizó para infectar conejos. Los resultados hasta ahora no han sido satisfactorios tanto en relación a la producción de anticuerpos neutralizantes como en cuanto a la protección conferida. Otro grupo ha intentado el mismo esquema en otros animales de experimentación, observándose producción de anticuerpos neutralizantes pero sin protección cuando fueron

desafiados con el virus homólogo (Moore D. PIADC, USA com. pers.).

La elaboración de vacunas a virus recombinante presentan la ventaja de mayor duración de inmunidad ya que se produce infección al inocularla, sin embargo no puede descartarse que el virus modificado se convierta en patógeno por ejemplo por modificación del tropismo (Villareal, L., Univ. de San Diego, U.S.A., com. pers.), riesgo de infección en animales inmunodeprimidos, riesgo de diseminación etc

Con vacunas antiidiotipos, los resultados tampoco han sido satisfactorios hasta el momento (Mac Cullough, K. et al, 1985c; Garmendia, A., 1988).

Por último, en el terreno de la hipótesis, también se ha planteado la posibilidad de desarrollar vectores para la transfección de embriones y células eucarióticas con trozos de ADN viral que al traducirse produzcan ARN de sentido negativo al del virus con el objeto de impedir la traducción de las proteínas del virus en caso de infección. (La Torre, J., 1986).

II.3 RESPUESTA INMUNE A VIRUS

II.3.1 INFECCIONES VIRALES

Los virus, por ser particulados, son multiantigénicos y buenos inmunógenos. A diferencia de partículas inertes, el sistema inmune reacciona no sólo contra los antígenos de la superficie virión sino también contra las proteínas que se producen durante el ciclo replicativo (Hood,L. et al,1984).

La duración de la inmunidad luego de una infección viral generalizada es, en general, muy larga (Ada,G.,1988). Entre las razones que actúan en favor de ello es que la replicación prolonga el período de exposición del antígeno al sistema inmune y la liberación de factores solubles inducidos por la replicación viral (Sissons,G. et al,1985).

Esquemáticamente, se puede dividir a las infecciones virales en (Roit,I. et al,1985):

- a. aguda: luego de la cual es imposible recuperar virus. Ej. Virus de la influenza (Couch,R. et al,1983).
- b. latente: en la cual el virus luego de la etapa aguda penetra en células del organismo donde se inserta en su genoma, pasando a estado de provirus y, cada tanto, y en función de determinados factores endógenos o exógenos, se produce una reinfección. Ej. Herpesvirus, Scrapie. (Ranjeani,J. et al,1977).

c. latente no demostrable: tal es el caso de enfermedades donde es difícil hallar al agente causal. Ej.: Panencefalitis esclerosante múltiple, esclerosis múltiple, etc. En este caso se considera que los agentes etiológicos podrían ser múltiples y los factores genéticos juegan un importante papel en la susceptibilidad (Yeh, J., 1973).

d. infección subclínica: se establece luego del periodo agudo, y va acompañada de producción de anticuerpos persistentemente con y formación de complejos inmunes circulantes. Posiblemente involucre un defecto en los mecanismos de eliminación de células infectadas con el patógeno. Ej.: Hepatitis B (Basualdo, J. et al, 1983), LCM (Oldstone, M. et al, 1971).

La ruta de entrada es un factor importante que incidirá en la respuesta inmune frente a la noxa. Así, cuando el virus penetra y se replica en el epitelio, deberá sortear los efectos del interferón, anticuerpos IgA y mecanismos celulares inespecíficos y específicos. Los virus que se diseminan y producen viremia inducirán, una importante respuesta en anticuerpos séricos. La calidad y cantidad de respuesta dirigida ya sea hacia la eliminación del virus, o de la memoria que se establezca, dependerá de como hayan sido activados los distintos mecanismos de la respuesta inmune (Massuh, E., 1983; Bloom, A., 1975).

Como producto de la infección se producen una serie de

antígenos. Estos pueden ser clasificados en :

- a. Antígenos propios del virión.
- b. Antígenos intracitoplasmáticos celulares del virus que corresponden a proteínas no estructurales (Coto,C. et al,1983).
- c. Antígenos virales expresados en membrana celular. En general glicosilados por el huesped, como sucede con el virus SV40 (Furchberger,N. et al,1979).
- d. Antígenos propios del huesped inducidos por la infección. Ej. Antígenos embrionarios y celulares desreprimidos, del tipo Forssman etc. (Nicholson,G.,1976).

Quando se vacuna con virus inactivado, los únicos antígenos que actúan sobre el sistema inmune son los que se encuentran en el virión. Esto es un importante elemento a considerar en cuanto a la modulación de la respuesta y a la efectividad de la protección capaz de inducir, dado que, los mecanismos del sistema inmune que se sensibilizan, tanto durante una infección como durante una inmunización y los factores específicos e inespecíficos que se liberan son diferentes cuando el virus se replica que cuando el virus se inocular inactivado (Playfair, J., 1984).

II.3.2 MECANISMOS DE RESPUESTA INMUNE

II.3.2.1 Generalidades

Durante el curso de una infección viral se inducen mecanismos de respuesta adaptativos (específicos) e innatos (inespecíficos). En base a la información obtenida en infecciones virales naturales y experimentales en huéspedes susceptibles, la importancia de los distintos mecanismos varía de un virus a otro (Ogra,P. et al.1975).

La primera línea de defensa del sistema inmune luego de la invasión por patógenos es inmediata y se encuentra siempre presente en un animal normal. Es muy importante en los primeros días post-infección, pues en ese momento el sistema adaptativo todavía no se encuentra capacitado para responder con toda su potencialidad. Los principales componentes de este compartimiento son el sistema complemento, algunas interferones, las células con actividad NK y los fagocitos (macrófagos, polimorfonucleares).

El papel antiviral del interferón, ha sido demostrado para muchos virus y en gran cantidad de huéspedes. Por ejemplo, se ha demostrado que, una inyección de IFN alfa 1 recombinante (que es liberado por macrófagos) antes de una infección con Herpes virus bovino 1 en su huésped natural disminuye signifi-

cativamente la viremia (Babiuk,L. et al, 1985). Lo mismo ocurre con rhinovirus en humanos (Merigan,T. et al,1973).

El factor necrosante de tumores (TNF) alfa es otro producto de la activación de los macrófagos. En experimentos realizados con TNF recombinante, se ha demostrado que esta linfoquina previene la replicación viral e induce la destrucción de células infectadas por algunos virus como p.e., los herpesvirus (Mestan,J. et al,1986).

Se conoce que las sustancias solubles involucradas en la respuesta inmune actúan en forma sinérgica, p.e., la efectividad del TNF alfa y beta con el IFN gama, en ensayos in vitro, es 100 veces superior a la suma de ambos (Wong,G. et al,1986).

Desde la década pasada se conocen los efectos antitumorales y antivirales de la actividad celular NK, cuyo efector es el linfocito grande granular. Por ejemplo, se ha determinado que una disminución de la actividad NK produce un incremento en la susceptibilidad de bovinos al Herpes virus bovino 1 (Filion,I. et al,1983).

La fagocitosis fue la primera función inespecífica descrita a fines del siglo pasado por Metchnikoff (Fenner,F. et al, 1975). Esta actividad, que es ejercida por los macrófagos y granulocitos juegan un rol muy importante no sólo en la destrucción de microorganismos invasores, sino también en la quimiotaxis y activación de otras células del sistema inmune específico e

inespecífico (Neuveu, P., 1986).

El sistema Complemento que actúa en la destrucción de bacterias por la vía alterna o clásica (asociadas a anticuerpos), también puede lisar virus con envoltura o bien ayudar para la ingestión por fagocitos por opsonización de partículas como por ejemplo en el caso del virus de la diarrea viral bovina (Ritchie, A. et al, 1969).

Los linfocitos B y T y sus productos son los principales componentes del sistema inmune adaptativo. La relación entre ambos compartimientos, el innato y el adaptativo, es muy estrecha, tanto en la rama aferente (atrapamiento del antígeno), la central (colaboración celular) y la eferente (activación de los mecanismos de neutralización y citotoxicidad).

El principal mecanismo por el que los linfocitos incrementan la resistencia a una enfermedad es por activación y eficiencia del sistema inmune innato (Roth, J.A., 1986).

Este sistema requiere una o dos semanas para alcanzar el óptimo de respuesta luego de la primera exposición al antígeno. A diferencia del sistema innato, posee memoria inmune antigénica específica la que implica una respuesta secundaria más rápida y elevada contra el mismo inmunógeno.

El producto de la célula B efectora son los anticuerpos que juegan un papel muy importante en cualquier respuesta viral, ya sea mediante mecanismos de neutralización, agregación de

partículas, opsonización (Ogra,A. et al,1975), que constituye una marca para la posterior fagocitosis o para la lisis viral mediada por complemento (Oldstone,M. et al,1971). También intervienen modulando la respuesta inmune por enmascaramiento de los antígenos virales sobre células infectadas LCM) o, a través de la red idiotipo-antiidiotipo (Kholer,H. et al, 1985),etc. En el caso de virus que infectan macrófagos, estos pueden jugar un rol facilitador en la infección del fagocito como parece ocurrir en la infección con el virus del dengue (Rizvi,N. et al,1987).

Las células T cumplen un papel destacado en las infecciones virales ya sea como reguladoras o efectoras. Las células T colaboradoras, son, normalmente, el eje sobre el que se asienta la respuesta inmune (Paul,W,1984).

Uno de sus productos de mayor relevancia es la interleukina 2 (IL 2) que induce, entre otras funciones, la activación de la capacidad fagocítica de las células capaces de cumplir esta función. Por ejemplo, se ha demostrado que, la administración de IL2, aumenta la resistencia a la infección con HSV 1 (Rouse,B. et al,1985). En bovinos, experimentos in vitro, han demostrado que la IL 2 humana recombinante ejerce un efecto de activación sobre células mononucleares periféricas (Fong,S. et al,1986).

El interferón gama, otro de los productos de los T colaboradores, participa también en la regulación de la respuesta inmu-

ne, pero también se ha descrito actividad antiviral per sé (Kircher, et al,1986).

Las células T de hipersensibilidad tardía cumplen una función importante en respuestas locales (Liew,F. et al,1980) y reacciones inmunopatológicas (Bloom,B. et al,1975).

Las células T citotóxicas intervienen de manera destacada en las infecciones por virus que expresan proteínas en membrana celular y requieren que estas se encuentren en el contexto del CMH tipo I para lisar a la célula portadora (Zinkernagel,R. et al,1979). Para el virus influenza se demostró que las células T_c inducidas como producto de la infección en humanos poseen un espectro de acción mayor que los anticuerpos pues reconocen epitopes mas conservados, aunque la presencia de estas células se prolonga sólo por unas semanas luego de la infección en contraposición con los anticuerpos que pueden permanecer por años en niveles elevados (Anders,M. et al,1981).

Se podría argumentar que la respuesta inmune a los virus son tan numerosas como virus existen. Y por lo tanto, nuestro conocimiento actual, se remite a la acumulación de datos sobre distintos tipos de respuesta inmune a distintos tipos de virus en distintos sistemas naturales o experimentales.

En realidad, actualmente no disponemos de una hipótesis abarcativa que permita explicar las funciones que se ponen en juego cuando ocurre una infección viral en un animal y que

sirva de base teórica para la formulación de inmunógenos. Por este motivo, con estas condiciones, la fabricación de vacunas sigue siendo una cuestión empírica de ensayo y error.

El conocimiento de las funciones efectoras relevantes para lograr una sensibilización eficiente del sistema inmune frente a un antígeno viral, permitiría la formulación de vacunas capaces de activar específicamente los mecanismos adecuados para producir una inmunidad mas sólida y duradera (Roit, I. et al, 1985; Murdin, A., 1986).

II.3.2.2 Respuesta inmune de ratones a virus

El ratón ha sido utilizado como modelo experimental para el estudio de la respuesta inmune hacia muchos tipos de virus. Esto se debe al exhaustivo conocimiento que se posee sobre las poblaciones celulares de su sistema inmune y a la posibilidad que brinda la existencia de distintas cepas singeneicas y congeneicas de manipular sus células inmunocompetentes tanto in vitro como in vivo.

Por este motivo los mecanismos de respuesta inmune frente a muchos virus animales se han estudiado usando al ratón como animal de experimentación, y los conocimientos obtenidos sirvieron como punto de partida para estudiar los mecanismos de respuesta en el huésped natural.

II.3.2.2.1 Respuesta inespecífica

La mayoría de los virus son buenos productores de IFN, por ejemplo, el VSV, tanto activo como inactivado, induce la producción de altas cantidades de IFN cuando se inyecta en ratones (Marcus,P.et al, 1980). Además, se ha demostrado que ambos antígenos son mitógenos de células B de ratón, lo que también ocurre como consecuencia de la infección con influenza y HSV 1 (Goodman-Snitkof,G. et al, 1980).

Ratones tratados con anticuerpos anti-IFN, aumentaron su susceptibilidad a una infección posterior con HSV 1, estomatitis vesicular, influenza, Newcastle y virus del sarcoma de Mahoney (Gresser,I. et al,1976).

La producción de IFN, está correlacionada con el aumento de actividad NK en el ratón en muchas infecciones virales (López,C.,1975). Esta función inespecífica mediada por células es de capital importancia en la respuesta a virus, una disminución de la actividad NK produce un incremento en la susceptibilidad de ratones al virus de la hepatitis viral murina (Bukoski,J. et al,1983).

Durante la infección con el virus de la influenza, la presencia de niveles altos de IFN (Rodgers,B. et al,1981) como de células con actividad NK (Wyde,P. et al,1982) se correlaciona con un menor título viral en pulmones luego de la infección. Fenómeno también observado con el virus Cocksakie B3 (Picorna-

viridae) de donde esta función celular sería importante en la limpieza de este virus (Gonedy, E. et al, 1987). A la inversa, ratones C 57 B1 inmunodeprimidos no estuvieron protegidos frente a una infección viral con HSV 1 cuando recibieron células provenientes de la cepa Beige (NK-deficientes) pero estuvieron protegidos cuando recibieron células con Asialo GM1 positivas (marcador específico de células con actividad NK) (Rager-Zisman, B. et al, 1987).

La infección por HSV 1 de ratones previamente tratados con agentes que disminuyen la actividad fagocítica, induce un aumento de la mortalidad debido a la infección viral (Roger, S et al, 1983). La alteración de esta función deprime también la respuesta específica debido a la importancia de algunas de estas células en la presentación del antígeno a linfocitos T (Paul, W., 1984) y, en algunos casos, como con el virus Dengue, a linfocitos B (Rizvi, N. et al, 1987).

II.3.2.2.2 Infección

Si el virus logra transponer la barrera inespecífica, se produce la infección. El tropismo está relacionado con la vía de inoculación, la especie viral, el desarrollo ontogénico y el genoma del huésped.

Distintas cepas de una misma especie viral, inoculadas por la

misma vía, pueden presentar tropismo diferente. Por ejemplo, se demostró que dos cepas diferentes de Cocksakie B 3 tienen en un caso tropismo pancreático y en otro tropismo hacia sistema nervioso (Fields, B. et al, 1985).

Luego de la infección, si no lleva a la muerte del ratón, el virus puede ser definitivamente eliminado del huésped, como ocurre con el virus respiratorio sincicial (Cannon, M. et al, 1987), puede permanecer en estado de provirus, como en el caso del virus de la encefalitis japonesa (Mathur, et al, 1987) o persistir infectando al animal en forma crónica como por ejemplo el virus de la lactico dehidrogenasa o LCM (Porter, D., 1975).

La inmunidad conferida luego de la infección depende de la relación que se establezca entre el virus y el sistema inmune y dependerá de varios factores inherentes a ambos sistemas. Se considera que la inmunidad conferida por una infección aguda es duradera. Muchos datos, corroboran esta aseveración, por ejemplo, la inmunidad conferida por la infección con virus de la influenza es cualitativamente más importante que la conferida por la inmunización con vacuna inactivada y es posible detectar células B de memoria mucho tiempo luego de la infección (Jones, P. et al, 1987).

En virus latentes, se puede inducir la aparición de recidivas, como ocurre en los huéspedes naturales, inmunodeprimiendo a los ratones previamente infectados. Tal es el caso del

virus de la encefalitis japonesa (Mathur, 1987) o del HSV 1 (Racjeani, J. et al, 1977).

Los virus que permanecen infectando en forma crónica suelen producir inmunopatologías y tolerancia, como en el caso tan estudiado de LCM (Oldstone, M., 1971) o una respuesta inmune deficiente que impide la limpieza del patógeno como en el caso del virus de la encefalomielitis de Theiler (Lipton, H. et al, 1987).

II.3.2.2.3 Respuesta inmune específica

Se reconoce la importancia de los anticuerpos circulantes en la protección frente a una infección viral aunque, en general, estos no sean suficientes en impedirla. Por ejemplo, la transferencia pasiva de suero hiperinmune anti-HSV 1 produce algún grado de protección (Mc Kendal, R. et al, 1979) y es necesario que tengan el fragmento Fc lo que sugiere que el mecanismo de acción no es por neutralización, pero tampoco por lisis mediada por complemento (Oakes, J. et al, 1981).

En experimentos en los que se utilizó ratones atímicos como receptores de suero hiperinmune, si bien hubo una disminución de la diseminación del virus, éste nunca pudo ser eliminado del sitio de inyección. Por otro lado, en ratones depletados de células B, ocurre lo contrario (Kapoor, A. et al, 1982).

Aunque, luego de la infección el virus permanece en estado de latencia y el nivel de anticuerpos no juega ningún rol en la limitación de la reactivación que pudiera ocurrir (Rouse, B. et al, 1977).

La presencia de anticuerpos séricos, en la infección con virus de la influenza, previene la neumonía pero no impide la infección (Raphal, R. et al, 1979). La transferencia pasiva de anticuerpos a ratones atímicos, no produce la eliminación del virus (Mc Michael, A. et al, 1982). Los anticuerpos deben estar dirigidos contra las proteínas Hemaglutinina o Neuraminidasa (pertenecientes a la cubierta del virión), pues los dirigidos contra las proteínas de la matriz o de la nucleocápside no son protectores. Por el contrario, esto sí ocurre en ratones agamaglobulínicos, los que además quedan inmunes para un nuevo desafío, estos resultados sugieren un rol preponderante de la inmunidad T dependiente contra estos virus (Kris, R. et al, 1985).

De acuerdo a estos resultados, parecería ser que, tanto los anticuerpos séricos como el nivel de células T sensibilizadas son necesarios para la prevención contra una infección.

Sin embargo, la presencia de anticuerpos circulantes, puede aumentar la severidad de una infección viral. Tal el caso del virus respiratorio sincicial de humanos, y para el que es necesaria la presencia de células T₀ para su eliminación (Cannon, M. et al, 1987).

La vía de entrada juega un rol importante en la inmunidad específica a una infección viral en ratones. Se ha demostrado que, la cantidad de anticuerpos neutralizantes producida, en la infección con HSV 1, es máxima por la vía i.p. y alcanza su mayor índice de respuesta a los 21 dpi (Knoblich, A. et al, 1983).

La producción de anticuerpos juega un rol muy importante en la respuesta primaria a la infección con virus de la influenza, a los tres días p.i. ya es posible detectar células plasmáticas productoras de IgM e IgA, aunque el título máximo de anticuerpos inhibidores de la aglutinación se detecta recién a las tres o cuatro semanas p.i. (Yap, K. et al, 1979).

Para que haya una respuesta eficiente de anticuerpos, es necesario que haya una buena colaboración con células T_H ; en ratones Cepa C57 B1/6 depletados de subpoblaciones de células T, e infectados con VSV, se observó, que los tratados con α -L3T4 (un marcador específico de células T_H) in vivo no produjeron anticuerpos del tipo IgG y a diferencia de aquellos tratados con α -lyt 2⁺ (un marcador específico de células T_C) cuya respuesta en anticuerpos fue similar a la de los no tratados que sí los produjeron (Leist, T. et al, 1987).

Sin embargo, ratones atímicos infectados e.v. con VSV, produjeron una respuesta temprana T-independiente con alta producción de IgM similar a la producida por los eutímicos (Charan, S. et al, 1986). También se ha informado sobre respuesta con IgG a

la infección con virus Semliki-Forest en ratones atímicos aunque en menor cantidad que los controles eutímicos (Suckling,A. et al,1982).

La inmunidad mediada por células cumple un destacado papel en la respuesta a virus en los modelos experimentales en ratón. La actividad de células citotóxicas luego de la primoinfección con HSV 1 alcanza su máximo a los 8-9 dpi aunque decae luego rápidamente. En experimentos en los que se transfirieron células adoptivamente en receptores singeneicos, se demostró que para que haya una buena respuesta que limite la replicación en el sitio de infección, es necesario que se transfieran juntas células T_0 y T_{DTH} (Nash,A. et al,1980).

En el caso de influenza, el virus activo es mas eficiente en la inducción de respuestas del tipo de CML e hipersensibilidad retardada que el virus inactivado. Ambas respuestas se desarrollan en el contexto de los antígenos de histocompatibilidad de clase I. Además, la respuesta inducida por el virus inactivado es específica y la inducida por el virus activo es heterotípica (Leung,K. et al,1980). La administración de células T inmunes a receptores infectados disminuye los títulos virales en el pulmón (Yap,K. et al, 1979). La transferencia adoptiva de células T_0 (fenotipo $lyt\ 23^+$) produce el mismo efecto. Si se transfieren células de fenotipo L3T4 (marcador de células T_H y T_{DTH}) no sólo no hay reducción de los títulos virales, sino que aumenta la mortalidad de los receptores infectados, probablemente

por una inmunopatología (Leung,K. et al,1982).

Se han confirmado estos resultados en ratones infectados que recibieron un clon de linfocitos T_0 los que lograron inhibir la multiplicación de virus homólogo y heterólogo (Lightman,S.et al,1987).

Se ha comprobado que durante la inmunización también se producen células T_0 que son capaces de inhibir a las células T_{DTH} (Liew,F. et al,1983) y células $L3T4^+$ que colaboran con las células T efectoras y células B (Anders,M. et al, 1981; Russel, 1980).

La respuesta inmune al VSV también se postula que es típicamente T-dependiente (Zinkernagel,R. et al,1978) e involucra células T_0 con restricción para el antígeno de histocompatibilidad de clase II (Zinkernagel,R. et al,1979).

Estos resultados sugieren que, los linfocitos T juegan un rol muy importante en la limitación de la replicación para estos virus y, los anticuerpos actúan principalmente en la eliminación de la viremia, aunque necesitan de la colaboración T para la activación de los linfocitos B.

Los linfocitos T_0 intervienen en forma principal el caso de la mayoría de los virus con envoltura.

Cuando, ratones BALB/c son inyectados i.p. con Cocksackie B 3 producen linfocitos T efectoras restringidos para los alelos de clase I del CMH. Este hecho es novedoso ya que no se ha reportado que los picornavirus expresen antígenos en membrana

celular. Los mismos autores han informado que la actividad de citotoxicidad anticuerpo dependiente no es significativa para este virus en este modelo (Wong,C. et al,1983). El virus Cocksakie B3 parece tener un comportamiento diferente al de los demás picornavirus ya que se ha encontrado evidencia de una importante actividad NK en la eliminación del virus en ratones (Godeny,N et al,1987).

II.3.3 RESPUESTA INMUNE AL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA

La inoculación de inductores de IFN no protege a bovinos de un desafío viral posterior (Mc Vicar,W. et al,1973).

La respuesta serológica inducida luego de la infección o vacunación con VFA, está bien caracterizada en el bovino (Cowan,K.,1973 ;Meloan, R.,1979 a y b).

Sin embargo, la literatura existente con respecto a los mecanismos celulares involucradas en la respuesta inmune al VFA es muy limitada, tanto en bovinos (Wardley,R. et al,1979) como en animales de experimentación (Collen,T. et al,1984).

La escasa información que se posee con respecto al sistema inmune del bovino, hace difícil el estudio de los mecanismos de respuesta en esta especie (Fossum,C.,1984).

El cobayo ha sido utilizado clásicamente como animal para pruebas de vacunas ya que el VFA puede ser adaptado por pasajes sucesivos y produce luego de la inoculación intradermoplantar, una viremia junto con aparición en las cuatro patas de vesículas conteniendo virus similares a las que se producen en el bovino. Los anticuerpos aparecen a partir de los 2-3 dpi y entre los 8-16 días post-infección se produce el cambio IgM --> IgG (Cowan,K. et al, 1965).

Se ha demostrado que cobayos infectados con VFA tipo A por varias vías, inducen una respuesta tanto humoral como celular, medida esta última como hipersensibilidad retardada y producción de factor de inhibición de la migración de macrófagos (MIF) (Knudsen,R. et al,1979). En este modelo, la transferencia pasiva de suero inmune, es suficiente para prevenir la infección viral (Knudsen, R. et al,1983)

El ratón puede ser infectado i.p. con VFA (Subak-Sharpe,H. et al,1961). Ratones hembras inmunizadas por infección pueden transferir inmunidad pasiva via útero o leche a la prole, los que quedan protegidos frente a un desafío viral (Campbell,C., 1960).

En los ratones machos adultos, a las 24 hs p.i. por via i.p., se detecta la replicación viral, principalmente en el páncreas, seguida de una viremia que desaparece a las 24-48 hs sin manifestación clínica de la enfermedad (Campbell,C.,1960, Fernández,F. et al,1986). A partir del momento en que se

detecta un aumento significativo de anticuerpos neutralizantes (AN), se observa una rápida disminución del virus en sangre y órganos hasta su desaparición total. Esta relación entre AN y desaparición de la viremia se ve confirmada por la correlación entre el retraso en la aparición de AN y la prolongación de la viremia en animales irradiados previo a la infección; así como una rápida disminución de la viremia en animales irradiados y luego reconstituídos con células inmunocompetentes de ratones inmunizados con virus activo. (Borca, M. et al, 1985).

En este modelo murino experimental, la infección con VFA no parece inducir una típica respuesta inmune antiviral ya que se comporta como un antígeno timo independiente; esto fue demostrado mediante experimentos sobre ratones atímicos nu/nu en los que se observó una respuesta inmune similar, tanto en la duración de la viremia como en el tiempo de aparición y cantidad de anticuerpos neutralizantes, a la de los controles eutímicos nu/+. Utilizando células B y T purificadas, provenientes de donadores inmunizados con virus activo, para reconstituir animales irradiados e infectados experimentalmente, se observó que las células B purificadas son capaces de eliminar la infección, lo que demostraría que la respuesta secundaria también es timo independiente. (Borca, M. et al, 1987).

Sin embargo, experimentos realizados in vitro, con bazo de ratones de la cepa Pir bright inmunizados con VFA tipo A 12 formulado con adyuvante completo de Freund por la vía i.p.

demonstraron que el VFA no es mitogénico para linfocitos B. Y que la presencia de células adherentes es esencial para la respuesta anamnésica usando esta técnica (Collen,T. et al, 1984).

Mc Cullough y col. demostraron que anticuerpos monoclonales en concentraciones no neutralizantes in vitro, eran capaces de proteger a ratones lactantes transferidos pasivamente. Esta capacidad se eliminaba si los anticuerpos eran digeridos con pepsina (enzima que elimina el fragmento Fc). Estos experimentos refuerzan la hipótesis sobre la importancia de los anticuerpos opsonizantes en la eliminación del VFA in vivo (Mc Cullough,K. et al,1986).

III. MATERIALES Y METODOS

III.1 RATONES

Se utilizaron ratones lactantes y adultos de la cepa endocriada BALB-c/ de 60-90 días de edad, que provinieron del Bioterio de INTA-CASTELAR. Se utilizaron ratones NIH nu/nu (atímicos) y nu/+ (eutéimicos) de 60-90 días que fueron cedidos por la CNEA.

III.2 VIRUS

Se utilizó el subtipo D, Campos salvaje origen banco del CICV-INTA-CASTELAR. Este virus fue pasado 6 veces en células BHK 21, una vez en bovino y dos veces mas en células BHK 21.

III.3 CELULAS

Para la producción viral, se utilizaron células BHK 21, propagadas en monocapa (Mowat, G. et al, 1962) en frascos rotantes, con medio suplementado con 10% de triptosa fosfato y

10% de suero de ternero precipitado con polietilenglicol (PM=6000).

III.4 OBTENCION DE VIRUS

Las monocapas de células fueron lavadas con solución salina PBS pH 7.4, con la finalidad de eliminar el resto del suero. Se inoculó 0.1 ml. de VFA semilla (Título viral: $10^{6.0}$ DIRM 50%). Se adsorbió durante una hora a 37°C y luego se eliminó el virus remanente. Durante el desarrollo de la infección se utilizó medio MEM suplementado con 10% de triptosa fosfato, sin suero de ternero. La infección se dejó progresar durante la noche. Luego los frascos rotantes fueron congelados. Al día siguiente se descongelaron, se llevó el pH a 7.4 y se centrifugó a 4500 g durante 30 minutos a 4°C con el objeto de eliminar los restos celulares. Una alícuota se guardó para titular por Fijación de Complemento y otra para titular por infectividad en ratón lactante.

III.5 OBTENCION DE VIRUS INACTIVADO

a. Inactivación: Se utilizó bromuro de etilenimina (BEI) (Bahnmann, H., 1974). Brevemente se inoculó la suspensión viral

con BEI 0.1 M al 1%. Se mantuvo durante 24 hs. a 37°C en agitación permanente. El inactivante excedente se neutralizó con Tiosulfato de sodio 0.1 M al 1%. Se dejó reposar durante tres días a 4°C y luego se centrifugó por 30 minutos a 4°C a 4500 g. Del sobrenadante se extrajo una alícuota con el objeto de determinar el título por Fijación de Complemento luego de la inactivación y otra alícuota para inyectar a 100 ratones lactantes de 5-7 días para investigar posible presencia de virus infectivo residual.

El título viral antes de la inactivación fue siempre mayor a $10^{7.5}$ DIRM 50% y de 128 por fijación de complemento antes de la inactivación y de 64 después de esta.

b. Purificación: El virus inactivado se purificó por sembrado en colchón de sacarosa 30% y posteriormente se lo sometió a un gradiente de sacarosa 10-40% P/V. La masa vírica obtenida se midió por absorbancia a 259 mμ.

III.6 EXTRACCION DE SANGRE

Los ratones adultos fueron anestesiados con eter y luego sangrados por inserción de un capilar para hematocrito de 0.5 cm de largo en el seno retroorbital y la sangre fue recogida en un tubo de hemólisis heparinizado.

III.7 OBTENCION DE PLASMA

La sangre heparinizada se centrifugó por 5' minutos a 400 g a temperatura ambiente. El plasma sobrenadante se recogió con micropipeta y se guardó en tubos a -20° hasta el momento de su uso.

III.8 TITULACIONES

Las determinaciones de virus infectivo se realizaron por el metodo de la dilución al punto final, empleando como sustrato ratones lactantes (Reed, L. & Muench, H., 1937). Una vez inactivada la suspensión viral se tituló por la técnica de fijación de complemento al 50%. Esta técnica tambien se utilizó para tipificar y subtificar los ratones lactantes muertos por inoculación del virus aftoso.

a. De virus: se inocularon intramuscularmente ratones lactantes con diluciones en base 10 del virus puro para calcular la dosis letal 50% (Skinner, H., 1953).

b. De anticuerpos neutralizantes a-VEA: se determinó el indice neutralizante (I.N.) empleando el metodo de suero constante-virus variable (Cunha R.B. et al, 1957); se realizaron dilu-

ciones en base 10 de un stock de virus O₁ Campos de título conocido. Las diluciones de virus se mezclaron en partes iguales con plasma inactivado por 30 minutos a 56°C y diluido 1:5. La mezcla se incubó por una hora a 37°C y la reacción se detuvo por incubación a 4°C por media hora.

Los ratones lactantes de 5-7 días de edad fueron inyectados i.m. con 0.05 ml de esta mezcla de igual modo que para la titulación de virus. El IN se determinó por la fórmula:

$$IN = \text{Título viral} - \text{Título mezcla plasma virus.}$$

c.Fijación de complementos: Los ratones lactantes que murieron por efecto de la inoculación del virus, fueron tipificados y subtipificados. Se procedió a la maceración de la carcaza del animal (las muestras se procesaron individualmente), en una suspensión 1/5 con buffer barbital pH 7.6. Se añadió cloroformo para eliminar lípidos y se inactivó a 56°C, durante 30 minutos. Se centrifugó y el sobrenadante se enfrentó a sueros hiperinmunes de cobayos tipo O, A y C. La titulación del antígeno viral, antes y después de inactivarlo, se realizó haciendo diluciones aritméticas del mismo y enfrentándolas al suero homólogo hiperinmune en la dilución óptima. Tanto el complemento, como el suero hemolítico, fueron previamente titulados (Inst. Virol. INTA, 1984).

La fijación del complemento se evaluó al 50% de hemólisis.

frente a 4 unidades de complemento y 90 minutos de contacto a 37°C.

III.9 DETECCIÓN DE VIRUS INFECTIVO

La sangre extraída se diluyó 1:5 en PBS pH 7.4. Los demás órganos se maceraron con un homogenizador de tejidos con émbolo de teflón con 1 ml de PBS o por macerado entre los bordes esmerilados de dos portaobjetos sobre una cápsula de Petri de 3 cm de diámetro con 1 ml de PBS.

El líquido peritoneal se extrajo de la cavidad peritoneal, luego de haber inyectado en esta 3 ml de PBS con pipeta Pasteur. Se utilizó puro para las pruebas de detección viral. La presencia de virus infectivo en los líquidos y suspensiones celulares se investigó en dos sistemas sensibles al VFA:

a. Por inyección i.m. de 0.05 ml a ratones lactantes BALB/c de 5-7 días de edad. El efecto viral se determinó por letalidad, hasta los días post-inoculación con posterior confirmación con la técnica de Fijación de Complemento.

b. Por inoculación de 0.1 ml de la suspensión en células BHK 21 y observación de efecto citopático a las 48-72 hs. p.i..

III.10 DESAFIO VIRAL

Los ratones fueron inyectados via i.p. con 1 DIMRA 100% (que corresponden a 10⁶ DIRM 50%) de virus D, Campos. Al dia siguiente los ratones fueron sangrados y sacrificados. La sangre se diluyó 1:5 en PBS pH 7.2 Se observó el páncreas, se extrajo y se determinó la presencia de virus.

III.11 DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI-VIA

Se determinaron por la técnica de inmunofluorescencia indirecta, se sembraron portaobjetos con células BOTUR (sensibles al VFA) infectadas. Las células se fijaron con acetona a -20°C hasta el momento de su uso. Los sueros problema se incubaron con las células por 45 minutos a 37°C. se lavaron con PBS 0.01 M por 10 minutos y luego se agregó un suero anti-ratón acoplado a isotiocianato de fluoresceína. Luego de la incubación con el conjugado se observaron los preparados en un microscopio de fluorescencia.

III.12 INMUNIZACIONES

a. Con virus activo: se inyectaron los ratones adultos, via i.p., con 10^6 DISE. 50 % de la cepa viral O₁ Campos en 0.5 ml de buffer salino. En base a resultados anteriores los animales infectados con virus fueron considerados como inmunes a partir de la desaparición de la viremia (Berca, M. et al, 1984).

b. Con virus inactivado: Se inyectó 0.1 ug (salvo referencia en contrario) de virus O₁ Campos inactivado y purificado en suspensión en 0.5 ml de PBS via i.p.

c. Con glóbulos rojos de carnero: Se inyectaron 0.5 ml de una suspensión de glóbulos rojos de carnero al 5% en PBS i.p.

III.13 TITULACION DE SUERO HEMAGLUTINANTE

El plasma de los ratones, fue diluido 1:5 en buffer Barbital y enfrentado GRC al 2 % en diluciones de plasma de base 2. El titulo de anticuerpos hemaglutinantes se expresó como la última dilución de plasma que provocó hemaglutinación.

III.14 INMUNODEPRESION

a. Físicas: Los ratones adultos se irradiaron con una fuente de 800 kv. 14mA, perteneciente a la CNEA. La dosis utilizada fue de 600 rads por ratón que es la dosis letal 50% en nuestros ratones Balb-c/.

a. Químicas: Se utilizó ciclofosfamida (Endoxán, Labianca) y dexametasona (Merck, Sharp y Dome) en diferentes dosis (Sigel, M. et al, 1984).

III.15 COCULTIVO DE CELULAS

Ratones de 30 dpi, fueron sacrificados y sus órganos extraídos y macerados en presencia de PBS. Las células viables se detectaron por la técnica de exclusión con colorante azul trypan. Las células provenientes del macerado, se introdujeron en tubos con células BHK 21 y cultivo primario de tiroides bovino con medio de mantenimiento para efectuar un cocultivo celular.

Las células se observaron diariamente durante 72 hs. Al tercer día de cultivo, se congelaron.

Los cultivos se descongelaron, se centrifugaron a 4500 g por 30 minutos y el sobrenadante se inoculó en tubos de células BHK

El cultivo primario de tiroides bovino o se inyectaron en ratones lactantes. Se utilizaron cuatro tubos con células y seis ratones lactantes por muestra. El procedimiento se repitió dos veces.

III.16 OBTENCION DE SUERO ANTI-THY

Obtención de ascitis: El suero anti-thy 1.2 lítico, se obtuvo a partir de un cultivo de hibridoma productor de IgM. Se utilizó la técnica de Milstein y col. (Kholer, H & Milstein, C., 1974). Básicamente, se inyectaron 10^7 células del hibridoma i.p. a ratones que habían sido previamente inoculados por la misma vía con 0.2 ml de pristane (Sigma). El líquido ascítico que se recogió se congeló a -20°C .

Purificación: El líquido ascítico se purificó por precipitación con Sulfato de amonio al 50 % por dos veces. El precipitado, se dializó contra PBS pH 8 hasta la eliminación del Sulfato de amonio remanente. La pureza de la fracción obtenida se determinó por electroforesis y precipitación con un suero de conejo anti-suero de ratón.

Titulación: El suero purificado se tituló por la lisis producida en células de timo mediada por complemento. La lisis

celular se determinó por la técnica de exclusión con colorante azul trypan. El título que se expresa como la inversa de la antedúltima dilución que produjo lisis total fue $\times 100$.

III.17 CARACTERIZACION DE POBLACIONES CELULARES

La pureza de las poblaciones B y T enriquecidas fue determinada por inmunofluorescencia directa. Para células B se utilizó un suero anti-Ig de ratón (GIBCO) y para células T un suero monoclonal anti-thy (Miles-Yeda) ambos acoplados a isotiocianato de fluoresceína. Brevemente, 250 000 células, suspendidas en PBS pH 7.2 con 10 % de albúmina bovina (Sigma) y 0.15 % de azida sódica (FAA), se enfrentaron con igual volumen de una dilución 1:50 del suero en un volumen total de 100 μ l por dos horas a 4°C con agitación permanente. Luego se lavaron las células por centrifugación a 300 g por 5 minutos por cuatro veces y el último pellet se resuspendió en 0.2 ml de PAA. La suspensión celular se montó en un portaobjeto y se observó al microscopio con luz ultravioleta. Se contaron 200 células por muestra observadas por iluminación con luz visible y las fluorescentes correspondientes. La pureza se expresó como:

$$\% \text{ pureza} = \frac{\text{Células fluorescentes observadas}}{200} \times 100$$

III.18 SUSPENSIONES CELULARES.

a. Preparación de suspensiones celulares: los bazo fueron macerados entre dos portaobjetos con borde esmerilado y las células obtenidas resuspendidas en medio RPMI + 10% de suero fetal bovino (GIBCO,USA) y luego contadas en medio con azul trypan para determinar su viabilidad.

b. Purificación de células linfoides:

i. Obtención de células mononucleares: El macerado de bazo fue centrifugado por 5 minutos a 300 g y el pellet resuspendido en 1 ml de Cloruro de amonio 0.75 % pH 7.2 con el objeto de lizar células rojas, y se mantuvo en frío con agitación continua por 5 minutos. Luego se agregó igual volumen de medio RPMI con 10% de suero fetal bovino y las células mononucleares fueron lavadas dos veces por centrifugado a bajas revoluciones. Se obtuvo un promedio de 90×10^6 células blancas por bazo con una viabilidad superior al 98 %.

ii. Separación de células no adherentes: Un total de 90×10^6 células blancas de bazo fueron incubadas durante 1 hora a 37°C en una atmósfera con 5 % de CO_2 en un volumen de 5 ml en una cápsula de Petri (Mishel & Shiqti,1978). Luego de la incubación, se recogió el sobrenadante suavemente y se lavó una vez

por centrifugado a bajas revoluciones. Este procedimiento se repitió una vez. El rendimiento fue del 40%.

iii. Purificación de células B: Las células no adherentes fueron tratadas con suero monoclonal anti-thy lítico mas suero de cobayo como fuente de complemento e incubadas por 1/2 hora a 37°C. Se utilizó 10 µl del suero monoclonal puro por cada 10⁷ de células totales y enfrentando esta mezcla con volúmenes iguales de suero de cobayo 1:4. Este procedimiento fue repetido. Luego de cada tratamiento lítico, las células se lavaron a bajas revoluciones y luego del último centrifugado se contaron en presencia de azul trypan para determinar viabilidad. El rendimiento fue del 25%. Posteriormente las células fueron caracterizadas frente a sueros anti-Ig y anti-thy marcados con fluoresceína para determinar el grado de purificación. La contaminación con células thy⁺ fue siempre menor del 1% y la pureza de células Ig⁺ fue siempre mayor del 94 %.

iv. Purificación de células T: Las células T fueron purificadas por pasaje en columna de lana de nylon (Michel & Shigii, 1978) y el eluyente tratado con un suero de conejo anti-Ig de ratón lítico mas complemento de cobayo. Se utilizó 10 µl de este suero por cada 10⁷ células eluidas. El resto del tratamiento fue similar al descrito en el ítem iii. Se obtu-

vieron células thy⁺ en un porcentaje mayor al 95% y con una contaminación de células Ig⁺ siempre menor al 3%.

En la figura 1 se describen los pasos seguidos para la purificación de células linfoides.

En la figura 2 se ilustran, como ejemplo, microfotografías de células provenientes de macerado de bazo tratadas con suero anti-thy acoplado con isotiocianato de fluoresceína. Se trataron células antes y después de la purificación y se observaron con luz visible y luz ultravioleta con el objeto de determinar el porcentaje de pureza.

III.19 TRANSFERENCIA PASIVA

Para el estudio de la respuesta a la transferencia pasiva de anticuerpos, se llevaron a cabo dos protocolos:

Protocolo A (ítem 1.1.3.1): ratones inmunizados con virus activo o inactivado fueron sangrados a los 15 y 90 días p.i. los primeros y a los 15 días p.i. los segundos.

Los receptores normales vírgenes fueron inoculados por la vía i.p. con 1 ml de plasma, proveniente de los donadores inmunizados con virus activo, puro, 1/10, 1/50, 1/100 y 1/500 diluido en PBS pH 7.4. Los receptores de plasma proveniente de donadores

FIGURA 1

PURIFICACION DE CELULAS LINFOIDEAS

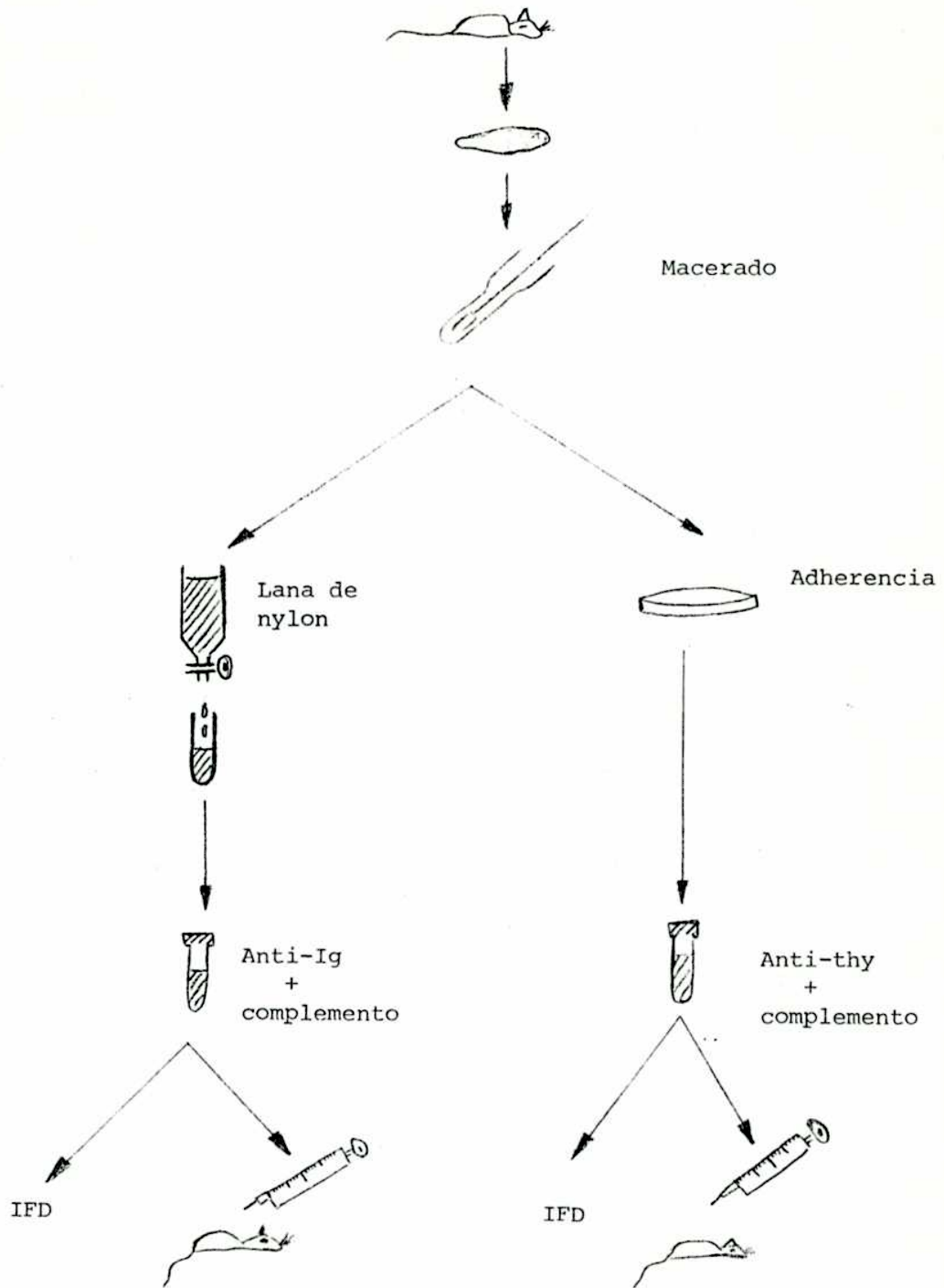
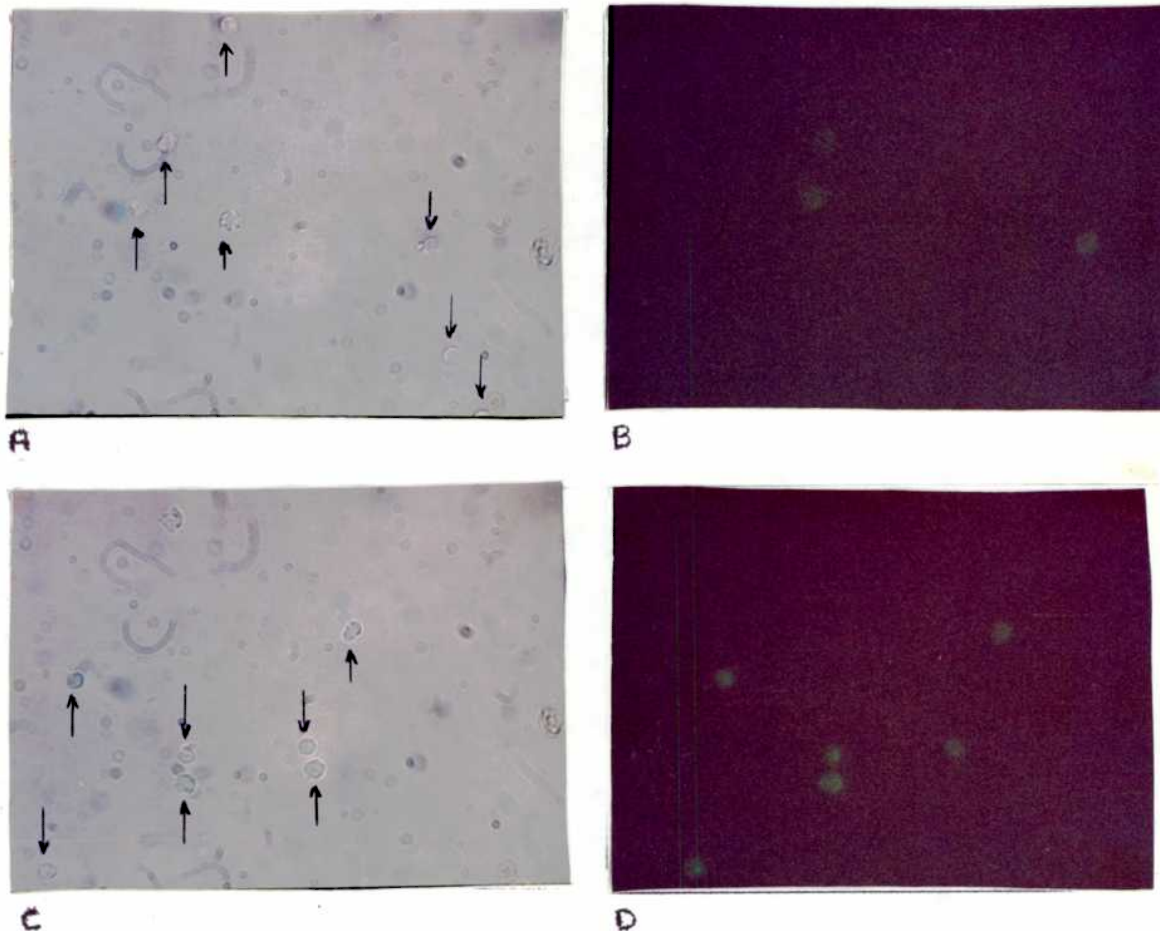


FIGURA 2

DETECCION DE POBLACIONES DE LINFOCITOS CON ANTISUEROS ESPECIFICOS



Con el objeto de determinar el grado de pureza luego de la separación de las células inmunocompetentes descripta en la figura 1, se trataron las células obtenidas con sueros anti-thy y anti-Ig de ratón acopladas con isotiocianato de fluoresceína. Se ilustra el resultado obtenido con el tratamiento con suero anti-Ig de ratón :

A. Células totales de bazo observadas con luz visible.
B. " " " " " " " " ultravioleta.
C. Células B purificadas observadas con luz visible.
D. " " " " " " " " ultravioleta.

inmunizados con virus inactivado fueron inyectados con 1 ml de plasma puro, 1/5 y 1/10.

Al día siguiente, se extrajeron 6 gotas a cada ratón de cada lote haciendo mezcla de seis ratones con el objeto de determinar el IN de los receptores en el momento de la descarga. Dos horas después de la sangría se desafiaron los receptores con 1 DIMRA 100% i.p.

Al día siguiente se extrajo sangre y páncreas para determinar la presencia de virus infeccioso en estos órganos.

Protocolo B (item 1.1.3.2): Se irradiaron ratones normales vírgenes con 1 DL 50%. Al día siguiente se infectaron con 1 DIMRA 100% con virus O₁ Campos. Al día siguiente se transfirió pasivamente 1 ml de suero inmune puro a-O₁ Campos obtenido de dadores inmunizados por infección de adultos singeneicos 15 o 90 días antes.

A las 24 y 48 horas post-transferencia, se sangraron los receptores y se extrajeron sus páncreas para investigar virus infeccioso.

En ambos casos también se inyectó a cada réplica de lote, 50 mg de Silica gel (Nutritional Biochemical Corporation) por la vía i.p. dos horas antes de la infección en el protocolo A y dos horas antes de la transferencia pasiva para el protocolo B.

III.20 TRANSFERENCIA ADOPTIVA

Las células inmunocompetentes provenientes de dadores previamente inmunizados y de controles vírgenes se transfirieron por inoculación i.p. a los animales receptores.

III.21 RECONSTITUCION DE ANIMALES IRRADIADOS

Ratones BALB/c fueron irradiados y luego desafiados y reconstituidos con células de bazo totales o purificadas provenientes de animales inmunizados o vírgenes como controles. Se llevaron a cabo dos protocolos:

Protocolo 1: Ratones BALB/c de dos a tres meses de edad fueron irradiados con 1 DL 50%. Al día siguientes fueron infectados via i.p. con 1 DIMRA. Y 24 hs despues fueron transferidos con 10^7 células totales o purificadas provenientes de bazo de dadores singeneicos previamente inmunizados o vírgenes utilizados como control.

Protocolo 2: Los receptores fueron irradiados, 24 hs despues transferidos con 10^7 células totales o purificadas provenientes de bazo de animales inmunizados y al día siguientes infectados con 1 DIMRA.

En resumen:

| | -----Dia -1 | Dia 0 | Dia 1 | Dia 2 |
|-------------|-------------|--------|---------|---------|
| Protocolo 1 | --- | Irrad. | Infec. | Transf. |
| Protocolo 2 | | Irrad. | Transf. | Infec. |

III.22 ESTADISTICA

Con el objeto de determinar la existencia de diferencias significativas entre los distintos lotes se utilizó análisis de la varianza o test de Student.

IV.RESULTADOS

IV.1 DETERMINACION DE LA CAPACIDAD INMUNIZANTE DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA ACTIVO E INACTIVADO.

IV.1.1 DETERMINACION DE LA RELACION ENTRE EL INDICE NEUTRALIZANTE Y PROTECCION

Tanto en el bovino como en el cobayo, se ha demostrado que existe una relación entre el título de anticuerpos neutralizantes y la protección frente a la descarga con el virus homólogo.

Fue de nuestro interés comprobar si en el modelo murino experimental se determina una relación similar entre los títulos de anticuerpos (medidos como IN) inducidos por el virus activo y el virus inactivado y la protección frente al desafío con el virus homólogo.

Con este fin se diseñaron experimentos de descarga viral a ratones inmunizados con ambos inmunógenos o transferidos pasivamente con anticuerpos inducidos en ratones normales.

IV.1.1.1 Desafío a ratones inmunizados con virus activo

En la tabla 1 se observan los resultados obtenidos luego del desafío a ratones convalescientes. Estos demuestran que en todos los casos los ratones inmunizados por infección experimental se encontraban protegidos frente a un desafío viral con el virus homólogo. Los IN promedio de los ratones desafiados fueron > 4.00 , con un valor mínimo de 3.50.

En la tabla 2 se observan la respuesta en anticuerpos neutralizantes medida como IN de un grupo de ratones cuyos niveles de anticuerpos fueron medidos 7 días post-descarga. Ratones con $IN < 4.15$ respondieron con producción de anticuerpos al desafío en forma significativa ($p < 0.05$).

IV.1.1.2 Desafío a ratones inmunizados con virus inactivado

En la tabla 1 también se observan los resultados correspondientes al desafío de ratones inmunizados con 0.1 μ g de virus O₁ Campos inactivado y purificado.

Ratones cuyos IN, en el momento de la descarga, fueron superiores a 1.60 (50 dpi) resistieron el desafío viral. Mientras que ratones cuyos IN fueron inferiores a este valor resultaron infectados (2 y 75 días post-inmunización).

TABLA 1

DESAFIO A RATONES BALB/c INMUNIZADOS

| Dias p.i. | I.N. | Inmun.* | Determinación de virus# | | a- VIA |
|-----------|------|---------|-------------------------|-----------|--------|
| | | | en páncreas | en sangre | |
| 7 | 4.30 | VA | - | - | - - |
| 27 | 4.20 | VA | - | - | - - |
| 50 | 4.15 | VA | - | - | - - |
| 75 | 4.20 | VA | - | - | - - |
| 150 | 4.00 | VA | - | - | - - |
| 210 | 4.10 | VA | - | - | - - |
| 300 | 4.30 | VA | - | - | - - |
| 420 | 4.10 | VA | - | - | - - |
| 470 | 4.30 | VA | - | - | - - |
| --- | 0.50 | -- | 7.50 | 7.00 | + + |
| 2 | 1.00 | VI | 7.20 | 6.80 | + + |
| 8 | 2.60 | VI | - | - | - - |
| 27 | 2.40 | VI | - | - | - - |
| 50 | 1.90 | VI | - | - | - - |
| 75 | 0.68 | VI | 7.80 | 6.90 | + + |

Ratones BALB/c fueron inmunizados via i.p. con virus activo (VA) o 0.1 ug de virus inactivado purificado (VI). A distintos dias p.i. tres ratones fueron sangrados para determinar su I.N. (se expresa el promedio) y cuatro fueron desafiados.

*: inmunógeno. #: Se expresa el título viral en páncreas y sangre. En los casos en que se detectó virus infectivo en páncreas siempre hubo correlación positiva con la observación clínica y la detección de anticuerpos anti-VIA 15 dias post-desafío.

TABLA 2

EFFECTO DE LA REINOCULACION DE ANIMALES REINFECTADOS

| Exp. Nº | d.p.i. | <u>Indice neutralizante</u> | | Diferencia |
|---------|--------|-----------------------------|------|------------|
| | | -7 | +7 | |
| 1 | 58 | 3.81 | 4.30 | 0.49 |
| 2 | 58 | 4.15 | 4.81 | 0.56 |
| 3 | 68 | 3.68 | 4.68 | 1.00 |
| 4 | 68 | 4.84 | 5.08 | 0.24 |
| 5 | 210 | 4.95 | 4.95 | 0.00 |
| 6 | 210 | 3.55 | 4.95 | 1.40 |
| 7 | 300 | 4.35 | 4.55 | 0.20 |
| control | 68 | 3.84 | 3.68 | 0.00 |
| control | 68 | 3.84 | 3.68 | 0.00 |

Ratones BALB/c fueron infectados con 1 DIMRA 100 %. A distintos días post-infección (d.p.i), fueron descargados i.p. con la misma dosis del virus homólogo (día 0). En ningún caso se detectó viremia a las 24 hs post-descarga. Se ilustran los IN de cada ratón 7 días antes del desafío (-7) y 7 días después del mismo (+7).

En el grupo de animales con IN predescarga menor que 4.15 (1,2,3 y 6) se detectó un aumento significativo del IN a la semana post-descarga (p,0.05). En el grupo de animales con IN . 4.15 antes del desafío no se registró un aumento significativo con respecto al IN a la semana post-descarga (p, 0.05). Control: ratones previamente inmunizados que no fueron desafiados.

IV.1.1.3 Desafío a ratones inmunizados por transferencia pasiva

Con el objeto de determinar la acción de los anticuerpos a-O, Campos in vivo en distintas concentraciones en sangre, se diseñaron experimentos de transferencia pasiva a receptores normales e inmunodeprimidos.

IV.1.1.3.1 Dosis respuesta en la protección al desafío viral

En la tabla 3 se observa que los ratones inoculados con diluciones de plasma de convalescientes o de inmunizados con virus inactivado tales que, el IN de los receptores 24 hs post-transferencia es de $IN > 1.50$, resisten el desafío. Por el contrario, los receptores cuyos IN son menores a este valor, no se encuentran protegidos.

Los ratones irradiados 24 horas antes de la transferencia pasiva, también estuvieron protegidos frente a la descarga cuando el IN de sus plasmas, producto de la transferencia pasiva, era $IN > 1.50$. Pero, ratones tratados con sílica dos horas antes de la descarga, no estuvieron protegidos cuando el título de anticuerpos neutralizantes era $IN = 1.50$.

TABLA 3

DOSIS RESPUESTA EN LA RESISTENCIA AL DESAFIO DE RATONES
NORMALES INMUNIZADOS POR TRANSFERENCIA PASIVA

| Receptor | IN receptor | <u>Determinación de virus en</u> | |
|--------------|-------------|----------------------------------|----------|
| | | Sangre | Páncreas |
| Normal | > 2 | 0/12 | 0/12 |
| | 1.50 | 1/12 | 1/12 |
| | 1 | 11/12 | 11/12 |
| Irradiado a. | > 2 | 0/12 | 0/12 |
| | 1.50 | 2/12 | 2/12 |
| | 1 | 12/12 | 12/12 |
| Irradiado b. | > 2 | 0/12 | 0/12 |
| | 1.50 | 10/12 | 10/12 |
| | 1 | 12/12 | 12/12 |

Ratones BALB/c fueron transferidos con plasma proveniente de dadores singeneicos inmunizados con virus activo (15 y 90 dpi), o virus inactivado (15 dpi). El plasma fue diluido en PBS con el objeto de conseguir distintas concentraciones de anticuerpos neutralizantes en los receptores. Al dia siguiente se les extrajo sangre para determinar su IN y 2 horas despues fueron desafiados; 24 hs. despues se extrajo sangre y páncreas para buscar virus.

a: ratones irradiados con 1 Dosis letal 50% un dia antes de la transferencia de anticuerpos.

b: ratones irradiados con 1 Dosis letal 50% un dia antes de la transferencia de anticuerpos y que fueron inoculados con 50 mg. sílica gel 2 hs. antes del desafío viral.

IV.1.1.3.3 Eliminación de la viremia

En la tabla 4, se observa que, ratones inmunodeprimidos que 24 hs post-infección recibieron suero anti-O₁, eliminaron la viremia en el día 1 p.i., aunque se encontró virus en páncreas hasta los tres días post-infección, mientras que los controles inmunodeprimidos transferidos con suero proveniente de ratones no inmunes, eliminaron la viremia el día 12 p.i. de igual forma que los ratones inmunodeprimidos infectados. Ratones inmunodeprimidos y transferidos, pero con su sistema de macrófagos deprimido por la inyección de sílica, también eliminaron la viremia el día 1 post-infección.

Los resultados obtenidos en esta serie de experimentos, indicaron que el IN es un parámetro inmunológico válido relacionado con la protección en el modelo murino experimental.

TABLA 4

ELIMINACION DE LA VIREMIA

| Lote | IN 24 hs post- transferencia | Viremia | Virus en páncreas |
|------|---------------------------------|---------|-------------------|
| I | < 1 | 12 dpi | > 2 dpi |
| II | > 4 | 1 dpi | 2 dpi |
| III | > 4 | 1 dpi | 2 dpi |

Se irradiaron 6 ratones por grupo con 1 Dosis letal 50 %. Al día siguiente fueron inyectados por la vía i.p. con 1 DIMRA 100 %.

Al día siguiente se transfirieron los receptores:

El lote I recibió 1 ml de plasma proveniente de dadores no inmunizados.

Los lotes II y III recibieron 1 ml de plasma de animales inmunizados 30 días antes con virus activo. El lote III fue inoculado con 50 mg de sílica gel 2 horas antes de recibir el plasma inmune.

Al día siguiente los ratones fueron sangrados y sus respectivos páncreas extraídos para detectar presencia viral.

IV.1.2 DETERMINACION DE LA DURACION DE LA INMUNIDAD LUEGO DE LA INMUNIZACION CON VIRUS ACTIVO E INACTIVADO.

Los bovinos infectados presentan una prolongada duración de inmunidad medida como título de anticuerpos neutralizantes y protección frente a la descarga con el virus homólogo (Cunliffe,H,1964; Sadir,A. et al,1988). Pero animales vacunados presentan una duración de inmunidad corta (INTA-PIADC, 1977). Se estudió la duración de inmunidad frente a ambos inmunógenos en el MME con el objeto de determinar si existían diferencias en cuanto a persistencia de inmunidad frente a ambos.

IV.1.2.1 Duración de la inmunidad en ratones inmunizados con virus activo.

IV.1.2.1.1 Cinética de anticuerpos neutralizantes luego de la infección.

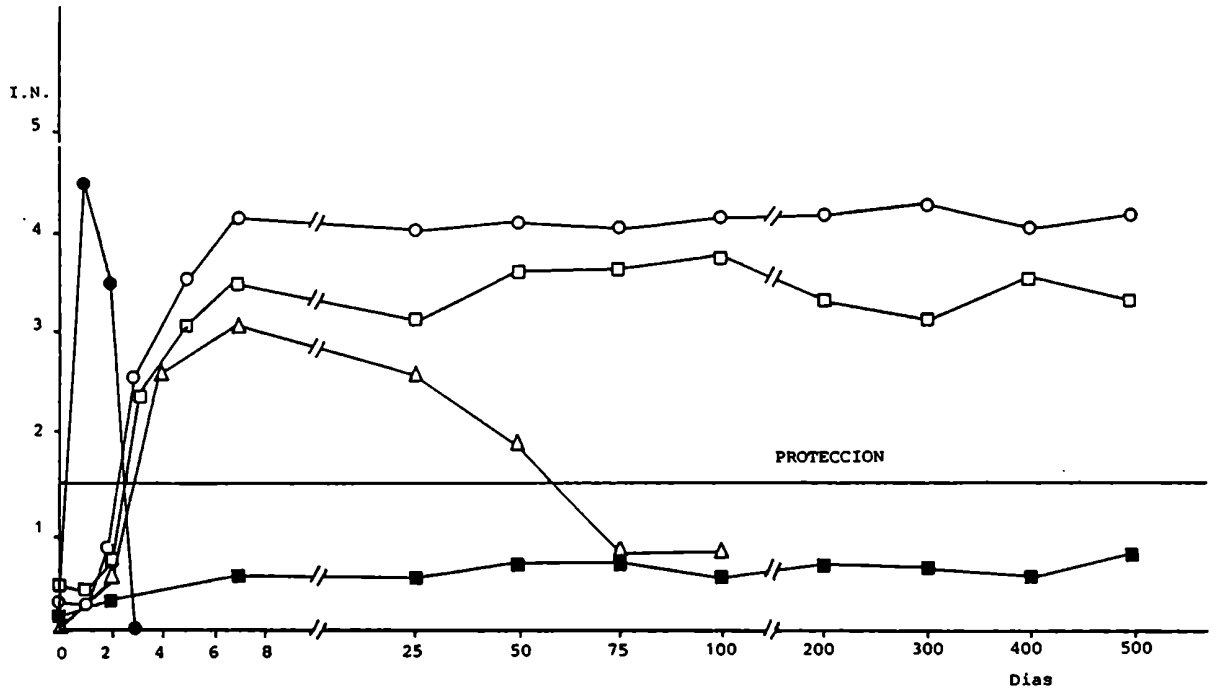
En la figura 3 se ilustra la cinética de los anticuerpos neutralizantes, expresados como IN en ratones BALB/c previamente infectados con una DIMRA 100% de virus O1 Cs via i.p.

Los anticuerpos se mantuvieron en niveles superiores a $IN=3.50$ a lo largo de toda la vida de los ratones.

En todos los casos los animales se encontraban protegidos

FIGURA 3

CINETICA DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES ANTI-O EN RATONES BALB/c



Ratones BALB/c fueron infectados el día 0. Se determinó el título viral en sangre (●) y el IN a lo largo del tiempo (○). El día 0 se inmunizó otro lote de ratones con 0.1 ug (▲) y 10 ug (◻) del virus homólogo inactivado y purificado. También se midió el IN a lo largo del tiempo de ratones inyectados con PBS como control (■). Cada punto corresponde al promedio de tres animales.

frente a una descarga viral con el virus homólogo (ver ítem IV.1.1.1).

En la figura 4 se observa la respuesta, medida en anticuerpos neutralizantes, de ratones atímicos (nu/nu) y eutímicos (nu/+), luego de la infección con 1 DIMRA 100% de virus O₁ Campos por vía i.p.

En los primeros días p.i. el IN fue similar para ambos, pero a partir de los 15 dpi se observó una marcada disminución del nivel de los anticuerpos en los atímicos. Por el contrario, los eutímicos permanecieron con niveles altos de anticuerpos neutralizantes a lo largo de todo el experimento. Sin embargo a los 240 dpi los ratones nu/nu con un índice neutralizante promedio de IN = 1.60 también se encontraban protegidos frente a una nueva descarga viral.

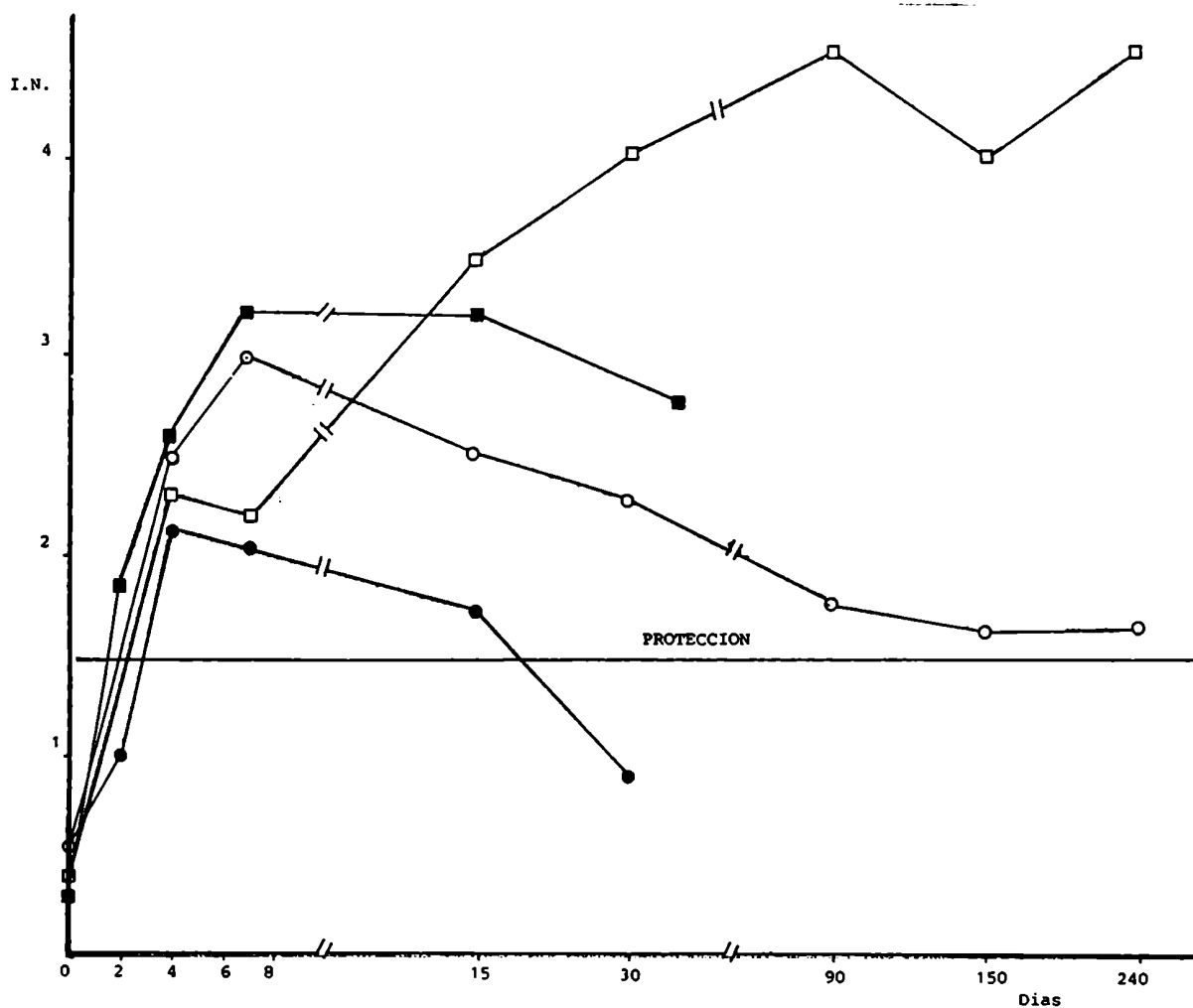
La duración de la viremia luego de la infección fue similar para ambos grupos.

En la tabla 5 se ilustra la respuesta del mismo lote de ratones al inmunógeno GRC inyectado al 5% en suspensión salina vía i.p., utilizado como control de antígeno timodependiente. Los ratones eutímicos reaccionaron frente al inmunógeno en forma similar a los BALB/c. Por el contrario, en los ratones atímicos, este inmunógeno induce una respuesta pasajera.

Los bazoos de los ratones sacrificados a lo largo de todo el

FIGURA 4

CINETICA DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES ANTI-O EN RATONES ATIMICOS INMUNIZADOS CON VIRUS ACTIVO E INACTIVADO



Ratones NIH atímicos (○) y eutímicos (□) fueron infectados por la vía i.p. Al mismo tiempo se inmunizaron con virus inactivado por la misma vía otros lotes de atímicos (●) y eutímicos (■). A distintos tiempos post-inmunización se sangraron a blanco dos ratones de cada lote para medir el IN. En el mismo momento, dos ratones de cada lote fueron desafiados con el virus homólogo. Al día siguiente se buscó virus en sangre y páncreas. Los ratones se mantuvieron en condiciones asepticas a lo largo de todo el experimento.

TABLA 5

REPUESTA DE RATONES ATIMICOS A LA INMUNIZACION CON CLOBULOS
ROJOS DE CARNERO

| Dias p.i. | <u>Título de anticuerpos hemaglutinantes</u> | | | | | | |
|-----------|--|---|-------------|------|---------------|-----|--|
| | <u>nu/nu</u> | | <u>nu/+</u> | | <u>BALB/c</u> | | |
| 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | |
| 4 | 8 | 8 | 32 | 64 | 64 | 64 | |
| 7 | 8 | 4 | 512 | 1028 | 512 | 512 | |
| 30 | 0 | 0 | 512 | 1028 | 1028 | 512 | |

Ratones NIH atímicos (nu/nu) y eutímicos (nu/+) y BALB/c fueron inmunizados via i.p. con GRC. A distintos tiempos p.i. se sangraron a blanco y se midieron los anticuerpos hemaglutinantes inducidos.

experimento fueron macerados y examinados con anticuerpo monoclonal a-thy acoplado con fluoresceína en busca de células T. El nivel de células thy + en bazo, fue de 40 % en los eutímicos y no se detectaron células thy + en los atímicos por inmunofluorescencia directa.

IV.1.2.1.1.2 Persistencia de la capacidad de transferir inmunidad adoptiva a receptores irradiados.

Se estudió la persistencia de la capacidad de transferir memoria adoptivamente a receptores singeneicos inmunodeprimidos por irradiación con células totales de bazo provenientes de animales convalescientes a varios tiempos p.i.

Se utilizaron dos protocolos para el estudio de la memoria inmune (ítem III.20).

La respuesta anamnésica transferida se midió por eliminación de la viremia (protocolo 1) o protección frente a la descarga (protocolo 2) y por la producción de anticuerpos neutralizantes en los receptores.

Los dadores fueron inmunizados por infección con 1 DIMRA 100% a distintos tiempos antes de la reconstitución. Como controles negativos se utilizaron dadores de la misma edad que los anteriores inyectados con PBS.

En la tabla 6 se observa un resumen de estos experimentos realizados con el protocolo 1. Ratonés infectados pero no transferidos con células presentan una viremia que se prolonga hasta el día 12 p.i. Receptores de células normales también presentan una viremia que se extiende hasta el 12 dpi. Los receptores de células provenientes de dadores singeneicos inmunes de hasta 500 días post-infección (máximo de vida de nuestros ratones) son capaces de eliminar la viremia a los 5 dpi y producir anticuerpos neutralizantes, de igual modo que las células provenientes de dadores inmunizados 8 días post-infección.

En la tabla 7 se describen los resultados obtenidos con el protocolo 2. Los receptores de células provenientes de dadores de por lo menos 135 dpi están protegidos frente a la descarga, y desarrollan una respuesta secundaria medida como producción de anticuerpos neutralizantes.

Estos resultados indicaron que en el modelo murino experimental, la respuesta inmune al virus activo, medida como producción de anticuerpos neutralizantes y protección frente a la descarga viral, es de larga duración, aun cuando los animales infectados son timodeficientes.

TABLA 6

RECONSTITUCION CON CELULAS TOTALES DE BAZO PROVENIENTES DE
DADORES CONVALESCIENTES A RECEPTORES IRRADIADOS (PROTOC. 1).

| Dias p.i. (*) | 1 | 4 | Viremia d.p.i. | | | | |
|------------------|---|---|----------------|---|----------|---|----|
| | | | 5 | 6 | (#) | 9 | 12 |
| 8 (4.20) | + | + | - | - | (2.50) a | - | - |
| 135 (4.30) | + | + | - | - | (2.50) b | - | - |
| 500 (4.00) | + | + | - | - | (2.90) c | - | - |
| --- | + | + | + | + | (0.40) d | + | + |
| N I (0.70) | + | + | + | + | (0.30) e | + | + |

Ratones BALB/c fueron infectados. A distintos dias p.i. se sangraron seis dadores a blanco haciendo pool con sus plasmas para determinar el I.N. (*). 10^7 células totales de bazo fueron transferidas a receptores irradiados según protocolo 1. Como controles se utilizaron ratones no transferidos (---) o transferidos con células totales de bazo provenientes de dadores no inmunizados (N I). A distintos dias p.i. se sangraron tres receptores por lote y la sangre de cada uno se inyectó en ratón lactante para determinar la presencia de virus infectivo. (+): virus infectivo presente. (-): virus infectivo ausente. (#): I.N. promedio de tres receptores.
 Diferencias entre a, b y c no significativas ($p < 0.01$).
 Diferencias entre d y e no significativas ($p < 0.01$).
 Diferencias entre a+b+c y d+e significativas ($p < 0.01$).

TABLA 7

RECONSTITUCION CON CELULAS TOTALES DE BAZO PROVENIENTES DE
DADORES CONVALESCIENTES A RECEPTORES INMUNODEPRIMIDOS
(PROT.C.2)

| Dias p.i. | (*) | <u>Viremia dias p.i.</u> | | |
|-----------|--------|--------------------------|------------|----|
| | | 1 (#) | 6 (#) | 12 |
| B | (4.20) | - (0.56) | - (1.10) a | - |
| 135 | (4.00) | - (0.40) | - (1.60) b | - |
| --- | | + (0.45) | - (0.36) c | + |
| N I | (0.60) | + (0.30) | + (0.40) d | + |

Ratones BALB/c fueron infectados. A distintos dias p.i. se sangraron seis dadores a blanco haciendo pool con sus plasmas para determinar el I.N. (*). 10⁷ células totales de bazo fueron transferidas a receptores irradiados según protocolo 2. Como controles se utilizaron ratones no transferidos (---) o transferidos con células totales de bazo provenientes de dadores no inmunizados (N I). A distintos dias p.i. se sangraron tres receptores por lote y la sangre de cada uno se inyectó en ratón lactante para determinar la presencia de virus infectivo.. (+): virus infectivo presente. (-): virus infectivo ausente. (#): I.N. promedio de tres receptores.

Diferencias entre a y b no significativas (p<0.01).
Diferencias entre c y d no significativas (p<0.01).
Diferencias entre a+b y c+d significativas (p<0.01).

IV.1.2.2 Duración de la inmunidad en ratones inmunizados con virus inactivado

IV.1.2.2.1 Cinética de anticuerpos neutralizantes luego de la inmunización con virus inactivado.

En la figura 3 se ilustra la duración de la inmunidad de ratones inmunizados por la vía i.p. con 0.1 ug de VI homólogo purificado en suspensión salina.

A diferencia de lo que ocurre con los ratones convalescientes a los 75 días el IN cae a niveles similares a los encontrados en ratones no inmunizados.

Durante el tiempo en que el IN se mantuvo con niveles superiores a los de los no inmunizados, los animales estaban protegidos frente a un desafío viral con el virus homólogo (ver ítem IV.1.1.2).

Como se observa en la misma figura, cuando el nivel de anticuerpos neutralizantes es menor a $IN=1.60$, los ratones se infectaron al ser descargados con el virus homólogo.

En esta figura, se ilustra también la cinética de anticuerpos $\alpha-O_1$ Campos inducidos por la inyección i.p. con 10 μ g de virus inactivado y purificado (una cantidad 30 veces superior a la que se inocula en bovinos en vacunas con adyuvantes), la duración de la inmunidad es prolongada y los ratones se encuentran protegidos frente a un desafío viral per vitam.

Para estudiar la respuesta a la inmunización con VI en ratones atímicos se inyectó 0.1 µg de virus purificado 01 Cs via i.p.

Como control de antígeno timodependiente se utilizó GRC por la misma via.

En la figura 4 se observa que los ratones eutímicos producen una respuesta similar a los ratones BALB/c (fig 3) y los atímicos tuvieron un nivel de respuesta muy inferior tanto en su IN ($p < 0.01$) como en su tiempo de duración

La respuesta en el tiempo de anticuerpos hemoaglutinantes fue similar a la que se muestra en la tabla 5 para ambos tipos de animales.

IV.1.2.2.2 Persistencia de la capacidad de transferir inmunidad adoptiva a receptores irradiados.

Se estudió la capacidad de células provenientes de dadores inmunizados con 0.1 µg de virus inactivado purificado para transferir inmunidad a receptores singeneicos irradiados. Se utilizaron dadores de 8 días post-inmunización y distintas cantidades de células totales de bazo.

En la tabla 8 se describen los resultados de este experimento llevado a cabo con el protocolo 2. En todos los casos los receptores estuvieron protegidos y no hubo diferencias en la

TABLA B

DOSIS RESPUESTA EN LA RECONSTITUCION CON CELULAS PROVENIENTES
DE RATONES INMUNIZADOS CON VIRUS INACTIVADO A RECEPTORES
INMUNODEPRIMIDOS (PROTOCOLO 2).

| Inm. | Nº de cél. (*) | <u>Viremia dias post-infección</u> | | | | |
|------|---------------------------|------------------------------------|----------|----------|-----|-----------|
| | | 1 | 2 | 6 | 12 | |
| | | | (#) | (#) | (#) | (#) |
| VI | 10 ⁷ (2.40) | - | - (0.60) | - (1.50) | a | - (ND) |
| VI | 5x10 ⁷ (2.40) | - | - (0.20) | - (2.38) | b | - (ND) |
| VI | 10x10 ⁷ (2.40) | - | - (0.84) | - (2.40) | c | - (ND) |
| NI | 10 ⁷ (0.60) | + | + | (0.64) | d | + |
| NI | 5x10 ⁷ (0.60) | + | + | (0.40) | e | - (1.74)h |
| VA | 10 ⁷ (3.80) | - | - (0.86) | - (1.38) | f | - (ND) |
| VA | 5x10 ⁷ (3.80) | - | - (0.60) | - (2.26) | g | - (2.50)i |
| -- | ----- | | + | (ND) | + | (ND) |
| | | | | | | + |
| | | | | | | (0.50)j |

Ratones BALB/c fueron inmunizados con virus activo (VA) o virus inactivado (VI). Ocho dias p.i. se sangraron mezclando sus plasmas y luego se sacrificaron. Sus células totales de bazo fueron transferidas a receptores irradiados según protocolo 2 (*): I.N. de los dadores. (#): I.N. promedio de tres receptores. NI: dadores vírgenes.

No hay diferencias significativas (p<0.01) entre los grupos a, f, y h; b,c,g e i y d,e y j. Pero si hay diferencias significativas (p<0.01) entre los tres grupos.

protección al desafío con las tres cantidades de células inyectadas. En los lotes transferidos con células provenientes de dadores inmunizados. Se observa inducción de anticuerpos neutralizantes. La producción de anticuerpos, se correlaciona con la cantidad de células transferidas. A los 12 d.p.i., no se observa viremia en los receptores de 5×10^7 de células provenientes de animales no inmunizados y la protección está correlacionada con un aumento en el IN a diferencia de los receptores de 10^7 células normales que no fueron protegidos frente a la descarga.

Se estudió la persistencia de la capacidad de transferir inmunidad de animales inmunizados con virus inactivado a receptores singeneicos en distintas tiempos post-inmunización. En la tabla 9 se observa que cuando el IN de los dadores corresponde a índices protectores, hay respuesta anamnésica detectada por eliminación de la viremia y aumento en el IN. A los 75 dpi, que es el momento en que el IN de los dadores disminuye a valores similares a los encontrados en ratones normales, no hay protección ni respuesta secundaria en los receptores irradiados.

Estos resultados indicaron que, en la dosis utilizada en nuestro modelo, la respuesta inmune es de corta duración, pero la duración de inmunidad se puede incrementar aumentando 100 veces la dosis inoculada.

TABLA 9

RECONSTITUCION CON CELULAS PROVENIENTES DE RATONES INMUNIZADOS
CON VIRUS INACTIVADO A RECEPTORES INMUNODEPRIMIDOS (PROTOCOLO 1)

| Dias p.i | I.N. dadores | <u>Viremia dias p.i</u> | | |
|----------|--------------|-------------------------|------------|----|
| | | 1 | 6 (#) | 12 |
| 8 | 2.20 | - | - (2.62) a | - |
| 27 | 2.40 | - | - (2.40) b | - |
| 75 | 0.60 | + | + (0.60) c | + |
| NI | 0.50 | + | + (0.60) d | + |
| -- | ---- | + | + (0.40) e | + |

Ratones BALB/c fueron inmunizados por la via i.p. con 0.1 ug de virus O₁ Campos inactivado y purificado. A distintos dias p.i. se sangraron 4 dadores mezclando sus plasmas para determinar su I.N. Sus células totales de bazo fueron transferidas a receptores irradiados según protocolo 1. A partir del dia 1 p.i. se sangraron 3 ratones por lote para determinar presencia de virus en sangre e I.N. de los mismos (#).

Diferencias entre a y b no significativas ($p < 0.01$).
Diferencias entre c,d y e no significativas ($p < 0.01$).
Diferencias entre a+b y c+d+e significativas ($p < 0.01$).

IV.2 ESTUDIO DE LAS CAUSAS INVOLUCRADAS EN LA DIFERENTE DURACION DE INMUNIDAD FRENTE AL VIRUS ACTIVO E INACTIVADO.

La duración de inmunidad luego de una infección viral aguda es prolongada, pero cuando se utiliza virus inactivado como inmunógeno, es significativamente menor (Ada, G., 1988). Son varias las hipótesis que se pueden esgrimir para explicar esta diferencia: persistencia viral luego de la infección, amplificación de la cantidad de inmunógeno que estimula al sistema inmune cuando existe replicación, diferentes mecanismos celulares y humorales involucrados en la respuesta a virus activo y a virus inactivado. Estos mecanismos, no excluyentes entre sí, pueden llevar al organismo infectado o vacunado a una mayor o menor respuesta por diferencias en la retención de inmunógeno y/o alteración de circuitos celulares y/o redes moleculares.

Con el objeto de determinar la validez de estas hipótesis en nuestro modelo, se diseñaron varios experimentos:

IV.2.1 PERSISTENCIA VIRAL EN EL MODELO MURINO EXPERIMENTAL

Se estudió la posible persistencia de virus infectivo, luego de la infección, por varios métodos:

IV.2.1.1 En ratones convalescientes persistentemente
inmunodeprimidos.

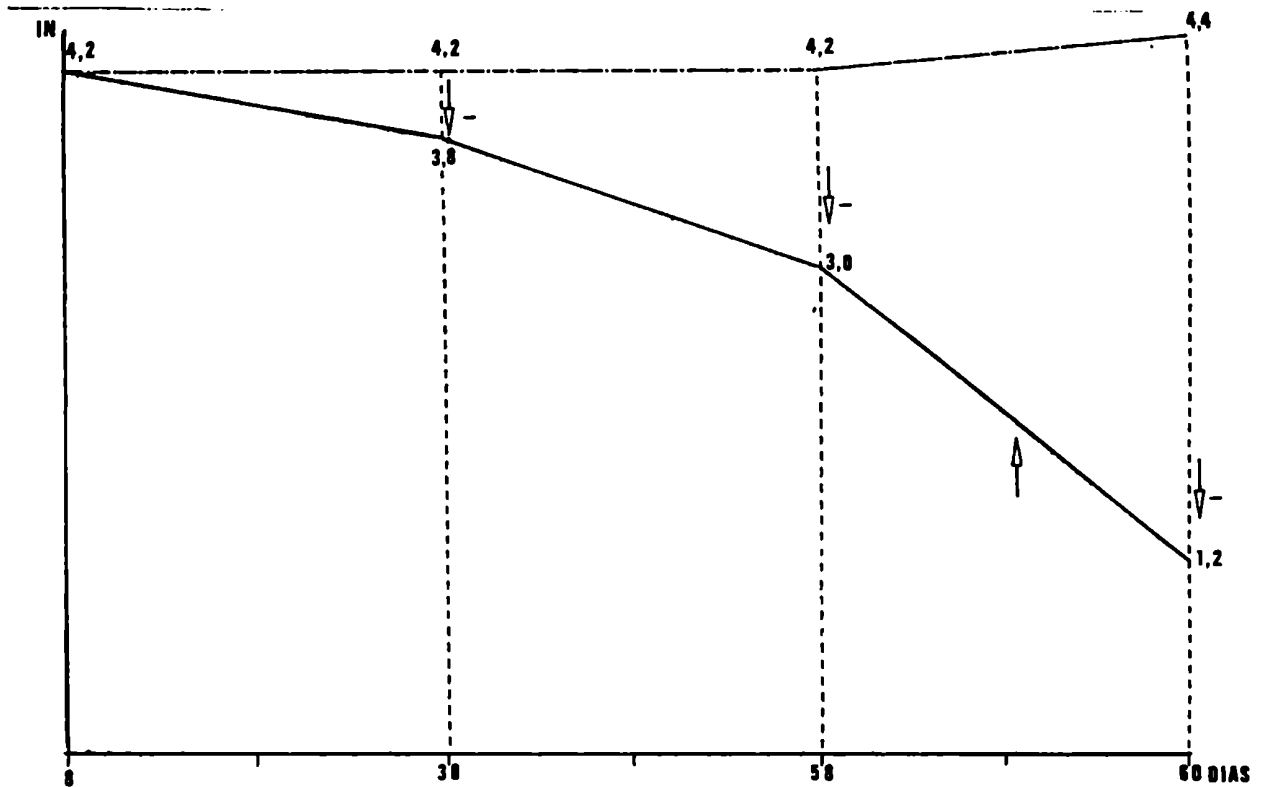
a. En la figura 5 se puede observar la cinética de anticuerpos neutralizantes de los animales previamente infectados y luego inmunodeprimidos. Nunca se detectó virus infectivo en los órganos estudiados.

b. Ratones inmunodeprimidos con ciclofosfamida y cortisona fueron sangrados día por medio durante dos semanas y sacrificados a los 15 días post-tratamiento. El índice neutralizante de los ratones correspondiente a la última sangría fue menor que 1 pero no se pudo detectar presencia de virus infectivo en sangre, bazo o páncreas. ni anticuerpos anti-VIA a los 7 y 15 días post-tratamiento.

En todos los casos se utilizó como control positivo animales infectados 24 hs. antes del sacrificio con 10^4 DIRL 50% via i.p. en los que sí se detectó virus infectivo presente y anticuerpos anti-VIA.

FIGURA 5

BUSQUEDA DE VIRUS INFECTIVO EN RATONES CONVALESCIENTES



Ratones B/6L/c infectados 30 días antes fueron inmunodeprimidos durante 40 días con Ciclofosfamida (250 mg/kg, 7 veces) y con Cortisona (375 mg/kg, 15 veces). Varias veces en el transcurso del experimento se sacrificaron ratones de a pares, para medir su IN y se buscó virus en sus órganos.

↑ : se inyectaron 20 µg del virus homólogo al utilizado en la infección, inactivado por la luz.

↓ : Búsqueda de virus en órganos negativos.

IV.2.1.2 Cocultivo celular

Se cocultivaron células provenientes de dadores infectados un mes antes con células BHK 21, en cultivo 1º de tiroides bovina y cultivo primario de tiroides bovina. Con el sobrenadante de los tubos de cultivo, se hicieron dos pasajes ciegos en las mismas células y en ratón lactante. No se pudo rescatar virus infectivo en ninguno de los órganos estudiados.

IV.2.2.1 Transferencia de células a receptores irradiados.

Se transfirieron 10^7 células totales de bazo a receptores irradiados con 1 DL 50%. Se sangraron a varios tiempos post-transferencia y al día 10 p.t. se sacrificaron y se buscó virus infectivo en sangre, páncreas, glándula salival y bazo por inyección del macerado de estos órganos en ratón lactante. Tampoco se encontró virus infectante por este método.

IV.2.2 ESTUDIO DE LA MEMORIA INMUNE.

IV.2.2.1 Transferencia de células de bazo a receptores normales no desafiados.

IV.2.2.1.1 Con células inmunocompetentes provenientes de dadores inmunizados con virus activo.

Se transfirieron células provenientes de animales previamente infectados a receptores vírgenes no irradiados y luego se estudió a lo largo del tiempo la aparición de anticuerpos neutralizantes en los receptores.

En la figura 6 se puede observar en los ratones inyectados con células provenientes de dadores inmunizados por infección se registra un aumento en el nivel de anticuerpos neutralizantes a lo largo del tiempo.

En todos los casos se examinó la presencia de virus en las células provenientes de los dadores por inyección de las mismas en ratones lactantes singeneicos y cocultivo de estas con células BHK 21 con dos pasajes ciegos: nunca se detectó virus infectivo.

Es importante notar que:

1º nunca se desafió estos animales con virus ni antígeno viral y

TABLA 10

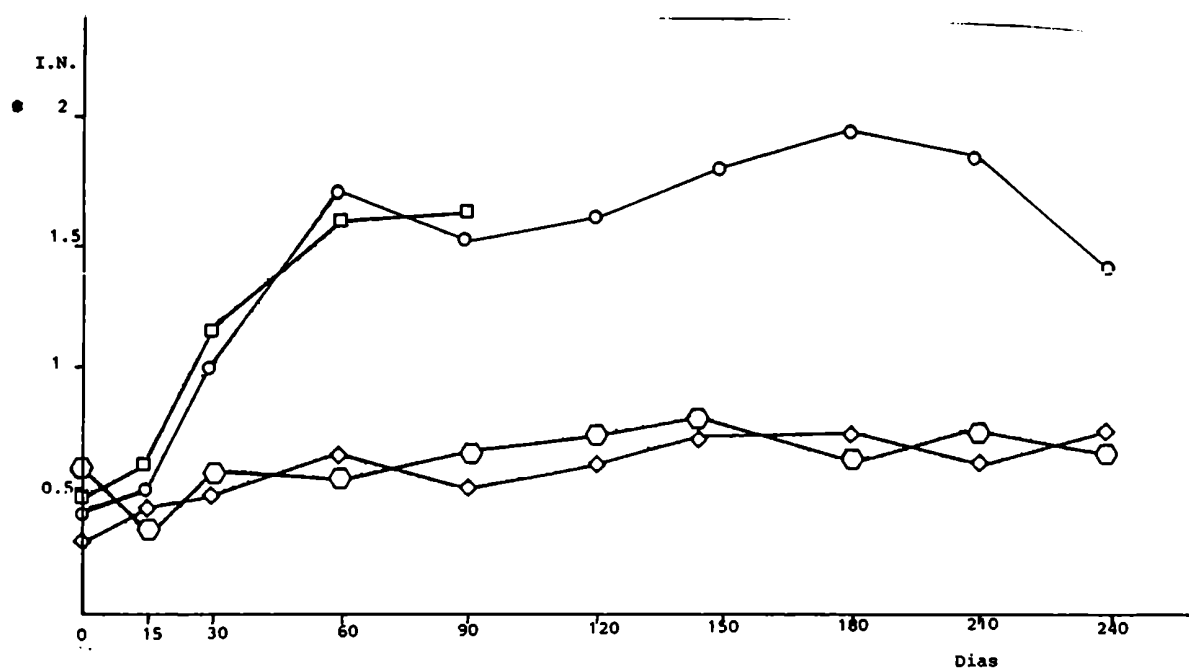
DESAFIO A RATONES TRANSFERIDOS CON CELULAS SENSIBILIZADAS

| Dadores sensib. con | IN 20 dias antes desafio | virus en | |
|---------------------|-----------------------------|----------|----------|
| | | sangre | páncreas |
| Virus activo | > 1.40 | 0/6 | 1/6 |
| Virus activo | < 0.84 | 6/6 | 6/6 |
| Virus inactivado | < 0.80 | 8/8 | 8/8 |
| No inmunizado | < 0.70 | 4/4 | 4/4 |

Ratones BALB/c que habían sido transferidos adoptivamente el día -260 antes del desafío, con células provenientes de animales sensibilizados con virus activo e inactivado, fueron desafiados con 1 DIMRA 100%. Al día siguiente fueron sangrados y sus páncreas extraídos con el objeto de determinar la presencia de virus.

FIGURA 6

TRANSFERENCIA DE CELULAS DE BAZO A RECEPTORES NO DESAFIADOS NI IRRADIADOS



50 x 10⁶ células de bazo provenientes de ratones BALB/c 60 días post-infección o 15 días post-inmunización con virus inactivado, fueron inyectadas en tres oportunidades por la vía i.p. en ratones singéneos. Como lote testigo se utilizaron células provenientes de animales no inmunizados. Se ilustra en IN promedio de los receptores a lo largo del tiempo.

(○): Receptores de células totales de ratones convalescientes.
 (□): " " " " " " " " inmunizados con VI
 (◇): " " " " " " " " no inmunizados.
 (○): " " " " " " " " adherentes " convalescientes.

Estos resultados indicaron que, el virus activo, es capaz de evocar una respuesta inmune que se mantiene activa y es independiente de la necesidad de un nuevo estímulo. Esto no ocurre con las células provenientes de animales inmunizados con virus inactivado.

IV.2.2.2 Reconstituciones de animales inmunodeprimidos con poblaciones de células inmunocompetentes.

IV.2.2.2.1 Con células provenientes de ratones atímicos.

Ratones atímicos infectados 30 días antes de la transferencia fueron sacrificados y sus células totales de bazo utilizadas para reconstituir ratones BALB/c previamente infectados. La cepa nude utilizada no es singeneica con los BALB/c. No se detectaron células thy+ en las células transferidas. En la tabla 11 se ilustra la respuesta medida como desaparición de la viremia y aumento del título de anticuerpos neutralizantes en los receptores.

Como se ilustra en la tabla 11, a los tres días p.i. ya no existe virus infectivo en sangre en los receptores transferidos con células provenientes de animales atímicos y el IN a los 4

TABLA 11

RECONSTITUCION CON CELULAS PROVENIENTES DE DADORES ATIMICOS
PREVIAMENTE INFECTADOS.(*)

| Dadores | 2dpi | 3dpi | 4dpi | 6dpi | 12dpi |
|------------|------|------|--------------|-----------|-------|
| nu/nu | + + | - - | - -(1.24)(a) | - -(1.64) | - - |
| nu/ + | - - | - - | - -(2.29)(b) | - -(4.50) | - - |
| Balb inm. | - - | - - | - -(2.34)(c) | - -(4.64) | - - |
| Balb norm. | + + | + + | + +(0.27)(d) | - + | - - |
| --- | + + | + + | + + | + + | + + |

Los ratones dadores fueron infectados 30 dias antes de la reconstitución. Sus celulas totales de bazo fueron transferidas a receptores irradiados según protocolo 2. A partir del dia 2 p.i. se sangraron 3 ratones por lote para determinar presencia de virus en sangre e I.N. de los mismos (b).

(*) (+): virus infectivo presente. (-): virus infectivo ausente. Entre paréntesis I.N. promedio de dos receptores. I.N. de los dadores: nu/nu: 2.60. nu/+: 4.02. BALB/c inmunes: 4.50. BALB/c vírgenes: 0.50.

Existen diferencias significativas ($p < 0.01$) de (a) con respecto a (d) y con respecto a (b) y (c).

dpi es superior al IN de ratones normales lo que indica que hubo una respuesta secundaria inducida por el reestímulo viral.

IV.2.2.2.2 Con células B purificadas provenientes de ratones inmunizados con virus inactivado.

Se transfirieron células B purificadas provenientes de ratones BALB/c inmunizados 8 días antes con 0.1 ug de VI a receptores singeneicos irradiados e infectados según el protocolo 1. En la tabla 12 se observa la respuesta medida como desaparición de la viremia y aparición de anticuerpos neutralizantes en los receptores irradiados.

Las células B purificadas provenientes de dadores inmunizados con VA fueron capaces de transferir inmunidad con la misma eficiencia que las células totales de bazo de los mismos dadores. Por el contrario células B purificadas provenientes de dadores inmunizados con VI no fueron capaces de transferir inmunidad como lo hicieron las células totales de bazo provenientes de los mismos dadores.

Solo respondieron aumentando su IN aquellos animales que eliminaron la viremia: los receptores de células totales de bazo provenientes de animales inmunizados con virus inactivado purificado y los receptores de células B purificadas o totales de bazo provenientes de ratones infectados 8 días antes.

TABLA 12

RECONSTITUCION SELECTIVA CON CELULAS TOTALES DE BAZO DE DADORES
INMUNIZADOS CON VIRUS INACTIVADO

| Grupo | Celulas | Inmunógeno | 5 | <u>Dias p.i.</u> | | | |
|--------|---------|------------|---|------------------|----|----|--|
| | | | | 6 | 13 | 14 | |
| (I) | B | VI | + | +(0.24) | + | - | |
| (II) | T | VI | + | +(0.24) | + | - | |
| (III) | Tot. | VI | - | -(2.14) | - | - | |
| (IV) | Tot. | -- | + | +(0.40) | + | - | |
| (V) | B | VA | + | -(2.00) | - | - | |
| (VI) | T | VA | + | +(0.30) | + | - | |
| (VII) | Tot. | VA | + | -(2.50) | - | - | |
| (VIII) | --- | -- | + | +(0.20) | + | - | |

Se transfirieron 10^7 células B, T o totales de bazo a receptores BALB/c previamente irradiados e infectados. Los dadores fueron inmunizados 8 dias antes de la reconstitución con 1 ug del virus homólogo inactivado y purificado o por infección A distintos dias p.i. se sacrificaron receptores de a tres por lote y se determinó virus infectivo en sangre. +: virus infectivo presente en sangre. -: virus ausente. Entre parentesis, I.N. promedio de los tres receptores. VA: virus activo. VI: virus inactivado. Existen diferencias significativas entre los lotes I, II, IV, VI y VIII con respecto a III, V y VII ($p < 0.01$). I.N. de los dadores: I, II y III: 2.20. IV: 0.50. V, VI y VII: 4. Entre parentesis IN promedio de tres receptores.

Se realizó un experimento similar pero transfiriendo células B purificadas provenientes de dadores inmunizados con virus inactivado con una contaminación de células T del 6%. Los resultados se ilustran en la tabla 13. Como se puede observar, los ratones receptores de células B contaminadas con un 6% de células T, eliminan la viremia a partir del día 10 p.i.. Por otro lado, los transferidos con células de animales vírgenes o con células B purificadas no contaminadas, eliminan la viremia el día 14 p.i. Esto se correlaciona con la respuesta en anticuerpos neutralizantes de los receptores que es mayor que 1 en el momento en que no hay virus infectivo presente.

Estos resultados indicaron que el virus inactivado necesita la colaboración T para inducir una respuesta anamnésica, a diferencia del virus activo que puede inducirlo con células B purificadas.

TABLA 13

RECONSTITUCION CON CELULAS B PURIFICADAS MAS T PURIFICADAS
PROVENIENTES DE ANIMALES INMUNIZADOS CON VIRUS INACTIVADO

| Lote | IN dador | 5 | <u>Dias post-infección</u> | | | |
|------|----------|-----|----------------------------|-----------|-----------|-----|
| | | | 8 | 9 | 10 | 11 |
| I | 2.12 | 2/2 | 2/2 | 1/2(0.75) | 0/2(1.38) | 0.2 |
| II | 2.12 | 0/2 | 0/2 | 0/2(2.54) | 0/2(2.47) | 0/2 |
| III | 0.50 | 2/2 | 2/2 | 2/2(0.68) | 2/2(0.60) | 2/2 |

Por cada lote se sacrificaron dos animales por dia. Se indica la viremia detectada por inyección de sangre del ratón receptor en ratón lactante.

Lote I: Reciben 10^7 cél. B^v mas 6 % T^v.

Lote II: Reciben cél tot.^v

Lote III: Reciben cél tot. norm.

SVI: células provenientes de animales sensibilizados con virus inactivado.

Entre paréntesis: I.N. promedio de los receptores.

Existen diferencias significativas (p,0.01) entre los tres grupos.

V. DISCUSION

En el modelo murino experimental, utilizado se observó una correlación positiva entre el título de anticuerpos neutralizantes y el grado de protección frente al desafío viral. Este hecho no está influenciado por el inmunógeno utilizado ni existe relación con respecto al tiempo post-infección (item IV.1.1).

Así, ratones inmunizados con VI con un IN mayor que 1.60, resistieron el desafío con el virus homólogo. En otros modelos de respuesta inmune a virus en ratón, como HSV 1 también se observó una correlación de este tipo en la prevención de la enfermedad (Rouse, T. et al, 1977). Sin embargo esto no ocurre con el virus influenza (Kris, R. et al, 1985) o LCM (Cerny, A. et al, 1986) en los que la presencia de anticuerpos circulantes no impide la infección. En otros casos, el nivel de anticuerpos circulantes puede, incluso, aumentar la severidad de la infección en relación a los controles seronegativos, como ocurre con el virus respiratorio sincicial (Prince, G. et al, 1986).

En el caso del VFA, se ha demostrado claramente que, el título de anticuerpos neutralizantes en bovinos convalescientes o vacunados con virus inactivado se correlaciona con el grado de protección frente al desafío viral (Van Bekum, J. et al, 1963; Graves, G. et al, 1972; Pay, T. et al, 1986). En cobayos

tambien existe correlación entre el IN y la protección (Knudsen, R. et al, 1983). En los experimentos de inmunización pasiva con plasma inmune (Item IV.1.1.3), todos los ratones estuvieron protegidos frente a la descarga viral cuando se les administró plasmas provenientes de ratones singeneicos inmunizados con VI o convalescientes, 24 horas antes del desafío (Item IV.1.1.3.1).

Esto demuestra que los efectores mas importantes en la respuesta protectora son los anticuerpos, sean estos tempranos (15 dpi) o tardíos (90 dpi) en el caso de los plasmas de ratones inmunizados con virus activo.

El nivel de anticuerpos tambien es responsable de la eliminación de la viremia, pues los ratones inmunodeprimidos y luego infectados, se eliminó la viremia cuando se les administró plasma inmune y no pudo detectarse virus en páncreas a partir del dia 2 post-inoculación del plasma inmune (item IV.1.1.3.2).

Estos resultados no coinciden con los informados con la mayoría de los virus, aun aquellos en los que un alto nivel de anticuerpos protege contra el desafío, como es el caso del HSV 1 en el que una vez producida la infección es necesaria la respuesta T para eliminar al virus de su sitio de replicación (Oakes, J. et al, 1980).

Los datos aquí presentados son consistentes con resultados previos obtenidos en nuestro modelo experimental ratón-VFA que

indican que la transferencia adoptiva de células B purificadas provenientes de bazo de ratones convalescientes, a ratones singeneicos irradiados e infectados, elimina la viremia correlativamente con la aparición de anticuerpos neutralizantes en los animales recipientes (Borca, M. et al, 1986).

La inmunización pasiva se ha utilizado como arma terapéutica luego de la infección con picornavirus (WHO, 1955) y otros virus que provocan infección aguda generalizada como el virus del moquillo canino (Baker, J., 1977).

Ratones transferidos pasivamente (IN < 1.5) pero tratados con sílica antes de la infección o de la transferencia pasiva de anticuerpos con el objeto de disminuir la fagocitosis, no estuvieron protegidos en relación a los controles no tratados siendo capaces de eliminar la infección cuando el suero inmune se administró luego de la descarga (IV.1.1.3).

Estos resultados son coincidentes con los obtenidos en experimentos realizados con anticuerpos monoclonales a-VFA Q₁, en los que se demostró que estos fueron capaces de proteger a ratones lactantes frente a un desafío viral en concentraciones subneutralizantes in vitro y esta capacidad se pudo abortar por tratamiento de los anticuerpos con pepsina con el fin de eliminar el fragmento F₀ de las Igs (Mc Cullough, K., 1986), cuyo efecto es similar al que produce el tratamiento con sílica gel ya que ambos impiden la opsonización por fagocitosis

Los resultados obtenidos en ambos modelos indican que los anticuerpos neutralizantes no serían los únicos efectores del estado de protección (Mc Cullough, K. et al, 1985).

Estos hallazgos permitirían explicar la falta de correlación existente entre el título de anticuerpos neutralizantes inducidos (que son los que se cuantificaron en estos experimentos) y el grado de protección encontrado en bovinos (Di Marchi, R. et al, 1986) y cobayos (Murdin, A. et al, 1986) cuando se utiliza como inmunógeno péptidos, pues aun con $IN = 3$, los animales no fueron protegidos frente a la descarga viral a partir del cual se había sintetizado el peptido.

En algunos ratones convalescientes se detectó un aumento en el título de anticuerpos neutralizantes cuando fueron descargados con virus infectivo, sin que se observara replicación (item IV.1.1.1). Se ha demostrado que en ratones inmunes, el virus infectivo inyectado por la vía i.p. es rápidamente neutralizado y por lo tanto no produce infección (López, O. et al, 1987). Es un hecho conocido que los complejos inmunes son muy buenos inmunógenos (Klaus, G. et al, 1981), sin embargo, el sistema parece tener un máximo de respuesta por esta vía de inoculación ya que en aquellos ratones con $IN > 4.15$, no fue posible el incremento del título de sus anticuerpos neutralizantes.

La respuesta al VA y al VI fue diferente tanto en el nivel de anticuerpos inducidos como en cuanto a la duración de la

inmunidad (IV.1.1).

En el día 75 p.i. ya no se detectan anticuerpos neutralizantes anti-VFA en los ratones BALB/c inmunizados con 0.1 ug de VI. Por el contrario, ratones BALB/c y nu/+ inoculados con VA mantienen altos títulos neutralizantes per vitam. Esta diferencia puede no ser atribuible a la cantidad de viriones utilizada en la inmunización pues el cálculo teórico de las partículas presentes en 0.1 ug de VI y purificado es superior a la cantidad estimada de viriones presentes en el ratón durante los tres días de la infección y la inyección de esta cantidad de virus inactivado por la vía e.v. produjo tolerancia (López, O. et al, res. no public.).

Para inducir una respuesta similar en duración de la inmunidad frente al VA es necesario inyectar 10 ug de VI, cantidad 100 veces mayor que la utilizada en nuestro modelo y 30 veces mayor que la utilizada para formular la vacuna con adyuvante en el bovino.

La diferente duración de inmunidad entre VA y VI es la regla en los sistemas estudiados con virus que producen infección aguda generalizada (Jones, P. et al, 1987). Por esta causa se han utilizado con éxito vacunas atenuadas contra virus como polio (Sabin, A. et al, 1960). Sin embargo, esta metodología no es conveniente para el VFA debido no sólo a la alta tasa de mutación con el riesgo de reversión que esto involucra, sino también a su amplio rango de huéspedes, lo que implica que un

virus aftoso atenuado para una especie, puede ser virulento para otras, como ya ha ocurrido en cerdos con virus atenuados para bovinos (Brooksby, J., 1982).

Bovinos infectados con VFA 0, presentaron títulos de anticuerpos protectores hasta los 900 días post infección (Sadir, A. et al, 1988) mientras que el máximo de protección logrado con VI no excede los 180 días aun cuando se utiliza adyuvante oleoso (INTA-PIADC), 1977).

Los ratones atímicos respondieron al virus inactivado con un aumento en su IN que fue pasajero, mientras que los infectados tuvieron una respuesta serológica temprana similar a la de los eutímicos, pero su nivel de anticuerpos disminuyó rápidamente hasta estabilizarse en un nivel protector (IN=1.60), aunque 1000 veces menor en relación a los eutímicos, hasta por lo menos 240 dpi (Item IV.1.2.1).

Si bien la respuesta inmune a virus es considerada clásicamente como T dependiente (Burns, W. et al, 1975), existen en la literatura excepciones a esta regla en la respuesta a varios virus, como Semliki (Suckling, A. et al, 1982) y VSV (Charan, S. et al, 1986). En este último caso, los anticuerpos se mantuvieron hasta por lo menos los 70 días post-infección, con niveles relativos a los encontrados por nosotros a los 240 días post-infección (item IV.1).

Las diferencias encontradas en la duración de la inmunidad frente a ambos inmunógenos pueden atribuirse a varios factores

no excluyentes entre sí: persistencia viral, persistencia de inmunógeno en células del sistema retículo endotelial o la actuación de distintos mecanismos de respuesta celular.

La persistencia viral en el ratón fue descartada in vitro e in vivo. En experimentos en los que los ratones se inmunodeprimieron químicamente con ciclofosfamida y cortisona, se logró disminuir su IN a niveles por debajo de los protectores, no siendo posible rescatar virus infeccioso (Item IV.2.1.1). El tratamiento con inmunodepresores permite reactivar virus que establecen un estado de latencia como el virus de la encefalitis japonesa (Mathur, J. et al,1987) o HSV 1 (Racjeani A. et al,1977)

En bovinos convalescientes de la infección con VFA O₁ Campos que fueron inmunodeprimidos con cortisona, tampoco fue posible rescatar virus aftoso a pesar de que se aisló herpesvirus bovino tipo 1 (Sadir,A. et al,1988). Tampoco fue posible rescatar virus infeccioso en nuestro modelo por la técnica clásica de cocultivo con células provenientes de ratones convalescientes luego de tres pasajes ciegos (Item IV.2.1.2).

En un porcentaje de bovinos infectados se produce un estado de portador luego de la infección. El tipo viral podría estar relacionado con el establecimiento de este estado: en bovinos infectados con virus A se pudo rescatar virus infeccioso de líquido esofagofaríngeo hasta el día 560 post-infección (Gebauer, E. et al,1987). Por otro lado, bovinos infectados con

virus D₁ sólo permanecieron como portadores hasta un máximo de 90 días post-infección y no hubo correlación entre el nivel de anticuerpos y la duración de inmunidad entre portadores y no portadores (Sadir,A. et al,1988). Sin embargo, por técnicas de hibridización con una sonda complementaria al segmento de ARN codificante para el antígeno VIA, se demostró que muestras negativas por infecciosidad eran positivas por hibridización (Rossi,M. et al,1987). Esto concuerda con la hipótesis sobre la persistencia de partículas no infecciosas que fue demostrada in vitro en células BHK 21 (De la Torre,G. et al,1985).

La respuesta al incremento de anticuerpos de ratones convalescientes a una DIMRA 100% que no infectó a los animales pero sí indujo un incremento en el IN significativo es una evidencia indirecta acerca de la no persistencia de virus en el modelo ya que una sola célula infectada produce una cantidad de partículas igual o mayor a la utilizada en la descarga viral (Item IV.1.1.1).

El hecho de que 10 µg de VI induzca una duración de inmunidad similar a la que se produce luego de la infección también es un aporte indirecto en ese sentido (Item IV.1.2.2.1).

La capacidad de transferir inmunidad adoptiva a partir de células linfoides de bazo provenientes de ratones inmunizados con VI está directamente relacionada con el título de anticuerpos presentes en el dador (Item IV.1.2.2.2), lo que indicaría que el IN sería un reflejo de un proceso activo que se va

agotando a lo largo del tiempo. Esto no ocurre en los ratones convalescientes en los que la capacidad de transferir inmunidad adoptiva se mantiene per vitam pues el IN también se mantiene elevado durante toda su vida (Item IV.1.2.1.2).

Parecería que la memoria, luego de la transferencia adoptiva, sólo puede ser activada si las células provienen de un dador con título de anticuerpos neutralizantes protectores. En bovinos revacunados cuatro meses luego de la primera dosis, se encontró una correlación lineal entre el nivel de anticuerpos presente luego de la revacunación con el título de anticuerpos alcanzado luego de esta (Black, L. et al, 1984).

Cuando se utilizó el protocolo 1 (irradiación, infección y luego reconstitución), la viremia en los receptores de células inmunocompetentes abortó en el día 5 p.i. y cuando se utilizó el protocolo 2 (irradiación, reconstitución y luego infección) no hubo viremia. Esto se debe probablemente al tropismo de los linfocitos hacia el páncreas cuando se utiliza la misma vía (i,p,) (López, O. et al, 1986) y por lo tanto el virus inyectado fue neutralizado in situ ya que este también tiene tropismo hacia el páncreas (López, O. et al, 1988).

De todas maneras, en ambos casos se produce una respuesta secundaria que se demuestra por el aumento en el IN de los receptores hasta niveles superiores a los protectores, aunque en menor medida cuando se infecta luego de la reconstitución, probablemente debido a la cantidad de virus presente en ambos

casos: cuando se utilizó el protocolo 1 se produjo viremia y cuando se utilizó el protocolo 2 no.

También es posible transferir inmunidad adoptiva en ratones en los que nunca se inoculó VFA ni sus antígenos (Item IV.2.2).

Luego de un período, en el que no se detectaron anticuerpos neutralizantes anti-VFA, comienza su producción y se mantienen por mucho tiempo. En experimentos llevados a cabo por Tew y col. (Tew, J. et al, 1979; Mandel, et al, 1981) se ha encontrado que células del sistema retículo endotelial son capaces de retener antígeno varios meses post-infección, fenómeno también demostrado en animales atímicos (Mjaalands, S. et al, 1987). Este elemento podría ser uno de los factores involucrados en la duración de inmunidad en nuestro modelo. Las células B pueden reconocer antígeno presentado por otras células (Rizvi, N et al, 1986) e incluso pueden presentar antígeno (Lanzavechia, R., 1985), lo que explicaría la respuesta positiva en la inducción de anticuerpos. La falta de respuesta luego de la inoculación con células de bazo provenientes de dadores inmunizados con VI (Item IV.2.2.1.2) se debería a una falla de este mecanismo cuando el antígeno se presenta en un contexto de no infección o bien a un fenómeno de dosis-respuesta relacionado con la red idiotipo-antiidiotipo (Jerne, N., 1974).

Células totales de bazo thy negativas, provenientes de ratones atímicos infectados 30 días antes, fueron capaces de contribuir a la eliminación de la infección, cuando se

transfirieron a ratones BALB/c alogeneicos, irradiados e infectados (Item IV.2.2.2.1).

Este "by pass" de la restricción del complejo mayor de histocompatibilidad, es congruente con resultados anteriores en los que se demostró que células B provenientes de dadores inmunizados por infección 8 días antes de la reconstitución, fueron capaces de transferir inmunidad a receptores singeneicos irradiados e infectados induciendo una respuesta secundaria (Borca, M. et al, 1986).

Esto indicaría que, en los ratones nu/nu, existiría una clase de memoria obviamente T-independiente, que es capaz de reactivarse (Item IV.2.2.1) o de inducir una inmunidad duradera (Item 1.1.1), sin necesidad de ser activada por células T ni siquiera en la sensibilización con el virus activo en el organismo dador.

Sin embargo, cuando hay células T presentes, se produce un efecto amplificador atribuible a los mecanismos en los que se encuentran involucrados los linfocitos T_H. Se podría postular que la respuesta inmune al VFA activo es timo-independiente opcional: cuando se encuentran células T, pueden ayudar en la iniciación de una respuesta en anticuerpos y en el establecimiento de una memoria duradera. No obstante, se pueden conseguir niveles de anticuerpos efectivos y alguna clase de memoria puede persistir y ser activada en ausencia de células T.

Esto no ocurre para la mayoría de los virus estudiados, donde la respuesta T-dependiente es la regla (Burns,W., 1975). Mas aun, es posible eliminar la infección sin la participación de células B, como por ejemplo en el caso de influenza o virus respiratorio sincicial (Cannon,M. et al,1987). Se ha logrado abortar infecciones por virus de la influenza en ratones por transferencia adoptiva de células T₀ clonadas dirigidas contra proteínas no presentes en la cubierta del virión (Taylor,P. et al,1987).

Sin embargo, en forma controvertida con la creencia generalizada, existen indicios de timo-independencia relativa en algunos virus como VSV o algunos subtipos de influenza A (Charan,C. et al,1986). Tambien se ha informado un comportamiento timoindependiente para el antígeno HBc (de cubierta) del virus de la hepatitis B. Este antígeno induce anticuerpos en ratones atímicos de la clase IgG2b en una proporción 1: 80 con respecto a los producidos por sus compañeros eutímicos (Milich, D. et al,1986), lo que indica que, como en nuestro modelo, la presencia de células T amplifica la respuesta inmune al antígeno.

El VI, en la dosis inyectada, se comporta de manera diferente al VA, es decir como un típico antígeno viral timodependiente: la respuesta que induce en ratones nu/nu es pasajera (Item IV.1.1.2), similar a la que se induce con GRC. Células B purificadas, provenientes de bazo de ratones inmunizados, no

son capaces de eliminar la viremia ni inducir una respuesta secundaria cuando se transfieren adoptivamente a receptores singeneicos irradiados e infectados, a diferencia de células totales de bazo de los mismos dadores o células B purificadas provenientes de dadores convalescientes (Item IV.2.2.2.2).

La necesidad de colaboración T se confirmó cuando se realizó el mismo experimento agregando células T provenientes del mismo dador en una pequeña proporción (6%). Si bien la cantidad de células T no alcanzó para reestablecer la respuesta similar a la producida por la reconstitución con células totales de bazo, sirvió para inducir anticuerpos neutralizantes en los receptores en cantidad suficiente para eliminar la viremia antes (9 d.p.i.) que los receptores de células B purificadas (12 d.p.i.) (Item IV.2.2.2.2).

VI. CONCLUSIONES

El nivel de anticuerpos neutralizantes anti-VFA inducidos por inmunización activa con virus activo o inactivado o por la transferencia pasiva de suero inmune, se correlaciona con el nivel de protección de los ratones al VFA homólogo. Esto es similar a lo que ocurre en el bovino.

La diferencia en la duración de inmunidad entre el virus activo y el inactivado no es atribuible a persistencia viral.

Si bien es posible que existan diferencias en la retención de inmunógenos por células presentadoras de antígenos para ambos virus, nuestros resultados indican que, los mecanismos de la respuesta inmune hacia el VA y el VI es diferente pues el VA se comporta como un antígeno timo-independiente "optativo" y el VI, en las dosis ensayadas, como un antígeno timo-dependiente típico.

VII. RESUMEN

La Fiebre Aftosa es la enfermedad viral del ganado que mayor impacto económico ocasiona a la Argentina, no sólo por los perjuicios directos a las especies afectadas, sino también por las pérdidas indirectas debido al cierre de mercados de exportación que representarían ingresos de divisas para nuestro país.

El principal elemento utilizado en la lucha contra esta enfermedad es la inmunización preventiva, pero la principal limitante de los inmunógenos en uso es la corta duración de la inmunidad que confieren.

Existe gran cantidad de información sobre la epidemiología de la enfermedad y la biología del virus. Sin embargo, es muy poco lo que se conoce sobre la relación virus-huesped y su respuesta inmune.

El propósito de este trabajo es abordar el problema desde el otro elemento de la ecuación epidemiológica, el huesped, y tiene como objetivo considerar los mecanismos de respuesta inmune específica que el hospedador pone en funcionamiento frente a la inmunización con virus activo e inactivado.

Se seleccionó un modelo murino de infección al virus de la Fiebre Aftosa por lo detallado del conocimiento que se posee

sobre el sistema inmune del ratón, la posibilidad que brinda este animal de manipular sus poblaciones celulares inmunocompetentes in vivo y la experiencia ganada en investigaciones previas realizadas en nuestro laboratorio.

Se determinó que en el modelo murino experimental, existe una correlación entre el nivel de anticuerpos a-VFA inducido por el virus activo o el virus inactivado y el grado de protección conferido. Sin embargo, la duración de la inmunidad producida por la infección en ratones atímicos y eutímicos es prolongada mientras que la producida por la inmunización con 0.1 µg del virus inactivado es de corta duración. Esta diferencia en la duración de la inmunidad no es atribuible a persistencia viral.

Se observó un comportamiento diferencial del sistema inmune del ratón en la respuesta a ambos inmunógenos:

En contraposición a lo que ocurre cuando se transfieren células B purificadas provenientes de dadores inmunizados con VA a receptores singeneicos irradiados e infectados (Borca, M. et al, 1986), las células B provenientes de dadores inmunizados con VI no son capaces de eliminar la infección en los ratones reconstituidos pero sí lo son las células totales de bazo provenientes de los mismos dadores.

El agregado, a las células B, de una pequeña proporción de células T provenientes de los mismos dadores inmunizados con VI, sirve para acortar la viremia provocada por la infección de los receptores.

El virus activo se comportaría como un antígeno timo-independiente "optativo", mientras que el virus inactivado se comportaría como un antígeno timo-dependiente típico. Estos resultados se consideran relevantes para la elaboración de vacunas anti-aftosa formuladas con inmunomoduladores que permitan mimetizar la respuesta del virus inactivado con la inducida por el virus activo, con el objeto de lograr una mejor y mas duradera inmunidad.

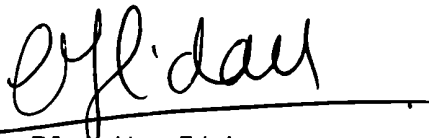


Lic. Osvaldo J. López



Dr. Alejandro A. Schudel

Director



Dr. Claudio Bidau

Co-Director.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- ACHA, P.N., Szybes, B. (1977). Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. PAHO Scientific Publications: 354-364.
- ADA, G.L. (1988). What to expect of a good vaccine and how to achieve it. *Vaccine* 6: 77-79.
- ALONSO FERNANDEZ, A., Aug de Mello, P. & Federer, K.E. (1973). Diagnóstico y referencia en la Fiebre Aftosa. *Bol. Centr. Panam. Fiebr.Aft.* 11: 1-12.
- ANDERS, E., Katz, J., Jackson, D. & White, D. (1981). *In vitro* antibody responses to influenza virus. II. Specificity of helper T cells recognizing hemagglutinin. *J. Immunol.* 127: 669-672.
- ARAMBULO, P.V. & Steele, H.H. (1977) A review of the natural history of Foot-and-Mouth Disease. *Philippine J.Vet. Med.* 14: 128-136.
- BABIUK, L.A. Bielefeldt-Ohmann, H. Gifford, G., Czerniecki, C., Scialli, V. & Hamilton, E. (1985). Effect of bovine alfa 1 interferon on Bovine Herpes Virus 1 induced respiratory disease. *J. Gen. Virol.* 66: 2383-2394.
- BACHRACH, H.L., Bresse, S.S., Callis, J.J., Heas, W.R. & Patty, R.E. (1957). Inactivation of Foot-and-Mouth Disease by pH and Temperature changes and by formaldehyde. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 25: 147-152.
- BACHRACH, H.L. & Bresse, S.S. (1958). Purification and electron microscopy of Foot-and-Mouth Disease Virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 27: 659-665.
- BACHRACH, H.L. (1968). Foot-and-Mouth Disease. *Ann. Rev. Microbiol.* 22: 201-244.
- BACHRACH, H.L., Swaney, J.R. & Vande woude, G.F. (1973). Isolation of the structural polypeptides of Foot-and-Mouth Disease Virus and analysis of their C-Terminal sequence. *Virology* 52: 520-528.
- BACHRACH, H.L., Moore, D.M., Mc Kercher, P.D. & Polatnick, J. (1975). Immune and antibody responses to an isolated capped protein of Foot-and-Mouth Disease Virus. *J. Immunol.* 115: 1636-1641.

BAHNEMANN, H.G. (1974). Binary ethylenimine as an inactivant for Foot and Mouth Disease Virus and its application for vaccine production. *Arch. Virol.* 47: 47-56.

BAKER, J. (1979). *Veterinary Therapeutics*. Ed. por W. Saunders, Cor: 655-656.

BARBONI, E & Manocchio, L. (1962). Severe diffuse changes in pancreas with disappearance of B cells. *Arch. Vet. Ital.* 1: 477-482.

CASUALDO, J.A., Minvielle, M.C. & De Torres, R. (1983). Inmunopatogenia de la infección persistente por el virus de la Hepatitis B. En resumen del Simposio: Mecanismos generales de patogenia de la infección viral en mamíferos. 1º Congreso Argentino de Virología: 44-57.

BATERLING, S.J., Mc Laen, R.H., Wagenaar, F. Bikkers, S. (1979). Isolation and characterization of trypsin-resistance O₁ variants of Foot-and-Mouth Disease Virus. *J.Gen.Virol.* 43: 383-393.

BELIN, C. (1953). The Belin FMD vaccine. *Bull. Off. Int. Epizoot.* 39: 103-107.

BITTLE, J.L., Houghten, R., Alexander, E., Schinick, T., Gutcliffe, J., Lerner, R., Rowlands, D. & Brown, F. (1982). Protection against foot and mouth disease by immunization with a chemical synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. *Nature* 298: 30-33.

BLACKWELL, J.H. (1980). Internationalism and survival of Foot-and-Mouth Disease Virus in cattle and Food products. *J. Dairy Science* 63 (6): 1019-1030.

BLACK, L., Rweyemamu, M. & Boge, A. (1984). Revaccination response of cattle as a function of the 140 S Foot-and-Mouth Antigen dose. *J. Comp. Pathol.* 94 (3): 417-424.

BLOOM, B.R. & Rager-Zisman, B. (1975). Cell mediated immunity in viral infections. En *Viral Immunology and Immunopathology*. Ed. Notkins, A.L. Academic Press. N.Y. : 113-133.

BOOTHROYD, J.C., Highfield, P.E., Cross, G., Rowlands, D. Lowe, F, Brown, F & Harris, t. (1981). Molecular cloning of Foot and mouth disease virus genome and nucleotide sequences in the structural protein genes. *Nature* 290: 800-802.

BORCA, M.V., Fernández F.N., Sadir A.M. & Schudel A.A. (1984). Reconstitution of immunosuppressed mice with mononuclear cells from donors sensitized to Foot and Mouth disease virus (FMDV). *Vet. Microbiol.* 10: 1-12.

BORCA, M.V., Fernández F.N., Sadir A.M., Braun M. & Schudel A.A. (1986) Immune response to foot-and-mouth disease virus in a murine experimental model: effective thymus-independent primary and secondary reaction. *Immunol.* 59: 261-268.

BROECKHUSEN, M.P., Blom, A.J., Van Rijn, J.M., Pouvels, P.H., Francis, M.J., Brown, F. & Enjer-Valk, B.E. (1987). Neutralization and protection induced by fusion proteins containing Foot-and-Mouth Disease Virus epitopes synthesized in *E. Coli*. En *Modern approaches to vaccines*: 43.

BRODSKY, J.B. (1968). La Fiebre Aftosa un problema mundial. *Bol. Ofic. Sanit. Panam.* 54 (5): 377-385.

BRODSKY, J.B. (1982). Portraits of viruses: Foot-and-mouth disease virus. *Intervirology* 18: 1-23.

BROWN, F. & Crick, J. (1958). Application of agar gel precipitating to the study of the virus of Foot-and-Mouth Disease. *Virology* 5: 133-144.

BROWN, F., Cartwright, B & Stewart, D.L. (1962). Further studies on the infection of pig-kidney cells by Foot-and-Mouth Disease Virus. *Biochem. Biophys. (Amst.)* 55: 768-774.

BROWN, F. & Newman, J.F. (1963). "In vitro" measurements of the potency of inactivated Foot-and-Mouth Disease Vaccines. *J. Hyg. (Camb.)* 61: 345-351.

BROWN, F., Newman, J.F., Stott, J., Porter, A., Frisby, D., Newton, C., Carey, N. & Fellner, P. (1974). Poly (C) in animal viral RNAs. *Nature* 251: 342-344.

BROWN, F. (1984). Foot-and-Mouth Disease Virus. En *New approaches to vaccines development*. Ed. R. Bell & G. Tomigiani. Swabe & Co. Basel: 282-297.

BROWN, F. (1988). Use of peptides for immunization against Foot-and-Mouth Disease. *Vaccines*: 180-182.

BRUSH, M & Cottral, G.E. (1977). Effect of normal oesophageal pharyngeal secretions from normal cattle on Foot-and-Mouth Disease Virus O₁. *Zbl. Vet. Med. B.* 24: 680-683.

- BRUNER, D.W. & Gillespie, J.H. (1966). *En Hagen's Infectious Diseases of Domestic Animals*. Cornell Univ. Press. Ythaca, N.Y.; cap. 44: 791-809.
- BUKOSKI, J.F., Woda, B.A., Habu, S., Okamura, K. & Welsh, R.M. (1983). Natural killer cell depletion enhances virus synthesis and virus -induced hepatitis in mice. *J.Immunol.* **131** (3): 1531-1536.
- BURNS, W.H., Billups, L.C. & Notkins, A.L. (1975). Thymus-dependence of viral antigens. *Nature* **256**: 654-656.
- BURROUGHS, J.N., Rowlands, D.J., Sangar, D.V., Talbot, P. & Brown, F. (1971). Further evidence for multiple proteins in the Foot-and-Mouth Disease particles. *J.Gen.Virol.* **13**: 73-84.
- BURROUGHS, J.N., Sangar, D.V., Clarke, B.E., Rowlands, D.J., Billiau, A. & Collen, D. (1984). Multiple proteases in Foot-and-Mouth Disease Virus replication. *J.Virol.* **50** (3): 878-883.
- BURROWS, R. (1968). Excretion of Foot-and-Mouth Disease Virus prior to the development of lesions. *Vet. Rec.* **82**: 387-388.
- BURROWS, R., Mann, J.A., Greig, A., Chapman, W.G. & Goodridge, D. (1971). The growth and persistence of Foot-and-Mouth Disease Virus in the bovine mammary gland. *J.Hyg. (Camb.)* **69**: 307-321.
- CALLIS, J.J. & Mc Kercher, P.D. (1980). *Diseases of swine*. Ed. por Leman P.D., Glock, R.D., Mengeling, W.L., Penny, R.H.C, Scholl, E. & Straw, B. Iowa State University Press. Ames. Iowa. U.S.A.
- CALLIS, J.J. (1988). Genetic engineering: animal health and production. *Resumen VI Cong. Arg. Vet.* : 265-268.
- CAMPBELL, C.H. (1960). The susceptibility of mother mice and pregnant mice to the virus of Foot-and-Mouth Disease. *J.Immunol.* **84** (5): 469-474.
- CANNON, M.J., Stott, E.J., Taylor, G & Ankenas, B.A. (1987). Clearance of persistent respiratory syncytial virus infections in immunodeficient mice following transfer of primed T cells. *Immunology* **62**: 133-138.
- CARRILLO, E., Rieder Rojas, E. Schiapacasse, C & Campos R. (Manuscrito) Modification of Foot-and-Mouth Disease Virus after several passages in the presence of antiviral polyclonal sera.

- CARTWRIGHT, B., Chapman, W.G. & Brown, F. (1980). Serological and immunological relationships between the 146 S and 12 S particles of Foot-and-Mouth Disease Virus. *J. Gen. Virol.* **50** (2): 369-376.
- CAVANAGH, D., Sangar, D., Rowlands, D.J. & Brown, J. (1977). Immunogenic and cell attachment sites of Foot-and-Mouth Disease Virus: further evidence for their localization in a single capsid polypeptide. *J. Gen. Virol.* **35**: 149-158.
- CEGLONISKY, W.S. (1965). Antibody response to the non-infectious 7 S components of the virus of Foot-and-Mouth Disease. *Virol.* **25**: 328-331.
- CERNY, A., Hueguin, A.W., Sutter, E., Bazin, H., Hengartner, H.H. & Zinkernagel, R.M. (1986). Immunity to lymphochoriomeningitis virus in B-cell depleted mice: evidence for B cells and antibody-independent protection by memory T-cells. *Eur. J. Immunol.* **16**: 913-917.
- CHARAN, S., Zinkernagel, R.M. (1986). Antibody mediated suppression of secondary IgM response in nude mice against Vesicular Stomatitis Virus. *J. Immunol.* **136** (8): 3057-3061.
- CHATTERJE, N.K., Cachrach, H.L. & Polatnick, J. (1976). Foot-and-Mouth Disease Virus RNA. Presence on 3' terminal polyribonucleic acid and absence of amino acid binding ability. *Virol.* **69**: 369-377.
- CHATURVEDI, U.C., Thandon, H.O. & Mathur, A. (1978). Control of in vivo and in vitro spread of Cocksackie virus B4 infection by sensitized spleen cells and antibodies. *J. Inf. Dis.* **138**: 181-190.
- CLARKE, B.E., Sangar, D.V., Burrough, J.N., Newton, S.E., Carroll, A.R. & Rowlands, D.J. (1985). Two initiation sites for Foot-and-Mouth Disease polypeptide in vivo. *J. Gen. Virol.* **66**: 2615-2626.
- COLLEN, T., McCullough, K.C. & Dole, T. (1984). Induction of antibody to Foot-and-Mouth disease virus in pre-sensitized mouse spleen cell cultures. *J. Virol.* **52** (2): 650-655.
- COOPER, P.D., Agol, V.I., Bachrach, H.L., Brown, F., Ghendon, Y., Gibbs, A.J., Gillespie, J.H., Lonberg-Holm, K., Handel, B., Melnick, J.L., Mohanty, S.B., Povey, R., Rueckert, R.R., Shaffer, F.C., Tyrrell, D.A.J. (1978). Picornaviridae: second report. *Intervirology* **10**: 165-180.

- COUCH, R.B. & Basel J.A. (1983). Immunity to influenza in man. *Ann. Rev. Microb.* 37: 529-549.
- COSALFA (1981). Política y estrategias del combate de la Fiebre Aftosa en Sudamérica para la década 1981-1990. CFFA, Rio de Janeiro, Brasil.
- COTO, C. & De Torres, R. (1983). Naturaleza y estructura de los virus animales. Ed. Ediquea, Bs.As.
- COTTRAL, G.E., Cox, B.F. & Baldwin, D.E. (1966). The survival of Foot-and-Mouth Disease Virus in cured and uncured meat. *Am. J. Vet. Res.* 21: 288-297.
- COTTRAL, G.E., Baliunas, P. & Cox, B.F. (1968). Foot-and-Mouth Disease Virus in semen of bulls and its transmission by artificial insemination. *Arch.Ges.Virusforsch.* 23: 362-377.
- COWAN, K.M. & Trautman, R. (1965). Antibodies produced by guinea pigs infected with Foot-and-Mouth Disease Virus. *J. Immunol.* 94: 858-867.
- COWAN, K.M. & Graves, J.H. (1966). A third antigenic component associated with Foot-and-Mouth Disease infection. *Virology* 30: 528-540.
- COWAN, K.M. & Trautman, R. (1967). Immunochemical fixation reactions with isolated antigenic components. *J. Immunol.* 99: 729-236.
- COWAN, K.M. & Graves, J.H. (1968a). Immunochemical studies of Foot-and-Mouth Disease. III. Acridine orange staining of agar gel precipitating reactions. *Virology* 34 (3): 544-548.
- COWAN, K.M. (1968b). Immunochemical studies of Foot-and-Mouth Disease. IV. Preparation and evaluation of antisera specific for virus, virus protein subunit and the infection associated antigen. *J. Immunol.* 102 (6): 1183-1191.
- COWAN, K.M. (1973). Antibody response to viral antigens. *Adv. Immunol.* 17: 195-254.
- CUMMINS, J.M. & Rosenquist, B.D. (1980) Protection of calves against rhinovirus infection by nasal secretion interferon induced by infectious bovine rhinotracheitis. *Am. J. Vet. Res.* 41: 161-165.
- CUNHA, R.G., Junior, J.A.B., Serrano, W. and Torruella, J., 1937. El uso de ratones lactantes en la evaluación de los anticuerpos

contra el virus de la Fiebre Aftosa y su significancia inmunológica. *Gac. Vet.*, 110:243-267.

CUNLIFFE, H.R. (1964) Observations on the duration of immunity in cattle after experimental infection with Foot and Mouth disease virus. *Cornell Veterinary*, 54: 501-510.

DE LA TORRE, J.C., Davila, M., Sobrino, F., Ortin, J. & Domindo E. (1985). Establishment of cell lines persistently infected with Foot-and-Mouth Disease Virus. 145:24-35.

DENOYA, C.D., Scodeller, E.A., Gimenez, B.H., Vazquez, C. & La Torre, J.L. (1978). Foot-and-Mouth Disease Virus. I. Stability of its ribonucleic acid. *Virology*, 84: 230-235.

DI MARCHI, R., Brooke, G., Gale, C., Crackwell, V., Doel, T. & Nowat, H. (1986). Protection of cattle against Foot-and-Mouth Disease by a synthetic peptide. *Science* 232: 639-641.

DOEL, T.R. & Bacarini, A. (1981). Thermal stability of Foot-and-Mouth Disease Virus. *Arch. of Virology*, 70: 21-32.

DOEL, T.R. & Chong, W.K.T. (1982a). Comparative immunogenicity of 146 S, 75 S and 12 S particles of Foot-and-Mouth Disease Virus in preparations destined for vaccines. *J. Biol. Stand.*, 10: 69-81.

DOEL, T.R. & Collen I. (1982b). Qualitative assessment of 146 S particles of Foot-and-Mouth Disease virus in preparation destined for vaccines. *J. Biol. Stand.*, 10: 69-81.

FAGG, R.H. & Hyslop, N. (1966). Isolation of variant strain of Foot-and-Mouth Disease Virus (type O) during passage in partly immunized cattle. *J. Hyg.*, 64: 397-404.

FENNER, F. & Blanden, R.V. (1975). History of viral immunology and immunopathology. En *Viral Immunology and Immunopathology*. Ed. A.L. Notkins. Ac. Press : 1-26.

FERNANDES, M.V. (1972). Últimas avances en vacunas contra la Fiebre Aftosa. *Bol. Ctr. Panam. Fiebr. Aft.*, 9: 1-14.

FERNANDEZ, F.N., Borca M.V., Sadr A.N., Fondevila N., Mayo J. and Schudel A.A. (1986) Foot-and-Mouth disease virus (FMDV) experimental infections: susceptibility and immune response of adult mice. *Vet. Microbiol.*, 12: 15-24.

FILION, L., Mc Guire, R. & Bahiuk L.A. (1983). The non specific immunosuppressive effects of BHV-1 infection in cattle on

bovine leucocyte functions. *Infect. Immunol.* 42: 106-112.

FONG, S. & Doyle, M.V. (1986). Response of bovine and porcine peripheral blood mononuclear cells to human recombinant interleukin-2. *Vet. Immunol. & Immunopathol.* 11: 91-100.

FOX, G., Stuart, K., Fry, E., Rowlands, D. & Brown, F. (1987). Crystallization and preliminary X ray diffraction analysis of Foot-and-Mouth Disease Virus. *J. Mol. Biol.* 196: 591-597.

FRACASTORIUS, H. (1546) De contagione et contagiosis morbis er curatione. BK.1 CAP. 12, Venecia.

FRANCIS, M.J., Fry C.M., Rowlands, D. J., Brown, F., Bittle, J.L., Hooghten, R.A. and Lerner, R.A. (1987a). Immune response to uncoupled peptides of Foot-and-Mouth Disease. *Immunology* 61: 1-6.

FRANCIS, M.J., Fry C.M., Rowlands, D. J., Brown, F., Bittle, J.L., Hooghten, R.A. and Lerner, R.A. (1987b). Non-responsiveness to Foot-and Mouth Disease Virus peptides overcome by addition of foreign Helper T cell determinant. *Nature* 130: 168-170.

FRENKEL, H.S. (1951). Research on foot-and-mouth disease. III- The cultivation of the virus in explants of tongue epithelium of bovine animals. *Am. J. Vet. Res.* 12: 187-190.

FRISBY, D.P., Newton, C., Carey, N.H., Fellner, P., Newman, J.F.E., Harris, T.J.R. & Brown, F. (1976). Oligonucleotide mapping of Picornavirus RNAs by two-dimensional electrophoresis. *Virol.* 71: 379-388.

FUCHSBERGER, N. & Borecky, L. (1979). Decrease of sensitivity to cell growth inhibitory effect of interferon in human embrionic cells after infection with SV 40 virus. *Acta virol.* 23: 344-347.

GARCIA OLAND, H. Bragagnolo, L., Ibarra, O. & Osorio, F. (1976). Investigación sobre la posibilidad de transmisión de la Fiebre Aftosa de bovinos portadores a susceptibles. 1º Congreso Arg. Microbiol., Bs. As.

GARMENDIA, A.E. (1988). Antiidiotipos: rol en inmunoregulación y posibles usos como vacunas. Libro de resúmenes del VI Congreso Arg. de Cs. Vet.: 269-275.

GEBAUER, F., De la Torre, J.C., Gomes, I., Mateu, M.G., Barcalona, H., Tiraboschi, B., Bergmann, I., Aug de Melo, P. & Domingo, E. (1988). Rapid selection of genetic and antigenic

variants of Foot-and-Mouth Disease Virus during persistence in cattle. *J. Virol.* 62 (6): 2041-2049.

GIRAUDO, A., Aug de Melo, P., Stroebe, K., Beck, E., Gomes, I., La Torre, J., Scodeller, e. & Bergmann, I. (1988). Comparison between an attenuated strain of Foot-and-Mouth Disease Virus (O, C) and its wild parental strain. Proc. 2^o Conf. Int. sobre el Impacto de las enfermedades virales en el desarrollo de Países de Latinoamérica y de la Región del Caribe. M. del Plata. Arg. : 65-4 pag.

GODENY, E.K. & Gaunt, H. (1987). Murine Natural Killer cells limit Cocksackievirus B3 replication. *J. Immunol.* 139 (3): 913-918.

GOODMAN-SNITKOFF, G.W. & Mc Sharry, J.J. (1980). Activation of mouse lymphocytes by Vesicular Stomatitis Virus. *J. Virol.* 35 (3): 757-765.

GOMES, I. & Rosenberg, F. (1986). A possible role of capybaras *Hydrochaeris-hydrochaeris hydrochaeris* in Foot-and-Mouth Disease endemicity. *Prevent. Vet. Med.* 3 (2): 197-206.

GRAVES, J.H., Cowan, K. & Trautman, R. (1968). Immunochemical studies of Foot-and-Mouth disease. II. Characterization of RNA-free virus like particle. *Virology* 34: 269-274.

GRAVES, J.H., Mc Vicar, J., Trautman, R. & Helagner, R. (1971). Contact transmission of FMD from infected to susceptible cattle. *J. Infect. Dis.* 123 (4): 386-391.

GRAVES, J.H. Mc Kercher, P.D. & Callis, J.J. (1972). Foot-and-Mouth Vaccine. Influence of the vaccine virus subtype on neutralizing antibodies and resistance to disease. *Am. J. Vet. Res.* 33 (4): 765-768.

GRESSER, I., Tovey, M.H., Maury, C. & Bandu, N.T. (1976). Role of interferon in the pathogenesis of virus disease in mice as demonstrated by use of anti-interferon serum. II. Studies with Herpes simplex, Moloney sarcoma, vesicular stomatitis, Newcastle disease and influenza viruses. *J. Exp. Med.* 144: 1316-1323.

GRUBMAN, M. (1984). In vitro morphogenesis of Foot-and-Mouth Disease Virus. *J. Virol.* 49 (3): 760-765.

GRUBMAN, M., Robertson, B.H., Morgan, P., Moore, D.M. & Dowbenko, D. (1984). Biochemical map of polypeptides specified by Foot-and-Mouth Disease Virus. *J. Virol.* 50: 579-586.

HARRIS, T.J.R., & Brown, F. (1977). Biochemical analysis of a virulent and an avirulent strain of Foot-and-Mouth Disease Virus. *J.Gen.Virol.* 34: 75-105.

HENDERSON, W.M. (1948). The survival of Foot-and-Mouth Disease in meat and offal. *J.Hyg.* 46: 394-402.

HOLLAND, J., Spindler, K., Horodyaky, F., Grabano, E., Nichol, G. & Vande Pol, S. (1982). Rapid evolution of RNA genome. *Science* 215: 1577-1585.

HOOD L., Neissman I., Wood W. & Wilson J. 1984. Immunology. Ed. The Benjamin / Cummings Publishing Co., INC.

HYSLOP, N. (1965). Secretion of Foot-and-Mouth Disease Virus and antibody in the saliva of infected and immunized cattle. *J.Comp.Path.Therap.* 75: 111-117.

HYSLOP, N. (1972). La epizootiologia y epidemiologia de la Fiebre Aftosa. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa.* 5: 1-48.

HUGH-JONES, M. (1986). A Mathematical model of antigenic drift. *Mathematical Modelling* 7: 765-775.

INSTITUTO DE VIROLOGIA. INTA, Castelar. (1984). Curso de Diagnóstico de enfermedades virales; 24.

INTA-PIADC (1977). Foot-and-Mouth diseases: a vaccine study. *Develop. Biol. Standard.* 35: 123-133.

J.Mol.Biol. 33: 369-376.

JONES P.D. & ADA, G.L. (1987). Persistence of influenza virus specific antibody secreting cells and B cell memory after primary murine influenza virus infection. *Cell. Immunol.* 102 (1): 153-160.

KAPOOR, A.K., Nash, A.A. & Wildy, P. (1982). Pathogenesis of Herpes simplex virus in B cell-suppressed mice: The relative role of cell mediated and humoral immunity. *J.Gen.Virol.* 61: 127-131.

KAPOOR, A.K., Nash, A.A., Wildy, P., Phelan, J., Mc Lean, C.S. & Field, H.G. (1982). Pathogenesis of Herpes simplex in congenitally athymic mice: The relative roles of cell-mediated and humoral immunity. *J.Gen.Virol.* 60: 225-233.

- KING, A.M.Q., Underwood, B.O., Mc Cahon, D., Newman, J.W.I. & Brown, F. (1981). Biochemical identification of viruses causing the 1981 outbreaks of foot and mouth disease in the UK. *Nature* **293**: 479-480.
- KIRCHER, H. (1986). The interferon system as a integral part of the defense system against infection. *Antiviral Res.* **6**: 1-17.
- KLAUS, G.G.B., Humphrey, J.H., Funkl, A. & Dongworth, D.W. (1980). The follicular dendritic cells: Its role in antigen presentation in the generation of immunological memory. *Immunol. Rev.* **53**: 3-28.
- KNOBLICH, A., Gortz, J. Harle-group, V & Falke, D. (1983). Kinetics and genetics of herpes simplex virus-induced antibody formation in mice. *Infect. Immun.* **39**: 15-23.
- KNUDSEN, R.C., Brocock, C.M. & Andersen, A.A. (1979). Immunity to Foot-and-Mouth disease Virus in guinea pigs: clinical and immune responses. *Infect. Immun.* **24** (3): 787-792.
- KNUDSEN, R.C., Brocock, C.M. & Andersen, A.A. (1982). Difference in protective immunity of the tongue and feet of guinea pigs vaccinated with Foot-and-Mouth disease virus type A12 following intradermolingual and footpad challenge. *Vet. Microbiol.* **7**: 97-107.
- KNUDSEN, R.C., Brocock, C.M. & Andersen, A.A. (1983). Protective role of Foot-and-Mouth disease virus antibody *in vitro* in Guinea-pigs. *J.Gen.Virol.* **64**: 341-348.
- KOHLER, H. & Milstein, C. (1975). Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**: 495-497.
- KOHLER, H., Muller, S. & Bona, C. (1985). Internal antigen and immune network. *Exp. Biol. and Med.* **178**: 189-195.
- KRIG, R.M., Asofky, R., Evans, C.B. & Small, P.A. (1985). Protection and recovery in influenza virus-infected mice immunosuppressed with anti-IgM. *J.Immunol.* **134** (2): 1230-1235.
- KUPPER, H., Keller, W., Kurz, C. Forst, S., Schaller, H., Franze, R., Stromaier, K., Marquardt, O., Zaslavsky, V. Hofschneider, P.H. (1981). Cloning of cDNA of major antigen of foot-and-mouth disease virus and expression in *E. coli*. *Nature* **289**: 555-559.

KUZNETSOVA, G.M., Ikovataya, G.M. & Onufried. (1966). Role of ixodid ticks in the transmission of Foot-and-Mouth Disease. *Vet. Bull.* 36 (12): 790-794.

JERNE, N.K. (1974) Towards a network theory of the immune response. *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)* 125: 373-389.

LANZAVECCHIA, A. (1985). Antigen specific interaction between T and B cells. *Nature* 314: 537-539.

LAPORTE, J., Grosclaude, J., Hantinghens, J., Serge, B. & Rouge, P. (1973). Neutralization in culture cellulaire du pouvoir infectieux du virus de la fièvre aphteuse par des sérums provenant de porcs immunisés à l'aide d'une protéine virale purifiée. *C.R. Acad. Sci. (Paris)* 276: 3399-3401.

LASTA, J., Sadir, A., Ludden, B., Zamorano, N., Marcovecchio, F., Rodriguez, R, Gallinger, M. & Kaupert, N. (1988). Eliminación del virus de la Fiebre Aftosa en carnes altamente infectadas. Libro de resúmenes del VI Congreso Arg. de Cs. Vet. : 227.

LA TORRE, J.L. (1987). La Fiebre Aftosa; producción de vacunas, estado actual y perspectivas futuras. *Biotecnología de las Américas.*

LEUNG, K.N., Ada, G.L. & McKenzie, I.F.C. (1980). Specificity by phenotype and H2 compatibility requirements of effector cells in DTH responses to murine influenza virus infection. *J.Exp.Med.* 151 (4): 813-826.

LEIST, T.P., Cobbold, S.P., Waldmann, H., Aguet, M & Zinkernagel, R.N. (1986). Functional analysis of T lymphocyte subsets in antiviral host defense. *J. Immunol.* :2278-2281.

LIEW, F. & Russell, S.M. (1980). Delayed-type hypersensitivity to influenza virus. Induction of antigen specific suppressor T cells for DTH to hemagglutinin during influenza virus infection in mice. *J.Exp. Med.* 151(4): 799-814.

LIGHTMAN, S., Cobbold, S., Waldmann, H. & Askonas, B.A. (1987). Do L3T4⁺ T cells act as effector cells in protection against influenza virus infection. *Immunol.* 62: 139-144.

LIPTON, H., Miller, S., Melvald, R. & Fujinami, K. (1987). Theiler's murine encephalomyelitis (THEY) infection in mice as a model for multiple sclerosis. En *Concepts in viral pathogenesis II*. Ed. por A.L. Notkins y M.B.A. Oldstone. Springer-Verlag, NY: 248-256.

- LOEFFLER, F., Frosch, P. (1977). Zentr. Bakterirol. Parasitenk. Abt. I. Origin. 22: 257-259.
- LOPEZ, C. (1975). Genetics of natural resistance to herpesvirus in mice. *Nature* 258: 152-153.
- LOPEZ, O.J., Braun M., Sadir A.M. & Schudel A.A. (1987). Respuesta inmune al virus de Fiebre Aftosa (VFA) en un modelo murino experimental. V) Respuesta al VFA inactivado 1º Congreso de la Asociación Latinoamericana de Inmunología y 2º Congreso Argentino de Inmunología. Buenos Aires.
- LOPEZ, O.J., Piatti P., Lucchelli A., Berinstein A., Benavides F., Fernandez F. y Sadir A.M. (1988). Respuesta inmune al virus de la Fiebre Aftosa activo e inactivado. VI Congreso de Argentino de Veterinaria. Buenos Aires, Argentina. 1988.
- LUTTON, L.W. & Gauntt, C.J. (1986). Cocksackievirus B3 infection alter plasma membrane of neonatal skin fibroblasts. *J. Virol* 60: 294-296.
- MC VICAR, J. Richmond, J. Campbell, C. & Hamilton, L. (1973). Observations of cattle, goats, and pigs after administration of synthetic interferon inducers and subsequent exposure to Foot-and-Mouth Disease Virus. *Can. J. Comp. Med.* 37 (4): 362-368.
- MADSHUS, I.H., Dinns, S. & Sandvig, K. (1984). Mechanism of entry into cytosol of poliovirus type 1: requirement for low pH. *J. Cell. Biol.* 98: 1194-1200.
- MANIATIS, T.S., Gootbourn, J. & Fisher, A. (1987). Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. *Science* 236: 1237-1244.
- MJAALANDS, S. & Fossum, S. (1987). The localization of antigen in lymph node follicular of congenitally athymic nude rats. *Scand. J. Immunol.* 26 (2): 141-148.
- MANDEL, T.E., Phipps, R.P., Abbot, A.P. & Tew, J.G. (1981). Long term antigen retention by dendritic cells in the popliteal lymph node of immunized mice. *Immunol.* 93: 353-362.
- MARCUS, P.I. & Sekellick M.J. (1980). Interferon induction by viruses: III. Vesicular stomatitis virus: Interferon inducing particle activity requires partial transcription of gene N. *J. Gen. Virol.* 47: 89-96.
- MASSUN, E. (1983). Respuesta humoral en infecciones virales. En resumen del Simposio: Antigenos virales y respuesta inmune en

las enfermedades virales. 1º Congreso Arg. de Virología: 14-22.

MATHUR, A., Kulshrestha, R. & Chaturvedi, V (1987). Induction of secondary immune response by reactivated Japanese encephalitis virus in latently infected mice. *Immunol.* 60: 481-484.

MC CULLOUGH, K.C. & Crowther, J.R. (1985a). The protective immune response against Foot-and-Mouth disease virus: relationship to virion topography. *F.M.D.Bull.* 23 (8): 1-5.

MC CULLOUGH, K.C., Parkinson, D., Cranenburg, C. & Crowther, J.R. (1985b). The relevance of opsonisation of FMD virus to the phagocytic immune defence of bovine. *Immunology* .

MC CULLOUGH, K.C. & Langley, D. (1985c). Anti-idiotope vaccines: can they exist?. *Vaccines* 3: 159-64.

MC CULLOUGH, K.C. & Crowther, J.R., Carpenter, W.C., Brocchi, E., Capucci, L., De Simone, F., Xie, Q & Mc Cahon D. (1986). Immune protection against Foot-and-Mouth Disease studied using virus neutralizing concentrations of monoclonal antibodies. *Immunol.* 58: 421-428.

MC CULLOUGH, K.C. & Crowther, J.R., Carpenter, W.C., Brocchi, E., Capucci, L., De Simone, F., Xie, Q & Mc Cahon D. (1987). Epitopes on Foot-and-Mouth disease Virus particles. I. Topography. *Virology* 157: 516-525.

MC KENDALL, R.R., Klassen, T. & Baringer, J.R. (1979). Host defense in Herpes simplex infection of the nervous system: Effect of antibody in disease and viral spread. *Infect. Immun.* 23: 305-311.

MC MICHAEL, A.J., Askonas, B.A., Webster, R.G. & Laver, W.G. (1982). Vaccination against influenza, B-cell or T-cell immunity?. *Immunol. Tod.* 3 (10): 256-260.

MC VICAR, J.W. & Suttmoller, P. (1976). Growth of Foot-and-Mouth Disease Virus in the upper respiratory tract of non-immunized, vaccinated and recovered cattle after intranasal inoculation. *J.Hyg.Camb.* 76: 467-481.

MELDEN, R.H. (1979a) Antibody response against Foot-and-Mouth Disease (FMDV) I. Response measured in sera of vaccinated steers with complete virus, trypsin treated virus, 12 S virus subunits and heterologous virus. *Zbl. Vet. Med. B* 26: 273-283.

MELDEN, R.H. (1979b) Antibody response against Foot-and-Mouth Disease (FMDV) II. Response measured in fractionated sera of

infected steers with complete virus, trypsin treated virus, 12 S virus subunits, VIA and heterologous virus. Zbl. Vet. Med. B 26: 358-365.

MELNICK, J.L. (1985). Enteroviruses. En Virology. Ed. Fields. : 739-794.

MERIGAN, T.C., Hall, T.S., Reed, S.D. & Tyrrel D.A.J. (1973). Inhibition of respiratory virus infection by locally applied interferon. Lancet ii 563-567.

MESTAN, J. & Digel, W. (1986). Antiviral effects of recombinant tumour necrosis factor in vitro. Nature 323: 816-819.

MILICH, D. & Mc Lachman, A. (1986). The nucleocapsid of Hepatitis B is both a T cell independent and a T cell dependent antigen. Science 234: 1398-1401.

MISHEL SHIBII EDS. 1980. Selected Methods in cellular immunology. Cap. 7.

MOLLER, J.R., Traum, J. (1942). Characteristic and nature of FMDV. Yearbook Agr. V.S. Dept. Agr.: 263-275.

MORGAN, D.O., Bachrach, H.L. & Mc Kercher, P.D. (1970). Quantitation of the antigenicity and immunogenicity of purified Foot-and-Mouth Disease Virus Vaccines for swine and steers. Appl. Microbiol. 20 (5): 770-774.

MORGAN, D.O., Robertson, B.L., Moore, D.M., Timpone, C.A. & Mc Kercher P.D. (1984).. Aphoviruses: Control of Foot-and-Mouth Disease with genetic engineering vaccines. Ed. por E. Kouratak. Marcel Dekker, inc. : 135-145.

MOUSSA, A.A., Daoud, A. & Omar, A. (1987). Isolation of Foot-and-Mouth Disease Virus from camels with ulcerative disease syndromes. J.Egypt.Vet.Med.Ass. 47: 219-229.

MOWAT, B.N. & Chapman, W.G. (1962). Growth of FMDV in a fibroblastic cell line derived from Hamster kidney. Nature 194: 253-255.

MURDIN, A.D. (1986). Synthetic peptides against Foot-and-Mouth Disease. Vaccine 4: 210-211.

MURDIN, A.D. & Doel T.R. (1987a) Synthetic peptide against foot-and-mouth disease. I. Duration of the immune response and priming in guinea pigs, rabbits and mice. J. of Biol. Stand. 15: 39-51.

MURDIN, A.D. & Doel T.E. (1987b) Synthetic peptide vaccines against foot-and-mouth disease. II Comparison of the response of guinea pigs, rabbits and mice to various formulations. *J. of Biol. Stand.* **15**: 58-65.

NASH, A.A., Quartey-Papaño, E. & Wildy, P. (1980). Cell-mediated immunity in herpes simplex virus-infected mice: Functional analysis of lymph node cells during periods of acute and latent infection with reference to cytotoxic and memory cells. *J. Gen. Virol.* **49**: 309-317.

NEUVEAU, P.J. (1986). The mononuclear phagocyte system. *Bull. Inst. Pasteur* **84**: 23-66.

NEWMAN, F.E., Rowlands, D.J. & Brown, F. (1973). A physico-chemical sub-grouping of the mammalian Picornaviruses. *J. Gen. Virol.* **18**: 171-180.

NEWTON, S., Clarke, B., Francis, M., Carroll, A., Rowlands, D., Skehel, J. & Brown, F. (1987). New approaches to FMDV Antigen presentation using vaccinia virus. *En Vaccines* **87**. Ed. Cold. Spring Harbor Lab: 12-21.

NICHOLSON, G.L. (1976). Transmembrane control of the receptors of normal and tumor cells. II. Surface changes associated with transformation and malignancy. *Biochem. Biophys. Acta* **458**: 1-72.

OKES, J.E. & Lausch, R.N. (1981). Role of Fc fragments in antibody mediated recovery from ocular and subcutaneous herpes simplex virus infections. *Infect. Immun.* **33**: 109-114.

OBRA, L., Morag, A. & Tiku, M (1975). Humoral immune responses to viral infections. *En Viral immunology and immunopathology*. Ed. A.L. Notkins Ac. Press.: 57-78.

OLDSTONE, M.B.A. & Dixon, F.J. (1971). Acute viral infections: Tissue injury mediated by antiviral antibody through a complement effector system. *J. Immunol.* **107**: 1274-1280.

PAUL, N.E. 1984. *Fundamental Immunology*. Cap. 4. Eds. Raven Press.

PAY, T.W.F. & HINGLEY, P.J. (1987). Correlation of 140 S antigen dose with the serum neutralizing antibody response and the level of protection induced in cattle by FMD vaccines. *Vaccine* **5** (1): 60-64.

FLAYFAIR, J.H.L. (1984). Vaccines: still needed. En *Immune intervention*. Ed. por I. Roitt. Academic Press

PEREZ, O., Sadir, A., Gaggino, O., Fernández, F., Mazzuca, B., Scodeller, E., La Torre, J.L. & Bergmann, I. (1987). Análisis de las modificaciones genómicas y serológicas del serotipo A en el campo entre 1980-1987 en la Argentina. Res. # 65 Congreso S.A.I.B.

FLEDBER, R.A. (1961). Formation and release of Foot-and-Mouth Disease Virus from bovine cell kidney cell cultures. *Virology* 13: 366-367.

FOLATNICK, J. & Bachrach, H.L. (1960). Metabolic studies of bovine kidney infected with Foot-and-Mouth Disease Virus. *Virology* 12: 450-462.

FOLATNICK, J. (1980). Isolation of a Foot-and-Mouth Disease polyuridic acid polymerase and its inhibition by antibody. *J. Virology* 33: 774-779.

PORTER, D.D. (1975). Persistence of viral infection in the presence of immunity. En *Viral immunology and immunopathology*. Ed A.L. Notkins. Academic Press: 189-200.

PRINCE, O.A., Jennon, A.B., Murphy, B.R., Walsh, E.E. Howard, R.L. & Charnock, R.M.. (1986). Enhancement of respiratory syncytial virus pulmonary pathology in cotton rats by prior intramuscular inoculation of formalin-inactivated virus. *J. Virology* 57: 721-727.

PRINGLE, C.R. (1964). Genetic aspects of the thermal inactivation properties of Foot-and-Mouth Disease Virus strains. *Bull. Offic. Intern. Epizoot.* 61: 619-628.

RAJER-ZISHAN, B., Phuc-Cahn, B., Roaner, M., Moller, J. & Bloom, B. (1987). Role of NK cells in protection of mice against HSV 1 infection. *J. Immunol.* 138 (3): 884-888.

RAJCANI, J., Blaskovic, D., Svoobodova, J., Ciampor, F., Huckva, D. & Stanekova, D. (1985). Pathogenesis of acute and persistent murine herpesvirus infection in mice. *Acta Virologica* 29: 51-60.

RAJCANI, J., Ciampor, F., Sabo, A., Libikova, H & Rosenbergova, M. (1977). Activation of latent herpesvirus hominis in explants of rabbits trigeminal ganglia: the influence of immune serum. *Arch. Virology* 53: 55-69.

- RAPHAL, R., Cogliano, R.C., Shande, J.W., Small, P.A. (1979). Serum antibody prevents lethal murine influenza pneumonitis but not tracheitis. *Infect. Immun.* 25: 992-997.
- REED, L. & Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty percent end points. *Am. J. Hyg.* 27: 493-495.
- RITCHIE, A.E. & Ferneluis, A.L. (1969). Characterization of Bovine Disease Diarrhea Viruses. *Arch. Ges. Virusforsch* 28: 369-389.
- RIZVI, M., Chaturvedi, U., Nagar, R. & Mathur, A. (1987). Macrophage functions during dengue infections: antigenic stimulation of B cells. *Immunol.* 62: 495-498.
- RODGERS, B.C. & Nims, C.A. (1981). Interaction of influenza virus with macrophages. *Inf. & Imm.* 31 (2): 751-757.
- ROEDER, P. & LeBlanc S. (1987). The detection and typing of FMDV by ELISA, a sensitive, rapid and reliable technique for primary diagnosis. *Res. Vet. Sci.* 43: 225-232.
- ROITT, I., Brostoff, S. & Male, D. (1985). *En Immunology*. Edit. por Gower Medical Publishing. London: Cap. 8.
- ROUSE, B. & Babiuk, L. (1978). Mechanisms of recovery from Herpesvirus infection. A review. *Can. J. Comp. Med.* 42: 414-427.
- ROTH, J. (1986). Recent advances in basic bovine immunology. A seminar in bovine immunology: 1-12.
- ROSEMBERG, F.J. & Aug de Mello, P. (1974) Portadores de virus aftoso. Proceso terminal de la infección o eslabón en la cadena epidemiológica de la enfermedad. *Bol. Centr. Panam. Fiebr. Aft.* 13-16: 50-60.
- ROSEMBERG, F.J. (1986). Estructura social y epidemiología veterinaria en América Latina. *Bol. Ctr. Pan. Fiebr. Aft.* 52: 3-23.
- ROSSI, M.S., Sadir, A.M., Schudel, A.A. & Palma, E. (1988). Detection of Foot-and-Mouth Disease Virus with DNA probes in bovine esophageal-pharyngeal fluids. *Arch. Virol.* 99: 67-74.
- ROUSE, B.T., Miller, L.S., Turtinen, L. & Moore, R. (1985). Augmentation of immunity to HSV by in vitro administration of interleukyne 2. *J. Immunol.* 134 (2): 926-930.
- ROWLANDS, D.J., Sangar, D.V. & Brown, F. (1971). Relationship of the antigenic structure of Foot-and-Mouth Disease Virus to

the process of infection. *J. Gen. Virol.* 12: 85-93.

ROWLANDS, D.J., Sangar, D.V. & Brown, F. (1975). A comparative chemical and serological study of the full and empty particles of Foot-and-Mouth Disease Virus. *J.Gen.Virol.* 26: 227-238.

RUECKERT, R.R. (1971). En "Comparative virology". Edit. por K. Maramoroch & E. Kurstak. Academic Press, New York.: 255-306.

RUECKERT, R.R. (1976). On the structure and morphogenesis of Picornaviruses. En "Comprehensive Virology" Vol. 6. Ed. por H. Fraenkel-Conrat & R.R. Wagner. Plenum, New York.: 131-213.

RWEYEMAMU, M.M., Terrey, G. & Paez, T.W.F. (1981). Stability and immunogenicity of empty particles of Foot-and-Mouth Disease Virus. *Arch. Virol.* 59: 69-74.

SABIN, A. Alvarez, R. & Mezquita, J. (1960). Live, orally given poliovirus vaccine. *J. Am. Med. Ass.* 173: 1521-1529.

SADIR, A., O.López, F. Marcovecchio, B. Tiraboschi, I. Bergmann, La Torre, J. & Schudel. (1988). The duration of immunity in cattle after experimental infection with Foot-and-Mouth Disease Virus. Impacto de las enfermedades virales en el desarrollo de países de Latinoamérica y de la región del Caribe. 2ª Conferencia Internacional. Mar del Plata, Argentina.

SANGAR, D.V., Harris, T.J.R. & Brown, F. (1977). A protein covalently linked to Foot-and-Mouth Disease Virus RNA. *Nature* 268: 648-650.

SANGAR, D.V. (1979). The replicat of picornavirus. *J.Gen.Virol.* 45: 1-13.

SCHMIDT, S., Schmidt, J.H. & Hansen, A. (1936). The use of acetylenimine in the production of inactivated Foot-and-Mouth Disease vaccines. *Rev. d'Immun.* 2: 359-368.

SCHUDEL, A.A., Sadir, A.M., Colilla, I. & Rivenston, S. (1982). Susceptibility of squirrel and cebus monkeys to Foot-and-Mouth Disease Virus. *J.Med.Primatol.* 11: 126-132.

SCHUDEL, A.A. & Sadir, A.A. (1986). En *Adel. Microbiol. Enf. Infec.* 2: 22-36.

SCHUDEL, A.A., Palma Zuloaga, B., Fernández, F., Borca, M.V. & Marcovecchio, F. (1985). Indirect immunofluorescence and immunodiffusion tests in the detection of antibodies to Foot-and-Mouth Disease Virus. *Vet. Res. Comm.* 9 (1): 15-23.

SCODELLER, E.A., Lebendiker, M.A., Dubra, M.S., Crespo, O.A., Basara, B.O., La Torre, J.L., & Vazquez, C. (1984) Inactivation of Foot-and-Mouth Disease Virus Vaccine by activation of virus-associated endonuclease. *J.Gen.Virol.* 65 (9): 1567-1574.

SCOTT, F.N., Cottral, G.E. & Gallunas, P. (1966). Persistence of Foot-and-Mouth Disease Virus in external lesions and saliva of experimentally infected. *Am. J. Vet. Res.* 27: 1531-1536.

SELLERS R.F. (1970). Inhalation, persistence and dispersal of Foot-and-Mouth Disease Virus by man. *J.Hyg. (Camb.)* 68: 565-573.

SELLERS, R.F. (1971). Quantitative aspects of the spread of Foot-and-Mouth Disease. *Vet. Bull.* 91: 431-439.

SHAHAN, M.S. (1962). The virus of Foot-and-Mouth Disease. *Annals N.Y. Acad. Sci.* 101 (2): 444-454.

SHERRY, B. Nooner, A. Colonna, R. & Rueckert, R. (1986). Use of monoclonal antibodies to identify neutralization immunogens on a common cold picornavirus human rhinovirus type 14. *J. Virol* 57: 246-255.

SISSONS, J.G.F. & Oldstone, M.B.A. (1985). Host response to viral infections. *En Virology*. Ed. por B.N. Fields. Raven Press N.Y. : 265-280.

SIGEL, H.M., Huggins, E.M., Wood, D.M. & Ghaffar, A. (1984). Selective action of cyclophosphamide on T and B cell activity. *En Chemical regulation of immunity in veterinary medicine*. Ed. Alan A. Liss, N.Y.: 241-248.

SKINNER, H.H., 1959. One-week-old white mice as test animals in foot and mouth disease research. *Proc. XVth. Int. Cong. Stockholm*, 1: 195-199.

SUBAK-SHARPE, H. (1961). The effect of passage, history, route of inoculation, virus strain and host strain on the susceptibility of adult mice to the virus of FMD. *Arch. fur Ges. Virusforsch* 3: 373-387.

SUCKLING, A.J., Jaguelman, S. & Wells, (1982). Immunoglobulin synthesis in nude (nu/nu), nu/+ and reconstituted nu/nu mice with a demyelinating strain of Semliki Forest virus. *Clin. Exp. Immunol.* 47: 283-288.

SUTMOLLER P. & Cottral G.E. (1967) Improved techniques for the detection of foot and mouth disease virus in carrier

cattle. Arch. Ges. Virusforsch 21: 170-177.

SUTMOLLER, P., Cottral, G.E., Mc Vicar J.W. (1967). A review of the carrier state in Foot-and-Mouth Disease. U.S. Livestock Sanitary Assoc. Proc. 71: 386-395.

SUTMOLLER, P. & Mc Vicar, J.W. (1976a). Pathogenesis of Foot-and-Mouth Disease: The lung as an additional portal of entry of the virus. J.Hyg. (Camb.) 77 (2): 235-243.

SUTMOLLER, P. & Mc Vicar, J.W. (1976b). Pathogenesis of Foot-and-Mouth Disease: Clearance of the virus from the circulation of cattle and goats during experimental viraemia. J.Hyg. (Camb.) 77 (2): 245-253.

TALBOT, P, Rowlands, D.J., Burroughs, J.N., Sanger, D.V. & Brown, F. (1973). Evidence for a group protein in Foot-and-Mouth Disease particles. J.Gen.Virol. 19: 369-380.

TAYLOR, P.M. & Askonas B.A. (1986). Influenza nucleoprotein-specific cytotoxic T cell clones are protective in vivo. Immunol. 58: 417-420.

TERPSTRA, C., Frenkel, S., Straver, P.J., Baterling, S.J. & Van Bekun, J.G. (1976). Comparison of laboratory techniques for the evaluation of the antigenic potency of Foot-and-Mouth Disease Virus cultures and vaccines. Vet. Microbiol. 1: 71-83.

TERRY, G.M., Clark, R.F. & Rweyenamu, M.M. (1982). Variations in the buoyant density of Foot-and-Mouth Disease Virus strains. Arch. Virol. 71: 333-341.

TEW, J.G., Mandel, T.E. & Burgess, A.U. (1979). Retention of intact HSA for prolonged periods in the popliteal lymph nodes of specifically immunized mice. Cell. Immunol. 45: 207-212.

THOMAS, A., Woortmeijer, R., Baterling, S & Maelen, R. (1988). Evidence for more than one important, neutralizing site on Foot-and-Mouth Disease Virus. Arch. Virol. 99: 237-242.

THORNE, H.V. (1962). Kinetics of cell infection and penetration by the virus of Foot-and-Mouth Disease. J.Bacteriol. 84: 929-942.

VAN BEKKUN, J.G. & Frenkel, S. (1959). Diagnostico diferencial en Fiebre Aftosa. Y. Diergeneesk 84: 1159-1164.

VAN BEKUN, J., Fish, R. & Nathens, I. (1969). Immunological responses in Dutch cattle vaccinated with Foot-and-Mouth vac-

cines under field conditions: neutralization antibodies response and immunity to O, A and C types. *Am. J. Vet. Res.* 30: 2125-2129.

VANDE WOUDE, G.F., Swaney, J.B. & Bachrach, H.L. (1972). *Bioch. Biophys. Res. Commun.* 48: 1222-1228.

VAN REGERMONTEI, M.H.V. (1966). Plant virus serology. *Adv. Virus Res.* 1: 207-271.

VAZQUEZ, C., Denoya, C.D., La Torre, J.L. & Palma, E. (1979). Structure of Foot-and-Mouth Disease Virus capsid. *Virology* 97: 195-200.

WARDLEY, R.C., Chapman N.C. & Garland A.J.M. (1979) A blastogenic test for Foot and Mouth disease. *J. Hyg.* 83: 507.

WHO (1955). Polymyelitis. Monograph series # 26. Ed. Palais des Nations.

WILD, T.P. & Burroughs, J.N. (1969). Surface structure of Foot-and-Mouth Disease Virus. *J. Gen. Virol.* 4: 313-320.

WONG, C.Y., Woodruff, J.L. & Woodruff, J.F. (1977). Generation of cytotoxic T lymphocytes during Cocksackievirus B-3 infection. II. Characterization on effector cells and demonstration of cytotoxicity against viral-infected myofibers. *J. Immunol.* 118 (4): 1165-1169.

WONG, G. & Goeddel, D. (1986). Tumor necrosis factor alpha and beta inhibit virus replication and synergize with interferons. *Nature* 323: 819-822.

WOOL, S.H., Polatnick, J. & Knudsen R.C. (1982). Ultrastructural changes and antigen localization in tissues from Foot-and-Mouth Disease Virus-infected Guinea-pigs. *Vet. Microbiol.* 7: 391-400.

WINTHER, M.D., Allen, G., Bomford, R.H. and Brown F. (1985). Bacterially expressed antigenic peptide from Foot and Mouth Disease Virus capsid elicits variable immunologic responses in animals. *J. Immunol.* 136(5): 1835-1840.

WYDE, P.R., Wilson, M.R. & Cate, T.R. (1982). Interferon production by leukocytes infiltrating the lungs of mice during primary influenza virus infection. *Inf. & Imm.* 36 (3): 1249-1255.

YAP, K.L., Braciale, T.J., Ada, G.L. (1979). Role of T cell function in recovery from influenza infection. *Cell. Immunol.* 43: 341-351.

YEH, J. (1973). Characterization of virus-specific RNAs from subacute sclerosing panencephalitis virus-infected CV-1 cells. J.Virol. 12: 962-968.

ZINKERNABEL, R. Adler, B. & Holland, J. (1978). Cell mediated immunity to vesicular stomatitis virus infection in mice. Exp. Cell. Biol. 46: 53-70.

ZINKERNABEL, R.M. & Doherty, P.C. (1979). MHC restricted cytotoxic T cells: Studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T cell restriction specificity, function and responsiveness. Adv. Immunol 27: 51-177.