

Tesis de Posgrado

Efecto de diferentes inmunomoduladores en la respuesta inmune al virus de la fiebre aftosa en un modelo experimental y en el huésped natural

Pérez Filgueira, Daniel Mariano

1996

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:

Pérez Filgueira, Daniel Mariano. (1996). Efecto de diferentes inmunomoduladores en la respuesta inmune al virus de la fiebre aftosa en un modelo experimental y en el huésped natural. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2838_PerezFilgueira.pdf

Cita tipo Chicago:

Pérez Filgueira, Daniel Mariano. "Efecto de diferentes inmunomoduladores en la respuesta inmune al virus de la fiebre aftosa en un modelo experimental y en el huésped natural". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1996.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2838_PerezFilgueira.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**EFFECTO DE DIFERENTES INMUNOMODULADORES EN LA RESPUESTA
INMUNE AL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EN UN MODELO
EXPERIMENTAL Y EN EL HUESPED NATURAL**

Daniel Mariano Pérez Filgueira

Director de Tesis: Dra. Ana María Sadir

Instituto de Virología
Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - Castelar

Tesis presentada para optar al grado de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

1996

52

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**EFFECT OF DIFFERENT IMMUNOMODULATORS IN THE IMMUNE
RESPONSE ELICITED AGAINST FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS IN
EXPERIMENTAL AND NATURAL MODELS**

Daniel Mariano Pérez Filgueira

Thesis Director: Dra. Ana María Sadir

Instituto de Virología
Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - Castelar

1996

RESUMEN

Se estudió la respuesta de isotipos en ratones de la cepa Balb/c luego de la infección experimental con VFA o de la inmunización con vacunas formuladas con virus inactivado con y sin el agregado de adyuvantes. Se utilizaron tres inmunomoduladores para formular diferentes vacunas usando vehículos acuosos y oleosos: la fracción hidrosoluble de pared celular de *Micobacterium sp.* (PCM), un extracto purificado de lipopolisacárido de *Brucella ovis* (LPS) y una amina lipoidal sintética, Avridine (AV). Los animales infectados mostraron respuestas dominadas por el isotipo IgG2b y seguidas por IgG1, IgG2a e IgG3, entre los 14 y 60 d.p.i. No se detectó actividad de IgG3 específicas para el VFA en ninguno de los animales vacunados. Las formulaciones conteniendo adyuvantes presentaron altos y persistentes niveles de IgG2b, similares a los de los animales infectados, hasta los 180 d.p.i., mientras que en las vacunas convencionales este isotipo fue detectado sólo hasta los 60 d.p.i. Los animales vacunados con formulaciones conteniendo estos adyuvantes presentaron una resistencia aumentada al desafío viral realizado a los 210 d.p.i., en relación con aquellos inmunizados con vacunas convencionales.

Dos de estos inmunomoduladores (PCM y AV) fueron también probados en bovinos, incluidos en vacunas oleosas. Se elaboraron 11 diferentes formulaciones que fueron inoculadas en grupos de 8 animales. Nuestros resultados muestran que la inclusión de cualquiera de estos dos adyuvantes en sus mayores concentraciones a vacunas formuladas con baja cantidad de antígeno viral, indujeron niveles de anticuerpos similares a los de vacunas conteniendo el doble de virus inactivado sin el agregado de adyuvantes. Los isotipos de IgG inducidos en estas vacunas experimentales también diferían de las formulaciones convencionales y control sin adyuvantes. Se discute la posible relación entre estos cambios inducidos y la inmunidad conferida en cada caso.

ABSTRACT

The IgG isotype response in Balb/c mice infected with FMDV or immunized with different vaccine formulations using inactivated virus particles as antigen was analyzed at various times post-inoculation. Three immunomodulators, were employed to formulate different vaccines using aqueous and oil vehicles: a water-soluble fraction of the cell wall of *Mycobacterium* sp.(PCM), a purified extract of lipopolysaccharide from *Brucella ovis* (LPS) and a synthetic lipoamide, Avridine (AV). Infected animals between 14 and 60 d.p.i. showed responses dominated by IgG2b, followed by IgG1, IgG2a and IgG3, respectively. No IgG3 activity was detected in vaccinated animals at any time. With formulations including immunomodulators, persisting high levels of IgG2b (similar to those of infected animals) were detected until 180 d.p.i. while with conventional vaccines IgG2b responses were detected up to 60 d.p.i. Animals vaccinated with formulations including these immunomodulators presented an augmented resistance to viral challenge at 210 d.p.i. in relation with those immunized with conventional vaccines.

Two of these immunomodulators (PCM and AV) were also tested in oil vaccines in experiments conducted in bovines. Eleven different formulations were used to vaccinate 8 animals per group. Our results showed that the inclusion of these adjuvants in the higher concentrations to vaccines formulated with a low antigen concentration, induced antibody levels similar to those of vaccines containing twice the concentration of virus and no adjuvants. The IgG isotypes profiles induced in these experimental vaccines also differed from the elicited by the conventional and control vaccines without immunomodulators. The possible relationship of these differences in the isotype response and protection is discussed.

*A mis padres, Angélica y Marcial,
a mis hermanos, Silvia y Luis,
y a mis sobrinos, Anita, Laura,
Agostina y Mauricio*

INDICE

INTRODUCCION	1
1. LA FIEBRE AFTOSA	2
1.1. Reseña general	2
1.2. Sintomatología, transmisión y estado portador	3
1.3. Distribución geográfica	4
1.4. Impacto económico y medidas de control	5
2. EL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA	8
2.1. Características generales de los Picornavirus	8
2.2. Características generales del VFA	9
2.2.1. Estructura de la cápside	10
2.2.2. Características antigénicas del VFA	12
2.2.3. Genoma.	15
i) Poli (C)	15
ii) Poli (A)	16
iii) VPg	16
iv) Regiones no codificantes	16
2.3. Ciclo de replicación del VFA	17
2.3.1. Adsorción	17
2.3.2. Penetración y desnudamiento	18
2.3.3. Mecanismo de replicación del ARN genómico	18
2.3.4. Traducción, síntesis de proteínas virales y formación del virión maduro	19
2.3.5. Empaquetamiento del ARN viral	20
2.3.6. Liberación del virión	21

3. LA RESPUESTA INMUNE	22
3.1. Subpoblaciones de linfocitos y citoquinas	23
3.2. Las inmunoglobulinas. La variación isotípica, idiotípica y alotípica	26
3.3. Respuesta inmune a una infección viral	29
3.4. Respuesta inmune frente al VFA	31
4. VACUNAS CONTRA EL VFA	36
4.1. Obtención del antígeno viral	36
4.2. Inactivación del virus	38
4.3. Concentración del antígeno	38
4.4 Vacunas en uso	39
4.5. Vacunas experimentales	41
5. ADYUVANTES	43
5.1. Adyuvantes utilizados en este trabajo	44
i) Lipopolisacáridos	44
ii) Pared celular de Mycobacterium	46
iii) Avridine	47
OBJETIVOS	49

MATERIALES Y METODOS	52
1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	53
1.1. Ratones	53
1.2. Bovinos	53
2. VIRUS	53
2.1. Obtención de virus	54
2.2. Inactivación de virus	55
2.3. Purificación de virus	55
3. FORMULACIÓN DE LAS VACUNAS	56
3.1. Vacunas para ratón	56
3.2. Vacunas para bovino	56
4. EXTRACCIÓN DE SANGRE, OBTENCIÓN DE PLASMA Y SUERO	58
5. TITULACIONES	59
5.1. Titulación de virus	59
5.2. Titulación de anticuerpos neutralizantes	59
6. DURACIÓN DE INMUNIDAD	59

7. PRUEBAS DE ELISA	60
7.1. Test de ELISA indirecto para detectar los isotipos de IgG anti-VFA en plasma de ratón	60
7.1.1. Puesta a punto del ELISA para detectar isotipos de IgG murinos anti-VFA	61
7.1.2. Especificidad de los reactivos para detectar isotipos murinos	62
7.1.3. Estandarización de los títulos de ELISA anti-isotipo	63
7.2. Test de ELISA en fase líquida para suero de bovino	64
7.3. Test de ELISA indirecto para detectar los isotipos de IgG anti-VFA en suero de bovino	65
7.3.1. Puesta a punto del ELISA para detectar isotipos de IgG bovinos anti-VFA.	66
8. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	67
RESULTADOS	68
Experimentos en ratón	69
1. Determinación de los isotipos de IgG específicos contra VFA	70
1.1. Especificidad de los reactivos para detectar isotipos murinos	70
1.2. Estandarización de los títulos de los ELISA anti-isotipo	70
2. Perfiles de isotipos de animales infectados	73

3. Perfiles de isotipos de animales inmunizados con vacunas convencionales	75
4. Perfiles de isotipos de animales inmunizados con vacunas experimentales	75
Experimentos en bovino	80
1. Selección de las formulaciones a utilizar en la experiencia	81
2. Títulos de anticuerpos totales anti-VFA con las diferentes formulaciones	82
2.1. Efecto de la cantidad de antígeno en la respuesta humoral inducida	87
2.2. Efecto de la inclusión de los adyuvantes en las vacunas con la menor concentración de antígeno	89
2.3. Efecto de la inclusión de los adyuvantes en las vacunas con la mayor concentración antigénica	92
3. ELISA para detectar isotipos de IgG anti-VFA presentes en suero bovino	93
3.1. Puesta a punto del ELISA para detectar isotipos de IgG bovinos específicos para VFA	93
3.2. Perfiles de isotipos de animales inmunizados con las diversas vacunas	95
DISCUSION	103
CONCLUSIONES	120
BIBLIOGRAFIA	124

INTRODUCCIÓN

1. LA FIEBRE AFTOSA

1.1. Reseña general

La fiebre aftosa es la más contagiosa de las enfermedades virales que afectan a los animales de pezuña partida. Aunque suele presentarse con mayor frecuencia en bovinos y porcinos, su rango de posibles huéspedes naturales puede abarcar a variedades caprinas, ovinas y decenas de especies silvestres^{170, 200}.

Dependiendo de la especie animal y la cepa viral la severidad de los síntomas clínicos va desde un porcentaje variable de mortandad en bovinos y porcinos jóvenes¹⁴ hasta infecciones prácticamente asintomáticas en ovejas y cabras⁴⁰. Cada una de las especies antes mencionadas, cumple un rol diferente en el mantenimiento y diseminación de la enfermedad.

Mientras que el ganado bovino actuaría como principal diseminador, las especies ovinas cumplirían su papel en el mantenimiento²⁰⁵, los porcinos funcionarían como huéspedes amplificadores²⁰⁴ y otras especies como llamas, antílopes, ciervos y jabalíes, entre otros, tendrían importancia por el hecho de poder portar y transmitir el virus a los animales domésticos.

A pesar de haber sido descrita ya en la Edad Media⁹² y de ser la primera enfermedad animal donde se reportó a un virus como su agente etiológico¹³⁰, la Fiebre Aftosa aún continua afectando a extensas áreas del planeta incluyendo África, Europa oriental y varios países de Sudamérica y Asia, incluyendo el Lejano y Medio Oriente.

1.2. Sintomatología, transmisión y estado portador

La Fiebre Aftosa posee las características de un enfermedad febril de curso agudo acompañada por la aparición de vesículas epiteliales de ocurrencia variable conteniendo virus infeccioso, que usualmente suelen afectar la boca, las pezuñas, el rumen y las mamas. La aparición de estas vesículas, que puede complicarse con la ocurrencia de infecciones bacterianas, hace dificultosa la alimentación y traslado del animal²⁰⁷. Los casos fatales se circunscriben a individuos jóvenes, en especial de bovinos y porcinos, los cuales pueden desarrollar cuadros de miocarditis con determinadas cepas virales.

Durante la infección natural, la puerta de entrada más común es el tracto respiratorio superior^{148, 41}. Las especies porcinas parecen más susceptibles que otras a la infección por el tracto digestivo mientras que las lesiones en la piel pueden también constituir una vía de acceso para el virus. En todos los casos muy pocas unidades infecciosas son suficientes para iniciar el proceso infectivo, una de las razones de la gran facilidad de contagio.

Dentro de las dos a cuatro horas después de la infección se puede aislar virus de las secreciones del tracto respiratorio superior⁶⁹, siendo la orofaringe y los tejidos linfoides asociados, los sitios de replicación primarios⁴¹. De la viremia resultante, se establecen los sitios de replicación secundarios en los tejidos de predilección: epitelio podal, epitelio lingual, glándula mamaria y otros órganos internos¹⁷⁹.

A pesar de que la secreción de virus se produce ya desde la incubación temprana de la enfermedad con pocos o nulos signos clínicos, es luego de la replicación secundaria que se produce la mayor diseminación de partículas virales²⁰².

La respuesta inmune inducida contra el virus es la responsable de la desaparición de la viremia y la posterior reconstitución de los tejidos dañados, en el lapso de 15 a 20 días. Luego de la infección, si bien en general los animales se recuperan completamente, algunos de ellos pueden permanecer persistentemente infectados. Este estado de portador puede durar desde pocas semanas hasta años dependiendo de la especie^{218, 228}, y puede también producirse luego de infecciones subclínicas o en animales con una inmunidad parcial o insuficiente. Estas condiciones suelen presentarse en zonas endémicas para el VFA donde los animales están periódicamente expuestos al virus y mantienen bajos títulos de anticuerpos neutralizantes (AcN). En estos casos la replicación se da en la orofaringe, ya que la inmunidad humoral previene contra la generalización de la enfermedad¹⁹⁹.

La importancia del estado portador radica no sólo en el hecho de que estos animales funcionen como reservorio natural del virus sino también en la posibilidad de que el virus genere variantes durante la replicación en los mismos. Fueron reportados cambios en la virulencia de virus provenientes de animales portadores por Sutmoller *et al.*²¹⁸, como así también variaciones en la antigenicidad^{82, 100}. Las variantes así surgidas pueden escapar a la inmunidad generada por la vacunación en el resto de la población susceptible.

1.1.4 Distribución geográfica

La Fiebre Aftosa representa una enfermedad de amplia distribución geográfica, siendo enzoótica en todos los continentes con excepción de Australia, Nueva Zelanda, Japón, Islas Británicas y Europa occidental¹⁵². En el continente americano, Estados Unidos, países de Centro América desde

el norte de Panamá e Islas del Caribe así como Chile, región norte del Chocó en Colombia, Guayana Francesa, Guyana y Surinam en América del Sur se encuentran libres de la enfermedad. Cabe mencionar la situación epidemiológica del Uruguay donde no se ha registrado la aparición de la enfermedad desde Julio de 1990, por lo que ha sido declarado país libre sin vacunación (Informe OIE, 1993).

La Argentina no ha presentado focos de infección desde el mes de Abril de 1994, mientras que la Patagonia Argentina (sur del paralelo 42), ya ha sido declarada zona libre de la enfermedad, registrándose el último brote en Tierra de Fuego en el año 1966 (SENASA, Boletín informativo, Julio 1994).

Esta situación ha permitido en 1995 el aumento de las exportaciones de carne desde la Argentina a los Estados Unidos, Comunidad Económica Europea y Brasil, como así también la apertura de mercados en el sudeste asiático (Malasia) y América del Sur (Chile)

1.1.5. Impacto económico y medidas de control

La Fiebre Aftosa constituye una de las más devastadoras enfermedades para las especies domésticas productoras de alimentos, debido a las características ya expuestas de transmisión y contagiosidad extrema, y a su amplia distribución geográfica^{15, 201}.

El alto grado de morbilidad y subsecuente debilitación, la pérdida de productividad y las lesiones asociadas a infecciones secundarias hacen de la Fiebre Aftosa un problema importante para los productores ganaderos e industrias relacionadas¹⁵¹. Las zonas afectadas en forma endémica deben afrontar serias restricciones en los mercados mundiales para la exportación de animales y de sus productos derivados, como así también los costos de la

implementación de medidas de control y erradicación, originando grandes pérdidas económicas a nivel regional⁴⁹.

En los países de la Comunidad Económica Europea se suspendió la vacunación antiaftosa en junio de 1991, luego del éxito alcanzado en el control de la enfermedad a través de las vacunaciones. Cabe señalar que entre 1993 y 1994, sin embargo, se registraron un brotes en Italia, Bulgaria y Grecia (Informe OIE, 1994).

A través de los años los brotes en las áreas libres de la enfermedad han sido erradicados por medio del sacrificio de los animales infectados y expuestos⁶². Aún cuando estos procedimientos son muy costosos, los perjuicios que acarrea la Fiebre Aftosa endémica justifican tal inversión¹⁴¹.

La mayoría de los países en los cuales la enfermedad es enzoótica o que están expuestos repetidamente a contaminaciones provenientes del exterior, procuran controlar los brotes con medidas de cuarentena y de vacunación. Las áreas afectadas son aisladas y se procede a la vacunación de todos los animales susceptibles en una ancha zona de protección³⁸. Un método que combina el sacrificio de los animales infectados con la vacunación zonal alrededor del foco infeccioso se practica en algunos países como Dinamarca y también fue utilizado para suprimir el extenso brote que ocurrió en México de 1946 a 1953¹⁴.

En América del Sur se realizan campañas de vacunación que cubren entre el 80 y el 90 % de los rumiantes existentes en la mayoría de las áreas bajo programa. En países como Argentina, el control se realiza mediante la inmunización preventiva de todo el ganado y el seguimiento epidemiológico de cualquier foco de la enfermedad.

Generalmente los focos de infección se presentan en áreas de cría extensiva con alto porcentaje de animales portadores. Estas zonas presentan la complicación adicional del nacimiento de terneros que incorpora al medio

nuevos animales susceptibles, y la existencia de una fauna silvestre que incrementa el número de reservorios (Centro Panamericano, Banco de datos, 1972-81).

Desde 1993, se puso en marcha en la Argentina el "Plan Nacional de Control y Erradicación de la Fiebre Aftosa". En la figura 1 se observa la evolución en el número de focos reportados hasta 1994. Desde abril de 1994 no se han reportado nuevos brotes de Fiebre Aftosa en el país.

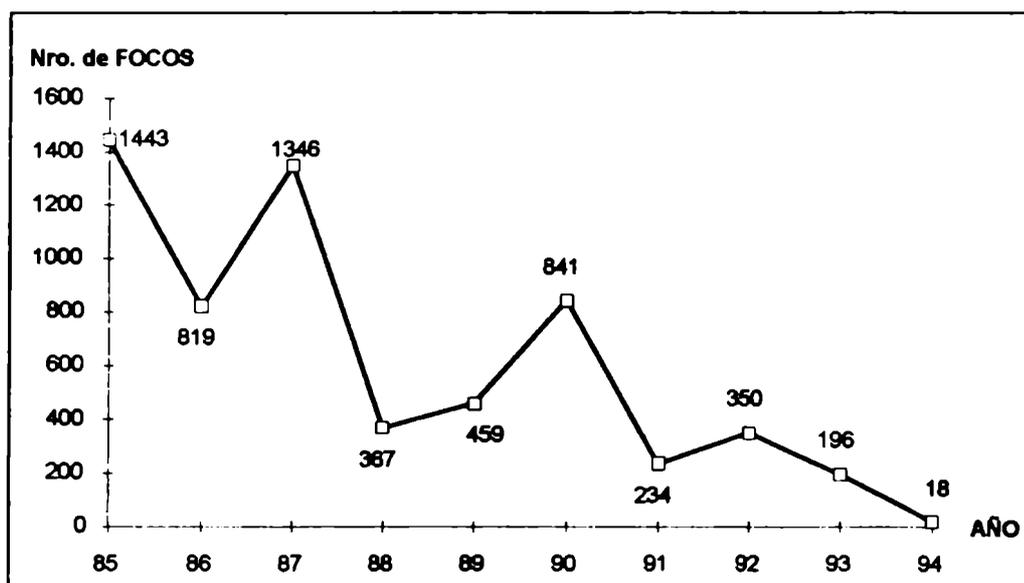


Figura 1. Registro de focos de Fiebre Aftosa en la República Argentina (Anuario 1993 del Servicio Nacional de Sanidad Animal, SENASA y datos epidemiológicos del CICV-INTA-Castelar).

2. EL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA

El virus de la fiebre aftosa (VFA), es el único representante del género aphovirus dentro de la familia Picornaviridae. Existen 7 tipos serológicos determinados por la técnica de fijación de complemento: A, O, C, SAT1, SAT2, SAT3 y Asia1 y cerca de 67 subtipos incluidos en estos 7 tipos¹⁵. A su vez, cada subtipo agrupa a cientos de cepas.

2.1. Características generales de los Picornavirus

1.- Cápside viral compuesta por 60 copias de cada una de las proteínas virales estructurales. Estas proteínas poseen una estructura tridimensional poliédrica muy conservada en todos los miembros de la familia¹.

2.- Genoma consistente de una única molécula de ARN (+) infeccioso tanto "in vivo" como "in vitro"^{2, 58}.

3.- Traducción del ARN viral en una poliproteína cuyo procesamiento, producido en varias etapas, da lugar a las proteínas estructurales y no estructurales del virus^{107, 120}.

4.- Replicación del ARN que implica la síntesis de una cadena de ARN (-), complementaria al ARN viral, y que constituye un intermediario replicativo que puede ser aislado de células infectadas. El complejo de replicación está asociado a la membrana celular e incluye a la polimerasa viral y al ARN que es utilizado como templado^{107, 206}.

En función de sus propiedades físico-químicas los Picornavirus han sido organizados en cinco géneros: enterovirus, rinovirus, cardiovirus, aftovirus y hepatovirus^{150, 59}. Cada grupo posee además características propias de infección en los hospedadores susceptibles.

Cada género es a su vez subdividido en tipos y subtipos mediante la caracterización de sus antígenos de superficie^{59, 200} (tabla 1). En el caso de la familia de los aftovirus se han detectado 7 serotipos: A, O, C, ASIA 1, ASIA 2, ASIA3 y SAT1, con diversa distribución geográfica.

Tabla 1. Características generales de los Picomaviridae

	Enterovirus	Cardiovirus	Rinovirus	Aftovirus
Miembros (nº de serotipos)	Polio (3) Coxsackie A (23) Coxsackie B (6) ECHO (31) Hepatitis A (1) Enterovirus (40)	Encefalomiocarditis Mengo, Thelier Maus Elberfeld Columbia SK, etc	Humanos (113) Bovinos (12)	Virus de la Fiebre Aftosa (7)
Rango de Huéspedes	Estrecho	Amplio	Estrecho	Amplio
Diámetro (nm)	22 - 28	24 - 30	24 - 30	23 - 25
Estabilidad al pH	estable a pH= 3 - 10	lábil a pH= 5 - 7 en presencia de 0.1M Cl o Br	lábil a pH <5	lábil a pH <6.5
Densidad en CICs (g/ml)	1.34	1.34	1.39 - 1.42	1.43 - 1.45
Coeficiente de sedimentación	156 S (*)	156 S (*)	149 S (*)	142 - 145 S (*)
% ARN	29	31	30	31.5

*En gradiente de sacarosa (fuerza iónica 0.04 - 0.15) pH = 7,3 - 7,6.

2.2. Características generales del VFA

El VFA consiste en una cápside desnuda de 30 nm de diámetro. Tiene un peso molecular de aproximadamente 7×10^6 Da y contiene un genoma de cerca de 8500 nucleótidos¹⁵. Su composición química es aproximadamente de un 30% ARN y un 70% proteínas¹⁹⁴.

2.2.1. Estructura de la cápside

La cápside viral posee forma icosaédrica y está compuesta por 60 copias de cada una de 4 proteínas designadas VP1, VP2, VP3 y VP4⁶² producidas por clivaje post-traducciona l de un precursor común²⁰⁰. Estas mismas cuatro proteínas estructurales también se denominan 1D, 1B, 1C y 1A, respectivamente¹⁹⁵. El virión contiene además 1 ó 2 copias de dos proteínas minoritarias denominadas VP0 (precursora de VP2 y VP4) y 3D (polimerasa viral). La estructura tridimensional de la cápside del VFA de los serotipos O y C fue determinada por la técnica de difracción de rayos X del virus cristalizado^{1, 91, 126}. Tanto VP1 como VP2 y VP3 se hallan parcialmente expuestas, mientras que VP4, la más pequeña de las proteínas estructurales, es totalmente interna³¹ (figura 2).

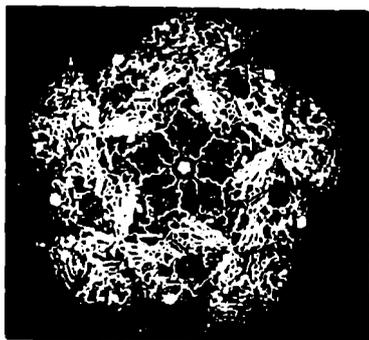


Figura 2. Representación de la estructura, a nivel atómico, de la cápside del VFA O₁ Kb. En azul se muestran los residuos de VP1, en verde los de VP2 y en rojo los de VP3 (extraído de ref. 1).

A pesar de las diferencias en la secuencia primaria VP1, VP2, VP3 adoptan una misma configuración espacial denominada "barril β ". Esta estructura consiste en ocho cadenas con estructura secundaria de hoja plegada β , ubicadas unas sobre otras y conectadas entre sí por bucles o *loops* que sobresalen de la superficie. Las cadenas β forman las paredes del barril (BIDG la anterior y CHEF la posterior). Los bucles entre las cadenas son identificados por las letras que denominan las cadenas que conectan; así el bucle G-H conecta las hojas β G y H (figura 3).

La subunidad biológica o protómero corresponde a una molécula de VP1 asociada a una de VP2 y a otra de VP3 perteneciente al área triangular adyacente, adquiriendo en conjunto una forma similar a un "barrilete". Los protómeros a su vez se agrupan en pentámeros que son la principal de las estructuras en que se disocia la partícula viral completa al ser expuesta a pH menores a 5⁹⁷.

Doce de estos pentámeros son los que se asocian para conformar la estructura icosaédrica que presenta el virión.

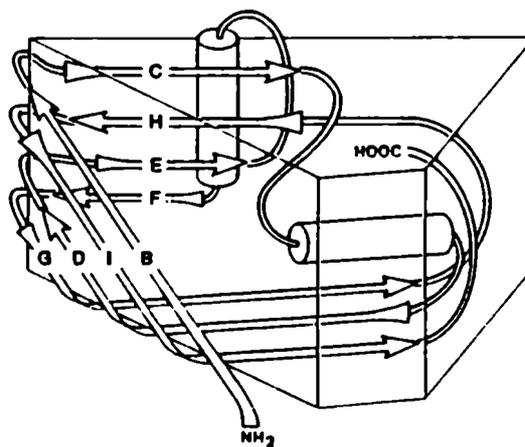


Figura 3. Representación esquemática de la estructura "barril β " que adoptan VP1, VP2 y VP3 (extraído de ref. 113). Las hojas plegadas β están representadas por flechas e identificadas por letras (B a I). Las estructuras en forma de hélice α se representan como cilindros.

2.2.2. Características antigénicas del VFA

El virión intacto tiene un coeficiente de sedimentación de 146S. La partícula 146S, por tratamiento a pH ácido, es fácilmente dissociable en subunidades virales 12S¹⁹⁴, que corresponden a pentámeros de VP1, VP2 y VP3, y un precipitado insoluble que contiene a VP4³⁹. Existe, además, otro tipo de partícula viral generada luego de la infección, que posee un coeficiente de sedimentación de 75S y que correspondería a cápsides vacías. Este producto naturalmente defectivo contiene VP1, VP3 y VP0 pero no contiene ARN²²⁹.

La proteína VP1 es la que posee los determinantes antigénicos principales del VFA y está involucrada también en el reconocimiento del receptor en la célula blanco⁹⁰. Esto queda demostrado cuando se trata al virus aftoso intacto con tripsina, lo cual lleva al clivaje de VP1 y a una consecuente pérdida de infectividad, inmunogenicidad²³⁵ y de la capacidad del virus para interactuar con su receptor en células susceptibles²¹.

A pesar de que todas las proteínas estructurales guardan características de arquitectura comunes entre serotipos existen grandes diferencias en la secuencia primaria de cada una de ellas, en especial en sus sitios expuestos (figura 4).

Para algunos miembros de la familia Picomaviridae como el rinovirus HRV 14¹⁹⁰, poliovirus¹¹³ y mengovirus¹³⁶ se ha formulado la llamada "hipótesis del cañón" que propone que el sitio de unión a la célula se encuentra en una depresión, oculto de la vigilancia del sistema inmune. El VFA, en cambio, no se ajusta a este modelo sino que al contrario, en este virus uno de los posibles sitios receptores y la porción más inmunogénica de la cápside forma una protusión desordenada, coincidente con un bucle o *loop* en la superficie del virión⁹⁰.

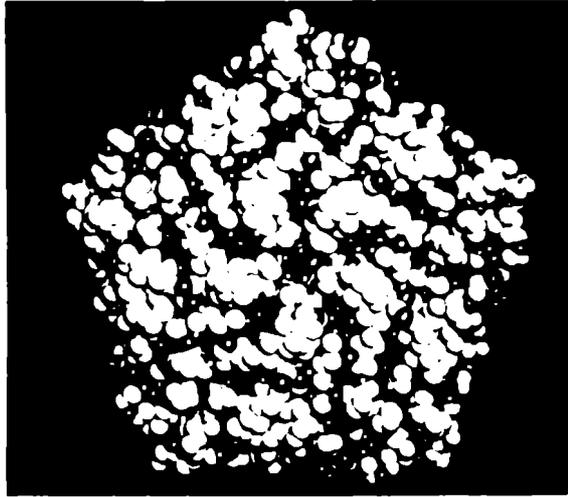


Figura 4. Variación en los residuos superficiales de un pentamero del VFA, formado por 5 copias de cada una de las proteínas estructurales. Los residuos en azul corresponden a VP1, los verdes a VP2 y los rojos a VP3. Los residuos en blanco representan los aminoácidos de cualquiera de estas 3 proteínas, que son distintos entre los serotipos A, O y C (extraído de Annual Report 1994, Institute for Animal Health, Pirbright, U.K.)

No fue hasta 1993 cuando la estructura de este bucle comprendido entre los aminoácidos 141 a 160 (*loop GH*) pudo ser definitivamente dilucidada¹³¹. Aunque tanto la secuencia como la longitud de este bucle son altamente variables entre cepas, existe dentro de él una secuencia fuertemente conservada entre serotipos. Se trata de un triplete de aminoácidos Arg-Gly-Asp (RGD) localizado en las posiciones 145-147 de VP1, que recientemente ha sido identificado como un ligando de la vitronectina, proteína que compone la matriz extracelular y miembro de la familia de receptores denominados integrinas²⁷. A pesar de esto, parecería que esta secuencia no es la única responsable de la unión del virus a la célula blanco, ya que removiendo el extremo C-terminal de VP1, la capacidad de unión del virión a las células también se ve afectada¹⁹⁰.

Basados en estudios de secuenciación de variantes antigénicas que escapan a la neutralización ejercida por anticuerpos monoclonales (AcM),

como así también, en ensayos de competencia con AcM entre virus y péptidos sintéticos que mimetizan segmentos de la partícula viral, se han identificado sitios antigénicos, en los serotipos A^{23, 198, 223}, O^{121, 167, 236} y C^{126, 140} del VFA.

Tales sitios antigénicos se hallan distribuidos en tres de las cuatro proteínas estructurales. Los epitopes virales lineales se hayan localizados en la mitad carboxiterminal de VP1, ya que fragmentos de esta zona obtenidos por diferentes métodos (clivaje con agentes químicos, péptidos sintéticos) también inducen AcN^{72, 174, 238}.

Un estrecho segmento dentro de VP1 representado por la secuencia comprendida entre los residuos aminoacídicos 140-160 (*loop GH*), antes ya mencionada por tener relación con el receptor del VFA, contendría los epitopes más importantes para la inducción de AcN^{78, 174}. Tal región dentro de VP1 fue denominada "sitio A" en el serotipo C.

Para el mismo serotipo se halló otra región antigénica, el "sitio C", que incluye los últimos quince aminoácidos (residuos 200-213) en el extremo carboxilo terminal de la misma proteína. Si bien en el serotipo C este sitio es independiente del "sitio A", en el serotipo O, ambos forman un solo sitio discontinuo, llamado "sitio 1".

En el serotipo O se ha descrito otro sitio dentro VP1, denominado "sitio 3", ocupando la región del *loop B-C* (residuos 43-45)¹²¹. Se ha reportado que ciertas sustituciones en este sitio pueden alterar la antigenicidad del "sitio 1"¹⁶⁸.

Otros estudios han determinado la existencia de epitopes B sobre VP2 y VP3^{23, 121, 223}. En el serotipo O se identificó un región antigénica denominada "sitio 2", que abarca el *loop B-C* (residuos 70-77) y el *loop E-B* adyacente (residuo 131) de VP2. Otra región de importancia antigénica, conformada por los residuos 56-58 de VP3, fue denominada "sitio 4".

En el serotipo C existe un sitio discontinuo que involucra a la regiones de las proteínas VP2 y VP3. Este sitio conformacional único llamado "sitio D" parecería ser análogo a los sitios 2 y 4 del serotipo O¹³⁹.

2.2.3. Genoma

Como otros Picornavirus, el VFA posee una única cadena simple de ARN de polaridad positiva, de aproximadamente 8500 nucleótidos. La misma presenta una pequeña proteína, VPg, covalentemente unida a su extremo 5', un segmento interno de poli (C) cerca del extremo 5' y una secuencia poli(A) en su extremo 3' ^{15, 200}. La masa molecular de ARN es aproximadamente de $2,8 \times 10^6$ Da y la infectividad del ARN libre es aproximadamente 10^8 veces menor que la del virus intacto⁷¹.

i) Poli (C)

Una de las características del VFA que es compartida con los cardiovirus es la presencia de residuos de poli (C) cercanos al extremo 5' ¹¹⁰. La longitud del poli (C) es variable (entre 100 y 200 residuos) dependiendo de la cepa viral. Así mismo, existe variación de tamaño entre virus obtenidos de diferentes aislamientos o de distintos huéspedes⁶¹.

La función precisa del poli (C) es desconocida. Se ha intentado relacionar el tamaño de este segmento con virulencia¹⁶⁶, aunque las evidencias son contradictorias⁸⁰. Esta región es potencialmente inductora de interferón, el cual dispara un mecanismo de atenuación de la replicación lítica de VFA persistente en animales portadores por la inducción de un estado antiviral en células infectadas y en las células vecinas.

ii) Poli (A)

La longitud del poli (A) varía entre 40 y 100 nucleótidos^{53, 178}. El rol de esta región no está bien determinado, pero se ha demostrado en el virus de la encefalomiocarditis y en poliovirus que los genomas con poli (A) naturalmente más corto¹⁰² o artificialmente acortados²⁰⁹, tienen una infectividad específica menor que aquellos con secuencia de poli (A) más largas, lo que indicaría que esta región es importante durante la infección.

iii) VPg

A diferencia de la mayor parte de los ARN mensajeros celulares y virales, el ARN de los Picornavirus no posee un grupo CAP ($m^7G(5')pppG(5')-Np$) en su extremo 5' ⁸⁶. Sin embargo, en varios Picornavirus, incluido el VFA, se encontró una proteína de bajo peso molecular, denominada VPg, unida covalentemente a este extremo^{103, 128}. Varias observaciones sugieren que la VPg (o su precursor) estaría involucrada en la replicación del ARN, aunque su rol preciso no es aún claro.

iv) Regiones no codificantes

El ARN viral contiene además de la región codificante dos regiones extracistrónicas. El extremo 5' no codificante (de aproximadamente 1200 nucleótidos) está formado por la región "S" hacia el extremo 5' (de 400 nucleótidos) y la región "L" (de aproximadamente 800 bases), ubicándose entre estas dos zonas el fragmento poli (C). En la región "L" se encuentra una secuencia que dirige la traducción del mensajero, también presente en células eucariotas, llamada sitio interno de entrada al ribosomal o IRES. El extremo 3' no codificante posiblemente sea relevante en la iniciación de la síntesis de ARN de polaridad negativa.

2.3. Ciclo replicativo del VFA

El ciclo infeccioso del VFA es un proceso rápido que culmina en aproximadamente 2 horas y media. La infección en cultivos celulares comienza con la adsorción; a esta le siguen la replicación del material genético y el ensamblado que suceden en el citoplasma de la célula hospedadora y por último la liberación del virus por lisis celular¹⁹⁴.

2.3.1. Adsorción

La adsorción es un proceso reversible cuya etapa inicial está gobernada por fuerzas electrostáticas, siendo requerida la presencia de cationes bivalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+}), sin los cuales el fenómeno no ocurre³⁵. Esta etapa es de particular interés ya que representa un determinante decisivo de la susceptibilidad celular a la infección, influyendo en el tropismo y la patogenia del virus⁶⁶.

El primer evento en la infección implica la unión del virus a receptores específicos localizados en la membrana plasmática de la célula⁶⁶. En cultivos de células de riñón de cerdo se encontraron entre 30 y 100 receptores por célula³⁵. Por otra parte estudios realizados en células de riñón de hámster bebé (BHK-21) demostraron la existencia de 1 a $2,5 \times 10^4$ receptores virales por célula para los virus tipo A12 y O1²⁰. Los mismos autores indicaron que los virus tipo A, O y C pueden, al menos, utilizar algunos receptores comunes. Como se mencionó anteriormente, en base a resultados de inactivación por acción de la tripsina, la VP1 ha sido postulada como la proteína viral involucrada en la unión al receptor⁵². Para la adsorción del virus a células BHK-21, es esencial la secuencia RGD en el *loop* G-H de la proteína VP1⁹⁰, aunque el virus puede penetrar también formando complejos antígeno-anticuerpo utilizando receptores de Fc en la

superficie de la célula a infectar¹³⁸. Recientemente se ha observado que el receptor en células LLC-MK2, es una integrina que actúa normalmente como receptor de la vitronectina, aunque esto no descarta la posibilidad de que el virus use otros receptores celulares²⁷.

2.3.2 Penetración y desnudamiento

El proceso de entrada del VFA a través de la membrana, está bien diferenciado del de enterovirus y rinovirus. En estos últimos, la entrada a través de la membrana involucra la alteración de las partículas virales, alteración que implica la pérdida de la proteína VP4 y un aumento a la sensibilidad al tratamiento con SDS al 1 %⁷⁰. En el VFA y en cardiovirus sin embargo, no se ha descrito ningún tipo de forma intermediaria²².

La penetración dentro de la célula hospedadora parece ser dependiente de la disponibilidad de energía ya que no ocurre en células muertas aún cuando el virus permanece absorbido a su superficie³⁵. El mecanismo propuesto para el ingreso del genoma viral en el citoplasma celular es la endocitosis mediada por el receptor. Se ha demostrado que el pH ácido de las vesículas prelisosomales (endosomas) proporcionan el medio necesario para la ruptura del virus en subunidades proteicas 12S, dejando el ARN genómico libre para iniciar su replicación^{50, 51}.

2.3.3 Mecanismo de replicación del ARN genómico

El genoma viral liberado al citoplasma se une a los ribosomas y demás proteínas de la maquinaria biosintética de la célula hospedadora. La traducción del ARN comienza en su extremo 5' resultando en una poliproteína que es rápidamente procesada¹⁰.

La replicación del ARN viral involucra la síntesis de una cadena complementaria de polaridad negativa (-) que es utilizada para amplificar el número de cadenas de ARN (+). El proceso de replicación tiene lugar por medio de la formación de un intermediario replicativo de ARN doble cadena asociado al retículo endoplasmático liso¹⁷¹. La elongación de ambas cadenas es realizada por una ARN polimerasa viral dependiente de ARN (3D)¹⁶¹.

2.3.4. Traducción, síntesis de proteínas virales y formación del virión maduro

Tempranamente, luego de la infección de las células por el VFA, se produce la inhibición de la síntesis de ARN y proteínas celulares¹³⁵. Esto coincide con la aparición de los primeros productos virales identificables. El producto primario de la traducción es una poliproteína que corresponde a la totalidad de la región codificante de aproximadamente 250 Kd⁸⁹. Dicho precursor poliprotéico no se detecta dado que los primeros clivajes tienen lugar durante su traducción, originando 4 proteínas precursoras primarias (P0-P3) que, a través de clivajes secundarios (mediados por proteasas virales), generan las proteínas estructurales y no estructurales que se encuentran en células infectadas.

Existen dos sitios de iniciación de la traducción, encuadrados dentro del mismo marco de lectura, desde los cuales resultan dos proteínas "leader", L y L', con distinta longitud ya que difieren en 28 residuos de la zona aminoterminal¹⁰⁶. Los péptidos precursores se encuentran dispuestos, de acuerdo al orden de traducción en sentido 5' - 3', de la siguiente forma: P0 (L/L'), P1 (1ABCD-2A), P2 (2BC), P3 (3ABCD) (figura 5).

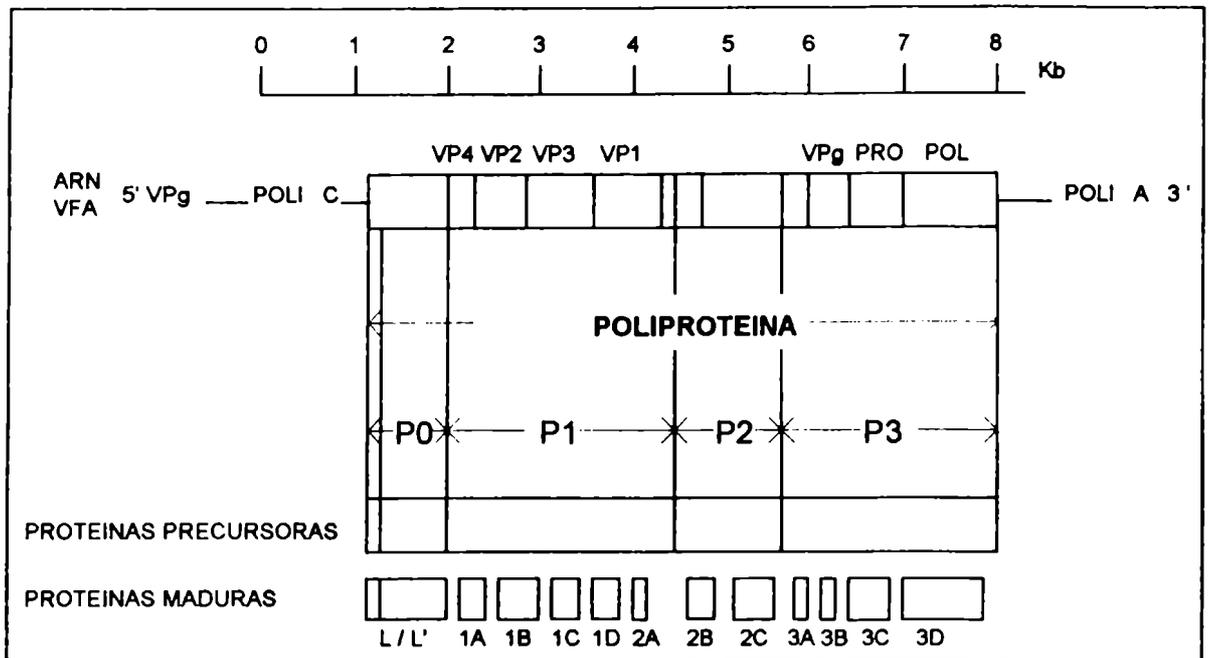


Figura 5. Organización y expresión del genoma del VFA.

2.3.5. Empaquetamiento del ARN viral

El mecanismo mediante el cual se lleva a cabo el empaquetamiento del ARN viral aún no se ha demostrado. Evidencias experimentales han relacionado a este proceso con la replicación del ARN. La síntesis del ARN podría dar la energía necesaria para la inserción del mismo en la procápside¹⁹⁴.

La entrada de la molécula de ARN en la procápside (partícula vacía) resulta en la formación del provirión, protegiéndose de este modo al genoma viral de la acción de nucleasas⁸⁷. La formación del virión maduro de 146S involucra el clivaje de casi la totalidad de cadenas VP0 para dar VP2 y VP4, lo que lleva al reordenamiento de la cápside viral y constituye el último paso de la maduración viral¹⁹³.

2.3.6. Liberación del virión

En células de riñón bovino infectadas con alta multiplicidad de infección (MOI), la fase de eclipse dura de 100 a 110 minutos¹⁷⁷, comenzando a detectarse virus extracelular a los 150 minutos post-infección. Aunque probablemente las partículas virales alcanzan el espacio extracelular como resultado de una lisis mecánica de las células infectadas¹⁹³, existe cierta evidencia de una liberación prelítica del virus a través de vesículas citoplasmáticas que emergen de células infectadas²³⁷.

3. LA RESPUESTA INMUNE

Un alto número de especies ha desarrollado evolutivamente mecanismos y sistemas que le permiten defenderse de una altísima variedad de posibles agentes invasores potencialmente patógenos.

En los organismos más evolucionados tales mecanismos de defensa son llevados a cabo por el sistema inmune, un conjunto disperso de órganos, tejidos, células y factores solubles encargados de producir respuestas apropiadas ante la entrada de los agentes invasores.

Cualquier sustancia extraña al organismo capaz de inducir respuesta de parte del sistema inmune, es denominada genéricamente antígeno. Dentro de los elementos celulares y humorales que componen el sistema inmune, se pueden diferenciar dos grupos: aquellos que son inducidos en forma inespecífica ante cualquier antígeno que entra al organismo, y los que se generan y activan en forma específica contra un determinado agente.

Los primeros son los que constituyen la parte innata de la respuesta, y están representados por las células fagocíticas (macrófagos, monocitos, neutrófilos, basófilos y mastocitos), las llamadas *natural killer* (NK) y factores solubles como el complemento y los interferones (IFN) α y β , entre otros. Estos elementos son los primeros en actuar para contener la invasión en sus inicios.

Los últimos llevan adelante la respuesta adaptativa o específica, que se activa ante la persistencia del agente en el organismo. Las células del sistema inmune que poseen especificidad por un antígeno determinado son los linfocitos, mientras que las inmunoglobulinas producidas por algunos de ellos, son los factores humorales específicos.

Existen diversas clases de linfocitos, agrupándose básicamente en linfocitos B y T. Las células B son las encargadas de producir los

anticuerpos, en presencia del antígeno para el que son específicas y de mensajeros solubles sintetizados por otras células del sistema inmune. Para los linfocitos T se diferencian dos fenotipos generales en relación al rol que cumplen durante el establecimiento de una respuesta específica: las células T colaboradoras, también llamadas *helper* (Th), y los linfocitos T citotóxicos (Tc). Estos dos últimos tipos también son denominados CD4+ y CD8+, respectivamente, debido a la presencia de las proteínas homónimas en sus membranas citoplasmáticas.

Ambas partes del sistema inmune, innata y adaptativa, funcionan estrechamente relacionadas y de hecho en todos los órganos y tejidos, coexisten células y factores de ambas, siendo imprescindible la interacción de células y mensajeros químicos de la parte inespecífica para activar la respuesta específica¹⁸⁷.

3.1 Subpoblaciones de linfocitos y citoquinas

Todos los linfocitos experimentan una serie de cambios fenotípicos durante su proceso de maduración, que les confieren características propias que permiten distinguirlos en sus distintos estados de diferenciación y activación. Sin embargo, son los linfocitos T los que poseen mayor heterogeneidad de tipos celulares debido a que deben cumplir una mayor variedad de funciones en relación a las células B.

Los linfocitos Th son los primeros en activarse durante el desarrollo de una respuesta específica. Estos reconocen al antígeno para el que son específicos, asociado a las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II, presente en las membranas de ciertos fagocitos, llamados células presentadoras de antígeno (CPA). Durante su activación los linfocitos Th sintetizan mensajeros químicos, pertenecientes al

grupo de las citoquinas, que sirven de co-estimulación para la presentación antigénica.

Luego de su activación los linfocitos Th, colaboran en la activación de los linfocitos B y Tc. Ambos tipos celulares precisan, además del reconocimiento del antígeno específico, la presencia en el medio de citoquinas sintetizadas por las células Th activadas. Los linfocitos B pueden reconocer al antígeno en forma soluble a través de inmunoglobulinas de membrana que funcionan como receptores, mientras que los linfocitos Tc sólo identifican a su antígeno asociado a proteínas del MHC de clase I que están presentes en todos los tipos celulares, a excepción de los eritrocitos y espermatozoides.

Las citoquinas son mensajeros químicos que no pertenecen exclusivamente al sistema inmune, ya numerosas tipos celulares del sistema endocrino y nervioso poseen receptores para ellos y tienen la capacidad de sintetizarlas¹⁸⁷. Se han descrito numerosos tipos de citoquinas, cada una de las cuales con una capacidad particular de modular diferentes actividades celulares. Si bien inicialmente fueron descritas para el ratón, luego fueron descubriéndose proteínas análogas u homólogas en otras especies. En bovinos se han descrito un alto número, algunas de ellas con una gran similitud estructural a las murinas y humanas^{6, 8, 37, 56, 111, 159, 212, 224} y todas ellas con una función específica.

Las citoquinas requeridas para la activación de los linfocitos B son diferentes a las necesarias para la activación de los linfocitos Tc y macrófagos. En función a esto se describió inicialmente en ratón, la existencia de dos fenotipos de células Th, cada uno con un perfil único de citoquinas que era capaz de sintetizar¹⁵⁴, el cual les permitiría preferencialmente la activación de la respuesta celular o humoral. Estas dos poblaciones fueron denominadas Th1 y Th2.

Los linfocitos Th1 serían los que tienen la capacidad de sintetizar IL-2, IFN- γ y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y estarían relacionados con la eliminación de las células infectadas. Actuarían modulando la respuesta de las células Tc, fagocitos activados y células NK. Por otro lado la subpoblación Th2 secretaría IL-4, IL-5, IL-6 y IL-10 y estaría relacionada con el desarrollo de la respuesta de anticuerpos cooperando con las células B¹⁸⁹. El concepto de células Th1 y Th2 fue luego extendido a otras especies como el hombre y el bovino, con algunas diferencias en el perfil de citoquinas sintetizado por cada una de las dos subpoblaciones^{36, 37, 212}.

Hoy en día, algunos autores consideran este modelo como una simplificación de lo que realmente ocurre en la naturaleza, indicando que las células T productoras de citoquinas *in vivo* no podrían clasificarse en subgrupos discretos¹¹⁶.

Para justificarlo estos autores señalan en primer lugar que muchos clones tanto de ratón como de humano no se ajustan exactamente a ninguno de estos dos patrones de síntesis de citoquinas. En segundo lugar argumentan que el modelo fue propuesto a partir del análisis de clones de células T cultivados *in vitro*, las cuales pueden no comportarse de igual manera que en su medio natural *in vivo*. De esta forma se propone que tanto las células T individuales como los clones, mostrarían una remarcable diversidad de perfiles de citoquinas, formando un espectro continuo del cual las células Th1 y Th2 sólo serían posiblemente sus extremos

En cambio, si está demostrado que algunas de las citoquinas agrupadas en cada una de estas dos subpoblaciones, como por ejemplo la IL-4 y el INF- γ , tienen efectos opuestos en una serie de parámetros inmunológicos¹¹⁶. Entre ellos se pueden nombrar, el desarrollo de los perfiles de citoquinas producidos por los linfocitos T, el cambio de isotipo en las inmunoglobulinas sintetizadas por las células B y varias funciones de los macrófagos.

No obstante estos cuestionamientos, el concepto de Th1 y Th2 sigue siendo ampliamente utilizado. La activación de clones con el fenotipo Th1 suele relacionarse con infecciones intracelulares (virus, bacterias y protozoos), mientras los clones Th2 jugarían un rol predominante en la respuestas alérgicas y contra helmintos. Si bien los factores que gobiernan esta polarización propuesta permanecen no aclarados, algunos autores sostienen que la naturaleza de la respuesta no adaptativa inicial tiene un papel preponderante en dirigir el balance hacia uno u otro extremo. Mientras que la activación de células NK y macrófagos, proveería un microambiente favorable para la aparición de clones del tipo Th1 a través de la síntesis de IFN- γ , la aparición de clones Th2 se vería apoyada en la síntesis de IL-4 por parte de los mastocitos y basófilos⁹⁹.

3.2. Las inmunoglobulinas. La variación isotípica, idotípica y alotípica

Las inmunoglobulinas funcionan como adaptadores bifuncionales ya que pueden unirse por un extremo al antígeno para el que son específicas y por el otro a una gran variedad de tejidos, tipos celulares y factores humorales del sistema inmune. De esta manera pueden promover una serie de mecanismos diferentes de respuesta ante la presencia de un antígeno.

Las moléculas de inmunoglobulina están formadas en su unidad básica por dos pares de cadenas polipeptídicas idénticas, dos mayores (cadenas pesadas) y dos menores (cadenas livianas). Algunas clases de inmunoglobulinas consisten en oligómeros compuestos por 2 ó 5 de estas unidades básicas. La región que se relaciona con el antígeno está conformada por dominios pertenecientes a los cuatro polipéptidos y presenta una altísima variabilidad entre inmunoglobulinas provenientes de diferentes clones de células B. Por el otro lado, la región reconocida por los elementos

del sistema inmune está constituida solo por los dominios del extremo carboxi-terminal de las cadenas pesadas y es la que media las funciones efectoras de la molécula⁴². Dependiendo de la secuencia y estructura de esta última región, también llamada "región constante", las inmunoglobulinas se clasifican en clases y subclases¹⁸⁸.

Tal como fue mencionado anteriormente los linfocitos B son los responsables de la síntesis de los anticuerpos. Durante su desarrollo un mismo linfocito B puede producir inmunoglobulinas pertenecientes a distintas clases y subclases, las cuales poseerán una misma región variable, pero se diferenciarán en su región constante. Todas las variantes que pueden tomar las regiones constantes de una molécula de anticuerpo, son los llamados isotipos de la inmunoglobulina.

Así como existen variantes isotípicas, las inmunoglobulinas pueden presentar también variantes idiotípicas y alotípicas. Tanto las cadenas livianas como las pesadas surgen de la recombinación somática de diversos genes ubicados para cada una de ellas, en un mismo cromosoma. Así existen genes que son responsables de la secuencia de aminoácidos de la zona variable y otros que lo son de la zona constante de cada cadena. De la recombinación de los distintos genes de la zona constante de la cadena pesada surgen las variantes isotípicas, mientras que de la recombinación de los genes de las regiones variables surgen las variantes idiotípicas. Estas últimas dan lugar a las diversas regiones variables tanto en las cadenas pesadas como en las livianas.

La variación alotípica responde al hecho de que algunos genes de la región constante de las cadenas pesadas presentan más de un alelo para un mismo locus y por lo tanto una población puede presentar más de una variante para estos genes.

Los isotipos se diferencian entre sí por sus propiedades tanto bioquímicas como biológicas. La cantidad y calidad de los isotipos presentes en los mamíferos, difiere de una especie a otra. Así mismo, no existe equivalencia clara entre los isotipos existentes en las distintas especies. Esto quizás sea la consecuencia de que su aparición ocurrió en forma posterior a los procesos de especiación en la evolución^{60, 176}.

De todas las clases de inmunoglobulinas, la IgG es la que presenta mayor número de variantes isotípicas. En el ratón fueron descritos cuatro isotipos de IgG: IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3^{83, 105}, los cuales muestran una clara restricción en relación a la clase del antígeno inductor. Es decir el isotipo del anticuerpo sintetizado tiene una fuerte relación con las características del antígeno para el cual es específico.

En el bovino fueron descritos básicamente dos isotipos de IgG: IgG1 e IgG2. A pesar de la alta heterogeneidad reportada para la IgG2 bovina y que en la literatura suelen encontrarse los términos "IgG2a" e "IgGb", no existiría evidencia que la IgG2 presente tales "subsubclases". Basados en criterios inmunológicos estas variantes no presentan diferencias en la antigenicidad, no se han reportado distintas funciones biológicas entre estas ellas, como tampoco hay evidencias de que existan dos genes diferentes de cadena pesada que den lugar a estas variantes^{43, 44, 46}. La posición más comúnmente tomada a este respecto es que la gran mayoría de las IgG2 bovinas corresponden al isotipo IgG2a y se identifica a este isotipo por ser el que presenta dos variantes alotípicas A1 y A2. De hecho es usual hallar que en la bibliografía se utilizan los términos IgG2 e IgG2a en forma indistinta para referirse al mismo isotipo⁴⁵. El término IgG2b sería una denominación arbitraria, ya que no existen elementos para pensar que sea un subtipo dentro de la IgG2.

La heterogeneidad isotípica de las inmunoglobulinas, indica la existencia de una relación entre estructura y función por la cual anticuerpos de ciertas clases y subclases son característicamente asociados con ciertas modalidades de respuesta inmune o con ciertas funciones efectoras. La regulación de los isotipos producidos por las células B está controlada por la presencia o ausencia de linfoquinas sintetizadas por las células T activadas^{88, 104}. Recordando lo anteriormente mencionado en cuanto a que el perfil de linfoquinas sintetizadas por las células T estaría profundamente relacionado con la naturaleza del agente inductor, esto podría explicar la restricción observada en los isotipos de los anticuerpos inducidos luego de la inmunización con determinados antígenos^{4, 65, 172}. Así la naturaleza química y biológica del agente, como la forma de presentarse al sistema inmune¹⁸, pueden determinar la síntesis de inmunoglobulinas con isotipos que promuevan los mecanismos más eficientes para su eliminación.

3.3 Respuesta Inmune a una infección viral

Tal como fue descrito anteriormente el mecanismo de respuesta inmune inducido luego de la entrada de un patógeno al organismo, se desarrollará con diferentes formas según el agente, tanto para la respuesta innata como para la específica. En especial, la respuesta de citoquinas parecería tener profundas consecuencias en la determinación de los mecanismos a cumplirse.

Las infecciones bacterianas tanto como parasitarias parecerían inducir perfiles de citoquinas que se ajustarían a los típicos de respuestas Th1 y Th2, respectivamente. Durante una infección viral las principales células efectoras que actúan son diferentes a las de aquellas dos, siendo por tanto posible predecir que la respuesta de citoquinas en este caso no seguirá

exactamente ninguno de los caminos descritos para aquellos otros agentes. Luego de la entrada del virus, las citoquinas inducidas deben, además de controlar las respuestas de anticuerpos, proveer las condiciones para promover la activación y regulación de la respuesta temprana de células NK y la posterior de linfocitos Tc.

Reuniendo datos preexistentes en relación a la respuesta observada en infecciones con diferentes virus en modelos murinos, un trabajo reciente sugiere que esta es llevada a cabo en diferentes etapas, cada una de ellas con características propias y diferenciales²⁸.

La primera etapa estaría caracterizada por la producción de IFN- α y - β por parte de las células infectadas, la cual resultaría en la activación y proliferación de las células NK²²⁶. No es claro si en esta etapa también, se induce INF- γ por parte de las células NK y/o IL-12 por parte de los macrófagos.

La segunda etapa comprendería la activación y proliferación de las células Tc, a través de los mecanismos de presentación antigénica en el contexto de las moléculas del MHC de clase I. En esta etapa se registraría la presencia simultánea de citoquinas del tipo 1 (IL-2 e INF- γ) y del tipo 2 (IL-4 y IL-10) como también de TGF- β . Esta última citoquina funcionaría como inhibidora de las células NK y favorecería las respuestas proliferativas de las células T CD8+, inhibiendo a otras subpoblaciones. En esta fase también se promoverían las respuestas de las células B y según el tipo viral, esta etapa podría concluir con la eliminación del agente infectante.

Si bien la respuesta de citotoxicidad celular es decisiva en la eliminación de las células infectadas, y por lo tanto de la infección para un gran número de tipos virales, en otros es muy importante la acción de los anticuerpos.

El mecanismo por el cual un anticuerpo puede neutralizar una infección viral depende tanto del agente viral como del isotipo de la inmunoglobulina.

La neutralización directa de la infectividad viral puede ser el resultado de una interferencia con la adsorción, con la entrada, con el desnudamiento luego de la entrada o por cambios conformacionales en la estructura del virión⁷³. En ciertas especies, las inmunoglobulinas poliméricas como la IgA secretoria y la IgM, pueden mediar la eliminación del virus por agregación o por favorecer su fagocitosis por parte de células del sistema retículo-endotelial. Otros isotipos son eficientes en la fijación de complemento y en la opsonización de complejos inmunes facilitando la captura por fagocitosis. Los virus envueltos pueden ser directamente eliminados por anticuerpos y fijación de complemento. A su vez, las células infectadas por virus envueltos pueden ser lisadas por la acción directa de los anticuerpos y el complemento o por citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC).

La tercera etapa descrita sólo se registraría en tiempos muy posteriores a la infección y exclusivamente en infecciones producidas por retrovirus, asociándose a esta fase con la aparición de síntomas de inmunodeficiencia en el huésped. Durante la misma se producirían desajustes en las citoquinas sintetizadas, hecho puesto de manifiesto por respuestas inapropiadas de IL-4 e IL-10 y por la reducción de la presencia de las citoquinas sintetizadas por células de la subpoblación Th1.

3.4. Respuesta inmune frente al VFA

La inmunidad contra el VFA esta mediada por la presencia de AcN contra las proteínas estructurales del virus y la protección contra el virus ha sido comunmente relacionada con el nivel de tales anticuerpos en la circulación sanguínea^{124, 167, 219, 227}.

Los ratones adultos sólo pueden ser infectados en forma experimental^{215, 216}. La infección en esta especie se inicia mediante la replicación viral

principalmente en células pancreáticas, seguida por un aumento de la viremia durante 72 hs post-infección⁸⁵. A pesar de inducir una respuesta por parte del sistema inmune, la infección con VFA no produce la aparición de síntomas clínicos en ratones. La acción del sistema inmune es la responsable de la desaparición de la viremia entre los 4 y 5 días post-infección (d.p.i.)^{85, 33}. Es importante remarcar que a diferencia de otras especies naturalmente susceptibles, no se ha podido detectar persistencia de genoma viral en células de ratón, habiéndose evaluado un gran número de órganos¹³³.

Como ya fue mencionado la infección en bovinos, provoca en cambio, una enfermedad febril de curso típicamente agudo y con la aparición de vesículas en los sitios de replicación secundarios del tejido epitelial. En esta especie en forma posterior a la infección, y luego de la eliminación en la circulación sanguínea periférica de las partículas virales, pueden aislarse en algunos animales partículas virales de líquido esofago-faríngeo, como así también puede detectarse genoma viral en tejidos pertenecientes a la faringe¹⁷⁹. El establecimiento y duración de la infección persistente no parecería tener relación con el nivel de AcN de los animales afectados^{69, 228}.

Tanto en modelos de infección experimentales como el ratón o en huéspedes naturales como el bovino, la respuesta de anticuerpos es rápida, detectándose inmunoglobulinas de clase M aproximadamente a partir de los 3 días posteriores a la infección (d.p.i). Aproximadamente a la semana se registra la presencia de inmunoglobulinas séricas IgG, las cuales persisten de por vida en el ratón y por varios años en el bovino⁶⁸. En el bovino también se registra la aparición temprana de IgA en los fluidos faríngeos. En el inicio de la respuesta esta IgA provendría de la transudación sérica, pero luego esta sería exclusivamente sintetizada localmente por las superficies mucosas del tracto respiratorio⁷⁵.

Es importante mencionar que en todos los casos la inmunidad adquirida luego de la infección, está fuertemente restringida al serotipo infectante y por lo tanto no protege contra la infección con otros serotipos.

A diferencia de la coincidencia que existe en relacionar el nivel de anticuerpos con la protección a la infección, el mismo grado de consenso no se mantiene en relación a los mecanismos por los cuales estos AcN median dicha protección.

Algunos autores sostienen que los AcN cumplen su función afectando los sitios virales destinados al reconocimiento del receptor celular, ya sea por unión a ellos o por impedimento estérico, imposibilitando por tanto la adsorción de la partícula viral a la célula. En este caso la eliminación del virus sería llevada a cabo a través de la formación de complejos inmunes entre los anticuerpos y las partículas virales, los cuales serían rápidamente eliminados de la circulación^{165, 22}.

Otros autores proponen en cambio que la protección está mediada exclusivamente por aquellos AcN que a través de la opsonización de la partícula viral puedan interactuar con las células del sistema retículo-endotelial induciendo su fagocitosis^{143, 144}. Es probable que ambos caminos no sean excluyentes entre sí y se lleven adelante simultáneamente, aunque la importancia relativa de cada uno de ellos no está aún claramente establecida.

En cuanto al papel e importancia del sistema T colaborador en el establecimiento de la respuesta protectora, existen también distintas posturas al respecto.

Para algunos autores el VFA se comporta durante la infección como un típico antígeno T-dependiente, es decir la respuesta inmune específica contra el virus requiere la activación de las células Th para la producción de anticuerpos por parte de las células B⁵⁷. Estos autores recalcan la

importancia de la participación de tales células en el establecimiento de memoria inmunológica.

Otros autores demostraron que tanto ratones atímicos (nu/nu) como normales (nu/+) luego de la infección con VFA no mostraban diferencias en el curso temporal de anticuerpos anti-VFA y que la viremia era eliminada en ambos casos al mismo tiempo³³. Estos mismos animales atímicos veían muy disminuida su capacidad con respecto a los normales, para la síntesis de anticuerpos contra antígenos T-dependientes. En el mismo trabajo ratones normales irradiados e infectados, que eran repoblados sólo con células B provenientes de dadores infectados, demostraron ser capaces de abortar la viremia en los mismos tiempos que aquellos reconstituidos con células totales provenientes de los mismos dadores.

A partir de estos resultados se propuso que el VFA se comporta como un antígeno "T-optativo", ya que durante la infección o inmunización con cantidades masivas de virus inactivado¹⁷⁵, el sistema T tendría una baja participación en el establecimiento de una respuesta protectora, mientras que si la inmunización se realiza con bajas cantidades de virus inactivado, como ocurre en las vacunaciones, la respuesta de anticuerpos involucra la activación previa de las células Th específicas.

Resultados obtenidos en ensayos de linfoproliferación *in vitro* mostraron que luego de la infección tanto en ratón como en bovino, es extremadamente difícil detectar la presencia de células Th específicas que se multipliquen ante la presencia de la partícula viral o antígenos derivados de ella y no existen evidencias de esto en la bibliografía. Algunos autores sugieren que el bajo nivel de detección de células Th activas específicas para el VFA de sangre periférica se debe a que su circulación es limitada debido al tropismo por ciertos tejidos de estas células y a que son secuestradas en los ganglios linfáticos, aunque no existe confirmación experimental para esta hipótesis⁷⁵.

En cambio, sí se detecta proliferación de células periféricas mononucleares de sangre de bovinos o provenientes de bazo de ratones, luego de ser estos animales inmunizados con vacunas convencionales o experimentales formuladas con VFA inactivado. Esto demostraría el diferente compromiso del sistema T colaborador durante la construcción de la respuesta inmune luego de la infección o de la vacunación.

De la misma forma existen claras diferencias en cuanto al título alcanzado y la duración de los AcN sintetizados luego de la inmunización con vacunas formuladas con virus inactivado. En todos los casos estas inducen menores niveles de AcN, los cuales se mantienen circulación por periodos mucho menores de tiempo¹⁵¹.

4. VACUNAS CONTRA EL VFA

Las vacunas formuladas con virus inactivado, como la del VFA, deben cumplir ciertos requerimientos. Primero, el antígeno viral debe poder obtenerse en altas concentraciones y en cantidades lo suficientemente grandes para permitir su producción a gran escala. Segundo, la preparación viral debe poder ser tratada de forma tal que no queden residuos infectivos. Tercero, en su formulación deben incluirse sustancias adyuvantes no tóxicas para el animal, que estimulen la respuesta inmune del mismo hasta el nivel de protección deseado.

4.1. Obtención del antígeno viral

El virus obtenido del epitelio lingual de bovinos infectados fue la primera fuente de antígeno viral utilizada para la formulación de vacunas contra la fiebre aftosa. Esta forma de obtención del antígeno se mantuvo hasta principios de los años '50. El virus obtenido se adsorbía a un gel de hidróxido de aluminio ($\text{Al}(\text{OH})_3$) para luego ser inactivado con formaldehído²³². El gel de hidróxido cumplía también las veces de sustancia adyuvante de la respuesta generada por el virus inactivado.

Este método fue reemplazado por el desarrollado por Frenkel alrededor del año 1950. Utilizando el procedimiento de replicación viral sobre tejido natural del hospedador, este investigador logró adaptarlo para la producción *in vitro* en gran escala⁹⁴. Si bien el tratamiento del virus durante su producción era diferente al descrito anteriormente, las partículas virales luego de ser cosechadas, clarificadas y filtradas eran adsorbidas en hidróxido de aluminio e inactivadas con formaldehído, en forma análoga al método anterior. Aunque su utilización ha sido cada vez menor, esta forma de producción de antígeno se mantuvo hasta nuestros días. El cultivo

Frenkel encierra ventajas importantes respecto a otros, en cuanto a la simpleza de su ejecución, los altos y constantes niveles de producción de virus y el no requerimiento de adaptación del virus al sistema de cultivo, lo que disminuye el riesgo de variación antigénica durante la replicación. Entre los aspectos negativos se pueden enumerar la dependencia de epitelios linguales, cuya disponibilidad puede variar dependiendo de la época, la dificultad y lentitud en lograr un escalamiento de la producción a mayores niveles cuando la circunstancias así lo requieren, y el bajo, pero inevitable, nivel de contaminación con bacterias y hongos que todos los cultivos Frenkel acarrearán consigo.

Ya en la década del '60 se comenzaron a establecer los cultivos en monocapa de células como forma de producción del virus. Si bien las primeras experiencias fueron realizadas con células provenientes de cultivos primarios de riñón de bovino, prontamente se comenzaron a utilizar líneas celulares, en especial la derivada de células de riñón de hámster bebé o BHK 21¹⁵⁵.

La producción a escala industrial de virus utilizando monocapas de células BHK 21 en botellas giratorias resultó engorrosa, además de riesgosa por la diseminación del virus en el laboratorio durante su cosecha. Por esta razón el sistema de monocapas fue reemplazado por el de infección de células BHK en cultivos en suspensión¹⁸². Por este método las células pueden ser crecidas en tanques fermentadores de hasta 5000 litros de capacidad, a los cuales se le agrega la semilla de virus a amplificar.

4.2. Inactivación del virus

El agregado de formaldehído nombrado anteriormente²³² fue, hasta tiempos recientes, el procedimiento más usado en Europa para inactivar el VFA. Sin embargo esta metodología presenta algunos inconvenientes, entre ellos que la cinética del proceso químico de inactivación no asegura la completa eliminación de la actividad del virus. A esto debe sumarse que dependiendo del método de producción del antígeno, la eficacia del proceso no puede ser medida por métodos *in vitro*, ya que el gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$ empleado previamente a la inactivación, en algunos casos para adsorber el virus resulta tóxico para las células y por lo tanto existe el riesgo de una inactivación incompleta no pueda ser detectada.

Un método alternativo es la utilización por aziridinas, las cuales producen una inactivación más eficiente y verificable, aunque tienen el inconveniente de ser tóxicas para el humano, por lo cual fueron resistidas por los productores de vacunas. La más comúnmente utilizada es la bromoetilamina hidrobromida (BEA) que en forma de droga sólida presenta baja toxicidad. Esta sustancia disuelta en solución a $\text{pH}=8$ se transforma en la sustancia activa etilenamina, la cual puede volver a ser desactivada por el agregado de tiosulfato de sodio¹⁶.

4.3. Concentración del antígeno

En la mayoría de los casos el antígeno viral debe ser concentrado antes de su inclusión en las vacunas. Los métodos de concentración fueron en general diseñados en relación a los procedimientos de producción del antígeno. Una de las primeras metodologías de concentración fue el tratamiento con cloroformo y centrifugación, el cual fue utilizado para virus producidos en cultivos de lenguas de animales infectados y servía a la vez como agente

esterilizante¹⁸¹. Otra forma utilizada fue la precipitación de los complejos que se forman entre el virus y el gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$ ¹⁸¹.

Actualmente las suspensiones virales obtenidas de los tanques de fermentación suelen ser concentradas por ultrafiltración, siguiendo el método descrito por Strohmaier con modificaciones²¹³. Si bien la purificación es limitada, esta metodología permite manejarse con grandes cantidades de antígeno viral.

Otro método de concentración utilizado a gran escala es la precipitación del virus por el agregado de polietilenglicol (PEG) y óxido de polietileno (PEO)²³¹. La precipitación permite a la vez de concentrar al virus, su aislamiento de otras proteínas de las células BHK, así como de proteínas presentes en el suero añadido al medio de cultivo. El resultante de la precipitación puede ser almacenado en nitrógeno líquido hasta su utilización.

4.4. Vacunas en uso

El siguiente paso en la formulación de la vacuna luego de la concentración del virus, debe ser la adición a la suspensión antigénica de sustancias que funcionen como vehículos. Tales sustancias en algunos casos deben también cumplir funciones inmunoestimulantes. Este requerimiento es debido a la baja inmunogenicidad que presenta el virus inactivado. Actualmente las vacunas que se producen contra el VFA pueden ser agrupadas en dos grandes conjuntos, las vacunas acuosas y las oleosas.

Las vacunas acuosas fueron las primeras en desarrollarse ya que incluyen a las formuladas con gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$ ²³². La capacidad inmunogénica de estas vacunas fue notablemente aumentada con el añadido de un componente purificado a partir de la *Quillaja saponaria*⁹⁵. El

agregado de esta sustancia denominada saponina (Quil A, su factor activo) permitió la prolongación de la respuesta inmune con buenos niveles de AcN más allá de los 6 meses luego de la vacunación.

La principal desventaja que presentan las vacunas acuosas es que la respuesta de anticuerpos que producen es de relativa baja intensidad y duración, y es siempre menor que la inducida por las formulaciones oleosas.

Las primeras vacunas oleosas para el VFA fueron desarrolladas alrededor del año 1960 a partir de la llamada formulación incompleta de Freund¹⁴⁹. Por este método la suspensión viral contenida en medio acuoso era mezclada con una fase oleosa, formándose una emulsión agua en aceite. La fase oleosa compuesta básicamente por aceites minerales carecía, a diferencia de la fórmula original de Freund, del extracto de pared bacteriana para disminuir las posibles reacciones adversas que su inoculación pudiera provocar en el ganado.

La aplicación de las formulaciones oleosas puede producir en ciertos casos, reacciones adversas en el sitio de inoculación. Estas reacciones fueron mejoradas al disminuirse el volumen inoculado y mejorarse la calidad de los aceites empleados en la emulsión. Esto también implicó el perfeccionamiento de los métodos de concentración del antígeno¹⁴⁷.

La formulación de las vacunas oleosas fue perfeccionada en nuestro país, desarrollándose nuevas mezclas de aceites minerales^{186, 197}. Las formulaciones oleosas son ampliamente las más utilizadas en las campañas de vacunación. Actualmente la calidad de los inmunógenos empleados en tales campañas en nuestro país permitieron que la frecuencia de vacunación se reduzca a una vez al año en los individuos adultos y dos veces en animales hasta 2 años.

4.5 Vacunas experimentales

Los avances conseguidos en la tecnología de producción y preparación del antígeno viral, como así también los descubrimientos realizados en función a la formulación, han permitido el desarrollo de vacunas de alta calidad y elevada inmunogenicidad. Hoy en día debido a la situación mundial de la enfermedad, los esfuerzos se dirigen al desarrollo de nuevas vacunas, más estables, más seguras y sin efectos colaterales adversos.

La mayor estabilidad está relacionada con el desarrollo de inmunógenos sintéticos que a diferencia de las partículas inactivadas de VFA, presenten mayor resistencia al manejo y tengan menores requerimientos de refrigeración para mantener su integridad antigénica.

La mayor seguridad también está asociada al desarrollo de tales antígenos sintéticos, ya que la tendencia sanitaria en una enfermedad erradicada o en vías de erradicación en una determinada zona es la disminuir lo máximo posible el manejo del agente infeccioso. En el caso de las vacunas anti-aftosa la ocurrencia de focos de infección en zonas libres usualmente se relacionan con la existencia de vacunas inadecuadamente inactivadas y/o con escapes de virus de las plantas productoras de tales vacunas^{134, 118}.

En la última década se realizaron importantes progresos al identificar las secuencias nucleotídicas del genoma viral y la composición de aminoácidos de las proteínas derivadas. La introducción de la tecnología del DNA recombinante y las pruebas realizadas con péptidos sintéticos y oligonucleótidos han dado paso al desarrollo de vacunas recombinantes y vacunas a péptidos sintéticos. Sin embargo un denominador común en todas estas formulaciones es la baja capacidad protectora que presentan frente a la infección natural.

Dentro de este contexto en los últimos años la investigación sobre los efectos de sustancias inmunomoduladoras como mejoradoras de vacunas inmunogénicamente pobres ha cobrado particular importancia. Así la inclusión de adyuvantes en las formulaciones vacunales surge como una posibilidad concreta que ayude a aumentar la eficiencia los nuevos inmunógenos, que permita mientras tanto reducir la cantidad de virus inactivado empleado por dosis, con la consiguiente reducción de costos y de volumen de agente viral involucrado en la producción.

5. ADYUVANTES

Los adyuvantes han sido usados en la inmunología experimental así como en la práctica vacunal por más de 70 años¹⁸⁴. En forma simple se los define como aquellas sustancias capaces de aumentar la respuesta inmune humoral o celular contra un antígeno. La naturaleza tanto química como biológica de las sustancias adyuvantes es muy amplia, aunque fisiológicamente los adyuvantes suelen ser sustancias extrañas para el organismo, a excepción de las interleuquinas empleadas como inmunomoduladores¹⁰⁸.

El modo de acción de los adyuvantes fue resumido por Chedid⁵⁴ como tres formas no excluyentes entre si:

- i) la formación de un depósito de antígeno en el sitio de inoculación, el cual es lentamente liberado.
- ii) la presentación del antígeno a células inmunocompetentes.
- iii) la producción de diferentes linfoquinas que actúan sobre las células del sistema inmune.

El efecto de depósito, implica por un lado la liberación lenta del antígeno lo cual permite prolongar el tiempo de interacción entre el antígeno, las células presentadoras de antígeno y los linfocitos. Por otro lado genera un sitio de inflamación con la consecuente atracción de las células inmunocompetentes al lugar de inoculación. Actúan así, las sales de aluminio y las emulsiones agua en aceite^{3, 24}. En el caso de las emulsiones, las gotas conteniendo el antígeno pueden viajar hasta los órganos inmunes secundarios, facilitando así la presentación del antígeno al sistema inmune.

Las sales de aluminio tienen además la capacidad de activar los factores del complemento¹⁸³, aumentando el foco inflamatorio y facilitando el establecimiento de la memoria B¹²².

También ha sido descrito el llamado *trapping* linfocitario que consiste en la migración selectiva de linfocitos circulantes hacia un órgano linfoide en especial. La importancia de este mecanismo reside en que el antígeno se pone en contacto con una mayor cantidad de células inmunocompetentes. Esta forma de estimulación es inducida por adyuvantes tales como el Adyuvante completo de Freund y *Carynebacterium parvum* entre otros¹²⁵.

En cuanto a la acción sobre las células involucradas en la respuesta inmune, estas incluyen macrófagos fijos y en circulación, células de Langerhans, células dendríticas, linfocitos T, y sus subpoblaciones, células plasmáticas, células natural killer, y a toda la variedad de los linfocitos B⁷⁹. Los adyuvantes pueden variar el fenotipo y comportamiento de un determinado tipo celular, cambiando sus receptores de superficie, moléculas de adhesión, moléculas accesorias o induciendo la síntesis de citoquinas u otros mediadores químicos.

Estos efectos tienen profunda implicancia en la célula ya que modifican la respuesta a los estímulos exteriores, la migración y establecimiento en un determinado tejido y la comunicación con otras células. En particular en los linfocitos B estas modificaciones pueden llevar a la regulación del isotipo de los anticuerpos producidos^{81, 88}.

5.1. Adyuvantes utilizados en este trabajo

i) Lipopolisacáridos

Los lipopolisacáridos (LPS) son sustancias con poder adyuvante extraídas de la pared celular de bacterias Gram negativas. Luego de una infección con tales bacterias, el LPS de sus paredes celulares funciona como endotoxina y es por lo tanto inductora natural de una gama de respuestas inmunes no adaptativas. De hecho existen receptores para LPS en las membranas de

macrófagos y otros tipos celulares. Se postula que la potente actividad adyuvante de esta endotoxina se encuentra en el residuo de lípido A⁵⁵.

Uno de los principales blancos del LPS para ejercer sus efectos son los macrófagos. El LPS induce la síntesis de citoquinas por parte de estos, en especial IL-1 y en algunos casos también de otra citoquina inflamatoria, el TNF además del IFN γ ²³³. También induce el reclutamiento de macrófagos como células presentadoras de antígeno⁵ y puede regular la expresión de ciertos antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II²³⁹, favoreciendo de esta forma, el contacto de los antígenos procesados con las células T colaboradoras. Por último se describió que en este tipo celular puede promover además la síntesis de precursores del óxido nitroso (NO), el cual tiene actividad bactericida²¹⁴.

Es conocida la capacidad del LPS de actuar como un *carrier* independiente de las células T, es decir por ser inductor de la síntesis de anticuerpos específicos contra pequeños haptenos acoplados a él¹⁵⁷.

En el mismo sentido el LPS funciona como un mitógeno policlonal de las células B¹⁰¹.

También ha sido descrita la capacidad de estimular la inmunidad mediada por células interactuando con el sistema T¹⁶⁴. También se reportaron efectos sobre linfocitos, ya que el lípido A puede disminuir la actividad supresora T⁵ y de hecho se considera que parte de sus efectos como adyuvante se deben a esta actividad¹⁷.

Existen diferencias entre los LPS según sea la bacteria de la que se lo extraiga. Nuevamente, el comportamiento diferencial se relacionaría con la composición del lípido A. El LPS proveniente de *Brucella abortus* a diferencia del proveniente de *Escherichia coli* es poco pirogénico, no es letalmente tóxico para conejos o embriones de pollo y no induce reacción de Schwartman¹²⁹. En los experimentos llevados a cabo en este trabajo con

LPS se emplea el extraído de *Brucella ovis* el cual no presenta reacción cruzada con *Brucella abortus*, factor importante para su empleo en bovinos.

ii) Pared celular de *Mycobacterium*

El llamado adyuvante completo de Freund contiene entre sus principales componentes estructuras celulares enteras de mycobacteria⁹⁶. Sin embargo a pesar de su gran poder adyuvante, su uso fue restringido a la investigación debido a su alta toxicidad. Durante los años '50 cuatro extractos bioquímicos fueron producidos a partir de la pared de *Mycobacterium*¹¹. A partir de uno de ellos, Wax D, se pudo aislar y purificar un tripéptido-monosacárido con potente acción adyuvante y menor toxicidad. En la búsqueda de derivados sintéticos de aquel que fueran de menor tamaño y que presentaran menos efectos colaterales, se llegó al descubrimiento del *N*-acetil-muramil-L-alanil-D-isoglutamina, llamado también muramil-dipeptido (MDP)¹⁰⁹.

El MDP aumenta la resistencia no específica contra bacterias, hongos⁹³, parásitos¹¹⁷ y virus¹⁵³. La capacidad inmunogénica del MDP depende de la manera en que es administrado. En soluciones salinas es buen inductor de la inmunidad humoral inducida¹², mientras que en vehículos oleosos es activador de la inmunidad mediada por células³⁰.

La ruta de inoculación influye en los isotipos de los anticuerpos producidos¹²⁷ y dosis elevadas provocan un descenso de la producción de anticuerpos, posiblemente por activación de linfocitos T supresores⁸⁴.

El mecanismo de acción es complejo y no completamente entendido. El MDP activa varios tipos de células, incluyendo macrófagos, mastocitos, leucocitos polimorfonucleares, plaquetas, células endoteliales y fibroblastos¹²⁸. Inhibe la migración de macrófagos¹⁵⁸, mientras que aumenta la quimiotaxis¹⁶³ y la fagocitosis²²¹. Induce la síntesis de varias citoquinas, incluida la IL-1, IL-4, CSF y el factor activador de fibroblastos, aumentando

también la producción de radicales superóxido, prostaglandinas y colagenasa¹²⁸. El MDP es también un mitógeno de las células B²¹⁰ y aumenta la proliferación de las células T inducidas por mitógenos¹¹⁵. Por último el MDP es capaz de aumentar la función de *carrier* específica de las células T helper²¹⁷.

iii) Avridine

El Avridine (AV) es una amina lipoidal sintética (*N,N* dioctadecil-*N'*, *N'*-bis) (2-hidroxiethyl) propanodiamina), caracterizada por sus propiedades adyuvantes. El principal efecto promovido por esta sustancia es la inducción de la síntesis de citoquinas. La acción más reconocida del AV es la síntesis de INF γ , aunque también induce la producción de IL-1¹⁹⁶. Como consecuencia de la inducción de estas citoquinas, el AV funciona también como activador de la actividad macrófaga¹⁶² y presenta amplia actividad proliferativa de linfocitos B y T, por lo que se sugiere que esta droga produce una expansión de los clones inmunoreactivos¹⁹⁶. Estudios *in vivo* de este adyuvante han demostrado que produce una migración de leucocitos al sitio de inoculación y una expansión en los nódulos linfoides regionales⁷.

La inoculación de AV fue asociada con una capacidad aumentada de los leucocitos polimorfonucleares para fagocitar *Staphylococcus aureus* y de funcionar como mediadores de la citotoxicidad mediada por anticuerpos¹⁹¹.

El AV actúa, a través de su capacidad inductora de INF γ , activando la función *natural killer*, aunque en ciertos esquemas de inmunización puede ser un factor refractario de la síntesis de esta citoquina²²⁰.

Administrada por vía oral o entérica en ratones y ratas, produce un importante incremento en la inmunidad de las mucosas¹⁹². Sin embargo, debido a su acción inductora de interleuquinas, este adyuvante también

puede inducir artritis experimental en ratas, reacción autoinmune mediada por las células T y relacionada con el haplotipo de las cepas afectadas²³⁰.

OBJETIVOS

Uno de los grandes problemas que presenta la vacunación contra la fiebre aftosa es el corto lapso de inmunidad que confieren los inmunógenos convencionales formulados con virus inactivado como antígeno. Aún cuando la duración de la protección inducida por estas vacunas mejoró considerablemente con la utilización de vehículos oleosos, ésta sigue siendo insuficiente en algunos casos, sobre todo cuando el inmunógeno es pobre y al compararsela con la respuesta inducida luego de la infección, la cual resulta protectora a la reinfección con el virus homólogo prácticamente de por vida.

El objetivo general de esta Tesis es el estudio del uso de sustancias inmunomoduladoras como estimulantes de la inmunidad específica contra el VFA. Tales sustancias se incluyeron en vacunas elaboradas con virus inactivado.

Como objetivos particulares se deben mencionar:

1.- Evaluar, en un modelo murino, la composición isotópica de los anticuerpos IgG inducidos por las vacunas experimentales y compararlos con los perfiles obtenidos por las vacunas convencionales y por la infección. Estudiar la correlación existente entre tales perfiles y los índices de protección obtenidos en cada caso.

2.- A partir de inmunomoduladores seleccionados en los experimentos antes mencionados, lograr alcanzar en bovinos inmunizados con vacunas con baja cantidad de antígeno viral con el agregado de tales adyuvantes, títulos de anticuerpos iguales a los logrados por vacunas elaboradas con mayores concentraciones virales.

3.- Estudiar los perfiles isotópicos de la IgG bovinas específicas inducidas por cada formulación vacunal y su relación con la capacidad protectora.

4.- Seleccionar las condiciones óptimas de uso de cada inmunomodulador en función a los resultados antes obtenidos.

Para el cumplimiento de tales objetivos se emplearon las siguientes técnicas:

a.- ELISA sandwich indirecto para la detección de isotipos murinos de IgG específicos para el VFA serotipo O1-Campos.

b.- Seroneutralización en ratón lactante para la cuantificación de los AcN de ratón contra el VFA serotipo O1-Campos.

c.- ELISA en fase líquida para la medición de anticuerpos totales séricos bovinos contra las cuatro cepas incluidas en las vacunas: O1-Caseros, A79, A87 y C3/85.

d.- ELISA sandwich indirecto para la detección de isotipos bovinos de IgG específicos para el VFA serotipo O1-Caseros.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

1.1. Ratones

Se utilizaron ratones lactantes de 5 días de edad y adultos de entre 60 y 90 días de edad pertenecientes a la cepa endocriada BALB/C proveniente del Bioterio de INTA-Castelar .

1.2. Bovinos

Se utilizaron 91 bovinos de 12 a 14 meses de edad, libres de anticuerpos específicos contra el VFA, de raza Holando y Angus x Hereford.

2. VIRUS

En las pruebas en ratón se utilizó VFA subtipo O1-Campos perteneciente al cepario de INTA y obtenido de epitelio lingual bovino y 2 pasajes posteriores en células BHK-21. La semilla se encuentra almacenada en el banco de nitrógeno líquido del CICV-INTA-Castelar. Su título es aproximadamente de $10^{7,5}$ dosis infectantes ratón lactante 50% (DIRL50%) / ml.

Para la formulación de las vacunas en bovinos se emplearon las cepas de VFA O1-Caseros, C3/85, A87 y A79 pertenecientes al cepario de la empresa que proveyó los antígenos virales.

2.1. Obtención de virus

El virus empleado en las pruebas raton fue sometido a procesos de amplificación, concentración y purificación siguiendo los protocolos usuales en nuestro laboratorio. Para los ensayos en bovino se utilizaron antígenos virales sin purificar y en algunos casos concentrados según los protocolos de la industria.

El virus utilizado con el modelo murino se multiplicó a partir de un virus semilla, en frascos rotantes con monocapas de células BHK-21, realizando infecciones cortas y con alta multiplicidad de infección (MOI). Se inoculó 0,1 ml del virus semilla, se adsorbió por una hora a 37°C y luego del agregado de medio MEM suplementado con 10% de triptosa fosfato se dejó progresar la infección aproximadamente durante 5 horas para congelar a -20°C inmediatamente. A las 12 horas se descongelaron, se ajustó el pH a 7,4 y se centrifugó a 3000 g durante 30' a 4°C para eliminar los restos celulares. Del sobrenadante se separaron alícuotas para su titulación por infectividad en ratón lactante. Este título viral resultó ser $10^{7,6}$ DIRL50% / ml.

Las vacunas para bovinos fueron elaboradas con antígenos virales sin purificar, obtenidos de sobrenadantes de infección en tanques de producción conteniendo células BHK-21 en suspensión. En algunas formulaciones se utilizaron directamente los clarificados inactivados de tales sobrenadantes y en otras estos clarificados fueron concentrados por ultrafiltración posteriormente a su inactivación, según la metodología empleada en la industria.

Para estas vacunas la medición de la masa viral para cada una de las cepas se hizo mediante un gradiente de sacarosa, utilizando directamente los clarificados inactivados y concentrados.

2.2. Inactivación de virus

Para ambas series de experimentos el protocolo de inactivación seguido fue el mismo. El virus fue clarificado por centrifugación a 3000 g durante 30', para luego ser inactivado usando bromuro de etilendiamina (BEI)¹⁶. Brevemente, se agregó a la suspensión viral, BEI 0,1M al 1% y se mantuvo a la suspensión a 37°C en agitación permanente, durante 24 horas. El inactivante excedente se neutralizó con tiosulfato de sodio 0,1M al 1%. Se dejó reposar por 48 horas a 4°C y luego se centrifugó a 3000 g por 30' a 4°C. Se realizó el control de inocuidad en 100 ratones lactantes para descartar posible presencia de virus infectivo residual, resultando este negativo a la presencia de virus. Por último, se tituló el virus inactivado por fijación de complemento 50% y a las suspensiones a utilizarse en los experimentos en bovinos se les calculó la masa viral por gradiente de sacarosa tal como fue mencionado anteriormente.

2.3. Purificación de virus

El virus inactivado a emplearse en las vacunas en ratón se concentró con polietilenglicol 6000 al 7%. La mezcla se dejó a 4°C hasta el día siguiente y entonces se centrifugó a 3200 g. durante 60' a 4°C. El pellet se resuspendió en Tris-CINa, se clarificó 30' a 3000 g. y el sobrenadante resultante se centrifugó a 40.000 r.p.m. durante 77' minutos a 4°C. Este material se resuspendió en Tris-CINa y se mantuvo en nitrógeno hasta su purificación a través de un gradiente preparativo de sacarosa 15-45% p/v a 41.000 r.p.m. y 10°C durante 215'. La masa viral obtenida se midió por absorbancia a 259 nm. El material así obtenido fue utilizado para determinar la dosis mínima inmunizante (DMI) según lo descrito por Berinstein *et al.*^{25, 26} y elaborar las vacunas con los diferentes inmunomoduladores.

3. FORMULACIÓN DE LAS VACUNAS

3.1. Vacunas para ratón

Todas las vacunas fueron formuladas conteniendo 0,1 μg de VFA O1-Campos purificado, inactivado y luego diluido en solución de fosfato salina (PBS) pH=7,2. Se utilizaron 5 formulaciones diferentes para inmunizar a los ratones: (1) una emulsión agua en aceite de acuerdo a la formulación INTA, (2) una formulación convencional con hidróxido de aluminio (2,5%), (3) una emulsión agua en aceite conteniendo Avridine (AV) [(N,N dioctadecil-N', N'-bis) (2-hidroxietil) propanodiamina] (Pfizer, Inc., USA), agregado a la fase oleosa en una dosis de 1 mg por ratón, y 2 formulaciones de hidróxido de aluminio (2,5%) incluyendo estas: (4) 20 μg por dosis de lipopolisacárido de *Brucella ovis* (LPS), o (5) la fase soluble en agua de la pared de *Mycobacterium* sp. (PCM) (10 μg por dosis).

3.2. Vacunas para bovino

Para la elaboración de las vacunas se utilizaron los subtipos de VFA O1-Caseros, C3/85, A87 y A79, sin purificar incluidos en formulaciones oleosas, con o sin el agregado de adyuvantes.

Se contó inicialmente con dos preparaciones de cada uno de los serotipos para la realización de las mezclas antigénicas. En la primera de ellas se hallaban las suspensiones virales tal como resultaron de los tanques de producción clarificadas e inactivadas. La segunda consistía de las mismas preparaciones pero concentradas luego de ser sometidas al proceso de ultrafiltración.

La medición de la masa viral por el gradiente de sacarosa arrojó las siguientes concentraciones para cada una de las preparaciones: para la

cepa O1-Caseros=2,5 y 24 $\mu\text{g/ml}$, para la C3/85=3,1 y 17,4 $\mu\text{g/ml}$, para la A87=1,04 y 10,08 $\mu\text{g/ml}$ y para la cepa A79=1,75 y 21,05 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.

Partiendo de estas preparaciones se elaboraron dos mezclas de antígeno cada una incluyendo diferentes cantidades por dosis de cada uno de los subtipos. La mezcla de menor concentración (Ag1) contenía para O1Caseros=1,5 $\mu\text{g/dosis}$, para C3/85=0,6 $\mu\text{g/dosis}$, para A79=1,4 $\mu\text{g/dosis}$ y para A87=1,2 $\mu\text{g/dosis}$. La mezcla antigénica de mayor concentración (Ag2) fue elaborada con las preparaciones ultrafiltradas y contenía de la cepa O1Caseros=3,3 $\mu\text{g/dosis}$, de C3/85=1,2 $\mu\text{g/dosis}$, de A79=2,9 $\mu\text{g/dosis}$ y de A87=2,6 $\mu\text{g/dosis}$.

Los inmunomoduladores usados fueron PCM y AV en dos concentraciones cada uno. Estas fueron para PCM: 50 μg y 100 $\mu\text{g/dosis}$ (PCM 1 y 2, respectivamente) y para AV: 10 mg y 20 mg/dosis (AV1 y AV2, respectivamente). El adyuvante PCM fue agregado a la fase acuosa de las vacunas, mientras que el AV fue disuelto en etanol 70% y añadido a la fase oleosa.

Se empleó una undécima vacuna comercial cuya formulación exacta era desconocida, aunque se sabía que los antígenos que la constituían habían sido producidos por medio del método de Frenkel. Esta fue incluida debido a los excelentes resultados obtenidos por la misma en la prueba de potencia por desafío viral. La formulación de las vacunas se muestra en la tabla 2.

Por último tres animales fueron mantenidos sin vacunación alguna (T.S.V.) como controles negativos y a su vez como animales centinelas de una posible actividad viral en el potrero de aislamiento. Durante toda la prueba se monitoreo en estos animales la presencia de anticuerpos contra la polimerasa viral (VIAA), la cual resultó negativa para todos los tiempos probados.

Tabla 2. Composición de las vacunas utilizadas para inmunizar a los bovinos

Vacuna Nro.	Antígeno	Adyuvante
1	AG1	PCM 1
2	AG2	PCM 1
3	AG1	PCM 2
4	AG2	PCM 2
5	AG1	AV1
6	AG2	AV1
7	AG1	AV2
8	AG2	AV2
9	AG1	-----
10	AG2	-----
11	COMERCIAL	-----

4. EXTRACCIÓN DE SANGRE, OBTENCIÓN DE PLASMA Y SUERO

Los ratones adultos fueron anestesiados con éter y luego sangrados por el seno retroorbital. La sangre fue recogida en tubos heparinizados. Luego se centrifugó por 5' a 1400 r.p.m. a 4°C. El plasma sobrenadante se guardó en viales a -20°C. Se extrajo además plasma de 20 animales normales y se lo reunió en una misma fracción, para luego poder ser usado como control negativo en la medición de las reacciones inespecíficas en las pruebas serológicas.

Los bovinos fueron sangrados a los 30, 60, 90 y 120 d.p.v., extrayéndose en cada caso el suero, que luego fue fraccionado y guardado a -20°C hasta su uso.

5. TITULACIONES

5.1. Titulación de virus

Se inocularon ratones lactantes por vía intra-muscular (i.m.) con diluciones en base 10 del virus puro para calcular la dosis letal 50% (DLRL 50%) / ml.²⁰⁸.

5.2. Titulación de anticuerpos neutralizantes

En las pruebas de seroneutralización, se empleó el método suero fijo-virus variable para determinar el índice seroneutralizante (ISN)⁶⁷, realizándose diluciones 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 calor (30' a 56°C) y diluido 1/5. La mezcla se incubó por 60' a 37°C y a 4°C por 30'. Los ratones lactantes fueron inoculados por VIA i.m. con 0,05 ml de esta mezcla. El ISN se determinó según la fórmula:
ISN = Título virus - Título mezcla plasma-virus

6. DURACIÓN DE INMUNIDAD

Todos los ratones fueron sangrados en grupos de 3 individuos en cada tiempo. El plasma resultante de cada grupo fue reunido en una sola fracción y se lo guardó a -20°C hasta su uso. Los ratones infectados fueron sangrados a los 3, 7, 14, 21, 45 y 60 días post-infección (d.p.i.). Los ratones inmunizados con las vacunas convencionales fueron sangrados en los mismos días más un tiempo adicional a los 180 días post-vacunación (d.p.v.), mientras que aquellos vacunados con formulaciones experimentales fueron sangrados a los 60 y 180 d.p.v., exclusivamente.

Los bovinos inmunizados con las diferentes formulaciones fueron todos sangrados a los 30, 60, 90 y 120 d.p.v.

7. PRUEBAS DE ELISA

7.1. Test de ELISA indirecto para detectar isotipos de IgG anti-VFA en plasma de ratón

Se sensibilizaron placas de ELISA (Nunc Immunoplate 1 Maxisorp, Denmark) con suero de captura conejo anti-VFA O1-Campos en buffer carbonato-bicarbonato pH 9,6. Luego de una incubación de 12 horas a 4°C se lavaron las placas 3 veces con PBS-Tween 20 (0,5%) (PBST) pH 7,4 (todos los lavados se realizaron con el mismo buffer) y se incubaron por 45' en agitación constante a 37°C (todas las incubaciones se realizaron bajo las mismas condiciones) con una dilución apropiada de VFA en buffer de bloqueo (BB), consistente en PBST-5% suero normal equino (SNE). Posteriormente las placas fueron lavadas nuevamente y se las incubó con diluciones, hechas en BB, de los sueros a testear. Luego de esto se repitieron los lavados y las placas fueron incubadas con suero policlonal producido en cabra contra isotipos de IgG de ratón (IgG1, IgG2a, IgG2b o IgG3). Por último las placas fueron lavadas 3 veces y se incubaron con un suero policlonal anti-Ig de cabra producido en conejo y conjugado con la enzima peroxidasa (Cappel, Suiza). Finalmente, antes de colocarse la etapa de sustrato, se las lavó 6 veces y se les añadió una solución reveladora de buffer citrato-fosfato(pH=5)/ortofenileno diamina dihidrocloridica(OPD)/H₂O₂ (3%). Se frenó la reacción con H₂SO₄ 2,5 N y la absorbancia resultante fue leída a 490 nm de longitud de onda en un lector Dynatech MR5000 Microplate Reader (Dynatech Laboratories, Inglaterra).

Los títulos se expresaron como el logaritmo de la inversa de la máxima dilución cuya lectura al menos duplicara la del suero negativo diluido 1 /10.

7.1.1. Puesta a punto del ELISA para detectar isotipos de IgG murinos anti-VFA

El ELISA diseñado para identificación y cuantificación de los isotipos de IgG específicos contra el VFA O1-Campos presentes en el plasma murino se esquematiza en la figura 1.

Los diversos isotipos de IgG presentes en el suero de los ratones normales Balb/c no están representados de igual forma¹⁶⁰. Este hecho puede modificar los títulos finales de cada uno de ellos obtenidos por ELISA, debido a la competición entre isotipos. Dicha competición se produciría entre las inmunoglobulinas por los sitios de pegado dentro de la placa⁷⁴. De esta forma los isotipos representados en mayor proporción ocuparían estos sitios desplazando a los existentes en menor medida y generando títulos que subestimarían aquellas subclases presentes en menor concentración.

En el caso del ELISA desarrollado para la medición de los isotipos murinos específicos para el VFA O1-Campos, las inmunoglobulinas de ratón se pegarían a las partículas virales capturadas, representado estas por la tanto, los sitios de posible competición entre ellas. Tanto la dilución del suero de conejo que se adsorbió en primer término a la placa como así también la del sobrenadante de infección que se usó como fuente del antígeno viral, fueron seleccionadas de forma tal de obtener un exceso de antígeno capturado y así prevenir tal competencia.

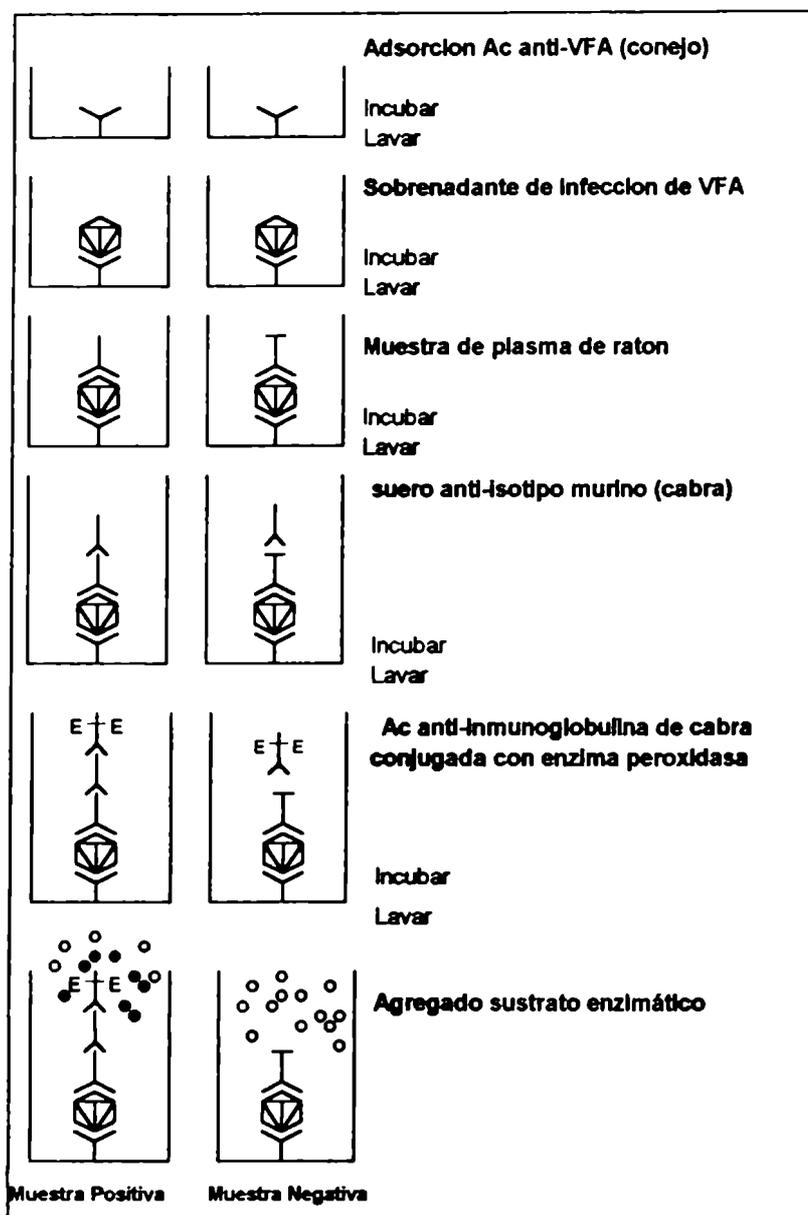


Figura 1. ELISA empleado para la detección de los isotipos de IgG murinos anti-VFA

7.1.2. Especificidad de los reactivos para detectar isotipos murinos

La especificidad de los sueros policlonales de cabra anti-subclases de IgG murinas, fue probada sustituyendo los sueros de ratón por uno de cuatro AcM (12FE9.2.1 y 10GA4.2.2²¹¹, y 4C9 y 1C6¹⁴²) contra VFA O1, cada uno de ellos de diferente isotipo. Tales AcM fueron usados de ahí en más como controles de especificidad. La descripción de estos monoclonales se hace en la tabla 3.

Tabla 3. Descripción de los AcM contra VFA O1 empleados para establecer la especificidad de los reactivos anti-isotipos de ratón.

AcM	Virus específico	Isotipo
12FE9.2.1	FMDV 01 Brugge	IgG1
10GA4.2.2	FMDV 01 Brugge	IgG3
4C9	FMDV 01 Suisse	IgG2a
1C6	FMDV 01 Suisse	IgG2b

7.1.3. Estandarización de los títulos de los ELISA anti-isotipo

Debido a que para la detección de cada isotipo se debió usar un suero detector diferente, el ensayo para la medición de cada isotipo constituía un sistema distinto en cada caso. Para poder comparar los títulos de isotipos obtenidos por cuatro sistemas diferentes se debía tener en cuenta en forma previa que la concentración de anticuerpos de cada reactivo anti-isotipo así como la afinidad de tales inmunoglobulinas por la subclase correspondiente difería entre ellos, consecuentemente fue necesario corregir estas diferentes sensibilidades antes de realizar las comparaciones.

Teniendo en cuenta que tanto la cantidad de antígeno viral capturado, como la concentración de los cuatro monoclonales control (dilución 1/5), se hallaban en exceso en todos los casos, las diferencias entre las densidades ópticas (D.O) máximas obtenidas para cada suero anti-isotipo usando el monoclonal con el isotipo homólogo, reflejaban aproximadamente las diferencias de potencia entre los reactivos anti-isotipos de IgG murinos. A partir de estos datos se calcularon factores de corrección para estandarizar las D.O., de forma que la conversión de D.O. a un título de isotipo en los cuatro sistemas produjera valores relativos confiables tal como fue descrito por McKendall y Woo¹⁴⁶.

7.2. Test de ELISA en fase líquida para suero de bovino

Se sensibilizaron placas Inmulon II (Dynatech) de 96 pocillos con suero de captura conejo anti-VFA O1 Campos en buffer carbonato-bicarbonato pH 9,6. Luego de una adsorción de 12 horas a 4°C se lavaron las placas 3 veces con PBST (todos los lavados se realizaron con el mismo buffer) y se bloquearon por 1 hora en agitación constante a 37°C (todas las restantes incubaciones se realizaron bajo las mismas condiciones) con PBST 1% ovalbumina (OVA). En una placa separada se incubaron los sueros a muestrear en diluciones de orden 5 empezando por 1/5 con una dilución fija de VFA de cada uno de los 4 serotipos proveniente de sobrenadantes de infección de monocapas de células BHK 21. En ambos casos el diluyente fue el mismo PBST 1% OVA. Luego de una hora de incubación las mezclas se traspasaron a la placa de ELISA y se dejaron a 37°C incubándose. Se realizaron 3 lavados y se colocó suero anti-VFA contra cada uno de los cuatro serotipos hecho en cobayo. Desde esta etapa en adelante el diluyente fue PBST 2% suero normal de conejo (SNC) - 2% suero normal de bovino (SNB). Por último luego de la incubación se lavaron 3 veces y se colocó anti-Ig de cobayo producido en conejo y conjugado con peroxidasa (Cappel, Suiza). Finalmente, se lavaron 6 veces y se revelaron con solución buffer citrato pH 5, ácido 2,2,-azino-di-3-etilbenztiasolin sulfónico (ABTS), H₂O₂ (3%). Las placas sin frenar fueron leídas a los 10' a 450 nm de longitud de onda, en el mismo lector mencionado anteriormente.

Los títulos se expresaron como el logaritmo de la inversa de la mayor dilución cuya absorbancia fuera el 50% de la del control sin suero. En la figura 2 se observa un esquema del ELISA empleado.

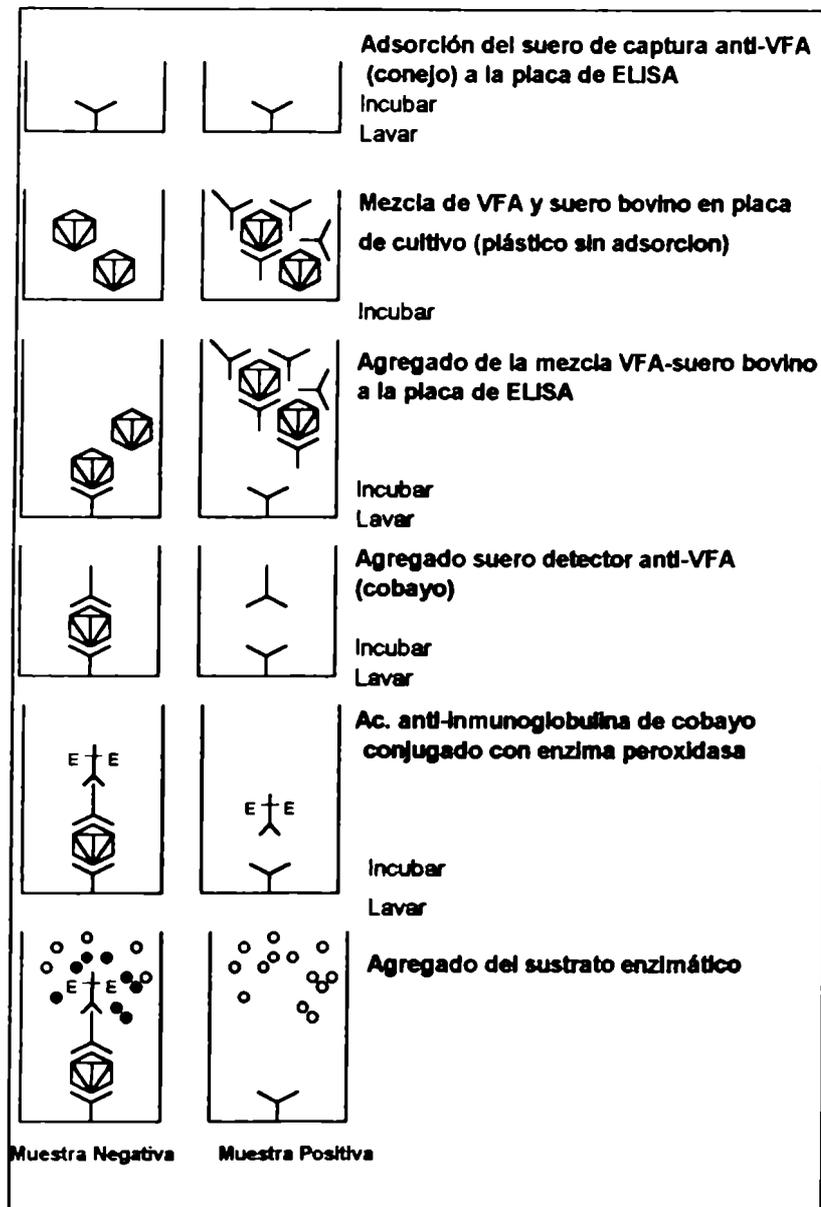


Figura 2.- ELISA en fase líquida utilizado para la detección de anticuerpos totales anti-VFA.

7.3. Test de ELISA indirecto para detectar isotipos de IgG anti-VFA en suero bovino

Los diferentes isotipos de inmunoglobulinas obtenidos luego de la inmunización con las diferentes formulaciones vacunales se determinaron por medio de un test de ELISA sandwich. El diseño del mismo es básicamente similar al presentado en la figura 1, con la excepción de que los

detectores de isotipos de IgG bovinas fueron en este caso AcM y que el conjugado fue un suero anti-Ig de ratón / peroxidasa. Se sensibilizaron placas Inmulon II (Dynatech) de 96 pocillos con suero de captura conejo anti-VFA O1 Campos en buffer carbonato-bicarbonato pH 9,6. Luego de una incubación de 12 horas a 4°C se lavaron las placas 3 veces con PBST pH 7,4 (todos los lavados se realizaron con el mismo buffer) y se incubaron por 45' en agitación constante a 37°C (todas las incubaciones se realizaron bajo las mismas condiciones) con una dilución apropiada de VFA en BB (PBST 5% SNE). Las placas se lavaron nuevamente y se las incubó con las diluciones apropiadas de los sueros a testear, también hechas en BB. Luego del lavado, se incubaron con AcM contra los isotipos IgG1 e IgG2 de bovino, diluidos apropiadamente en BB. Las placas se incubaron con suero anti-inmunoglobulina de ratón peroxidasa (Jackson) luego de 5 lavados. Por último las placas fueron lavadas 6 veces y se revelaron con solución buffer citrato-fosfato (pH 5) / OPD / H₂O₂ (3%). Se frenó la reacción con H₂SO₄ 2,5 N y se leyeron las placas a 490 nm, tal como fue descrito anteriormente.

Los títulos se expresaron como el logaritmo de la inversa de la máxima dilución cuya lectura al menos duplicara la del suero negativo diluido de igual forma.

7.3.1. Puesta a punto del ELISA para detectar isotipos de IgG bovinos anti-VFA

A diferencia del ensayo para detectar isotipos de IgG murinos específicos contra el VFA, para estos ensayos se contó con AcM de especificidad probada contra cada uno de los dos isotipos bovinos a determinar. Los AcM DAS-17 (anti-IgG1) y DAS-2 (anti-IgG2)⁴⁷ fueron cedidos gentilmente por el Dr. S. Srikumaran de la Universidad de Nebraska, EE.UU.

Para probar la especificidad del ensayo, se realizaron pruebas de reacción entre los AcM y otras etapas del ELISA anteriores y no consecutivas (suero de conejo anti-VFA y suspensión conteniendo el VFA O1-Campos).

8. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Los estudios estadísticos fueron realizados sobre la transformación logarítmica de la inversa de los títulos obtenidos en cada caso. Para la comparación entre los niveles de anticuerpos generados por los bovinos de los distintos grupos vacunados con cada una de las formulaciones se utilizó en primer término el test de ANOVA, de forma tal de detectar diferencias generales entre los grupos de animales inmunizados con cada una de las 11 vacunas. Una vez encontradas tales diferencias se emplearon como técnicas post-ANOVA, el test de Tuckey como método para la comparación entre pares de formulaciones y el de contrastes ortogonales en el caso de comparar grupos de vacunas entre si.

En los casos en los que se estudió la correlación entre dos variables se aplicó el método de regresión lineal y ajuste por cuadrados mínimos.

RESULTADOS

Experimentos en ratón

1. Determinación de los isotipos de IgG específicos contra el VFA

Como paso inicial en esta tesis se propuso la comparación de los isotipos de las IgG de ratón específicos contra el VFA O1-Campos, generados en estos animales luego de su infección o inmunización con distintas vacunas convencionales o experimentales conteniendo adyuvantes.

1.1. Especificidad de los reactivos para detectar isotipos murinos

Los sueros anti-subclases de IgG murinas fueron probados en su especificidad, reemplazando, en el mismo sistema de ELISA, el plasma de ratón por AcM producidos contra VFA serotipo O1, pertenecientes cada uno a un diferente isotipo.

Como se muestra en la figura 8 las diluciones óptimas resultaron 1/2000 para los sueros anti-IgG1, anti-IgG2a y anti-IgG3, y 1/3000 para el suero anti-IgG2b. En todos los casos los sueros anti-isotipo fueron de 3 a 7 veces más específicos para el isotipo correspondiente que para los heterólogos.

1.2. Estandarización de los títulos de los ELISA anti-isotipo

En la figura 9 se observa la respuesta en los cuatro ELISA de distintas diluciones de los cuatro AcM con cada uno de los sueros anti-isotipo en la dilución óptima. A partir de estos datos, se calcularon los factores de corrección de forma de normalizar entre sí los títulos producidos para cada isotipo. Las D.O. obtenidas por cada reactivo anti-isotipo con su monoclonal homólogo fueron tomadas como indicador de la concentración y afinidad del suero anti-isotipo por las inmunoglobulinas de ratón correspondientes.

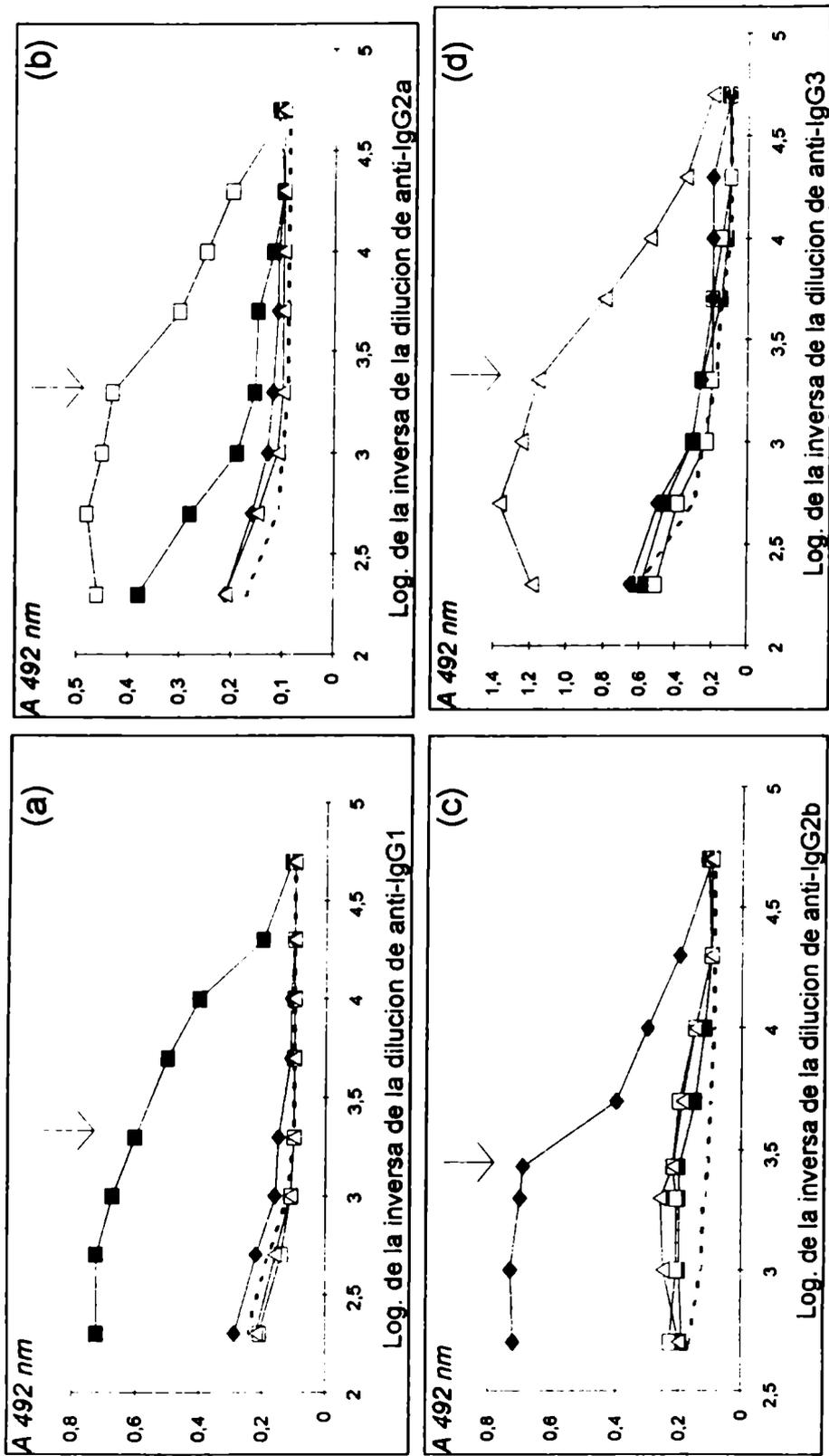


Figura 8. ELISA para determinar la especificidad de los reactivos anti-isotipos de IgG murinos. El virus capturado fue incubado con plasma normal de ratón (—) diluido 1:10, o con un grupo de AcM anti-VFA (diluído 1:5) de isotipos IgG1 (■), IgG2a (□), IgG2b (◆), o IgG3 (△). Luego fueron agregadas varias diluciones de anti-IgG1 (a), -IgG2a (b), -IgG2b (c), o -IgG3 (d) a cada grupo de AcM. Las flechas indican la dilución de trabajo óptima para cada reactivo anti-isotipo.

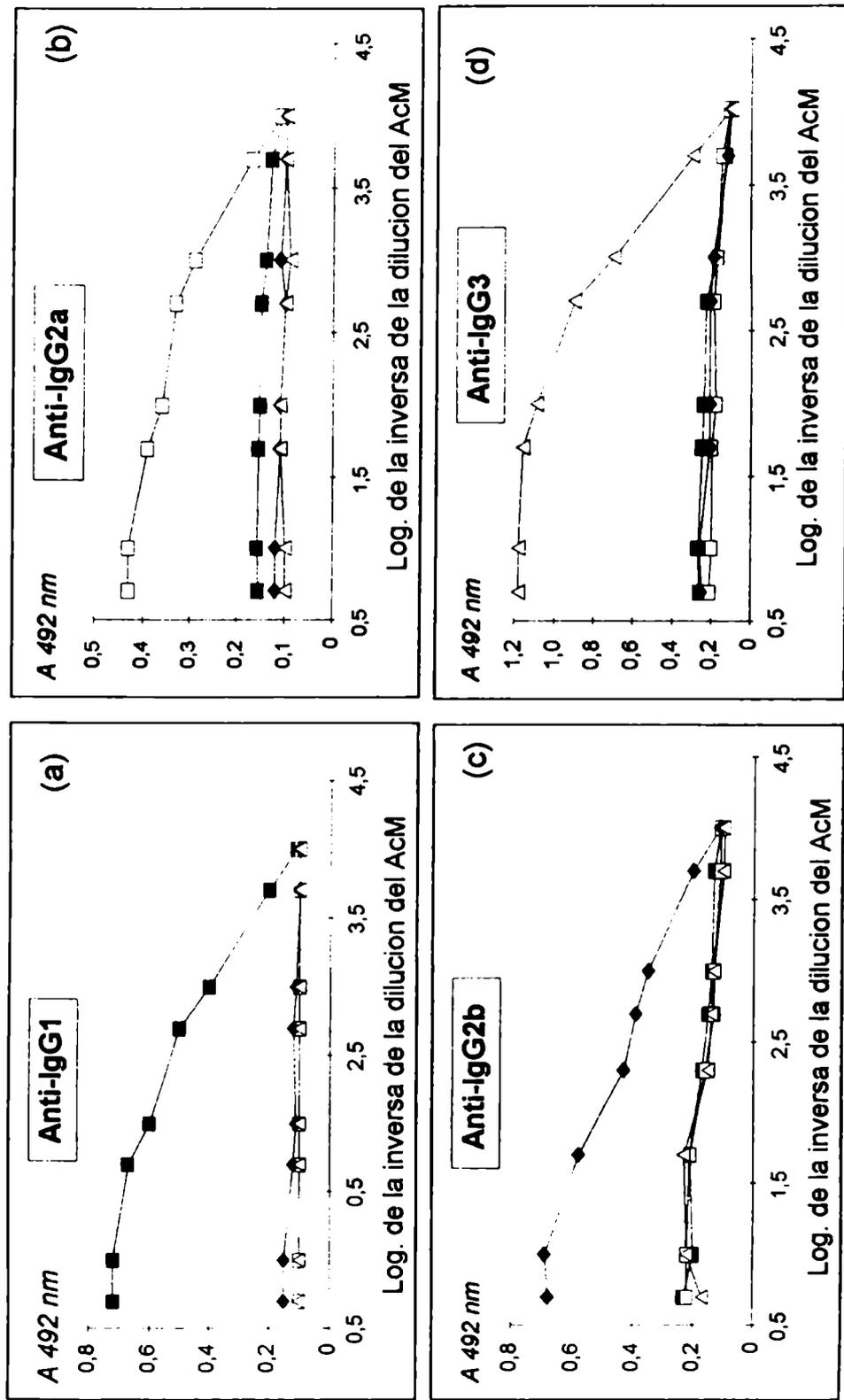


Figura 9. Actividad de los anti-isotipos contra diferentes diluciones de un grupo de AcM anti-VFA. La dilución óptima de cada anti-isotipo [1:2000 para anti-IgG1(a), anti-IgG2a(b) y anti-IgG3(d); y 1:3000 para anti-IgG2b(c)]; fue agregada a AcM con isotipos IgG1 (■), IgG2a (□), IgG2b (◇) y IgG3 (△) en el mismo sistema que el descrito en la figura 2.

El suero anti-isotipo que mayor afinidad demostró por las anticuerpos con el isotipo homólogo, fue el anti-IgG3. De la relación entre la D.O. máxima obtenida por este reactivo con la de los restantes sueros anti-isotipo surgieron los factores de corrección (tabla 4).

Tabla 4. Los factores de corrección para los reactivos anti-subclases de IgG fueron calculados como la relación entre la absorbancia obtenida para el anti-IgG3 (en la dilución óptima) con su AcM homólogo (10GA4.2.2) diluido 1:5; y los obtenidos por los anti-IgG1, -IgG2a o -IgG2b con sus AcM homólogos (12FE9.2.1, 4C9 y 1C6 respectivamente) en las mismas condiciones. Las diluciones finales aparentes para IgG1, IgG2a y IgG2b fueron ajustadas por sus factores respectivos para compensar su menor potencia respecto al suero anti-IgG3.

Subclases de IgG	A492 nm	Factor de corrección
IgG1	0.724	1.64
IgG2a	0.403	2.93
IgG2b	0.676	1.75
IgG3	1.183	1.00

2. Perfiles de isotipos de animales infectados

En la figura 10 se muestran los perfiles isotípicos y los I.S.N. obtenidos a los 3, 7, 14, 21, 45 y 60 d.p.i. No se detectó ninguna subclase de IgG específica para VFA hasta los 7 d.p.i., momento en el que se detectaron los isotipos IgG1 e IgG3. Dos semanas post-infección los otros 2 restantes isotipos hicieron su aparición, mientras que IgG1 e IgG3 mostraron niveles más elevados que a la semana. El patrón registrado a este tiempo se mantuvo hasta el día 60 d.p.i., con niveles predominantes de IgG2b, seguidos por IgG1 y luego IgG2a e IgG3.

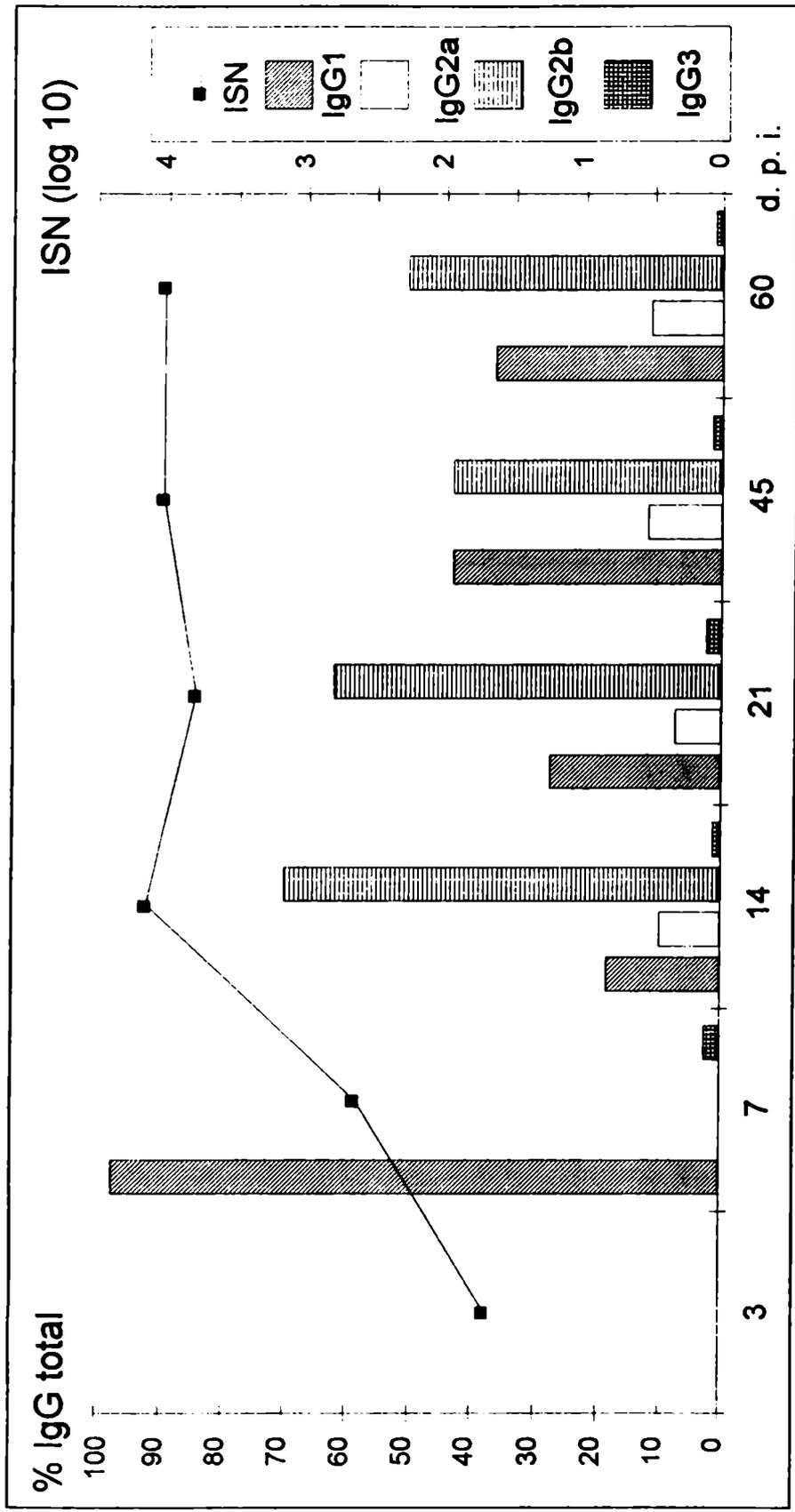


Figura 10. ISN y perfiles isotípicos en animales infectados. La dilución final de cada isotipo fue definida como la mayor dilución del plasma que produce una absorbancia al menos 2 veces mayor a la del plasma normal de ratón diluido 1:10. Los títulos para cada subclase fueron entonces definidos como el logaritmo de la inversa de la dilución final corregida. Los títulos finales fueron en todos los casos la media de 2 ensayos independientes realizados por duplicado.

3. Perfiles de isotipos de animales inmunizados con vacunas convencionales

En todos los animales inmunizados con la vacuna de hidróxido de aluminio, el isotipo predominante fue el IgG1, mostrando el título más alto en el día 60 d.p.v. La actividad IgG2a fue transitoriamente detectada a los 45 y 60 d.p.v. y en menores concentraciones que para IgG1.

En estos animales el isotipo IgG2b fue el menos abundante de los detectados, y sólo fue revelada su presencia a los 60 d.p.v. No se detectó IgG3 durante todo el período experimental. (figura 11 a).

Por otro lado, los animales inmunizados con la vacuna de formulación oleosa convencional, presentaron como isotipo predominante el IgG2a desde los 21 d.p.v. Se detectó IgG1 a los 45 d.p.v., pero en concentraciones dos veces menores que las de IgG2a. Los títulos de IgG1 presentaron un incremento a los 60 d.p.v. como fue descrito anteriormente para la vacuna de hidróxido de aluminio, hasta casi igualar los títulos de IgG2a. A los 180 d.p.v. los títulos de IgG1 e IgG2a eran todavía similares entre sí, pero menores que para los 60 d.p.v.

Como en el caso de los animales vacunados con la formulación acuosa, la IgG2b fue sólo detectada a los 60 d.p.v., coincidiendo con el pico del I.S.N., y no se registró actividad de IgG3 en ningún tiempo (figura 11 b).

Para ambas formulaciones aquellos isotipos presentes en mayor concentración fueron también los primeros en ser inducidos.

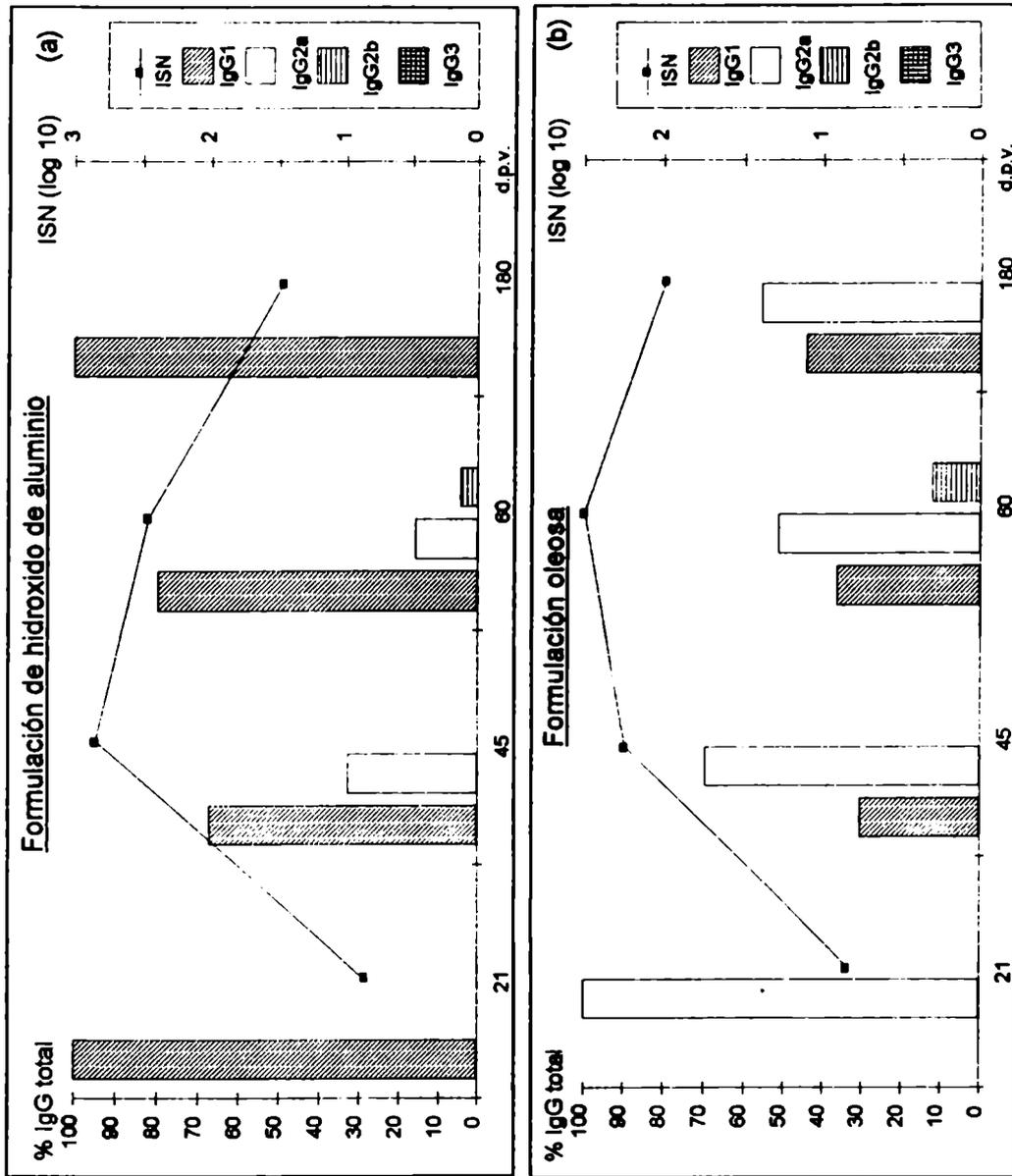


Figura 11. ISN y perfiles de isotipos en animales inmunizados con vacunas convencionales. Los isotipos de IgG en los ratones inmunizados con las formulaciones de hidróxido de aluminio (a) u oleosa (b) fueron detectados desde los 21 d.p.v. Los títulos fueron calculados como en la figura 4.

5. Perfiles de isotipos de animales inmunizados con vacunas experimentales

El patrón de actividad de los isotipos de IgG en animales vacunados con formulaciones incluyendo AV, PCM o LPS fue establecido a los 60 y 180 d.p.v. y comparado con los obtenidos por los mismos vehículos sin tales inmunomoduladores.

La vacuna conteniendo PCM indujo niveles predominantes de IgG1 a los 60 d.p.v., seguida por IgG2b e IgG2a en concentraciones 3 y 8 veces menores que para la IgG1, respectivamente (figura 12 b).

Por otro lado, la inclusión del LPS generó al mismo tiempo niveles de IgG2a de 2 a 6 veces mayores que los de IgG1 e IgG2b respectivamente (figura 12 c).

Las vacunas incluyendo PCM o LPS indujeron a los 180 d.p.v. casi el mismo perfil isotípico con producción de IgG2b e IgG2a, isotipos que no estaban presentes en la formulación acuosa convencional a ese tiempo (figura 12 a).

La vacuna oleosa incluyendo AV produjo títulos dominantes de IgG1 seguidos por la IgG2a a los 60 d.p.v. (figura 13 b). A ese mismo tiempo la vacuna convencional oleosa generó mayores niveles de IgG2a seguidos por IgG1 y IgG2b (figura 13 a).

Seis meses después de la inmunización la IgG2a era aún el isotipo predominante en el plasma de los animales inmunizados con la formulación convencional, seguidos por IgG1, aunque el isotipo IgG2b no pudo ser detectado. Mientras tanto la formulación experimental a los 180 d.p.v. indujo títulos dominantes de IgG2b e IgG1, con producción de IgG2a pero en menor cantidad. Como con las formulaciones convencionales, no se detectó actividad de IgG3 contra el VFA en ninguna de las formulaciones experimentales durante todo el período de tiempo de la prueba.

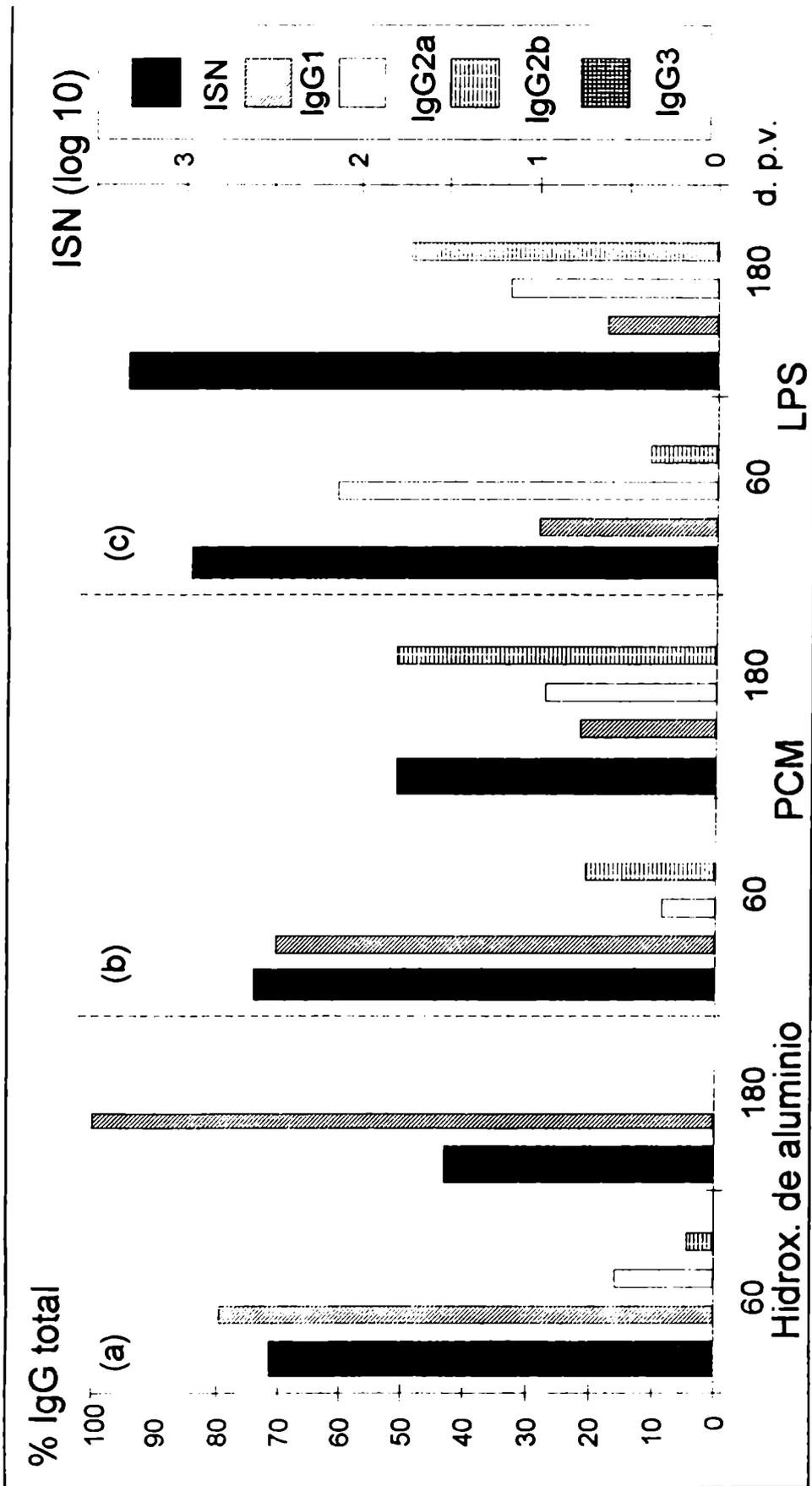


Figura 12. ISN y perfiles isotípicos determinados en animales vacunados con virus inactivado en hidróxido de aluminio solo(a) o con la adición de PCM (b) o LPS (c) a los 60 y 180 d.p.v. Los títulos para cada isotipo se calcularon según lo descrito en la figura 4.

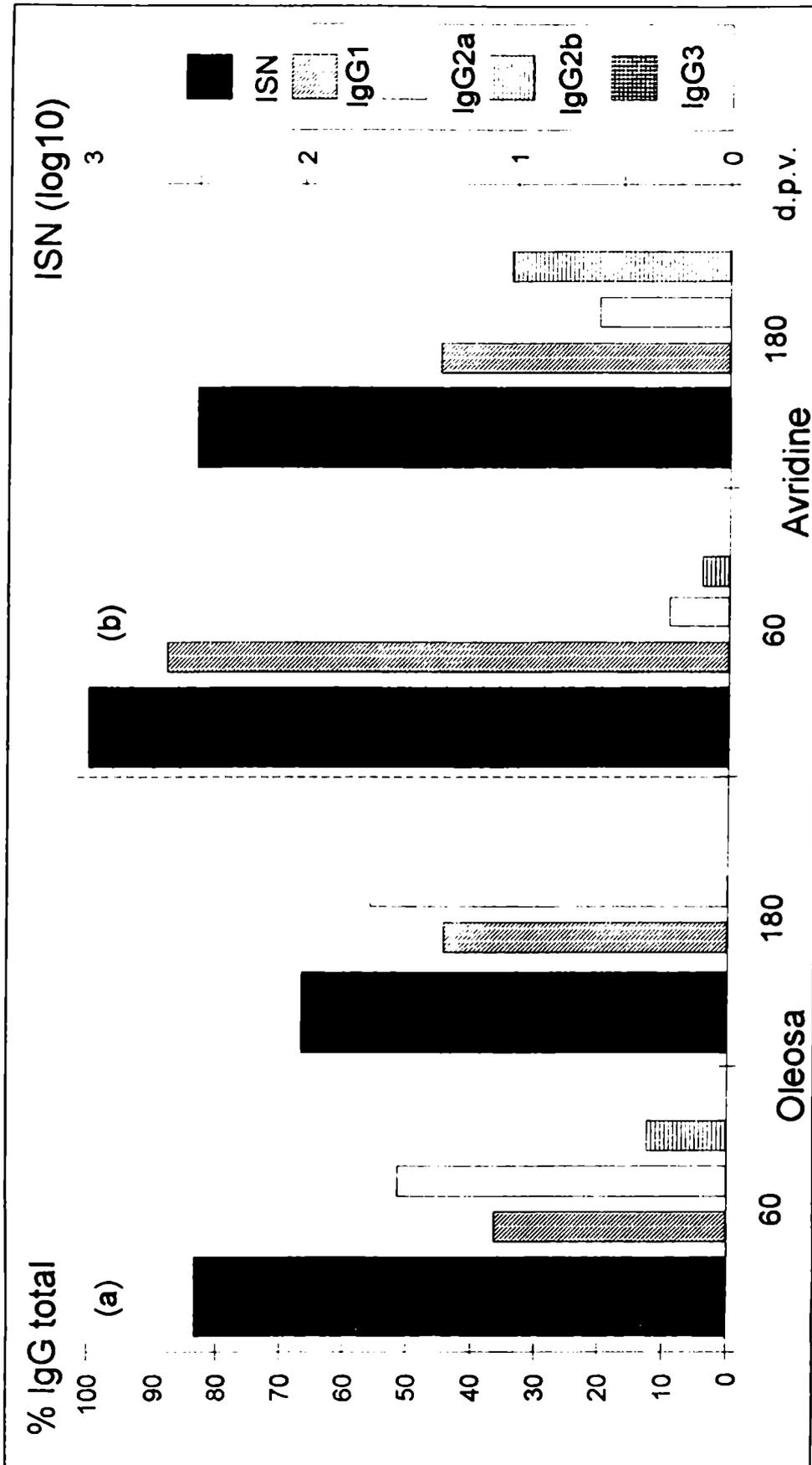


Figura 13. ISN y perfiles isotípicos determinados en animales vacunados con virus inactivado en una emulsión aceite en agua sola (a) o con la adición de Avridine (b) a los 60 y 180 d.p.v. Los títulos para cada isotipo se calcularon según lo descrito en la figura 4.

Experimentos en bovino

1. Selección de las formulaciones a utilizar en la experiencia

De los tres inmunomoduladores probados en ratón, sólo dos se producen a escala industrial: el PCM y el AV. Por esta razón y a partir de los resultados obtenidos en el modelo murino se propuso la utilización de estos dos adyuvantes en las experiencias en bovinos. Ambas sustancias fueron incluidas en formulaciones oleosas. A diferencia de las vacunas usadas con los ratones, las empleadas en las experiencias con los bovinos contenían 4 cepas de VFA: O1-Caseros, A79, C3/85 y A87.

Tal como se describe en materiales y métodos, se utilizaron dos concentraciones de cada uno de los inmunomoduladores (PCM1 y AV1, las dos menores y PCM2 y AV2, las dos mayores) y dos concentraciones de cada una de las cuatro cepas de VFA utilizadas (Ag1, la menor y Ag2, la mayor). Con estas variables se formularon 10 vacunas diferentes como se muestra en la figura 14, con las que se inmunizaron grupos de 8 animales.

Se incluyó un undécimo grupo inoculado con la mejor vacuna comercial del mercado, que había sido sometida a la prueba de desafío viral oficial (inoculación por vía intradermolingual conteniendo 10.000 dosis infectantes bovino (DIB) 50% de VFA cepa O1-Caseros), resultando protegidos de la infección la totalidad de los 16 bovinos desafiados. Como control de circulación del agente viral en la zona donde eran mantenidos los animales, se mantuvieron 3 individuos sin vacunar, los cuales eran evaluados tanto con las pruebas serológicas de los restantes grupos, como con ensayos de ELISA para determinar la presencia de anticuerpos contra la polimerasa viral (VIAA). En todos los casos los resultados fueron negativos a lo largo de la experiencia

Nro.	Ag1	Ag2	PCM1	PCM2	AV1	AV2
1	■		■			
2		■	■			
3	■			■		
4		■		■		
5	■				■	
6		■			■	
7	■					■
8		■				■
9	■					
10		■				

Figura 14. Esquema de la formulación de las vacunas elaboradas para la inmunización de los bovinos

2. Títulos de anticuerpos totales anti-VFA con las diferentes formulaciones

Para la medición de los anticuerpos totales específicos contra el VFA se utilizaron 4 sistemas de ELISA en fase líquida, uno para cada una de las cuatro cepas de VFA presentes en las vacunas. Se utilizaron sueros policlonales de conejo y cobayo como fuentes de anticuerpos de captura y detector, respectivamente. Las muestras de suero analizadas fueron tomadas a los 30, 60, 90 y 120 d.p.v. de los 12 grupos anteriormente mencionados. En las figuras 15, 16, 17 y 18 se muestran los promedios por grupo de los títulos de anticuerpos obtenidos por ELISA en fase líquida a los 30, 60, 90 y 120 d.p.v. para los serotipos O1-Caseros, C3/85, A79 y A87 respectivamente.

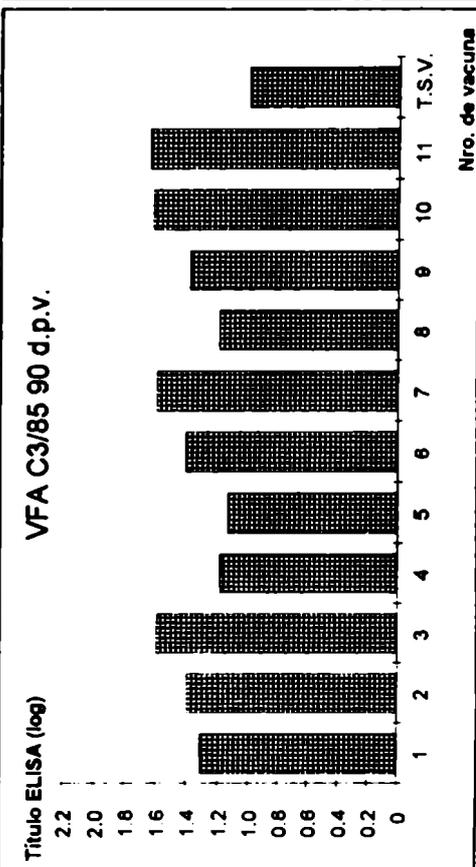
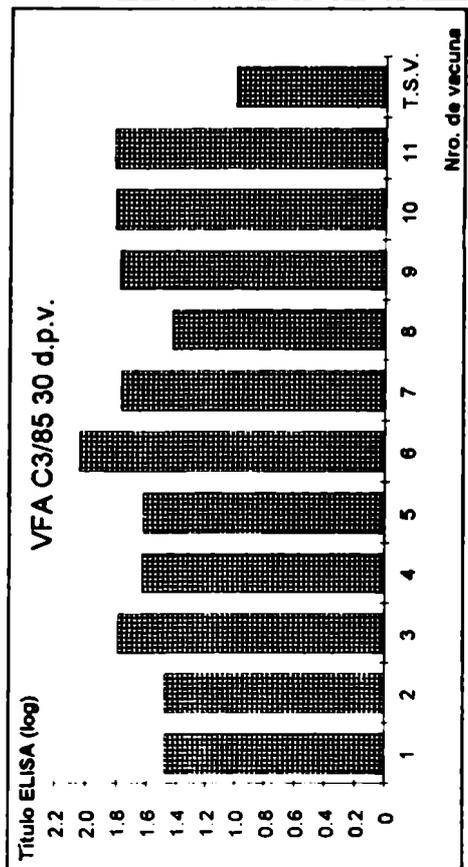
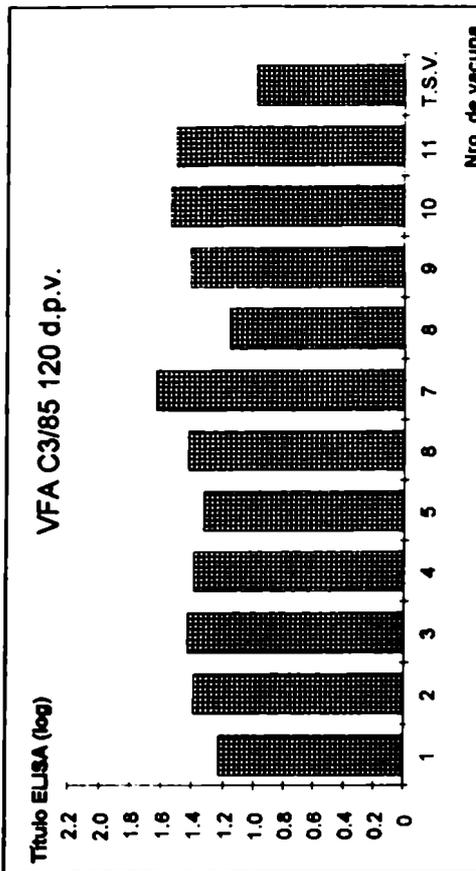
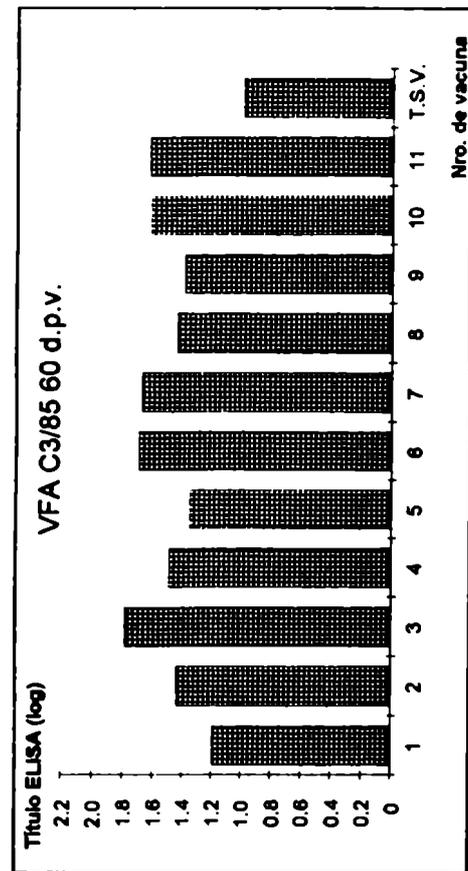


Figura 16. Promedio de los títulos de anticuerpos totales anti-VFA C3/85 medidos para cada grupo experimental por ELISA en fase líquida a los 30, 60, 90 y 120 d.p.v. Los títulos se calcularon como en la figura 10. 0,30, 0,16, 0,16, 0,16 y 0,10 (0,18)

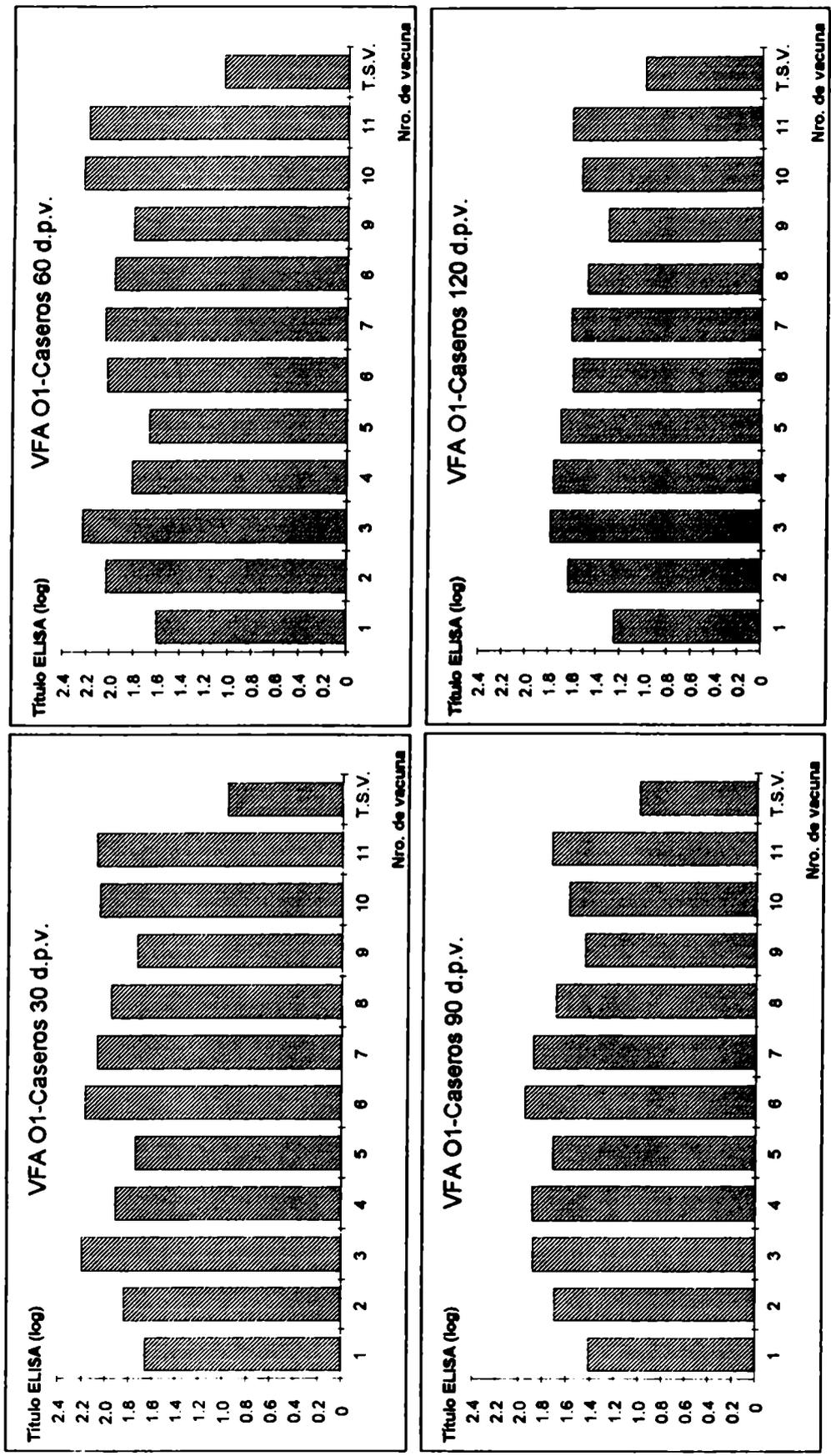


Figura 15. Promedios de los títulos de anticuerpos totales anti-VFA O1-Caseros medidos para cada grupo experimental por ELISA en fase líquida. Los títulos se calcularon como la inversa de la mayor dilución cuya absorbancia fuera el 50% de la del control sin suero. 0,27, 0,23, 0,18 y 0,14. (0,20).

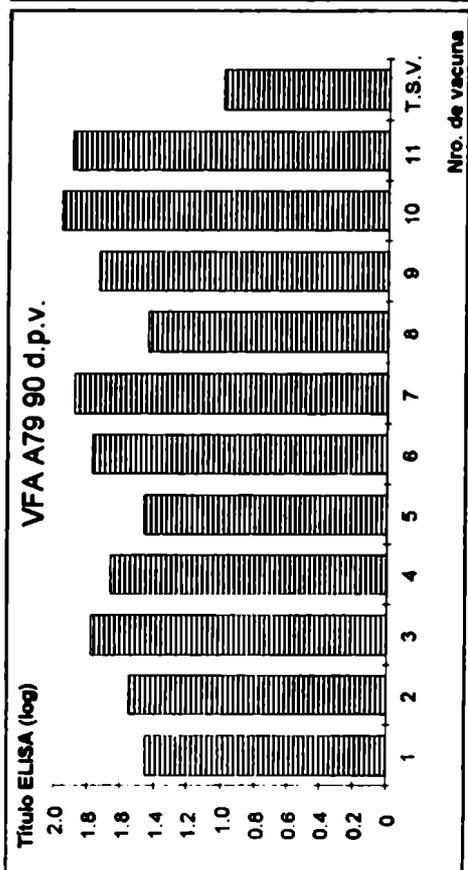
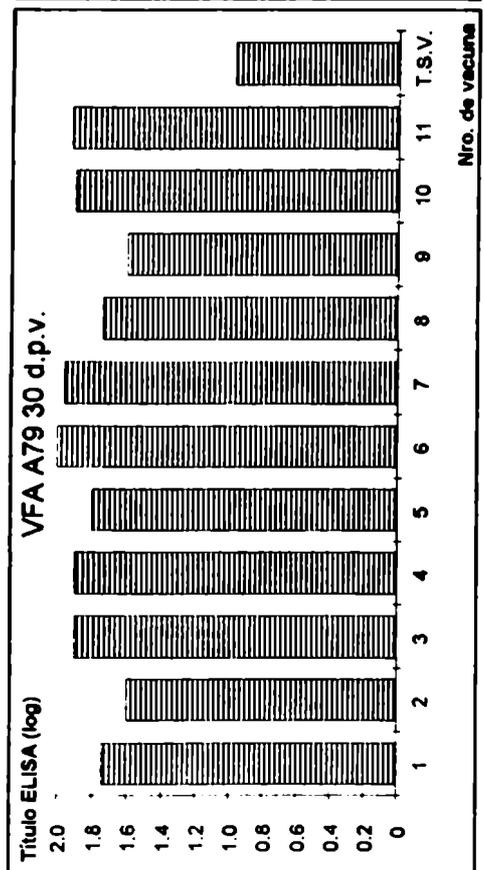
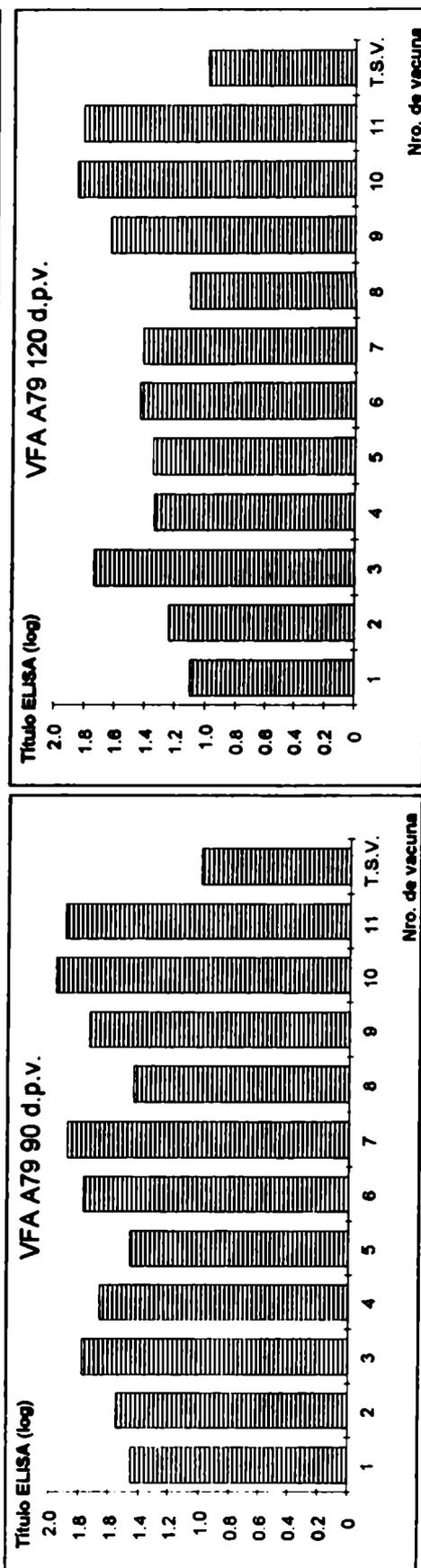
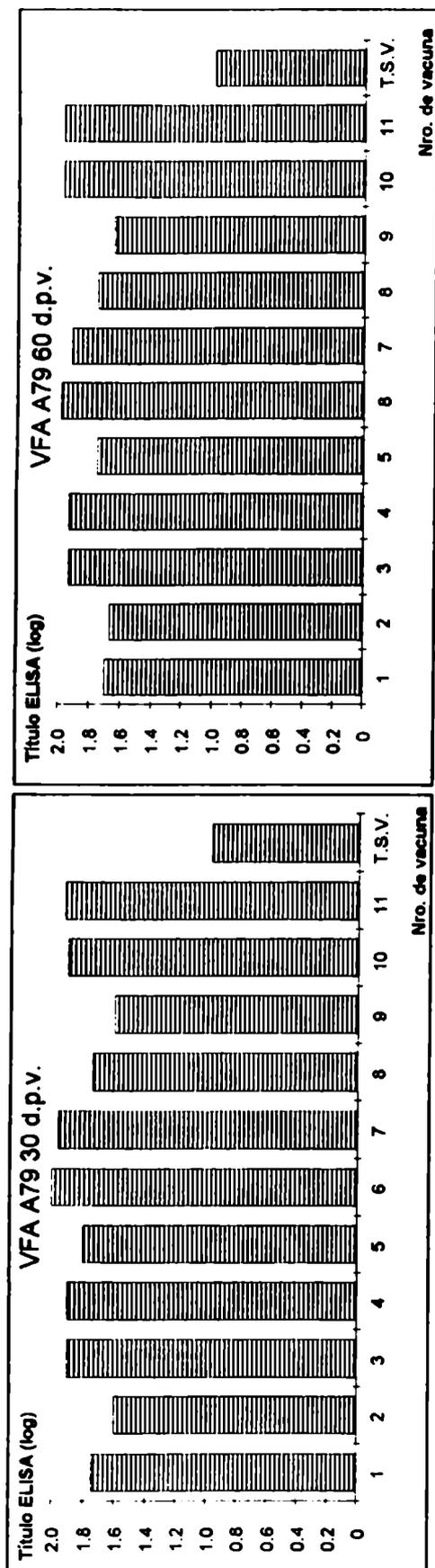


Figura 17. Promedio de los títulos de anticuerpos totales anti-VFA A79 medidos para cada grupo experimental por ELISA en fase líquida a los 30, 60, 90 y 120 d.p.v. Los títulos se calcularon como en la figura 10. 0,15, 0,14, 0,18 y 0,14 (0,15)

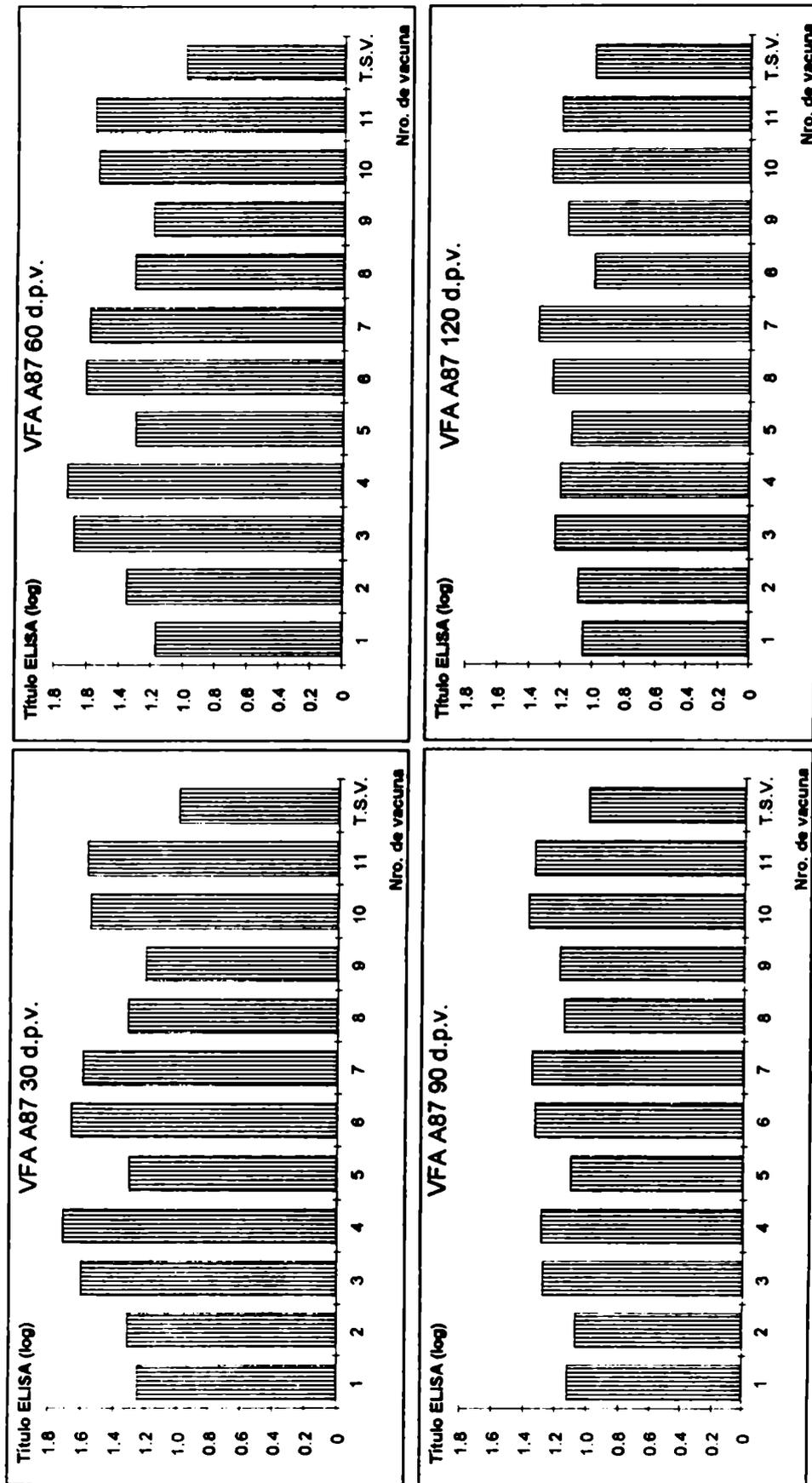


Figura 18. Promedio de los títulos de anticuerpos totales anti- VFA A87 medidos para cada grupo experimental por ELISA en fase líquida a los 30, 60, 90 y 120 d.p.v. Los títulos se calcularon como en la figura 10. 0,22, 0,22, 0,16 y 0,09 (0,17)

Para el análisis estadístico comparativo inicial de tales grupos se utilizó el método de ANOVA el cual tiene como uno de sus supuestos un nivel de variación intra-grupo (es decir entre los 8 bovinos de un mismo grupo) similar para todos ellos. El valor de esta variación surge del cuadrado medio del error experimental y es único para cada cepa en cada tiempo. Por esta razón no se muestran los desvios estandar individuales en cada uno de los títulos promedios presentados en las figuras 15, 16, 17 y 18.

2.1 Efecto de la cantidad de antígeno en la respuesta humoral inducida

A partir de los 30 d.p.v. y hasta los 120 d.p.v. se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de anticuerpos totales específicos de las vacunas 9 (formulada con Ag1) y 10 (formulada con Ag2). Tales diferencias tuvieron un nivel de significancia dispar según los serotipos y el tiempo considerado.

Para la cepa O1 Caseros las mayores diferencias se mostraron entre los 30 y 60 d.p.v. ($p \leq 0.1$), para hacerse menores a partir de los 90 d.p.v. ($p \leq 0,2$) (figura 15).

En el serotipo A79 las diferencias se mantuvieron entre los 30 y los 120 d.p.v. (figura 17), mientras que el serotipo A87 mostró diferencias significativas básicamente a los 30 y 60 d.p.v. (figura 18).

Por último la cepa C3/85 no presentó distintos niveles de anticuerpos entre estas dos formulaciones excepto transitoriamente a los 60 d.p.v. (figura 16).

La comparación de los títulos promedio de anticuerpos para el serotipo O1-Caseros entre las vacunas 9 y 11 (comercial), mostró la existencia de diferencias significativas en todos los tiempos probados.

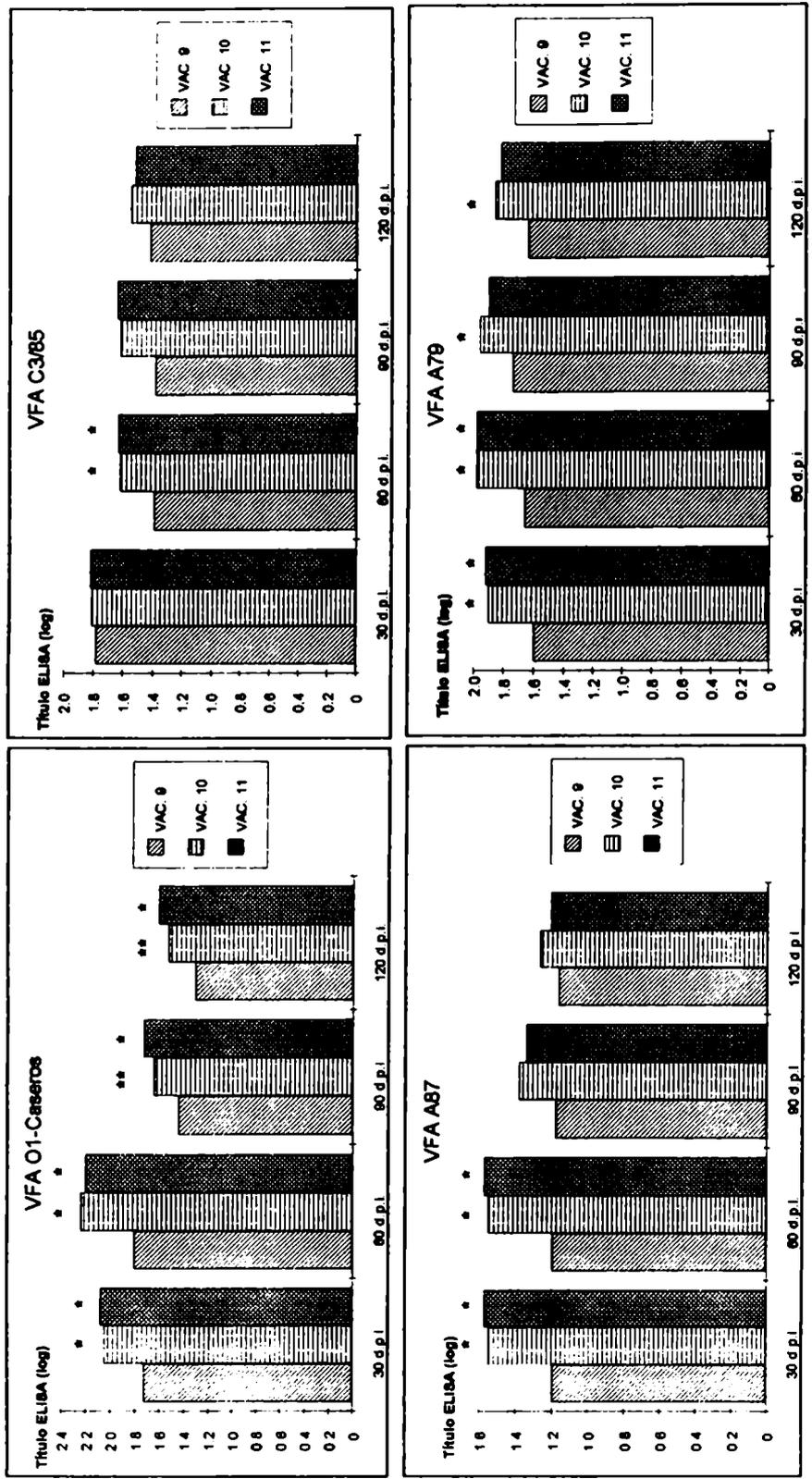


Figura 19. Comparación entre los promedios de los títulos alcanzados por las formulaciones con Ag1 (vacuna 9), Ag2 (vacuna 10) y la vacuna comercial (vacuna 11). Diferencias significativas: (*) $p \leq 0.1$, (**) $p \leq 0.2$

Tanto para el serotipo A87 como para el A79, las diferencias sólo se mantuvieron entre los 30 y 60 d.p.v. En relación al subtipo C3/85, como ocurrió en la comparación anterior con la vacuna 10, la vacuna 9 sólo fue superada significativamente por la formulación comercial a los 60 d.p.v.

A su vez para todos los serotipos y en todos los tiempos no se registraron diferencias entre los niveles de anticuerpos inducidos por la formulación comercial en relación a la de mayor concentración de Ag (vacuna 10).

Según lo expuesto anteriormente el serotipo O1-Caseros fue el que mostró por más tiempo y en mayor grado diferencias significativas entre los títulos promedio de anticuerpos específicos producidos por las vacunas 9, 10 y 11. Debido a esto se decidió emplear esta cepa como modelo para observar las variaciones producidas por la introducción de los inmunomoduladores a las mezclas antigénicas antes mencionadas. Un resumen de los resultados antes mencionados se muestran en la figura 19.

2.2. El efecto de la inclusión de los adyuvantes en las vacunas con la menor concentración de antígeno

Los títulos de anticuerpos alcanzados por la adición de los inmunomoduladores en menor concentración (PCM1 y AV1) al Ag en menor cantidad (vacunas 1 y 5, respectivamente) no lograron superar inicialmente a los de su control sin adyuvante (vacuna 9).

Estas tres formulaciones presentaron un perfil de comportamiento similar a lo largo de la experiencia que permitió agruparlas como un conjunto sin diferencias estadísticas en todos los tiempos analizados.

Por el contrario aquellas formulaciones que contenían el Ag en menor concentración y PCM o AV en su mayor concentración (vacunas 3 y 7, respectivamente) indujeron niveles de anticuerpos que fueron significativamente mayores en todos los casos a los de su control (vacuna

9). Al igual que lo que ocurrió entre las vacunas 1, 5 y 9, las formulaciones 3 y 7, mostraron títulos similares a los de las vacunas 10 y 11 a lo largo del tiempo. Como en el caso anterior estas cuatro formulaciones fueron agrupadas atendiendo a esta similitud.

En consecuencia se establecieron dos patrones generales de evolución en los títulos de anticuerpos durante toda la experiencia. El primero de ellos, representado por el grupo de vacunas 1, 5 y 9, produjo en todos los tiempos títulos significativamente inferiores a los del segundo grupo formado por las vacunas 3, 7, 10 y 11 (tabla 5).

Tabla 5. Cuadro de diferencias estadísticas en los agrupamientos de vacunas con perfil similar de título de anticuerpos contra el VFA O1-Caseros a los 30. 60. 90 y 120 d.p.v. Diferencias significativas: (*) $p \leq 0.1$

Vac.	30 d.p.i			60 d.p.i			90 d.p.v.			120 d.p.i		
	Título	Prom.	Dif.	Título	Prom.	Dif.	Título	Prom.	Dif.	Título	Prom.	Dif.
9	1,73	1,71	0,39*	1,80	1,70	0,47*	1,45	1,42	0,39*	1,30	1,28	0,36*
1	1,66			1,60			1,41			126		
5	1,74			1,69			1,71	1,70				
3	2,20	2,10		2,23	2,17		1,88	1,81		1,78	1,64	
7	2,07			2,03			1,88			1,60		
10	2,05			2,24			1,58 ^g			1,53		
11	2,08			2,20			1,76			1,61		

Como únicas excepciones se debe marcar que la vacuna 5 (Ag1-AV1) se desprendió del grupo de las vacunas 1 y 9 a partir de los 90 d.p.v. para unirse al de las vacunas 3, 7, 10 y 11, y que la vacuna 10 (Ag2) se separó transitoriamente de este grupo a los 90 d.p.v. debido a una pronunciada caída en sus títulos entre los 60 y 90 d.p.v. (figura 20).

Vale mencionar que la existencia de estos dos grupos fue registrada en general para todas las cepas, con ligeras variaciones a lo descrito para el subtipo O1-Caseros.

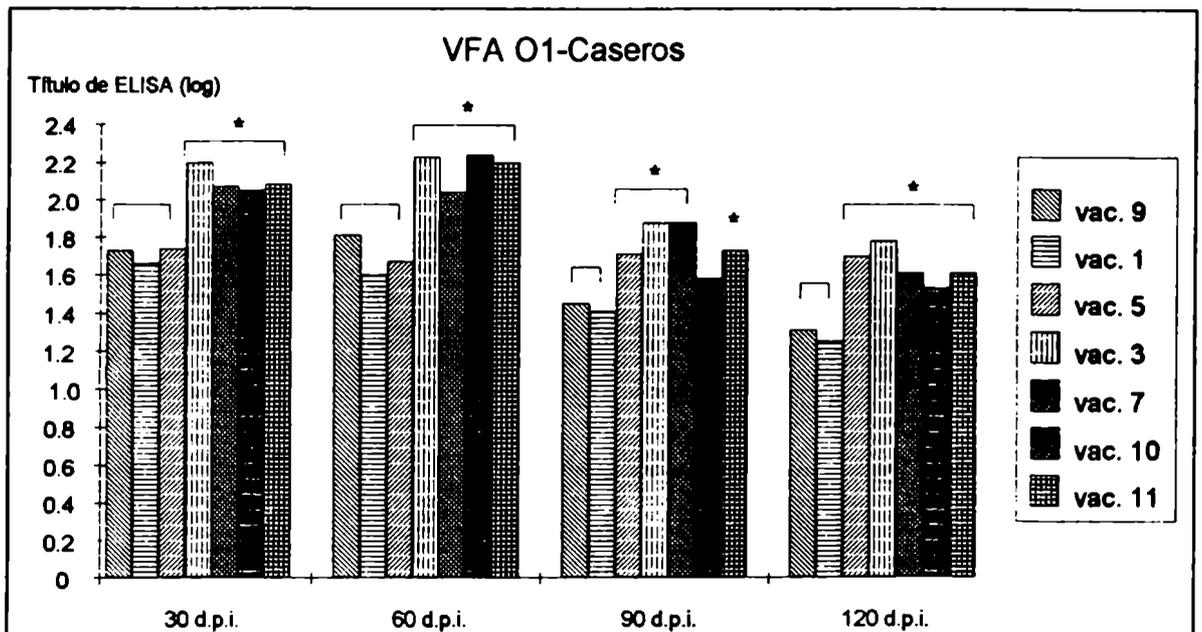


Figura 20. Diferencias entre los títulos de anticuerpos producidos por las vacunas conteniendo Ag1 solo o con el agregado de PCM o Avridine en la menor concentración (vacunas 9, 1 y 5 respectivamente) con respecto al grupo formado por la formulación con Ag2, la vacuna comercial y las vacunas conteniendo Ag1 en presencia de PCM o AV en la mayor concentración (vacunas 10, 11, 3 y 7, respectivamente). Las llaves agrupan en cada tiempo las vacunas sin diferencias estadísticas entre ellas. Diferencias significativas: (*) $p \leq 0.1$.

2.3. El efecto de la inclusión de los adyuvantes en las vacunas con la mayor concentración antigénica

Las vacunas 2, 4, 6 y 8 fueron formuladas empleando la mayor masa de Ag e incluyendo alguno de los dos adyuvantes en alguna de sus dos concentraciones.

Todas las formulaciones antes mencionadas produjeron títulos promedio de anticuerpos específicos que en ningún caso superaron significativamente a los de las vacunas 3 (Ag1-PCM2) y 7 (Ag1-AV2). Como se muestra en la figura 16, la formulación 6 (Ag2-AV1) indujo niveles de anticuerpos prácticamente indiferenciables a los de la vacuna 7 en todos los tiempos.

Mientras tanto las restantes formulaciones conteniendo Ag2 y alguno de los dos inmumoduladores indujeron títulos inicialmente situados entre los de las vacunas 9 (Ag1) y 10 (Ag2) (figura 21).

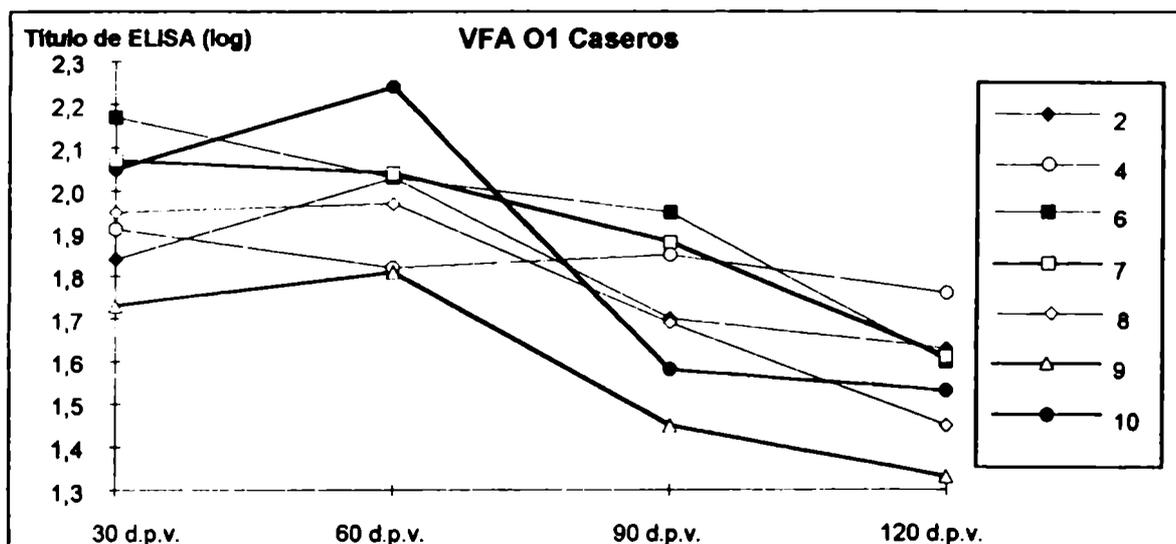


Figura 21. Comparación de los títulos promedio de anticuerpos inducidos por la vacuna 2 (Ag2-PCM1), vacuna 4 (Ag2-PCM2), vacuna 6 (Ag2-AV1), vacuna 7 (Ag1-AV1), vacuna 8 (Ag2-AV2), vacuna 9 (Ag1) y vacuna 10 (Ag2).

Si bien el grupo inmunizado con la formulación 8 (Ag2-AV2) mostró prácticamente en todos los tiempos probados títulos intermedios a los de las vacunas control de Ag1 y Ag2, las restantes 2 formulaciones indujeron un patrón de comportamiento algo diferente. A partir de los 90 d.p.v. las formulaciones 2 (Ag2-PCM1) y 4 (Ag2-PCM2) se alejaron aún más de los títulos inducidos por la vacuna 9 y llegaron a alcanzar a los de la 10, llegando a hacerse comparables a los producidos por las vacunas 3 y 7 a los 120 d.p.v. (figura 21).

3. ELISA para detectar isotipos de IgG anti-VFA presentes en suero bovino.

3.1. Puesta a punto del ELISA para detectar isotipos de IgG bovinos específicos para VFA.

Para la detección de las subclases de IgG bovinas que reconocieran epítopes presentes en la partícula del VFA O1-Caseros se emplearon AcMs contra cada uno de los isotipos. En la figura 22 se muestran las curvas de titulación y ensayos de control de reacciones inespecíficas para los ensayos de IgG1 (a y b) e IgG2 (c y d). Ambos ELISA demostraron una alta sensibilidad de detección para sus respectivos isotipos, un bajo nivel de reacciones cruzadas entre etapas previas y discontinuas del ensayo y no mostraron reacción en presencia de sueros negativos para el VFA. La dilución de uso para cada uno de los monoclonales en estos ensayos resultó ser 1 / 4.000 para el anti-IgG2 (figura 22 c) y 1 / 40.000 para el anti-IgG1 (figura 22 a).

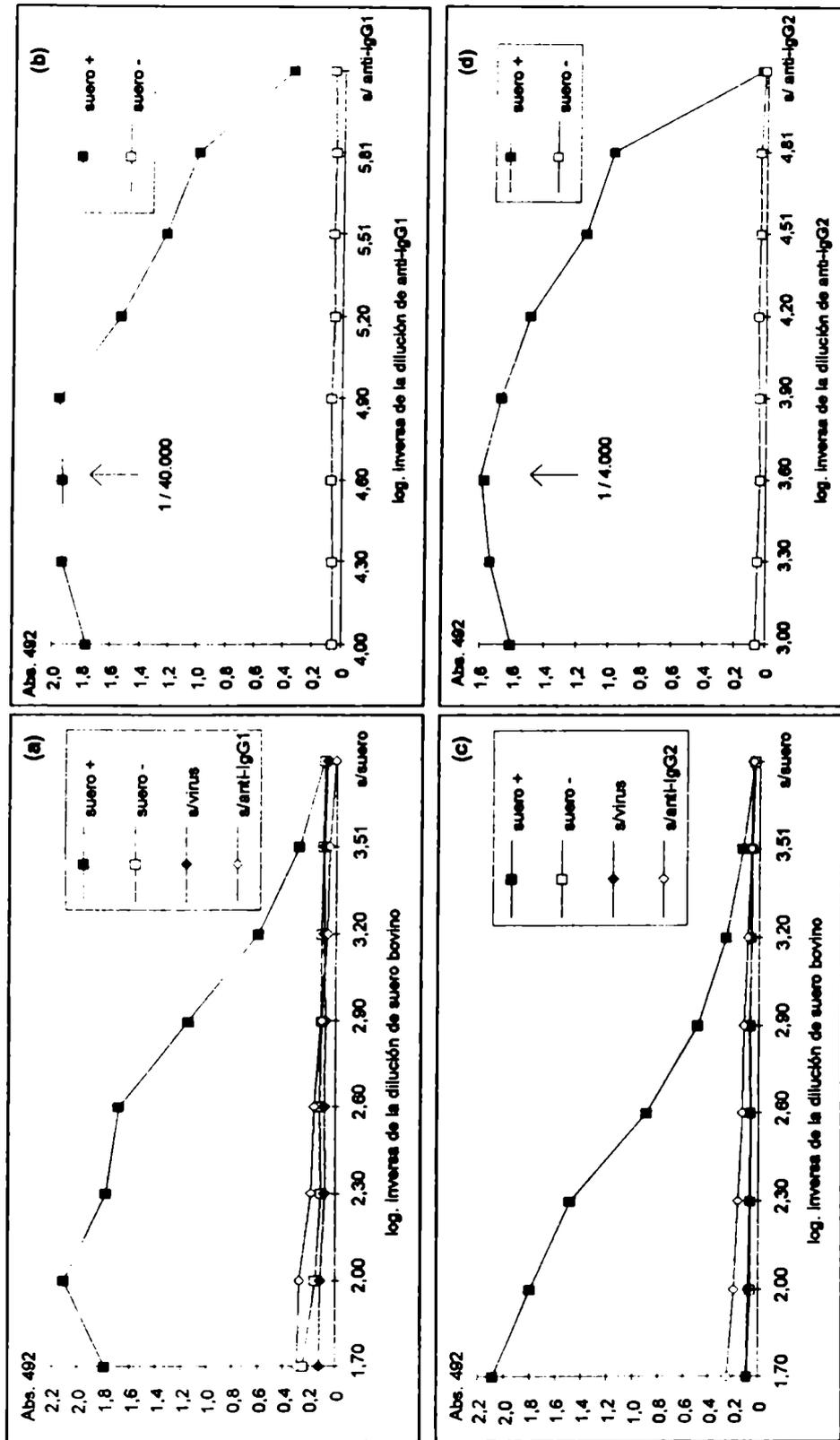


Figura 22. Pruebas de control de reacciones inespecíficas para los ensayos de detección de IgG1 (a) e IgG2 (c) bovinas y curvas de titulación correspondientes a los AcM contra los mismos isotipos bovinos (b y d). El suero bovino positivo (+) provenía de animales multivacunados con vacunas comerciales, el suero negativo (-) de animales sin vacunación de zona libre de VFA. En los gráficos (a) y (c) los AcM fueron usados en sus diluciones óptimas y las curvas sin virus y sin AcM fueron realizadas con suero (+). En los gráficos (b) y (d) la dilución tanto del suero (+) como del suero (-) fue 1/200 y la dilución óptima de uso de cada uno de los AcM es la indicada por las flechas.

3.2. Perfiles de isotipos de animales inmunizados con las diversas vacunas.

Los títulos de IgG1 e IgG2 específicos para el VFA O1-Caseros fueron determinados en ensayos de ELISA similares a los de ratón excepto porque se emplearon AcMs como detectores de los isotipos. Para poder expresar la variación que presentan entre sí los títulos de IgG1 e IgG2 en el tiempo para cada formulación, además de presentarlos por separado, ambos datos medidos para cada caso fueron reunidos en un solo índice resultante del cociente entre tales títulos. Esta relación no expresa cual de los dos isotipos está en mayor cantidad, sino que es un número que caracteriza la proporción de ambos para un determinado tiempo y grupo experimental.

En la tabla 6 se muestran los promedios de los títulos de IgG2 e IgG1 y el cociente entre ellos, medidos a los 30, 60, 90 y 120 d.p.v. para las vacunas 3 (Ag1-PCM2) y 7 (Ag1-AV2), junto con otras que fueron consideradas importantes para su comparación con aquellas: vacuna 9 (Ag1), vacuna 1 (Ag1-PCM1), vacuna 5 (Ag1-AV1), vacuna 4 (Ag2-PCM2), vacuna 6 (Ag2-AV1), vacuna 8 (Ag2-AV2), vacuna 10 (Ag2) y vacuna 11 (comercial).

Tabla 6. Promedios de los títulos de IgG1 e IgG2 de bovino específicos para el VFA O1Caseros y de la relación entre ellos para las vacunas 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11 medidos a los 30, 60, 90 y 120 d.p.v.

	30 d.p.v.			60 d.p.v.			90 d.p.v.			120 d.p.v.		
	IgG2	IgG1	Rel. 2/1	IgG2	IgG1	Rel. 2/1	IgG2	IgG1	Rel. 2/1	IgG2	IgG1	Rel. 2/1
Vac. 9	1,67	2,50	0,67	2,06	2,16	0,95	2,42	2,65	0,91	2,22	2,73	0,81
Vac. 3	2,20	2,97	0,74	2,46	2,61	0,94	3,30	3,40	0,97	2,90	2,86	1,01
Vac. 7	2,54	2,99	0,85	2,72	2,77	0,98	3,15	3,21	0,98	2,92	2,70	1,08
Vac. 1	1,70	2,89	0,59	1,75	2,62	0,66	1,70	2,53	0,67	1,74	2,39	0,73
Vac. 5	2,04	2,52	0,81	2,13	2,44	0,87	2,53	3,05	0,83	2,51	2,61	0,96
Vac. 4	2,38	2,79	0,85	2,30	2,48	0,91	2,60	3,02	0,86	2,53	2,78	0,91
Vac. 6	2,56	3,04	0,84	2,60	2,64	0,99	2,85	2,86	1,00	2,60	2,61	1,00
Vac. 8	2,32	2,80	0,83	2,40	2,50	0,96	2,74	2,94	0,93	2,42	2,45	0,99
Vac. 10	2,24	3,10	0,72	2,42	2,90	0,83	2,40	2,85	0,84	1,91	2,61	0,73
Vac. 11	2,02	2,69	0,75	2,48	2,85	0,87	2,76	2,87	0,96	1,89	2,39	0,79

En la tabla 6 y la figura 23 se puede observar que mientras algunas vacunas como la 9, la 10 y la 11 presentaron un pico en el valor de la relación entre los 60 y 90 d.p.v. para luego descender hacia los 120 d.p.v., otras como la 4 (Ag2-PCM2) y la 5 (Ag1-AV1) mostraron dos máximos a los 60 y a los 120 d.p.v. Un tercer grupo puede diferenciarse, cuyos índices suben a lo largo de la experiencia. En este grupo se hallan a las formulaciones 1 (Ag1-PCM1), 3 (Ag1-PCM2), 6 (Ag2-AV1) y 7 (Ag1-AV2). Sin embargo dentro de este último grupo existieron diferencias ya que los rangos de variación del valor de la relación IgG2 / IgG1 no fueron similares para todas las vacunas.

Mientras que la formulación 1 varió entre valores de 0,59 a 0,73, la vacuna 3 lo hizo entre 0,74 y 1,01, la 6 fue desde 0,85 a 1,00 y la 7 aumentó de 0,85 a 1,08.

Al igual que lo ocurrido con los títulos totales, las vacunas 6 y 7 presentaron una evolución similares en los valores de la relación.

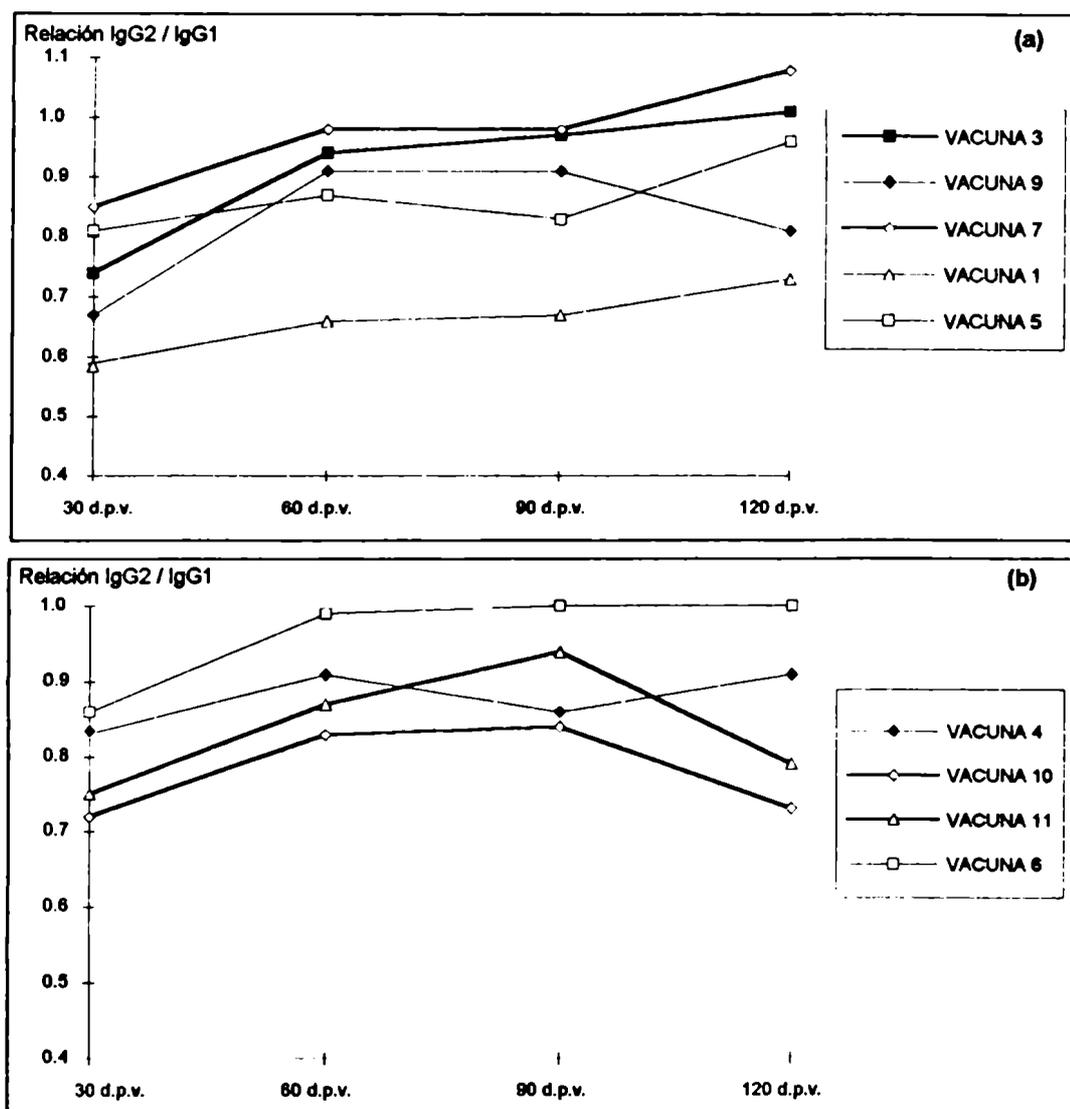


Figura 23. (a) Variación en el tiempo de la relación IgG2 / IgG1 entre las vacunas con Ag1 solo (vacuna 9) o con la adición de AV1, AV2, PCM1 o PCM2 (vacunas 5, 7, 1 y 3 respectivamente). (b) Idéntico análisis para las vacunas conteniendo Ag2 solo (vacuna 10) o en presencia de PCM2 o AV1 (vacunas 4 y 6 respectivamente) y para la formulación comercial (vacuna 11).

A partir de los datos de la tabla 6 no se puede concluir claramente si este aumento en la relación entre IgG2 e IgG1 es debido a un incremento en los títulos de IgG2, a un descenso de los de IgG1 o a una combinación entre ambas situaciones.

Para analizar tales posibilidades se tomaron los datos individuales de los títulos de IgG2, IgG1 y de sus cocientes para las vacunas 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 en todos los tiempos probados anteriormente y se estudió la existencia de correlación entre las distintas variables, esto es título de IgG2 vs. relación IgG2 / IgG1 y título de IgG1 vs. relación IgG2 / IgG1. Los resultados se muestran en la figura 24.

Como se puede observar en la figura 24, el aumento de la relación IgG2 / IgG1 se correlaciona positivamente con el aumento en los títulos de IgG2 ($r = 0,73540$), mientras que no se observa correlación alguna entre los títulos de IgG1 y la misma relación ($r = 0,18685$). Esto estaría indicando que el aumento en la relación se debe efectivamente a un aumento relativo en los títulos de IgG2 específicos con respecto a los de IgG1.

Por último se decidió comparar el curso temporal de los títulos de IgG1 e IgG2 específicas en forma independiente para las vacunas 3 (Ag1-PCM2), 7 (Ag1-AV2) y los controles 9 (Ag1), 10 (Ag2) y 11 (comercial), (figuras 25 (a) y (b)).

Los títulos promedio de IgG2 específica para las vacunas 3 y 7 mostraron al igual que los de IgG1, un pico a los 90 d.p.v., si bien los del primer isotipo presentaron una menor caída entre los 90 y 120 d.p.v.

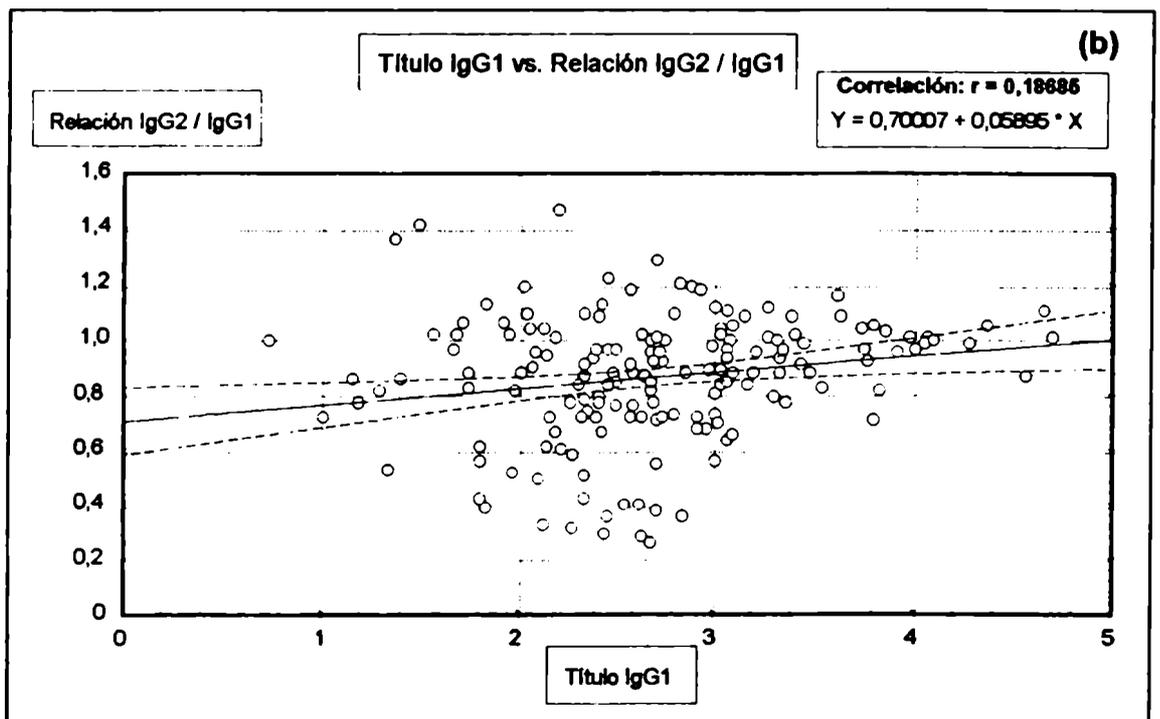
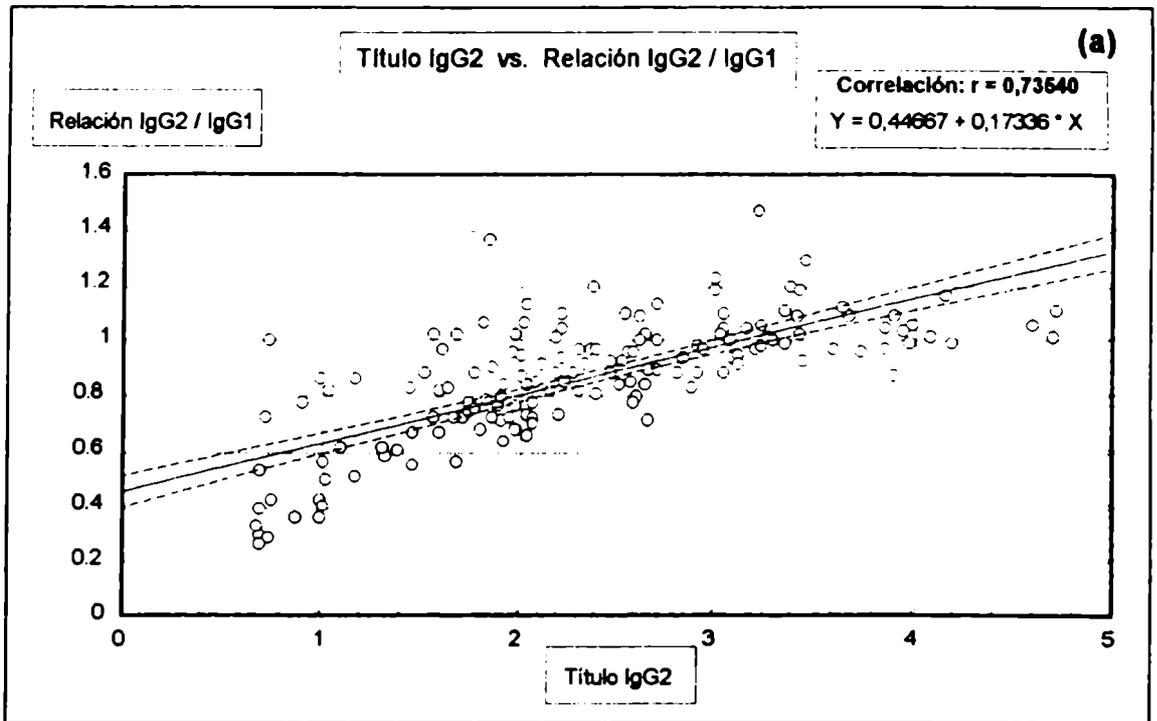


Figura 24. (a) Correlación entre el título de IgG2 bovina específicas para el VFA O1 Caseros y la relación entre este título y el de IgG1. (b) Idéntica correlación que en (a), pero para el isotipo IgG1. En ambos gráficos el tamaño de la muestra fue de 213 casos resultantes de las determinaciones de isotipos de las vacunas 1, 3, 4, 5, 7, 8 y 9 a los 30, 60, 90 y 120 d.p.v. El índice de correlación $r=0,7354$ es significativo ($p<0.005$). Las líneas de puntos marcan los límites de confianza del 95%.

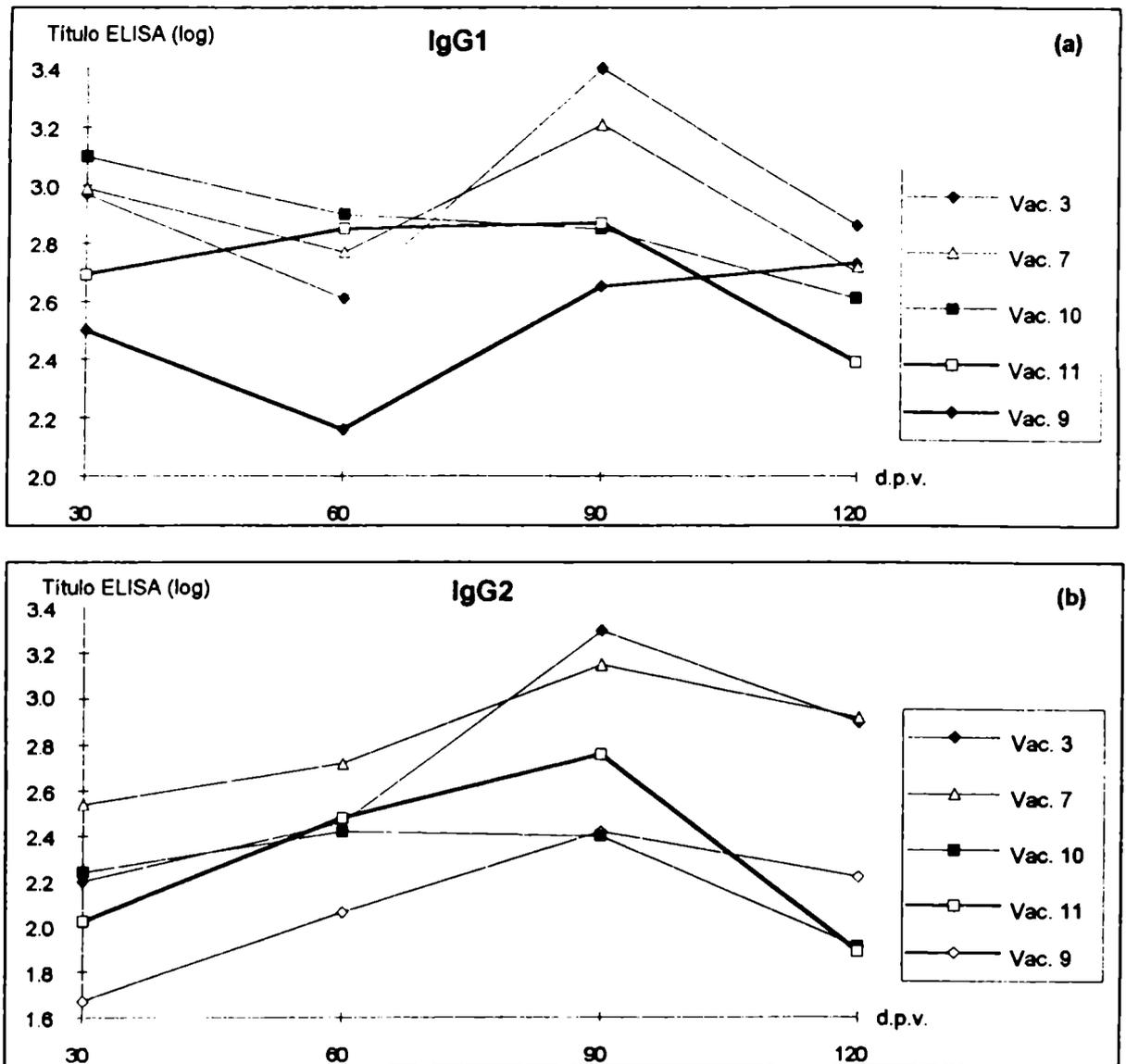


Figura 25. Evolución en el tiempo de los títulos de IgG1 (a) e IgG2 (b) específicos para el VFA O1-Caseros.

Las diferencias más importantes de estas dos vacunas con respecto a las vacunas control para el IgG1 se observaron a los 90 d.p.v. Los títulos para este isotipo fueron para la vacuna 3 entre 3,4 y 3,5 veces mayores que los de las vacunas 10 y 11 respectivamente, y 5,6 veces mayores que los de la vacuna 9. Para la vacuna 7 los niveles de IgG1 llegaron a ser 2,3 y 2,2 veces más elevados que los de las vacunas 10 y 11 respectivamente, y 3,6 veces mayores que los de la vacuna 9 (figura 25 (a)).

Para el isotipo IgG2 las mayores diferencias se alcanzaron a los 120 d.p.v. La vacuna 3 presentó títulos 10 veces mayores que los de las vacunas 10 y 11 y 4,8 veces más altos que los de la vacuna 9. La vacuna 7 indujo niveles de IgG2 específicos que fueron 10,2 y 10,7 veces más elevados que los de las vacunas 10 y 11 respectivamente, y 4 veces mayores que los de la vacuna 9 (figura 25 (b)).

Tomados en conjunto estos datos se observa que para el isotipo IgG1 las vacunas 3 y 7 tuvieron sus mayores diferencias con la vacuna 9, mientras que para el isotipo IgG2 las mayores diferencias se establecieron con las vacunas 10 y 11.

DISCUSIÓN

La validez del uso de cepas endocriadas de ratones como modelo para estudiar la respuesta inmune al VFA, ha sido ampliamente documentada a través de publicaciones realizadas por nuestro grupo y por otros laboratorios del exterior^{85, 133, 175, 32}.

Las bondades del modelo murino se apoyan en la alta sensibilidad del mismo como instrumento para medir capacidad inmunogénica, la elevada repetitividad tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo* y el gran paralelismo que presenta en sus respuestas con respecto al hospedador natural^{34, 98}.

Estas características le confieren la virtud de ser un buen medio para estudiar y predecir la respuesta que se desarrollará en los huéspedes susceptibles. A esto habría que añadir que los plazos para la obtención de resultados suelen ser más cortos que con otras especies y que existe un amplísimo conocimiento a cerca del sistema inmune de estos animales.

Muchos estudios han sido dirigidos para determinar la respuesta de isotipos inducida en ratones inmunizados con antígenos virales o infectados con virus activo^{65, 112, 146, 173, 225}, pero hasta el momento ninguno había sido hecho en el sistema del VFA.

Coutelier et al.^{63,64,65}, reportaron que generalmente las infecciones por virus inducen en ratones respuestas de anticuerpos del isotipo IgG2a, y en una menor medida del IgG2b. Tal restricción fue demostrada para una amplia gama de virus con material genético de ADN o ARN, pareciendo ser además independiente de la ruta de inoculación o cepa del ratón.

Sin embargo se han reportado otros perfiles isotípicos en cepas como CBA/N y C3J *xid* donde, por ejemplo, la infección con virus de influenza induce la producción predominante de anticuerpos específicos del isotipo IgG3 e IgG1¹⁸⁵. También para el herpes simplex virus tipo 1 (HSV-1) se observa que la infección induce la síntesis de anticuerpos de la subclase IgG1¹⁴⁶ y para la infección con el virus de la encefalomielitis de Theiler

murina la restricción a la producción de IgG2a se registra en las cepas resistentes pero no en las susceptibles¹⁷³.

El objetivo inicial de este trabajo de tesis fue el análisis de los perfiles isotípicos inducidos en ratones Balb-C por la infección con el VFA cepa O1-Campos y la posterior comparación con los obtenidos por inmunización con vacunas formuladas con virus purificado e inactivado en diferentes vehículos y en presencia de diversos inmunomoduladores, los cuales habían sido previamente estudiados por nuestro grupo por su capacidad de prolongar la protección inducida en el mismo modelo animal.

Entre los 14 y 60 d.p.i. el isotipo IgG2b fue el predominante entre las IgG totales específicas para el VFA en ratones infectados, seguida por la IgG1. De acuerdo a Klaus *et al.*¹²³ y a Kipps *et al.*¹¹⁹, tanto la IgG2a como la IgG2b son los isotipos murinos más efectivos en la activación del complemento como así también en las respuestas celulares mediadas por anticuerpos.

La predominancia del isotipo IgG2b en los animales infectados entre los 14 y 60 d.p.i., concordaría con la hipótesis propuesta por Mc Cullough *et al.*^{143, 144}, la cual plantea que la protección efectiva contra la infección del VFA es llevada a cabo por parte de las células del sistema retículo-endotelial a través de la fagocitosis, mediada por anticuerpos, de las partículas virales.

Teniendo en cuenta esto sería importante la inducción de isotipos específicos que fueran favorables para el desarrollo de tales modalidades de respuesta inmune.

Berinstein *et al.*²⁵ observaron una resistencia aumentada al desafío viral en los animales vacunados con formulaciones oleosas conteniendo AV (89% de protección) en relación a aquellos inmunizados con la emulsión convencional (24%). De la misma forma, estos autores^{25, 26} reportaron que cuando el LPS o PCM eran incluidos en vacunas de hidróxido de aluminio, la protección alcanzaba al 87,5 y 100% de los animales respectivamente,

porcentajes estos mucho mayores a los observados en comparación por la formulación convencional acuosa (20 al 28% de protección).

Estos valores de resistencia al desafío viral aumentados obtenidos por la inclusión de los inmunomoduladores citados, no muestra sin embargo una clara correlación con el I.S.N. alcanzado en cada caso en los experimentos aquí llevados a cabo. Sin embargo para todas estas formulaciones experimentales se registró una producción mayor de IgG2b, comparada con la de las vacunas convencionales.

Nuestros resultados muestran que el isotipo IgG2b fue predominante en el plasma de los animales infectados y en aquellos grupos que presentaron un alto porcentaje de resistencia al desafío viral. Por otro lado este isotipo fue sólo temporalmente detectado en aquellos grupos de ratones inmunizados con vacunas convencionales acuosa u oleosas, las que mostraron una menor respuesta protectora al desafío con el VFA. A pesar de precisarse más experimentos para confirmar la eficiencia de este isotipo particular en la protección contra el VFA, estos resultados indican que el perfil de isotipos inducido, además del nivel de A.N., puede ser importante en la eficacia de una formulación vacunal.

Los animales infectados también diferían con respecto a los vacunados, en la presencia de anticuerpos específicos contra el VFA del isotipo IgG3.

La subclase IgG3 presenta la tendencia a formar agregados por uniones no covalentes entre las regiones Fc de otras moléculas adyacentes de IgG3, además de caracterizarse por fijar pobremente el complemento^{104, 105}. Baxt *et al.*²² encontraron que todos los AcM específicos de VFA que causaban agregación del virus, formando complejos inmunes, eran de la subclase IgG3. Estos autores propusieron que la agregación de las partículas virales podría ser un posible mecanismo de neutralización viral, sugiriendo además que podría estar relacionado con el isotipo del anticuerpo involucrado en la

misma. Este mecanismo podría funcionar en forma complementaria al propuesto por Mc Cullough *et al* ¹⁴⁴.

La regulación de las clases y subclases de inmunoglobulinas sintetizadas por los linfocitos B se encuentra bajo el control de las citoquinas producidas por las células Th^{88, 222}. En particular la producción del isotipo IgG3 en los ratones parece estar asociada a una ausencia de tales linfoquinas¹⁰⁴, las cuales tienden a dirigir la expresión hacia otras subclases. La presencia de anticuerpos con tal isotipo, por lo tanto, puede estar reflejando en primera instancia, la activación de clones de células B sin la cooperación de células Th capaces de secretar linfoquinas.

Experimentos *in vivo* mostraron que células B transferidas de ratones infectados 8 días antes, eran capaces de abortar la viremia en ratones inmunosuprimidos por irradiación, en ausencia de linfocitos T. De igual forma ratones atímicos no veían afectada su capacidad de respuesta a la infección con el VFA, en comparación con los normales³³.

A pesar de los bajos niveles de este isotipo en relación a los restantes, es notable que la IgG3 fue la primera subclase de IgG inducida junto a con la IgG1 a los 7 d.p.i.

Tomados en conjunto, estos resultados podrían reflejar un posible rol de la IgG3 durante los primeros pasos de la respuesta inmune al VFA en el ratón, o al menos indicar que durante estos primeros días la respuesta es llevada a adelante con una baja participación del sistema T.

En cualquier caso esta restricción de la producción de IgG3 obtenida sólo durante la infección con el VFA, volvería a indicar que la respuesta inmune en los animales infectados es llevada a cabo de diferente forma que luego de la vacunación.

Las diferencias en los perfiles isotípicos obtenidos entre los animales infectados y los vacunados, y entre aquellos inmunizados con vacunas

convencionales y los vacunados con formulaciones conteniendo adyuvantes, indicarían diferentes condiciones de primado de la células Th en cada caso. Los resultados presentados en esta sección serían una forma posible de relacionar el tipo de inmunización con la estimulación del sistema de células T, la composición isotópica de los anticuerpos inducidos y la protección contra el VFA.

La inclusión de inmunomoduladores en las formulaciones convencionales, efectivamente provocó variaciones en el perfil de los isotipos murinos de IgG inducidos en el tiempo. Estos cambios isotípicos ocurrieron para ciertas formulaciones, las cuales presentaron mayores porcentajes de animales protegidos al desafío viral, marcando así una posible correlación entre estos dos fenómenos.

A partir de estos resultados se eligieron dos de los mismos inmunomoduladores para ser incluidos en las pruebas en el huésped natural, teniendo en cuenta la factibilidad de la utilización de tales sustancias a escala industrial. Se decidió la comparación de la respuesta humoral total específica para el VFA entre vacunas con o sin el agregado de AV o PCM, como así también el estudio del perfil de los isotipos relevantes en cada caso.

La prueba utilizada para medir la respuesta humoral generada por cada formulación contra cada cepa viral incluida en la vacuna fue el ELISA en fase líquida. Los ensayos empleados en esta tesis son esencialmente iguales a los aplicados por los organismos oficiales encargados del control de las vacunas comerciales y que hoy en día reemplazan a las pruebas de potencia como parámetro exclusivo para la aprobación de las mismas.

A si mismo las cuatro cepas incluidas en cada una de las formulaciones fueron seleccionadas debido a que son las usualmente empleadas en las vacunas comerciales.

Se dispuso de dos suspensiones virales de cada uno de los cuatro subtipos, una de ellas proveniente directamente del sobrenadante de los tanques de producción a escala industrial y la otra resultante de un proceso de ultrafiltración de aquel mismo sobrenadante. La concentración de los antígenos luego de la ultrafiltración fue de 6 a 12 veces mayor que la del sobrenadante sin tratamiento. Las concentraciones tanto del sobrenadante de infección como de la suspensión ultrafiltrada, fueron ajustadas de forma tal de obtener mezclas antigénicas conteniendo todas las cepas, en dos diferentes concentraciones (Ag1 y Ag2). A partir de las suspensiones provenientes directamente de los sobrenadantes de infección se elaboró la mezcla antigénica de menor concentración (Ag1), mientras que la mezcla antigénica de mayor concentración (Ag2) se elaboró a partir de los ultrafiltrados. La masa viral por dosis de la preparación de Ag1 fue la mitad o menos de la de Ag2, dependiendo de la cepa. Esta diferencia de concentraciones entre las dos preparaciones antigénicas era suficiente para demostrar la utilidad de los inmunomoduladores como estimuladores de la respuesta específica al VFA, ya que si mediante la inclusión de un inmunomodulador en formulaciones con la menor concentración de antígeno (Ag1) se lograba inducir títulos de anticuerpos iguales a aquellas vacunas con la mayor concentración (Ag2), esto repercutiría en un enorme beneficio económico a escala industrial. Por otro lado esto permitiría el manejo de menores volúmenes de preparaciones virales, reduciendo el riesgo de escapes de virus de las plantas productoras.

Es ampliamente conocido el hecho de que la inmunogenicidad de cada subtipo del VFA es diferente. Black *et al.*²⁹ reportaron tales diferencias entre los distintos serotipos incluidos en las vacunas anti-VFA, siendo la capacidad inmunogénica del tipo O1 varias veces menor que la de los tipos A24 y C3. En vista a que la inmunogenicidad de las cápsidas completas (146S) es

aproximadamente 100 veces mayor que la de las partículas 12S producidas luego de su disociación⁷⁷, estas diferencias entre capacidad inmunogénica de los serotipos podrían ser explicadas en parte por la distinta estabilidad que presentan los diversos tipos en la integridad sus cápsides⁷⁶.

Atendiendo a este hecho, cantidades diferentes de cada uno de los subtipos virales fueron incluídas durante la formulación de las vacunas. La menor masa correspondió a la cepa C3/85 y la mayor a la cepa O1-Caseros. Las restantes cepas fueron colocadas en concentraciones intermedias entre estas dos, en todos los casos respetando las proporciones utilizadas a nivel industrial.

La cepa O1-Caseros fue la que mostró mayores y más persistentes diferencias en la respuesta inducida de anticuerpos específicos cuando se compararon la vacuna de menor concentración de Ag (vacuna 9) con la de mayor concentración (vacuna 10). Por el otro lado el subtipo C3/85 prácticamente no mostró diferencias en estas dos concentraciones. Estos dos resultados tendrían relación con las diferencias existentes en la capacidad inmunogénica entre cepas, ya que mostrarían que aún las menores masas antigénicas aquí utilizadas de la cepa más inmunogénica (C3/85) son capaces de inducir una buena respuesta de anticuerpos, al menos indiferenciable con la inducida por concentraciones 2 veces mayores. Sin embargo cuando el inmunógeno es más pobre, como sería el caso del serotipo O1-Caseros, la cantidad incluída en la vacuna tiene una influencia más notable en la respuesta humoral producida. Debido a esta razón se eligió la cepa O1-Caseros para mostrar los efectos promovidos por la inclusión de inmunomoduladores en las formulaciones convencionales.

Las evidencias más claras de la acción de los adyuvantes se vieron reflejadas en aquellas vacunas elaboradas con la menor concentración de

antígeno y que incluían los inmunomoduladores en sus concentraciones mayores, esto es las vacunas 3 (Ag1-PCM2) y 7 (Ag1-AV2).

La inclusión de cualquiera de las dos sustancias permitió a estas formulaciones con la menor masa antigénica alcanzar y en algunos casos superar (como a los 90 d.p.v.) el nivel de anticuerpos específicos producidos por la vacuna 10, la cual contenía la mayor concentración de los virus (Ag2).

Otro tanto ocurrió cuando se las comparó con la vacuna comercial (vacuna 11), dando lugar a que esta fuera agrupada junto con las formulaciones 3, 7 y 10 como un conjunto sin diferencias estadísticas entre ellas, desde los 30 a los 120 d.p.v. Los animales inmunizados con la formulación 10 (Ag2) presentaron un fuerte caída en el nivel de anticuerpos entre los 60 y los 90 d.p.v. de forma que este grupo de animales se separó de este conjunto transitoriamente a los 90 d.p.v.

De la misma manera tampoco existieron diferencias estadísticas entre las vacunas 9, 1 y 5, elaboradas conteniendo sólo Ag1 o con la inclusión de PCM o AV en sus menores concentraciones, respectivamente. Estas tres formulaciones indujeron niveles promedio de anticuerpos similares en el transcurso de la prueba y siempre estadísticamente menores a los del grupo de las vacunas 3, 7, 10 y 11. La vacuna 5, a la inversa de lo ocurrido con la formulación 10, mantuvo su nivel promedio de anticuerpos prácticamente sin cambios entre los 60 y los 90 d.p.v. Esto permitió asociarla al grupo de vacunas con mayores títulos a partir de los 90 d.p.v.

De estos resultados se desprende que la inclusión de los inmunomoduladores en sus mayores concentraciones a las vacunas con la menor concentración antigénica, fue efectiva en la inducción de niveles de anticuerpos mayores en relación a su control sin adyuvante (vacuna 9) e indiferenciables a los de la formulación con el doble de masa antigénica (vacuna 10). Este efecto se demostró desde un primer momento a los 30

d.p.v., y su acción se mantuvo en el tiempo hasta al menos 4 meses después de la inmunización.

Tal como fue mencionado anteriormente, tanto la vacuna 3 (Ag1-PCM2) como la vacuna 7 (Ag1-AV2) mostraron títulos promedio siempre estadísticamente iguales a los de la formulación comercial (vacuna 11). Esta formulación comercial fue seleccionada por ser la mejor del mercado en ese momento y por haber superado la prueba de desafío viral con la cepa O1-Caseros a los 90 d.p.v., protegiendo a la totalidad de los 16 bovinos infectados. Si bien no se conocieron todos los detalles de composición de esta vacuna, se conocía que la misma había sido producida en cultivos Frenkel, los cuales producen virus en concentraciones mayores que los cultivos de BHK¹⁹. A partir de estos datos se podría deducir que la concentración antigénica en esta vacuna era al menos comparable a la de Ag2.

Los resultados obtenidos por la inclusión de estos adyuvantes en estas condiciones, en cuanto al nivel de anticuerpos específicos inducidos, muestran su relevancia a la luz del hecho comprobado de que el valor que alcanzan dichos anticuerpos específicos es fundamental en la determinación de la protección a la infección del VFA, existiendo correlación entre estos dos fenómenos^{124, 167, 219, 227}.

También es importante remarcar que estos resultados fueron demostrados con la cepa O1-Caseros, que es reconocida como la menos inmunogénica de las cuatro comúnmente utilizadas y la que mayores inconvenientes plantea a la hora de establecer una protección eficiente a la infección natural

Otro efecto importante del uso de los adyuvantes fue el observado en la vacuna 5 (Ag1-AV1). Esta formulación si bien indujo niveles de anticuerpos inicialmente indiferenciables a los de la vacuna 9, puso de manifiesto la

acción adyuvante del AV entre los 60 y 90 d.p.v. generando un grado de estimulación de la inmunidad humoral suficiente como para mantener el nivel de anticuerpos casi invariable entre estos dos tiempos. Este hecho toma más trascendencia si se remarca que precisamente entre estos dos tiempos ambas formulaciones control sin adyuvantes (vacunas 9 y 10), como así también la formulación comercial (vacuna 11), mostraron sus caídas más bruscas en el título de anticuerpos inducidos. De esta forma el uso del AV, aún en su menor concentración, permitió que una vacuna inductora de niveles iniciales moderados de inmunidad humoral se comportara, a medida que transcurrió el tiempo, como los inmunógenos formulados con la mayor cantidad de antígeno

La inclusión de los adyuvantes en cualquiera de sus dos concentraciones a la mezcla antigénica en la mayor concentración, no logró mejorar la capacidad inductora de anticuerpos mostrada en general por el grupo de las vacunas 3, 7, 10 y 11. La vacuna 6 (Ag2-AV1) indujo una respuesta similar a la de la vacuna 7 (Ag1-AV2) en todos los tiempos testeados. Por otro lado las vacunas 2 (Ag2-PCM1), 4 (Ag2-PCM2) y 8 (Ag2-AV2) produjeron en términos generales títulos intermedios a las de los grupos de vacunas antes mencionados (vacunas 3, 7, 10 y 11 y vacunas 9, 1 y 5). Sin embargo alternativamente la formulación 4, entre los 60 y 90 d.p.v., y la formulación 2, entre los 90 y 120 d.p.v., mostraron caídas menos pronunciadas en el título de anticuerpos que la mayoría de las restantes formulaciones. Esto les permitió llegar a los 120 días con un nivel de anticuerpos similar al de las formulaciones más efectivas en la inducción de los mismos.

Es posible que la acción de estos adyuvantes en la inmunomodulación de la respuesta humoral en estos casos, sea menos notable cuando la masa antigénica inicial es suficientemente grande como para generar *per se* una buena estimulación. Se debe tener en cuenta además que las preparaciones

virales provenían de sobrenadantes de infección de cultivos de células en suspensión, lo cual trae aparejado la presencia de una gran cantidad de restos celulares contaminantes. Esta situación es más acentuada luego del proceso de ultrafiltración al que fueron sometidas previamente las preparaciones de Ag2, ya que junto con el virus también los residuos celulares fueron concentrados. Esto podría haber llevado al secuestro de parte del adyuvante incluido por parte de estos restos celulares y una menor disponibilidad de los mismos, disminuyendo así su eficacia.

Como último elemento a considerar cabe mencionar que no se observaron diferencias notables en el empleo de uno u otro adyuvante, esto es PCM o AV, en relación al nivel inmunidad humoral inducida. Las únicas excepciones podrían ser el comportamiento ya comentado de la vacuna 5 (Ag1-AV1) entre los 60 y 90 d.p.v., efecto que no fue demostrado en su contraparte con PCM (vacuna 1, Ag1-PCM1), y los niveles iniciales de anticuerpos producidos por la vacuna 6 (Ag2-AV1) que fueron algo mayores a los de la vacuna 2 (Ag2-PCM1).

Teniendo ya información de la capacidad inmunogénica de cada una de las vacunas utilizadas en la prueba, se decidió estudiar la composición isotópica de los sueros obtenidos durante el transcurso de la misma.

Se eligió la detección de los isotipos de IgG bovinos ya que era poco probable encontrar en el suero y en los tiempos testeados a las restantes clases, IgM e IgA, siendo por lo tanto de importancia relativa en la inmunidad humoral inducida.

A diferencia de los ensayos empleados en la detección de los isotipos de IgG murinos, en las pruebas de bovinos se contó con AcM (DAS-17 y DAS-2) como detectores anti-isotipo, ambos facilitados gentilmente por el Dr. S. Srikumaran de la Universidad de Nebraska, Lincoln, USA.

Uno de los problemas más comunes que presenta la detección y cuantificación de los isotipos de IgG de bovino es que los reactivos anti-isotipo puedan reaccionar en mayor medida determinadas variantes de los isotipos, subestimando otras. Este inconveniente es debido a que muchos de los reactivos anti-isotipo poseen una reactividad dirigida contra ciertos determinantes alotípicos y por lo tanto no detectan inmunoglobulinas que pertenezcan a otros alotipos diferentes. En el caso particular del isotipo IgG2, el cual presenta dos variantes alotípicas⁴⁵, una publicación reciente reportó que el 80% de sueros detectores policlonales y monoclonales allí evaluados, detectaba una u otra de las variantes alotípicas⁴⁷. En esa misma publicación, se demostró que el AcM aquí utilizado para la detección de IgG2 (DAS-2) presentaba igual sensibilidad de detección para ambos alotipos, A1 y A2, siendo por lo tanto la detección del IgG2 en los ensayos de ELISA aquí empleados, de igual sensibilidad independientemente del alotipo que tuviera el animal.

En estos ensayos no se pudo contar con los isotipos de IgG bovinos aislados de forma tal de poder normalizar las posibles diferencias de afinidad y concentración entre los dos AcM detectores. Esta situación si bien permitió el seguimiento de los títulos de un mismo isotipo a la largo del tiempo y entre los diferentes tratamientos, hizo imposible la comparación entre los niveles de ambas subclases. Se decidió por lo tanto, tomando como ejemplo la bibliografía anterior¹⁵⁶, reunir ambos títulos en un solo número que resultaba del cociente entre ellos. Este es un valor arbitrario que se utilizó para simplificar la comparación de las formulaciones durante el transcurso de la prueba y no explicita la mayor o menor presencia de un determinado isotipo en la muestra de suero, sino la relación entre ellos.

El análisis realizado se focalizó en el estudio de la respuesta isotípica de las IgG específicas para el VFA O1-Caseros de las vacunas 3 (Ag1-PCM2) y

7 (Ag1-AV2), que habían resultado las más exitosas en la inducción de anticuerpos, teniendo en cuenta que su formulación había sido realizada con la menor concentración de antígeno. El objetivo era ver si estas formulaciones presentaban diferencias con las otras que incluían Ag1, PCM2, o AV2. Además se incluyó en la comparación a la vacuna 10 (Ag2), la vacuna 11 (comercial) y la 6 (Ag2-AV1), esta última con un comportamiento casi idéntico a la vacuna 7, en cuanto al nivel de anticuerpos totales específicos.

Las vacunas 3 (Ag1-PCM2), 6 (Ag2-AV2) y 7 (Ag1-AV2) presentaron una tendencia a aumentar el valor promedio de la relación IgG2 / IgG1 (de 0,74 a 1,08) desde los 30 d.p.v., mostrando el máximo a los 120 d.p.v. Por otro lado todas aquellas vacunas que no contenían adyuvante (formulaciones 9 y 10) y la vacuna comercial (formulación 11) mostraban un máximo en el valor promedio de la relación entre los títulos de IgG2 e IgG1 a los 60 ó 90 d.p.v. para luego descender, situándose siempre estos valores por debajo de 1. Las restantes formulaciones analizadas presentaron un patrón distinto a las anteriores, experimentando dos picos en el valor de la relación usualmente a los 30 y 90 d.p.v.

De esta manera, al igual que lo ocurrido con los anticuerpos totales, la respuesta inducida por las vacunas 3 y 7 se diferenció a las del resto, en este caso por mantener una tendencia constante a aumentar el valor de la relación IgG2 / IgG1 y debido a los valores que alcanzó dicho cociente. De igual forma, como antes la vacuna 6 tuvo un comportamiento similar a la vacuna 7.

Los datos individuales de los títulos de IgG1 e IgG2 de todas las vacunas antes analizadas para los 4 tiempos fueron utilizados para estudiar por una parte la correlación entre los títulos de IgG2 y su cociente con los del IgG1 y por otra la de los títulos de IgG1 con la misma relación. El análisis de

regresión lineal de ajuste por cuadrados mínimos arrojó como resultado la existencia de correlación positiva entre los niveles de IgG2 y los valores del cociente entre los títulos de IgG2 e IgG1. Por el contrario, el mismo análisis no mostró correlación entre los valores de IgG1 y los de la relación IgG2 / IgG1. Esto demostraba que el aumento en el valor de la relación IgG2 / IgG1 se debía a un incremento de los títulos de IgG2 en comparación con los de IgG1.

La evolución en los perfiles isotípicos estaría relacionada con la presencia del inmunomodulador y no con el nivel de anticuerpos inducido, con la cantidad de antígeno o el tipo de adyuvante empleados (PCM o AV). Algunos de estos hechos pueden observarse comparando la respuesta de isotipos de las vacuna 6 (Ag2-AV2) y 11 (comercial) que mostraron grandes similitudes en los títulos totales de anticuerpos entre ellas, y que sin embargo mostraron una respuesta de isotipos totalmente diferente entre sí, siendo la de la vacuna 6 muy similar a la de la 7 (Ag1-Av2).

Para complementar los datos anteriores se estudió que ocurría en el tiempo con los títulos de ambos isotipos por separado, comparando las formulaciones 3 y 7 con sus controles.

Las vacunas 3 y 7 exhibieron los niveles más elevados de ambos isotipos en prácticamente todos los tiempos. Para la subclase IgG1 llegaron a ser, a los 90 d.p.v., entre dos y tres veces superiores a los de la vacunas 10 y 11 y entre tres y cinco veces mayores que la vacuna control de Ag1 (formulación 9). En cuanto al isotipo IgG2 las diferencias mayores con respecto a las formulaciones control se registraron a los 120 d.p.v. y los títulos de las mismas se encontraron diez veces por encima de las vacunas 10 y 11 y aproximadamente cinco veces por sobre los de la vacuna 9. Se desprende de esto que el uso de estos adyuvantes favoreció en términos generales un

aumento en el título de ambos isotipos, especialmente entre los 90 y 120 d.p.v., aunque modificó las proporciones entre ellos.

Las evidencias existentes hoy en día en cuanto a la utilidad de la presencia de un determinado isotipo bovino en la construcción de una respuesta protectora contra un determinado agente, no siempre son completas y en algunos casos son controversiales. Esto es una consecuencia directa de los menores conocimientos que se tienen sobre las inmunoglobulinas bovinas y su funcionalidad, en relación a otras especies como el ratón y de la falta de experimentos que permitan verificar tales funciones *in vivo*.

El isotipo IgG1 fue descrito por algunos autores como buen fijador del complemento de cobayo y conejo²⁰³, mientras que el IgG2 poseería la capacidad de opsonizar en forma independiente del complemento²³⁴. No obstante otros autores no encontraron diferencias en la capacidad de una y otra subclase en la interacción con el complemento homólogo bovino¹⁴⁵. Estos mismos autores reportaron que el IgG2 poseía la capacidad promover la fagocitosis de eritrocitos por parte de monocitos y neutrófilos, mientras que la IgG1 favorecía la fagocitosis solamente por monocitos cultivados durante más de una semana. Sin embargo otros investigadores¹¹⁴ reportaron la existencia exclusiva de receptores para IgG1 en macrófagos, mientras que los neutrófilos tendrían receptores para IgG2.

De igual manera mientras para ciertas bacterias como *Brucella abortus* la respuesta parecería estar restringida al isotipo IgG1⁴⁸, para otras como *Streptococcus agalactiae* esta parecería estar dominada por IgG2¹³⁷.

Entre los escasos estudios que existen sobre los perfiles isotípicos inducidos en bovinos inmunizados con antígenos del VFA, se destaca el realizado por Mulcahy *et al.*¹⁵⁶, donde se relaciona la presencia del isotipo IgG1 con una mayor capacidad protectora de la respuesta inducida. Los

autores llegan a esta conclusión a partir de observar una mayor presencia del isotipo IgG1 en el suero de los animales infectados y vacunados con vacunas convencionales en relación a otros inmunizados con péptidos sintéticos. Sin embargo los bovinos inmunizados con péptidos sintéticos, a pesar de presentar en general mayores títulos de IgG2 respecto a los anteriormente mencionados, mostraron una gama de respuestas isotípicas con mayor o menor presencia de IgG1 e IgG2, no pudiéndose discernir a partir de los perfiles de isotipos características predictivas de la protección inducida luego de la inmunización. Siendo este el caso, es difícil explicar la baja capacidad protectora de las vacunas formuladas a péptidos en términos de exclusivos de los isotipos inducidos. De la misma forma, las evidencias presentadas en favor de una mayor utilidad del isotipo IgG1 en los mecanismos protectivos no parecen hasta el momento conclusivas.

Al realizar un estudio de este tipo deben ser tenidos en cuenta los factores relacionados con la variación entre individuos. Entre ellos la reactividad de los anticuerpos anti-isotipo contra determinantes alotípicos no es un elemento de importancia menor, ya que puede modificar radicalmente la interpretación de los resultados. Los AcM aquí utilizados demostraron reaccionar con igual afinidad contra las diversas variantes alotípicas descritas en el bovino, lo que hace a estos datos confiables a ese respecto.

La presencia de adyuvantes en el medio en el cual el antígeno es presentado, así como la presencia de epitopes T en el mismo y su naturaleza química y biológica junto con la forma macromolecular en que este es presentado, posiblemente sean los principales factores que tengan influencia en el perfil de citoquinas sintetizado durante la activación de la respuesta específica. Teniendo en cuenta que sobre este perfil se basa a su vez la regulación isotípica de las inmunoglobulinas⁸⁸, los adyuvantes

podrían por esta vía, influir en la determinación de los isotipos de los anticuerpos sintetizados.

Los mecanismos que mediaron la variación isotópica aquí descrita, pasan seguramente por la estimulación diferencial que recibieron las poblaciones de células Th de los grupos inmunizados con estas vacunas, ya que ambos adyuvantes utilizados son conocidos por su capacidad para estimular la inmunidad celular^{9, 191}. Corroborando este hecho, resultados preliminares obtenidos en nuestro laboratorio en ensayos de linfoproliferación *in vitro* con células mononucleares periféricas confirman la mayor estimulación del sistema T colaborador en los animales inmunizados con vacunas conteniendo PCM o AV.

Nuestros resultados muestran que la inclusión de PCM o AV, en especial en las formulaciones 3 y 7, estimuló la producción de ambos isotipos IgG1 e IgG2, con una mayor proporción de IgG2; respecto a sus controles sin adyuvante. Este resultado es importante ya que independientemente de cual sea el isotipo más favorable en el establecimiento respuestas de tipo protectoras contra el VFA, ambas vacunas experimentales indujeron aumentos tanto en los títulos de IgG1 como de IgG2.

CONCLUSIONES

1. Las diferencias en los perfiles de isotipos de IgG murinos presentadas entre los animales infectados y los vacunados, reflejan diferentes condiciones de activación de la células Th a través del tiempo. Las partículas virales activas podrían diferenciarse de las inactivadas en la masa de antígeno generada luego de la replicación en el animal, en el curso temporal y los sitios en que se produciría la aparición de antígeno circulante en el organismo. Estos factores, entre otros, afectarían la forma de presentación antigénica de cada inmunógeno y en último caso el número y tipo de poblaciones de células T involucradas en uno y otro caso.

2. La inclusión de los inmunomoduladores aquí empleados en las vacunas convencionales inoculadas a los ratones indujo variaciones en las subclases de IgG de los anticuerpos anti-VFA sintetizados, modificando las proporciones entre ellas y promoviendo la aparición y mantenimiento de determinados isotipos no presentes en las formulaciones sin adyuvantes. Teniendo en cuenta la capacidad estimuladora que estos adyuvantes poseen en cuanto a la actividad T colaboradora, es probable que su acción haya permitido la síntesis de citoquinas distintas a las de las vacunas convencionales las cuales a su vez hayan promovido la aparición de anticuerpos específicos de diferente isotipo.

3. Los cambios en la composición isotópica de los anticuerpos murinos específicos registrados en las vacunas conteniendo inmunomoduladores se correlacionan con mayores porcentajes de protección provistos por estas vacunas en relación a los controles sin adyuvantes. Es remarcable el hecho de que al menos hasta seis meses después de la vacunación, la presencia y dominancia de ciertos isotipos en el plasma de los ratones inoculados con las vacunas experimentales fuera similar a los de los ratones infectados, los cuales exhiben protección de por vida a la reinfección con el virus homólogo.

Este hecho indicaría que la acción inmunomoduladora promovida por los adyuvantes permitió la síntesis de anticuerpos de subclases más efectivas en la construcción de una respuesta protectora.

4. La utilización en bovinos de dos de los inmunomoduladores evaluados en el modelo murino, PCM y AV, incluidos en sus mayores concentraciones a las mezclas antigénicas con la menor concentración (Ag1) permitió a estas formulaciones (vacunas 3 y 7, respectivamente) alcanzar títulos de anticuerpos específicos siempre mayores a los de su control elaborado sólo con Ag1 (vacuna 9).

5. Estas mismas dos vacunas experimentales produjeron, al menos hasta cuatro meses después de la inmunización, títulos de anticuerpos anti-VFA iguales o superiores a los de la vacuna conteniendo una masa viral dos veces mayor (Ag2, vacuna 10). De la igual forma las formulaciones 3 y 7, no exhibieron diferencias significativas en ningún tiempo con los niveles de anticuerpos específicos producidos por la vacuna comercial, formulada con una concentración antigénica al menos comparable a la de Ag2 y seleccionada por haber conferido protección al 100% de los bovinos desafiados a los 90 d.p.v.

6. Los perfiles de isotipos de IgG1 e IgG2 bovinos mostrados por las vacunas 3 y 7 fueron diferentes a los de las vacunas elaboradas sólo con Ag1 o Ag2, y a los de la vacuna comercial, mostrando las primeras una tendencia a un mayor aumento en proporción del isotipo IgG2 en función al IgG1. Esta variación en la composición isotípica de las inmunoglobulinas específicas estaría relacionada con la presencia de los inmunomoduladores en las vacunas.

7. Se pudo comprobar que la utilización de estos inmunomoduladores en las vacunas de menor masa antigénica promovió, entre los 90 y 120 d.p.v., un fuerte incremento de los títulos de IgG1 tanto como de IgG2 en relación a las vacunas control. De esta forma, independientemente de cuál de los dos isotipos sea el más eficiente en inducir una respuesta protectora, los dos adyuvantes promovieron el aumento de ambos isotipos.

BIBLIOGRAFÍA

1. ACHARYA, R., FRY, E., STUART, D.I., FOX, G., ROWLANDS, D. & BROWN, F. (1989). The three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å. *Nature*, 337: 709-716.
2. ALEXANDER, H., KOCH, G., MOUNTAIN, I., SPRUNT, K. & VAN SANNE, O. (1958). Infectivity of ribonucleic acid of poliovirus on Hella cell monolayers. *Virology*, 5: 172-173.
3. ALLISON, A. (1973). Effects of adjuvants on different cell types and their interactions in immune responses. In *Immunopotential, CIBA Foundation Symposium N°18*, pp. 73. Ed. G.E.W. Wolstenholme and Knight Elsevier, Amsterdam.
4. ALMOND, N. M. & PARKHOUSE, R. M. (1986). Immunoglobulin class specific responses to biochemically defined antigens of *Trichinella spiralis*. *Parasite Immunol.*, 8: 391-406.
5. ALVING, C.R. (1993). Lipopolysaccharide, lipid A, and liposomes containing lipid A as immunologic adjuvants. *Immunobiology*, 187: 430-446
6. AMADORI, M., BONIZZI, L. (1983). Biological activities of interleukin-2 and gamma-interferon in bovine T lymphocyte conditioned media. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*, 3 : 139-145
7. ANDERSON, A., PLOTNER, A. & RUBIN, D. (1983). Effects of enteric priming with reovirus and lipodal amine adjuvant on mucosal lymphatic tissue and anti-viral IgA secretion. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 409: 769-783.
8. ANDREWS, A.E., BARCHAM, G.J., ASHMAN, K., MEEUSEN, E.N., BRANDON, M.R. & NASH, A.D. (1993). Molecular cloning and characterization of a ruminant interleukin-6 cDNA. *Immunol. Cell. Biol.*, 71 : 341-348
9. ARCHAMBAULT, D., MORIN, G. & ELAZHARY, Y. (1988). Influence of immunomodulatory agents on bovine humoral and cellular immune responses to parenteral inoculation with bovine rotavirus vaccines. *Vet. Microbiol.*, 17: 323-34.
10. ARLINGHAUS, R. & POLATNICK, J. (1969). The isolation of two enzyme-ribonucleic acid complexes involved in the synthesis of foot & mouth disease virus ribonucleic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 62: 821-824.

11. ASSELINEAU, J. & LEREDER, E. (1951). Sur la constitution des acides mycoliques de deux souches humains virulentes de *Mycobacterium tuberculosis*. Biochim. Biophys. Acta 1951, 7: 126-136.
12. AUDIBERT, F.M., CHEDID, L., LEFRANCIER, P. & CHOAY, J. (1976). Distinctive adjuvanticity of synthetics analogues of Mycobacteria water soluble components. Cell. Immunol, 21: 243-251.
13. AUDIBERT, F.M. & LISE, L.D. (1993). Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects. Immunol.Today, 14: 281-284.
14. BACHRACH, H. (1968). Foot and mouth disease virus. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 97: 659-670.
15. BACHRACH, H. (1977). Foot and mouth disease virus: properties, molecular biology and immunogenicity, en: Romberger, Betsville Symposia in Agricultural Research I., Virology in Agriculture, Ed. Allanheld-Osmiun, Montclair, NY.
16. BAHNEMANN, H. (1975). Binary ethylenimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production. Arch. Virol. 47: 47-56.
17. BAKER, P.J., TAYLOR, C.E. & EKWUNIFE, F.S. (1992). Bacterial polysaccharides, endotoxins and immunomodulation. Adv. Exp. Med. Biol. 319: 31-38
18. BALCOVIC, E. S., FLORACK, J. A. & SIX, H. R. (1987). Immunoglobulin G subclass responses of mice to influenza virus antigens given in different forms. Antiviral Res., 8: 151-160.
19. BARTELING, S.J. & VREESWIJK, J. (1991). Developments in foot-and-mouth disease vaccines. Vaccine, 9: 75-84.
20. BAXT, B. & BACHRACH, H. (1980). Early interactions of foot and mouth disease virus with cultured cells. Virology, 104: 42-55.
21. BAXT, B. & BACHRACH, H. (1982). The adsorption and degradation of foot and mouth disease virus by isolated BHK-21 cells plasma membranes. Virology, 116: 391-394.

22. BAXT, B., MORGAN, D.O., ROBERTSON, B.H., TIMPONE, C.A. (1984). Epitopes on foot-and-mouth disease virus outer capsid protein VP1 involved in neutralization and cell attachment. *J. Virol.* 51: 298-309.
23. BAXT, B., VAKHARIA, V., MOORE, D.M., FRANKE, A.J. & MORGAN, D.O. (1989). Analysis of neutralizing antigenic sites on the surface of type A12 foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.*, 63: 2143-2151.
24. BEH, K. & LASCELLES, A. (1985). The effects of adjuvants and prior immunization on the rate and mode of uptake of antigen into afferent popliteal lymph from sheep. *Immunology*, 54: 487-492.
25. BERINSTEIN, A., PÉREZ FILGUEIRA, M., SCHUDEL, A. A., ZAMORANO, P., BORCA, M. & SADIR A. M. (1993). Avridine and LPS from *B.Ovis*: effect on the memory induced by FMDV vaccination. *Vaccine*, 11: 1295-1301.
26. BERINSTEIN, A., PIATTI, P., GAGGINO, O. P., SCHUDEL, A. A. & SADIR, A. M. (1991). Enhancement of the immune response elicited with foot-and-mouth disease virus vaccines by an extract of the *Mycobacterium* sp. wall. *Vaccine*, 9: 883-888.
27. BERINSTEIN, A., ROIVAINEN, M., HOVI, T., MASON, P.W. & BAXT B. (1995). Antibodies to the vitronectin receptor (integrin $\alpha v \beta 3$) inhibit binding and infection of foot and mouth disease virus to cultured cells. *J. Virol.* (en prensa).
28. Biron, C. (1994). Cytoquines in the generation of immune response to and resolution of, virus infection. *Current Opinion in Immunology*, 6: 530-538.
29. BLACK, L., NICHOLLS, M.J., RWEYEMAMU, M.M., FERRARI, R. & ZUNINO, M.A. (1986). Foot-and- mouth disease vaccination: a multifactorial study of the influence of antigen dose and potentially competitive immunogens on the response of cattle of different ages. *Res. vet. Sci.*, 40: 303-307.
30. BONFORD, R. (1980). The comparative selectivity of adjuvants for humoral and cell-mediated immunity. II. Effect of delayed type hypersensitivity in the mouse and guinea pig, and cell-mediated immunity to tumour antigens in the mouse of Freund incomplete and complete adjuvants, alhydrogel, *Corynebacterium parvum*, *Bordetella pertussis*, muramyl dipeptide and saponin. *Clin. Exp. Immunol.* 29: 435-450.

31. BOOTHROYD, J., HIGHFIELD, P., CROSS, G., ROWLANDS, D., LOWE, P., BROWN, F. & HARRIS, T. (1981). Molecular cloning of foot and mouth disease virus genome and nucleotide sequence in the structural protein genes. *Nature*, 290: 800-803.
32. BORCA, M. V., FERNÁNDEZ, F. F., 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: 1-11.
33. BORCA, M. V., FERNÁNDEZ, F. F., SADIR, A. M., BRAUN, M. & SCHUDEL, A. A. (1988). The immune response to foot-and-mouth disease virus in a murine model: effective thymus-independent primary and secondary reaction. *Immunology*, 59, 261-267.
34. BORCA, M. V., GARMENDIA, A. E., BAXT, B., MOORE, D., SRIKUMARAN, S. & MORGAN, D.O. (1993). Cross-reactive idiotopes among anti foot-and-mouth disease virus neutralizing antibodies. *Immunology*, 79: 368-374.
35. BROWN, F., CARTWRIGHT, B. & STEWARD, D. (1962). Further studies on the infection of pig-kidney cells by foot and mouth disease virus. *Biochemistry and Biophysics*, 55: 768-774.
36. BROWN, W.C., WOODS, V.M., CHITKO-McKOWN, C.G., HASH, S.M., RICE-FICHT, A.C. (1994). Interleukin-10 is expressed by bovine type 1 helper, type 2 helper, and unrestricted parasite-specific T-cell clones and inhibits proliferation of all three subsets in an accessory-cell-dependent manner. *Infect. Immun.*, 62: 4697-4708
37. BROWN, W.C., ZHAO, S., WOODS, V.M., TRIPP, C.A., TETZLAFF, C.L., HEUSSLER, V.T., DOBBELAERE, D.A., RICE-FICHT, A.C. (1993). Identification of two Th1 cell epitopes on the *Babesia bovis*-encoded 77-kilodalton merozoite protein (Bb-1) by use of truncated recombinant fusion proteins. *Infect. Immun.*, 61: 236-244
38. BRUNER, D. & GILLESPIE, J. (1966). *Hagen's Infectious Diseases of Domestic Animals*, Chp. 44: 791-795, Cornell Univ. Press Ithaca, N.Y.
39. BURROUGHS, J., ROWLANDS, D., SANGAR, D., TALBOT, P. & BROWN, F. (1971). Further evidence for multiple proteins in the foot and mouth disease virus particles. *J. Gen. Virol.*, 13: 73-77.

40. BURROWS, R. (1968). Excretion of foot and mouth disease virus prior to the development of lesions. *Vet. Res.* 82:387.
41. BURROWS, R., MANN, J.A., GARLAND, A.J.M., GREIG, A. & GOODRIGDE, D. (1981), The pathogenesis of natural and simulated antural foot and mouth disease infection in cattle. *J. Comp.Pathol.* 91: 599-608
42. BURTON, D. (1985). Immunoglobulin G, functional sites. *Mol. Immunol.*, 22: 161-206.
43. BUTLER, J.E. (1981). A concept of humoral immunity among the ruminants and an aproach to its investigation. En: J.E. Butler (editor): *The ruminat immune system*. Plenum Press, N.Y.
44. BUTLER, J.E. (1983) Bovine immunoglobulins: an augmented review. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 4: 43-152.
45. BUTLER, J.E., HEYERMANN, H., BORCA, M., BIELECKA, M. & FRENYO, L.V. (1987). The isotypic, allotypic and idiotypic heterogeneity of bovine IgG2. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 17: 1-16.
46. BUTLER, J.E., HEYERMANN, H, FRENYO, L.V. & KIERNAN, R. (1987). The heterogeneity of bovine IgG2. II. The identification of IgG2b. *J. Immunol. Lett.*, 16: 31-38
47. BUTLER, J.E., NAVARRO, P. & HEYERMANN, H. (1994). Heterogeneity of bovine IgG2. VI. Comparative specificity of monoclonal and polyclonal capture antibodies for IgG2a (A1) and IgG2a (A2). *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 40: 119-133.
48. BUTLER, J.E., SEAWRIGHT, G. & McGIVERN, P.L. (1980). Class and subclass responses antibody response of B. abortus strain 19-vaccinated and field strain-challenge cattle: Evidence for a predominant IgG1 response in infected animals en: *The ruminant immune system*, Ed. J.E. Butler, Plenum Press, N.Y.
49. CALLIS, J.J., McKERBER, P.D. & GRAVES, J.H. (1968). Foot-and-mouth disease: A review. *J. Am. Veterinary Medical Association*, 12: 1798.
50. CARRILLO, E., GIACHETTI, C. & CAMPOS, R. (1984). Effect of lysosomotropic agents on the foot and mouth disease virus replication. *Virology*, 135: 542-545.

51. CARRILLO, E. (1985). Replicación del virus de la fiebre aftosa. Estudio del mecanismo de penetración. Tesis doctoral. Fac. de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.
52. CAVANAGH, D., ROWLANDS, D.J. & BROWN, F. (1978). Early events in the interaction between FMDV and primary kidney cells. *J. Gen. Virol.*, 41: 255-260.
53. CHARTEJEE, N.K., BACHRACH, H.L. & POLATNIK, J. (1976). Foot and mouth disease virus RNA, presence of 3' terminal poliriboadenilic acid and absence of amino acid binding ability. *Virology*, 69: 369-377.
54. CHEDID, L. (1985). Adjuvants of immunity. *Ann. Immunol.*, 136: 283-292
55. CHILLER, J., SKIDMORE, B., MORRISON, D. & WEIGLE, W. (1983). Relationship of the structure of bacterial lipopolysaccharide to its function in mitogenesis and adjuvanticity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 70: 2129-2133
56. CLUDTS, I., DROOGMANS, L., CLEUTER, Y., KETTMANN, R., BURNY, A. (1992). Sequence of bovine interleukin 7. *DNA Seq.*, 3 : 55-59
57. COLLEN, T, PULLEN, L. & DOEL, T. (1989). T cell-dependent induction of antibody against foot and mouth disease virus in a mouse model. *J. Gen. Virol.*, 70: 395-403.
58. COLTER, J.; BIRD, H. & BROWN, F. (1957). Infectivity of ribonucleic acid from ehrlich ascites tumor cells infected with mengoencephalitic. *Virology*, 5: 172-173.
59. COOPER, P.; AGOL, V., BACHRACH, H., BROWN, F., GHENDON, Y., GIBBS, A., GILLESPIE, J., LONGBERG-HOLM, K., MANDEL, B., MELNICK, J., MOHANTY, S., POVEY, R., RUECKERT, R., SCHAFFER, F. & TYRREL, D. (1978). Picornaviridae: second report. *Intervirology*, 10: 165-180.
60. CORNELL, G. PARR, D.Y HOFFMAN, T. (1979). The amino acid sequences of the three heavy chain constant region domains of a human IgG2 myeloma protein. *Can J. Biochem.*, 57: 758-766
61. COSTA GIOMI, M.P., BERGMANN, I.E., SCODELLER, E.A., MELLO, P., AUGEDE, T., GOMES, I. & LA TORRE, J.L. (1984). Heterogeneity of polyribocytidilic acid tract in aphthovirus: Biochemical and biological studies of viruses carrying polyribocytidilic acid tracts of difference lengths. *J. Virol.*, 51: 799-805.

62. COTTRAL, G.E. (1975). Foot and mouth disease virus, en: Foreign Animal Disease, Third ed., Committee on Foreign Animal Diseases, United States Animal Health Association, Richmond, VA.
63. COUTELIER, J.-P., VAN DER LOGT, F. & HEESSEN, F.W. A. (1991). IgG subclass distribution of primary and secondary immune responses concomitant with viral infections. *J. Exp. Med.*, 165: 64-69.
64. COUTELIER, J.-P., VAN DER LOGT, F., HEESSEN, F.W.A., VINK, A., & VAN SNICK, J. (1988). Virally induced modulation of murine IgG antibody subclasses. *J. Exp. Med.*, 165: 2373-2380.
65. COUTELIER, J.-P., VAN DER LOGT, F., HEESSEN, W. A., WARNIER, G. & VAN SNICK, J. (1987). IgG2a restriction of murine antibodies elicited by viral infections. *J. Exp. Med.*, 165: 64-69.
66. CROWELL, R. & LANDAU, B. J. (1979). Receptors as determinants of cellular tropism in picornavirus infection, en: Receptors and human disease. Ed. Bean, A. G. and Chopin, P., Jos. Macy Foundation., N.Y.
67. CUNHA R., JUNIOR, J., SERRARO, W. & TORRUELA, I. (1957). 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.
68. CUNLIFFE, H.R. (1964). Observations on the duration of immunity in cattle after experimental infection with foot and mouth disease virus. *Cornell Vet.*, 54: 501-510.
69. de LEEUW, P.W., VAN BEKKUM, J.G., TIESSINNK, J.W.A. (1978). Excretion of foot and mouth disease virus in oesophageal-pharyngeal fluid and milk of cattle after intranasal infection. *J. Hyg. (Camb)*, 81: 415-425.
70. DE SENA, J. & MANDELL, B. (1977). Studies on the in vitro uncoating of poliovirus. II. Characterization of the membrane-modified particle. *Virology*, 78: 554-560.
71. DENOYA, C., SCODELLER, E., GIMÉNEZ, B., VÁZQUEZ, C. & LA TORRE, J.L. (1978). Foot and mouth disease virus I: Stability of its ribonucleic acid. *Virology*, 84: 230-235.

72. DIMARCHI, R., BROOKE, G., GALE, C., CRACKNELL, V., DOEL, T. & MOWAT, N. (1986). Protection of cattle against foot and mouth disease by a synthetic peptide. *Science*, 232: 639-641.
73. DIMMOCK, N.J. (1984). Mechanisms of neutralization of animal viruses *J. Gen. Virol.*, 65: 1015-1020.
74. DJURUP, R. & WEEKE, B. (1986). Methods of detecting IgG subclass proteins and antibodies en: *Basic and Clinical Aspects of IgG Subclasses*, Ed. F. Shakib, S. Karger, Basel.
75. DoEL, T.R. (1996). Natural and vaccine-induced immunity to foot-and-mouth disease: the prospects for improved vaccines. *Vaccine en prensa*.
76. DOEL, T.R. & BACCARINI, P. J. (1981). Thermal stability of FMDV. *Arch. Virol.*, 70: 21-32
77. DOEL, T.R. & CHONG, W.K.T. (1982). Comparative immunogenicity of 146S, 75S and 12S particles of FMDV. *Arch. Virol.*, 73: 185-191.
78. DOEL, T.R., GALE, C.R., BROOKE, G. & DIMARCHI, R. (1988). Immunization against foot and mouth disease with synthetic peptides representing the C-terminal region of VP1. *J. Gen. Virol.* 69: 2403-2408.
79. EDELMAN, R. (1980). Vaccine adjuvants. *Rev. Infect. Dis.*, 2: 370-389.
80. ESCARMIS, C., TOJA, M., MEDINA, M. & DOMINGO, E. (1992). Modification of the 5' and translated region of foot and mouth disease virus after prolonged persistence in cell culture. *Virus Res.*, 26: 113-125.
81. ESSER, C. & RADBRUCH, A. (1990). Immunoglobulin class switching: molecular and cellular analysis. *Ann. Rev. Immunology.*, 8: 717-730.
82. FAGG, R. & HYSLOP, N. (1966). Isolation of variants strain of foot and mouth disease virus (type O) during passage in partly immunized cattle. *J. Hyg. (Camb)*, 64: 397-402.
83. FAHEY, J., WUNDERLICH, J. & MICHELL, R. (1964). The immunoglobulins of mice: 7S gamma 2, 7S gamma 1, gamma 1A (β 2A), and 18S gamma 1 M-globulins. *J. Exp. Med.*, 120: 223-242.

84. FERGUSSON, T.A., KRIEGER, M.J., PESCE, A., & MICHEL, J.G. (1983). Enhancement of antigen specific suppression by muramyl dipeptide. *Infect. Immun.* 39: 800-807
85. FERNÁNDEZ, F.F., BORCA, M.V., SADIR, A.M., FONDEVILA, N., MAYO, J. & SCHUDEL, A.A. (1986). Foot and mouth disease virus (FMDV) experimental infection: susceptibility and immune response of adult mice. *Vet. Microbiol.*, 12: 15-24.
86. FERNANDEZ-MUÑOZ, R. & DARNELL, J.E. (1976). Structural differences between the 5' termini of viral and cellular mRNA in poliovirus-infected cells: possible basis for the inhibition of host protein synthesis. *J. Virol.*, 126: 719-725.
87. FERNANDEZ-TOMAS, C. & BALTIMORE, D. (1973). Morphogenesis of picomavirus. Demonstration of a new intermediate, the provirion. *J. Virol.*, 12: 1122-1130.
88. FINKELMAN, F. & HOLMES, J. (1990). Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Ann. Rev. Immunol.*, 8: 303-333.
89. FORSS, S., STREBEL, K., BECK, E. & SCHALLER, H. (1984). Nucleotide sequence and genome organization of foot and mouth disease virus. *Nucleic acids Res.* 12: 6587-6601.
90. FOX, G., PARRY, N., BARNETT, P., MCGINN, B., ROWLANDS, D. & BROWN, F. (1989). The cell attachment site on foot and mouth disease virus includes the amino acid sequence R-G-D (Arginine-Glycine-Aspartic acid). *J. Gen. Virol.*, 70: 625-637.
91. FOX, G., STUART, D., ACHARYA, R.K., FRY, E., ROWLANDS, D. & BROWN, F. (1987). Crystalization and preliminary X-ray diffraction analysis of foot-and-mouth disease virus. *J. Mol. Biol.* 196: 591-597.
92. FRACASTORIUS, H. (1546). *De contagione et contagiosis morbis et curatione*, Bk1, chap. 12, Venezia.
93. FRASER-SMITH, E.B. & MATTHEWS, T.R. (1981). Protective effect of muramyl-dipeptide analogues against infections of *Pseudomonas aeruginosa* or *Candida albicans* in mice. *Infect. Immun.* 34: 676-684.

94. FRENKEL, S.H. (1951). Research on foot-and-mouth disease II. The cultivation of the virus on a practical scale in explantations of bovine tongue epithelium. *Am. J. Vet. Res.*, 12: 187-199.
95. FRENKEL, S., BARENDREGT, L.G., KLOOSTERMAN, E.G. & TALMON, F.P. (1982). Serological response of calves to aluminum hydroxide gel FMD vaccine with or without saponin. Influence of genetic differences on this response. *OIE, Proc. 16th Conf. on FMD, Paris*.
96. FREUND, J., CASALS, J. & HOSMER, E.P. (1937). Sensitization and antibody formation after injection of tubercle bacilli and paraffin oil. *Proc. Soc. Exp. Med.*, 37: 509-520.
97. FRY, E., LOGAN, D., ACHARYA, R., FOX, G., ROWLANDS, D., BROWN, F., & STUART, D. (1990). Architecture and topology of an aphthovirus. *Seminars in Virology*, 1: 439-451.
98. GARMENDIA, A.E., BORCA, M.V., MORGAN, D.O. & BAXT, B. (1989). Analysis of the foot-and-mouth disease virus neutralizing idotypes from immune bovine and swine with anti-murine idiotype antibody probes. *J. Immunol.*, 143: 3015-3019.
99. GARSIDE, P. & Mcl. MOWAT, A. (1995). Polarization of Th-cell responses: a phylogenetic consequence of nonspecific immune defence?. *Immunol. Today*, 16: 220-223
100. GEBAUER, F., DE LA TORRE, J., GOMES, I., MATEU, M., BARAHONA, H., TIRABOSCHI, E., BERGMANN, I., AUGÉ DE MELLO, P. & DOMINGO, E. (1988). Rapid selection of genetic and antigenic variants of foot and mouth disease virus during persistence in cattle. *J. Virol.*, 62: 2041-2049.
101. GERY, I., KRUGER, J. SPIECEL, S. (1972). Stimulation of lymphocytes by endotoxin. Reaction of thymus-deprived mice and karyotypic analysis of dividing cells in mice bearing T6T6 thymus grafts *J. Immunol.*, 108: 1088-1091.
102. GOLDSTEIN, N.O., PARDOE, I.V. & BURNES, A.T.N. (1976). Requirement of an adenylic acid segment for the infectivity EMC RNA. *J. Gen. Virol.*, 31: 271-275.

103. GOLINI, F., NOMOTO, A. & WIMMER, E. (1978). The genome-linked proteins of picornavirus I. Difference in the VPgs of encephallomyocarditis virus and poliovirus as evidence that genome linked proteins are virus-coded. *Virology*, 89: 112-117.
104. GREENSPAN, N.S. & COOPER, L.J.N. (1992). Intermolecular cooperativity: a clue to why mice have IgG3?. *Immunol. Today*, 13: 164-168.
105. GREY, H.M., HIRST, J.W. & COHN, M. (1971). A new mouse immunoglobulin: IgG3. *J. Exp. Med.*, 133: 289-304
106. GRUBMAN, M.J. & BAXT, B. (1982). Translation of foot and mouth disease virion RNA and processing of primary cleavage product in a rabbit reticulocyte lysate. *Virology*, 116: 19-30.
107. GRUBMAN, M., ROBERTSON, B., MORGAN, D., MOORE, D. & DOWBENKO, D. (1984). Biochemical map of polypeptides specified by foot and mouth disease virus. *J. Virol.*, 50: 579-586.
108. GUPTA, R.K., RELYVELD, E.H., LINDBLAD, E.B., BIZZINI, B., BEN-EFRAIM, S., GUPTA, C.K. (1993). Adjuvants-a balance between toxicity and adjuvanticity. *Vaccine*, 11: 293-306.
109. GUPTA, R.K., SAXENA, S.N., SHARMA, S.G.B. & AHUJA, S. (1990). Immunogenicity of glutaraldehyde inactivated pertussis vaccine. *Vaccine*, 8: 563-573
110. HARRIS, T. J. R. & BROWN, F. (1976). The location of poly (c) tract in the RNA of foot-and-mouth disease virus. *J. Gen. Virol.*, 33: 493-501.
111. HASSFURTHER, R.L., CANNING, P.C. & GEIB, R.W. (1994). Isolation and characterization of an interleukin-8-like peptide in the bovine species. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 42 : 117-126
112. HOCKART, M., MACKENZIE, J. & STEWARD, G. (1988). The IgG subclass response induced by wild-type, cold-adapted and purified haemagglutinin from influenza virus A/Queensland/6/72 in CBA/CaH mice. *J. Gen. Virol.*, 69: 1872-1882.

113. HOGLE, J.M., CHOW, M. & FILMAN, D.J. (1985). Three dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science*, 229: 1358-1365.
114. HOWARD, C.J., TAYLOR, G & BROWNLIE, J. (1980). Surface receptors for immunoglobulin on bovine polymorphonuclear neutrophils and macrophages. *Res. Vet. Sci.*, 29: 128-130.
115. IRIBE, H. & KOGA, T. (1984). Augmentation of proliferative responses of thymocytes to phytohemagglutinin by muramyl dipeptide. *Cell. Immunol.* 88: 9-15.
116. KELSO, A. (1995). Th1 and Th2 subsets: paradigms lost?. *Immunol. Today*, 16: 374-379.
117. KIERSZERBAUM, F. & FERRARESI, F.W. (1979). Enhancement of host resistance against *Trypanosoma cruzi* infection by immunoregulatory agent muramyl dipeptide. *Infect. Immun.* 25: 273-282
118. KING, A.M.Q., UNDERWOOD, B.O., McCAHON, 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: 479-485.
119. KIPPS, T.J., PARHAM, P., PUNT, J & HERZEMBERG, L.A. (1985). Importance of immunoglobulin isotype in human antibody-dependent, cell-mediated cytotoxicity directed by murine monoclonal antibodies. *J. Exp. Med.*, 161: 1-17.
120. KITAMURA, N., SEMBLER, B., ROTHBERG, P., LARSEN, G., ADLER, C., DORNER, A., EMINI, E., HANEKAC, R., LEE, J., VAN DER WERT, S., ANDERSON, C. & WINNER, E. (1981). Primary structure, gene organization and polypeptide repression of poliovirus RNA. *Nature*, 291: 547-553.
121. KITSON, J.D.A., McCAHON, D. & BELSHAM, G.J. (1990). Sequence analysis of monoclonal antibody resistant mutants of type O foot-and-mouth disease virus: evidence for the involvement of the three surface exposed capsid proteins in four antigenic sites. *Virology*, 179: 26-33.
122. KLAUS, G.G.B., HUMPHREY, J.H. (1977). The generation of memory cells. *Immunology*, 33: 31-38
123. KLAUS G.G.B.; PEPYS, M.B.; KITAJINA, K. & ASCONAS, B.A. (1979). Activation of mouse complement by different classes of mouse antibody. *J. Immunol.*, 38: 687-695.

124. KNUDSEN, R., GROOCOCK, C. & ANDERSEN, A. (1979). Immunity to foot and mouth disease virus in guinea pigs: clinical and immune response. *Infect. Immunol.*, 24: 787-792.
125. LASCELLES, A., EAGLESON, G., BETH, K. & WATSON, D. (1989). Significance of Freund's adjuvant antigen injection granuloma in the maintenance of serum antibody response. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 22: 15-19.
126. LEA, S., HERNANDEZ, J., BLAKEMORE, W., BROCCO, E., CURRY, S., DOMINGO, E., FRY, E., ABU-GHAZALEH, R., KING, A., NEWMAN, J., STUART, D. & MATEU, M.G. (1994). The structure and antigenicity of a type C foot-and-mouth disease virus. *Structure*. 2: 123-139.
127. LeCLERC, C., AUDIBERT & F. CHEDID, L. (1978). Influence of a synthetic adjuvant (MDP) on qualitative and quantitative changes of serum globulins. *Immunology*, 35: 963-971.
128. LeCLERC, C. & VOGEL, F. (1986). Synthetic immunomodulators and synthetic vaccines. *CRC Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Systems*, 2: 353-380
129. LEE, F. Y., NOMOTO, A., DETJEN, B. M. & WIMMER, R. (1977). A protein covalently linked to poliovirus genome RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74: 59-63.
130. LEONG, D., DÍAZ, R. MILNER, K., RUDBACH, J. & WILSON, J. (1970). Some structural and biological properties of *Brucella* endotoxin. *Infect. Immun.*, 1: 174-179
131. LOEFFLER, F. & FROSH, P. (1897). Summarischer Bericht über der Ergebnisse der Untersuchungen zur Erforschung der Maul - und Klauenseuche. *Zent Bl. Bakt. Parasistkde*, 22: 257-277.
132. LOGAN, D., ABU-GHAZALEH, R., BLAKEMORE, W., CURRY, S., JACSON, T., KING A., LEA, S., LEWIS, R., NEWMAN, J., PARRY, N., ROWLANDS, D., STUART, T & FRY, E. (1993). Structure of a major immunogenic site of foot and mouth disease virus. *Nature*, 362: 566-568
133. LOPEZ, O.J., BORCA, M.V., FERNÁNDEZ, F.F., BRAUN, M. & SCHUDEL, A.A. (1990). Immune response to foot and mouth disease virus in an experimental murine model. II. Basis of persistent antibody reaction. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 24: 313-321.

134. LOWES, E. (1972). Epidemiological studies of foot-and-mouth disease in Great Britain. *Bull. Of. Int. Epiz.*, 7: 481-488
135. LUCAS-LENARD, J.M. (1979). Inhibition of cellular protein synthesis after virus infection, en: *The molecular biology of picornaviruses*, Ed. Perez-Bercoff, Cambridge University Press, N.Y.
136. LUO, M., VRIEND, G., KRAMER, G., MINOR, I., ARNNOL, E., ROSSMAN, M.G., BOEGE, V., SCRABA, D.G., DUKE, G.M. & PALMEMBERG, A. (1987). The atomic structure of Mengo virus at 30 Å resolution. *Science*, 235: 182-191.
137. MACKIE D.P. & LOGAN E.F. (1986). Changes in immunoglobulin levels in whey during experimental *Streptococcus agalactiae* mastitis. *Res Vet Sci.*, 40: 183-188.
138. MASON, P.W., RIEDER, E. & BAXT, B. (1994). RGD sequence of foot and mouth disease virus is essential for infecting cells via the natural receptor but can be bypassed by antibody-dependent enhancement pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91: 1932-1936.
139. MATEU, M.G., HERNÁNDEZ, J., MARTINEZ, M.A., FEIGELSTOCK, D., LEA, S., PÉREZ, J.J., GIRALT, E., STUART, D., PALMA, E.L. & DOMINGO, E. (1994). Antigenic heterogeneity of a foot and mouth disease virus serotype in the field is mediated by very limited sequence variation at several antigenic sites. *J. Virol.*, 68: 1407-1417.
140. MATEU, M.G., MARTINEZ, M.A., ROCHA, E., ANDREU, D., PAREJO, J., GIRALT, E., SOBRINO, F. & DOMINGO, E. (1989). Implications of a quasispecies genome structure: effect of frequent, naturally occurring amino acid substitutions on the antigenicity of foot-and-mouth disease virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86: 5883-5887.
141. McCAULEY, E., AULAQI, N., SUNDQUIST, W., NEW, J & MILLER, W. (1977). A study of the potential economic impact of foot and mouth disease, en: *U.S. Proc. of United States Animal Health Assoc.*, 81st. Annual Meeting, pp 284.
142. McCULLOUGH, K.C., CROWTHER, J.R., BUTCHER, R.N., CARPENTER, W.C., BROCCHI, E., CAPUCCI, L. & DE SIMONE, F. (1986). Immune protection against foot-and-mouth disease virus studied using virus neutralizing and non-neutralizing concentrations of monoclonal antibodies. *Immunology*, 58: 421-428.

143. McCULLOUGH, K.C., DE SIMONE, F., BROCCHI, E., CAPUCCI, L., CROWTHER, J.R. & KIHM, U. (1992). Protective immune response against foot-and-mouth disease. *J. Virol.*, 66: 1835-1840.
144. McCULLOUGH, K.C., PARKINSON, D. & CROWTHER, J.R. (1988). Opsonization enhanced phagocytosis of foot-and-mouth disease virus. *Immunology*, 65: 187-191.
145. McGUIRE, T.C., MUSOKE, A.J. & KURTII, T. (1979). Functional properties of bovine IgG1 and IgG2: interaction with complement, macrophages, neutrophils and skin. *Immunology*, 38: 249-55.
146. McKENDALL, R.R., WOO, W. (1988). Murine IgG subclasses responses to herpes simplex virus type 1 and polypeptides. *J. Gen. Virol.*, 69: 847-857.
147. McKERCHER, P.D. & GRAVES, J.H. (1977). A review of the current status of oil adjuvants in foot-and-mouth disease vaccines. *Dev. Biol. Stand.*, 35: 107-118
148. McVICAR, J.M. & SUTMOLLER, P. (1976). Growth of foot-and-mouth disease virus in the upper respiratory tract of non immunized and recovered cattle after intrabasal inoculation. *J. Hyg (Camb)* 76: 467-481.
149. MICHELSEN, E. (1961). Experience with vaccination of pigs. *Arch. Exp. Vet. Med.*, 15: 317-322
150. MINOR, P.D. (1990). Antigenic structure of picomaviruses. *Current topics in Microbiology and Immunology*, 161: 121-154.
151. MORGAN, D.O., MOORE, D. & McKERCHER, P. (1980). Vaccination against foot and mouth disease, en: *New Developments with Human and Veterinary Vaccines*. Ed. A. Mizsahi, I. Hertman, M. A. Klingberg and A. Kohn, Alan A. Liss Inc., N.Y.
152. MORGAN, D., ROBERTSON, B., MOORE, D., TIMPONE, C. & McKERCHER, P. (1984). Aphthoviruses: Control of foot and mouth disease with genetic engineering vaccines. Ed. E. Kouretak, Marcel Dekker Inc., London.
153. MORIN, A., CHARLEY, B., PETIT, A. & CHEDID, L. (1985). Protective effects of muramyl peptides against experimental viral infections. *Int. J. immunopharmacol.*, 7: 345-351

154. MOSMANN, T.R., CHERWINSKY, H., BOND, M.W., GIEDLIN, M.A., COFFMAN, R.L. (1986). Two types of murine helper T cell clone: 1. Definition according to the profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.*, 136: 2348-2357.
155. MOWAT, G.N. & CHAPMAN, W.G. (1962). Growth of foot-and-mouth disease virus in a fibroblastic cell line derived from hamster kidneys. *Nature*, 194: 253-257
156. MULCAHY, G., GALE, C., ROBERTSON, P., IYISAN, S., DIMARCHI, R. D. & DOEL, T. R. (1990). Isotype responses of infected, virus-vaccinated and peptide-vaccinated cattle to Foot-and-Mouth disease virus. *Vaccine*, 8: 249-257.
157. MYERS, K.R., BEINING, P. BETTS, M., SNIPPE, H., INMAN, J. & GOLDING B. (1995). Monophosphoryl lipid A behaves as a T-cell-independent type 1 carrier for hapten-specific antibody response in mice. *Infect. Immun.*, 63: 168-174
158. NAGAO, S., TANAKA, A., YAMAMOTO, Y., KOGA, T., ONOUE, K. SHIBA, T. ET AL. (1979) Inhibition of macrophage migration by muramyl dipeptides. *Infect. Immun.*, 24: 308-313.
159. NAMEN, A.E., MAGNUSON J.A. (1984). Production and characterization of bovine interleukin-2. *Immunology*, 52 : 469-475
160. NATSUUME-SAKAI, S., MOTONISHI, K. & MIGITA, S. (1977). Quantitative estimation of five classes of immunoglobulin in inbred mouse strains. *Immunology* , 32: 861-866.
161. NEWMAN, J.F.E., CARTWRIGTH, B., DOEL, T.L. & BROWN, F. (1979). Purification and identification of RNA-dependent RNA polymerase of foot and mouth disease virus. *J.Gen. Virol.*, 45: 497-507.
162. NIBLACK, J., OTTERNES, I., HERMSWORTH, G., WOLFF, J., HOFFMAN,W. & KRASKA, A. (1979). CP-20,961: a structurally novel, synthetic adjuvant. *J. Reticuloendothel. Soc.*, 26: 655-660.
163. OGAWA, T., KOTANI, S., KUSUMOTO, S. & SHIBA, T. (1983) Possible chemotaxis of human monocytes by *N*-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine. *Infect. Immun.* 39: 449-461.

164. OHTA, M., NAKASHIMA, I. & KATO, M. (1980). Adjuvant actions of polyclonal activators II. Comparison and characterization of their actions in initiation and potentiation of immune responses of T-dependent and T-independent soluble antigens. *Cell. Immunol.*, 49: 360-366
165. OUTLAW, M. C. & DIMMOCK (1991). Insights into neutralization of animals viruses gained from the study of influenza virus. *Epidemiol. Infect.*, 106: 205-212.
166. PARISI, J. M., GIOMI, P.C., GRIERA, P., AUGÉ DE MELLO, P., BERGMANN, I.E., LA TORRE, J.L. (1987) Biochemical characterization of an aphthovirus type O1 strain Campos attenuated for cattle by serial passages in chicken embryos. *Virology*, 68: 523-528.
167. PARRY, N.R., OULDRIDGE, E.J., BARNETT, P.V., ROWLANDS, D.J. & BROWN, F. (1989). Neutralizing epitopes of type O foot-and-mouth disease virus. II. Mapping three conformational sites with synthetic peptide reagents. *J.Gen.Virol.*, 70: 1493-1499.
168. PARRY, N.R.; ROWLANDS, D.J., BROWN, F., FRY, E., ACHARYA, R., LOGAN, D., STUART, D. (1990). Structural and serological evidence for a novel mechanism of antigenic variation in foot and mouth disease virus. *Nature*, 347: 569-572.
169. PAY, T. W. F., HINGLEY, P. H., RADLETT, P. J., BLACK, L. & O' REILLY, K. J. (1983). The correlation of the 140S antigen dose with the serum neutralizing antibody response and with protection from challenge induced by FMD vaccine. Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of FMD, Leystad, The Netherlands. Food and Agriculture Organization, Rome.
170. PEREIRA, H.G. (1981). Foot and mouth disease. *Virus disease of food animals*. E.P.J. Academic Press, 2: 333-363.
171. PEREZ BERCOFF, R. (1979). Replication of the viral RNA, en: *The Molecular Biology of Picornaviruses*, Ed. Perez Bercoff, Plenum Press, N.Y.
172. PERLMUTTER, R. M., HANSBURG, D., BRILES, D. E., NICOLOTTI, D. A. & DAVIE, J. (1978). Subclass restriction of murine antibodies. *J. Immunol.*, 172: 566-572.

173. PETERSON J.D., WALTEBAUGH C. & MILLER S.D. (1992). IgG subclass responses to Theiler's murine encephalomyelitis virus infection and immunization suggest a dominant role for Th1 cells in susceptible mouse strains. *Immunology*, 75: 652-658.
174. PFAFF, E., MUSSGAY, M., BOHM, H.O. SCHULTZ, G.E. & SCHALLER, H. (1982). Antibodies against preselected peptide recognize and neutralize foot-and-mouth disease virus. *EMBO J.*, 1: 869-874.
175. PIATTI, P., BERINSTEIN, A., LOPEZ, O.J, BORCA, M.V., FERNÁNDEZ, F.F., SCHUDEL, A.A., & SADIR, A.M. (1991). Comparison of the immune response elicited by infectious and inactivated foot and mouth disease virus in mice. *J. Gen. Virol.*, 72: 1691-1694.
176. PINK, J., BUTTERY, S., DE VRIES, G. & MILSTEIN, C. (1970). Human immunoglobulin subclasses. Partial aminoacid sequence of the constant region of a γ -4 chain. *Biochem. J.*, 117: 133-143
177. POLATNICK, J. & BACHRACH, H. (1964). Production and purification of milligram amounts of foot and mouth disease virus from baby hamster kidney cell cultures. *Appl. Microbiol.*, 12: 368-376.
178. PORTER, A., FELLNER, P., BLACK, D., ROWLANDS, D., HARRIS, T., J. & BROWN, F. (1978). 3' Terminal nucleotide sequences in the genome RNA of picornaviruses. *Nature*, 276: 298-301.
179. PRATO MURPHY, M.L., MEYER, R.F., MEBUS, C., SCHUDEL, A.A. & RODRIGUEZ, M. (1994). Analysis of the sites of foot and mouth disease virus persistence in carrier state via the polymerase chain reaction. *Arch. Virol.* 136: 299-307.
180. PRATO MURPHY, M., RODRIGUEZ, M., SCHUDEL, A.A. & MAYER, R.F. (1995). Localization of FMDV RNA in tissue culture infected cells via in situ polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods*, 54: 174-180.
181. PYL, G. (1953). Die Herstellung eines Konzentrat-Adsorbat-Impfstoffes gegen Maul- und Klauenseuche aus gereinigtem Antigen. *Arch. Exp. Vet. Med.*, 7: 238-244

182. RADLETT, P.J., PAY, T.W.F. & GARDLAND, A.J.M. (1985). The use of BHK suspension cells for the commercial production of foot-and-mouth disease vaccines over a twenty year period. *Dev. Biol. Stand.*, 60: 163-170
183. RAMANATHAN, V.D., BADENOCH-JONES, P. & TURK, J.L. (1979). Complement activation by aluminum zirconium compounds. *Immunology*, 37: 881-885
184. RAMON, G. (1925). Sur l'augmentation anormale de l'antitoxine chez les chevaux producteurs de serum antidiphtherique. *Bull.Soc. Centr. Med. Vet.* 101: 227-233
185. REALE, M. A., BONA, C. A. & SCHULMAN, J. L. (1985). Isotype profiles of anti-influenza antibodies in mice bearing the *xid* defect. *J. Virol.*, 53: 425-429.
186. RIVENSON, S., SADIR, A. M., GAGGINO, O. P., MARCOVECCHIO, F. E., ZABAL, O. & LAPORTE, O. (1982). Estudio comparativo en bovinos de dos vacunas antiaftosa: oleosa e hidroxisaponinada. *Rev. Med. (Buenos Aires)*, 63: 364-370.
187. ROITT, I., BROSTOFF, J. & MALE, D. (1996). Introduction to the immune system, en: *Immunology*, 4º edición, Ed. Mosby, Londres, U.K
188. ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. (1996). Antibodies and their receptors, en: *Immunology*, 4º edición, Ed. Mosby, London, U.K.
189. ROMAGNANI, S. (1991). Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more. *Immun. Today* 12:256.
190. ROSSMAN, M.G., ARNOLD, E., ERICKSON, J., FRANKELBERG, E., GRIFFITH, J., HECHT H., JOHONSON, J., KRAMER, G., LUO, M., MOSSER, A., RUECKERT, R., SHERRY, B. & VRIEND, G. (1985). Structure of a human common cold virus and functional relationship to other picomaviruses. *Nature* 317: 145-149.
191. ROTH, J.A., KAEBERLE, M.L. (1985). Enhancement of lymphocyte blastogenesis and neutrophil function by Avidine in dexamethasone-treated and non treated cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 46: 53-57.

192. RUBIN, D., ANDERSON, A., LUCIS, D. & MICHALEK, S. (1983). Potentiation of the secretory IgA response by oral and enteric administration of CP-20,961. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 409: 866-882.
193. RUECKERT, R. (1976). On the structure and morphogenesis of picomaviruses, en: *Comprehensive Virology*, Ed. Fraenkel-Conrat, H. and Wagner, R.R., N.Y.
194. RUECKERT, R. (1985). Picomaviruses and their replication, en: *Virology*. Ed. B. Fields, Raven Press, N.Y.
195. RUECKERT, R. & WIMMER, E. (1984). Systematic nomenclature of picomavirus proteins. *J. Virol.* 50: 957-962.
196. RWEYEMAMU, M., UMEHARA, O., LUCCA NETO, D., BALTAZAR, M., VICENTE, F. & MEDEIROS NETO, R. (1986). Efficacy of Avidine as an adjuvant for Newcastle virus antigen in chickens. *Am. J. Vet. Res.*, 47: 1243-1248.
197. SADIR, A.M., LÓPEZ, O.J., MARCOVECCHIO, F.M., TIRABOSCHI, B., BERGMANN, I., LA TORRE, J.L. & SCHUDEL, A.A. (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.*
198. SAIZ, J.C., GONZALEZ, M.J., BORCA, M.V., SOBRINO, F. & MOORE, D.M. (1991). Identification of neutralizing antigenic sites on VP1 and VP2 of type A5 foot-and-mouth disease virus, defined by neutralization-resistant variants. *J. Virol.*, 65: 2518-2525
199. SALT, J.S. (1993). The carrier state in foot and mouth disease virus-an immunological review. *Br. Vet. J.*, 149: 207-223
200. SANGAR, D. (1979). The replication of picomaviridae. *J. Gen. Virol.* 45: 1-13.
201. SCHUDEL, A.A.; FERNÁNDEZ, F.F. Y SADIR, A.M. (1993). Fiebre Aftosa. Actualización. *Therios.* 21:105-120
202. SCOTT, F.W., COTTRAL, G.E. & GAILIUNAS, P. (1966). Persistence of FMD virus in external lesion and saliva of experimentally infected cattle. *Am. J. Veterinary Research*, 27: 1531-1536.

203. SELLEI, J. (1987). Interaction of bovine immunoglobulins with complement. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 10: 93-89.
204. SELLERS, R.F. (1971). Quantitative aspects of the spread of foot and mouth disease. *Vet. Bull.* 41: 431-440.
205. SELLERS, R.F., PARKER, J. (1969). Airborne excretion of foot-and-mouth disease virus. *J. of Hig. (Camb)*, 67: 671-677.
206. SEMLER, B., ANDERSON, C., KITAMURA, N., ROTHKERG, P., WISHART, W. & WIMMER, E. (1981). Poliovirus replication protein: RNA sequence encoding P3-1b and the sites of proteolytic processing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78:3464.
207. SHAHAN, M. (1962). The virus of foot and mouth disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 101: 444-453.
208. SKINNER, H. (1953). One week old white as test animals in foot and mouth disease research. *Proc. XVth.Int. Cong. Stockholm*, 1: 195-199
209. SPECTOR, D.H. & BALTIMORE, D. (1974). Requirement of 3'-terminal; poly (adenylic acid) for the infectivity of poliovirus RNA. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 71: 2983-2992.
210. STARUCH, M.J. & WOOD, D.D. (1983). The adjuvanticity of interleukin-1 *in vivo*. *J. Immunol.*, 130: 2191-2199.
211. STAVE, J.W., CARD, J.L., MORGAN, D.O. & VAKHARIA, V.N. (1987). Neutralization sites of type O1 foot-and-mouth disease virus defined by monoclonal antibodies and neutralization-escape virus variants. *Virology*, 162: 21-29.
212. STEVENS, M.G., WILSON, L.K., GERSHWIN, L.J. (1992). Isolation and characterization of an IL-1-dependent IL-4-producing bovine CD4+ T cell clone. *Cell. Immunol.*, 140 : 453-467
213. STROHMAIER, L. (1967). Virus concentration by ultrafiltration. *Methods. Virol.*, III: 45-49
214. STUEHR, D.J. & MARLETTA, M.A. (1987). Synthesis of nitrite and nitrate in murine macrophage cell lines. *Cancer Res*, 47: 5590-5594

215. SUBAK-SHARPE, H. (1961). The effect of passage, history, route of inoculation, virus strain and host strain on susceptibility of adult mice to the virus of foot and mouth disease. *Arch. Ges. Virusforsch.* 3: 373-380.
216. SUBAK-SHARPE, H. PRINGLE, C. & HOLLOM, S. (1962). Factors influencing the dynamics of multiplication of foot and mouth disease virus in adult mice. *Arch. Ges. Virusforsch.*, 5: 600-612.
217. SUGIMOTO, M., GERMAIN, R.N., CHEDID, L. & BENACERRAF, B. (1978). Enhancement of carrier-specific helper T-cell function by the synthetic adjuvant *N*-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (MDP). *J. Immunol.*, 120: 980-990.
218. SUTMOLLER, P. & GAGGERO, C.A. (1965). Foot and Mouth disease carriers. *The Veterinary Record*, 77: 968-969.
219. SUTMOLLER, P. & VIEIRA, A. (1980). The relationship of neutralizing antibody titres for FMDV and the protection of cattle. *Bol. Cent. Panam. Fiebre Aftosa*, 39: 57-62.
220. TALCOTT, P.A., KOLLER, L.D., WOODARD, L.F., WHITBECK, G.A. (1986). Opposing effects of the interferon inducer, avidine: enhancement or suppression of tumor growth depending on treatment regimen. *Int. J. Immunopharmacol.*, 8: 553-559.
221. TANAKA, A., NAGAO, S., NAGAO, R., KOTANI, S. & SHIBA, T. (1979). Stimulation of reticuloendothelial system of mice by muramyl dipeptide. *Infect. Immun.*, 24: 302-307.
222. THÈZE, J. (1984). Helper T lymphocytes and isotype expression. *Immunol. Today*, 5, 67-68.
223. THOMAS, A., WOORTMEIJER, P., PUIJK, W. & BARTELLING, S. (1988). Antigenic sites on foot and mouth disease virus type A10. *J. Virol.*, 62: 2782-2789.
224. THOMAS, K.A., RIOS-CANDELORE, M., GIMENEZ-GALLEGO, G., DISALVO, J., BENNETT, C., RODKEY J., FITZPATRICK, S. (1985). Pure brain-derived acidic fibroblast growth factor is a potent angiogenic vascular endothelial cell mitogen with sequence homology to interleukin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82 : 6409-6413

225. THOMSEN, A. R., VOLKERT, M. & RAJEWSKY, K. (1986). Different isotype profiles in virus-specific antibodies in acute and persistent lymphocytic choriomeningitis virus infection in mice. *J. Immunol.*, 136: 2892-2895.
226. TRINCHIERI, G. (1989). Biology of Natural killer cells. *Adv. Immunol.*, 47: 187-376.
227. VAN BEKKUM, J.G. (1969). Correlation between serum antibody levels and protection against challenge with FMDV. Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of FMD, Brescia, Italy. Food and Agriculture Organization, Rome.
228. VAN BEKKUM, J.G. (1973). The carrier state in foot and mouth disease, en: *Proc. 2nd. Int. Conf. on FMD*, Ed. Pollard, M., Gustav Stern Foundation Inc., N.Y.
229. VAN DE WONDE, G., SWAYNEY, J. & BACHRACH, H. (1972). Chemical and physical properties of foot and mouth disease virus: a comparison with Maus Elberfeld virus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 8: 1222-1231.
230. VINGSBO, C., JONSSON, R., HOLMDAHL, R. (1995). Avidine-induced arthritis in rats; a T cell-dependent chronic disease influenced both by MHC genes and by non-MHC genes. *Clin. Exp. Immunol.*, 99: 359-363.
231. WAGNER, G.G., CARD, J.L. & COWAN, K.M. (1970). Immunochemical studies of foot-and-mouth disease virus. VII. Characterization of foot-and-mouth disease virus concentrated by polyethylenglicol precipitation. *Arch. Ges. Virusforsch.*, 30: 343-350
232. WALDMANN, O., KOBE, K., & PYL, G. (1937). Die aktive immunisierung der Rindes gegen Maul - und Klausenseuche. *Zentralbl. Bakteriol. J. Orig.*, 138: 401-423
233. WARREN, H., VOGEL, F. & CHEDID, L. (1986). Current status of immunological adjuvants. *Ann.Rev. Immunol.*, 4: 369-388
234. WATSON, D.L. (1976). The effect of cytophilic IgG2 on phagocytosis by ovine polymorphonuclear leucocytes. *Immunology*, 31: 159-65.
235. WILD, T., BURROUGHS, J. & BROWN, F. (1969). Surface structure of foot and mouth disease virus. *J. Gen. Virol.*, 4: 313-320.

236. XIE, Q.C., Mc CAHON, D., CROWTER, J.R., BELSHAM, G.J. & McCULLOUGH, K.C. (1987). Neutralization of foot and mouth disease virus can be mediated through any of at least three separate antigenic sites. *J. Gen. Virol.*, 68: 1637-1647
237. YILMA, T., McVICAR, J. & BREESE, S. (1978). Pre-lytic release of foot and mouth disease virus cytoplasmic blebs. *J. Gen. Virol.* 41: 105-
238. ZAMORANO, P., WIGDOROVITZ, A., CHAHER, M.T., FERNANDEZ, F.M., SADIR, A.M. & BORCA, M.V. (1994). Localization of B and T cell epitopes on a synthetic peptide containing the major immunogenic site of FMDV O1 Campos. *Virology*, 201: 383-386
239. ZIEGLER, H., STAFFILENO, L. & WENTWORTH, P. (1984). Modulation of macrophage Ia-expression by lipopolysaccharide. I. Induction of Ia expression "in vivo". *J. Immunol.*, 133: 1825-1831.