



Inmunidad adaptativa y protectora contra  
el Virus de la Fiebre Aftosa en bovinos: rol de  
las respuestas inmunes sistémica y de  
mucosas

---

***Lic. Florencia Mariel Barrionuevo***

Instituto de Virología  
Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA)  
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)

***Director: Dr. Mariano Pérez Filgueira***  
Instituto de Virología, CICVyA, INTA

***Co-Director: Dr. Manuel Borca***  
Plum Island Animal Disease Center (PIADC), ARS, USDA

***Tesis de Doctorado para optar por el grado de Doctor de la Universidad de Buenos  
Aires Facultad de Ciencias Veterinarias***

***– 2018 –***

*A la memoria de  
nuestro compañero y amigo,  
Diego Soráire.*

**Parte de los resultados de esta tesis fueron publicados en el siguiente artículo:**

*“Systemic antibodies administered by passive immunization prevent generalization of the infection by foot-and-mouth disease virus in cattle after oronasal challenge”*

Barrionuevo Florencia, Di Giacomo Sebastián, Bucafusco Danilo, Ayude Andrea, Schammas Juan Manuel, Miraglia María Cruz, Capozzo Alejandra, Borca Manuel, Pérez-Filgueira, Mariano

Virology 518:143-151, May 2018

**La presente tesis fue financiada por:**

El acuerdo colaborativo 58-1940-2-107F del ARS (Agricultural Research Service)-USDA, EE.UU., por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 0309-2013) y por el Proyecto Específico dentro del módulo de Salud Animal PNSA-1115052-INTA.

# **AGRADECIMIENTOS**

---

A Mariano, por haberme dado la posibilidad de pertenecer a su grupo de trabajo, por enseñarme con paciencia y mucha humildad y por haberme facilitado siempre su ayuda con buena predisposición, tanto en asuntos laborales como personales.

A mis compañeros de trabajo, Seba, Danilo, Juan y Andre, sin quienes no hubiera sido posible la realización de esta tesis. Gracias por todo el tiempo invertido en esto y su valiosa ayuda, por enseñarme desde el primer día todo lo que necesité saber, y estar siempre ahí para dar una mano en lo que fuera. Y gracias, sobre todo, por las risas y los hermosos momentos que compartimos en estos 5 años.

Al resto de mis compañeros del Instituto, Nan, Ceci, Flor, Maru, Lucas, Cruz, Juan, Rodri, Myr, Flori, Ana, Ale, Jose, Ivi y Javi. Por hacer de todos mis días de trabajo, días alegres y divertidos, por estar siempre dispuestos a dar una mano, por la contención constante, por el interés y la preocupación, por tantos viajes a la estación de trenes para facilitarme la llegada a INTA o la vuelta a casa, y por la amistad que se fue construyendo durante todos estos años.

A mi co-director, por su orientación y comentarios a lo largo de la tesis, esenciales para llevar adelante la misma.

A Ceci y Nan, por la gran ayuda y la paciencia infinita, brindada para poner a punto la Real Time.

A Juan S., por su ayuda en los análisis estadísticos de los resultados.

A Juan P., por haberme enseñado la técnica de ELISpot al comienzo de la beca.

A Ceci, por ayudarme con la amplificación del plásmido y tantas corridas de geles.

A Diego, Claudio, Verónica y Lucas, del campo experimental del CICVyA, por su buena predisposición cada vez que los necesitamos y su gran ayuda y esfuerzo físico para trabajar con los animales.

A Alejandra, por sus sugerencias y ayuda en el análisis de resultados.

A Eze, por la buena onda y paciencia para las numerosas entradas al laboratorio de bioseguridad.

A los chicos de mantenimiento, en especial Diego y Javi, por haber colaborado con la experiencia dentro del box de bioseguridad.

A Javier Cappuccio, Claudia Mongini, Gabi Calamante y Cecilia Langellotti, por formar parte de la comisión de seguimiento de mi tesis dentro de INTA, por los aportes y sugerencias, la dedicación y su tiempo.

A la gente del sector de cultivo celular, por proporcionarme los medios y las células indispensables para la realización de este trabajo.

A la gente del Instituto de Biotecnología, por permitirme la utilización de la ultracentrífuga y el equipo de Real Time, necesarios para el desarrollo de la presente tesis, en especial a Damián Moyano por la gran ayuda para la corrida de las últimas muestras.

A la gente del SENASA, en especial a Sabrina Galdonovo, por facilitarnos el virus infeccioso.

A la gente de Biogénesis Bagó S.A, por facilitarnos la vacuna.

Al Instituto de Virología y sus directivos, por brindarme el espacio de trabajo durante la beca doctoral.

A la Facultad de Cs Veterinarias de la UBA, por aceptar el presente trabajo y permitirme desarrollar mi Doctorado en esta casa de estudios.

Al CONICET y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica por proveer de la beca y subsidios para desarrollar el trabajo presentado.

A mis amigos que siempre están acompañando y alentando. A los que están cerca y a los que están lejos.

A Roli, por haberme acompañado durmiendo en mi regazo durante todas las horas de escritura.

A mis abuelos, por enseñarme los valores del trabajo y la dedicación.

A mis hermanos, por ser un fuerte sostén en todo momento, por acompañarme y cuidarme siempre, y por ser mis mejores amigos.

A mis papas, por hacerme posible llegar hasta acá, por el ejemplo continuo, el sacrificio y la dedicación para conmigo y mis hermanos. Por darme la libertad de elegir y acompañarme en todas mis decisiones. Un “gracias” eterno y lleno de amor para Uds.

# INDICE

---



<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	12
<b>RESUMEN</b> .....	14
<b>SUMMARY</b> .....	17
1. INTRODUCCIÓN.....	19
1.1 La fiebre aftosa.....	20
1.1.1 Breve reseña histórica de la enfermedad.....	20
1.1.2 Importancia sanitario-económica y distribución geográfica .....	22
1.1.3 Historia y control de la fiebre aftosa en Argentina .....	24
1.2 El virus de la fiebre aftosa .....	30
1.2.1 Taxonomía y estructura del virus .....	30
1.2.2 Organización del genoma .....	32
1.2.3 Filogenia y variabilidad antigénica del VFA .....	34
1.3 Patogenia a nivel celular y en hospedadores .....	36
1.3.1 Patogenia celular del virus .....	36
1.3.2 Patogenia en especies susceptibles .....	38
1.4 La vacuna anti-aftosa .....	42
1.4.1 Sus métodos de producción y control .....	42
1.4.2 Nuevas vacunas contra VFA.....	45
1.5 Inmunidad contra el VFA.....	46
1.5.1 Inmunidad adaptativa: linfocitos B y anticuerpos .....	46
1.5.2 Sistema inmunitario bovino .....	48
1.5.3 Respuesta inmune a la infección por VFA .....	51
1.5.4 Respuesta inmune a la vacunación contra VFA .....	56
1.6 Antecedentes al plan de trabajo y planteo del problema .....	58
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	60
3. OBJETIVOS .....	61
3.1 OBJETIVOS GENERALES .....	62
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	62

4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	63
Diseño Experimental .....	64
4.1 Protocolos experimentales in vivo .....	66
4.1.1 Vacunación .....	66
4.1.2 Sangrado de los bovinos, procesamiento del suero y transferencia a los terneros .....	66
4.1.3 Infecciones experimentales .....	68
4.1.4 Determinación de los signos clínicos .....	69
4.1.5 Toma de muestras nasales, de sangre entera y suero .....	69
4.1.6 Eutanasia .....	70
4.2 Protocolos experimentales in vitro .....	70
4.2.1 Obtención de células mononucleares (CMN) de órganos linfoides .....	70
4.2.2 ELISPOT específico para VFA en bovinos .....	71
4.2.3 Purificación de VFA inactivado .....	72
4.2.4 Puesta a punto de un ELISA de bloqueo en fase líquida (LP-ELISA) específico para VFA O1/Campos .....	73
4.2.3 Determinación de anticuerpos séricos totales contra VFA .....	74
4.2.4 Determinación de los perfiles de isotipos IgG1 e IgG2 de Ac específicos contra VFA en bovinos .....	74
4.2.5 Determinación de anticuerpos séricos anti VFA IgM .....	75
4.2.6 Determinación de la avidéz de los anticuerpos anti-VFA .....	76
4.2.7 Producción de VFA O1/Campos en cultivos celulares de BHK-21 .....	76
4.2.8 Determinación de anticuerpos neutralizantes séricos contra VFA .....	77
4.2.9 Extracción de ARN viral de muestras de suero .....	77
4.2.10 Extracción de ARN viral de muestras de linfonódulos .....	78
4.2.11 Amplificación del plásmido estándar (pGEM-T/genoma VFA) para su uso en RT-qPCR .....	78
4.2.12 Detección de ARN viral en muestras de suero o tejido por RT-qPCR .....	79
4.3 Análisis Estadísticos .....	80
5. RESULTADOS .....	82
5.1 Ajuste del protocolo de transferencia pasiva de anticuerpos contra VFA en bovinos .....	83
5.1.1 Sangrado de los bovinos, procesamiento del plasma y transferencia a los terneros .....	83

5.1.2 Evolución de diferentes parámetros serológicos de respuesta humoral anti-VFA adquirida pasivamente .....	84
5.2 Infección por vía oronasal de bovinos naïve transferidos pasivamente con anticuerpos anti-VFA.....	87
5.2.1 Determinación de los signos clínicos .....	88
5.2.2 Detección de ARN viral en muestras de suero por RT-qPCR .....	89
5.2.3 Análisis de la inmunidad de los terneros previo a la infección.....	91
5.2.4 ELISPOT específico para VFA en bovinos .....	93
5.2.5 Determinación de anticuerpos séricos totales contra VFA .....	99
5.2.6 Determinación de anticuerpos séricos por isotipos: IgG1, IgG2 e IgM.....	101
5.2.7 Determinación de la avidéz de los anticuerpos anti-VFA.....	104
6. DISCUSIÓN.....	106
7. CONCLUSIONES.....	118
8. BIBLIOGRAFÍA.....	121

## LISTA DE ABREVIATURAS

**Abs:** Absorbancia

**ABTS:** 2,2'-azino-bis (ácido-3- etilbenzotiazolina-6-sulfónico)

**Ac:** Anticuerpo/s

**AcN:** Anticuerpo/s Neutralizante/s

**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico

**Arg:** Arginina

**ARN:** Ácido Ribonucleico

**Asp:** Aspártico

**BCR:** del inglés *B Cell Receptor* (Receptor de Células B)

**BD:** *Becton, Dickinson y Compañía*

**BEI:** Etilenimina binaria

**BHK:** del inglés *Baby-Hamster Kidney* (riñón de hámster bebé)

**CaCl<sub>2</sub>:** Cloruro de Calcio

**CICUAE:** Comité Institucional del Cuidado y Uso de Animales de Experimentación

**CICUAL:** Comité Institucional del Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio

**CICVyA:** Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas

**CMN:** Célula/s Mononuclear/es

**CNIA:** Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias

**CPA:** Célula/s Presentadora/s de Antígenos

**CSA:** Célula/s Secretora/s de Anticuerpos

**DC:** Célula/s Dendrítica/s

**DE:** Desviación Estándar

**DICT<sub>50%</sub>:** Dosis Infecciosa Media en Cultivo de tejidos

**DLRL<sub>50%</sub>:** Dosis Letal Media en Ratón Lactante

**DO:** Densidad Óptica

**dpi:** Días post-infección

**dpt:** Días post-transferencia

**dpv:** Días post-vacunación

**ELISA:** del inglés *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

**ELISPOT:** del inglés *Enzyme-linked Immunospot*

**FA:** Fiebre Aftosa

**FCV:** Facultad de Ciencias Veterinarias

**Gly:** Glicina

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:** Ácido sulfúrico

**hpt:** Horas post-transferencia

**hr:** Hora

**HRP:** del inglés *Horse Radish Peroxidase* (peroxidasa del rábano)

**IA:** Índice de Avidéz

**IFN:** Interferón

**Ig:** Inmunoglobulina

**INTA:** Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

**IRES:** del inglés *Internal Ribosome Entry Site* (sitio interno de entrada del ribosoma)

**kg:** Kilogramo/s

**LN:** Linfonódulo/s

**LPE:** Linfonódulo/s Preescapular/es

**LP-ELISA:** del inglés *Liquid Phase ELISA* (Elisa en fase líquida)

**LRM:** Linfonódulo/s Retrofaríngeo/s Medial/es

**LTB:** Linfonódulo/s Traqueobronquial/es

**mg:** Miligramo/s

**MHC:** Complejo Mayor de Histocompatibilidad

**min:** Minuto/s

**mL:** Mililitro/s

**MOI:** del inglés *multiplicity of infection* (multiplicidad de infección)

**NaCl:** Cloruro de Sodio

**NaF:** Fluoruro de sodio

**ng:** Nanogramo

**NGS:** del inglés *Next Generation Sequencing* (secuenciación de última generación)

**nm:** Nanómetro

**NSB:** Nivel de Seguridad Biológica

**o/n:** del inglés *overnight*

**OIE:** Organización Mundial de Sanidad Animal

**OPD:** O-fenildiamina

**OVA:** Ovoalbúmina

**PBS:** del inglés *Phosphate Buffered Saline* (solución salina tamponada con fosfato)

**PBST:** del inglés *Phosphate Buffered Saline* (solución salina tamponada con fosfato) y Tween®20

**PCR:** del inglés *Polymerase Chain Reaction* (reacción en cadena de la polimerasa)

**pH:** Potencial Hidrógeno

**PIADC:** Plum Island Animal Disease Center

**RT-qPCR:** del inglés *Real Time*

*Retrotranscription-polymerase chain reaction* (reacción de transcripción reversa seguida de reacción en cadena de la polimerasa)

**rpm:** revoluciones por minuto

**RPMI:** del inglés *Roswell Park Memorial Institute* (medio de cultivos celulares)

**S:** *Svedberg* (unidad para medir coeficiente de sedimentación de una partícula o macromolécula)

**SENASA:** Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria

**SFB:** Suero Fetal Bovino

**SNB:** Suero Normal de Bovino

**SNC:** Suero Normal de Conejo

**SNV:** Seroneutralización viral

**T-D:** Timo Dependiente

**T-I:** Timo Independiente

**TLAB:** Tejido Linfoide Asociado a Bronquios

**TLAI:** Tejido Linfoide Asociado a Intestino

**TLAM:** Tejido Linfoide Asociado a Mucosas

**UTR:** del inglés *Untranslated Region* (región del genoma que no se traduce)

**VFA:** Virus de la Fiebre Aftosa

**µg:** Microgramo

## RESUMEN

La fiebre aftosa (FA) es una enfermedad viral infectocontagiosa de curso agudo que se caracteriza por producir lesiones vesiculares en tejidos de la mucosa oronasal (incluyendo lengua, encías y paladar), ubres, espacios interdigitales y rodetes coronarios de las pezuñas de los animales infectados. Su agente etiológico, el virus de la fiebre aftosa (VFA), es un virus perteneciente a la familia Picornaviridae que afecta a animales biungulados, incluyendo por tanto a bovinos, porcinos, caprinos y ovinos domésticos, junto con numerosas especies silvestres que pueden actuar como reservorios bajo determinadas condiciones ecológicas. La virulencia, el amplio rango de huéspedes, la diversidad de variantes y la alta capacidad infecciosa y de contagio del VFA, explican su presencia y re-emergencia en diversas partes del mundo y la convierten en un problema sanitario de escala global. La enfermedad genera enormes pérdidas económicas a la industria ganadera debido al cierre obligado de los mercados externos y a pérdidas considerables en el mercado interno, asociadas a la disminución de la producción, al sacrificio y al bloqueo del movimiento de animales.

En trabajos previos de nuestro grupo de investigación, se evidenciaron respuestas inmunes de anticuerpos tanto a nivel sistémico como en mucosas, observables luego de la infección con VFA, así como de la vacunación sistémica en bovinos, siendo su ocurrencia, por lo tanto, independiente de la ruta inicial de contacto con el antígeno viral. Dentro de este panorama, la contribución relativa a la inmunidad protectora de los diferentes mecanismos inmunes potencialmente implicados en la respuesta generada, es difícil de discernir. La presente tesis doctoral plantea como hipótesis de trabajo que los anticuerpos sistémicos, administrados mediante la inmunización pasiva de terneros seronegativos para VFA, son capaces de evitar la diseminación del virus luego de la infección por vía aerógena y en ausencia de otros mecanismos inmunes.

Para esto, inicialmente se realizaron una serie de experimentos donde se ajustaron las condiciones para la inmunización pasiva contra el VFA en terneros. En estos procedimientos se utilizaron plasmas de bovinos vacunados con formulaciones tetravalentes comerciales anti-aftosa de serie. Los mismos fueron reunidos en una sola fracción y diferentes volúmenes de esta preparación fueron transferidos a terneros seronegativos. Una vez realizado el procedimiento, se midieron diversos parámetros de inmunidad humoral específicos contra el VFA, entre las 0 h y los 30 días post-transferencia. A partir de estos resultados, se determinó el volumen de plasma requerido para llevar a cabo la inmunización pasiva, así como los protocolos de administración y

los tiempos adecuados para realizar las infecciones posteriores en los animales pasivamente inmunizados.

Para el segundo experimento, se utilizaron vacunas monovalentes de la cepa O1/Campos de alta carga antigénica, con las que se inmunizaron bovinos seronegativos (n=8). Se obtuvo plasma de cuatro de estos animales a los 7 días post-vacunación (dpv) y a los 26 dpv en los cuatro restantes. Así se conformaron dos *pools* de plasma inmunes (7 y 26 dpv) que diferían tanto en la composición isotípica de las inmunoglobulinas, así como en los títulos de anticuerpos totales y neutralizantes anti-VFA. En el caso del *pool* de plasma de 7 dpv el isotipo predominante detectado fue la IgM y el título de anticuerpos neutralizantes fue 1,6; mientras que para el *pool* de 26 dpv, se detectaron ambos subtipos de IgG (1 y 2) y niveles menores de IgM, con un título de anticuerpos neutralizantes de 2,7. Los animales pasivamente inmunizados se infectaron por vía oronasal y estos resultados se compararon con los obtenidos en animales vacunados e infectados a los mismos tiempos post-vacunación (7 y 26 dpv).

Nuestros resultados demostraron que los anticuerpos circulantes previenen la generalización de la fiebre aftosa solo en el caso de los animales pasivamente inmunizados con plasma de 26 dpv, ya que los animales que recibieron el plasma de 7 dpv mostraron signos clínicos de la enfermedad luego de la infección aerógena. Esto indicaría que, en ausencia de otros mecanismos inmunitarios adaptativos preexistentes, los anticuerpos circulantes en sangre efectivamente son capaces de evitar el desarrollo de la enfermedad, aunque existe un umbral de título de anticuerpos por debajo del cual se desencadena la enfermedad luego de la infección oronasal.

Para el caso de los animales vacunados, se obtuvo una protección total de los mismos, tanto en los infectados a los 7 como a los 26 dpv. Esto ocurrió aun cuando el animal vacunado 7 días antes de la infección presentaba, al momento del desafío, niveles de anticuerpos sistémicos neutralizantes similares a los de los animales inmunizados pasivamente con plasma de 7 dpv y que mostraron signos clínicos de fiebre aftosa post-infección. El estudio de las respuestas de anticuerpos post-infección, tanto a nivel sistémico como en mucosas respiratorias, indicó que la vacunación promovió la generación de una respuesta de anticuerpos rápida tras la exposición al virus, presentando la misma un perfil de respuesta de tipo secundaria. En ambos casos, los infectados a los 7 dpv o a los 26 dpv, mostraron rápidos cambios de los isotipos predominantes de las inmunoglobulinas VFA-específicas, así como un aumento de los títulos de anticuerpos y de la avidéz en los sueros obtenidos post-infección. Interesantemente, estas observaciones se verificaron tanto a nivel sistémico como local, en linfonódulos drenantes del tracto respiratorio.

En conjunto estos resultados indican que los anticuerpos circulantes pueden ser suficientes para evitar la generalización de la enfermedad en bovinos infectados por la vía oronasal, aun en

ausencia de otros mecanismos activos de inmunidad específica. A su vez, la caracterización de las respuestas de anticuerpos posteriores al desafío, tanto a nivel sistémico como local, reveló que la inmunización sistémica con vacunas convencionales anti-aftosa promovió rápidamente un aumento del título de anticuerpos, así como de la avidéz de los sueros inmunes y la modificación en los isotipos en las inmunoglobulinas predominantes, todos cambios asociables a respuestas anamnésicas contra el virus. Se resalta el carácter protector de que estos procesos frente al establecimiento de la enfermedad, y el hecho que los mismos se verificaron en tiempos muy cercanos a la vacunación (7 dpv) y aun cuando la infección aerógena se realizó en presencia de títulos bajos de anticuerpos neutralizantes.



## SUMMARY

Foot-and-mouth disease (FMD) is an acute infectious viral disease characterized by producing vesicular lesions in tissues of the oronasal mucosa (including the tongue and palate), udders, interdigital spaces and coronary runners of the hooves of infected animals. Its etiological agent, the foot-and-mouth disease virus (FMDV), is a virus belonging to the Picornaviridae family that affects cloven-hoofed animals, including cattle, pigs, goats and domestic sheep, along with numerous wild species that can act as reservoirs under certain ecological conditions. The virulence, the wide range of hosts, the diversity of variants and the high infectious and contagious capacity of FMDV, explain their presence and re-emergence in various parts of the world and make it a sanitary problem of scale global. The disease generates enormous economic losses to the livestock industry due to the forced closure of external markets and considerable losses in the domestic market, associated with the reduction of production, slaughter, and blockage of animal movement.

Previous results of our laboratory described the onset of the mucosal and systemic immunity in cattle not only after FMDV aerosol infection but also after systemic vaccination, showing that the response is independent of the initial route of contact with the virus. Despite this, the contribution of each immune mechanism implicated in the immune response is not clear yet. The present work is based on the hypothesis that the systemic antibodies circulating after a passive immunization in cattle are sufficient to prevent disease generalization after oronasal infection and in absence of additional immune mechanisms.

To this end, a series of experiments were initially carried out to adjust the conditions for the passive immunization against FMD in seronegative calves. In these procedures, calves sera from cattle vaccinated with commercial tetravalent formulations were used. From these results, the volume of serum required to make the passive immunization was determined, as well as the administration protocols and the time available to perform the subsequent infections in the passively immunized animals.

For the final experiment, naïve animals (n=8) received one dose of a single-oil-emulsion monovalent vaccine containing FMDV O1/Campos strain. We used two different preparations of FMDV- specific immune serum, obtained at 7 and 26 days post-vaccination (dpv), differing therefore in the immunoglobulin isotype composition and seroneutralization titers. Serum 7 dpv pool had a titer of neutralizing antibodies of 1.6 and the isotype predominantly on its composition was IgM, while titer of serum 26 dpv pool was 2.7 and both subtypes- IgG1 and IgG2- were detected in the pool and in less concentration IgM. After passive immunization, animals were

infected by oronasal infection with FMDV O1C strain and these results were compared with animals infected 7 and 26 days after vaccination.

Our results demonstrated that systemic antibodies were enough to prevent the disease generalization only in the case of animals transferred with serum 26 dpv, since animals transferred with serum 7 dpv showed clinical symptoms of the disease after oronasal infection. This might suggest that in absence of other preexisting adaptive immune mechanisms, circulating antibodies are able to prevent the progress of the disease despite there is a threshold titer of antibodies below which the disease is triggered after oronasal infection.

Animals infected after vaccination were all protected, including the animal vaccinated and infected 7 dpv even though when the neutralizing antibody titers were similar to those of the animals passively immunized with serum 7 dpv and which showed clinical symptoms after oronasal infection. The study of post-infection antibody responses, both systemic and mucosal, indicated that vaccination promoted the generation of a rapid antibody response after exposure to the virus, presenting a secondary response profile. In both cases, those infected at 7 dpv or at 26 dpv showed rapid changes of the predominant isotype of the FMDV-specific immunoglobulins, as well as an increase in antibody titers and avidity in sera obtained post-infection. Interestingly, these observations were verified both at the systemic and local level, in draining lymph nodes of the respiratory tract.

Overall, these results indicate that circulating antibodies may be sufficient to prevent the generalization of the disease in bovines infected by the oronasal route, even in the absence of other active mechanisms of specific immunity. In turn, the characterization of post-challenge antibody responses, both at systemic and local level, revealed that systemic immunization with conventional anti-FMDV vaccines rapidly promoted increases in antibody titers and avidity of the immune serum, accompanied by a change of the isotype profile towards the IgG1 subclass, all changes associated with anamnestic responses against the virus. Interestingly, such protective responses occurred very early after vaccination (7 dpv) and even when the aerogenic infection was performed in the presence of low titers of FMDV-neutralizing antibodies.

# 1. INTRODUCCIÓN

---

---

## **1.1 La fiebre aftosa**

### 1.1.1 Breve reseña histórica de la enfermedad

Las primeras menciones sobre la enfermedad en la literatura se encontraron en el año 1514 en un cuaderno del médico italiano Hieronymi Fracastorius (Wright, 1930), donde describe una enfermedad del ganado con signos similares a los de la fiebre aftosa (FA). A partir de esa fecha, pueden encontrarse varias menciones sobre la enfermedad en la bibliografía (Thalmann & Nöckler, 2001). Durante la segunda mitad del siglo XIX, producto del desarrollo de nuevas rutas de transporte y del incremento del comercio de animales (O'Rourke & Jeffrey G. Williamson, 2000), la enfermedad comenzó a cobrar mayor importancia y provocar pérdidas económicas considerables. Durante 1897 se creó en Alemania una comisión para establecer medidas de control contra la enfermedad. Un año después, Loeffler y Frosch, describieron en un reporte que el agente causante de la FA no era una bacteria ni una toxina conocida al momento, ya que al tomar muestras del fluido del interior de las vesículas de los bovinos infectados y filtrarlas con los filtros usados normalmente para bacterias, se encontraron con que el agente causal de la enfermedad era lo suficientemente pequeño como para no quedar retenido en el filtro y no podía ser visto por ningún microscopio. De esta forma, describieron al virus de la fiebre aftosa (VFA) como el primer virus animal (Loeffler & Frosch, 1898).

Desde el descubrimiento de Fracastorius, la FA ocurrió en casi todos los países del mundo a excepción de Groenlandia, Islandia, Nueva Zelanda y las pequeñas islas de Oceanía. Esto dio lugar al establecimiento de numerosos institutos con el objetivo de investigar distintos métodos de control de la enfermedad: en 1910 se creó el primer instituto de investigación sobre FA en Alemania, seguido por otros en distintas partes del mundo como el laboratorio de Pirbright en Reino Unido creado en el año 1924, el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (PanAftosa) ubicado en Brasil y creado en el año 1951 y el PIADC (Plum Island Animal Disease Center) en el año 1953 en Estados Unidos, entre otros (M. M. J. Grubman & Baxt, 2004). En nuestro país, el INTA crea en el año 1956 el Instituto de Fiebre Aftosa, que luego se convertiría en el Instituto de Virología de INTA Castelar.

Los primeros años de investigación se vieron afectados por la falta de un modelo animal experimental apropiado, habiéndose probado en rata, ratón y conejo sin éxito (Mahy, 2005). En el año 1920, Waldmann y Pape demostraron que los cobayos eran susceptibles a la enfermedad mediante inoculación intradérmica (Fred Brown, 2003) proveyendo así un modelo muy importante para su estudio. Junto con el desarrollo posterior de un sistema de cultivo celular in vitro, que

permitió estudiar las propiedades físicas y químicas de este virus, se logró describir por completo la estructura tridimensional del virión en el año 1989.

Estados Unidos sufrió el primer brote en el año 1870 y el último en 1930, a partir del cual se establecieron restricciones severas en la importación de ganado susceptible, carne fresca y productos animales provenientes de países afectados por la FA para lograr erradicar la enfermedad (Bachrach, 1968). Durante los años 1946 a 1953, la enfermedad fue epizootica en México y de no haber sido por las campañas de control y erradicación establecidas, la enfermedad se hubiera diseminado hacia los Estados Unidos generando nuevos brotes (A R Samuel & Knowles, 2001). A comienzos de los años '50, varios países de Europa Occidental también se encontraban sufriendo numerosos brotes de FA y en ese entonces, las medidas de control consistían en la restricción del movimiento de animales y el sacrificio de los que estaban infectados. A partir del desarrollo de Frenkel de un método de producción de VFA por infección del epitelio de la lengua de bovinos sanos sacrificados (Frenkel & Ribelin, 1956) y con el posterior descubrimiento de la capacidad del virus de replicar en células de riñón de hámster bebé (BHK-21), se logró desarrollar una vacuna comercial anti-VFA (Brooksby, 1982).

La implementación de políticas de vacunación en distintas regiones del mundo a partir de mitad del siglo XX, hizo posible la erradicación de la enfermedad en algunas regiones incluyendo América del Norte, el este de Europa y algunas partes de Asia (Fayna Diaz-San Segundo, Medina, Stenfeldt, Arzt, & de los Santos, 2017). Como resultado de las exitosas campañas de vacunación en Europa y el consecuente cese de los brotes a partir del año 1989, en 1992 se adoptó una política de no vacunación en el continente (F. Brown, 1992) y fue declarado libre de la enfermedad en el año 1997. En la misma época, se comenzó con políticas de control de la enfermedad en América del Sur y hacia fines del año 1990 Argentina, Chile, Uruguay y parte de Brasil, fueron reconocidos como países libres de FA sin vacunación.

Sin embargo, como consecuencia de la ausencia de vacunación y la presencia del agente infeccioso aun con baja circulación, con el tiempo comenzaron a aparecer nuevos focos de la enfermedad en países donde ya había sido erradicada. En 1997 hubo un brote devastador en Taiwán luego de 68 años sin presencia de la enfermedad, donde se perdieron aproximadamente 6 billones de dólares (Yang, Chu, Chung, & Sung, 1999)(Yang et al., 1999) y se sacrificaron 4 millones de cerdos; hacia fines de 1999 hubo un nuevo brote en Taiwán y una serie de brotes en el este de Asia y Sudáfrica y en el año 2001, luego de 20 años sin presencia de la enfermedad (M. M. J. Grubman & Baxt, 2004), hubo un brote en Reino Unido que tuvo un costo estimado de 6000 millones de euros (Alan R. Samuel & Knowles, 2001). A este brote le siguió otro ocurrido en el año 2007 debido a un escape viral en un laboratorio ubicado en Inglaterra, posiblemente

ocurrido a través de las tuberías de drenaje de las instalaciones, lo que contaminó el suelo circundante y luego fue trasladado hacia granjas cercanas mediante vehículos contaminados (Chairman, 2008). En el año 2010 se registró un nuevo brote en Japón y en el 2011 en Corea del Sur, China, Hong Kong, Bulgaria y en América del Sur en Paraguay (Brito, Rodriguez, Hammond, Pinto, & Perez, 2017). Durante el año 2013 se registró un brote en Venezuela y se detectó la presencia del serotipo O en Egipto, Turquía, Arabia Saudita y Libia. En el 2017 el serotipo A fue detectado en Birmania (Sudeste Asiático) así como en Argelia y Túnez, siendo el serotipo detectado un nuevo linaje para esta zona de África (A/África/G-IV). Por último, durante el presente año, se informaron brotes de FA en Colombia relacionados con la situación endémica que se vive en Venezuela y un nuevo brote del serotipo O en Argelia (King et al., 2018).

Estos antecedentes dan una pauta de la vigencia de la enfermedad desde su descubrimiento hasta la actualidad, así como de los graves perjuicios socio-económicos asociados a secuencias de brotes y reemergencias que han afectado tanto países desarrollados como en vías de desarrollo. En las siguientes secciones, se describirán en más detalle algunos de estos aspectos a nivel mundial y en nuestro país.

### 1.1.2 Importancia sanitario-económica y distribución geográfica

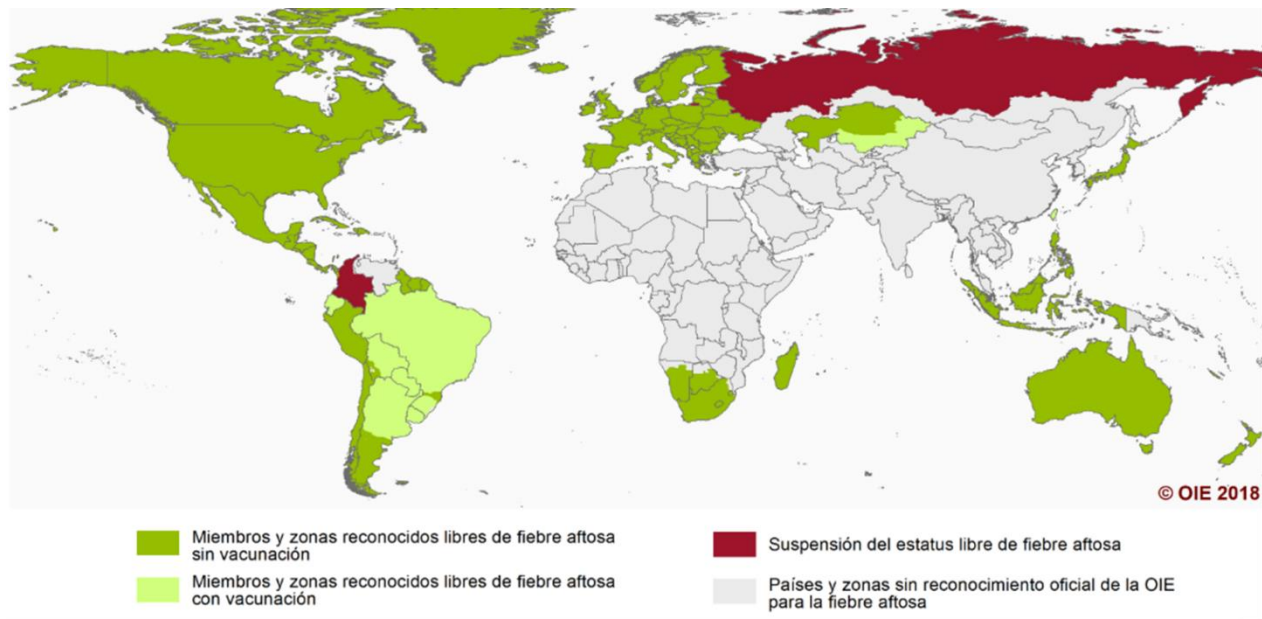
La FA es reconocida como la enfermedad del ganado que causa los mayores perjuicios económicos para la actividad ganadera, sus industrias asociadas y cadenas derivadas a nivel mundial (Perry & Rich, 2007). La enfermedad afecta a especies de pezuña hendida incluyendo por lo tanto a bovinos, caprinos, porcinos, y ovinos domésticos, junto con más de 70 especies silvestres que pueden actuar como reservorios bajo determinadas condiciones ecológicas (S. Alexandersen, Zhang, Donaldson, & Garland, 2003). Aunque los casos mortales se restringen por lo general a los animales jóvenes, la alta transmisibilidad y morbilidad registradas en los animales adultos durante las incursiones de la enfermedad, generan enormes pérdidas económicas a la industria ganadera debido al cierre obligado de los mercados externos y a pérdidas en el mercado interno, asociadas a la disminución de la producción, al sacrificio y al bloqueo de movimiento de animales.

Las potencialmente devastadoras consecuencias económicas, sociales y ambientales de la enfermedad han sido dramáticamente demostradas durante las últimas dos décadas por una serie de brotes reportados en países libres de FA, tanto desarrollados como en vías de desarrollo (Muroga et al., 2012; Perez, Ward, & Carpenter, 2004; Thompson et al., 2002). La reducción de

la productividad de carne y leche que genera la enfermedad, puede llegar a disminuir el rendimiento económico en hasta un 25%. A estos factores se le suman además los altos costos implicados en la implementación de medidas de control y erradicación, tales como la vigilancia y trazabilidad del ganado potencialmente infectado o expuesto, el sacrificio de los animales infectados, la eliminación adecuada de los mismos, la cuarentena estricta y el control del movimiento tanto del ganado como de equipos, vehículos y en algunos casos la vacunación estratégica en anillo.

La FA también impacta en los pequeños productores de las regiones donde el virus es endémico. Generalmente, tanto los pequeños como grandes productores porcinos y ganaderos productores de leche, son los más afectados durante los brotes viéndose directamente afectada la producción nacional. En Kenia por ejemplo, los pequeños productores representan el 70% de la producción de leche del país (Knight-Jones, McLaws, & Rushton, 2017). El impacto varía según la intensidad de la producción: los pequeños productores bovinos generalmente comercializan el ganado cuando necesitan del dinero, por lo que la pérdida de peso de los animales a corto plazo no les genera un problema mayor, en contraste con los sistemas más comerciales en los cuales las demoras en el tiempo de los animales para alcanzar el peso adecuado suponen grandes pérdidas en las ganancias. Así es como en los campos donde la productividad y comercialización es alta, el impacto de un brote de FA es grande, mientras que en los lugares donde la productividad ya es baja de por sí, el brote tiene un impacto menor aunque puede volverse significativo en el caso de animales crónicamente infectados (Knight-Jones et al., 2017). La FA no afecta única y directamente a la agricultura del país afectado por el brote, sino también a las industrias que proveen a los agricultores, las industrias alimenticias y el turismo del lugar.

Como ya se mencionó anteriormente, la FA ha ocurrido en casi todo el mundo a excepción de Groenlandia, Islandia, Nueva Zelanda y las pequeñas islas de Oceanía. La enfermedad es endémica en varias partes de Asia y en gran parte de África. En América del Sur la mayoría de los países son reconocidos libres de FA con o sin vacunación, y la enfermedad sigue siendo endémica solo en ciertos países o regiones dentro de determinados países. La actividad productiva ganadera en Argentina en particular, ha sufrido en numerosas ocasiones las consecuencias de la aparición de la FA. En la figura 1 puede verse la distribución de la enfermedad y el estatus otorgado por la OIE a los diferentes países miembros en la actualidad. A pesar de las grandes extensiones de territorio que son declaradas libres de la enfermedad, es importante remarcar que más del 60% del ganado a nivel mundial se encuentra en zonas endémicas para la FA.



**Figura 1: Mapa del estatus oficial de FA de los miembros de la OIE.** Situación actualizada en octubre de 2018. Pueden diferenciarse por colores las zonas libres de FA con y sin vacunación, así como también las zonas donde actualmente está suspendido el estatus de “libre de FA”. Los países en gris no cuentan con el reconocimiento oficial de la OIE. Figurada extraída de la página web oficial de la OIE.

### 1.1.3 Historia y control de la fiebre aftosa en Argentina

La FA tiene una larga historia en el territorio argentino y en toda Sudamérica, ya que desde finales del siglo XIX se ha mantenido como enfermedad endémica en alguno de los países de la región. Los primeros registros de la enfermedad datan de la segunda mitad del siglo XIX, con casos registrados en la provincia de Buenos Aires, posiblemente como resultado de la introducción del virus por parte de inmigrantes ganaderos europeos que se asentaron con sus rodeos, los cuáles incluían animales infectados (A R Samuel & Knowles, 2001). Este hecho también explicaría la conexión genética existente entre los virus de Europa y Sudamérica. En los Anales de la Sociedad Rural Argentina del año 1870 se informa que los doctores Wilke y Douglas habían diagnosticado la enfermedad en San José de Flores y Lomas de Zamora, brotes que dieron lugar a una pandemia que se extendió en un año a Uruguay (Goié M., 1989). En 1882 José Hernández, autor del Martín Fierro, escribe “Introducción del estanciero” y allí se indica que en los años 1865 y 1866 se observaron focos en el norte y noroeste de la provincia de Buenos Aires de lo que él describe como enfermedad de las “llagas” (Bedotti, Rodríguez, & Inta, 2012).



Ya en el siglo XX, durante la década del '50, se realizaron pruebas piloto para desarrollar programas de vacunación obligatoria con una vacuna hidroxisaponinada en la región denominada endémica y a partir de los años 60 la modalidad se extendió a todo el territorio, aunque con efectividad limitada. En el año 1988 los países de la región firmaron el Programa Hemisférico de Erradicación de FA (PHEFA), con la participación de la Organización Panamericana de la Salud, dependiente de la Organización Mundial de la Salud ([www.paho.org](http://www.paho.org)). La implementación de este Programa trajo notables efectos beneficiosos, ya que los casos de FA a lo largo del continente fueron reduciéndose notablemente, disminuyendo de un promedio de 766 casos por año en América del Sur a comienzos de los '90, a 130 casos por año hacia finales de la década (Correa Melo, Saraiva, & Astudillo, 2002).

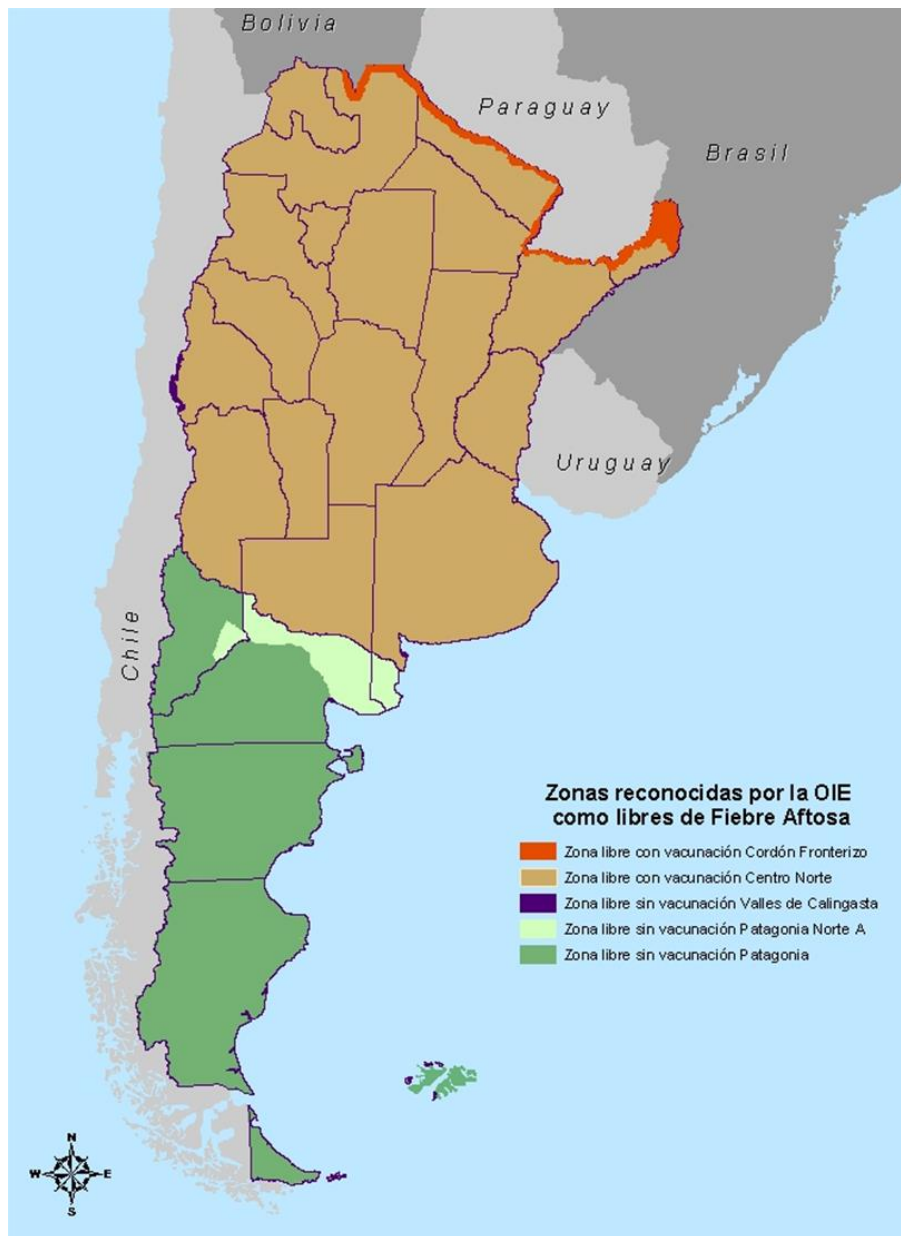
En consonancia con las políticas regionales, la Argentina pudo organizar una nueva campaña de vacunación en el año 1990 y en el marco de la aplicación de un nuevo plan de erradicación. Esta campaña incluyó la vacunación de todos los bovinos con una vacuna oleosa de alta inmunogenicidad, en cuyo desarrollo trabajó activamente el INTA, y permitió cortar la circulación del virus en el campo. A partir de este plan se logró progresar hacia una condición que se juzgó suficiente para interrumpir la vacunación y obtener en mayo de 2000 el reconocimiento de la OIE de "País libre de FA sin vacunación". Sin embargo, al suspenderse la vacunación se abandonó la principal estrategia para cortar la circulación viral, tal es el mantenimiento de altos niveles de inmunidad poblacional. De igual manera, tampoco se tuvo en cuenta la situación regional y geográfica del país, con fronteras en el norte que no representaban barreras suficientes contra una posible reintroducción. Como consecuencia de tales decisiones, hacia finales del año 2000 se inició una epidemia que se extendió hasta enero de 2002 con un total de 2563 focos en 15 provincias y un costo estimado de 1.700 millones de dólares sólo en pérdidas directas por el cierre de mercados externos (König, Palma, Maradei, & Piccone, 2007).

Esto hizo necesario el diseño e implementación de un nuevo plan de erradicación que comenzó a aplicarse en el año 2001. Laboratorios del SENASA, el CONICET y el INTA, estuvieron a cargo del trabajo de caracterización de los virus circulantes, así como del diseño de la estrategia vacunal, en lo que respecta a la formulación de la vacuna tanto como en la implementación del plan, en conjunto con la única productora de vacunas anti-aftosa en funcionamiento en ese momento, Biogénesis Bagó S.A. (Mattion et al., 2004). Este plan consistió en la vacunación sistemática, obligatoria y universal de los bovinos con una vacuna de alta calidad, acompañado por un control adecuado del mantenimiento de la cadena de frío de la misma. Además, se aseguró el control del movimiento de animales de la mano de un sistema eficaz de identificación de los bovinos y una adecuada vigilancia epidemiológica con atención

tanto de denuncias como de muestreos serológicos y con la participación activa de los productores como parte ejecutora de las políticas delineadas a nivel nacional por el SENASA. La nueva formulación, incluía una de las cepas que circuló en el campo durante los brotes del año 2001 (A/Arg/2001) y contra la cual las cepas vacunales presentes en las formulaciones previas, no generaban protección.

Como el territorio ubicado al Sur del Paralelo 42° se mantuvo indemne durante la epidemia, confirmando que las condiciones naturales, así como el patrón de movimientos de la zona no permitieron la dispersión de la enfermedad, se la delimitó y resguardó con la implementación de una importante barrera sanitaria: una zona de vigilancia denominada Patagonia Norte B (sin vacunación) y una zona “buffer” denominada Patagonia Norte A, con vacunación. Consecuentemente, esta región al sur del paralelo de 42° ha sido reconocida por la OIE como Zona libre sin vacunación desde mayo del año 2002.

El plan que se ejecutó resultó exitoso y permitió la interrupción de la circulación viral para la población bovina. Como consecuencia, luego del periodo sin aparición de nuevos brotes establecido en la reglamentación (12 meses), se solicitó a la OIE el reconocimiento del territorio ubicado al norte del paralelo 42° como “Zona libre de FA con vacunación”, otorgado en el año 2003. En agosto de ese mismo año, se detecta la ocurrencia de un único foco en una localidad de la provincia de Salta ubicada a 40 Km de la frontera que hizo que este estatus fuera suspendido, para volver a recuperarse en enero de 2005. A su vez, en el año 2004, se delimitó un “cordón fronterizo” de 25 Km de ancho contra las fronteras de Bolivia y Paraguay comprendiendo territorios de las provincias de Salta, Formosa, Corrientes y Misiones, donde se vacunaron de emergencia a todos los animales de las especies susceptibles, con una revacunación con 30 días de intervalo. En febrero de 2006 se registraron dos focos en la provincia de Corrientes por lo que se declaró la emergencia sanitaria y se realizaron todas las actividades necesarias para el control y erradicación, para lograr restituir la condición de “zona libre con vacunación” en el año 2007, con excepción de una zona definida como de alta vigilancia, de aproximadamente 15 km de ancho, contra la frontera con Bolivia y Paraguay. En febrero de 2011 la OIE declaró “zona libre con vacunación” a la zona de alta vigilancia denominada Cordón Fronterizo y en mayo de 2014, se agregó a la “zona libre sin vacunación” al área comprendida entre los ríos Colorado y Negro, denominada por SENASA como Patagonia Norte A (Figura 2).



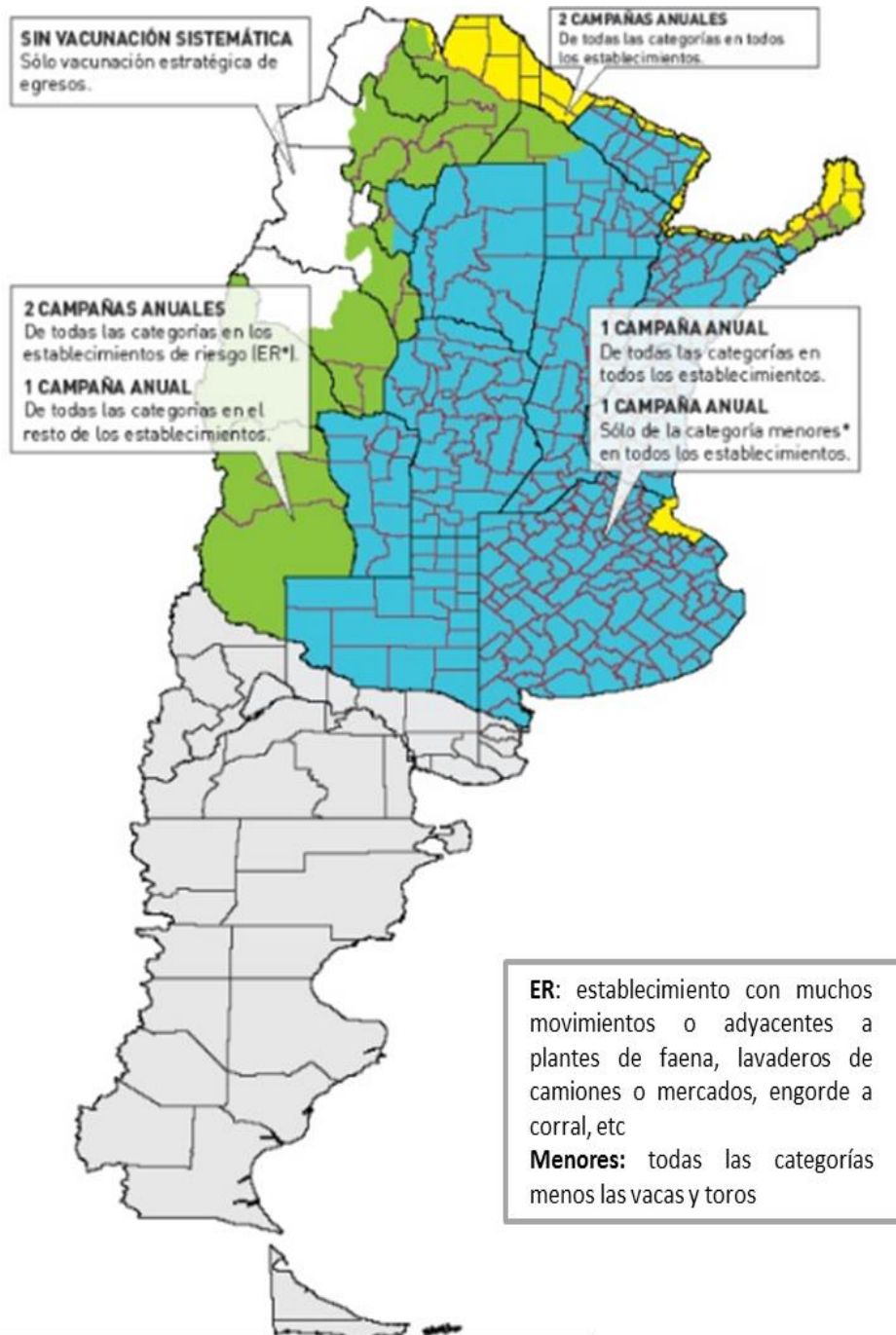
**Figura 2: Distribución de las zonas reconocidas como libres de FA.** Estatus sanitario actual respecto a la fiebre aftosa en la República Argentina de acuerdo al reconocimiento de la OIE.

Hasta el año 2010 las campañas de vacunación se realizaban dos veces por año en bovinos y bubalinos, momento en el cual se consideró que ya se había adquirido una sólida inmunización de la población tras haber transcurrido 19 campañas de vacunación sistemática. A partir de

entonces, se procedió a realizar una campaña anual de todas las categorías etarias y una campaña anual en la que se exceptúan las vacas y toros mayores de 2 años. Así, en la gran mayoría del territorio con vacunación obligatoria, los animales menores son vacunados dos veces al año mientras que los mayores de 2 años, sólo una vez (Figura 3).

La totalidad de las series de vacunas producidas en el país son controladas por la Coordinación General de Laboratorio Animal dependiente de la Dirección de Laboratorios y Control Técnico (Dilacot) del SENASA, acorde a las recomendaciones del *Manual de Pruebas Diagnósticas y Vacunas para Animales Terrestres* de la OIE. Argentina cuenta con tres laboratorios habilitados para elaborar vacunas anti-aftosa con capacidad de producción suficiente para atender la demanda de vacunas de todo el país.

La vacuna que se utiliza actualmente es una vacuna tetravalente que contiene las cepas O1 Campos/Brazil/58 (O1/Campos), A24 Cruzeiro/Brazil/55 (A24/Cruzeiro), A Argentina/2001 (A/Arg/01) y C3 Indaial/Brazil/71 (C3 Indaial), y se administra en dosis de 2 mL/animal. La misma se formula con adyuvante oleoso y saponina, lo que confiere larga inmunidad, y se utiliza etilenimina binaria (BEI), un inactivante de primer orden, que garantiza la completa inactivación del virus. En las siguientes secciones se tratarán con mayor detalle diversos aspectos de las vacunas anti-aftosa disponibles en la actualidad, así como de las nuevas vacunas que se encuentran en proceso de desarrollo.



**Figura 3: Distribución de las campañas de vacunación anti-aftosa en las zonas reconocidas como libres de FA con vacunación.** Organización de las campañas de vacunación de acuerdo a la población vacunada y a la estacionalidad de las vacunaciones.

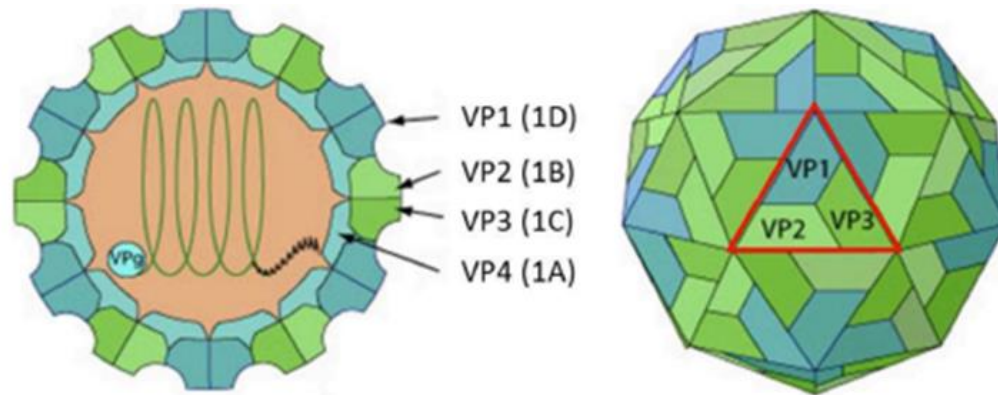
---

## **1.2 El virus de la fiebre aftosa**

### 1.2.1 Taxonomía y estructura del virus

El virus de la fiebre aftosa (VFA), agente etiológico de la FA, es el único miembro del género *aphthovirus* dentro de la familia *Picornaviridae*. Los picornavirus componen una familia que incluye varios virus patógenos tanto para el hombre como para los animales y que consta de 9 géneros: enterovirus, rinovirus, cardiovirus, aftovirus, hepatovirus, parechovirus, erbovirus, kobuvirus y teschovirus (Lefkowitz E.J, Jorgensen J.H, Pfaller M.A, 2015). La diferencia entre los géneros se estableció por sus propiedades fisicoquímicas tales como la estabilidad al pH, el coeficiente de sedimentación y la densidad de flotación en cloruro de cesio (Racaniello V.R., 2007).

El VFA comparte una organización básica similar a la de los otros miembros de la familia. El virión contiene una cadena simple de ARN de aproximadamente 8.500 nucleótidos y de polaridad positiva, que se encuentra encapsidada dentro de una partícula de naturaleza proteica y forma icosaédrica, sin envoltura lipídica y de aproximadamente 25-30 nm (M. M. J. Grubman & Baxt, 2004). Estudios cristalográficos permitieron dilucidar la resolución atómica tridimensional de la estructura de varios VFA aislados y variantes antigénicas (Acharya et al., 1989). Las partículas virales están compuestas por 60 copias de cada una de las cuatro proteínas estructurales que forman la cápside (VP1, VP2, VP3 y VP4), siendo las tres primeras externas y VP4 interna, estableciendo contacto con el ARN genómico. Copias únicas de cada una de estas proteínas se agrupan para formar un protómero, 5 protómeros se agrupan formando un pentámero, denominado subunidad 12S y que constituye cada una de las caras del icosaedro, y 12 pentámeros constituyen la cara externa de la partícula viral (Figura 4). El virión contiene además, una o dos copias de dos proteínas minoritarias: VP0, precursor de VP2 y VP4 (Forss, Strebel, Beck, & Schaller, 1984) y la polimerasa viral 3D (J. F. Newman et al., 1994).



**Figura 4: Organización estructural de la cápside del VFA.** Vista interna (izquierda) y externa (derecha). Cada protómero (resaltado en rojo en la vista de la derecha) consta de 4 proteínas estructurales (VP1 a VP4) y se muestra entre paréntesis el nombre del gen correspondiente. Cada cápside está compuesta por 60 unidades de protómeros. Adaptado de Gasteiger y col. (Gasteiger et al., 2003).

Las proteínas estructurales de la cápside comparten una estructura consistente de ocho cadenas con estructura barril  $\beta$ . Las cadenas  $\beta$  están unidas por bucles que incluyen determinantes antigénicos (epítopes de las células B) involucrados en la neutralización del virus por los anticuerpos del huésped.

El virión intacto tiene un coeficiente de sedimentación de 146S y una alta densidad en cloruro de cesio ( $\approx 1.44 \text{ g/cm}^3$ ). Como el virus carece de cubierta lipídica, no es sensible a solventes como el cloroformo y el fenol (van Vlijmen, Curry, Schaefer, & Karplus, 1998) pero si es relativamente sensible a distintos estímulos físicos y químicos, por lo que las interacciones entre las subunidades de la cápside son fundamentales para proveerle la estabilidad necesaria bajo condiciones ambientales desnaturalizantes (Ellard, Drew, Blakemore, Stuart, & King, 1999). Sin embargo, es necesario también que la cápside sea lo suficientemente inestable para permitir la liberación intracelular del ARN viral durante la infección. El VFA es inestable a pH ácido por lo que la partícula 146S es fácilmente dissociable por tratamiento a pH apenas por debajo de la neutralidad (Yuan et al., 2017) en subunidades virales 12S (Rueckert & Wimmer, 1984) que corresponden a los pentámeros VP1, VP2 y VP3 y un precipitado insoluble que contiene VP4 (Burroughs, Rowlands, Sangar, Talbot, & Brown, 1971). El ARN genómico está también involucrado en la desestabilización de la cápside (Yuan et al., 2017), por lo que el ensamblaje y la estabilidad de la misma dependen de una variedad de interacciones entre las subunidades de la cápside, que comprenden re-arreglos estructurales desencadenados por la interacción entre residuos aminoacídicos sensibles al pH con otros residuos de la misma, y el ácido nucleico.

---

Existen reportes de que la cápside vacía es más estable al pH ácido que la homóloga con ARN en un rango de pH de 0,5 (Curry et al., 1995) aunque, por otro lado, es menos termoestable (Curry et al., 1997).

A temperaturas moderadas, la tasa de inactivación del virión es mucho mayor que la de disociación (Mateo, Luna, Rincón, & Mateu, 2008). La exposición del virus a 56°C durante 30 minutos es suficiente para inactivarlo, aunque se han descrito algunas diferencias en la resistencia entre cepas (Doel & Baccarini, 1981). Por encima de los 30°C la cápside se disocia en las subunidades pentaméricas (12S) mientras que a temperatura ambiente puede mantener su infectividad de 8 a 10 semanas, y de 4 a 7 días a temperaturas alrededor de los 37°C. Mateo y col. demostraron que la disociación del virus en una unidad logarítmica ocurre en aproximadamente 20 horas a 42°C, y entre 30 y 40 días a 4°C (Mateo et al., 2008), aunque un cambio en el aminoácido ubicado en la posición 65 de la proteína VP2 (de alanina a histidina) hace que ocurra luego de 60 horas a 42°C y de varios meses a 4°C (Hegde, Maddur, Rao, Kaveri, & Bayry, 2009). Por otro lado, el virión inactivado para la formulación vacunal puede ser mantenido a -80°C generalmente por 1 a 2 años sin que pierda su infectividad.

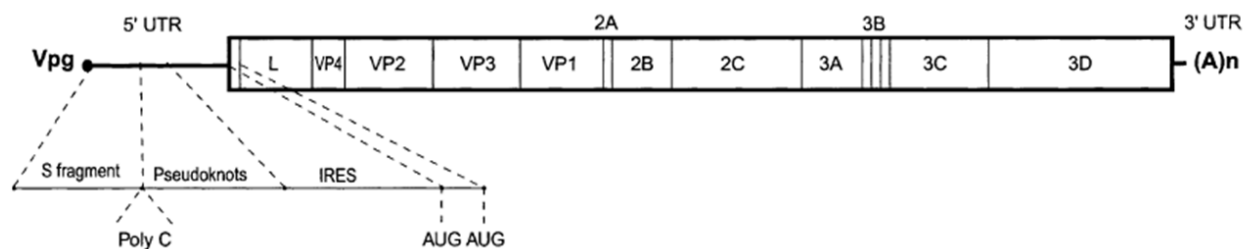
### 1.2.2 Organización del genoma

El ARN del VFA posee una secuencia de poli-adeninas (poliA) en su extremo 3' y una pequeña proteína, denominada VPg, asociada a su extremo 5' (Figura 5). El genoma puede ser dividido en 3 regiones funcionales principales: i) la región regulatoria no codificante 5', ii) la región codificante de proteínas (subdividida en L/P1, P2 y P3) y iii) la región regulatoria no codificante 3'. La región no codificante 5' incluye el fragmento S, altamente estructurado y de aproximadamente 370 residuos, seguido por un tramo de poliribocitidilato (poli C) de longitud variable (entre 100 y 400 residuos), y el sitio interno de entrada del ribosoma (IRES) de aproximadamente 440 residuos. El sitio IRES sirve para el inicio de la síntesis de proteínas, la cual puede comenzar en dos codones AUG funcionales y en marcos de lectura distintos, separados por 80 nucleótidos que delimitan un único marco de lectura abierto (ORF) que codifica para una poliproteína de 2.330 aminoácidos.

Se han observado diferencias en las longitudes de las regiones codificantes y no codificantes entre aislados naturales de VFA y a veces incluso en virus con distintos pasajes en cultivos celulares. Debido a la posibilidad de doble iniciación en la síntesis proteica, existen dos tipos de proteasas L las cual tienen un rol fundamental en la virulencia del VFA: ambas catalizan su propio



clivaje del resto de la poliproteína así como también el clivaje de eIF- 4G del complejo CAP contribuyendo a detener la síntesis de las proteínas del huésped (Domingo, Baranowski, Escarmís, & Sobrino, 2002). La región P1 codifica las 4 proteínas de la cápside icosaédrica VP1, VP2, VP3 y VP4 (Rueckert & Wimmer, 1984), mientras que las regiones P2 y P3 codifican proteínas no estructurales involucradas en la replicación del genoma viral y la maduración del virus. El sitio más antigénico en todos los serotipos está localizado dentro de una región variable de VP1 y las variaciones que ocurren dentro de esta región han impedido el desarrollo de vacunas que proporcione protección cruzada entre serotipos (Brehm, Kumar, Thulke, & Haas, 2008). Por otra parte, aún se desconocen varias de las funciones de muchas de las proteínas no estructurales, aunque algunas de las proteínas homólogas en poliovirus han sido estudiadas en mayor detalle. La proteína 3C es una serín proteasa que cataliza la mayoría de los clivajes necesarios para el procesamiento de la poliproteína, la proteína 2C está involucrada en la síntesis del ARN y es el sitio donde ocurren las mutaciones que le brindan al VFA resistencia al cloruro de guanidino y la región 3B codifica para tres copias de la proteína VPg, unida covalentemente al extremo 5' del genoma (Figura 5). La proteína 3D es la ARN polimerasa-dependiente de ARN que presenta una baja fidelidad de copiado durante la replicación (Domingo et al., 2002). La misma tiene un 34% de homología de secuencia con la polimerasa 3D de poliovirus, una enzima cuya estructura tridimensional ha sido descrita por cristalografía de rayos X (Hansen, Long, & Schultz, 1997). Al final del ORF se encuentra una región 3'UTR de 90 residuos, compuesta de dos "stem-loops" y una cola poliA, siendo esta una región de interacción con proteínas virales y del huésped para la replicación del ARN (Belsham, 1993).



**Figura 5: Esquema del genoma del VFA.** Las regiones no codificantes 5' y 3' están indicadas con líneas horizontales y algunas subregiones dentro de la región 5' UTR fueron ampliadas. El genoma viral está esquematizado como una caja rectangular donde se indican los distintos genes virales y sus proteínas derivadas: L a 3D. Vpg es la proteína covalentemente unida al extremo 5' y  $(A)_n$  es la cola poliadenilada en el extremo 3'. Adaptado de Domingo y col. (Domingo et al., 2002).

---

### 1.2.3 Filogenia y variabilidad antigénica del VFA

Los aislados de VFA recolectados durante el siglo XX fueron agrupados en 7 tipos serológicos distintos, basados en la falta de protección cruzada entre cepas luego de una infección o vacunación: A, O, C, SAT 1, SAT 2, SAT 3 y Asia 1. La distribución de los mismos en las regiones endémicas no es uniforme: 6 de los 7 serotipos se han reportado en África (A, O, C y SAT 1-3), 4 en Asia (A, O, C y Asia 1) y solamente 3 en América del Sur (A, O y C). El serotipo C no ha sido reportado desde el brote de 2004 en África (Knight-Jones et al., 2016). Los virus que presentaban una protección cruzada parcial, fueron asignados dentro del mismo serotipo pero distinto subtipo (Domingo et al., 2002) y de esta forma se definieron alrededor de 65 subtipos. Hace 20 años, con el uso creciente de anticuerpos monoclonales, se descubrió que cada aislado podía ser considerado como una variante antigénica (Martinez et al., 1988; M G Mateu et al., 1988).

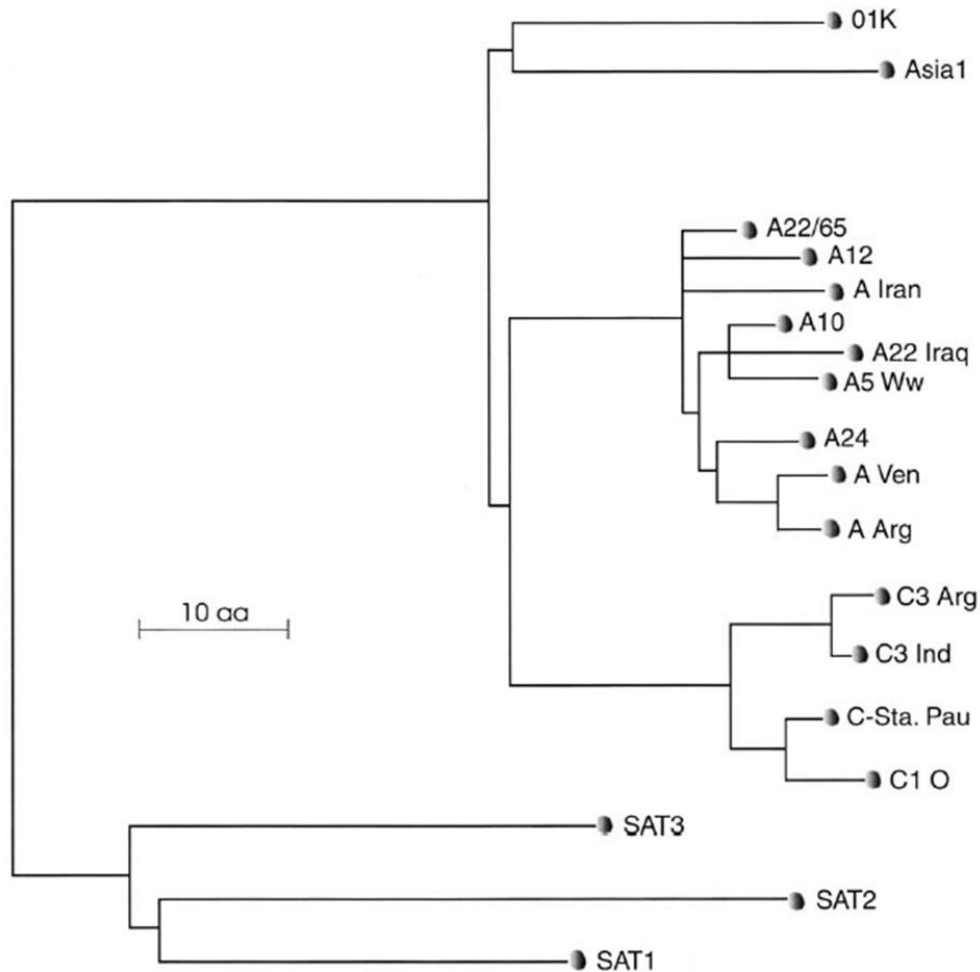
La diversidad antigénica que existe para este virus es una consecuencia directa de la variación genética. Los métodos filogenéticos para clasificar los aislados de VFA han ido reemplazando los agrupamientos tradicionales basados en criterios serológicos (Figura 6). En principio, estos métodos se basaron en la amplificación de ARN viral de los aislados por RT-PCR y la secuenciación de regiones genómicas específicas para las proteínas estructurales, en especial la VP1 (Martinez et al., 1988; Francisco Sobrino et al., 2001). En la actualidad, se utiliza tanto la secuenciación del genoma completo por los métodos tradicionales (Sanger) como la secuenciación de última generación o *next generation sequencing* (NGS) lo que ha permitido identificar variantes del genoma en una determinada población viral e identificar posibles mecanismos evolutivos relacionados a ellas (Lasecka-Dykes et al., 2018).

Cuatro de los sitios antigénicos más importantes han sido identificados combinando técnicas inmunológicas, genéticas y bioquímicas. Existe un sitio con particular interés inmunológico que se encuentra ubicado dentro del bucle G-H de la proteína VP1. Este bucle consiste en una lámina plegada  $\beta$  que precede al motivo RGD (tripéptido Arg-Gly-Asp), el cual adopta una conformación abierta, seguido de una región helicoidal en el extremo carboxilo del motivo RGD (Domingo et al., 2002). La exposición y movilidad de este bucle contribuyen a la inmunogenicidad del virus adoptando diferentes posiciones sobre la superficie de la cápside cuando se encuentra unido a diferentes anticuerpos. Por su parte, el motivo RGD cumple funciones tanto en el reconocimiento de integrinas que sirven como receptores celulares para el virus, como en la unión con los anticuerpos (Baranowski, Ruiz-Jarabo, & Domingo, 2001; Mauricio G. Mateu, 1995). Este motivo es crítico dentro de varios epítopes involucrados en la neutralización del VFA que han sido mapeados dentro del bucle. La superposición entre sitios antigénicos y sitios de reconocimiento

de receptores, permite la co-evolución de las propiedades antigénicas y el tropismo celular del huésped, lo cual es relevante en los virus ARN altamente variables ya que favorece la adaptación del virus. El gran potencial del VFA para evolucionar rápidamente y la gran diversidad antigénica que presenta, dificultan el diagnóstico, la prevención y el control de la enfermedad.

La transmisión del virus de un animal infectado a un huésped susceptible da inicio a una nueva ronda de eventos evolucionarios. Esta evolución intra-huésped es esencialmente el resultado de un crecimiento diferencial de las subpoblaciones mutantes de VFA. Sucesivas rondas de evolución dentro del huésped y la transmisión de la misma dentro de la naturaleza, desencadena una divergencia sucesiva del VFA. Estudios serológicos han demostrado que los diferentes serotipos virales tienen una alta variabilidad principalmente entre los residuos 135-155 de la proteína VP1, siendo este uno de los sitios más antigénicos del virus.

Las tasas de evolución de VFA en la naturaleza varían con el tiempo y pueden ir desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-4}$  sustituciones por nucleótido por año (F. Sobrino & Domingo, 2001).



**Figura 6: Relaciones filogenéticas entre aislados de VFA de 7 serotipos.** Las relaciones fueron basadas en las secuencias de aminoácidos de la proteína VP1. Los segmentos indican una distancia de 10 aminoácidos y las esferas en el extremo de cada rama indican que cada aislado viral es en realidad un conjunto de mutantes. Adoptado de Domingo y col. (Domingo et al., 2002).

## 1.3 Patogenia a nivel celular y en hospedadores

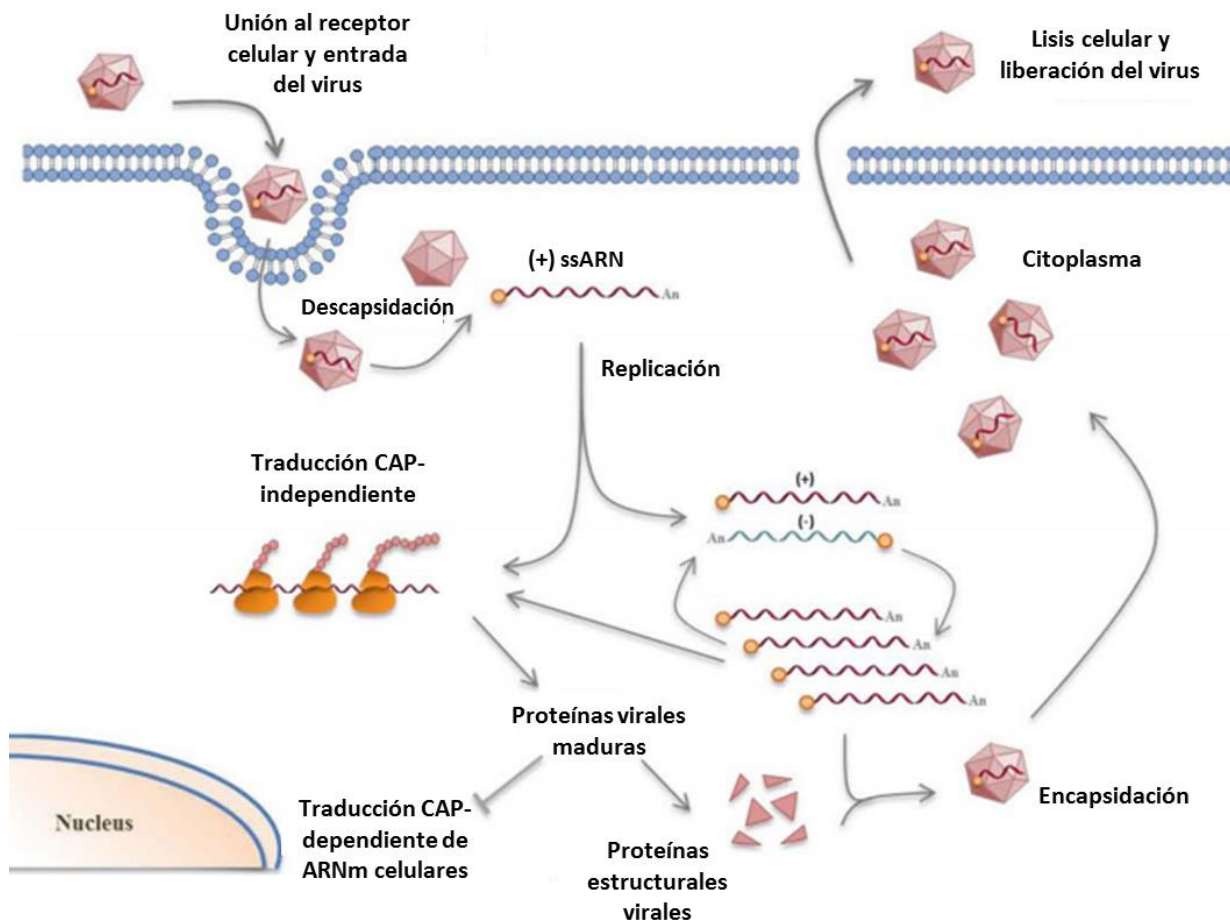
### 1.3.1 Patogenia celular del virus

El VFA es un patógeno exitoso en gran parte porque posee mecanismos que le permiten evadir la respuesta inmune innata pudiéndose multiplicar lo suficientemente rápido para ser transmitido a nuevos hospedadores antes de que el animal infectado desarrolle respuestas

---

adaptativas eficientes (Rodríguez Pulido & Sáiz, 2017; Toka & Golde, 2013). El mecanismo molecular por el cual se inicia la infección, a nivel de interacción entre proteínas estructurales del virus con receptores celulares del huésped, se cree que se basa en la adhesión del motivo RGD de la proteína estructural VP1 presente en la cápside viral con las integrinas de superficie de las células blanco (Berinstein, Roivainen, Hovi, Mason, & Baxt, 1995; Mason, Rieder, & Baxt, 1994). En algunos cultivos celulares sin embargo, las interacciones entre el virus y las células se da mediante una porción alterada de la proteína VP3 que se une a motivos de heparina en la superficie celular (Fry et al., 1999; Sa-Carvalho et al., 1997). En el caso de los bovinos, las integrinas  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$  y  $\alpha_v\beta_6$  actúan como receptores virales (Jackson et al., 1997; Jackson, Sheppard, Denyer, Blakemore, & King, 2000; Neff, Mason, & Baxt, 2000).

Al igual que otros picornavirus, el VFA presenta un ciclo de infección corto. En cultivos celulares los viriones nuevos comienzan a detectarse entre las 4 y 6 h post-infección (hpi), dependiendo de la multiplicidad de infección. El virus es citolítico y las células afectadas presentan alteraciones morfológicas que incluyen redondeamiento celular y alteración de la distribución de membranas celulares internas, lo que constituye el denominado efecto citopático (ECP) (Racaniello V.R., 2007). Luego de la adhesión del virus al receptor celular, tiene lugar la replicación viral la cual se da completamente en el citoplasma celular. La decapsidación del VFA ocurre con la acidificación de los endosomas celulares lo que provoca que la cápside se disocie en subunidades pentaméricas, permitiendo la liberación del genoma dentro de la célula huésped. Una vez que el ARN viral se libera en el citoplasma, es traducido para producir las proteínas virales esenciales para la replicación y producción de nuevas partículas virales. El primer paso de la replicación consiste en copiar la cadena positiva de ARN para formar un intermediario de polaridad negativa que es utilizado para producir nuevas hebras positivas mediante la ARN polimerasa- dependiente de ARN viral (Figura 7). Estos eventos ocurren dentro de los denominados complejos de replicación, que son pequeñas vesículas derivadas de membranas que son inducidas por varias proteínas virales. Como se explicó en la sección 1.2.2, a medida que se van produciendo las proteínas estructurales la proteína 3C las cliva y se van formando los protómeros. El inicio de la encapsidación depende de la concentración citoplasmática de proteínas virales y el tiempo requerido para un ciclo completo de replicación viral varía entre 5 y 10 horas. La variación del mismo depende de la cepa viral, el pH celular, la temperatura y la multiplicidad de infección, entre otros factores. Las partículas virales completas a menudo forman cristales en las células infectadas y son luego liberadas cuando la célula pierde su integridad y se rompe (Racaniello V.R., 2007).



**Figura 7: Ciclo viral del VFA.** El ciclo de replicación completo ocurre dentro del citoplasma de la célula huésped. El ARN viral contiene toda la información necesaria para tomar el control de la maquinaria celular e inducir la detención de la síntesis de macromoléculas del huésped. La replicación del ARN es llevada a cabo por la polimerasa 3D dependiente de ARN que transcribe el ARN de cadena positiva en una molécula de ARN de cadena negativa complementaria. Luego, la polimerasa 3D genera múltiples ARN de cadena positiva que entran en una nueva ronda de traducción y replicación o bien son empaquetadas por las proteínas de la cápside para formar nuevas partículas virales que finalmente son liberadas por la lisis celular. Adaptado de Rodríguez Pulido y col. (Rodríguez Pulido & Sáiz, 2017).

### 1.3.2 Patogenia en especies susceptibles

La patogenia del virus varía para cada especie susceptible (Alexandersen, S y Mowat N, 2005, host range and pathogenesis) y también con el serotipo y cepa viral. En términos generales, se sabe que los cerdos son menos susceptibles que los bovinos y ovinos a la infección por vías

aerógenas, precisando dosis infectivas 1.000 veces mayores para la infección. Sin embargo, son más sensibles a la infección por vía oral y excretan 3.000 veces más partículas virales que los rumiantes.

La infección con VFA por vía natural de animales susceptibles, puede ocurrir mediante contacto directo, tanto con animales infectados como con sus secreciones y/o excreciones, o indirecto a través de vehículos o personal contaminado con el virus, ocurriendo la entrada del mismo a través de cortes o abrasiones en las mucosas de los animales. Otra vía de contagio es a través de aerosoles naturales de animales infectados que contienen partículas infecciosas de distinto tamaño que se depositan en el tracto respiratorio de los animales receptores (S. Alexandersen, Zhang, et al., 2003).

Las infecciones experimentales basadas en la transmisión viral por contacto directo, tienen la desventaja de no permitir el control de la dosis ni el momento exacto de la infección. Además, la eficiencia de transmisión depende tanto de la cepa viral utilizada, como de las condiciones de contacto e interacción entre animales (J. M. Pacheco et al., 2012). Se han realizado estudios de transmisión por contacto entre animales de la misma especie, incluyendo bovinos (Howey et al., 2012) y cerdos (J. M. Pacheco et al., 2012) así como también entre animales de distinta especie (cerdos a bovinos o viceversa, (J. M. Pacheco et al., 2016). También pueden realizarse infecciones experimentales mediante instilación nasal e inyección intraepitelial en la lengua (mal llamado intradermolingual). Las dosis que deben usarse durante la infección por instilación son mucho mayores que las usadas en una infección mediante aerosol, alrededor de  $10^4$  o  $10^5$  TCID<sub>50%</sub> para bovinos y ovinos siendo la vía de entrada del virus a través de la faringe (McVicar & Suttmoller, 1976). Para el caso de la infección por vía intraepitelial, el virus alcanza regiones de la lengua en bovinos, las bandas coronarias de las patas en ovejas y los bulbos del talón en cerdos. Aunque este método provee de un modelo altamente reproducible y consistente, tiene la desventaja de que traspasa la barrera de mucosa natural del huésped.

La infección experimental en bovinos mediante la técnica de aerosol controlado (J. M. Pacheco, Arzt, & Rodriguez, 2010), a diferencia de las técnicas antes expuestas, permite mantener las características de una infección natural en cuanto a la vía de entrada y distribución anatómica de las partículas virales por el tracto respiratorio del bovino, logrando a su vez la cuantificación precisa del inóculo infeccioso y la determinación exacta del momento de infección. La inoculación por aerosol, como se detalla más adelante en la sección de materiales y métodos, genera partículas pequeñas que se distribuyen a lo largo del tracto respiratorio superior e inferior (Hess, Fisher, Williams, Pooler, & Kacmarek, 1996).

Recientemente se ha descrito otro método de inoculación por vía intranasofaríngea (INP) que simula también la vía de entrada natural del virus. El mismo consiste en la deposición directa en la nasofaringe del bovino de 2 mL de un inóculo de VFA conteniendo entre  $10^6$  y  $10^7$  unidades infecciosas, permitiendo por lo tanto, un control de la dosis de desafío y la participación de las defensas naturales del animal en el sitio primario de la infección (J. M. M. Pacheco, Stenfeldt, Rodriguez, & Arzt, 2016).

El período de incubación en cualquier enfermedad infecciosa se define como el intervalo de tiempo entre la exposición frente a una dosis infectiva y la aparición de los primeros signos clínicos. En el caso de la FA, este período es altamente variable y depende tanto de la cepa como de la dosis viral, la vía de transmisión y la especie animal. El período de incubación puede variar de 2 a 14 días (Garland, A.J.M and Donaldson, 1990), y puede ser tan corto como 24 horas para el caso de cerdos dependiendo las condiciones del desafío.

Luego de ocurrida la infección, los bovinos generalmente presentan fiebre y desarrollan lesiones en la lengua, almohadilla dental, encías, paladar blando, nariz o morro. Las vesículas en la lengua a menudo coalescen, se rompen con rapidez, producen dolor y el animal se rehúsa a comer. Es común también la salivación excesiva y la descarga nasal. Los animales afectados se vuelven letárgicos, pueden perder rápidamente el estado y tener disminuciones graves, graduales o repentinas en la producción de leche. Las lesiones de la pezuña ocurren en el área de la banda coronaria y el espacio interdigital y causan renuencia a levantarse, o temblor de las patas. Los terneros jóvenes pueden morir de insuficiencia cardiaca, sin desarrollar vesículas.

En el caso de los cerdos, las lesiones más graves ocurren generalmente en las patas. Los primeros síntomas pueden ser cojera y decoloración de la piel alrededor de las bandas coronarias. Las vesículas se desarrollan en la banda coronaria del talón y en el espacio interdigital, y las lesiones pueden volverse tan dolorosas que los cerdos se arrastran en lugar de caminar. Las lesiones en otros sitios son menos comunes y de menor gravedad, pudiéndose desarrollar vesículas en el hocico o la ubre, así como sobre el corvejón o codos si los cerdos se echan en pisos de concreto áspero. Las lesiones de la boca son generalmente pequeñas y menos aparentes que en los bovinos, y el babeo es poco frecuente. Los cerdos afectados pueden tener también una disminución del apetito, volverse letárgicos y tender a agruparse. Pueden presentar fiebre, pero el aumento de la temperatura suele ser corto o inconsistente.

Por su parte, la FA tiende a ser leve en ovejas y cabras, con síntomas clínicos leves que dificultan su diagnóstico (Cox, Barnett, Dani, & Salt, 1999; Hughes et al., 2002) los cuales incluyen fiebre y cojera de leve a severa, vesículas en la fisura interdigital y en los bulbos del talón y la



banda coronaria, y rara vez en los pezones, vulva o prepucio. Hasta un 25% de las ovejas infectadas permanecen asintomáticas y un 20% tienen lesiones en un sólo sitio.

En los bovinos la entrada del virus es por vía aerógena. Luego de ocurrida la infección, el virus muestra una fase de replicación primaria en faringe y luego en tejido alveolar, conocida como etapa pre-virémica (hasta 24 hpi), seguida de una fase virémica febril y aguda (entre 4 y 5 días post-infección) con replicación en epitelios de boca, lengua, patas y ubres (J. M. Pacheco et al., 2010). La aparición y ruptura de vesículas con virus en alta concentración, dificultan la alimentación y movimientos del animal, disminuyendo su peso y rendimiento productivo, con riesgo de infecciones secundarias. Los bovinos comienzan su recuperación a partir de la semana y entre un 15% a 50% de los animales infectados pueden permanecer como persistentemente infectados entre 30 días hasta 2 años (Eschbaumer et al., 2016; Stenfeldt et al., 2016). El virus persistiría asociado a células dendríticas foliculares de ganglios linfáticos que drenan los sitios primarios de replicación y/o en tejido epitelial de la nasofaringe de los animales infectados (Juleff et al., 2008).

La infección en bovinos genera una inmunidad adaptativa sistémica que previene la reinfección con virus de la misma cepa (Doel, 2005), pero no protege contra una nueva reinfección con otra e incluso contra distintas cepas dentro de un mismo serotipo (S. Alexandersen, Zhang, et al., 2003). Dado que los animales infectados excretan en sus secreciones respiratorias grandes cantidades de partículas virales, esta es la vía de transmisión más importante ya que combina la posibilidad de transmisión por cercanía de los animales y, también posible, aunque en menor medida, la transmisión a largas distancias.

Entre los rumiantes, el control de la FA se ve complicado por la aparición de animales persistentes o *carriers*, los cuales presentan una infección subclínica (S. Alexandersen, Zhang, et al., 2003; Stenfeldt et al., 2016). Estos animales pueden excretar virus infeccioso en el fluido esofágico-faríngeo (OPF) a tiempos posteriores a los 28 dpi (OIE, 2012), aunque trabajos más recientes sugieren que la divergencia existente entre animales que logran superar la infección y aquellos que se mantienen persistentemente infectados, ocurre a tiempos más tempranos (Stenfeldt & Belsham, 2012; Stenfeldt et al., 2016). El virus persistente ha sido localizado en células epiteliales especializadas de la nasofaringe bovina (Stenfeldt et al., 2016) o asociado a tejido linfoide (Juleff et al., 2008). Los perfiles serológicos de los bovinos *carriers* y de los que lograron superar la infección son indistinguibles entre ellos (Stenfeldt et al., 2016; Stenfeldt, Heegaard, Stockmarr, Tjørnehøj, & Belsham, 2011), aunque generalmente se puede identificar a los *carriers* por recolección de virus infeccioso del OPF. A pesar de que el significado del estado de *carriers* en bovinos continúa siendo controversial, la existencia de una fase subclínica

prolongada de infección ha influenciado drásticamente en las políticas de control de la enfermedad (Sutmoller & Casas, 2002).

## **1.4 La vacuna anti-aftosa**

### 1.4.1 Sus métodos de producción y control

Los primeros intentos de producir vacunas anti-VFA comenzaron a principios del siglo XX, cuando en 1927 Belin describió sus experimentos con virus atenuado. Sin embargo, su uso se vio limitado por el potencial riesgo de producir una diseminación de virus al ganado no vacunado. Finalmente, la primera vacuna inactivada fue desarrollada por Waldman y col. en 1937 usando virus extraído del epitelio y del fluido vesicular de la lengua de bovinos infectados inactivado con formaldehído en presencia de gel de hidróxido de aluminio, el cual funcionada como adyuvante a la vez que facilitaba la inactivación.

Al trabajo de Waldman, le continuó el trabajo de Frenkel (1947), quien utilizó epitelio de la lengua de bovinos sanos sacrificados para realizar cultivos *in vitro* que infectó posteriormente con VFA, procedimiento que se utilizó por muchos años para la producción de la vacuna. El hecho de usar epitelio de la lengua tenía la desventaja de la logística que implicaba obtener suficiente material para todo el proceso y mantener la esterilidad durante el mismo. Es por esto, que Mowat y Chapman (1962) adoptaron la línea celular BHK-21 clon 13, obtenida a partir de riñón de hámster bebé y previamente desarrollada por MacPherson y Stoker en 1962, para usarla en la producción y titulación de VFA. Actualmente, la mayoría de las vacunas se producen de esta forma.

La inactivación con formaldehído fue aceptada por muchos años, hasta que se tomó conciencia del riesgo de contaminación con virus vivo y se comenzó a utilizar etilenimina binaria (BEI), siendo hoy en día el proceso de inactivación más ampliamente usado. La etilenimina binaria constituye un inactivante de primer orden, es decir que presenta una cinética de inactivación constante representada por una línea de regresión recta, que permite predecir el tiempo necesario para alcanzar una inactivación completa.

Las vacunas comerciales vigentes contienen partículas virales completas (146S) inactivadas como antígeno y son formuladas en adyuvantes oleosos o acuosos (Doel, 2003). Su uso ha sido exitoso en el control de la enfermedad en diferentes regiones del mundo, incluida Europa y grandes regiones de América del Sur. Tal lo mencionado en la sección 1.1.3, la vacunación es la

principal herramienta de prevención de la FA y se utiliza rutinariamente como medida de control en Argentina y en otras regiones de Sudamérica y del mundo, reconocidas por la OIE como libres de la enfermedad (Saraiva & Darsie, 2004).

La vacuna se administra de forma intramuscular en porcinos, ovinos, caprinos y bovinos. En estos últimos, la vacuna se aplica en la tabla del cuello y la vacunación con vacunas de alta potencia ( $> 6 \text{ PD}_{50}/\text{dosis}$ ) puede conferir protección a tiempos tan tempranos como 4 dpv (Golde et al., 2005). Como ya se mencionó anteriormente, debido a la gran variabilidad antigénica que presenta el VFA, la vacunación contra un serotipo específico no confiere protección contra otro distinto, y puede incluso no generarla contra otros subtipos dentro del mismo serotipo (Cartwright, Chapman, & Sharpe, 1982; Paton et al., 2005).

En nuestro país más del 90% de las vacunas que se comercializan, se producen por cultivo de células BHK en suspensión debido a su elevada susceptibilidad frente a la infección por el virus y a que permiten la obtención a gran escala de antígeno homogéneo y de alta calidad. La producción de antígenos y vacunas se lleva a cabo en condiciones que cumplen con las normas de "buenas prácticas de manufactura" (GMP) y en condiciones de biocontención con seguridad biológica de nivel 4 (NSB-4OIE) que disminuyen los posibles riesgos de escape viral de la planta de producción (Doel, 2003).

Las cepas de virus incluidas en la vacuna son seleccionadas por su alta cobertura antigénica y su relación con las cepas actuantes en el campo. Además de las cepas de referencia en Sudamérica O1 Campos/Brazil/58 (O1/Campos) y A24 Cruzeiro/Brazil/55 (A24/Cruzeiro), se incluye la cepa de campo de tipo A actuantes en la Argentina A Argentina/2001 (A/Arg/01) que fue adoptada como cepa vacunal después de estudios antigénicos y genómicos (Mattion et al., 2004), junto con la cepa C3 Indaial/Brazil/71 (C3/Indaial). Todas las cepas vacunales son entregadas por SENASA y son previamente controladas para asegurar que estén libres de agentes patógenos y adventicios. Con estas cepas se elaboran stocks de "semillas de virus", que se conservan a  $-80^{\circ}\text{C}$  para mantener sus características.

Para la producción de virus, las células BHK-21 en suspensión cultivadas en tanques, se infectan con la semilla de virus y se permite la replicación viral por un período de 12 a 24 horas. A medida que las células son lisadas producto de la infección, el VFA se libera al medio para luego clarificarse en sistemas de centrifugación continua y filtración tangencial, de forma de retirar restos celulares y proteínas liberadas luego de la lisis celular. Posteriormente, el antígeno es sometido a inactivación química con el objetivo de eliminar su capacidad infectiva, pero manteniendo las propiedades inmunogénicas del virus. Dicho proceso se realiza como ya se mencionó anteriormente, mediante un primer agregado del inactivante BEI (Bahnmann, 1975)

que garantiza la completa inactivación del virus. El proceso se monitorea por cinética de inactivación y se asegura de manera absoluta la ausencia de virus infectante mediante la inoculación de células susceptibles. Adicionalmente se realizan controles de contenido antigénico para verificar que la integridad estructural de los virus producidos no haya sufrido deterioro durante el proceso. A continuación, el antígeno se purifica y concentra mediante el uso de polietilenglicol (PEG), que permite la obtención de virus libre de sustancias remanentes del proceso de producción y que además concentra el antígeno, lo que hace más práctica su conservación, manejo y posterior formulación según la necesidad de contenido antigénico correspondiente a cada cepa. Durante los últimos años, se han desarrollado nuevas estrategias de purificación y concentración de las partículas virales luego de su cosecha en los tanques de producción. En particular, aquellas basadas en métodos de cromatografía de exclusión de tamaño han avanzado hasta hacer posible su uso a escala industrial (Spitteler et al., 2011). Finalmente, para la formulación de la vacuna, los antígenos se emulsifican con la fase oleosa, compuesta de aceites minerales y emulsificantes que le confieren baja viscosidad. Antes de envasarla en condiciones de esterilidad, se realizan ciertos controles establecidos, que incluyen controles bacteriológicos (la vacuna deberá estar libre de bacterias y hongos viables), controles físico-químicos y de inocuidad, para conservarse a una temperatura entre 4°C y 8°C. Dentro de este rango de temperatura, la vacuna es estable durante 1-2 años, aunque es lábil a temperaturas superiores y nunca debe congelarse.

Una vez producida, los lotes de vacuna anti-aftosa son controlados por SENASA antes de su comercialización, donde se incluyen controles de esterilidad, inocuidad (para verificar la ausencia de VFA activo), seguridad (pruebas in vivo para demostrar la no toxicidad de la vacuna) y bioquímicos. Adicionalmente, pueden realizarse controles de identidad antigénica para demostrar que las cepas incluidas son las permitidas en el país, y en todos los casos se realizan pruebas para medir capacidad inmunogénica de la vacuna.

En caso de que la vacuna sea un nuevo registro para un producto que sale por primera vez al mercado, se realizan las pruebas de potencia por infección experimental con una o más cepas vacunales del VFA infectivas en bovinos inmunizados con las vacunas a evaluar 90 días antes del desafío. Para la prueba se utilizan 16 bovinos adultos vacunados y 2 controles sin vacunar. La aprobación de la vacuna ocurre si al menos 12 de los 16 animales no muestran síntomas de generalización de la enfermedad (ampollas en las extremidades) luego de los 7 dpi. Para los casos de vacunas ya registradas, pero sobre las que se produjeron nuevos lotes, los controles consisten en la evaluación serológica de los títulos de anticuerpos generados contra las cepas vacunales a los 60 dpv. Esta evaluación se realiza mediante ensayos de ELISA en fase líquida,

para los cuales existen curvas que correlacionan los títulos de anticuerpos con el nivel de protección, expresado como expectativa porcentual de protección (EPP). En este caso, el nivel promedio de título de anticuerpos específicos contra el VFA debe corresponder a una EPP mayor o igual al 75 (Maradei et al., 2008).

#### 1.4.2 Nuevas vacunas contra VFA

Dentro de las desventajas de la vacuna actualmente utilizada, se encuentran el hecho de que sea necesario mantener la cadena de frío de la misma, revacunar a los animales para asegurar el control de la enfermedad y realizar un proceso de purificación para asegurar que esté libre de proteínas no estructurales. Además, existe la posibilidad de una descarga de virus vivo o inadecuadamente inactivado que pudiera provocar un brote (Cottam et al., 2008) así como también el hecho de que las vacunas inactivadas son incapaces de producir inmunidad estéril y por lo tanto, puede ocurrir replicación viral en los epitelios de los animales vacunados dando origen a animales *carriers* (Soren Alexandersen, Zhang, & Donaldson, 2002) capaces de transmitir la enfermedad a animales sanos (Dawe et al., 1994).

Debido a estas limitantes, durante los últimos años se trabajó en el desarrollo de nuevas vacunas, con la idea de lograr formulaciones más eficientes y seguras que las actuales. Dentro de las modificaciones que deberían presentar estas nuevas vacunas se encuentra el hecho de incluir tanto los epítopes B como T de distintas cepas para producir una amplia respuesta humoral y celular, capaz de demorar e idealmente eliminar una posible selección de VFA mutantes en el campo con una resistencia a la inmunidad generada por la vacuna. Además, deberían generar tanto inmunidad sistémica como en mucosas, con la esperanza de que esta última minimice las chances de que se establezcan animales *carriers* y deberían también, evitar la manipulación de virus debido al peligro de un posible escape (Domingo et al., 2002).

Teniendo en cuenta estos factores, distintos grupos a nivel mundial han trabajado sobre diferentes estrategias (Cao, Lu, & Liu, 2016; Fayna Diaz-San Segundo et al., 2017) que incluyen : i) vacunas atenuadas por ingeniería genética que reducen los riesgos de un escape viral o de una inactivación incompleta; ii) vacunas con cápsides completas recombinantes inactivadas con mayor termoestabilidad y obtenidas por ingeniería genética (Park et al., 2016), ya que como se mencionó anteriormente uno de los problemas que limita la eficacia de la vacuna actual es el hecho de que los viriones son termolábiles y las temperaturas elevadas inducen su disociación a pentámeros disminuyendo la inmunogenicidad y requiriendo por lo tanto una cadena de frío; iii)

vacunas producidas con proteínas recombinantes y péptidos sintéticos, tanto lineales como ramificados (dendriméricos), que contienen el bucle G-H de la proteína VP1 y sus secuencias flanqueantes junto con epitopes T, propios o foráneos, habiéndose probado su efectividad en cerdos y en bovinos (Cubillos et al., 2008; Soria et al., 2017; C. Y. Wang et al., 2002); iv) vacunas vectorizadas por adenovirus humanos (Ad5) no replicantes, que fueron extensamente evaluadas en cerdo y bovino (Fayna Diaz-San Segundo et al., 2016; Fernandez-Sainz et al., 2017), y que ya están licenciadas su producción en EE.UU.; y por último, iv) vacunas producidas con cápsides vacías (VLPs), que presentan propiedades antigénicas e inmunológicas similares al virus completo pero no son infecciosas ya que no tienen ARN viral y pueden ser sintetizadas y ensambladas fuera de las áreas de alta biocontención en diferentes sistemas de expresión como baculovirus en células de insecto, en células de mamífero (Mignaqui et al., 2013) a través de plásmidos y vectores de poxvirus y adenovirus, o en sistemas bacterianos (Xiao et al., 2016).

## **1.5 Inmunidad contra el VFA**

### 1.5.1 Inmunidad adaptativa: linfocitos B y anticuerpos

La respuesta inmune presenta dos componentes principales: la respuesta innata y la adaptativa. La inmunidad innata aporta la primera línea de defensa frente a un desafío inmunológico, desencadenando una amplia y rápida respuesta. La inmunidad adaptativa en cambio, representa una respuesta antígeno (Ag)-específica con capacidad de desarrollar memoria inmunológica, siendo sus componentes principales los linfocitos T y B, las células presentadoras de antígenos (CPA) y las células efectoras. Los linfocitos son las únicas células del cuerpo capaces de reconocer diversos determinantes antigénicos y distinguirlos específicamente, por lo que son los responsables de las dos características fundamentales de la respuesta inmune adaptativa: su especificidad y su memoria. Tanto los linfocitos B como los T, expresan receptores antígeno-específicos altamente diversos unidos a su membrana lo que les permite responder a un gran espectro de antígenos. Ambos linajes linfocitarios tienen origen en células hematopoyéticas pluripotenciales que se encuentran principalmente en la médula ósea (Charron, 2007).

Los linfocitos B maduran parcialmente en la médula ósea para luego entrar en circulación y poblar los órganos linfáticos periféricos, donde culminan el proceso. Ya maduros, reciben el nombre de linfocitos B vírgenes y son capaces de ser activados por un antígeno en los órganos

---

linfáticos secundarios (bazo y ganglios linfáticos), lo que les provoca cambios secuenciales en su fenotipo y capacidad funcional (Abul Abbas, Andrew H.Lichtman, 2007). Los linfocitos B reconocen antígenos extracelulares y se diferencian en células plasmáticas secretoras de anticuerpos (Ac) con distintas especificidades. El mantenimiento de anticuerpos a largo plazo luego de una exposición antigénica primaria es conferido por una combinación de células B de memoria y células plasmáticas de larga vida. A su vez, durante el reconocimiento de un Ag específico, también se produce una población de células B de corta vida que proveen una fuente rápida de anticuerpos mientras ocurre el desarrollo de las células plasmáticas de larga vida y células B de memoria (Ndungu et al., 2009). Las células plasmáticas de larga vida abandonan los linfonódulos y migran a través de la sangre a nichos específicos en la médula ósea (Manz, Thiel, & Radbruch, 1997) y bazo (Slifka, Antia, Whitmire, & Ahmed, 1998), donde alcanzan su diferenciación terminal y secretan anticuerpos de alta afinidad por períodos prolongados a la circulación sistémica, manteniendo así los niveles de los mismos a largo plazo. Las células B de memoria por su parte, recirculan continuamente entre sangre y tejidos permaneciendo en el individuo por largo tiempo en un estado quiescente (Bernasconi, Traggiai, & Lanzavecchia, 2002), pero luego de una re-exposición a un antígeno específico (Zinkernagel & Hengartner, 2006) se diferencian a células plasmáticas secretoras de anticuerpos. Las células B de memoria pueden expresar determinados isotipos (IgA, IgE o IgG) como consecuencia de cambios de clase o secretar IgM e IgD (cómo los linfocitos B vírgenes) sin que exista dicho cambio, aunque pueden ser re-activadas con un umbral de estimulación muy por debajo del de su contraparte *naïve*.

Los anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig) son sintetizados como ya se mencionó, por células B que sufrieron una diferenciación luego de ser activadas por la presencia de un antígeno, para convertirse en células plasmáticas. La estructura de un anticuerpo es simétrica y consiste en dos cadenas livianas y dos cadenas pesadas idénticas entre sí. Tanto las cadenas pesadas como las livianas constan de regiones variables amino terminales (V) que participan en el reconocimiento del antígeno y regiones constantes (C) carboxi terminales: la cadena pesada contiene 3 o 4 dominios constantes (dependiendo del isotipo de Ig) y un solo dominio variable, mientras que la cadena liviana contiene un dominio constante y uno variable. Las regiones variables reciben ese nombre porque contienen zonas de variabilidad en la secuencia de aminoácidos que distinguen a los anticuerpos elaborados por un clon de linfocitos B de los elaborados por otros clones. La región variable de una cadena pesada ( $V_H$ ) se encuentra yuxtapuesta con la región variable de la cadena liviana ( $V_L$ ) formando un punto de unión con el Ag, y como la estructura de un anticuerpo presenta dos cadenas livianas y dos pesadas, cada molécula contiene dos puntos de unión al Ag. Luego de que un anticuerpo se une a un antígeno se forma un complejo inmune Ac-Ag que puede

tener origen en Ac de alta afinidad producidos por células plasmáticas que fueron estimuladas por un Ag específico, o por Ac naturales poli-reactivos que pueden unirse a múltiples epítopes compartidos por diferentes patógenos (Manz, Hauser, Hiepe, & Radbruch, 2005).

El principal isotipo de Ig producido durante una respuesta inmune primaria (primer contacto con un Ag específico) es IgM. Debido a que la misma se induce en la etapa temprana de la respuesta inmune, la región variable ha sufrido muy poca hipermutación somática lo que la hace altamente polireactiva permitiéndole a las células B responder rápidamente frente a un gran espectro de Ag (Schroeder & Cavacini, 2010). Cada IgM tiene una estructura pentamérica con un total de 10 sitios de posible unión con el Ag lo que le otorga a la molécula, pese a su bajo nivel de afinidad individual, una alta avidéz general (Czajkowsky & Shao, 2009). A medida que la respuesta inmune avanza en el tiempo, se produce un cambio en el tipo de Ig generalmente a IgG. De igual manera, durante una respuesta inmune secundaria se activan las células B de memoria generadas durante la respuesta primaria, la cual está caracterizada por el isotipo IgG mayormente (aunque a veces también por los isotipos IgA e IgE), siendo más veloz y de 100 a 1000 veces más potente que la respuesta primaria.

### 1.5.2 Sistema inmunitario bovino

Los anticuerpos juegan entonces un rol importante en proteger al animal frente a infecciones, ya sea eliminando al patógeno mediante su neutralización, tornándolo biológicamente inactivo, o mediante opsonización, marcándolo para su eliminación por parte del sistema retículo-endotelial (Abul Abbas, Andrew H.Lichtman, 2007).

Entre los distintos isotipos de inmunoglobulinas existentes nombrados en la sección anterior (IgA, IgM, IgE, IgG e IgD), los bovinos expresan IgG, IgA e IgE, con 2 subclases de IgG: IgG1 e IgG2. Bajo condiciones normales, el suero bovino contiene cantidades indetectables de IgE y muy bajos niveles de IgA, mientras que los isotipos que se encuentran en mayor abundancia son IgM (3mg/mL), IgG1 e IgG2 (10 mg/mL) (Blakeslee, Rapacz, & Butler, 1971). La IgG1 predomina en calostro (>100 mg/mL), fluidos exócrinos y leche, mientras que los niveles de IgG2 son marcadamente menores (Butler, McGivern, Cantarero, & Peterson, 1980; Guidry, Butler, Pearson, & Weinland, 1980), tal como sucede con IgA e IgM. De este modo, IgG1 constituye el principal isotipo secretorio en la especie bovina (Tizard, 2009).

Con el fin de optimizar las interacciones celulares necesarias durante las fases de reconocimiento y activación de la respuesta inmune específica, los linfocitos y CPA están



localizados y concentrados dentro de los tejidos linfáticos. El sistema linfático es una red de órganos, conductos, ganglios y vasos linfáticos que producen y transportan linfa desde los tejidos hacia el torrente sanguíneo, siendo un componente principal del sistema inmune. El mismo se compone de sitios primarios y secundarios, cada uno con un rol específico en el desarrollo linfocitario. En mamíferos adultos, los tejidos linfoides primarios están compuestos por la médula ósea y el timo y es donde los linfocitos expresan por primera vez los receptores del Ag y adquieren su madurez fenotípica y funcional. Los tejidos linfoides secundarios comprenden el bazo, linfonódulos y tejido linfoide asociado a mucosas, bronquios e intestino (TLAM, TLAB, TLAI, respectivamente), siendo los sitios donde se inician las respuestas inmunes adaptativas.

En el bovino, el desarrollo continuo de células B ocurre tanto en la médula ósea como en el tejido linfoide asociado a mucosas (TLAM), a nivel de las placas de Peyer del íleon. Los progenitores de células B, población IgM+ intracelular, pueden ser detectados en la médula ósea bovina desde la gestación tardía hasta la edad juvenil, pero no en el animal adulto. De este modo, el repertorio de receptores de células B (BCR) en el bovino es establecido a una edad temprana, dependiendo de modificaciones que ocurren luego de la recombinación para diversificar más aun la población de células B (Ekman, Pessa-Morikawa, Liljavirta, Niku, & Iivanainen, 2010). Los linfocitos maduros recirculan entre la sangre y los órganos linfoides secundarios y si el antígeno específico para algún linfocito está presente en los sitios secundarios, se inicia una respuesta inmune. El líquido intersticial proveniente de los tejidos (linfa), que puede contener antígenos, complejos inmunes y CPA, drena hacia los linfonódulos regionales a través del sistema linfático, permitiendo así hacer un muestreo del estatus inmunitario en una región particular. Esto provee un eficiente mecanismo para que los linfocitos *naïve* contacten un antígeno específico.

Cada linfonódulo está delimitado por una cápsula, debajo de la cual existe un espacio abierto (seno subcapsular o SCS) en el cual desembocan vasos aferentes en diversos sitios. El linfonódulo se divide en dos regiones concéntricas histológicamente diferentes, la medular y la cortical. La corteza se subdivide en paracorteza (región de células T) y folículos (región de células B, donde se generan también los centros germinales (CG) durante una respuesta inmune). La médula consiste en cordones celulares ramificados más laxos, y al igual que la corteza, ambos elementos están sostenidos por un armazón reticular de células de estroma que contiene muchas células fagocíticas. Los antígenos son transportados a los linfonódulos mediante diferentes mecanismos, dependiendo de sus características, pudiendo ser capturados por CPA presentes en los tejidos antes de su migración a linfonódulos regionales.

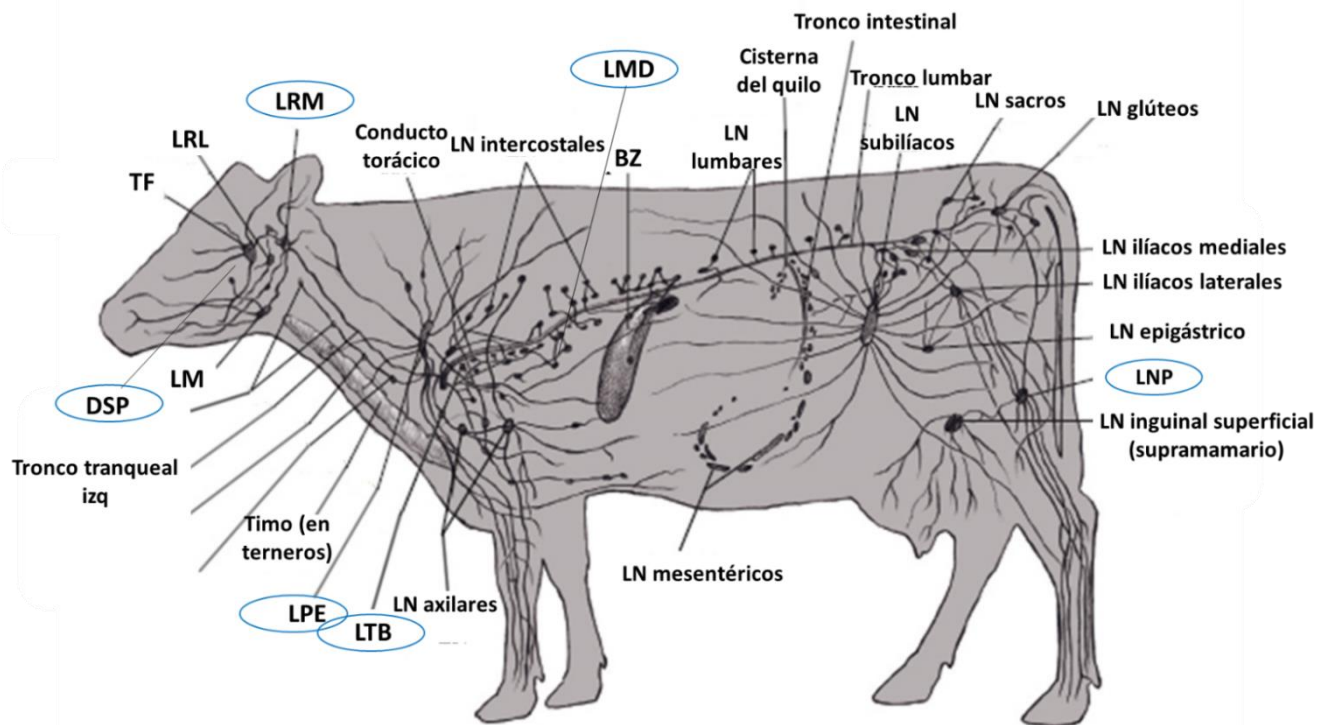
El sistema linfoide bovino posee un sistema de capilares y vasos linfáticos que devuelven el líquido intersticial al torrente sanguíneo y una variedad de tejido linfoide ampliamente diseminada, donde se incluyen los numerosos linfonódulos (Figura 8).

El drenaje linfoide sigue un curso topográfico con origen en un plexo de capilares linfáticos, el cual se encuentra distribuido en la mayoría de los tejidos que recoge una fracción del líquido intersticial. Este último tiene una gran importancia porque comprende las proteínas y otras moléculas grandes que no pueden ingresar en los vasos sanguíneos que son menos permeables.

La mayor permeabilidad de los vasos linfáticos también les permite captar partículas, incluso a veces microorganismos. Los linfonódulos en el bovino son firmes, de superficie lisa y por lo general ovoides o reniformes, algunos de los cuales son superficiales pudiéndose identificar palpándolos a través de la piel. Están dispuestos a lo largo de las vías linfáticas de acuerdo a un patrón que exhibe considerables variaciones generales y algunas individuales. Salvo muy pocas excepciones, toda la linfa pasa por al menos un nódulo en su recorrido desde los tejidos hasta el torrente sanguíneo.

A continuación, se describen topografía, aferentes y eferentes linfáticos de los linfonódulos utilizados durante la presente tesis. Los linfonódulos retrofaríngeos mediales (LRM) son generalmente dos y están a cada lado de la faringe y la base del cráneo, inmersos en grasa. Reciben linfa de la mayoría de las estructuras más profundas de la cabeza, incluso las cavidades nasal y oral, faringe, laringe, cráneo y músculos de la mandíbula, así como de la parte ventral del extremo superior del cuello. Los vasos eferentes también drenan en los linfonódulos retrofaríngeos laterales que son los centros colectores de toda la cabeza. Normalmente, tanto los vasos linfáticos profundos como los superficiales, van a los linfonódulos traqueobronquiales (LTB), pero unos poco los eluden y pasan al siguiente ganglio de la cadena. Los LTB pueden encontrarse en número de dos o más y reciben linfa de los lóbulos del pulmón izquierdo y derecho, enviando eferentes directamente al conducto torácico y a los linfonódulos craneales, medios y caudales del mediastino. Los linfonódulos preescapulares (LPE) son dos, ubicándose cada uno en la parte inferior izquierda y derecha del cuello, delante de la escápula, descansando sobre los músculos profundos que cubren la vértebras cervicales y cubiertos por el músculo omotransverso. Reciben linfa de un área muy grande de piel y músculos subyacentes, que va desde la mitad del cuello hasta la porción caudal del tórax, incluso la parte proximal del miembro torácico. El flujo a través del nódulo está compartimentado porque determinadas porciones del nódulo están en relación con distintas partes del campo de drenaje. Los grandes vasos eferentes desembocan de diversas maneras en los grandes troncos linfáticos y venosos de las cercanías. El linfonódulo poplíteo (LNP) se halla situado profundamente en una masa de grasa sobre el músculo

gastroenemio, con una longitud media de 3-4 cm. Las aferencias proceden de la piel de las porciones lateral y caudal de la pierna y de la porción distal del miembro.



**Figura 8: Esquema del sistema linfático bovino.** Los órganos y tejidos linfáticos utilizados en este trabajo están resaltados en azul: linfonódulos retrofaríngeos mediales (LRM), linfonódulos traquobronquiales (LTB), linfonódulos preescapulares o cervicales superficiales (LPE), paladar dorsal blando (DSP), lóbulo medio distal (LMD) y linfonódulo poplíteo (LNP). Adaptado de "lymphatic system and defense mechanism" (Kyaw, 2011).

### 1.5.3 Respuesta inmune a la infección por VFA

Las infecciones virales pueden estimular múltiples vías para inducir la producción de interferones de tipo I y III (IFN-I e IFN-III), los cuales tienen funciones antivirales y antiproliferativas (Fensterl, Chattopadhyay, & Sen, 2015). El reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) virales dentro de la célula huésped, activa una cascada de señalización que desencadena la expresión de genes codificantes para IFN-I y citoquinas proinflamatorias. Dentro de los receptores celulares involucrados en la detección del ARN viral, los receptores de

---

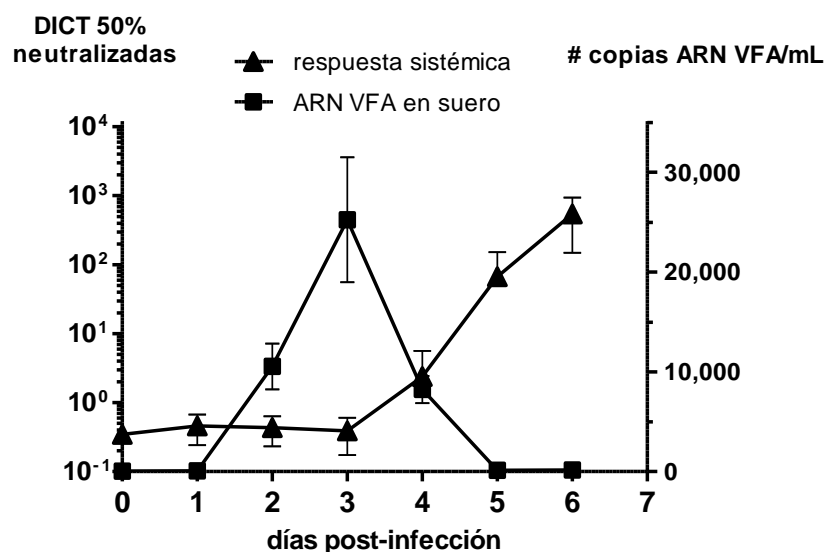
tipo *toll* (TLRs) expresados en la superficie y compartimentos endosomales de algunos tipos celulares tienen un rol fundamental en la respuesta inmune generada: TLR3 reconoce ARN doble cadena mientras que TLR7 y TLR8 reconocen ARN simple cadena (Lund et al., 2004). La primera línea de defensa que dispara la infección por VFA se relaciona, por lo tanto, con las respuestas inmunes innatas generando una rápida inducción de interferones y otras citoquinas antivirales en el sitio de infección (Rodríguez Pulido & Sáiz, 2017).

El VFA es altamente sensible a IFN-I (Chinsangaram, Piccone, & Grubman, 1999) y estudios *in vitro* también demostraron su sensibilidad a IFN-III en cultivos primarios de células bovinas y porcinas (Díaz-San Segundo et al., 2011; D. Wang et al., 2011). En el curso de la evolución viral y a pesar del tamaño limitado de su genoma, se han seleccionado una variedad de proteínas virales para evadir estas respuestas innatas del huésped de manera tal de maximizar la replicación y diseminación viral. La proteasa líder ( $L^{pro}$ ) del VFA por ejemplo, bloquea la traducción de todas las proteínas celulares sintetizadas a partir de mensajeros CAP-dependientes y controla específicamente la transcripción de los genes implicados en la inmunidad innata de la célula infectada, afectando la expresión de IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  e IFN- $\gamma$  (de los Santos, de Avila Botton, Weiblen, & Grubman, 2006; M. J. Grubman, Moraes, Diaz-San Segundo, Pena, & de los Santos, 2008; D. Wang et al., 2011, 2010). Otras proteínas no estructurales del virus, entre las que se incluye la proteína 2B, son capaces de inhibir el tráfico a través del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi (Moffat et al., 2005) reduciendo el número de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) sobre la superficie celular, lo que retrasaría la iniciación de la respuesta inmune adaptativa impidiendo el transporte de moléculas de señalización (M. J. Grubman et al., 2008).

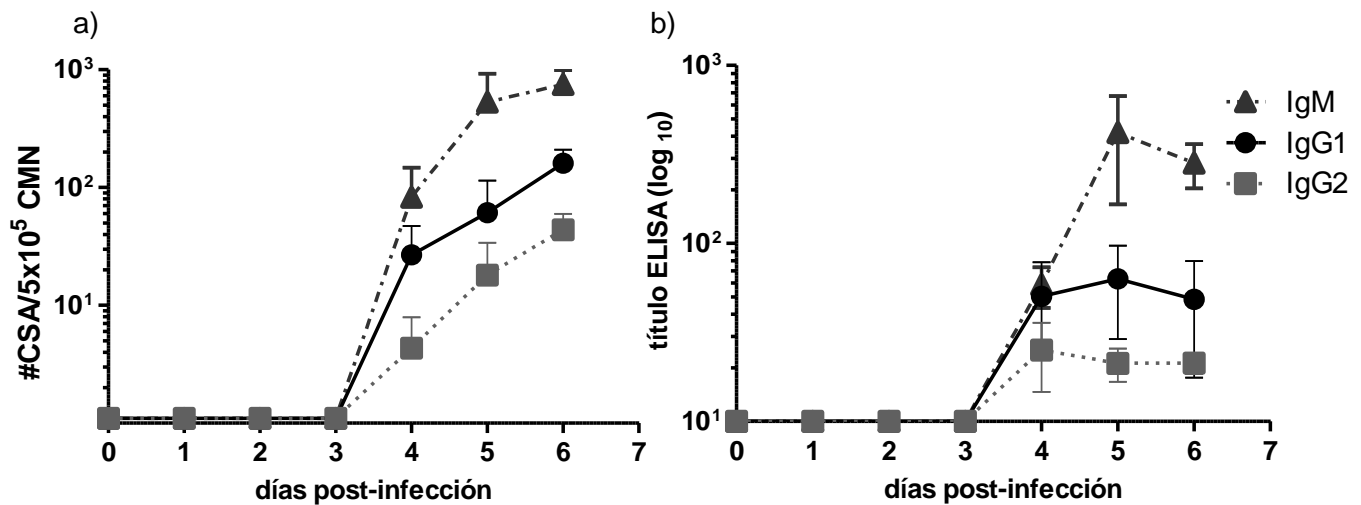
Se ha reportado que los cerdos desarrollan una linfopenia severa pero transitoria durante la fase aguda de la infección, donde se ven afectadas todas las poblaciones de células B y T, correlacionándose la disminución del número de linfocitos con la aparición de la viremia (F. Diaz-San Segundo et al., 2006). La funcionalidad y el número de linfocitos comienzan a retornar a sus niveles normales de 4 a 7 dpi, cuando la viremia decae, lo que sugiere que los linfocitos poseen un rol en la protección frente al virus y que la linfopenia observada promueve la patogénesis al facilitar la diseminación viral.

A diferencia de lo descrito para cerdos, el VFA no puede infectar células del sistema inmune del bovino en ausencia de anticuerpos y, por lo tanto, no genera linfopenia al inicio de la infección ni pérdida de la inmunocompetencia del animal (Windsor et al., 2011). Por el contrario, la infección con VFA en bovinos dispara una rápida respuesta adaptativa de anticuerpos neutralizantes tanto a nivel sistémico como local, tal como describió Pega y col. luego de la infección por vía aerógena

de bovinos *naïve* con VFA (Pega et al., 2013). Transcurridas 24 hpi ya es posible detectar ARN viral en el suero de los animales, aumentando notablemente el número de copias de genoma viral al 3° dpi y desapareciendo del torrente sanguíneo al 5°dpi), coincidiendo con el inicio de las respuestas sistémicas de Ac específicos ya reportadas (Figura 9)(S. Alexandersen, Quan, Murphy, Knight, & Zhang, 2003). Esta respuesta de anticuerpos logra rápidamente eliminar el virus de circulación sanguínea entre el 3° y 4° dpi (Pega et al., 2013) aunque es menos eficiente en eliminarlo tanto de las superficies orales y nasales como de las vesículas epiteliales, donde puede permanecer entre 10 a 14 días luego de ocurrida la infección (Oliver et al., 1988). Se vio además, que entre los días 4 y 5 post-infección es posible detectar en suero anticuerpos seroneutralizantes (AcN), así como también anticuerpos totales específicos, siendo el isotipo predominante la IgM (Pega et al., 2013) (Figura 10b). A nivel local, se genera también una rápida respuesta de anticuerpos a lo largo de todo el tracto respiratorio que se genera con una ligera anticipación y en forma independiente a la observada a nivel sistémico, presentado una gran similitud en el curso temporal y los perfiles isotípicos con la respuesta sistémica (Figura 10a).

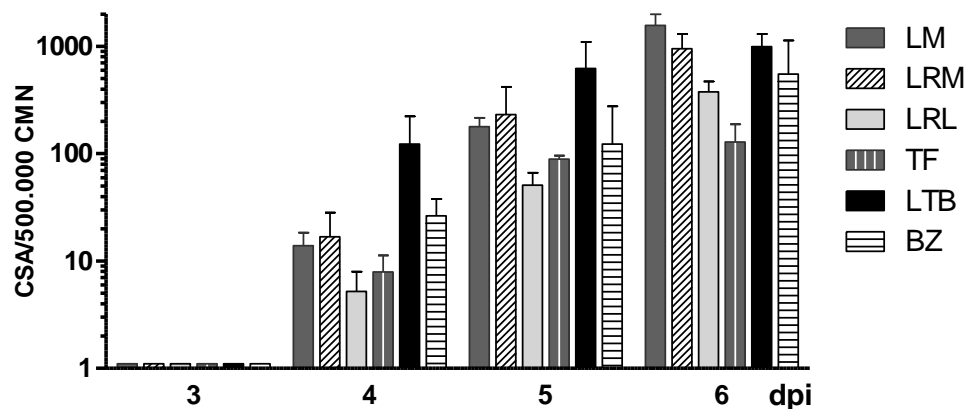


**Figura 9: Curso temporal de la detección de ARN viral y de las respuestas adaptativas humorales sistémicas en bovinos luego de la infección con VFA por vía oronasal.** Las respuestas sistémicas de anticuerpos se expresan como el promedio de  $DICT_{50\%}$  neutralizadas por el suero diluido (1:16)  $\pm$  D.E (eje de la izquierda). El curso temporal de la viremia detectada por ARN viral en sangre se expresa como el número promedio de copias de ARN viral/mL en suero de los bovinos  $\pm$  D.E (eje de la derecha). Adaptado de Pega y col. (Pega et al., 2013)



**Figura 10: Isotipos de anticuerpos específicos para el VFA inducidos tanto (a) a nivel local como (b) sistémico luego de la infección de bovinos naïve por vía oronasal.** Las muestras de distintos linfonódulos se analizaron por (a) ELISPOT donde cada línea corresponde a un isotipo y cada punto representa el número de CSA específicas para VFA por cada  $10^5$  CMN purificadas, y las muestras de suero por (b) ELISA de isotipos, donde cada línea corresponde a un isotipo en particular y cada punto representa el título de ELISA promedio de todos los animales infectados. Los títulos están expresados como la dilución más alta de suero que alcanza un valor de DO igual a 0,2. Adaptado de Pega y col. (Pega et al., 2013)

Se vio, además, que hasta el 0.4% del total de CSA de los ganglios linfáticos eran específicas contra el virus y principalmente representadas por células secretoras del isotipo IgM hasta el 6° dpi. Además, los órganos linfoides que drenan tejidos del tracto respiratorio superior aumentan su número de CSA contra el VFA a partir del día 5 post-infección, y los linfonódulos que drenan los tejidos donde puede replicar el VFA son los más estimulados (Figura 11) (Pega et al., 2013). La magnitud de la respuesta observada se correlaciona con el grado de estimulación antigénica que recibe el linfonódulo drenante correspondiente.



**Figura 11: Detección de CSA específicas para VFA en órganos linfoides del tracto respiratorio de bovinos naïve infectados por vía oronasal.** Las CSA fueron detectadas mediante la técnica de ELISPOT en linfonódulos mandibulares (LM), tonsila faríngea (TF), linfonódulos retrofaríngeos mediales (LRM) y laterales (LRL), linfonódulos traqueobronquiales (LTB) y bazo (BZ). Los resultados están expresados como el número de CSA por cada  $5 \times 10^5$  CMN purificadas y cada barra representa el valor promedio de 3 individuos (excepto para 5 dpi, donde  $n=2$ )  $\pm$  DE. Adaptado de Pega y col. (Pega et al., 2013).

Estos resultados indican que la infección viral induce una rápida y eficiente respuesta de anticuerpos, asimilable a las respuestas generadas independientemente de la colaboración de linfocitos T.

Los antígenos T-independientes (T-I) son capaces de iniciar una respuesta serológica sin colaboración de las células T, lo que induce una respuesta más rápida, pero de menor duración que los antígenos T-dependientes (T-D) y por lo general, están asociados a una producción de Ac de menor afinidad y a una pobre capacidad de generar memoria inmunológica (Fagarasan & Honjo, 2000). Los antígenos T-I de tipo II poseen una estructura repetitiva altamente organizada que puede activar células B naïve en ausencia de células T CD4+, mediante el entrecruzamiento de múltiples receptores de células B (BCR) en las superficie de células B naïve (Feldmann & Easten, 1971). Esto dispara una cascada de señales de activación que determinan la diferenciación final hacia células plasmáticas productoras de Ac (Vos, Lees, Wu, Snapper, & Mond, 2000) o en menor medida, células de memoria (Defrance, Taillardet, & Genestier, 2011). Las cápsides del VFA poseen una estructura repetitiva organizada con epitopes antigénicos separados por 5-10 nm entre sí, características que le permiten generar ante determinadas condiciones de localización, tiempo y dosis, respuestas T-I.

La naturaleza T-I del VFA fue tempranamente descrita en el modelo murino (Borca, Fernández, Sadir, Braun, & Schudel, 1986), modelo en el que más tarde se profundizó su

---

caracterización (Ostrowski et al., 2007). Más de dos décadas después, también para bovinos, se pudo demostrar que la función de las células T CD4+ no es requerida para controlar la infección primaria, ya que incluso el cambio de isotipo de los anticuerpos inducidos ocurre de manera independiente de la presencia de células T CD4+ (Juleff et al., 2009). Este mecanismo de inducción de inmunidad es clave para la aparición rápida de anticuerpos neutralizantes que eviten una mayor diseminación del virus en el organismo del animal infectado.

Por otro lado, la eliminación del virus de la región esófago-faríngea puede llegar a ser poco eficiente y el VFA puede llegar a permanecer infectando células epiteliales del paladar blando y faringe, o asociado a células dendríticas foliculares ubicadas en la zona clara de los centros germinales (Juleff et al., 2008) hasta 17 dpi (Prato Murphy, Forsyth, Belsham, & Salt, 1999). De hecho, este último sitio fue propuesto como un reservorio de VFA no replicativo pero infeccioso, que daría lugar a la existencia de animales persistentemente infectados (PI). Estos animales PI presentan un patrón diferencial de respuesta humoral y de mucosas (Mohan et al., 2008), con altos títulos de anticuerpos séricos específicos, al menos por 7 meses luego de la infección (McVicar & Suttmoller, 1974), y niveles bajos, pero por largos periodos de tiempo, de IgA en fluidos esófago-faríngeos (Parida, Anderson, Cox, Barnett, & Paton, 2006). La persistencia antigénica entonces sería la responsable de mantener la inmunidad humoral de largo plazo, únicamente descrita en FA para la infección en bovinos y otros rumiantes (Cunliffe, 1964), pero ya reportada para otras infecciones virales agudas como las inducidas por el virus de la estomatitis vesicular (Bachmann, Odermatt, Hengartner, & Zinkernagel, 1996)

#### 1.5.4 Respuesta inmune a la vacunación contra VFA

Al igual que con la infección, los anticuerpos neutralizantes inducidos por la vacunación eliminan el VFA de la circulación sanguínea, siendo esta respuesta humoral específica de serotipo (McCullough, Parkinson, & Crowther, 1988). En bovinos, la infección por VFA induce inmunidad de por vida mientras que la vacunación con virus inactivado induce inmunidad por períodos de hasta 6 meses en animales primo-vacunados (Doel, 2005) obligando, por lo tanto, a la revacunación de toda la población una o dos veces al año según la categoría de los bovinos. La inducción de los anticuerpos neutralizantes por la vacunación en bovinos, a diferencia de la infección, parecería dependiente de la activación de respuestas de linfocitos T colaboradores (CD4+) específicos para el VFA (Carr et al., 2013). La activación de células T específicas para el VFA en animales vacunados puede medirse *ex vivo* mediante la detección de IFN- $\gamma$  en cultivos



---

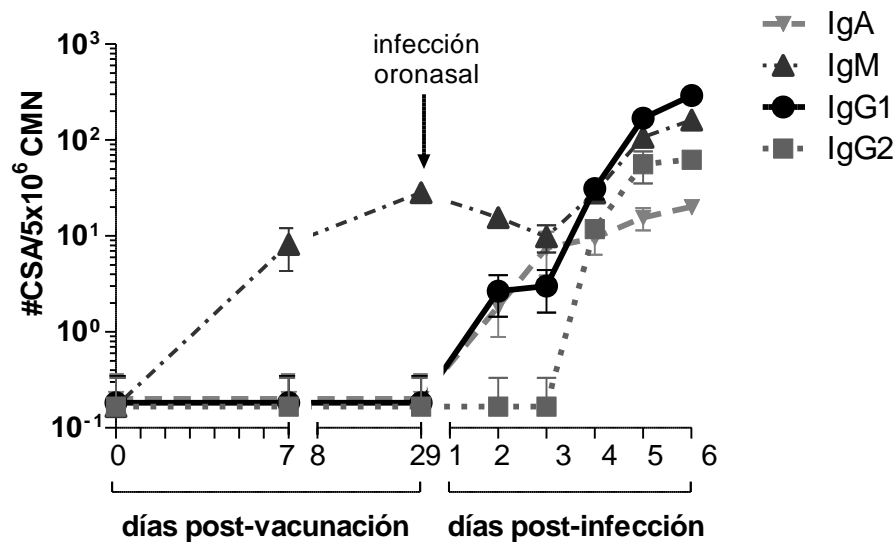
de sangre entera de los animales con antígenos virales (Bucafusco et al., 2015; Parida, Oh, et al., 2006).

El rol del IFN- $\gamma$  en la protección no ha sido aún establecido, sin embargo, es un marcador de la activación de la respuesta celular específica inducida por la vacunación. Trabajos de nuestro laboratorio demostraron que las distintas cepas de VFA difieren en su capacidad de inducir tales respuestas de células T productoras de IFN- $\gamma$  y esto se relaciona con la integridad de la cápside de VFA, tanto para la estimulación in vivo como in vitro (Bucafusco et al., 2015).

A través de diversos estudios, la inmunidad protectora contra el VFA en bovinos ha sido relacionada, casi con exclusividad, con la inducción de anticuerpos neutralizantes sistémicos que pueden neutralizar al virus en circulación impidiendo tanto su acceso a los sitios de replicación secundarios como la generalización de la infección en tejidos epiteliales de boca y patas (Golde et al., 2005). De acuerdo a lo descrito en la bibliografía (Golde et al., 2005) la vacunación induce una pronunciada respuesta sistémica de anticuerpos neutralizantes, visible ya a los 7 días post-vacunación (dpv) y con un aumento moderado hasta los 30 dpv.

Resultados obtenidos en nuestro laboratorio luego de inmunizar bovinos *naïve* con una vacuna monovalente conteniendo 23,5  $\mu\text{g}$ /dosis de la cepa O1/Campos (Pega et al., 2015), fueron coincidentes con este curso temporal de inmunidad sistémica. Se observó que la vacunación por vía intramuscular indujo una pronunciada respuesta sistémica de anticuerpos seroneutralizantes con títulos crecientes hasta los 7 dpv, alcanzando un máximo a los 29 dpv. A su vez, el estudio del patrón isotípico a nivel sistémico de los anticuerpos anti-VFA de estos animales, mostró a la IgM como el isotipo dominante a los 7 dpv seguido de IgG1 e IgG2, con un aumento marcado de IgG1 a partir de los 21 dpv.

A nivel local, es posible encontrar CSA del isotipo IgM en mayores niveles que las de IgG1 e IgG2, dando cuenta de la generación de una respuesta inmune de tipo primaria luego de la vacunación, coincidente con la observada a nivel sistémico (Figura 12). A los 7 dpv, el linfonódulo pre-escapular (LPE) fue el órgano más estimulado con predominancia de CSA del isotipo IgM, mientras que en linfonódulos distantes del sitio de inoculación, la presencia de CSA específicos para VFA se detectó en bajo número. Sin embargo, al estudiar el LPE a los 29 dpv, se observó que predominaban las CSA del isotipo IgG1 y se pudo evidenciar, además, la presencia de CSA en los demás linfonodos estudiados no drenantes del sitio de inoculación de la vacuna (LTB, LRM, linfonódulo mandibular (LM) y retrofaríngeo lateral (LRL)).



**Figura 12:** Isotipo de anticuerpos específicos para VFA inducidos a nivel local en bovinos vacunados antes y después de la infección por vía oronasal. Se observa el promedio del número de CSA por cada  $10^5$  CMN purificadas, hasta los 29 dpv, donde cada línea representa un isotipo en particular. La flecha indica el momento de la infección oronasal. Adaptado de Pega y col. (Pega et al., 2015).

En este trabajo se pudo demostrar que la vacunación por vía intramuscular es capaz de estimular tanto respuestas humorales sistémicas como la aparición de CSA específica en ganglios linfáticos del tracto respiratorio alejados y no drenantes del sitio de inoculación. La infección posterior de todos los animales vacunados a los 30 dpv, permitió una respuesta de anticuerpos secundaria rápida en todo el tracto respiratorio que protegió a la totalidad de los animales infectados (Pega et al., 2015). Esto evidenció, por lo tanto, la circulación de linfocitos B específicos para VFA (incluyendo células B de memoria) tras la vacunación los cuales son capaces de diferenciarse a CSA rápidamente al entrar en contacto con virus infeccioso en los órganos linfáticos secundarios luego de ocurrida la infección oronasal.

## 1.6 Antecedentes al plan de trabajo y planteo del problema

Trabajos previos realizados por nuestro grupo de trabajo que concluyeron con la tesis doctoral del Dr. Pega (Facultad de Cs. Veterinarias, UBA, marzo de 2014), aportaron resultados que ayudaron a entender el rol de la respuesta temprana de anticuerpos frente a la infección por VFA

tanto a nivel local (mucosas) como sistémico. Como ya se mencionó en secciones anteriores, estos resultados demostraron que tanto la infección por vía oronasal como la vacunación por vía intramuscular generan respuestas específicas tanto a nivel sistémico como en mucosas que son coexistentes e independientes.

A partir de lo observado, surgió el interrogante sobre la importancia que tiene la inducción de estas respuestas de anticuerpos locales en la protección a la infección por vía oronasal, ruta natural de entrada del VFA. Pensamos que esta información cubriría un vacío importante del conocimiento respecto del papel de las respuestas de mucosas oronales en la infección con VFA en bovinos, sobre todo teniendo en cuenta que el portal natural de entrada del virus es la vía aerógena. A su vez, podría brindar información práctica valiosa para el diseño de nuevas vacunas y nuevas estrategias vacunales que mejoren la inmunidad inducida. Cabe destacar, además, que los estudios de inmunidad de mucosas oronales realizados en bovinos son escasos, posiblemente por la dificultad del modelo, la poca disponibilidad de reactivos en comparación con otras especies y la imposibilidad de replicar el modelo natural en animales de laboratorio.

En este contexto, los protocolos y estrategias experimentales desarrollados en nuestro laboratorio para el estudio de este tema, constituyen un aporte que excede a la temática de fiebre aftosa, pudiendo ser aplicados a otras de las numerosas enfermedades de los bovinos que tienen como portal de entrada la vía aerógena.

La demostración entonces de la coexistencia de respuestas inmunes sistémicas y de mucosas que se generan luego de la vacunación o infección por vía oronasal con el VFA, es el antecedente clave de esta tesis que tiene como objetivo evaluar el papel y la relevancia de la inmunidad adaptativa de anticuerpos generada a nivel sistémico en la protección frente a la infección con VFA, y en ausencia de otros mecanismos inmunes.

## 2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

---

A partir de datos preliminares propios y de otros grupos de investigación, la hipótesis de trabajo plantea que los anticuerpos sistémicos, administrados mediante la inmunización pasiva de terneros seronegativos para VFA, son capaces de evitar la diseminación del virus luego de la infección por vía aerógena y en ausencia de otros mecanismos inmunes.

## **3. OBJETIVOS**

---

### **3.1 OBJETIVOS GENERALES**

El objetivo de este proyecto es evaluar la respuesta adaptativa de anticuerpos generada a nivel sistémico y la capacidad de la misma para proveer protección a la infección por vía aerógena en ausencia de otros mecanismos inmunes. Para ello se propone estudiar las respuestas y la protección generadas luego de la infección oronasal de bovinos vírgenes que hayan recibido previamente por transferencia pasiva anticuerpos obtenidos de otros bovinos inmunizados con vacunas anti-aftosa. En función de estas observaciones será posible caracterizar la importancia relativa de la inmunidad sistémica contra la infección por vía aerógena con el VFA, y a su vez, identificar otros posibles mecanismos inmunes que son activados por la vacunación siguiendo los protocolos convencionales. En conjunto, esta información puede resultar relevante para el diseño de estrategias vacunales, en busca de vacunas más efectivas, de mayor duración y que generen inmunidad sin persistencia del virus.

### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Para contrastar la hipótesis y en función del objetivo general descrito anteriormente, se proponen los siguientes objetivos específicos:

- A. Desarrollar un modelo de transferencia de inmunidad pasiva en bovinos utilizando sueros inmunes anti-VFA obtenidos de bovinos vacunados con formulaciones oleosas.
- B. Realizar experimentos de infección oronasal con VFA usando la cepa O1/Campos/Bra/58 (O1/ Campos) en animales que recibieron por inmunización pasiva plasma inmune de bovinos vacunados con la cepa homóloga, obtenido a distintos tiempos post-vacunación.
- C. Estudiar las respuestas inmunes inducidas a nivel sistémico y local a distintos tiempos post-infección en los animales previamente inmunizados en forma pasiva y correlacionarlas con la presencia o ausencia de signos clínicos y su curso temporal.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

---

## **Diseño Experimental**

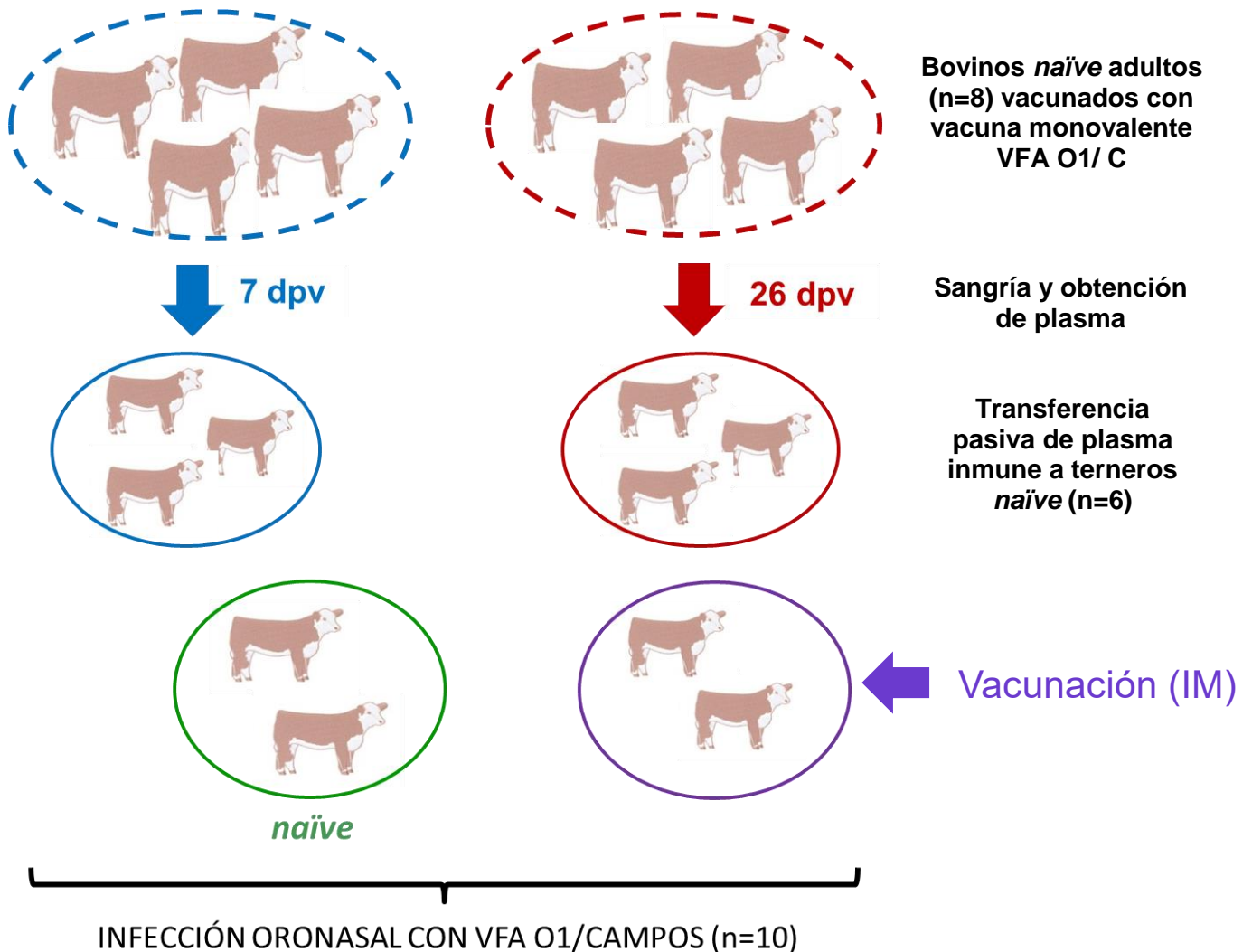
Para el ajuste del protocolo de transferencia pasiva de anticuerpos anti-VFA en bovinos se trabajó con doce bovinos adultos (dadores) que contaban con múltiples inmunizaciones dentro del marco de las campañas de vacunación anti-aftosa anuales vigentes y con cuatro terneros (receptores) que fueron monitoreados durante 90 días hasta que el título de anticuerpos totales anti-VFA medidos por ELISA en fase líquida (LP-ELISA) fue negativo ( $<1,1$  para 3 de los animales y  $<1,4$  para el restante). Basándonos en datos bibliográficos, la volemia de los bovinos es de aproximadamente 60 mL/kg ( $\approx 8\%$  del peso del animal en kg) y es posible colectar hasta el 20% del volumen total de sangre del animal donante sin generarle perjuicios (Balcomb & Foster, 2014; Diehl et al., 2001). En este caso, se extrajeron 1,8 L de sangre por animal con los que se conformó un único *pool* de plasma, con elevados títulos de anticuerpos anti-VFA y se transfirieron dos volúmenes distintos por grupo experimental: 280 mL ( $n=2$ ) y 2800 mL ( $n=2$ ). Todos los animales pertenecían al campo experimental del Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA) de INTA.

Para la experiencia definitiva de transferencia pasiva de anticuerpos a bovinos *naïve*, se trabajó con bovinos de raza Hereford provenientes de un establecimiento ubicado en la provincia de Chubut, región libre de FA sin vacunación. Se trasladaron al campo experimental del CICVyA un total de 10 terneros de entre 6 y 8 meses de edad y 180 - 220 kg de peso (receptores) y 8 bovinos adultos de aproximadamente 2 años de edad y 350 - 400 kg de peso (dadores), y se corroboró que todos los animales fueran negativos para anticuerpos anti-VFA medidos por LP-ELISA. Los bovinos dadores fueron vacunados con una vacuna monovalente para VFA O1/Campos y a continuación se obtuvieron 4,5 litros de sangre por animal a dos tiempos distintos post-vacunación: 7 y 26 dpv. Con el plasma obtenido se armaron dos *pool*es y se transfirieron a seis terneros receptores ( $n=3$  para cada *pool*). Por otra parte, dos de los terneros fueron vacunados a distintos tiempos, previo al desafío con VFA (7 y 26 días antes). Todos los terneros ( $n=10$ ) fueron infectados con VFA O1/Campos por vía oronasal (Figura 1). Los procedimientos que incluyeron animales no infectados con VFA fueron realizados en el campo experimental del CICVyA mientras que los que incluyeron animales infectados, se llevaron a cabo en los boxes de seguridad biológica 4 OIE (NSB4-OIE) ubicado dentro del predio del CICVyA.

Todas las maniobras realizadas se efectuaron de acuerdo a normas de bienestar animal según protocolos aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAE, Protocolo n° 7/2015 y n° 71/2015) y por el Comité Institucional de



Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAL) de la Facultad de Cs. Veterinarias (FCV) de la Universidad de Buenos Aires (UBA).



**Figura 1: Diseño experimental para los terneros naïve infectados por vía oronasal con VFA O1/Campos.** Los animales fueron transferidos con un pool de plasma obtenido de los bovinos adultos vacunados a dos tiempos distintos: 7 y 26 dpv (n=3 para cada grupo experimental). Dos animales fueron vacunados por vía intramuscular a dos tiempos distintos previos a la infección (7 y 26 días antes) y dos animales no recibieron tratamiento alguno (control de la infección). Todos los terneros (n=10) fueron infectados por vía oronasal con VFA O1/Campos ( $10^7$  DLRL<sub>50%</sub>).

## **4.1 Protocolos experimentales in vivo**

### 4.1.1 Vacunación

Los bovinos adultos del campo experimental del CICVyA, utilizados durante la experiencia de ajuste de las condiciones de transferencia pasiva de anticuerpos, recibieron vacunaciones dentro del marco de las campañas anuales de vacunación con la vacuna comercial tetravalente vigente, la cual contiene partículas virales íntegras inactivadas químicamente de las cepas O1 Campos/Brazil/58 (O1/Campos), A24 Cruzeiro/Brazil/55 (A24 Cruzeiro), A Argentina/2001 (A/Arg/01) y C3 Indaial/Brazil/71 (C3 Indaial).

Para la experiencia de transferencia pasiva de anticuerpos a terneros *naïve*, los bovinos adultos dadores fueron vacunados con una formulación oleosa monovalente de emulsión simple conteniendo 22 µg/dosis de VFA O1/Campos inactivado.

Ambas vacunas fueron elaboradas por Biogénesis Bagó S.A y se administraron por vía intramuscular en la tabla del cuello, sobre el flanco izquierdo de los animales, en dosis de 2mL/animal.

### 4.1.2 Sangrado de los bovinos, procesamiento del suero y transferencia a los terneros

Los bovinos adultos dadores fueron sedados con xilacina 2% (entre 1-1.5 mL por animal según el peso) para luego ser sangrados utilizando bolsas estériles de 0,45 L conteniendo 63 mL de una solución anticoagulante con citrato, fosfato y dextrosa (0.3% de ácido cítrico anhídrido, 2.63% de citrato de sodio dihidratado, 0.22% de fosfato monosódico monohidratado, 3.19% de dextrosa monohidratada y 0.027% de adenina). La sangre se centrifugó durante 13 minutos a 1600 X g y se obtuvo entre un 40-50% de plasma respecto del volumen total de sangre que se conservó a -20°C hasta el momento de su uso. Una vez descongelados, los plasmas obtenidos de cada animal se mezclaron utilizando un frasco de vidrio estéril de 10 L de capacidad, para poder armar el *pool* a transferir. A continuación, se colocaron los volúmenes correspondientes para cada animal dentro de bolsas de 3 L que originalmente contenían solución fisiológica estéril.

Previo a realizarles la transferencia pasiva de anticuerpos, los terneros fueron pesados y sedados con xilacina 2% (0.075 mg/kg por vía intramuscular). Durante la transferencia, realizada en el campo experimental del CICVyA, el suero se mantuvo a una temperatura de  $\approx 37^{\circ}\text{C}$

utilizando un baño térmico y la velocidad de transferencia fue controlada de manera tal que la velocidad inicial fue de  $\approx 3\text{ mL/kg/hr}$  durante los primeros 20 minutos y luego  $15\text{ mL/kg/hr}$  (Hunt & Wood, 1999; Soldan, 1999). La transferencia se realizó con una guía para suero con filtro, conectada a la bolsa conteniendo el volumen total de *pool* a transferir.

a)



b)



c)



**Figura 2: Fotografías tomadas durante el procesamiento de los plasmas obtenidos de los bovinos adultos dadores (a) y la transferencia pasiva de anticuerpos a terneros receptores (b y c). (a) los plasmas obtenidos de los distintos animales vacunados con vacunas anti-VFA fueron transferidos a un envase de vidrio de 10 L dentro de una cabina de seguridad biológica, para poder armar el pool que luego fue transferido a una bolsa estéril de 3 L que contenía originalmente solución fisiológica; (b) las bolsas con el plasma a transferir fueron mantenidas a una temperatura cercana a los  $37^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su uso en un baño térmico ; (c) transferencia de plasma al ternero sedado en las instalaciones del campo experimental del CICVyA.**

En la experiencia de transferencia pasiva de anticuerpos a terneros *naïve*, los sueros obtenidos de los bovinos dadores no fueron congelados ya que se usaron entre las 24 y 48 horas posteriores a su obtención y se mantuvieron a 4°C mientras tanto. A su vez, en este caso, la inmunización pasiva a los terneros receptores se realizó dentro del box de bioseguridad donde fueron infectados al día siguiente por una cuestión de logística.

#### 4.1.3 Infecciones experimentales

Las infecciones experimentales de los terneros *naïve* ( $n=10$ ) con VFA 01/Campos se realizaron por vía oronasal utilizando una máscara acoplada a una bomba nebulizadora, el día posterior de realizada la transferencia pasiva de anticuerpos anti-VFA. El virus infectivo que se utilizó fue titulado y provisto por el Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA). La dosis de los inóculos administrada por animal en cada descarga fue de  $10^7$  DLRL<sub>50%</sub> (dosis: 2 mL por animal). El protocolo de infección utilizado (J. M. Pacheco et al., 2010) fue diseñado en Plum Island Animal Disease Center (PIADC), y a diferencia de los otros métodos utilizados que implican infección por inoculación directa en el torrente sanguíneo o en la lengua, este protocolo permite mantener las características de la infección natural en cuanto a vía de entrada y distribución anatómica de las partículas virales en el tracto respiratorio del bovino, ya que genera partículas con un tamaño promedio de 5  $\mu\text{m}$  que se distribuyen a lo largo del tracto respiratorio superior e inferior (Hess et al., 1996). En cada inspiración del animal, el inóculo nebulizado es inhalado a través de una válvula que conecta a la bomba con la máscara que cubre la porción distal del hocico, incluyendo las fosas nasales (Figura 3). Es por esto que la técnica tiene una alta reproducibilidad, ya que permite la cuantificación precisa del inóculo nebulizado en cada descarga. Previo al desafío, los animales fueron sedados utilizando xilacina 2% para facilitar el manejo de los mismos y asegurar la correcta posición de la máscara nebulizadora durante la infección. Las maniobras de infección, el seguimiento de los animales durante 7 días post-infección (dpi) y la necropsia final, fueron realizadas dentro del box de seguridad biológica 4 OIE (NSB4-OIE).



**Figura 3: Infección experimental con VFA por vía oronasal.** Infección aerógena de bovinos con VFA cepa O1C dentro del box de bioseguridad NSB-4OIE utilizando una máscara acoplada a una bomba nebulizadora.

#### 4.1.4 Determinación de los signos clínicos

Los animales infectados por vía oronasal fueron monitoreados diariamente durante 7 dpi para detectar signos clínicos característicos de la enfermedad, los cuales incluyeron: aparición de aftas en la región oronasal y patas, aumento de la salivación, decaimiento, falta de apetito e hipertermia (temperatura mayor a 39°C). El score clínico que se asignó a cada animal por día, consistió en 0,5 puntos por temperaturas entre 39,1°C y 40°C, 1 punto por temperatura mayor a 40°C, 1 punto por lesiones en la región nasal o bucal y 1 punto por cada pata lesionada, pudiendo alcanzar un score máximo de 6.

#### 4.1.5 Toma de muestras nasales, de sangre entera y suero

Las muestras de sangre se obtuvieron por punción en la vena yugular, utilizando tubos *Vacutainer* (BD) con heparina (para la obtención de sangre entera), sin heparina (para la obtención de suero) o con EDTA. Las muestras de suero se obtuvieron por centrifugación (1600 X g, 13 min, 4°C) luego de dejar los tubos por 15 minutos a temperatura ambiente para facilitar la formación del coágulo. Los sueros obtenidos de cada animal, que incluían muestras tomadas al momento previo a la transferencia y durante 7 días posteriores a la infección, fueron alicuotados y almacenados a -20 °C dentro del laboratorio de bioseguridad NSB-4OIE. Para las muestras nasales, se utilizaron tampones de algodón que fueron colocados en los orificios nasales de los bovinos por 3 o 4 minutos y luego centrifugados dentro de un cónico de 50 mL (4000 rpm, 10 minutos), alicuotados y guardados a -20 °C en el laboratorio de bioseguridad NSB-4OIE.

---

#### 4.1.6 Eutanasia

El método utilizado para sacrificar la totalidad de los animales ingresados al box de seguridad biológica NSB-4OIE fue aprobado por el CICUAE del CICVyA y el CICUAL de la FCV de la UBA. El mismo consistió en insensibilización de los animales mediante bala cautiva en la región frontal del cráneo, seguido de degüello y punción cardíaca lo que permitió la exanguinación completa. La eutanasia se llevó a cabo dentro del box de bioseguridad NSB-4OIE y los animales fueron descartados en el digestor presente dentro de las instalaciones.

Durante la necropsia, se extrajeron muestras de los siguientes linfonódulos: traqueobronqueal (LTB), preescapular (LPE), y retrofaríngeo medial (LRM) para ser utilizados en la técnica de ELISPOT, así como también de los siguientes tejidos, que fueron almacenados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  dentro del laboratorio de seguridad NSB-4OIE para su posterior análisis por la técnica de RT-qPCR para detección de viremia: poplíteo (LNP), paladar dorsal blando (DSP) y lóbulo medio distal (LMD).

El LTB constituye uno de los órganos linfoides que drenan estructuras del tracto respiratorio inferior, mientras que el LRM drena el tracto respiratorio superior, y el LPE drena el sitio de inoculación de la vacuna (en la zona de la tabla del cuello).

Los diferentes tejidos se extrajeron de manera aséptica y se colocaron en WASH (medio de cultivo RPMI 1640 + HEPES 10 mM) y se mantuvieron en hielo hasta su procesamiento, para lo cual fueron trasladados al laboratorio de seguridad NSB4-OIE dentro de un triple envase rociado con ácido acético según las normas de bioseguridad.

## **4.2 Protocolos experimentales in vitro**

### 4.2.1 Obtención de células mononucleares (CMN) de órganos linfoides

Tomando como base métodos publicados (Chen, Campbell, VanCott, & Saif, 1995; Hodgins et al., 1999; Parreño et al., 2004; Schaller et al., 1992) para la tesis doctoral del Dr. Pega (FCV, UBA, 2014) se definió esta técnica para obtener CMN a partir de órganos linfoides de bovinos. Los órganos obtenidos post-mórtem fueron desintegrados utilizando una malla de acero de 80 *mesh* (Sigma Aldrich) para obtener suspensiones celulares aisladas, las cuales fueron resuspendidas en solución de Percoll 90% (GE Healthcare) y centrifugadas a 5000 X g por 30 minutos a 4°C. Los pellets celulares obtenidos fueron resuspendidos en Percoll 43% y luego de

---

ser sembrados sobre Percoll 70%, se centrifugaron a 4000 X g durante 30 minutos a 4°C. A continuación, se recolectaron las células de la interfase 43-70% que se resuspendieron en medio de cultivo conteniendo 10% de SFB y su viabilidad fue determinada por exclusión con tinción de azul *trypan*, debiendo ser en todos los casos > 95%. La densidad de cada solución de Percoll fue ajustada previamente utilizando un refractómetro de mano (NSG Precision Cells, INC, NY). El número de CMN aisladas de cada tejido linfóide se ajustó a  $5 \times 10^6$  y  $2.5 \times 10^6$  células/mL, diluciones que se utilizaron para los ensayos de ELISpot como se detalla a continuación.

#### 4.2.2 ELISPOT específico para VFA en bovinos

En el desarrollo de la tesis doctoral del Dr. Pega (FCV-UBA, 2014) se puso a punto un ensayo capaz de detectar inmunoglobulinas específicas contra el VFA aún en niveles bajos, lo que permitió usarlo en momentos tempranos de la infección, donde la cantidad de células secretoras de anticuerpos (CSA) es mínima. La técnica diseñada se utilizó para detectar anticuerpos en órganos linfoides para poder estudiar la respuesta humoral contra el virus en estructuras relacionadas anatómicamente con el sitio de replicación primario del mismo. El ensayo permite detectar y enumerar las células inmunes que secretan una proteína específica, al incubar suspensiones que contienen células mononucleares del sistema inmune (entre las que se encuentran potencialmente CSA específicas) sobre placas que fueron cubiertas con el antígeno de interés. Las placas se incuban luego con anticuerpos específicos conjugados, de forma tal que al revelar las placas quedan en evidencia las zonas con anticuerpos que luego de ser secretados se unieron al Ag, observándose como puntos azules macroscópicos (*spots*), donde cada spot indica una única célula secretora. Esta técnica presenta una gran sensibilidad, ya que permite detectar entre 100 a 200 CSA luego de sólo 3 horas de incubación, y hasta incluso cantidades inferiores a las mencionadas. Esto brinda la posibilidad de medir respuestas inmunes aún en situaciones en las cuáles solo unos pocos clones de precursores de CSA están siendo activadas, por ejemplo, en etapas tempranas de la respuesta inmune.

El protocolo utilizado nos permitió entonces, analizar isotipos de CSA específicas para VFA en CMN obtenidas de órganos linfoides de los bovinos: IgM, IgG1, IgG2 e IgM. Brevemente, el mismo consistió en sensibilizar placas de nitrocelulosa de 96 pocillos con 40 µg/mL del antígeno 146S purificado mediante gradientes de sacarosa, por 16 horas y a continuación, las mismas fueron bloqueadas con PBS-leche descremada 4% por 2 horas a temperatura ambiente. Se sembraron dos diluciones distintas por triplicado ( $5 \times 10^6$  y  $2.5 \times 10^6$  células/mL) de las CMN

---

purificadas de cada órgano linfoide junto con pocillos donde únicamente se agregó medio (control) y se incubaron a 37°C en estufa con 5% de CO<sub>2</sub> durante 16 horas. Transcurrido ese tiempo, se realizó un lavado con agua destilada y 4 con PBS 1X. La detección de los isotipos IgG1 e IgG2 se realizó mediante anticuerpos monoclonales comerciales específicos (Serotec, diluidos en buffer de bloqueo 1:500) revelados luego con un anticuerpo secundario anti-Ig de ratón conjugado con HRP (1:2000), mientras que los isotipos IgA e IgM se detectaron utilizando anticuerpos policlonales de oveja directamente conjugados con HRP (Bethyl, dilución 1/5000 y 1/2500 respectivamente). Para esto, se colocó 50 µl por pocillo de las diluciones correspondientes de los ACM específicos para IgG1 e IgG2 y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Luego, se realizaron 5 lavados con PBS y se colocaron 50 µl del anticuerpo de cabra anti-Ig de ratón conjugado con HRP (KPL) y los sueros de oveja anti IgA e IgM bovinas conjugados con HRP. Luego de 1 hora de incubación a temperatura ambiente y 5 lavados con PBS, se reveló el ensayo utilizando 50 µl por pocillo del cromógeno *True Blue* (KPL) durante 10 minutos en oscuridad. La reacción de corteo con agua destilada, y las placas se dejaron secando boca abajo hasta el día siguiente, donde se contabilizaron los spots correspondientes a CSA específicas para el VFA utilizando una lupa estereoscópica.

#### 4.2.3 Purificación de VFA inactivado

Se partió de concentrados de suspensiones virales inactivadas de VFA O1/Campos provistas por Biogénesis Bagó S.A. El protocolo utilizado fue puesto a punto en nuestro grupo de trabajo a partir de lo descrito en la bibliografía (Barteling & Meloen, 1974; Doel & Mowat, 1985; Fayet, Fargeaud, Louisot, Stellmann, & Roumiantzeff, 1971) y consistió en la purificación de las partículas virales utilizando un gradiente de sacarosa desde 15 a 45% p/v. El gradiente fue preparado con 9 fases de 3 mL cada una de sacarosa diluida en buffer NET (0.1M NaCl-0.004M EDTA-0.05M Tris pH 8.0) utilizando una bomba peristáltica. Las suspensiones virales se mezclaron en una proporción 4:1 con el surfactante aniónico N-lauril sarcosinato de sodio y se incubaron durante 30 minutos a 4°C. Transcurrido este tiempo, se tomaron 4, 5 mL de esta preparación y se sembraron sobre cada uno de los tubos conteniendo el gradiente de sacarosa. A continuación, los gradientes con el concentrado viral se ultracentrifugaron a 45.000 X g durante 16 horas a 4°C para luego colectar fracciones de 1 mL utilizando la bomba peristáltica y comenzando por el fondo del gradiente. La presencia de las partículas virales 146S se determinó por detección de ARN viral en cada uno de las fracciones recolectadas utilizando un



espectrofotómetro (Multiskan® EX, Thermo Scientific, USA) y realizando lecturas a 260nm. Las fracciones que presentaban las mayores densidades ópticas (DO) fueron seleccionadas, diluidas en buffer NET y ultracentrifugadas a 100.000 X g y 4°C durante 16 horas para obtener partículas virales libres de sacarosa. El virus obtenido fue resuspendido en buffer NET, cuantificado por espectrofotometría, alícuotado y almacenado a -80° C hasta su uso.

#### 4.2.4 Puesta a punto de un ELISA de bloqueo en fase líquida (LP-ELISA) específico para VFA O1/Campos

Para la puesta a punto de esta técnica, se procedió primeramente a titular el suero policlonal de conejo anti VFA O1/Campos utilizado para la captura. Para esto, se sensibilizó una placa de 96 pocillos con 4 diluciones seriadas al cuádruple y por duplicado, comenzando en 1:400 con buffer de pegado (carbonato/bicarbonato 50 Mm pH 9.6). A continuación, se procedió a hacer la fase líquida sin sueros y con diferentes concentraciones de virus. El suero policlonal de cobayo y el anticuerpo de cabra anti-Ig cobayo utilizados en los pasos siguientes, se utilizaron en la dilución que se estaban usando en ese momento para LP-ELISA de otras cepas de VFA. Se realizó una curva de absorbancia (Abs) en función de la concentración de suero de conejo captura para cada dilución de virus utilizada y se seleccionó la mayor dilución de suero captura que presentaba la máxima absorbancia para cada dilución de virus. A continuación, se procedió a realizar en una nueva placa 8 diluciones al doble del suero captura a partir de la dilución inmediatamente anterior a la definida en el primer ensayo realizado. Se realizaron los pasos siguientes del ELISA de bloqueo en fase líquida, sin sueros y con diferentes concentraciones de virus. El título del suero captura que definimos como dilución de trabajo, fue la dilución anterior a la máxima dilución de suero que presentó la máxima Abs para cada dilución de virus. Una vez establecido el título del suero policlonal de conejo, se procedió a titular la suspensión viral inactivada para lo cual se hicieron diluciones al doble de la suspensión, comenzando en 1:2 hasta 1:2048 y se realizaron los pasos siguientes del ensayo. Al finalizar, se graficó como se explicó más arriba una curva de Abs promedio en función de la dilución de virus y se eligió para titular en una segunda placa posterior, la dilución que otorgaba aproximadamente el 60% de la máxima Abs obtenida (denominada 1/n), la dilución anterior (1/0.5n) y la posterior (1/2n). Se realizó entonces el último ensayo en presencia de sueros controles positivos (de intensidad baja, media y alta) por duplicado en diluciones seriadas en base 5, y se eligió la dilución de la suspensión viral a utilizar como

aquella en la cual los valores de los sueros control daban títulos acordes a los esperados y que permitían una buena diferenciación según cuán positivos fueran los sueros.

#### 4.2.3 Determinación de anticuerpos séricos totales contra VFA

Los anticuerpos totales específicos contra VFA se determinaron mediante un LP-ELISA a distintos tiempos post-transferencia. El protocolo consistió en sensibilizar placas de 96 pocillos (Microton Greiner Bio-One) con suero policlonal de conejo anti-VFA O1C, diluido 1:1600 en buffer de pegado (carbonato/bicarbonato 50 Mm pH 9.6) y dejarlas a 4°C durante 16 horas. A continuación, se lavaron 3 veces con PBST y se bloquearon con PBST- 1% ovoalbúmina (OVA, Sigma) durante 1 hora a 37°C en agitación. Las muestras de suero se diluyeron en PBST-OVA 1% desde 1:10 a 1:2560 y se colocaron en placas de cultivo (sin adherencia) de 96 pocillos (50 µl/pocillo) junto con 50 µl de sobrenadantes de infección de VFA en células BHK-21 diluidos 1:200 con PBST-OVA 1% y se incubaron 1 hora a 37°C con agitación. Transcurrido ese tiempo, se descartó la solución de bloqueo de las placas de ELISA y se transfirieron las mezclas de suero y virus a las mismas, para incubar 1 hora a 37°C con agitación. Luego, las placas se lavaron 3 veces con PBST y se colocaron 50 µl de un suero policlonal de cobayo anti-VFA O1C diluido 1:3200 en PBST-2% suero normal de bovino-2% suero normal de conejo (PBST-SNB-SNC) por pocillo. Finalizado el tiempo de incubación correspondiente (1 hora a 37°C con agitación), se lavaron las placas 3 veces con PBST y se agregó 50 µl por pocillo de un anticuerpo de cabra anti-Ig cobayo (KPL) diluido 1:2500 en PBST-SNB-SNC y se incubó por 30 min a 37°C con agitación. Las placas se lavaron 3 veces con PBST y se procedió a revelarlas con la mezcla sustrato/cromógeno H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/OPD (O-fenilendiamina) por 15 minutos en oscuridad. La reacción se detuvo con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N y se leyeron los valores de DO utilizando un lector automático para microplacas (Multiskan® EX, Thermo Scientific, USA) a una longitud de onda de 492 nm. Los títulos de anticuerpos se expresaron como el log<sub>10</sub> de la dilución de suero que otorgaba el 50% de DO del promedio de Abs de los pocillos control sin suero (Abs que proporcionó el punto de corte del ensayo).

#### 4.2.4 Determinación de los perfiles de isotipos IgG1 e IgG2 de Ac específicos contra VFA en bovinos

El ELISA para la detección de los isotipos IgG1 e IgG2, se realizó según protocolos desarrollados en nuestro laboratorio con anterioridad (Capozzo et al., 1997). Brevemente, se sensibilizaron placas de 96 pocillos (Microlon Greiner Bio-One) con 1 µg/mL de VFA O1/Campos (inactivado y purificado en gradiente de sacarosa como se explicó en la sección 4.2.3) diluido en buffer de pegado (carbonato/bicarbonato 50 Mm pH 9.6), y se incubaron a 4°C durante 16 horas. Luego de 4 lavados con PBST, se bloquearon con buffer de bloqueo (10% suero normal equino (SNE) ,0.02 g/L de timerosal, 9% PBS 10X, 810 mL/L de agua destilada, 1 mL/L de rojo fenol) durante 90 minutos a 37°C. Una vez descartada la solución de bloqueo, se incubaron los sueros en 8 diluciones seriadas en base 2 (desde 1:100 hasta 1:12.800) durante 1 hora a 37°C, diluyendo los mismos en buffer de bloqueo. Las placas se lavaron 4 veces con PBST y se incubaron con anticuerpos de oveja anti-IgG1 o anti-IgG2 bovino (según correspondiera) conjugados con HRP (BioRAD, USA) en dilución 1:10.000 y 1:2.500, respectivamente. Las placas se incubaron 1 hora a 37°C, se lavaron 4 veces con PBST y se revelaron con la mezcla sustrato/cromógeno H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ABTS. La reacción se detuvo luego de 20 min en oscuridad con una solución 2% de fluoruro de sodio (NaF). Los valores de DO se registraron en el lector automático para microplacas a una longitud de onda de 405 nm. Los títulos de Ac se expresaron como el log<sub>10</sub> de la dilución de suero cuya DO fuera igual o mayor al promedio de los sueros control negativos más dos desvíos estándar (DE).

#### 4.2.5 Determinación de anticuerpos séricos anti VFA IgM

El ELISA para la detección del isotipo IgM, se realizó mediante un protocolo desarrollado por nuestro grupo de trabajo (Di Giacomo et.al., manuscrito en preparación) que consistió en un ELISA doble tipo sándwich. Brevemente, se incubaron placas de 96 pocillos con un anticuerpo de oveja anti-IgM bovino (BioRAD, USA) diluido 1:1.000, y se incubaron durante 16 horas a 4°C. Las placas se lavaron con PBST y fueron bloqueadas durante 1 hora a 37°C con buffer de bloqueo (10% suero normal equino (SNE) ,0.02 g/L de timerosal, 9% PBS 10X, 810 mL/L de agua destilada, 1 mL/L de rojo fenol). Por otra parte, las muestras de suero se diluyeron en el mismo buffer de bloqueo, en 8 diluciones seriadas en base 4, comenzando en 1:50. Luego de lavar 4 veces con PBST las placas bloqueadas, se agregó VFA O1/Campos inactivado y purificado (0.4 ng/µl) y se incubó 1 hora a 37°C. Por último, las IgM fueron detectadas usando un suero de cobayo hiperinmune (1:2000) y el posterior agregado de un anticuerpo anticobayo IgG conjugado con HRP (1:1500, KPL). El revelado del ensayo se efectuó con la mezcla sustrato/ cromógeno

---

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/o-fenilendiamina (OPD) y la reacción se detuvo con ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) luego de 20 minutos. Se leyeron los valores de DO utilizando un lector automático para microplacas a una longitud de onda de 492 nm. Los títulos de Ac se expresaron como la máxima dilución de suero que alcanzó una DO igual a la OD media obtenida de 4 sueros negativos  $\pm$  2 desvíos estándar (DE).

#### 4.2.6 Determinación de la avidéz de los anticuerpos anti-VFA

La avidéz de los Ac específicos contra VFA se midió usando el ELISA desarrollado por (Lavoria et al., 2012) con pequeñas modificaciones. Brevemente, se incubaron placas de 96 pocillos (Microlon, Griener Bio-One, Monroe, NC) con 1 ng/ $\mu$ l de VFA O1/Campos inactivado y purificado, diluido en buffer de pegado (carbonato/bicarbonato 50 Mm pH 9.6) durante 16 horas a 4°C. Luego de lavar las placas 4 veces con PBST, se incubaron con buffer de bloqueo (10% SNE ,0.02 g/L de timerosal, 9% PBS 10X, 810 mL/L de agua destilada, 1 mL/L de rojo fenol) por 90 minutos a 37 °C. A continuación, se diluyeron las muestras de suero en buffer de bloqueo, en diluciones seriadas en base 2 comenzando en 1:50. Se incluyeron también junto con las muestras, controles positivos y negativos. Se preparó el doble de volumen de todas las muestras, ya que se prepararon por duplicado, ya que se colocaron por duplicado en dos placas distintas que se incubaron 1 hora a 37°C. Luego, una de las placas se incubó con PBS 1X y la otra con urea 7M (preparada en PBS 1X) por 20 minutos. Después de 5 lavados con PBST, los Ac específicos anti-VFA se detectaron con un anticuerpo anti-Ig bovino conjugado con HRP (1:5.000, Jackson Laboratories). El revelado del ensayo se efectuó con la mezcla sustrato/ cromógeno H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/o-fenilendiamina (OPD) y la reacción se detuvo con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M luego de 15 minutos en oscuridad. Se leyeron los valores de DO utilizando un lector automático para microplacas a una longitud de onda de 492 nm. El índice de avidéz (IA) se calculó como la relación entre la DO de las placas tratadas con urea 7M y las no tratadas (IA% = DO [(urea)/DO (sin urea)] x100).

#### 4.2.7 Producción de VFA O1/Campos en cultivos celulares de BHK-21

La producción de virus se realizó dentro del laboratorio de bioseguridad NSB 4-OIE. Se partió de un cultivo celular de BHK-21 crecido en monocapa con un 80% de confluencia que fue

---

infectado con VFA O1C con una multiplicidad de infección (MOI) de 0.1, es decir 1 unidad infecciosa (DICT) / 10 células. El virus semilla que se utilizó tenía un título viral de  $10^{6.5}$  DICT<sub>50%</sub>/mL. Se incubó el virus con las células en monocapa durante 10 minutos en estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C y luego se agregó medio de cultivo MEM-D con 2% SFB y se incubó por 12 horas. Transcurrido ese tiempo, procedimos a cosechar el virus para lo que se congeló a -80°C y se descongeló a 37°C la suspensión durante tres veces sucesivas. A continuación, se traspasó todo el contenido a un cónico de 50 mL y se centrifugó por 5 minutos a 2000 rpm, para alicuotar luego el sobrenadante en volúmenes de 200 µl. Estos stocks virales fueron guardados a -80°C hasta su uso en titulaciones o seroneutralizaciones virales.

#### 4.2.8 Determinación de anticuerpos neutralizantes séricos contra VFA

Los anticuerpos neutralizantes (AcN) se detectaron mediante un ensayo de neutralización viral en microplaca siguiendo un protocolo modificado en nuestro laboratorio (Pega et al., 2013). Se colocaron en placas de cultivo de 96 pocillos 50 µl de 6 diluciones en base 2 de las muestras de suero diluidas en medio RPMI (desde 1:8 hasta 1:256) y se incubaron a 37°C por 1 hora con 50 µl de VFA O1C activo titulado previamente (100 dosis infectivas en cultivo de tejido (DICT<sub>50%</sub>)). Para el caso de los sueros obtenidos de los terneros *naïve* a distintos tiempos post-infección, se modificó el protocolo para poder detectar AcN aún en títulos muy bajos, como son los esperados en los primeros días de infección, por lo que se utilizaron cuatro diluciones en base 10 de VFA O1C activo titulado previamente (50 µl de cada dilución; 1 a 1000 DICT<sub>50%</sub>). Las diluciones se prepararon a partir de una suspensión stock con un título de  $10^7$  DICT<sub>50%</sub>, el cual fue determinado para cada ensayo permitiendo una variación de  $\pm 0.5 \log_{10}$  respecto del valor esperado. A continuación, se agregó una suspensión de células BHK-21 (100µl,  $3 \times 10^5$  cél/mL) conteniendo 10% de SFB y se incubó por 72 horas a 37°C en estufa con 5% de CO<sub>2</sub>. Los títulos de AcN se expresaron como el número de DICT<sub>50%</sub> neutralizadas por las muestras diluidas, según el método de Reed and Muench (Reed, L.J and Muench, 1938).

#### 4.2.9 Extracción de ARN viral de muestras de suero

El ARN se extrajo de las muestras de sueros (140 µl) obtenidos a los distintos tiempos post-infección con el kit de extracción de QIAGEN (QIAamp® Viral RNA Kit). Brevemente, la muestra

es inicialmente lisada bajo condiciones fuertemente desnaturalizantes para inactivar las RNAsas y para asegurar el aislamiento de ARN viral intacto. En los pasos siguientes, se ajustan las condiciones para lograr la óptima unión del ARN a la membrana y que los contaminantes sean efectivamente lavados y arrastrados fuera de la membrana al utilizar dos buffers de lavado. Finalmente, se obtiene ARN de alta calidad, el cual es eluído de la membrana en un buffer provisto por el kit libre de RNAsa, listo para ser usado o de lo contrario, almacenado a - 80°C.

#### 4.2.10 Extracción de ARN viral de muestras de linfonódulos

En este caso, el ARN se extrajo utilizando Quick-Zol (Kalium Technologies SRL), un reactivo desarrollado para extraer ARN total a partir de células y tejidos, de gran pureza y libre de contaminación proveniente de ADN y proteínas. Todo el material plástico a utilizar durante la extracción fue sumergido en SDS 0,5% por 16 horas para asegurarnos que estuviera libre de RNAsas. Se partió de entre 0.05 y 0.1 gr de tejido al cual se le agregó 1 mL de quick-zol y se homogenizó utilizando un pilón plástico y un eppendorf de 1.5 mL. A continuación, se agregaron 0.2 mL de cloroformo, se incubó a temperatura ambiente por 2 minutos y se centrifugó 10 minutos a 4°C y 12.000 X g. Luego se tomó la fase superior, que es donde se encuentra el ARN, se transfirió a un tubo nuevo y se agregó alcohol isopropílico. Se centrifugó nuevamente por 10 minutos a 4°C y 12.000 X g lo que favorece la formación de un *pellet* (generalmente invisible) de ARN en la base del tubo que fue lavado utilizando etanol 75% y centrifugado por 5 minutos a 4°C y 12.000 X g. Finalmente, el pellet se secó dejando el tubo abierto durante 5 minutos a temperatura ambiente y se resuspendió luego en 25 µl de agua libre de RNAsa. Para facilitar la solubilidad del ARN, los tubos se colocaron 10 minutos en un termobloque a 50°C y luego el ARN fue cuantificado por espectrofotometría a 260 nm y almacenado a -80°C hasta su uso.

#### 4.2.11 Amplificación del plásmido estándar (pGEM-T/genoma VFA) para su uso en RT-qPCR

Inicialmente, se transformaron por shock térmico bacterias DH5-α competentes químicas con cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>). Brevemente, se descongelaron las bacterias competentes en hielo, se agregó 1 µl del plásmido y se incubó en hielo durante 30 min. Luego se colocaron en un baño

---

térmico a 42°C por 90 segundos y se incubaron rápidamente en hielo por 2 min. A continuación, se añadieron 900 µl de medio LB líquido precalentado y se incubaron en un agitador orbital durante 1 hora a 37°C y 200 rpm. Después de centrifugar a máxima velocidad por 30 segundos y eliminar el sobrenadante, se sembraron 100 µl en una placa de agar + ampicilina y se incubó a 37°C o/n. Al día siguiente se eligieron dos de las colonias que habían crecido en la placa y se colocaron en un tubo de 15 mL con medio LB líquido + ampicilina y se dejaron crecer o/n a 37°C en el agitador.

Para obtener el ADN plasmídico purificado, se siguió el protocolo sugerido del kit ADN PuriPrep-P de INBIO-Highway. A continuación, se cuantificó el ADN obtenido utilizando el espectrofotómetro a 260 nm y se calculó el número de copias de plásmido presentes por µL.

Para finalizar se realizó una *colony* PCR con los clones obtenidos de la purificación y el plásmido original como control positivo. La reacción se realizó con la enzima go Taq polimerasa, los *primers* reverso y directo (Epi5s: 5'TTC GAG AAC GGC ACT GTC GG-3' y Epi2a: 5' TCG GGG TTG CAA CCG ACC GC-3') y comenzó con una incubación de 2 min a 94°C seguida por 35 ciclos de amplificación de 10 segundos a 92°C, 15 segundos a 58°C y 30 segundos a 72°C para finalizar con 2 minutos a 72°C. Por último, se corrió un gel de agarosa para corroborar la identidad de los plásmidos.

Con esto obtuvimos un *stock* de bacterias DH5-α conteniendo el plásmido estándar a utilizar en posteriores reacciones de RT-qPCR para realizar la curva de calibración de la técnica.

#### 4.2.12 Detección de ARN viral en muestras de suero o tejido por RT-qPCR

La detección de ARN genómico viral en las muestras extraídas de los bovinos se realizó mediante la técnica de PCR de transcripción reversa en tiempo real. Para comenzar se realizó la transcripción reversa del ARN extraído para sintetizar una cadena de DNA complementario (cDNA) a la cadena de ARN molde. Para esto, se utilizó una transcriptasa reversa (M-MLV, Promega) y un cebador reverso (Epi2a: 5'-TCG GGG TTG CAA CCG ACC GC-3') para amplificar un fragmento de 259 nucleótidos dentro del gen de la polimerasa viral 3D (posiciones 7079 a 7338) del VFA O1/Campos, junto con los demás componentes necesarios para que ocurra la transcripción: la enzima RNAsin junto con su buffer correspondiente, DNTPs y DTTs. La reacción consistió en incubar el material 1hr a 42°C y luego 10 min a 94°C. Los templados de cDNA obtenidos (5µl) o diluciones en base 10 de un plásmido estándar (pGEM-T, Promega) conteniendo el gen de la polimerasa 3D, se utilizaron para reacciones de PCR realizadas con un

---

*master mix* para *Real Time* (SYBR® Green Master Mix BIO-RAD) y el cebador reverso y directo (Epi5s: 5´TTC GAG AAC GGC ACT GTC GG-3´ y Epi2a: 5´ TCG GGG TTG CAA CCG ACC GC-3´). La reacción comenzó con una incubación de 10 min a 95°C, seguida por 45 ciclos de amplificación (15 segundos a 95°C seguido por 1 min a 60°C), y luego del ciclado se hizo una etapa de disociación para detectar amplificación específica. Con las diluciones de los plásmidos se construyó una curva estándar para correlacionar los valores de CT obtenidos de las muestras de suero con el número de copias de genoma de VFA/mL.

Tanto la secuencia de los cebadores como el plásmido estándar, fueron generosamente cedidos por el Dr. Guido König del Instituto de Biotecnología del CICVyA.

### **4.3 Análisis Estadísticos**

Las diferencias entre las cinéticas y los títulos de anticuerpos medidos por diferentes técnicas serológicas (LP-ELISA, ELISA indirecto de isotipos o seroneutralización viral) en los animales utilizados para el ajuste de protocolo de la transferencia pasiva de anticuerpos (dentro de un mismo grupo o entre grupos experimentales), se analizaron mediante un modelo de análisis de varianza (ANOVA) con medidas repetidas (MR) seguido por el test de Tukey (con nivel de significancia  $\alpha=0,05$ ) para comparaciones múltiples, con el fin de analizar si existían diferencias significativas entre los títulos de anticuerpos medidos a los distintos tiempos post-transferencia. Para estimar la vida media de los anticuerpos totales anti-VFA medidos por LP-ELISA, las curvas de los títulos obtenidos para cada grupo experimental fueron sometidas a análisis de regresión lineal. La vida media (en días) se calculó como el  $\log_{10}(0,5)$  / pendiente estimada (Bucafusco et al., 2014). Los análisis se realizaron con el Software Estadístico Infostat.

Las diferencias entre las medias de los títulos de anticuerpos y los valores totales de CSA obtenidos para cada órgano o isotipo analizado y entre tratamientos (bovinos naïve, transferidos con suero de 7 y 26 dpv o vacunados y luego infectados) se analizaron por ANOVA de dos vías y las comparaciones entre medias apareadas se efectuaron utilizando el método de Bonferroni.

La viremia total para cada animal fue calculada empleando el software Graph-Pad Prism 5.0 (Graph Pad Software Inc.) para estimar el área bajo la curva (AUC) en el curso temporal de la viremia observada en la Figura 6(a). Las comparaciones de viremia total entre animales con o sin generalización de la enfermedad, así como las comparaciones entre el número de copias de ARN viral en los distintos LN extraídos de los animales transferidos con suero de 7 o 26 dpv, se



llevaron a cabo mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney (análisis de datos que no siguen una distribución normal). Para analizar la correlación existente entre el título de anticuerpos seroneutralizantes previo a la infección y el máximo score clínico o viremia total observados por animal, se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman (Graph-Pad Prism 5.0).

## **5. RESULTADOS**

---

## **5.1 Ajuste del protocolo de transferencia pasiva de anticuerpos contra VFA en bovinos**

Con el propósito de establecer las condiciones experimentales para realizar la transferencia pasiva de anticuerpos en terneros seronegativos para el VFA, así como para determinar el tiempo adecuado de la infección aerógena posterior a la inmunización pasiva, se diseñó un experimento piloto inicial donde se probaron dos volúmenes de plasma transferidos y se siguió en el tiempo la evolución de diferentes parámetros de inmunidad humoral contra el virus.

### 5.1.1 Sangrado de los bovinos, procesamiento del plasma y transferencia a los terneros

Como se detalló en la sección de Materiales y Métodos (diseño experimental), dos volúmenes distintos (2,8 L y 0,28 L) del *pool* de plasma obtenido de los bovinos adultos multivacunados, se transfirieron a sendos grupos experimentales de terneros seronegativos para VFA (n=2 cada grupo). Teniendo en cuenta que la volemia de un bovino es aproximadamente 60 mL/kg y que aproximadamente el 40% de ese volumen está conformado por el suero de la sangre, los animales transferidos con 0,28 L (#304 y #306) recibieron aproximadamente entre 7% y 9% de plasma respecto del volumen propio, mientras que los animales transferidos con 2,80 L (#305 y #308), recibieron una cantidad cercana al 90% del volumen propio (tabla 1).

# animal	peso (kg)	volemia / vol. suero (L)	vol. de <i>pool</i> recibido (L)	% de plasma recibido respecto del propio
304	130	7,8 / 3,12	0,28	8,97%
306	165	9,90 / 3,96	0,28	7,07%
305	170	10,2 / 4,08	2,8	68,74%
308	127	7,62 / 3,05	2,8	91,80%

**Tabla 1:** Información de los terneros transferidos pasivamente con suero inmune. Para cada animal se informa el peso, volemia, volumen estimado de suero propio, cantidad del *pool* recibido y su porcentaje respecto del propio volumen.

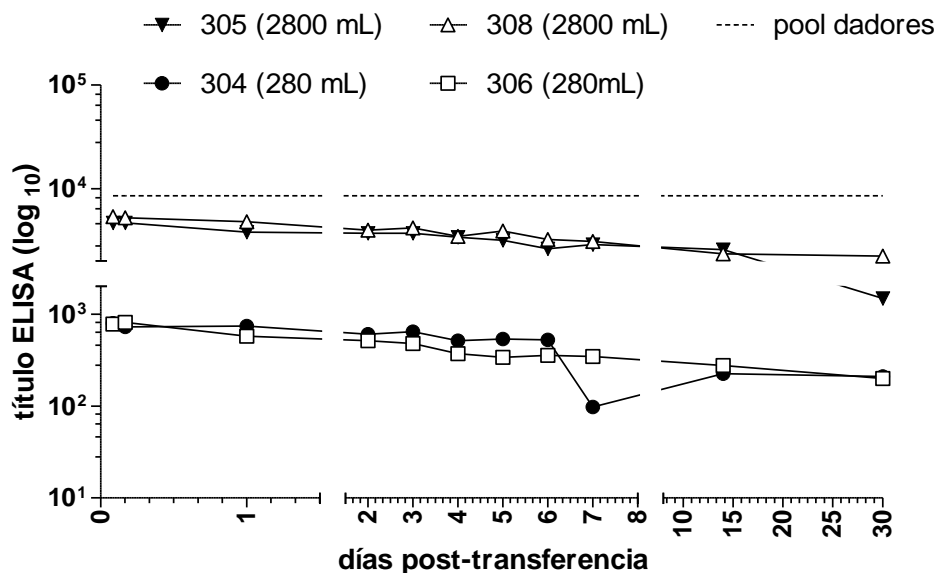
---

### 5.1.2 Evolución de diferentes parámetros serológicos de respuesta humoral anti-VFA adquirida pasivamente

La evolución de diversos aspectos serológicos de los anticuerpos transferidos fue evaluada desde tiempos muy cercanos al procedimiento (2 y 4 horas post-inmunización pasiva), luego cada 24 horas hasta los 7 días posteriores, y finalmente a los 15 y 30 días post-transferencia (dpt). La evolución de los títulos de anticuerpos totales anti-VFA se midieron por el LP-ELISA mientras que las cinéticas de anticuerpos IgG1 e IgG2 específicos se midieron mediante ensayos de ELISA indirectos desarrollados en nuestro laboratorio (Capozzo et al., 1997). Por último, se evaluó también la capacidad seroneutralizante de los anticuerpos transferidos a los distintos tiempos post-transferencia a través de un ensayo de seroneutralización viral en placa.

Para todas las variables estudiadas se observó que la cinética de disminución del título de anticuerpos anti-VFA fue similar, en promedio, entre los dos grupos experimentales independientemente del volumen inicial de plasma recibido y del parámetro evaluado. Consecuentemente, los perfiles de respuesta a través del tiempo fueron similares ya que las curvas variaban de igual manera en ambos grupos ( $p < 0,0001$ ). A su vez, no se detectaron diferencias significativas en la respuesta de los animales asignados a un mismo tratamiento ( $p > 0,05$ ), exceptuando lo observado al medir la cinética de Ac IgG1, donde se observaron diferencias significativas intra-grupo. Sin embargo, debido al bajo número de animales utilizados por grupo, no en todos los casos se pudieron comprobar los supuestos de esfericidad requeridos por el modelo de medidas repetidas utilizado para el análisis de estos resultados.

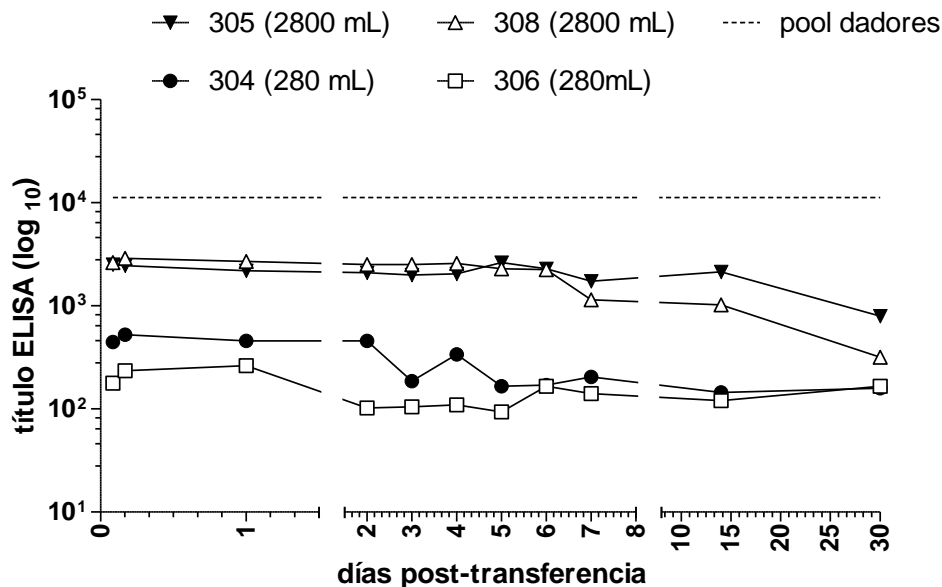
Los resultados obtenidos en el LP-ELISA no mostraron diferencias significativas entre los títulos medidos entre las 2 y 24 hpt, condición que se mantuvo hasta el 6° dpt para ambos grupos experimentales. Durante las primeras 24 hpt, los títulos observados en el grupo de animales transferidos con 2800mL de plasma variaron entre 0,23 y 0,30 unidades logarítmicas respecto del título del *pool* recibido, mientras que para los animales transferidos con 280mL esta variación fue entre 1,03 y 1,12 unidades logarítmicas. Por su parte, la vida media de los anticuerpos fue de 21,8 días para los animales transferidos con 2800 mL y de 15,6 días para el grupo transferido con 280 mL de plasma. La evolución en el tiempo de los títulos totales de anticuerpos anti-VFA para todos los animales inmunizados pasivamente se muestra en la Figura 1.



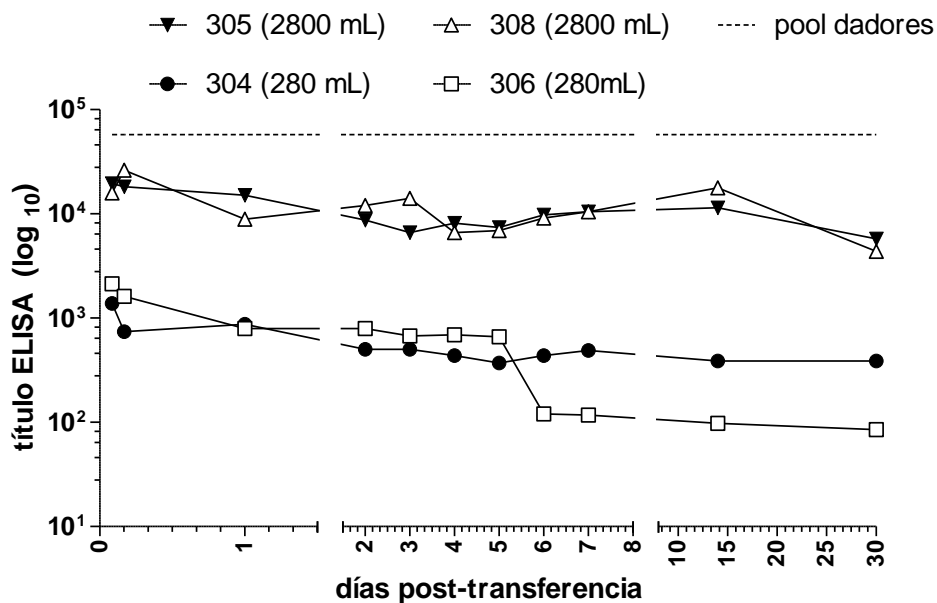
**Figura 1: Cinética de Ac totales anti-VFA medidos por LP-ELISA.** Títulos de anticuerpos totales obtenidos de muestras de terneros seronegativos para VFA transferidos con plasma inmune de bovinos vacunados. Cada línea corresponde a un animal individual y la línea punteada superior indica el título de Ac anti-VFA de la preparación de plasma que se transfirió a los terneros. Los títulos se expresan como el log<sub>10</sub> de la dilución de suero cuya DO fuera igual al 50% del promedio de la de los controles sin suero.

A continuación, se analizaron las cinéticas de anticuerpos anti-VFA de los isotipos IgG1 e IgG2 (Figuras 2 y 3, respectivamente). Durante las primeras 24 hpt los títulos de Ac anti-IgG1 variaron entre 0,64 y 0,67 para el grupo de animales transferidos con 2800mL, y entre 1,72 y 1,52 para los transferidos con 280mL, en ambos casos respecto al título del *pool* recibido. Además, vimos que no existían diferencias significativas entre las medias de los títulos observados hasta los 15 dpt, sólo siendo significativamente menores los valores observados a los 30 dpt ( $p < 0,05$ ).

Una situación similar se observó al analizar los títulos de Ac del isotipo IgG2, excepto que sólo los valores obtenidos a las 2 y 4 hpt fueron significativamente mayores que a los 30 dpt ( $p < 0,05$ ). Los títulos de Ac para este isotipo variaron durante las primeras 24 hpt entre 0,52 y 0,70, y entre 1,53 y 1,84 unidades logarítmicas respecto del *pool* recibido para los animales transferidos con 2800mL y 280mL de suero, respectivamente.

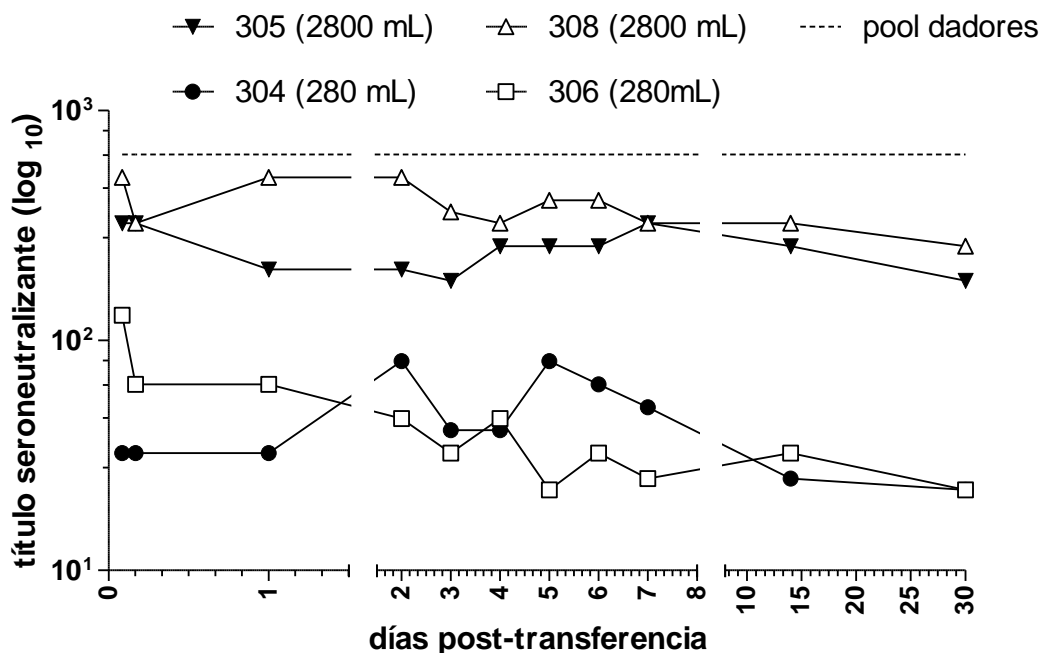


**Figura 2: Cinética de anticuerpos IgG1 anti-VFA medidos por ELISA indirecto.** Se muestran los títulos de IgG1 obtenidos de muestras de terneros seronegativos para VFA transferidos con plasma inmune. Cada línea corresponde a un animal en particular y la línea punteada superior indica el título de IgG1 de la preparación de plasmas que se transfirió a los terneros. Los títulos se expresan como el log<sub>10</sub> de la dilución de suero con DO  $\geq$  al promedio de los sueros control negativos + 2 D.E



**Figura 3: Cinética de anticuerpos IgG2 anti-VFA medidos por ELISA indirecto hasta los 30dpt.** Se muestran los títulos de IgG2 obtenidos de muestras de terneros seronegativos para VFA transferidos con plasma inmune. Cada línea corresponde a un animal en particular y la línea punteada superior indica el título de IgG2 de la preparación de plasmas que se transfirió a los terneros. Los títulos se expresan como el log<sub>10</sub> de la dilución de suero con DO  $\geq$  al promedio de los sueros control negativos + 2 D.E.

En relación a los títulos de Ac seroneutralizantes, observamos que la variación de títulos entre las primeras 24 hpt se encontraba entre 0,21 y 0,31 unidades logarítmicas para el caso de los animales transferidos con 2800mL del *pool*, y entre 1,01 y 1,16 para el grupo transferido con 280mL (Figura 4). Para este parámetro se observó una mayor dispersión de los datos en comparación con las anteriores técnicas, y no se observaron diferencias significativas entre las medias de los títulos medidos a los distintos tiempos posteriores a la transferencia.



**Figura 4: Cinética de anticuerpos seroneutralizantes específicos para VFA medidos por un ensayo de neutralización viral en placa.** Se muestran los títulos de anticuerpos obtenidos de muestras de terneros seronegativos para VFA transferidos con suero inmune. Cada línea corresponde a un animal en particular y la línea punteada superior indica el título de AcN de la preparación de plasmas que se transfirió a los terneros. Los títulos se calcularon como el  $\log_{10}$  de la dilución recíproca del suero requerida para neutralizar el 50% de 100 DICT<sub>50</sub> del VFA 01/Campos.

## **5.2 Infección por vía oronasal de bovinos naïve transferidos pasivamente con anticuerpos anti-VFA**

Con los resultados obtenidos en el ensayo piloto para la puesta a punto de la transferencia pasiva de anticuerpos anti-VFA en bovinos *naïve* descrito en la sección anterior, se decidió trabajar con un volumen de transferencia de tres litros de suero por animal. A su vez, en base a

---

la velocidad de detección y el tiempo medio de permanencia de los anticuerpos en la sangre circulante de los terneros transferidos, se decidió realizar la infección oronasal dentro de las 24 h post-transferencia, de forma de tener niveles de inmunidad humoral sérica similar a los de las preparaciones de plasma que se utilizarían para la inmunización pasiva. Para el experimento se utilizaron dos *pool*es de plasma obtenidos a dos tiempos distintos post-vacunación y que diferían por lo tanto en la composición isotópica de las inmunoglobulinas, así como también en los títulos de Ac totales y neutralizantes anti-VFA. Se procedió entonces a vacunar a ocho bovinos adultos con una vacuna monovalente para la cepa O1/Campos de los cuales se extrajeron muestras de sangre a los 7 dpv (n=4) y a los 26 dpv (n=4). Tal lo detallado en el capítulo Materiales y Métodos (sección A 4.1.3), se obtuvo el plasma de la sangre extraída en cada caso y se conformaron 2 *pool*es reuniendo las muestras tomadas a los 7 y 26 dpv. Estos *pool*es fueron transferidos a dos grupos experimentales de terneros compuestos por tres animales cada uno que fueron infectados por vía aerógena con VFA O1/Campos 16 horas después de realizada la transferencia pasiva. Además, se agregó un grupo control de la infección compuesto por dos terneros *naïve* que fueron infectados en el mismo momento que los seis animales transferidos pasivamente y un grupo compuesto por dos animales que fueron infectados a distintos tiempos post-vacunación, 7 dpv y 26 dpv.

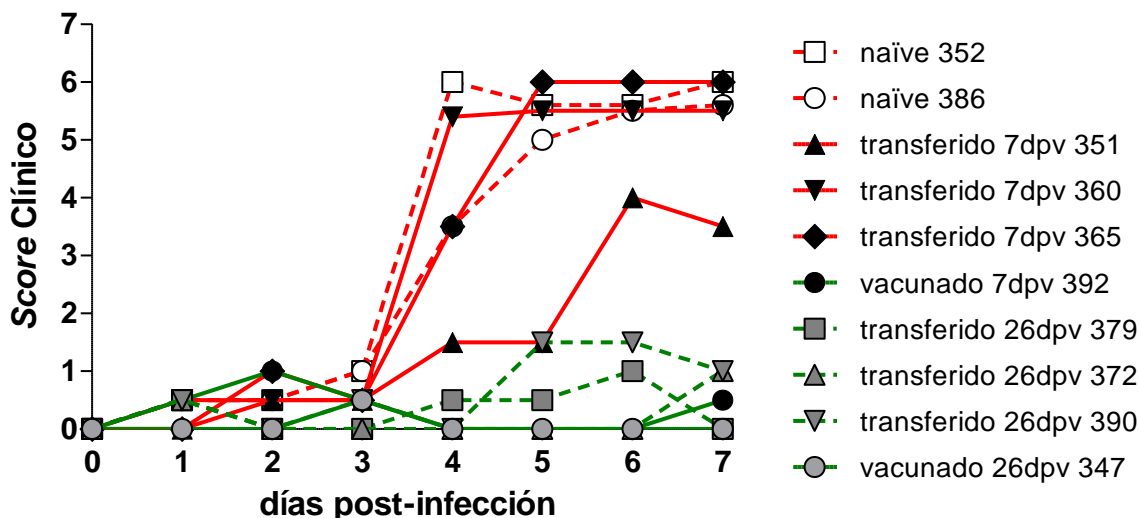
### 5.2.1 Determinación de los signos clínicos

Como se detalló en la sección B 4.1.4 de Materiales y Métodos, los animales fueron monitoreados diariamente durante los siete días siguientes a la infección por vía aerógena para observar la aparición de vesículas en la región oronasal y en las patas. Durante ese tiempo también se les midió la temperatura rectal y se tomaron muestras de sangre diariamente para su posterior análisis. Con los datos registrados se asignó un *score* clínico a cada animal de acuerdo a lo que se detalla en la figura 5.

Al graficar la evolución del *score* clínico de cada animal infectado durante los 7 posteriores a la infección (Figura 5), observamos que se podían distinguir dos grupos definidos con claridad. Por un lado, un grupo de animales con *score* clínico elevado y generalización de la enfermedad a las extremidades luego del 3 dpi, compuesto por los animales transferidos con suero de 7dpv (#360, #365 y #351) y los dos animales del grupo control de la infección (#352 y #386). Por el otro, un grupo de animales con puntuación baja, que en general correspondió únicamente a un aumento leve de la temperatura corporal, y sin generalización de la enfermedad a las



extremidades, que incluía los animales transferidos con plasma de 26 dpv (#379, #372 y #390) y los vacunados y luego infectados (#392 y #347).



**Figura 5: Progresión de los síntomas clínicos en bovinos infectados por vía oronasal con VFA O1/Campos.** El gráfico muestra la puntuación clínica diaria de los bovinos infectados hasta el séptimo día post-infección. A cada individuo se le asignaron 0,5 puntos por temperaturas entre 39,1°C y 40°C, 1 punto por temperatura mayor a 40°C, 1 punto por lesiones en la región nasal o bucal y 1 punto por cada pata lesionada, pudiéndose alcanzar un score clínico máximo de 6 puntos.

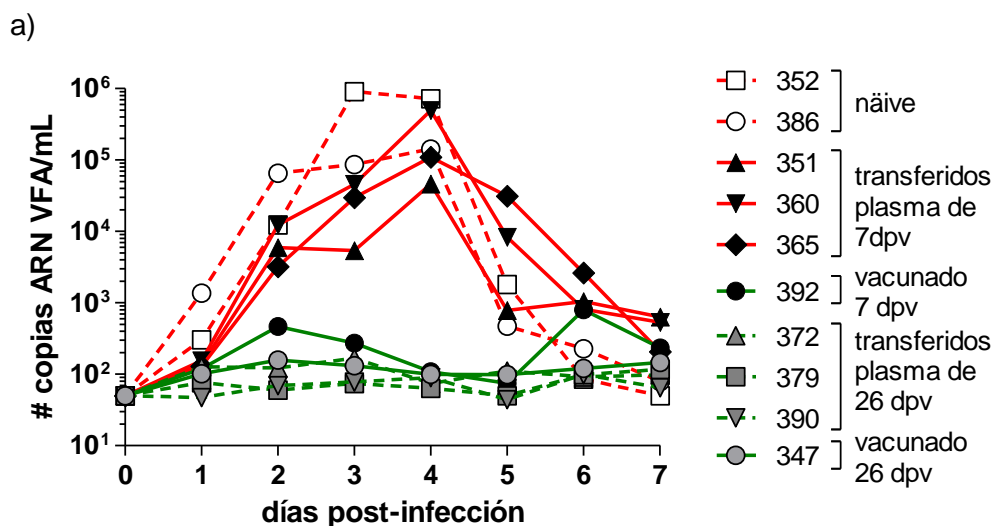
Dentro del grupo de animales que presentó score clínico elevado, el #351 (transferido con plasma de 7 dpv) obtuvo un score clínico menor ya que presentó lesiones únicamente en dos de las patas, mientras que el resto de los animales del grupo, en las cuatro. Además, todos los animales de ese grupo presentaron lesiones en la lengua y/o encías. Dentro del grupo de animales que presentaron score clínico bajo, el #379 (transferido con suero de 26 dpv) presentó una puntuación menor que los otros dos animales del mismo grupo ya que no se observaron lesiones de ningún tipo, mientras que los otros dos presentaron lesiones en lengua y/o encías.

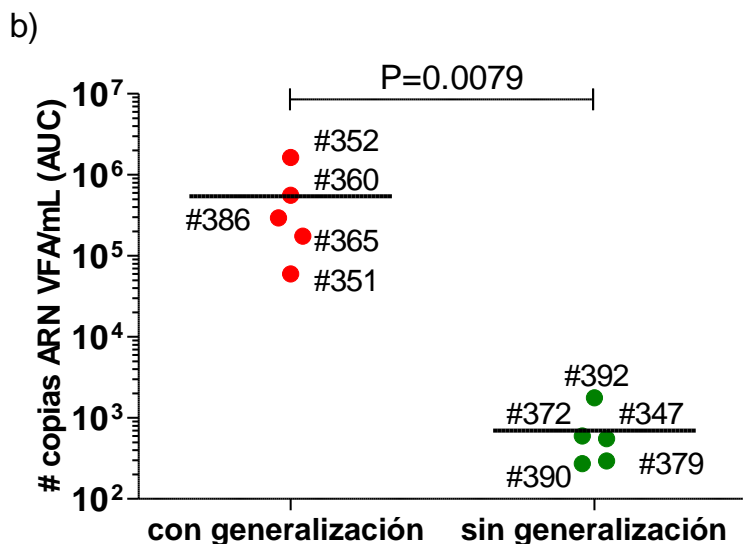
### 5.2.2 Detección de ARN viral en muestras de suero por RT-qPCR

Al analizar la progresión de la viremia en el tiempo, se observó una agrupación de los animales similar a la observada en el score clínico (Figura 5). Como puede observarse en la Figura 6a, los animales *naïve* y los transferidos con plasma de 7 dpv presentaron un máximo de

viremia, por encima de las  $4 \times 10^4$  copias de ARN/mL, entre los 3 y 4 días post-infección. En cambio, en los animales transferidos con plasma de 26 dpv, así como también en los vacunados y luego infectados, se observó que los niveles de ARN viral circulantes se mantuvieron bajos durante toda la semana posterior a infección.

Estos resultados demuestran una correlación directa entre la severidad de los síntomas observados y la concentración de virus circulante después de la infección. Para analizar más en profundidad esta correlación, se calculó la viremia total por animal como el área bajo la curva (AUC) del curso temporal observado en la figura 6a. A continuación, se compararon esos valores utilizando el test de Mann-Whitney (no paramétrico), observándose que la viremia total detectada en los animales que no presentaron generalización de la enfermedad a las extremidades era significativamente menor que la detectada en animales que mostraron signos clínicos de la enfermedad ( $P = 0,0079$ , Figura 6b).





**Figura 6: Viremia observada en los bovinos luego de la infección por vía oronasal. (a)** curso temporal de la detección de ARN viral medida por RT-qPCR para cada animal infectado. Los resultados se expresan como el número de copias de ARN viral por mL de suero. **(b)** Comparación de la viremia total observada hasta el 7dpi entre los terneros que presentaron generalización de la enfermedad y los que no (test estadístico de Mann-Whitney). Las barras horizontales indican las medias para cada grupo y la significancia estadística se muestra en la parte superior del gráfico ( $P=0,0079$ ).

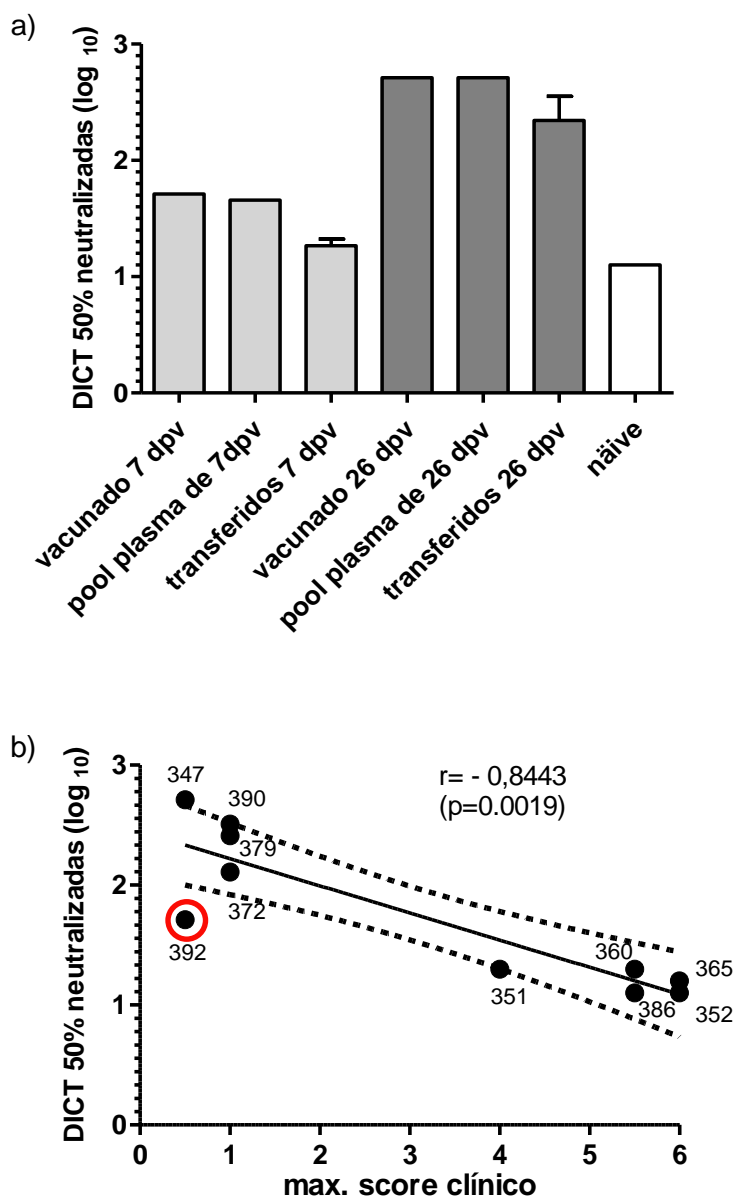
### 5.2.3 Análisis de la inmunidad de los terneros previo a la infección

Con el propósito de entender el rol de la inmunidad pre-existente a la infección en los terneros, así como su relación con los signos clínicos y la viremia observados luego de la misma, analizamos los títulos de anticuerpos seroneutralizantes en las muestras de suero recolectadas en el momento previo a la infección por vía oronasal y de los *poles* transferidos a los terneros.

Como se muestra en la Figura 7a observamos que los títulos de anticuerpos seroneutralizantes de los animales transferidos con plasma de 7 dpv, así como del animal vacunado e infectado 7dpv, eran aproximadamente 10 veces menores que los de los animales transferidos con plasma de 26 dpv y el animal vacunado e infectado 26 dpv. Cabe destacar que los títulos observados en los animales transferidos respecto del *pool* de plasma recibido (1,66 para el *pool* de plasmas obtenidos a los 7 dpv y 2,71 para el de 26dpv), resultaron según lo esperado a partir de los ensayos de ajuste del protocolo de transferencia pasiva de anticuerpos,

encontrándose en promedio, el título de los animales transferidos 0,38 log por debajo del *pool* recibido.

Por otra parte, utilizando el coeficiente de correlación de Spearman ( $r$ ) hallamos una correlación inversa con significancia estadística entre los títulos de Ac seroneutralizantes previos al desafío y el *score* clínico máximo obtenido para cada animal (Figura 7b;  $r=-0,8443$ ,  $p=0,0019$ ). Es decir que los animales transferidos con plasma de 7dpv presentaron títulos de AcN bajos y *score* clínico elevado mientras que los animales transferidos con plasma de 26dpv no mostraron generalización de la enfermedad (*score* clínico bajo) y desarrollaron títulos de AcN más elevados. De manera similar, el coeficiente fue calculado para la viremia total de cada animal, calculada como el área bajo la curva (Figura 6b), y el título de Ac seroneutralizantes resultando también inversamente relacionados ( $r= -0,8659$ ,  $p=0,0011$ ).



**Figura 7: Respuesta de Ac neutralizantes (AcN) antes de la infección por vía oronasal y su correlación con la patogenicidad observada luego del desafío. (a) niveles de AcN en las diferentes muestras de suero obtenidas de los animales en el momento previo a la infección por vía oronasal y de los pools utilizados para transferir a los terneros. Los títulos están expresados como log<sub>10</sub> del número de DICT<sub>50%</sub> neutralizadas por mL de suero diluido 1:32 (índice seroneutralizante). Las barras de los grupos de animales transferidos pasivamente corresponden a la media ± DE (n=3) (b) Análisis de la correlación existente entre el título de anticuerpos seroneutralizantes previo a la infección por vía aerógena y el máximo score clínico observado para cada animal (# animales transferidos con plasma de 7 dpv: 351, 360, 365); # animales transferidos con plasma de 26 dpv: 390,379, 372); # animal vacunado e infectado 7dpv: 392; animal vacunado e infectado 26 dpv:347). Las líneas punteadas indican un intervalo de confianza del 95%, y se muestra el coeficiente de Spearman ( $r$ ) y su correspondiente significancia estadística ( $p$ ).**

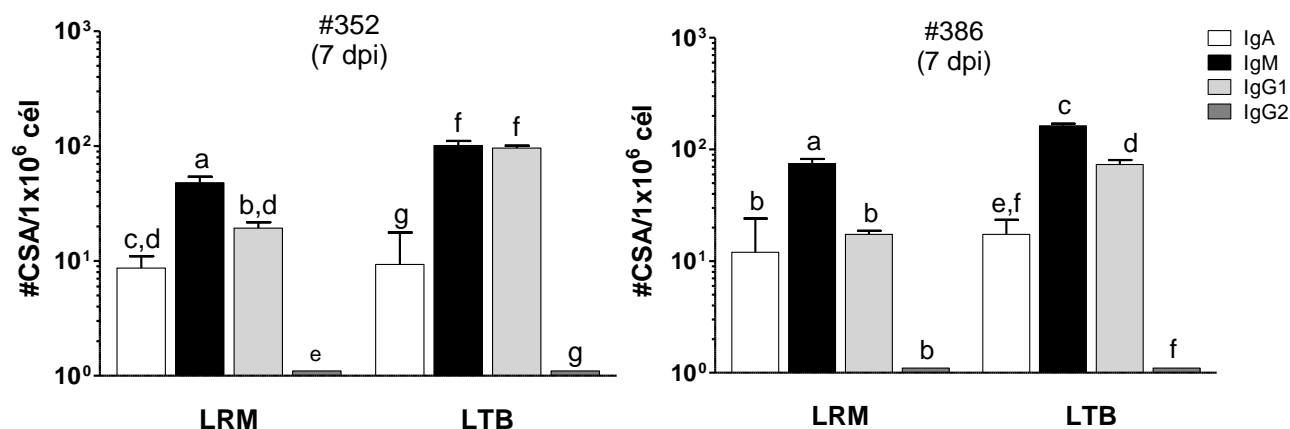
---

Con esta correlación es posible explicar la diferencia en la severidad de los síntomas observados entre los dos grupos experimentales de terneros transferidos con los distintos *pooles* de plasma. Este fenómeno, sin embargo, no se logra ver tan claramente en el animal # 392 vacunado e infectado por vía oronasal a los 7 dpv (Figura 7b), que presentó un *score* clínico máximo de 0.5 y a pesar de tener un índice seroneutralizante relativamente bajo al momento de la infección por vía aerógena ( $\log_{10}=1.71$ ). De hecho, como se muestra en la figura 7b, este animal se encuentra fuera del intervalo de confianza del 95%.

Esta última observación indicaría que aunque los anticuerpos sistémicos en títulos suficientemente elevados serían suficientes para impedir por sí solos el progreso de la infección aerógena hacia tejidos distantes y producir generalización de la enfermedad, la vacunación parecería generar otros mecanismos inmunológicos protectores que complementarían el efecto neutralizante de los AcN sistémicos pre-existentes a la infección, lo cual es particularmente visible en tiempos tempranos post- infección.

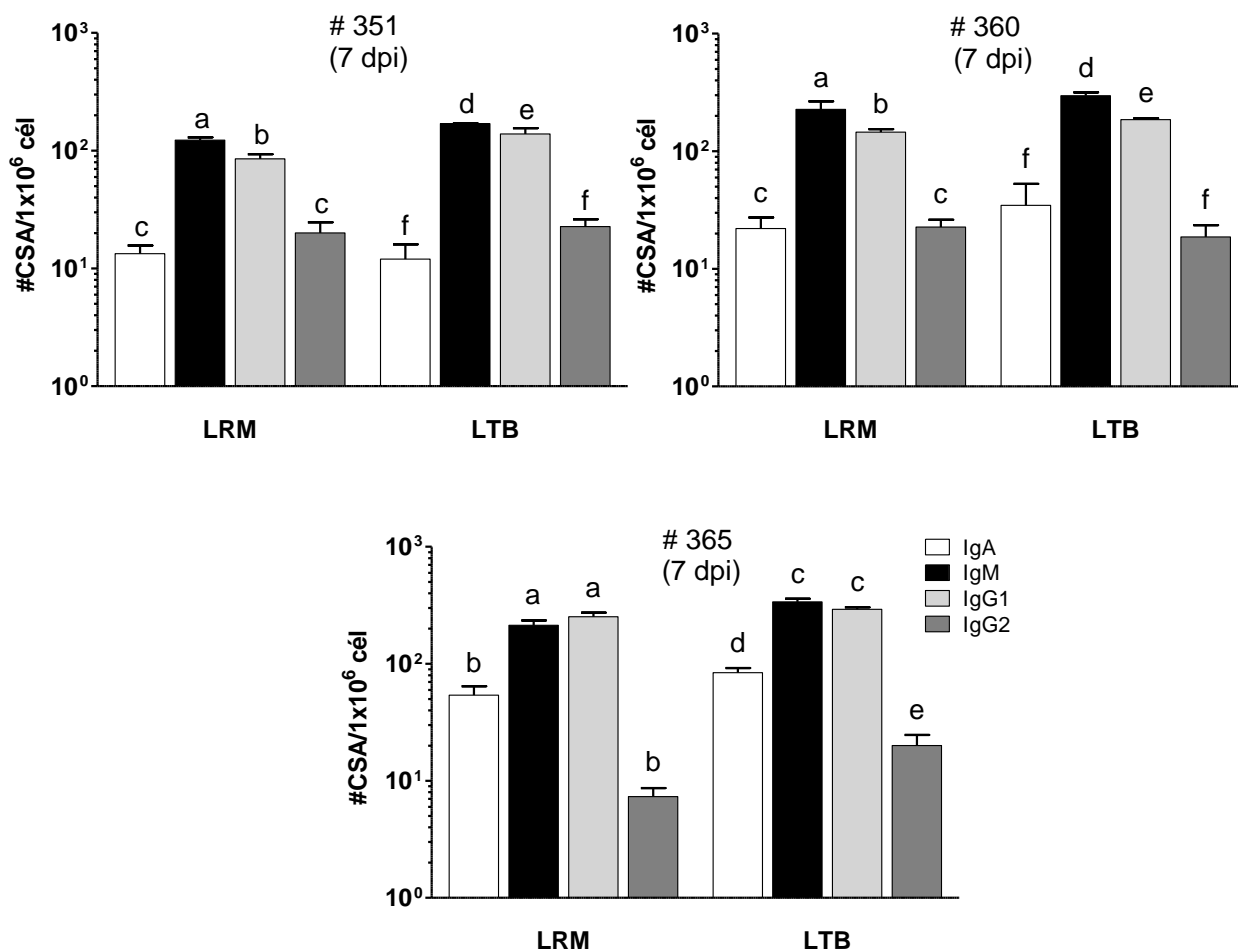
#### 5.2.4 ELISPOT específico para VFA en bovinos

Para analizar más en profundidad el impacto de la inmunidad pre-existente en los terneros en el desenlace final del desafío viral, analizamos la progresión de la respuesta de anticuerpos específicos para VFA en linfonódulos drenantes del tracto respiratorio superior e inferior a los 7 días post-infección. Con este objetivo se procesaron post-mórtem los linfonódulos retrofaríngeos mediales (LRM), los cuales drenan el tracto respiratorio superior, y el linfonódulo traqueobronquial (LTB) que drena los pulmones y otras estructuras del tracto respiratorio inferior y mediante la técnica de ELISPOT se detectaron las CSA específicas contra el VFA para cada isotipo. Para el caso de los animales *naïve*, vimos que los patrones de estimulación en ambos linfonódulos al día 7 post-infección, se correspondían con una respuesta inmune de tipo primaria, tal como había sido descrito con anterioridad por nuestro grupo de trabajo (Pega et al., 2013). Ambos animales analizados presentaron en ambos linfonódulos niveles significativamente mayores de CSA del isotipo IgM respecto del isotipo IgG1, excepto para los LTB en el animal #352 (Figura 8). Por otra parte, se detectaron CSA del isotipo IgA pero en bajo número para ambos órganos estudiados, mientras que no se detectaron CSA del isotipo IgG2 en ningún caso (Figura 8).



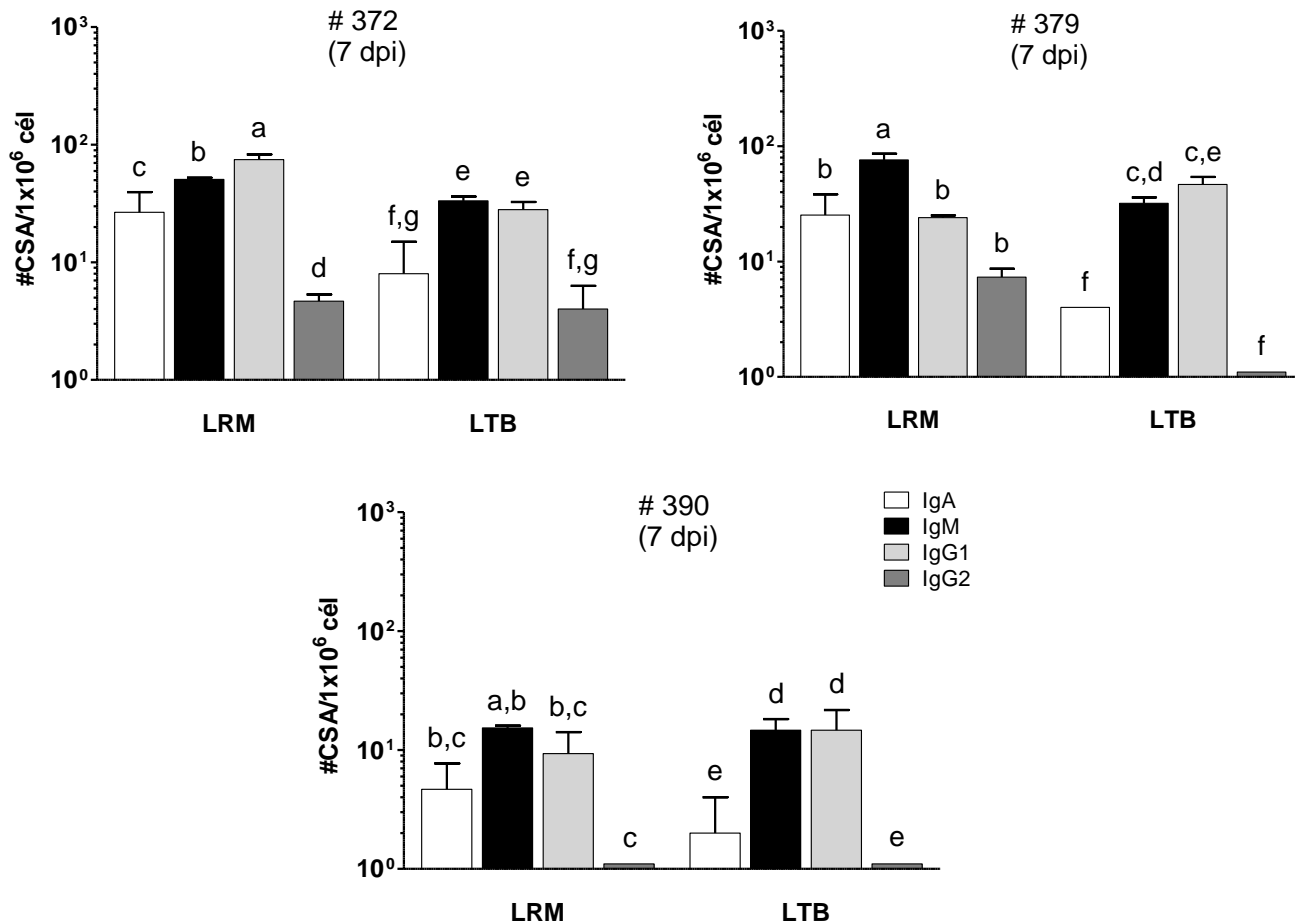
**Figura 8: Respuesta de anticuerpos en mucosas de los terneros naïve luego de la infección por vía oronasal.** Perfiles de isotipos de CSA específicas para el VFA al 7dpi en el linfonódulo retrofaríngeo medial (LRM) y linfonódulo traqueobronqueal (LTB) de los bovinos naïve. Los resultados se expresan como el número de CSA por cada  $10^6$  CMN purificadas  $\pm$  DE y cada barra representa el valor promedio de 3 réplicas para cada isotipo, linfonódulo y animal. Las letras sobre cada barra indican diferencias significativas con otros isotipos en ese mismo tejido y animal.

En el caso de los animales transferidos con plasma de 7dpv (Figura 9) se observó una respuesta de anticuerpos en el tracto respiratorio, tanto superior como inferior, similar a la de los animales naïve. Aunque esta respuesta fue levemente mayor para este grupo de animales, la misma preservó el patrón de respuesta primaria, es decir CSA del isotipo IgM en cantidades significativamente mayores que IgG1, seguidas en número por CSA del isotipo IgA e IgG2, excepto para el animal # 365 donde no se vieron diferencias significativas entre ambos isotipos (Figura 9).



**Figura 9: Respuesta de anticuerpos en mucosas de los terneros transferidos con plasma de 7dpv luego de la infección por vía oronasal.** Perfiles de isotipos de CSA específicas para el VFA al 7dpi en el linfónodo retrofaríngeo medial (LRM) y linfónodo traqueobronqueal (LTB) de los terneros. Los resultados se expresan como el número de CSA por cada  $10^6$  CMN purificadas  $\pm$  DE y cada barra representa el valor promedio de 3 réplicas para cada isotipo, linfónodo y animal. Las letras sobre cada barra indican diferencias significativas con otros isotipos en ese mismo tejido y animal.

Al analizar la respuesta generada a nivel local en el grupo de terneros transferidos con plasma de 26 dpv (Figura 10), se vio también un perfil de tipo primario tanto en el LRM como en el LTB, caracterizado como en los casos anteriores por un número de CSA del isotipo IgM mayor o similar que el número de CSA del isotipo IgG1, excepto para el animal # 372 en el LRM. Al igual que lo observado a los 7 días post-infección para el caso de los animales *naïve* y los transferidos con plasma de 7 dpv, el número de CSA del isotipo IgA fue significativamente menor que las del isotipo IgM e IgG1, siendo las secretoras de IgG2 detectadas en cantidades aún menores y únicamente en la mitad de los órganos analizados (Figura 10).

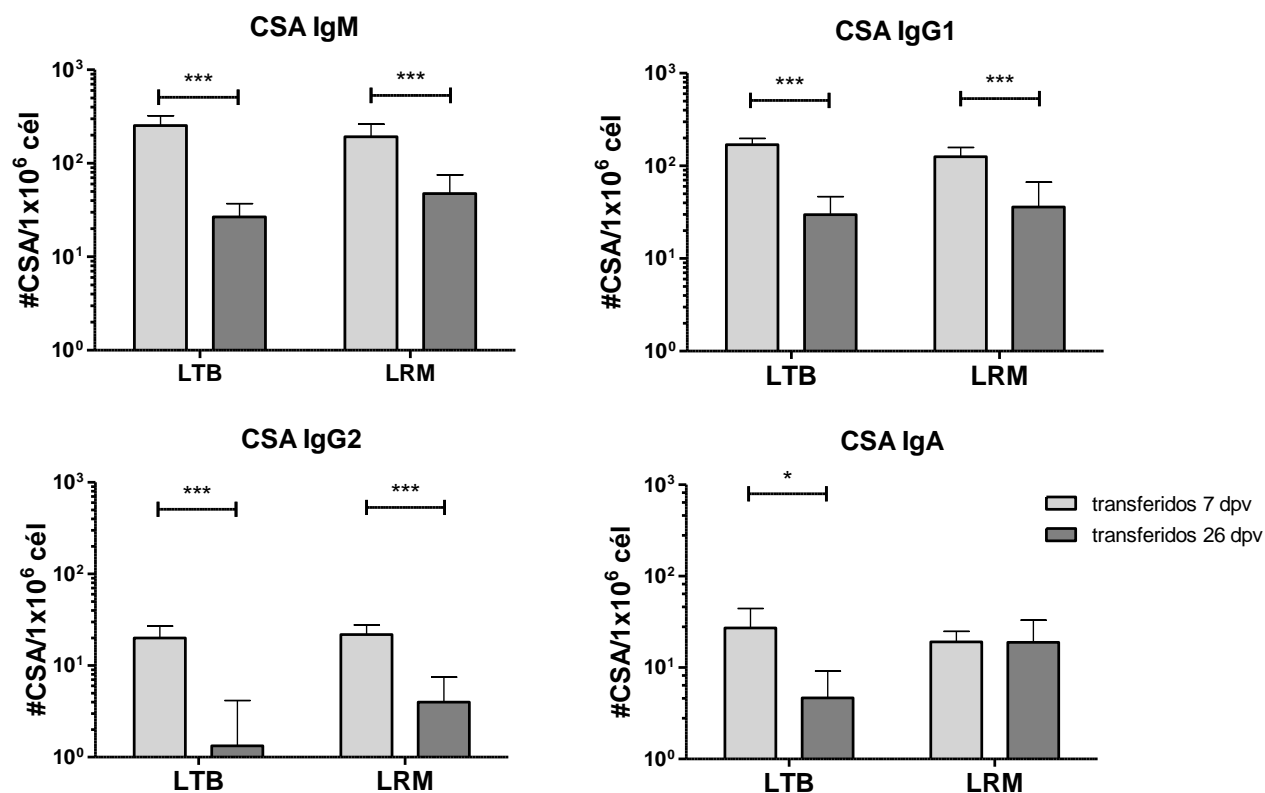


**Figura 10: Respuesta de anticuerpos en mucosas de los terneros transferidos con plasma de 26 dpv luego de la infección por vía oronasal.** Perfiles de isotipos de CSA específicas para el VFA a 7dpi en el linfonódulo retrofaríngeo medial (LRM) y linfonódulo traqueobronqueal (LTB) de los terneros. Los resultados se expresan como el número de CSA por cada  $10^6$  CMN purificadas  $\pm$  DE y cada barra representa el valor promedio de 3 réplicas para cada isotipo, linfonódulo y animal. Las letras sobre cada barra indican diferencias significativas con otros isotipos en ese mismo tejido y animal.

Observamos también que la cantidad de CSA en este grupo fue significativamente menor ( $p < 0,001$ ) que el número medido en el grupo de terneros transferidos con suero de 7 dpv, para todos los isotipos y en ambos órganos, a excepción de las CSA del isotipo IgA en el LRM (Figura 11). Interesantemente, esta misma observación fue registrada para los linfonódulos preescapulares (LPE), órganos linfoides no drenantes de la zona de replicación viral (datos no mostrados en el gráfico). En este caso, los animales transferidos con plasma de 7 dpv también



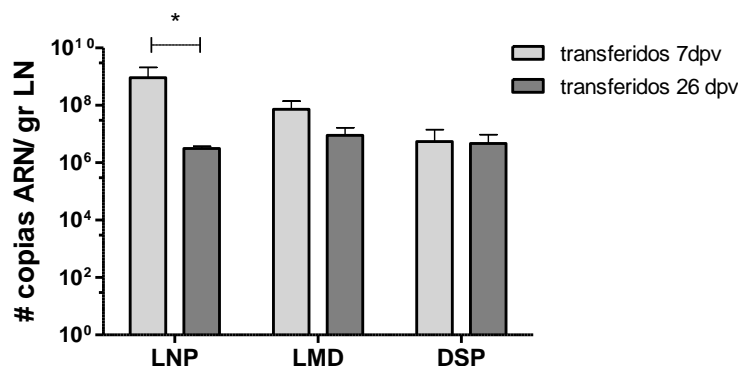
presentaban números predominantes de CSA del isotipo IgM ( $155,98 \pm 85,25$ ) sobre los demás isotipos (IgG1:  $53,5 \pm 22,84$ ; IgA:  $7,3 \pm 4,66$ ), mientras que en los animales transferidos con plasma de 26 dpv, prácticamente no se midió presencia de CSA de ningún isotipo (IgM:  $4,87 \pm 5,18$ ; IgA:  $1,3 \pm 0$  y no se detectaron CSA de las subclases de IgG).



**Figura 11: Comparación de la respuesta de anticuerpos en mucosas de los terneros transferidos con plasma de 7 y 26 dpv luego de la infección por vía oronasal.** Perfiles de isotipos de CSA específicas para el VFA al 7dpi en el linfonódulo retrofaríngeo medial (LRM) y linfonódulo traqueobronquial (LTB) de los terneros inmunizados pasivamente. Cada barra representa el valor promedio del número de CSA por cada  $10^6$  CMN purificadas medidas en tres terneros por triplicado  $\pm$  DE de cada animal. Las diferencias significativas entre grupos están marcadas con \*, donde \* =  $P < 0,05$  y \*\*\* =  $P < 0,001$  (two-way ANOVA).

En concordancia con estos resultados, al analizar el número de copias de ARN viral presentes en distintos tejidos obtenidos al momento de la necropsia (LNP, LMD y DSP) por la técnica de RT-qPCR, se observó que los valores registrados en el linfonódulo poplíteo de los animales transferidos con plasma de 7 dpv eran significativamente mayores que en el grupo transferido con plasma de 26 dpv. Al ser un tejido alejado del sitio de inoculación del virus, esto indicaría nuevamente que la circulación viral en sangre fue menor en los animales pasivamente

inmunizados con la preparación de plasma de 26 dpv. Por su parte, no observamos diferencias significativas entre ambos grupos para otros tejidos más cercanos a la vía de entrada y de replicación del virus tal como el paladar dorsal blando y el lóbulo medio distal del pulmón (Figura 12).



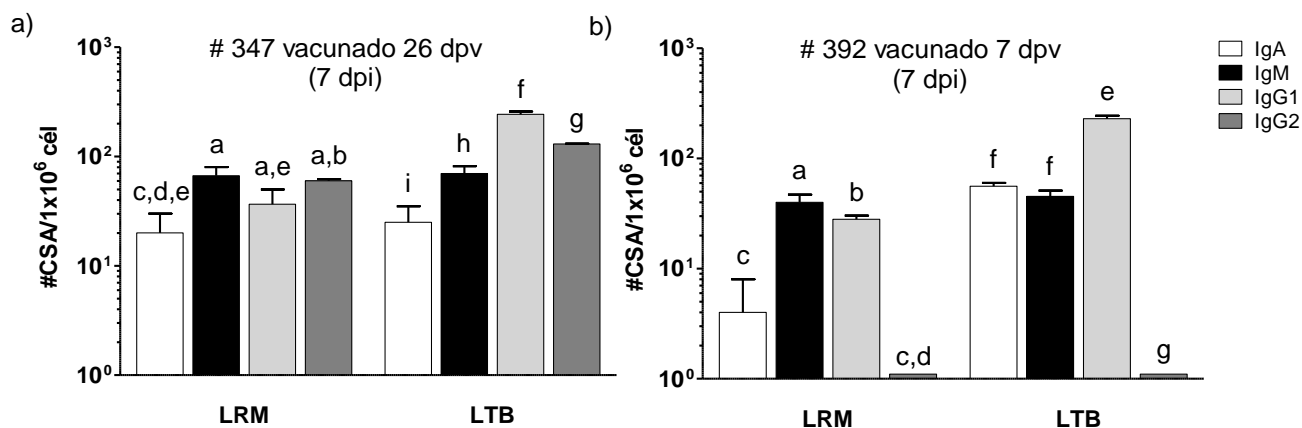
**Figura 12: Comparación del número de copias de ARN viral presentes en tejidos de los terneros inmunizados pasivamente a los 7 dpi.** Las muestras se analizaron por RT-qPCR para detectar el número de copias de ARN por gramo de tejido en el linfonódulo poplíteo (LNP), lóbulo medio distal (LMD) y paladar dorsal blando (DSP). Cada barra representa el valor promedio del número de copias de ARN por gramo de tejido medido en cada uno de los tres terneros  $\pm$  DE para cada grupo experimental. El asterisco denota diferencia significativa entre las medias de ambos grupos ( $p < 0,05$ , T-test no paramétrico, Mann-Whitney).

Estos resultados demuestran que los anticuerpos sistémicos pre-existentes a la infección aerógena previenen la circulación del virus generando dos efectos en el animal. Por un lado, evitan la generalización de la enfermedad a las extremidades y su consecuente desarrollo de los signos clínicos característicos. Por el otro, previenen también la estimulación antigénica de los linfonódulos estudiados lo que provoca una disminución de la respuesta de Ac específica post-infección, tal lo observado a nivel de mucosas en los animales transferidos con suero de 26 dpv.

Por último, analizamos la respuesta inmune generada a nivel local en los terneros que fueron vacunados e infectados por vía oronasal, y observamos que la respuesta adaptativa generada fue totalmente distinta a la descrita con anterioridad para los otros grupos experimentales. El perfil de CSA observado para animal #347 vacunado e infectado a los 26 dpv, se condice con una respuesta inmune de tipo secundaria, es decir, de mayor magnitud y con cambio de predominancia de CSA del isotipo IgM al IgG1. En el LRM el número de CSA del isotipo IgG1 fue similar al de IgM e IgG2, y el número de CSA del isotipo IgA fue ligera pero significativamente menor (Figura 13a). Por otro lado, en el LTB las CSA del isotipo IgG1 fueron las que se encontraron en mayor número, seguidas por las de IgG2 e IgM y, por último, las de IgA (Figura

13a). Estos resultados se condicen con lo publicado previamente por nuestro grupo (Pega et al., 2015).

Para el caso del animal #392, vacunado e infectado a los 7dpv, encontramos que a los 7 días post-infección también presentaba CSA del isotipo IgG1 predominantes ( $229,33 \pm 25,71$ ) sobre los demás isotipos en el LTB (IgM:  $45,33 \pm 10,06$ ; IgA:  $56,00 \pm 4,00$ ;  $P < 0,001$ ). Este tipo de respuesta se condice con una respuesta inmune de tipo secundaria, distinta a la observada para los animales *naïve* o el grupo de animales transferidos con plasma de 7dpv.



**Figura 13: Respuesta de anticuerpos en mucosas de los terneros vacunados luego de la infección por vía oronasal a dos tiempos post-vacunación distintos.** Perfiles de isotipos de CSA específicas para el VFA a 7dpi en el linfonódulo retrofaríngeo medial (LRM) y linfonódulo traqueobronqueal (LTB) de los terneros. Los resultados se expresan como el número de CSA por cada  $10^6$  CMN purificadas  $\pm$  SD y cada barra representa el valor promedio de 3 réplicas para cada isotipo, linfonódulo y animal. Las letras sobre cada barra indican diferencias significativas con otros isotipos en ese mismo tejido y animal.

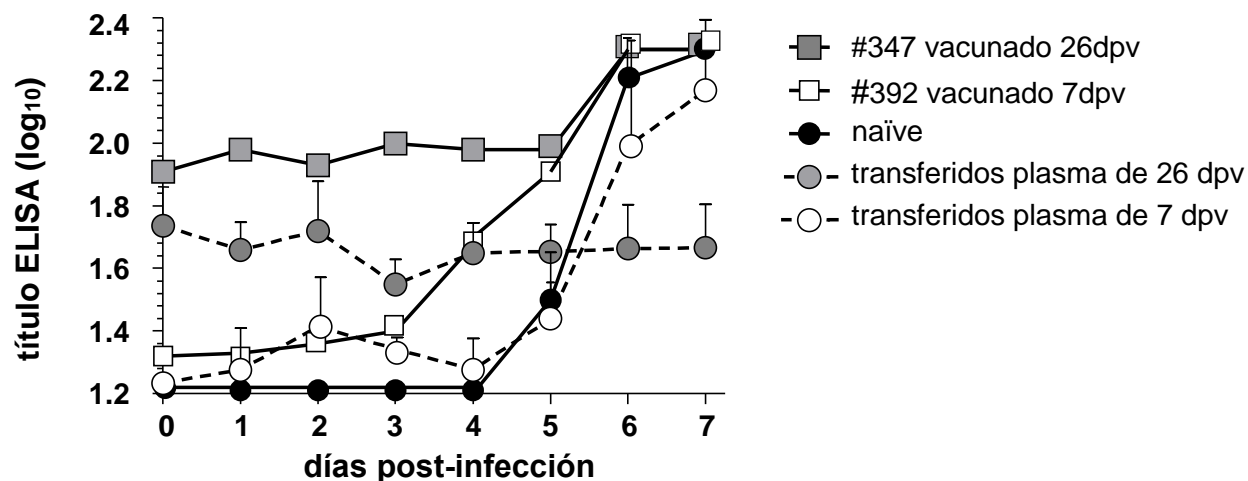
### 5.2.5 Determinación de anticuerpos séricos totales contra VFA

De forma de conseguir más información sobre el impacto de la inmunidad preexistente en el desarrollo de la enfermedad luego de la infección, estudiamos la progresión de la respuesta de anticuerpos totales anti-VFA a nivel sistémico mediante LP-ELISA.

Como puede observarse en la figura 14, el animal #347 vacunado e infectado a los 26 dpv presentó títulos altos de anticuerpos totales específicos contra el VFA al momento de la infección oronasal. Estos se mantuvieron constantes hasta el 5° día posterior a la infección, momento a partir del cual comenzaron a aumentar hasta alcanzar finalmente un título de anticuerpos totales

dos órdenes de magnitud mayor, 7 días luego de la infección. Por el contrario, en el caso del animal #392, vacunado e infectado a los 7 dpv, se observó que al momento de la infección los títulos de anticuerpos totales anti-VFA eran bajos. Sin embargo, y a diferencia del animal #347, el título de anticuerpos comenzó a aumentar de manera constante inmediatamente después de la infección aerógena, para alcanzar finalmente los valores del ternero #347, con un título 10 veces mayor que el observado al momento previo a la infección (Figura 14).

Por su parte, los animales naïve, así como en los transferidos con plasma de 7 dpv (título de anticuerpos séricos totales anti-VFA del *pool* <1,3), mostraron un aumento marcado en los títulos de los anticuerpos específicos a partir del 4to día post-infección. Esto se condice con las respuestas inmunes de perfil primario, observadas para estos animales con anterioridad a nivel local. Por último y tal lo esperado, al momento de la infección los animales transferidos con plasma de 26 dpv (título de anticuerpos séricos totales anti-VFA del *pool* = 1,95) presentaron títulos mucho mayores que aquellos transferidos con plasma de 7 dpv, no registrándose grandes variaciones a lo largo del tiempo hasta los 7 dpi.

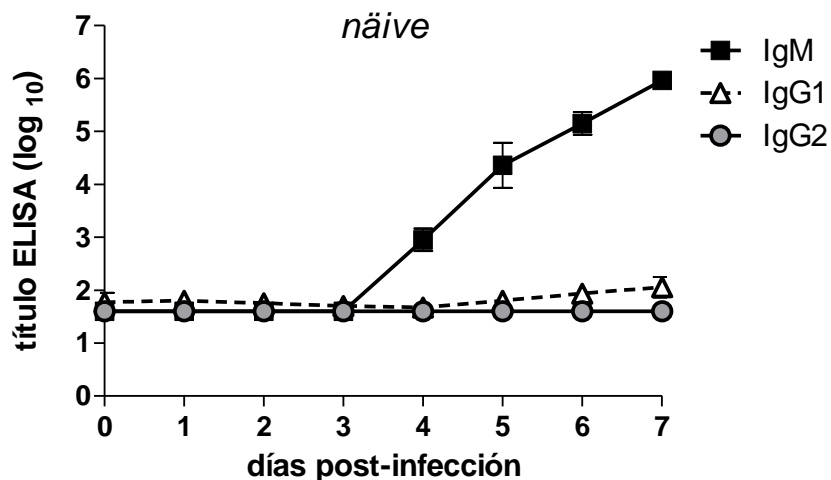


**Figura 14: Respuesta de anticuerpos totales anti-VFA en todos los grupos experimentales luego de la infección por vía oronasal.** La evolución de los anticuerpos totales contra el VFA cepa O1 Campos fueron medidos mediante el LP-ELISA. Los resultados se expresan como el  $\log_{10}$  de los títulos medidos a cada tiempo post-infección. Los títulos obtenidos para los animales naïve ( $n=2$ ) y los inmunizados pasivamente ( $n=3$ ) se expresan el promedio  $\pm$  DE.

En conjunto, estos resultados muestran que el aumento de las respuestas inmunes específicas contra el VFA luego de la infección por vía oronasal, tanto respecto a anticuerpos totales como a número de CSA a nivel local, se restringieron a aquellos animales con una respuesta primaria pre-existente y sugerirán el desarrollo de respuestas secundarias post-infección, tanto a nivel sistémico como en mucosas.

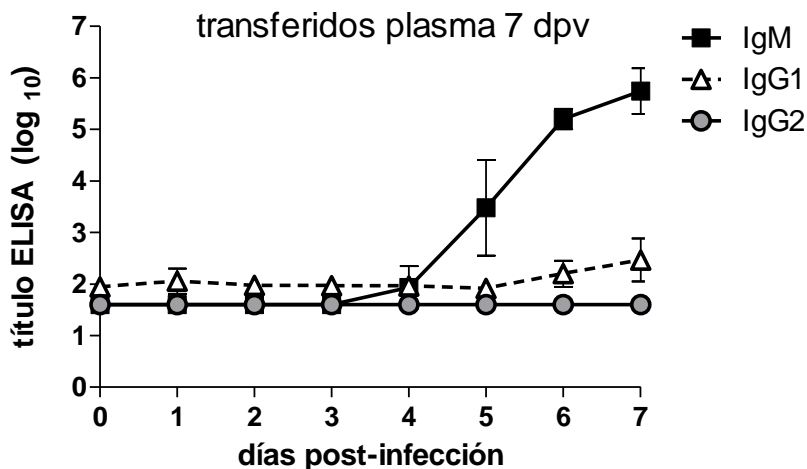
### 5.2.6 Determinación de anticuerpos séricos por isotipos: IgG1, IgG2 e IgM

De forma de avanzar con la caracterización de las respuestas de anticuerpos circulantes post-infección aerógena, los sueros inmunes de todos los animales fueron analizados respecto a la composición isotópica de sus anticuerpos. Para el caso de los animales *naïve* infectados el perfil de inducción de los distintos isotipos correspondió a una respuesta de tipo primaria, coincidiendo con lo ya descrito por nuestro grupo de trabajo (Pega et.al, 2013), con niveles crecientes y predominantes del isotipo IgM a partir del 4to día post-infección y niveles mucho menores de IgG1 e IgG2 que se mantuvieron prácticamente constantes durante los 7dpi estudiados (Figura 15).



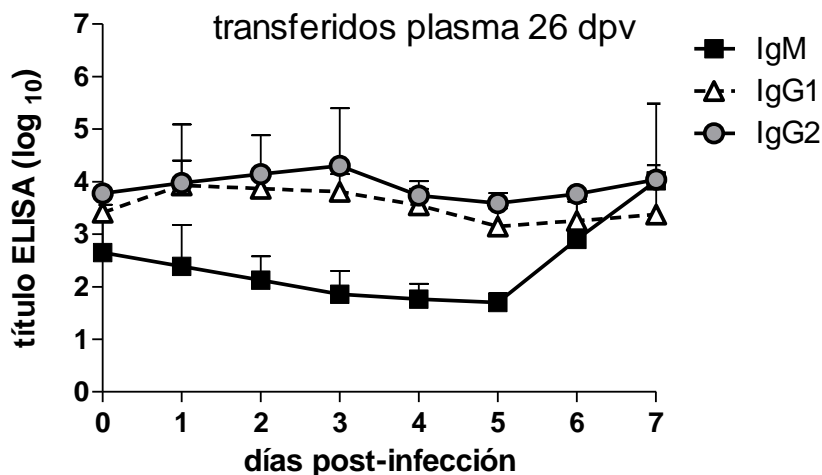
**Figura 15: Isotipo de anticuerpos específicos para el VFA inducidos a nivel sistémico luego de la infección por vía oronasal de terneros *naïve*.** Las muestras de suero obtenidas diariamente durante los 7 días posteriores al desafío se analizaron por un ELISA de isotipo específico para VFA. Cada línea corresponde a un isotipo en particular y cada punto representa el título promedio obtenido de los dos animales infectados  $\pm$  DE.

Una respuesta similar se observó para los animales transferidos con plasma de 7dpv (Figura 16), y aunque el aumento de IgM se vio recién a partir del 5° día post-infección, el título final alcanzado a los 7dpi fue similar al de los animales *naïve*.



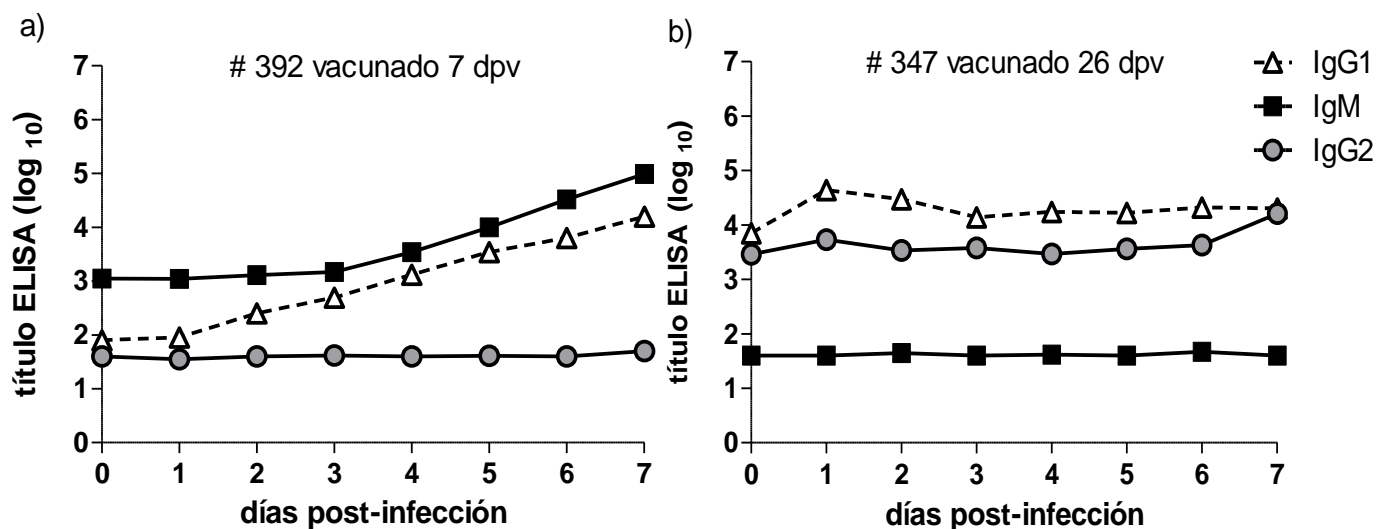
**Figura 16: Respuesta de anticuerpos a nivel sistémico luego de la infección por vía oronasal de terneros transferidos con plasma de 7 dpv.** Las muestras de suero obtenidas diariamente durante los 7 días posteriores al desafío se analizaron por un ELISA de isotipo específico para VFA. Cada línea corresponde a un isotipo en particular y cada punto representa el título promedio obtenido de los tres animales infectados  $\pm$  DE.

Al analizar el grupo de bovinos inmunizados pasivamente con plasma de 26 dpv vimos que, a diferencia de los terneros transferidos con plasma de 7 dpv, los animales ya tenían títulos de anticuerpos detectables para todos los isotipos desde el momento previo a la infección, con valores de IgG1 e IgG2 por encima de los de IgM. Al 5° día post-infección, los valores de IgM comenzaron a aumentar rápidamente hasta alcanzar los valores observados para IgG1 e IgG2, transcurridos 7 días desde la infección por vía oronasal (Figura 17). Esto indicaría la inducción de una respuesta primaria, subyacente a la adquirida pasivamente luego de la transferencia, pero que como lo descrito para las respuestas locales de CSA (Figura 11), fue de menor magnitud que la observada en los animales inmunizados pasivamente con plasma de 7 dpv (Figura 16), y sólo fue evidente a partir de los 6 dpi (Figura 17).



**Figura 17: Respuesta de anticuerpos a nivel sistémico luego de la infección por vía oronasal de terneros transferidos con suero de 26 dpv.** Las muestras de suero obtenidas diariamente durante los 7 días posteriores al desafío se analizaron por un ELISA de isotipo específico para VFA. Cada línea corresponde a un isotipo en particular y cada punto representa el título promedio obtenido de los tres animales infectados  $\pm$  DE.

La infección oronasal en los animales vacunados produjo evoluciones diferentes en los perfiles isotípicos entre los animales infectados a los 26 dpv o a los 7 dpv. En el primer caso, observamos que la infección oronasal no modificó significativamente la composición de isotipos en los animales infectados (Figura 18b), que se mantuvieron prácticamente en niveles constantes durante los 7 días post-infección, siendo predominantes los isotipos IgG1 e IgG2. Este perfil constante sugeriría que la inmunidad preexistente impidió la circulación viral y, por lo tanto, que el VFA actúe como antígeno estimulante a nivel sistémico. Por lo demás, la composición de isotipos en sangre circulante fue coincidente con la observada a nivel local para este mismo animal (Figura 14a) respecto a la detección de niveles altos o predominantes de ambos isotipos de IgG. Respecto del animal #392 infectado a los 7 dpv (Figura 18a), el título de IgM comenzó a aumentar a partir del 4° día post-infección, de forma similar a los animales *naïve* o transferidos con suero inmune de 7 dpv. Sin embargo, a diferencia de estos dos grupos, el animal desafiado a los 7 dpv, exhibió un temprano y constante aumento de los títulos de IgG1 a partir del 2° día post-infección. Este cambio temprano hacia el isotipo IgG1, así como la magnitud del mismo, podría ser interpretado como indicador del desarrollo de respuestas de memoria a partir de la re-estimulación antigénica generada por la infección aerógena.



**Figura 18: Respuesta de anticuerpos a nivel sistémico luego de la infección por vía oronasal de terneros vacunados.** Las muestras de suero obtenidas diariamente durante los 7 días posteriores al desafío se analizaron por un ELISA de isotipo específico para VFA en (a) el ternero vacunado e infectado a los 7 dpv y (b) en el ternero vacunado e infectado a los 26 dpv. Cada línea corresponde a un isotipo en particular y cada punto representa el título obtenido  $\pm$  DE.

En conjunto, estos resultados mostraron que lo observado a nivel sistémico para los distintos grupos experimentales y control, se condecía con lo registrado a nivel local (Figuras 8 a 13).

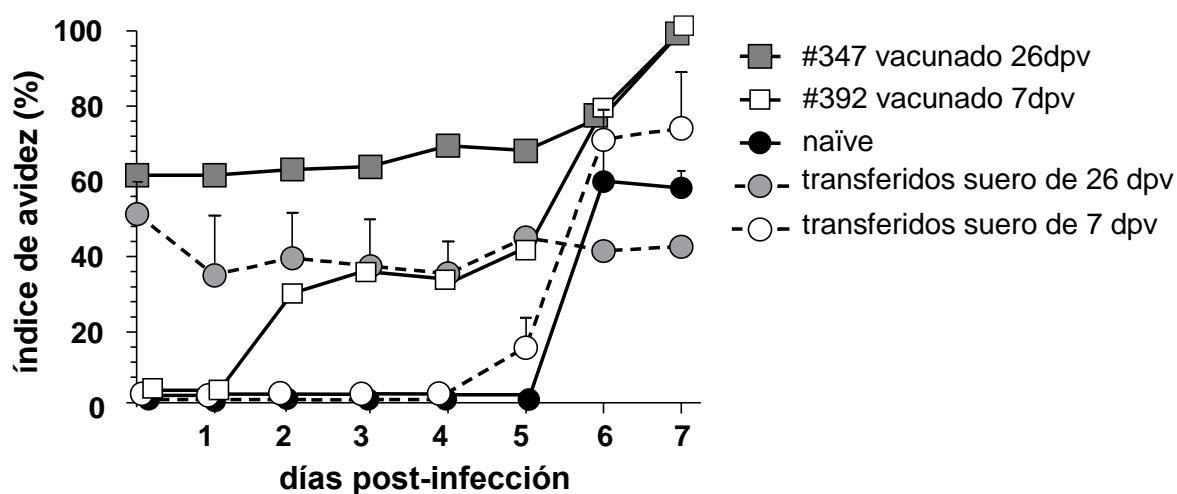
### 5.2.7 Determinación de la avidéz de los anticuerpos anti-VFA

Para completar el análisis de la respuesta inmune sistémica generada luego de la infección por vía oronasal de los terneros sometidos a distintos tratamientos experimentales, analizamos la avidéz de los anticuerpos producidos post-infección mediante un ELISA previamente desarrollado en nuestro laboratorio (Lavoria et al., 2012)

Tal como se muestra en la Figura 19, el perfil de progresión registrado en los animales *naïve* y en los terneros transferidos con plasma de 7dpv fue similar, con índices de avidéz (IA) en aumento a partir del 6° día post-infección, aproximadamente dos días después del comienzo de la respuesta de anticuerpos mediada por IgM a nivel sistémico (Figura 15). Por su parte, los bovinos transferidos con plasma de 26 dpv, no mostraron cambios significativos en el IA a lo largo



del tiempo, en coincidencia con lo observado para los anticuerpos totales (Figura 14) y para los perfiles isotípicos a nivel local (Figura 17). Respecto a los animales vacunados, el bovino #347, infectado a los 26 dpv, ya presentaba valores de avidéz elevados en el suero previamente a la infección, probablemente debido a la maduración de la afinidad de los anticuerpos durante los 26 días transcurridos desde la vacunación hasta el momento del desafío. Luego del desafío viral se observó un aumento en la afinidad, aunque sólo a luego del 5° día post-infección (Figura 19). En forma diferente, el ternero #392, infectado a los 7 dpv, mostró un aumento constante en el IA ya a partir del 1° día post-infección, alcanzando valores similares a los del animal #347 a los 7 dpi. Este aumento temprano y acelerado de los IA, fue coincidente con el incremento descrito para el título de anticuerpos totales (Figura 14) así como el de los títulos de anticuerpos específicos de isotipo IgM e IgG1a nivel sistémico (Figura 18a), reforzando la idea de la generación de respuestas anamnésicas disparadas por la infección, aún en tiempos tempranos post-vacunación.



**Figura 19: Progresión de la avidéz de los anticuerpos totales específicos para VFA luego de la infección por vía oronasal de todos los grupos experimentales.** Las muestras de suero recolectadas durante 7 dpi, se analizaron mediante ELISA de avidéz. Los resultados se expresan como el índice de avidéz (IA) para cada tiempo post-infección. Los índices obtenidos para los animales naïve ( $n=2$ ) y los inmunizados pasivamente ( $n=3$ ) se expresan como los IA promedio  $\pm$  DE.

## 6. DISCUSIÓN

---

Comprender los mecanismos inmunitarios que se encuentran detrás de la protección contra la fiebre aftosa en las especies susceptibles, representa un paso crucial en el desarrollo de vacunas y estrategias profilácticas capaces de controlar la enfermedad en diversos escenarios epidemiológicos.

La generación de inmunidad humoral sistémica específica contra el VFA, ha sido considerada un parámetro fundamental al momento de evaluar el potencial resultado de la infección en el ganado. A partir de esta idea, la evaluación de los niveles de anticuerpos circulantes en sangre contra cepas específicas de VFA es prácticamente el único parámetro que se toma en cuenta para predecir la capacidad de un individuo de evitar la generalización sistémica de la infección y el desarrollo de la enfermedad (Maradei et al., 2008). Sin embargo, como se detalló en la sección antecedentes del plan de trabajo, resultados previos de nuestro grupo de investigación demostraron que, tanto la infección aerógena como la vacunación sistémica, promueven un número de procesos inmunológicos adicionales a la generación de anticuerpos circulantes a nivel sistémico, involucrando tejidos linfoides de mucosas y distantes del sitio de infección o vacunación (Pega et al., 2013, 2015). Esta situación dificulta la interpretación clara del rol y el aporte de los diversos mecanismos inmunitarios puestos en juego luego de la vacunación y la infección.

La infección aerógena de bovinos naïve genera una genuina, rápida y potente respuesta local de anticuerpos a lo largo de todo el tracto respiratorio. Esta respuesta se genera con una ligera anticipación y en forma independiente a la observada a nivel sistémico mostrando, sin embargo, grandes similitudes en el curso temporal y perfiles de isotipos inducidos. En particular, el estudio de estos dos parámetros junto con la cinética de detección del VFA en la sangre de los bovinos infectados, reveló una clara correlación entre el marcado descenso en la detección de ARN viral en sangre y el aumento de IgM específicas en el suero a partir de los 4 dpi, y hasta la desaparición de la viremia a los 5 dpi. Por su parte, la cuantificación de las respuestas de anticuerpos locales observadas en los linfonódulos a lo largo del tracto respiratorio permitió ver que la intensidad de estas respuestas se correspondía con la topografía de la replicación del VFA en los tejidos de la mucosa. De esta manera, aquellos linfonódulos que drenan los sitios de mayor replicación del virus, fueron los que resultaron más estimulados antigénicamente y, por ende, donde se detectaron los mayores números de CSA específicas para el VFA. En conjunto, esta información permite deducir que la infección dispara, tanto a nivel sistémico como a nivel local, una eficiente respuesta primaria de anticuerpos que, independientemente de la activación de

---

células T colaboradoras, logra eliminar al virus de la circulación sanguínea, transcurridos tan sólo 5 días de la infección aerógena (Pega et al., 2013).

El estudio de estos mismos parámetros de inmunidad adaptativa en bovinos, luego de la vacunación intramuscular con una formulación oleosa de alta potencia, mostró que la inmunización sistémica induce una rápida respuesta de anticuerpos neutralizantes, que a la semana post-vacunación alcanzan magnitudes comparables a las de la infección en un tiempo similar (6 dpi). De la misma manera, la secuencia y cinética de aparición de los distintos isotipos de inmunoglobulinas bovinas fue similar a la registrada tempranamente luego de la infección. Tres semanas luego de la vacunación en cambio, el isotipo predominante en la respuesta humoral es la IgG1, seguida de niveles ya detectables de IgG2.

Este segundo trabajo demostró que, tal lo esperado, la vacunación sistémica estimula mayoritariamente los linfonódulos drenantes del sitio de inoculación (prescapulares en este caso). Los mismos presentan perfiles isotípicos de CSA a lo largo del tiempo con patrones similares a los de los anticuerpos séricos. Sin embargo, la inmunización sistémica es capaz también de generar CSA específicas contra VFA en órganos linfoides alejados del sitio de inoculación y sin conexión directa (tracto respiratorio), y en su mayoría del isotipo IgM (Pega et al., 2015). Aún más interesante es el hecho de que la infección oronasal de los animales vacunados con una cepa homóloga, realizada en este caso a los 30 dpv, no provocó el desarrollo de la enfermedad en los mismos, pero el VFA infectivo, sin embargo, actuó como una reestimulación antigénica. Esta reestimulación reveló la presencia de linfocitos B de memoria que se activaron rápidamente a nivel local para producir una potente respuesta de anticuerpos en el tracto respiratorio, con cambio del isotipo predominante hacia IgG1 e IgA, tan solo dos días luego de la infección (Pega et al., 2015). Así, la inmunización por vía sistémica fue nuevamente no solo responsable de inducir la presencia de anticuerpos específicos en sangre periférica, sino también de promover respuestas anamnésicas que se manifestaron también a nivel de las mucosas respiratorias luego de la infección aerógena.

En conjunto, estos antecedentes representaron los pilares fundamentales para el planteo del problema y la hipótesis del presente trabajo, la cual propone que los anticuerpos sistémicos, administrados mediante la inmunización pasiva de terneros seronegativos para el VFA, son capaces de evitar la diseminación del virus luego de la infección por vía aerógena y en ausencia de otros mecanismos inmunes. Nuestro abordaje experimental para contrastar esta hipótesis implicó entonces, poder generar inicialmente animales que sólo poseyeran inmunidad sistémica de anticuerpos específicos contra el VFA, para luego infectarlos a través de una vía aerógena, simulando la ruta natural de infección en los bovinos.

---

Los primeros reportes que buscaron entender el papel y la relevancia de la inmunidad sistémica en la protección a la infección por VFA en bovinos, datan de finales de la década del '60 y principios de los años '70. Sutmoller y col. demostraron que novillos pasivamente inmunizados (n=12) usando sueros inmunes obtenidos de bovinos infectados (obtenidos entre 3 a 5 meses después de la infección), no resultaban protegidos al ser desafiados con  $10^4$  o  $10^6$  unidades formadoras de placa (UFP) de VFA infeccioso de la cepa homóloga (A-4691), administrado a través de las vías faríngea o intranasal (Sutmoller, McVicar, & Cottral, 1968).

Unos años más tarde, estos mismos autores realizaron una nueva serie de experimentos utilizando el mismo conjunto de sueros para inmunizar pasivamente a novillos (n=4) que se desafiaron mediante la vía intranasal utilizando  $10^4$  o  $10^6$  UFP (n=2 para cada dosis) de la misma cepa infecciosa homóloga de VFA (Sutmoller & McVicar, 1972). Tres de los cuatro novillos, todos presentando títulos medios a altos de anticuerpos específicos contra el VFA previos a la infección, mostraron la signología clásica de la FA. Por el contrario, el animal restante desafiado con  $10^4$  UFP y que presentaba bajos títulos de anticuerpos específicos contra el virus al momento de la infección, no mostró síntomas de la enfermedad. Así es como, en conjunto, estos resultados no fueron concluyentes para lograr establecer una correlación entre los títulos de anticuerpos específicos anti-VFA previos a la infección, la dosis infectiva y lo observado a nivel clínico después del desafío. En consecuencia, el rol y la eficacia de los anticuerpos sistémicos para prevenir la generalización de la enfermedad luego de la infección con VFA, así como su impacto en otros mecanismos inmunes desencadenados después de la infección, no pudieron determinarse en estos trabajos iniciales.

La primera etapa de esta tesis consistió en el ajuste de las condiciones experimentales que permitieran realizar la transferencia pasiva de plasma inmune contra el VFA en animales *naïve*, de forma de generar individuos que solo poseyeran anticuerpos circulantes anti-VFA como mecanismo inmunitario contra el virus antes de la infección aerógena. A partir de trabajos previos (Balcomb & Foster, 2014; Soldan, 1999) se decidió realizar la transferencia de los plasmas bovinos inmunes sin ningún tratamiento previo de concentración de las inmunoglobulinas. Si bien esto aumentaba el volumen de plasma a transferir, reducía la potencial alteración de la composición de anticuerpos anti-VFA de las preparaciones debido a la ruptura, degradación o inactivación diferencial de inmunoglobulinas, en particular las IgM, que podían ser afectadas durante el procesamiento.

Se evaluaron dos cantidades de plasma a transferir con una diferencia de un orden en relación al volumen (2,8 L vs 0,28 L). El volumen máximo a transferir se estableció a partir de lo descrito en la bibliografía (Balcomb & Foster, 2014; Soldan, 1999) y representó aproximadamente

---

entre el 70% y 90% del volumen propio de suero de cada animal, mientras que, para el volumen menor, estos porcentajes fueron entre el 7% y el 9%. El seguimiento de los títulos de anticuerpos (totales, por isotipos y seroneutralizantes) en los terneros inmunizados pasivamente, se realizó con mayor frecuencia al inicio del procedimiento para determinar el rango de tiempo disponible para realizar la infección experimental post-transferencia, y se extendió hasta un mes luego de la inmunización pasiva, para poder estimar la vida media de los anticuerpos transferidos.

No se hallaron diferencias significativas en los títulos de anticuerpos registrados entre los dos individuos de cada grupo, indicando que la diferencia de volumen transferido en cada grupo experimental (70% vs 90% y 7% vs 9%) no impactaba significativamente en la cantidad y concentración de los anticuerpos anti-VFA circulantes. Esto se comprobó para todos los parámetros evaluados, excepto para la determinación de IgG1 que mostró mayores variaciones entre individuos, en particular para los que recibieron 0,28 L de plasma.

Por su parte, para todos los parámetros medidos se encontraron diferencias significativas en los títulos de anticuerpos registrados entre ambos grupos experimentales, conservándose aproximadamente un orden de distancia, tal como la diferencia en volúmenes administrados a cada grupo. La comparación entre los títulos de anticuerpos anti-VFA registrados durante las primeras 24 horas en los animales transferidos respecto de los valores propios del *pool* de plasmas utilizado para las transferencias, también mantuvo la relación esperada. Tomando como referencia los títulos de anticuerpos totales medidos por LP-ELISA, los animales que recibieron 2,8 L (donde los plasmas inmunes se diluyeron entre el 40% y 47% en el organismo del animal) se registraron títulos de aproximadamente 0,3 unidades de  $\log_{10}$  por debajo (aproximadamente un 50% de reducción) respecto del *pool* administrado. Por su parte, aquellos que recibieron 0,28 L (donde los plasmas inmunes se diluyeron entre 94% y 95%), se midieron títulos de aproximadamente 1,1 unidades de  $\log_{10}$  por debajo (aproximadamente un 88% de reducción) respecto del *pool* administrado. En conjunto, estos resultados indicaron que las diferencias de un orden en el volumen de plasma administrado generaban diferencias similares en el título de anticuerpos anti-VFA medidos en cada grupo experimental, así como también, que no había pérdidas significativas de los anticuerpos durante el proceso de transferencia y que las que se registraban respecto del *pool* de plasmas utilizado respondían a la dilución que sufrían las preparaciones al incorporarse al torrente sanguíneo de los animales receptores.

La evaluación del curso temporal en los títulos de anticuerpos totales anti-VFA medidos por LP-ELISA, permitió establecer una vida media aproximada de entre 15 y 20 días, dependiendo del grupo experimental analizado. Estos valores se encuentran en concordancia con los previamente establecidos por nuestro grupo para los anticuerpos anti-VFA calostrales, que son

---

incorporados por los terneros lactantes mayormente durante las primeras 24 horas de vida y que mostraron un valor promedio de 17,1 días (Bucafusco et al., 2014). Por su parte, el estudio de la evolución de los títulos de anticuerpos para los distintos parámetros evaluados también mostró que no existían diferencias significativas entre el primer registro obtenido, a las 2 horas post-transferencia, y los posteriores, al menos hasta las 24 horas posteriores. Este resultado permitió determinar que la infección experimental podría realizarse dentro de las primeras 24 horas luego de la inmunización pasiva, sin que variaran significativamente los títulos de los anticuerpos presentes en el animal inmediatamente después del procedimiento.

El diseño del segundo experimento contempló la generación de dos grupos experimentales y dos grupos control. Los grupos experimentales estuvieron conformados por dos grupos de terneros ( $n=3$  en cada grupo) que recibieron dos preparaciones de plasma diferentes provenientes de bovinos adultos inmunizados con una vacuna anti-VFA con alta carga antigénica (22,5  $\mu\text{g}/\text{dosis}$ ) de la cepa O1/Campos. Una de las preparaciones fue obtenida a los 7 dpv y la otra, a los 26 dpv. La intención de este diseño apuntó a evaluar la capacidad protectora de dos preparados de plasma que difirieran cuantitativamente respecto a los títulos de anticuerpos y cualitativamente en relación con su perfil de isotipos, avidéz y capacidad neutralizante. Los grupos control consistieron en dos animales sin vacunar, y por lo tanto carentes de inmunidad adaptativa contra el VFA, y en dos animales vacunados y desafiados en tiempos coincidentes con los de recolección de los plasmas inmunes (7 y 26 dpv). La finalidad de este último grupo fue la de evaluar animales que tuvieran anticuerpos circulantes en cantidad y composición similares a las de los grupos experimentales, pero que contaran a su vez, con otros mecanismos de inmunidad adaptativa generados luego de la inmunización activa.

Todos los animales fueron infectados por vía aerógena siguiendo un protocolo de infección experimental ya establecido (J. M. Pacheco et al., 2010) y empleado por nuestro grupo de trabajo anteriormente (Pega et al., 2013, 2015). Tal lo determinado luego del experimento de ajuste de las condiciones de la transferencia pasiva de anticuerpos, los grupos experimentales de terneros *naïve* fueron infectados 24 horas después de realizada la inmunización pasiva. Los métodos más utilizados de infección experimental, inclusive para probar la potencia de vacunas, son aquellos donde el virus se inyecta directamente en el animal, ya sea en la circulación sistémica o por vía intradermolingual. Si bien estos métodos permiten precisar tanto la cantidad de inóculo infeccioso administrado como el comienzo de la infección, es evidente que difieren sustancialmente de lo que ocurre en las infecciones naturales, debido a que franquean las barreras de mucosas impuestas por el huésped como primera línea de defensa frente al patógeno. Por otra parte, el protocolo que más se asemeja a una infección natural tal como ocurre en la naturaleza, es el de

---

infección por contacto entre animales sanos y enfermos dentro de un box de bioseguridad. Esta estrategia presenta, sin embargo, la gran desventaja de no poder cuantificar el inóculo infeccioso en cada descarga ni determinar el momento exacto donde se inicia la infección, tornándolo así en un modelo poco reproducible. En este sentido, el protocolo de infección por nebulización controlada desarrollado por Pacheco y col., en donde el VFA es administrado en forma de aerosol mediante una bomba acoplada a una máscara nebulizadora que se ajusta a la región oronasal del bovino, conjuga las ventajas de ambos métodos. Las suspensiones de VFA generadas mediante el equipo nebulizador contienen partículas que miden entre 3 y 6  $\mu\text{m}$  de diámetro, las cuales se distribuyen a lo largo de todo el aparato respiratorio del bovino, tal como ocurre en las infecciones naturales donde el VFA se transmite en forma de aerosoles (McVicar & Eisner, 1983). A su vez, la metodología permite establecer el inicio de la infección con precisión y cuantificar el inóculo administrado en el animal en cada descarga. Estas características le brindan reproducibilidad, la cual se ve reflejada en el hecho de que los bovinos infectados presentan un curso temporal de signos clínicos (fiebre y aparición de vesículas en extremidades) similar entre experimentos y comparable al que se logra con el método más ampliamente difundido de inyección intradermolingual (J. M. Pacheco et al., 2010).

Nuestro experimento de infección oronasal de los animales transferidos con plasma de 26 dpv, mostró que ninguno de los individuos presentó generalización de la enfermedad, coincidiendo con lo observado en los animales vacunados y desafiados a los 7 y 26 dpv. Los animales transferidos con plasma de 7 dpv, al igual que los controles *naïve* infectados, mostraron en cambio, generalización de la enfermedad con aparición de los síntomas característicos de la misma.

Inicialmente analizamos estos resultados estudiando la correlación existente entre el *score* clínico observado, la viremia y el título de anticuerpos neutralizantes de los animales en el momento previo a la infección. En estos análisis encontramos, tal lo esperado, una relación directa y significativa entre los niveles de viremia y la severidad de los síntomas observados. A su vez, estos estudios mostraron una relación inversa significativa entre los títulos de anticuerpos neutralizantes previos a la infección y el máximo *score* alcanzado por animal y/o la viremia. Esto demuestra, a diferencia de los trabajos iniciales de Sutmoller y col. que no pudieron ser concluyentes al respecto, que la severidad de los síntomas característicos de la enfermedad observados está directamente relacionada con los niveles de anticuerpos neutralizantes circulantes en el animal antes de la infección, especialmente para los bovinos transferidos pasivamente. De esta manera, los anticuerpos circulantes actúan como una primera línea de defensa adaptativa para prevenir la diseminación del virus dentro del organismo del animal.



---

Cuando estos anticuerpos se encuentran en cantidades suficientes, son capaces de evitar la generalización de la enfermedad, tal como fue el caso de los animales transferidos con plasma de 26 dpv.

Sin embargo, cuando el título de anticuerpos específicos es bajo, y en ausencia de una inmunidad primaria activa, las partículas virales logran superar esta barrera desde sus sitios de replicación tempranos en mucosas, llegando a la circulación sanguínea y, por ende, accediendo también a tejidos más distantes. Este fue el caso de los animales transferidos con plasma de 7dpv, los cuales mostraron *scores* clínicos altos y presentaron cantidades de ARN viral significativamente mayores que los animales del grupo transferido con plasma de 26 dpv, pero solo para tejidos alejados de la vía de inoculación (linfonódulo poplíteo). Interesantemente, esta observación fue diferente para tejidos vecinos a los sitios de replicación temprana del virus, tales como el paladar dorsal blando y el lóbulo medio distal del pulmón (J. Arzt, Pacheco, & Rodriguez, 2010), en los cuales no se encontraron diferencias significativas en los niveles promedio de ARN viral detectados entre ambos grupos experimentales. Esto indicaría que los anticuerpos sistémicos no impiden la replicación primaria del VFA en las mucosas, pero que una vez que las partículas virales infectivas acceden a la circulación, éstos pueden neutralizarlas si se encuentran en cantidades suficientes, previniendo así su acceso a los tejidos epiteliales de las extremidades y, por consiguiente, la generalización de la enfermedad.

La comparación de los números de CSA presentes a los 7 dpi en linfonódulos de los animales transferidos con plasma de 7 dpv o 26 dpv, también arrojó resultados significativos. Los animales transferidos con plasma de 7 dpv mostraron, en promedio, cantidades significativamente mayores de CSA anti-VFA, que los transferidos con plasma de 26 dpv. Estos resultados fueron verificados para todos los isotipos y en los tres nódulos linfáticos evaluados (dos asociados al tracto respiratorio, LTB y LRM, y uno no relacionado con las mucosas respiratorias, LPE), con excepción del isotipo IgG1 en el LMR. Esto indica que los anticuerpos existentes en el animal al momento de la infección por vía oronasal, pueden disminuir el desarrollo de las respuestas inmunes primarias generadas contra el virus luego de la infección.

Más aún, esto pudo verificarse también a nivel sistémico donde, a diferencia de lo observado en el grupo transferido con plasma de 7 dpv, los animales que recibieron plasma de 26 dpv no mostraron aumentos significativos en los títulos de anticuerpos séricos totales ni por isotipos, así como tampoco en la avidéz de los mismos, al menos hasta el 7 dpi. En concordancia con nuestros resultados, Sutmoller y col. también describieron que los animales que presentaban títulos altos de anticuerpos previo a la exposición, mostraban un retraso mayor en la producción de anticuerpos séricos (Sutmoller & McVicar, 1972).

---

Teniendo en cuenta estos resultados, junto con los reportes anteriores sobre la progresión de la infección oronasal (Jonathan Arzt, Pacheco, & Rodriguez, 2010; J. M. Pacheco et al., 2010) y los trabajos que describen los procesos de eliminación del VFA de la circulación por parte de los anticuerpos (McCullough et al., 1992), es posible proponer un modelo para responder estas observaciones en conjunto. Según el mismo, los anticuerpos sistémicos son incapaces de asociarse al VFA durante su replicación primaria en tejidos de la nasofaringe y su amplificación posterior en tejidos pulmonares que le permite el acceso a la circulación sanguínea (Jonathan Arzt et al., 2010). Sin embargo, sí pueden hacerlo en sangre, eliminándolo de la circulación, posiblemente a través del sistema retículo endotelial (McCullough et al., 1992), reduciendo el número disponible de partículas infecciosas capaces de infectar tejidos distales, así como también su disponibilidad como antígeno estimulante para la producción de anticuerpos específicos, tanto a nivel sistémico como local.

Las respuestas inmunes generadas en el ternero vacunado y desafiado por vía aerógena a los 26 dpv, coincidieron con las observadas en animales infectados a los 30 dpv ya descritas por nuestro grupo de trabajo (Pega et al., 2015). La vacunación estimuló el desarrollo de una respuesta madura de anticuerpos séricos a los 26 dpv, con títulos elevados de IgG1 e IgG2, niveles basales de IgM y con un índice de avidéz superior al 60%. La posterior infección oronasal generó rápidamente respuestas secundarias tanto a nivel sistémico como en mucosas (medidas en el LTB), con números de CSA predominantes para el isotipo IgG1, seguidas de IgG2 y luego de IgM una semana después de la infección, así como también, un aumento significativo del índice de avidéz de los anticuerpos sistémicos hasta alcanzar casi el 100% luego de 6 dpi.

Interesantemente, el animal desafiado a los 7 dpv también estuvo protegido frente a la generalización de la enfermedad, a pesar de tener niveles de anticuerpos bajos anti-VFA previo a la infección, siendo los mismos sólo ligeramente superiores en valor, a los medidos por LP-ELISA y SNV en el grupo de animales transferidos con plasma de 7 dpv. De hecho, este fue el único animal que quedó por fuera del intervalo de confianza del 95% en la correlación entre títulos de anticuerpos neutralizantes y la severidad clínica, ya que poseía títulos de AcN por debajo de los esperado para el score clínico que presentó. Es evidente, por lo tanto, que la vacunación sistémica fue capaz de activar mecanismos inmunes adicionales a los anticuerpos circulantes en sangre, tal como se observó en ambos animales inmunizados con vacunas convencionales contra la FA.

Numerosos informes indican la protección temprana brindada por la vacunación a tiempos tempranos post-inmunización, aún en presencia de bajos niveles de anticuerpos específicos antes de la infección (Doel, Williams, & Barnett, 1994; Elnekave et al., 2013; Golde et al., 2005).

---

Sin embargo, los mecanismos inmunes detrás de estos resultados no han sido descritos con claridad.

Particularmente en nuestro caso, el desafío oronasal en el animal desafiado a los 7 dpv desencadenó una respuesta caracterizada por: (i) un cambio rápido de isotipo ya evidente a los 2 dpi; (ii) un aumento significativo en los títulos de anticuerpos totales anti-VFA y (iii) una mejora en la avidéz de los anticuerpos específicos contra el virus. Con respecto a esta última observación, los incrementos de avidéz en los primeros tiempos posteriores a la vacunación pueden ser más un reflejo del aumento en el número y variedad de los anticuerpos presentes en el suero (M. A. Newman, Mainhart, Mallett, Lavoie, & Smith-Gill, 1992) que de cambios en las afinidades monovalentes de los anticuerpos, fenómeno que también ha sido reportado pero para respuestas de memoria en tiempos más avanzados luego de la vacunación (Mulcahy, Reid, Dimarchi, Gale, & Doel, 1992). En el tracto respiratorio inferior, donde el virus experimenta una extensa replicación pre virémica luego de ingresar por las vías respiratorias (J. Arzt, Juleff, Zhang, & Rodriguez, 2011), la presencia de números predominantes de CSA del isotipo IgG1 seguido de IgA e IgM a los 7 dpi, es compatible con el desarrollo de una respuesta anamnésica, estando este patrón de inducción local de isotipos restringido solamente los dos animales inmunizados activamente. Por lo tanto, esta segunda línea de defensa, constituida por la respuesta de anticuerpos de memoria, puede activarse después del desafío en los bovinos vacunados, independientemente de que las vías de vacunación e infección sean o no coincidentes, y puede ser detectada simultáneamente a niveles locales y sistémicos.

Este mismo razonamiento puede ser aplicado a otros ejemplos de animales desafiados a tiempos tardíos post-vacunación cuando los títulos de anticuerpos caen por debajo de los niveles asociados a la protección debido a la disminución natural de la respuesta humoral circulante. En un trabajo reciente Scott y col. demostraron la protección completa de 21 bovinos frente al desafío con virus homólogo, en tres diferentes grupos inmunizados con formulaciones experimentales que portaban VFA recombinante de la cepa SAT 2. Los animales fueron desafiados por vía intradermolingual con un VFA de cepa homóloga luego de transcurridos 162 días de la vacunación primaria y en presencia de títulos bajos de anticuerpos específicos anti-VFA previos a la infección. Interesantemente, la protección clínica en estos animales se produjo de la mano de rápidos y significativos aumentos en los títulos de anticuerpos registrados por SNV y LP-ELISA luego del desafío, concordando con nuestras observaciones para los animales vacunados (Scott, Rathogwa, Capozzo, & Maree, 2017).

Como se describió anteriormente en la Introducción de este trabajo, las características de la cápside viral con epítopes de repetición regulares que pueden estimular las células B

---

directamente por entrecruzamiento de sus receptores de membrana (Vos et al., 2000), caracterizan al VFA como un antígeno T-independiente de tipo 2 (TI-2) (Borca et al., 1986; Juleff et al., 2009). Así, el VFA, como otros antígenos TI-2, presenta limitaciones significativas en términos de la generación de anticuerpos de larga duración y respuestas mediadas por células B de memoria después de la vacunación o infección (Grant et al., 2016). Los resultados previos de nuestro grupo (Pega et al., 2013), así como los de otros grupos de referencia en el mundo (Grant et al., 2017) y los presentados en este trabajo de tesis, agregan evidencia adicional a la hipótesis de que el VFA es en gran medida un antígeno TI-2, capaz de estimular las células B en ausencia de colaboración de células T CD4+ (Feldmann & Easten, 1971). Tal como ha sido descrito para otros antígenos timo-independientes, las CSA que se inducen a través de mecanismos de TI-2 son extrafoliculares, de corta vida y permanecen en el sitio de inducción, en general el tejido linfóide drenante local (Feldmann & Easten, 1971).

A partir de nuestros resultados, es evidente, sin embargo, que aún dentro de un período de tiempo relativamente breve luego de la vacunación, un re-estímulo con el virus infeccioso puede provocar el desarrollo de respuestas anamnésicas de anticuerpos en los bovinos vacunados.

La presencia de células B de memoria específicas contra el VFA se condice con el requerimiento de respuestas de células T CD4+ específicas para la producción de AcN en bovinos vacunados (Carr et al., 2013), que también incluye la existencia de células T de memoria específicas contra el VFA (Bucafusco et al., 2015). Más aún, la detección de células B de memoria circulantes específicas para VFA en bajo número, ya ha sido descrita para bovinos revacunados poco después de ocurrida la revacunación: nuestro grupo de investigación reportó sobre la presencia de células B de memoria del isotipo IgG1 específicas para VFA a los 4 días de la revacunación (Pega et al., 2015) mientras que Grant y col. también encontraron células B de memoria específicas entre los días 7 y 14 después de la revacunación (Grant et al., 2016). Sin embargo, aún se desconoce la naturaleza exacta de estas respuestas de memoria.

Es posible proponer, sobre la base de su rápida detección después de la inmunización y las características estructurales del antígeno viral que las dispara, que al menos parte de estas respuestas anamnésicas sean generadas por células B de memoria tempranas independientes del centro germinal (CG) producidas poco después de la activación mediada por el antígeno viral (Inamine et al., 2005).

Esta línea teórica también permitiría explicar la reacción inmune compatible con respuestas anamnésicas que se observó tempranamente luego de la infección en el ternero desafiado a los 7 dpv. Aunque estos mecanismos inmunes aún no han sido descritos para bovinos, diferentes trabajos han demostrado la generación de células B de memoria independientes del CG dentro

---

de los 3 a 7 días posteriores a la inmunización, utilizando antígenos modelo en ratones (Kaji et al., 2012). Dichas células B de memoria, requieren de la ayuda clásica de las células T CD4+ y, aunque no experimentan hipermutación somática durante su generación (Taylor, Pape, & Jenkins, 2012), pueden experimentar una expansión clonal tras el reencuentro con el antígeno viral (Takemori, Kaji, Takahashi, Shimoda, & Rajewsky, 2014).

En conjunto nuestros resultados muestran que los anticuerpos sistémicos en cantidades suficientes son capaces de proteger al animal frente a la generalización de la enfermedad, luego de la infección por vía aerógena y en ausencia de otros mecanismos inmunes. Además, hallamos que la vacunación contra el VFA promueve la generación de células B de memoria específicas, aún a tiempos cortos post-vacunación y que estas células B de memoria son capaces de desencadenar una respuesta de anticuerpos rápida, con cambio de isotipo y de altos títulos, tanto a nivel sistémico como local. Esto permitió la protección de los animales frente a la generalización de la enfermedad luego de la infección por vía oronasal, aun cuando ésta ocurra a tiempos cortos post-vacunación y en presencia de niveles no protectores de anticuerpos anti-VFA circulantes.

## **7. CONCLUSIONES**

---

- Durante el presente trabajo se optimizó un protocolo de transferencia pasiva de anticuerpos neutralizantes del VFA en bovinos. La cuantificación *in vitro* de la actividad neutralizante medida en los animales luego de la transferencia, corresponden ajustadamente al factor de dilución obtenido después del procedimiento, demostrando la preservación de la integridad de las inmunoglobulinas transferidas.
- Los trabajos previos existentes de inmunización pasiva en FA en bovinos son escasos y no concluyentes en relación al rol de anticuerpos transferidos en la protección debido a que no establecen una correlación entre la presencia de anticuerpos y la protección observada. En nuestro caso, se verificó para todos los animales transferidos pasivamente, la existencia de una relación inversa entre los niveles de anticuerpos neutralizantes circulantes en el animal previo a la infección y la severidad de la sintomatología clínica, relacionada con los animales que se encontraron protegidos frente a la enfermedad y los que no. Por otra parte, se halló una relación directa y significativa entre los niveles de viremia y la severidad de los síntomas observados en los animales infectados.
- Los resultados obtenidos demuestran que los anticuerpos circulantes actúan como una primera línea de defensa adaptativa para prevenir la diseminación del virus dentro del organismo del animal. Cuando estos anticuerpos se encuentran en cantidades suficientes, son capaces *per se* de evitar la generalización de la enfermedad, aún en ausencia de otros mecanismos activos de inmunidad.
- Los anticuerpos específicos existentes en el animal al momento de la infección, disminuirían el desarrollo de la respuesta inmune primaria generada contra el virus luego del desafío. Éstos reducirían la oferta de antígeno disponible para la inducción de una respuesta inmune activa, tanto a nivel sistémico como local.
- Los animales inmunizados en forma activa cuentan con una segunda línea de defensa adaptativa, constituida por la respuesta de memoria mediada por anticuerpos. La existencia de esta respuesta se evidencia tanto por la presencia de un cambio rápido de isotipo como por el aumento de la avidéz del suero.
- La respuesta de linfocitos B de memoria, puede activarse después del desafío en los bovinos vacunados, independientemente de que las vías de vacunación e infección sean o no coincidentes, y puede ser detectada simultáneamente a nivel local y sistémico. Estos resultados demuestran la importancia de la inmunidad local inducida por la vacunación parenteral frente a la infección aerógena, particularmente a tiempos tempranos, corroborando lo descrito previamente por nuestro grupo de trabajo (Pega et al. 2015, J Virol 89:9581).

- A pesar de las características estructurales de virus que promueven respuestas de tipo TI-2, la vacunación contra el VFA genera células B de memoria específicas, aún a tiempos cortos post-vacunación, tanto a nivel sistémico como local. Esto permite explicar la protección de animales frente a la generalización de la enfermedad que se observa luego de la infección por vía oronasal en presencia de niveles no protectores de anticuerpos anti-VFA circulantes, y aun cuando el desafío ocurra en tiempos cercanos a la vacunación.



## **8. BIBLIOGRAFÍA**

---

- 
- Abul Abbas, Andrew H. Lichtman, S. P. (2007). *Cellular and Molecular Immunology* (6th ed.). Saunders.
- Acharya, R., Fry, E., Stuart, D., Fox, G., Rowlands, D., & Brown, F. (1989). The three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution. *Nature*, 337(6209), 709–716. <https://doi.org/10.1038/337709a0>
- Alexandersen, S., Quan, M., Murphy, C., Knight, J., & Zhang, Z. (2003). Studies of quantitative parameters of virus excretion and transmission in pigs and cattle experimentally infected with foot-and-mouth disease virus. *Journal of Comparative Pathology*, 129(4), 268–282. [https://doi.org/10.1016/S0021-9975\(03\)00045-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(03)00045-8)
- Alexandersen, S., Zhang, Z., & Donaldson, A. I. (2002). Aspects of the persistence of foot-and-mouth disease virus in animals--the carrier problem. *Microbes and Infection*, 4(10), 1099–1110. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12191660>
- Alexandersen, S., Zhang, Z., Donaldson, A. I., & Garland, A. J. M. M. (2003). The pathogenesis and diagnosis of foot-and-mouth disease. *Journal of Comparative Pathology*, 129(1), 1–36. [https://doi.org/10.1016/S0021-9975\(03\)00041-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(03)00041-0)
- Arzt, J., Juleff, N., Zhang, Z., & Rodriguez, L. L. (2011). The Pathogenesis of Foot-and-Mouth Disease I: Viral Pathways in Cattle. *Transboundary and Emerging Diseases*, 58(4), 291–304. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01204.x>
- Arzt, J., Pacheco, J. M., & Rodriguez, L. L. (2010). The early pathogenesis of foot-and-mouth disease in cattle after aerosol inoculation: Identification of the nasopharynx as the primary site of infection. *Veterinary Pathology*, 47(6), 1048–1063. <https://doi.org/10.1177/0300985810372509>
- Arzt, J., Pacheco, J. M., & Rodriguez, L. L. (2010). The Early Pathogenesis of Foot-and-Mouth Disease in Cattle After Aerosol Inoculation. *Veterinary Pathology*, 47(6), 1048–1063. <https://doi.org/10.1177/0300985810372509>
- Bachmann, M. F., Odermatt, B., Hengartner, H., & Zinkernagel, R. M. (1996). Induction of long-lived germinal centers associated with persisting antigen after viral infection. *The Journal of Experimental Medicine*, 183(5), 2259–2269. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8642335>
- Bachrach, H. L. (1968). Foot-And-Mouth Disease. *Annual Review of Microbiology*, 22(1), 201–244. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.22.100168.001221>
- Bahnemann, H. G. (1975). Binary ethylenimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production. *Archives of Virology*, 47(1), 47–56. Retrieved from

- 
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/167679>
- Balcomb, C., & Foster, D. (2014). Update on the Use of Blood and Blood Products in Ruminants. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 30(2), 455–474. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2014.04.001>
- Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C. M., & Domingo, E. (2001). Evolution of cell recognition by viruses. *Science (New York, N.Y.)*, 292(5519), 1102–1105. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11352064>
- Barteling, S. J., & Melen, R. H. (1974). A simple method for the quantification of 140S particles of foot-and-mouth disease virus (FMDV). *Archiv Fur Die Gesamte Virusforschung*, 45(4), 362–364. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4374160>
- Bedotti, D. O., Rodríguez, M. S., & Inta, E. E. A. ; (2012). *Sitio Argentino de Producción Animal. Revista Veterinaria Argentina* (Vol. XXIX).
- Belsham, G. J. (1993). Distinctive features of foot-and-mouth disease virus, a member of the picornavirus family; aspects of virus protein synthesis, protein processing and structure. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 60(3), 241–260. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8396787>
- 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. *Journal of Virology*, 69(4), 2664–2666. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7533862>
- Bernasconi, N. L., Traggiai, E., & Lanzavecchia, A. (2002). Maintenance of Serological Memory by Polyclonal Activation of Human Memory B Cells. *Science*, 298(5601), 2199–2202. <https://doi.org/10.1126/science.1076071>
- Blakeslee, D., Rapacz, J., & Butler, J. E. (1971). Bovine immunoglobulin allotypes. *Journal of Dairy Science*, 54(9), 1319–1320. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5094697>
- Borca, M. V, Fernández, F. M., Sadir, A. M., Braun, M., & Schudel, A. A. (1986). Immune response to foot-and-mouth disease virus in a murine experimental model: effective thymus-independent primary and secondary reaction. *Immunology*, 59(2), 261–267. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3490436>
- Brehm, K. E., Kumar, N., Thulke, H.-H., & Haas, B. (2008). High potency vaccines induce protection against heterologous challenge with foot-and-mouth disease virus. *Vaccine*, 26(13), 1681–1687. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.01.038>
- Brito, B. P., Rodriguez, L. L., Hammond, J. M., Pinto, J., & Perez, A. M. (2017). Review of the

- 
- Global Distribution of Foot-and-Mouth Disease Virus from 2007 to 2014. *Transboundary and Emerging Diseases*, 64(2), 316–332. <https://doi.org/10.1111/tbed.12373>
- Brooksby, J. (1982). Portraits of Viruses: Foot-and-Mouth Disease Virus. *Intervirology*, 18(1–2), 1–23. <https://doi.org/10.1159/000149299>
- Brown, F. (1992). New approaches to vaccination against foot-and-mouth disease. *Vaccine*, 10(14), 1022–1026. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1335197>
- Brown, F. (2003). The history of research in foot-and-mouth disease. *Virus Research*, 91(1), 3–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12527434>
- Bucafusco, D., Di Giacomo, S., Pega, J., Juncos, M. S., Schammas, J. M., Pérez-Filgueira, M., & Capozzo, A. V. (2014). Influence of antibodies transferred by colostrum in the immune responses of calves to current foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine*, 32(48), 6576–6582. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.06.056>
- Bucafusco, D., Di Giacomo, S., Pega, J., Schammas, J. M., Cardoso, N., Capozzo, A. V., & Perez-Filgueira, M. (2015). Foot-and-mouth disease vaccination induces cross-reactive IFN- $\gamma$  responses in cattle that are dependent on the integrity of the 140S particles. *Virology*, 476, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.11.023>
- Burroughs, J. N., Rowlands, D. J., Sangar, D. V., Talbot, P., & Brown, F. (1971). Further Evidence for Multiple Proteins in the Foot-and-Mouth Disease Virus Particle. *Journal of General Virology*, 13(1), 73–84. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-13-1-73>
- Butler, J. E., McGivern, P. L., Cantarero, L. A., & Peterson, L. (1980). Application of the amplified enzyme-linked immunosorbent assay: comparative quantitation of bovine serum IgG1, IgG2, IgA, and IgM antibodies. *American Journal of Veterinary Research*, 41(9), 1479–1491. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7004283>
- Cao, Y., Lu, Z., & Liu, Z. (2016). Foot-and-mouth disease vaccines: progress and problems. *Expert Review of Vaccines*, 15(6), 783–789. <https://doi.org/10.1586/14760584.2016.1140042>
- Capozzo, A. V, Periolo, O. H., Robiolo, B., Seki, C., La Torre, J. L., & Grigera, P. R. (1997). Total and isotype humoral responses in cattle vaccinated with foot and mouth disease virus (FMDV) immunogen produced either in bovine tongue tissue or in BHK-21 cell suspension cultures. *Vaccine*, 15(6–7), 624–630. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9178462>
- Carr, B. V., Lefevre, E. A., Windsor, M. A., Inghese, C., Gubbins, S., Prentice, H., ... Charleston, B. (2013). CD4+ T-cell responses to foot-and-mouth disease virus in vaccinated cattle. *Journal of General Virology*, 94(Pt\_1), 97–107. <https://doi.org/10.1099/vir.0.045732-0>
- Cartwright, B., Chapman, W. G., & Sharpe, R. T. (1982). Stimulation by heterotypic antigens of

- 
- foot-and-mouth disease virus antibodies in vaccinated cattle. *Research in Veterinary Science*, 32(3), 338–342. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6179141>
- Chairman, D. I. A. C. (2008). *Foot and Mouth Disease 2007: A review and lessons learned*. London. Retrieved from [https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/250363/0312.pdf](https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/250363/0312.pdf)
- Charron, D. (2007). Autologous white blood cell transfusion: Toward a younger immunity. *Human Immunology*, 68(10), 805–812. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2007.07.004>
- Chen, W. K., Campbell, T., VanCott, J., & Saif, L. J. (1995). Enumeration of isotype-specific antibody-secreting cells derived from gnotobiotic piglets inoculated with porcine rotaviruses. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 45(3–4), 265–284. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7676610>
- Chinsangaram, J., Piccone, M. E., & Grubman, M. J. (1999). Ability of foot-and-mouth disease virus to form plaques in cell culture is associated with suppression of alpha/beta interferon. *Journal of Virology*, 73(12), 9891–9898. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10559301>
- Correa Melo, E., Saraiva, V., & Astudillo, V. (2002). Review of the status of foot and mouth disease in countries of South America and approaches to control and eradication. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 21(3), 429–436. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12523684>
- Cottam, E. M., Wadsworth, J., Shaw, A. E., Rowlands, R. J., Goatley, L., Maan, S., ... Knowles, N. J. (2008). Transmission Pathways of Foot-and-Mouth Disease Virus in the United Kingdom in 2007. *PLoS Pathogens*, 4(4), e1000050. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000050>
- Cox, S. J., Barnett, P. V, Dani, P., & Salt, J. S. (1999). Emergency vaccination of sheep against foot-and-mouth disease: protection against disease and reduction in contact transmission. *Vaccine*, 17(15–16), 1858–1868. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10217583>
- Cubillos, C., de la Torre, B. G., Jakab, A., Clementi, G., Borrás, E., Barcena, J., ... Blanco, E. (2008). Enhanced Mucosal Immunoglobulin A Response and Solid Protection against Foot-and-Mouth Disease Virus Challenge Induced by a Novel Dendrimeric Peptide. *Journal of Virology*, 82(14), 7223–7230. <https://doi.org/10.1128/JVI.00401-08>
- Cunliffe, H. R. (1964). OBSERVATIONS ON THE DURATION OF IMMUNITY IN CATTLE AFTER EXPERIMENTAL INFECTION WITH FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS. *The Cornell*

- 
- Veterinarian*, 54, 501–510. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14234053>
- Curry, S., Abrams, C. C., Fry, E., Crowther, J. C., Belsham, G. J., Stuart, D. I., & King, A. M. (1995). Viral RNA modulates the acid sensitivity of foot-and-mouth disease virus capsids. *Journal of Virology*, 69(1), 430–438. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7983739>
- Curry, S., Fry, E., Blakemore, W., Abu-Ghazaleh, R., Jackson, T., King, A., ... Stuart, D. (1997). Dissecting the roles of VP0 cleavage and RNA packaging in picornavirus capsid stabilization: the structure of empty capsids of foot-and-mouth disease virus. *Journal of Virology*, 71(12), 9743–9752. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9371640>
- Czajkowsky, D. M., & Shao, Z. (2009). The human IgM pentamer is a mushroom-shaped molecule with a flexural bias. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(35), 14960–14965. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903805106>
- Dawe, P. S., Sorensen, K., Ferris, N. P., Barnett, I. T., Armstrong, R. M., & Knowles, N. J. (1994). Experimental transmission of foot-and-mouth disease virus from carrier African buffalo (*Syncerus caffer*) to cattle in Zimbabwe. *The Veterinary Record*, 134(9), 211–215. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8171808>
- de los Santos, T., de Avila Botton, S., Weiblen, R., & Grubman, M. J. (2006). The Leader Proteinase of Foot-and-Mouth Disease Virus Inhibits the Induction of Beta Interferon mRNA and Blocks the Host Innate Immune Response. *Journal of Virology*, 80(4), 1906–1914. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.4.1906-1914.2006>
- Defrance, T., Taillardet, M., & Genestier, L. (2011). T cell-independent B cell memory. *Current Opinion in Immunology*, 23(3), 330–336. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2011.03.004>
- Diaz-San Segundo, F., Medina, G. N., Stenfeldt, C., Arzt, J., & de los Santos, T. (2017). Foot-and-mouth disease vaccines. *Veterinary Microbiology*, 206, 102–112. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.12.018>
- Diaz-San Segundo, F., Montiel, N. A., Sturza, D. F., Perez-Martin, E., Hickman, D., Ramirez-Medina, E., ... de los Santos, T. (2016). Combination of Adt-O1Manisa and Ad5-boIFNλ3 induces early protective immunity against foot-and-mouth disease in cattle. *Virology*, 499, 340–349. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.09.027>
- Diaz-San Segundo, F., Salguero, F. J., de Avila, A., Fernandez de Marco, M. M., Sanchez-Martin, M. A., & Sevilla, N. (2006). Selective Lymphocyte Depletion during the Early Stage of the Immune Response to Foot-and-Mouth Disease Virus Infection in Swine. *Journal of Virology*, 80(5), 2369–2379. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.5.2369-2379.2006>
- Díaz-San Segundo, F., Weiss, M., Perez-Martín, E., Koster, M. J., Zhu, J., Grubman, M. J., & de

- 
- los Santos, T. (2011). Antiviral activity of bovine type III interferon against foot-and-mouth disease virus. *Virology*, 413(2), 283–292. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.02.023>
- Diehl, K., Diehl, K., Hull, R., Morton, D., Pfister, R., Rabemampianina, Y., ... Qg, H. E. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J APPL TOXICOL*, 15--23. Retrieved from <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/summary?doi=10.1.1.646.6027>
- Doel, T. R. (2003). Re v iew FMD v accines, 91, 81–99.
- Doel, T. R. (2005). Natural and vaccine induced immunity to FMD. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 288, 103–131. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15648176>
- Doel, T. R., & Baccarini, P. J. (1981). Thermal stability of foot-and-mouth disease virus. *Archives of Virology*, 70(1), 21–32. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6277281>
- Doel, T. R., & Mowat, G. N. (1985). An international collaborative study on foot and mouth disease virus assay methods. 2. Quantification of 146S particles. *Journal of Biological Standardization*, 13(4), 335–344. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2997228>
- Doel, T. R., Williams, L., & Barnett, P. V. (1994). Emergency vaccination against foot-and-mouth disease: rate of development of immunity and its implications for the carrier state. *Vaccine*, 12(7), 592–600. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8085375>
- Domingo, E., Baranowski, E., Escarmís, C., & Sobrino, F. (2002). Foot-and-mouth disease virus. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 25(5–6), 297–308. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12365806>
- Ekman, A., Pessa-Morikawa, T., Liljavirta, J., Niku, M., & Iivanainen, A. (2010). B-cell development in bovine fetuses proceeds via a pre-B like cell in bone marrow and lymph nodes. *Developmental & Comparative Immunology*, 34(8), 896–903. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2010.03.012>
- Ellard, F. M., Drew, J., Blakemore, W. E., Stuart, D. I., & King, A. M. (1999). Evidence for the role of His-142 of protein 1C in the acid-induced disassembly of foot-and-mouth disease virus capsids. *The Journal of General Virology*, 80 ( Pt 8)(8), 1911–1918. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-8-1911>
- Elnekave, E., Li, Y., Zamir, L., Even-Tov, B., Hamblin, P., Gelman, B., ... Klement, E. (2013). The field effectiveness of routine and emergency vaccination with an inactivated vaccine against foot and mouth disease. *Vaccine*, 31(6), 879–885. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.12.011>

- 
- Eschbaumer, M., Stenfeldt, C., Rekant, S. I., Pacheco, J. M., Hartwig, E. J., Smoliga, G. R., ... Arzt, J. (2016). Systemic immune response and virus persistence after foot-and-mouth disease virus infection of naïve cattle and cattle vaccinated with a homologous adenovirus-vectored vaccine. *BMC Veterinary Research*, *12*(1), 205. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0838-x>
- Fagarasan, S., & Honjo, T. (2000). T-Independent immune response: new aspects of B cell biology. *Science (New York, N.Y.)*, *290*(5489), 89–92. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11021805>
- Fayet, M. T., Fargeaud, D., Louisot, P., Stellmann, C., & Roumiantzeff, M. (1971). [Physical chemical measurement of 140S particles of the foot-and-mouth disease virus]. *Annales de l'Institut Pasteur*, *121*(1), 107–118. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4329751>
- Feldmann, M., & Easten, A. (1971). The relationship between antigenic structure and the requirement for thymus-derived cells in the immune response. *The Journal of Experimental Medicine*, *134*(1), 103–119. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4104294>
- Fensterl, V., Chattopadhyay, S., & Sen, G. C. (2015). No Love Lost Between Viruses and Interferons. *Annual Review of Virology*, *2*(1), 549–572. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-100114-055249>
- Fernandez-Sainz, I., Medina, G. N., Ramirez-Medina, E., Koster, M. J., Grubman, M. J., & de los Santos, T. (2017). Adenovirus-vectored foot-and-mouth disease vaccine confers early and full protection against FMDV O1 Manisa in swine. *Virology*, *502*, 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.12.021>
- Forss, S., Strebel, K., Beck, E., & Schaller, H. (1984). Nucleotide sequence and genome organization of foot-and-mouth disease virus. *Nucleic Acids Research*, *12*(16), 6587–6601. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6089122>
- Frenkel, H. S., & Ribelin, W. E. (1956). Cultivation of the foot-and-mouth disease virus in explanted epithelium of the bovine tongue. IX. Growth characteristics of the virus in large scale tissue cultures. *American Journal of Veterinary Research*, *17*(62), 40–44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13283228>
- Fry, E. E., Lea, S. M., Jackson, T., Newman, J. W., Ellard, F. M., Blakemore, W. E., ... Stuart, D. I. (1999). The structure and function of a foot-and-mouth disease virus-oligosaccharide receptor complex. *The EMBO Journal*, *18*(3), 543–554. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.3.543>
- Garland, A.J.M and Donaldson, A. I. (1990). Foot and mouth disease. *Surveillance* *17* (4).



- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2003). ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3784–3788. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12824418>
- Goié M., R. (1989). La Fiebre Aftosa en América del Sur. *Avances En Ciencias Veterinarias*, 4(Nº1), 16–23. Retrieved from <https://avancesveterinaria.uchile.cl/index.php/ACV/article/view/4517/10807>
- Golde, W. T., Pacheco, J. M., Duque, H., Doel, T., PENFOLD, B., FERMAN, G. S., ... RODRIGUEZ, L. L. (2005). Vaccination against foot-and-mouth disease virus confers complete clinical protection in 7 days and partial protection in 4 days: Use in emergency outbreak response. *Vaccine*, 23(50), 5775–5782. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.07.043>
- Grant, C. F. J., Carr, B. V., Kotecha, A., van den Born, E., Stuart, D. I., Hammond, J. A., & Charleston, B. (2017). The B Cell Response to Foot-and-Mouth Disease Virus in Cattle following Sequential Vaccination with Multiple Serotypes. *Journal of Virology*, 91(9), e02157-16. <https://doi.org/10.1128/JVI.02157-16>
- Grant, C. F. J., Carr, B. V., Singanallur, N. B., Morris, J., Gubbins, S., Hudelet, P., ... Charleston, B. (2016). The B-cell response to foot-and-mouth-disease virus in cattle following vaccination and live-virus challenge. *Journal of General Virology*, 97(9), 2201–2209. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000517>
- Grubman, M. J., Moraes, M. P., Diaz-San Segundo, F., Pena, L., & de los Santos, T. (2008). Evading the host immune response: how foot-and-mouth disease virus has become an effective pathogen. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 53(1), 8–17. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2008.00409.x>
- Grubman, M. M. J., & Baxt, B. (2004). Foot-and-mouth disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(2), 465–493. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.2.465>
- Guidry, J., Butler, J. E., Pearson, R. E., & Weinland, B. T. (1980). IgA, igG1, IgG2, IgM, and BSA in serum and mammary secretion throughout lactation. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1(4), 329–341. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15615051>
- Hansen, J. L., Long, A. M., & Schultz, S. C. (1997). Structure of the RNA-dependent RNA polymerase of poliovirus. *Structure (London, England : 1993)*, 5(8), 1109–1122. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9309225>
- Hegde, N. R., Maddur, M. S., Rao, P. P., Kaveri, S. V., & Bayry, J. (2009). Thermostable foot-and-mouth disease virus as a vaccine candidate for endemic countries: A perspective. *Vaccine*,

- 
- 27(16), 2199–2201. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.01.032>
- Hess, D., Fisher, D., Williams, P., Pooler, S., & Kacmarek, R. M. (1996). Medication nebulizer performance. Effects of diluent volume, nebulizer flow, and nebulizer brand. *Chest*, *110*(2), 498–505. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8697857>
- Hodgins, D. C., Kang, S. Y., deArriba, L., Parreño, V., Ward, L. A., Yuan, L., ... Saif, L. J. (1999). Effects of maternal antibodies on protection and development of antibody responses to human rotavirus in gnotobiotic pigs. *Journal of Virology*, *73*(1), 186–197. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9847321>
- Howey, R., Bankowski, B., Juleff, N., Savill, N. J., Gibson, D., Fazakerley, J., ... Woolhouse, M. E. J. (2012). Modelling the within-host dynamics of the foot-and-mouth disease virus in cattle. *Epidemics*, *4*(2), 93–103. <https://doi.org/10.1016/j.epidem.2012.04.001>
- Hughes, G. J., Mioulet, V., Haydon, D. T., Kitching, R. P., Donaldson, A. I., & Woolhouse, M. E. J. (2002). Serial passage of foot-and-mouth disease virus in sheep reveals declining levels of viraemia over time. *The Journal of General Virology*, *83*(Pt 8), 1907–1914. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-8-1907>
- Hunt, E., & Wood, B. (1999). Use of blood and blood products. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, *15*(3), 641–662. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10573816>
- Inamine, A., Takahashi, Y., Baba, N., Miyake, K., Tokuhisa, T., Takemori, T., & Abe, R. (2005). Two waves of memory B-cell generation in the primary immune response. *International Immunology*, *17*(5), 581–589. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh241>
- Jackson, T., Sharma, A., Ghazaleh, R. A., Blakemore, W. E., Ellard, F. M., Simmons, D. L., ... King, A. M. (1997). Arginine-glycine-aspartic acid-specific binding by foot-and-mouth disease viruses to the purified integrin alpha(v)beta3 in vitro. *Journal of Virology*, *71*(11), 8357–8361. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9343190>
- Jackson, T., Sheppard, D., Denyer, M., Blakemore, W., & King, A. M. (2000). The epithelial integrin alphavbeta6 is a receptor for foot-and-mouth disease virus. *Journal of Virology*, *74*(11), 4949–4956. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10799568>
- Juleff, N., Windsor, M., Lefevre, E. A., Gubbins, S., Hamblin, P., Reid, E., ... Charleston, B. (2009). Foot-and-mouth disease virus can induce a specific and rapid CD4+ T-cell-independent neutralizing and isotype class-switched antibody response in naïve cattle. *Journal of Virology*, *83*(8), 3626–3636. <https://doi.org/10.1128/JVI.02613-08>
- Juleff, N., Windsor, M., Reid, E., Seago, J., Zhang, Z., Monaghan, P., ... Charleston, B. (2008). Foot-and-Mouth Disease Virus Persists in the Light Zone of Germinal Centres. *PLoS ONE*,

- 3(10), e3434. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003434>
- Kaji, T., Ishige, A., Hikida, M., Taka, J., Hijikata, A., Kubo, M., ... Takemori, T. (2012). Distinct cellular pathways select germline-encoded and somatically mutated antibodies into immunological memory. *The Journal of Experimental Medicine*, 209(11), 2079–2097. <https://doi.org/10.1084/jem.20120127>
- King, D., Mioulet, V., Knowles, N., Ludi, A., Wilsden, G., Azhar, M., ... Belgrave, S. (2018). Global Status Report for FMD: Tracking the emergence and spread of new viral lineages. Retrieved from <http://www.foot-and-mouth.org/>
- Knight-Jones, T. J. D. D., McLaws, M., & Rushton, J. (2017). Foot-and-Mouth Disease Impact on Smallholders - What Do We Know, What Don't We Know and How Can We Find Out More? *Transboundary and Emerging Diseases*, 64(4), 1079–1094. <https://doi.org/10.1111/tbed.12507>
- Knight-Jones, T. J. D. D., Robinson, L., Charleston, B., Rodriguez, L. L., Gay, C. G., Sumption, K. J., & Vosloo, W. (2016). Global Foot-and-Mouth Disease Research Update and Gap Analysis: 1 - Overview of Global Status and Research Needs. *Transboundary and Emerging Diseases*, 63, 3–13. <https://doi.org/10.1111/tbed.12528>
- König, G. A., Palma, E. L., Maradei, E., & Piccone, M. E. (2007). Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus types A and O isolated in Argentina during the 2000–2002 epizootic. *Veterinary Microbiology*, 124(1–2), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.03.015>
- Kyaw, D. T. (2011). Lymphatic system and Defense Mechanism (Immune Response).
- Lasecka-Dykes, L., Wright, C., Di Nardo, A., Logan, G., Mioulet, V., Jackson, T., ... King, D. (2018). Full Genome Sequencing Reveals New Southern African Territories Genotypes Bringing Us Closer to Understanding True Variability of Foot-and-Mouth Disease Virus in Africa. *Viruses*, 10(4), 192. <https://doi.org/10.3390/v10040192>
- Lavoria, M. Á., Di-Giacomo, S., Bucafusco, D., Franco-Mahecha, O. L., Pérez-Filgueira, D. M., & Capozzo, A. V. (2012). Avidity and subtyping of specific antibodies applied to the indirect assessment of heterologous protection against Foot-and-Mouth Disease Virus in cattle. *Vaccine*, 30(48), 6845–6850. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.09.011>
- Lefkowitz E.J, Jorgensen J.H, Pfaller M.A, C. K. . (2015). *Taxonomy and Classification of Viruses. Manual of Clinical Microbiology*. (A. Press, Ed.). Washington, D.C.
- Loeffler, F., & Frosch, P. (1898). Report of the commission for research on the foot-and-mouth disease. *Zent. Bakt. Parasitkde. Abt.I*, 23, 371–391.
- Lund, J. M., Alexopoulou, L., Sato, A., Karow, M., Adams, N. C., Gale, N. W., ... Flavell, R. A. (2004). Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proceedings of*

- 
- the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(15), 5598–5603. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400937101>
- Mahy, B. W. J. (2005). Introduction and History of Foot-and-Mouth Disease Virus. *Foot-and-Mouth Disease Virus*, 288, 1–8. [https://doi.org/10.1007/3-540-27109-0\\_1](https://doi.org/10.1007/3-540-27109-0_1)
- Manz, R. A., Hauser, A. E., Hiepe, F., & Radbruch, A. (2005). MAINTENANCE OF SERUM ANTIBODY LEVELS. *Annual Review of Immunology*, 23(1), 367–386. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115723>
- Manz, R. A., Thiel, A., & Radbruch, A. (1997). Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature*, 388(6638), 133–134. <https://doi.org/10.1038/40540>
- Maradei, E., La Torre, J., Robiolo, B., Esteves, J., Seki, C., Pedemonte, A., ... Mattion, N. (2008). Updating of the correlation between IpELISA titers and protection from virus challenge for the assessment of the potency of polyvalent aphtovirus vaccines in Argentina. *Vaccine*, 26(51), 6577–6586. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.09.033>
- Martinez, M. A., Carrillo, C., Plana, J., Mascarella, R., Bergada, J., Palma, E. L., ... Sobrino, F. (1988). Genetic and immunogenic variations among closely related isolates of foot-and-mouth disease virus. *Gene*, 62(1), 75–84. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2453395>
- 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 an antibody-dependent enhancement pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(5), 1932–1936. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8127909>
- Mateo, R., Luna, E., Rincón, V., & Mateu, M. G. (2008). Engineering viable foot-and-mouth disease viruses with increased thermostability as a step in the development of improved vaccines. *Journal of Virology*, 82(24), 12232–12240. <https://doi.org/10.1128/JVI.01553-08>
- Mateu, M. G. (1995). Antibody recognition of picornaviruses and escape from neutralization: a structural view. *Virus Research*, 38(1), 1–24. [https://doi.org/10.1016/0168-1702\(95\)00048-U](https://doi.org/10.1016/0168-1702(95)00048-U)
- Mateu, M. G., Da Silva, J. L., Rocha, E., De Brum, D. L., Alonso, A., Enjuanes, L., ... Barahona, H. (1988). Extensive antigenic heterogeneity of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *Virology*, 167(1), 113–124. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2460992>
- Mattion, N., König, G., Seki, C., Smitsaart, E., Maradei, E., Robiolo, B., ... Palma, E. L. (2004). Reintroduction of foot-and-mouth disease in Argentina: Characterisation of the isolates and development of tools for the control and eradication of the disease. *Vaccine*, 22(31–32), 4149–4162. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.06.040>

- 
- McCullough, K. C., De Simone, F., Brocchi, E., Capucci, L., Crowther, J. R., & Kihm, U. (1992). Protective immune response against foot-and-mouth disease. *Journal of Virology*, *66*(4), 1835–1840. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2009.05.003>
- McCullough, K. C., Parkinson, D., & Crowther, J. R. (1988). Opsonization-enhanced phagocytosis of foot-and-mouth disease virus. *Immunology*, *65*(2), 187–191. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2847979>
- McVicar, J. W., & Eisner, R. J. (1983). Aerosol exposure of cattle to foot-and-mouth disease virus. *The Journal of Hygiene*, *91*(2), 319–328. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6315813>
- McVicar, J. W., & Suttmoller, P. (1974). Neutralizing activity in the serum and oesophageal-pharyngeal fluid of cattle after exposure to foot-and-mouth disease virus and subsequent re-exposure. *Archiv Fur Die Gesamte Virusforschung*, *44*(2), 173–176. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4365187>
- McVicar, J. W., & Suttmoller, P. (1976). Growth of foot-and-mouth disease virus in the upper respiratory tract of non-immunized, vaccinated, and recovered cattle after intranasal inoculation. *The Journal of Hygiene*, *76*(3), 467–481. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/180177>
- Mignaqui, A. C., Ruiz, V., Perret, S., St-Laurent, G., Singh Chahal, P., Transfiguracion, J., ... Wigdorovitz, A. (2013). Transient Gene Expression in Serum-Free Suspension-Growing Mammalian Cells for the Production of Foot-and-Mouth Disease Virus Empty Capsids. *PLoS ONE*, *8*(8), e72800. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072800>
- Moffat, K., Howell, G., Knox, C., Belsham, G. J., Monaghan, P., Ryan, M. D., & Wileman, T. (2005). Effects of foot-and-mouth disease virus nonstructural proteins on the structure and function of the early secretory pathway: 2BC but not 3A blocks endoplasmic reticulum-to-Golgi transport. *Journal of Virology*, *79*(7), 4382–4395. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.7.4382-4395.2005>
- Mohan, M. S., Gajendragad, M. R., Kishore, S., Chockalingam, A. K., Suryanarayana, V. V. S., Gopalakrishna, S., ... Singh, N. (2008). Enhanced mucosal immune response in cattle persistently infected with foot-and-mouth disease virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *125*(3–4), 337–343. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.05.031>
- Mulcahy, G., Reid, E., Dimarchi, R. D., Gale, C., & Doel, T. R. (1992). Maturation of functional antibody affinity in animals immunised with synthetic foot-and-mouth disease virus. *Research in Veterinary Science*, *52*(2), 133–140. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1316628>

- 
- Muroga, N., Hayama, Y., Yamamoto, T., Kurogi, A., Tsuda, T., & Tsutsui, T. (2012). The 2010 foot-and-mouth disease epidemic in Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 74(4), 399–404. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22075710>
- Ndungu, F. M., Cadman, E. T., Coulcher, J., Nduati, E., Couper, E., MacDonald, D. W., ... Langhorne, J. (2009). Functional Memory B Cells and Long-Lived Plasma Cells Are Generated after a Single *Plasmodium chabaudi* Infection in Mice. *PLoS Pathogens*, 5(12), e1000690. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000690>
- Neff, S., Mason, P. W., & Baxt, B. (2000). High-efficiency utilization of the bovine integrin alpha(v)beta(3) as a receptor for foot-and-mouth disease virus is dependent on the bovine beta(3) subunit. *Journal of Virology*, 74(16), 7298–7306. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10906183>
- Newman, J. F., Piatti, P. G., Gorman, B. M., Burrage, T. G., Ryan, M. D., Flint, M., & Brown, F. (1994). Foot-and-mouth disease virus particles contain replicase protein 3D. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(2), 733–737. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8290591>
- Newman, M. A., Mainhart, C. R., Mallett, C. P., Lavoie, T. B., & Smith-Gill, S. J. (1992). Patterns of antibody specificity during the BALB/c immune response to hen eggwhite lysozyme. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 149(10), 3260–3272. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1431104>
- O'Rourke, K. H., & Jeffrey G. Williamson. (2000). *When did globalization begin?* Retrieved from <http://www.nber.org/papers/w7632>
- Oliver, R. E., Donaldson, A. I., Gibson, C. F., Roeder, P. L., Le Blanc Smith, P. M., & Hamblin, C. (1988). Detection of foot-and-mouth disease antigen in bovine epithelial samples: comparison of sites of sample collection by an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and complement fixation test. *Research in Veterinary Science*, 44(3), 315–319. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2841733>
- Ostrowski, M., Vermeulen, M., Zabal, O., Zamorano, P. I., Sadir, A. M., Geffner, J. R., & Lopez, O. J. (2007). The early protective thymus-independent antibody response to foot-and-mouth disease virus is mediated by splenic CD9+ B lymphocytes. *Journal of Virology*, 81(17), 9357–9367. <https://doi.org/10.1128/JVI.00677-07>
- Pacheco, J. M., Arzt, J., & Rodriguez, L. L. (2010). Early events in the pathogenesis of foot-and-mouth disease in cattle after controlled aerosol exposure. *Veterinary Journal*, 183(1), 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.08.023>
- Pacheco, J. M., Lee, K.-N., Eschbaumer, M., Bishop, E. A., Hartwig, E. J., Pauszek, S. J., ... Arzt,

- 
- J. (2016). Evaluation of Infectivity, Virulence and Transmission of FDMV Field Strains of Serotypes O and A Isolated In 2010 from Outbreaks in the Republic of Korea. *PLoS One*, 11(1), e0146445. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146445>
- Pacheco, J. M. M., Stenfeldt, C., Rodriguez, L. L. L., & Arzt, J. (2016). Infection Dynamics of Foot-and-Mouth Disease Virus in Cattle Following Intranasopharyngeal Inoculation or Contact Exposure. *Journal of Comparative Pathology*, 155(4), 314–325. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2016.08.005>
- Pacheco, J. M., Tucker, M., Hartwig, E., Bishop, E., Arzt, J., & Rodriguez, L. L. (2012). Direct contact transmission of three different foot-and-mouth disease virus strains in swine demonstrates important strain-specific differences. *The Veterinary Journal*, 193(2), 456–463. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.01.012>
- Parida, S., Anderson, J., Cox, S., Barnett, P., & Paton, D. (2006). Secretory IgA as an indicator of oro-pharyngeal foot-and-mouth disease virus replication and as a tool for post vaccination surveillance. *Vaccine*, 24(8), 1107–1116. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.09.006>
- Parida, S., Oh, Y., Reid, S. M., Cox, S. J., Statham, R. J., Mahapatra, M., ... Paton, D. J. (2006). Interferon- $\gamma$  production in vitro from whole blood of foot-and-mouth disease virus (FMDV) vaccinated and infected cattle after incubation with inactivated FMDV. *Vaccine*, 24(7), 964–969. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.08.108>
- Park, J.-N., Ko, M.-K., Kim, R.-H., Park, M.-E., Lee, S.-Y., Yoon, J.-E., ... Park, J.-H. (2016). Construction of stabilized and tagged foot-and-mouth disease virus. *Journal of Virological Methods*, 237, 187–191. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.09.013>
- Parreño, V., Béjar, C., Vagnozzi, A., Barrandeguy, M., Costantini, V., Craig, M. I., ... Fernández, F. (2004). Modulation by colostrum-acquired maternal antibodies of systemic and mucosal antibody responses to rotavirus in calves experimentally challenged with bovine rotavirus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 100(1–2), 7–24. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.02.007>
- Paton, D. J., Valarcher, J. F., Bergmann, I., Matlho, O. G., Zakharov, V. M., Palma, E. L., & Thomson, G. R. (2005). Selection of foot and mouth disease vaccine strains--a review. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 24(3), 981–993. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16642769>
- Pega, J., Bucafusco, D., Di Giacomo, S., Schammas, J. M., Malacari, D., Capozzo, A. V., ... Perez-Filgueira, M. (2013). Early Adaptive Immune Responses in the Respiratory Tract of Foot-and-Mouth Disease Virus-Infected Cattle. *Journal of Virology*, 87(5), 2489–2495. <https://doi.org/10.1128/JVI.02879-12>

- 
- Pega, J., Di Giacomo, S., Bucafusco, D., Schammas, J. M., Malacari, D., Barrionuevo, F., ... Pérez-Filgueira, M. (2015). Systemic Foot-and-Mouth Disease Vaccination in Cattle Promotes Specific Antibody-Secreting Cells at the Respiratory Tract and Triggers Local Anamnestic Responses upon Aerosol Infection. *Journal of Virology*, *89*(18), 9581–9590. <https://doi.org/10.1128/JVI.01082-15>
- Perez, A. M., Ward, M. P., & Carpenter, T. E. (2004). Control of a foot-and-mouth disease epidemic in Argentina. *Preventive Veterinary Medicine*, *65*(3–4), 217–226. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2004.08.002>
- Perry, B. D., & Rich, K. M. (2007). Poverty impacts of foot-and-mouth disease and the poverty reduction implications of its control. *Veterinary Record*, *160*(7), 238–241. <https://doi.org/10.1136/vr.160.7.238>
- Prato Murphy, M. L., Forsyth, M. A., Belsham, G. J., & Salt, J. S. (1999). Localization of foot-and-mouth disease virus RNA by in situ hybridization within bovine tissues. *Virus Research*, *62*(1), 67–76. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10513288>
- Racaniello V.R. (2007). Picornaviridae: The viruses and their replication. In S. Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B & E. rauss SE (Eds.), *Fields Virology* (5th., pp. 795–838). USA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Reed, L.J and Muench, H. (1938). A Simple Method of Estimating Fifty Percent Endpoints. *American Journal of Hygiene*, *27*: 493-497. Retrieved from [https://www.scirp.org/\(S\(351jmbntvnsjt1aadkposzje\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1843715](https://www.scirp.org/(S(351jmbntvnsjt1aadkposzje))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1843715)
- Rodríguez Pulido, M., & Sáiz, M. (2017). Molecular Mechanisms of Foot-and-Mouth Disease Virus Targeting the Host Antiviral Response. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *7*(June), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00252>
- Rueckert, R. R., & Wimmer, E. (1984). Systematic nomenclature of picornavirus proteins. *Journal of Virology*, *50*(3), 957–959. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6726891>
- Sa-Carvalho, D., Rieder, E., Baxt, B., Rodarte, R., Tanuri, A., & Mason, P. W. (1997). Tissue culture adaptation of foot-and-mouth disease virus selects viruses that bind to heparin and are attenuated in cattle. *Journal of Virology*, *71*(7), 5115–5123. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9188578>
- Samuel, A. R., & Knowles, N. J. (2001). Foot-and-mouth disease type O viruses exhibit genetically and geographically distinct evolutionary lineages (topotypes). *The Journal of General Virology*, *82*(Pt 3), 609–621. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-3-609>
- Samuel, A. R., & Knowles, N. J. (2001). Foot-and-mouth disease virus: Cause of the recent crisis



- 
- for the UK livestock industry. *Trends in Genetics*, 17(8), 421–424. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(01\)02374-5](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(01)02374-5)
- Saraiva, V., & Darsie, G. (2004). The use of vaccines in South American foot-and-mouth disease eradication programmes. *Developments in Biologicals*, 119, 33–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15742616>
- Schaller, J. P., Saif, L. J., Cordle, C. T., Candler, E., Winship, T. R., & Smith, K. L. (1992). Prevention of human rotavirus-induced diarrhea in gnotobiotic piglets using bovine antibody. *The Journal of Infectious Diseases*, 165(4), 623–630. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1313067>
- Schroeder, H. W., & Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2 Suppl 2), S41-52. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.046>
- Scott, K. A., Rathogwa, N. M. M., Capozzo, A. V. V., & Maree, F. F. (2017). Evaluation of immune responses of stabilised SAT2 antigens of foot-and-mouth disease in cattle. *Vaccine*, 35(40), 5426–5433. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.02.003>
- Slifka, M. K., Antia, R., Whitmire, J. K., & Ahmed, R. (1998). Humoral immunity due to long-lived plasma cells. *Immunity*, 8(3), 363–372. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9529153>
- Sobrinho, F., & Domingo, E. (2001). Foot-and-mouth disease in Europe: FMD is economically the most important disease of farm animals. Its re-emergence in Europe is likely to have consequences that go beyond severe alterations of livestock production and trade. *EMBO Reports*, 2(6), 459–461. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kve122>
- Sobrinho, F., Sáiz, M., Jiménez-Clavero, M. A., Núñez, J. I., Rosas, M. F. M. F. M. F., Baranowski, E., ... Ley, V. (2001). Foot-and-mouth disease virus: A long known virus, but a current threat. *Veterinary Research*, 32(1), 1–30. <https://doi.org/10.1051/vetres:2001106>
- Soldan, A. (1999). Blood transfusions in cattle. *In Practice*, 21(10), 590–595. <https://doi.org/10.1136/inpract.21.10.590>
- Soria, I., Quattrocchi, V., Langelotti, C., Gammella, M., Digiacomio, S., Garcia de la Torre, B., ... Zamorano, P. (2017). Dendrimeric peptides can confer protection against foot-and-mouth disease virus in cattle. *PLOS ONE*, 12(9), e0185184. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185184>
- Spitteler, M. A., Fernández, I., Schabes, E., Krimer, A., Régulier, E. G., Guinzburg, M., ... Levy, M. S. (2011). Foot and mouth disease (FMD) virus: Quantification of whole virus particles during the vaccine manufacturing process by size exclusion chromatography. *Vaccine*,

- 
- 29(41), 7182–7187. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.05.078>
- Stenfeldt, C., & Belsham, G. J. (2012). Detection of foot-and-mouth disease virus RNA in pharyngeal epithelium biopsy samples obtained from infected cattle: Investigation of possible sites of virus replication and persistence. *Veterinary Microbiology*, *154*(3–4), 230–239. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.07.007>
- Stenfeldt, C., Eschbaumer, M., Rekant, S. I., Pacheco, J. M., Smoliga, G. R., Hartwig, E. J., ... Arzt, J. (2016). The Foot-and-Mouth Disease Carrier State Divergence in Cattle. *Journal of Virology*, *90*(14), 6344–6364. <https://doi.org/10.1128/JVI.00388-16>
- Stenfeldt, C., Heegaard, P. M., Stockmarr, A., Tjørnehøj, K., & Belsham, G. J. (2011). Analysis of the acute phase responses of Serum Amyloid A, Haptoglobin and Type 1 Interferon in cattle experimentally infected with foot-and-mouth disease virus serotype O. *Veterinary Research*, *42*(1), 66. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-66>
- Sutmoller, P., & Casas, O. R. (2002). Unapparent foot and mouth disease infection (sub-clinical infections and carriers): implications for control. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, *21*(3), 519–529. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12523693>
- Sutmoller, P., & McVicar, J. W. (1972). Foot-and-mouth disease: changes in serum-neutralizing activity of immunized cattle shortly after virus exposure. *Infection and Immunity*, *6*(5), 718–722. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4344366>
- Sutmoller, P., McVicar, J. W., & Cottral, G. E. (1968). The epizootiological importance of foot-and-mouth disease carriers. I. Experimentally produced foot-and-mouth disease carriers in susceptible and immune cattle. *Archiv Fur Die Gesamte Virusforschung*, *23*(3), 227–235. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5680590>
- Takemori, T., Kaji, T., Takahashi, Y., Shimoda, M., & Rajewsky, K. (2014). Generation of memory B cells inside and outside germinal centers. *European Journal of Immunology*, *44*(5), 1258–1264. <https://doi.org/10.1002/eji.201343716>
- Taylor, J. J., Pape, K. A., & Jenkins, M. K. (2012). A germinal center-independent pathway generates unswitched memory B cells early in the primary response. *The Journal of Experimental Medicine*, *209*(3), 597–606. <https://doi.org/10.1084/jem.20111696>
- Thalmann, G., & Nöckler, A. (2001). [Occurrence of foot and mouth disease--a historical survey]. *DTW. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, *108*(12), 484–494. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11822161>
- Thompson, D., Muriel, P., Russell, D., Osborne, P., Bromley, A., Rowland, M., ... Brown, C. (2002). Economic costs of the foot and mouth disease outbreak in the United Kingdom in

- 
2001. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 21(3), 675–687. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12523706>
- Tizard, I. R. (2009). *Introducción a la Inmunología Veterinaria* (8va edición). Barcelona, España.
- Toka, F. N., & Golde, W. T. (2013). Cell mediated innate responses of cattle and swine are diverse during foot-and-mouth disease virus (FMDV) infection: a unique landscape of innate immunity. *Immunology Letters*, 152(2), 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2013.05.007>
- van Vlijmen, H. W. T., Curry, S., Schaefer, M., & Karplus, M. (1998). Titration calculations of foot-and-mouth disease virus capsids and their stabilities as a function of pH 1 Edited by A. R. Fersht. *Journal of Molecular Biology*, 275(2), 295–308. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1418>
- Vos, Q., Lees, A., Wu, Z. Q., Snapper, C. M., & Mond, J. J. (2000). B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. *Immunological Reviews*, 176, 154–170. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11043775>
- Wang, C. Y., Chang, T. Y., Walfield, A. M., Ye, J., Shen, M., Chen, S. P., ... Brown, F. (2002). Effective synthetic peptide vaccine for foot-and-mouth disease in swine. *Vaccine*, 20(19–20), 2603–2610. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12057619>
- Wang, D., Fang, L., Liu, L., Zhong, H., Chen, Q., Luo, R., ... Xiao, S. (2011). Foot-and-mouth disease virus (FMDV) leader proteinase negatively regulates the porcine interferon- $\lambda$ 1 pathway. *Molecular Immunology*, 49(1–2), 407–412. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2011.09.009>
- Wang, D., Fang, L., Luo, R., Ye, R., Fang, Y., Xie, L., ... Xiao, S. (2010). Foot-and-mouth disease virus leader proteinase inhibits dsRNA-induced type I interferon transcription by decreasing interferon regulatory factor 3/7 in protein levels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 399(1), 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.07.044>
- Windsor, M. A., Carr, B. V., Bankowski, B., Gibson, D., Reid, E., Hamblin, P., ... Charleston, B. (2011). Cattle remain immunocompetent during the acute phase of foot-and-mouth disease virus infection. *Veterinary Research*, 42(1), 108. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-108>
- Wright, J. G. (1930). Avertin Narcosis in the Small Domestic Animals. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 24(2), 247–250. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19987886>
- Xiao, Y., Chen, H.-Y., Wang, Y., Yin, B., Lv, C., Mo, X., ... Tian, K. (2016). Large-scale production of foot-and-mouth disease virus (serotype Asia1) VLP vaccine in *Escherichia coli* and protection potency evaluation in cattle. *BMC Biotechnology*, 16(1), 56.

---

<https://doi.org/10.1186/s12896-016-0285-6>

- Yang, P. C., Chu, R. M., Chung, W. B., & Sung, H. T. (1999). Epidemiological characteristics and financial costs of the 1997 foot-and-mouth disease epidemic in Taiwan. *The Veterinary Record*, *145*(25), 731–734. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10972111>
- Yuan, H., Li, P., Ma, X., Lu, Z., Sun, P., Bai, X., ... Liu, Z. (2017). The pH stability of foot-and-mouth disease virus. *Virology Journal*, *14*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0897-z>
- Zinkernagel, R. M., & Hengartner, H. (2006). Protective “immunity” by pre-existent neutralizing antibody titers and preactivated T cells but not by so-called “immunological memory.” *Immunological Reviews*, *211*(1), 310–319. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2006.00402.x>