

**Universidad de Buenos Aires**  
Facultad de Ciencias Veterinarias



**“Modelo animal alternativo para el control de  
eficacia de vacuna antiaftosa y su correlación con  
métodos indirectos”**

Tesis para optar por el título de Doctora en la Universidad  
de Buenos Aires

**Lic. Victoria Gnazzo**

Director: Dra. Zamorano Patricia Inés

Co-director: Dra. Smitsaart Eliana

Lugar: Instituto de Virología-CICVyA-INTA Castelar

Buenos Aires 2017

Este trabajo doctoral se realizó en el Área de Inmunología e Inmunomoduladores del Instituto de Virología perteneciente al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Hurlingham, con el aporte de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.



*A mi familia*

*A mis amigos que están a cerca y a los que están a miles de kilómetros*

*Siempre conmigo*

# Índice

<i>ABREVIATURAS</i> _____	9
<i>INTRODUCCIÓN</i> _____	11
<b>1. LA ENFERMEDAD Y SU AGENTE</b> _____	12
<b>1.1 ESTRUCTURA DEL VIRUS VFA</b> _____	12
<b>1.2 ORGANIZACIÓN GENOMICA Y PROTEINAS CODIFICADAS POR EL VFA.</b> ____	13
<b>1.3 CICLO DE REPLICACIÓN VIRAL</b> _____	15
<b>1.4 PATOGENIA</b> _____	17
<b>1.5 SIGNOS CLÍNICOS EN BOVINOS</b> _____	19
<b>1.6 TRANSMISIÓN Y SUPERVIVENCIA DEL VFA</b> _____	20
<b>1.7 SEROTIPOS DEL VFA</b> _____	21
<b>1.8 DISTRIBUCIÓN MUNDIAL DE LA FA</b> _____	21
<b>1.9 FIEBRE AFTOSA EN EL MUNDO</b> _____	22
<b>1.10 ANTECEDENTES DE FA Y SITUACIÓN ACTUAL EN AMÉRICA DEL SUR.</b> ____	24
<b>1.11 ANTECEDENTES DE FA Y SITUACIÓN ACTUAL EN LA ARGENTINA</b> ____	25
<b>1.12 CONSECUENCIAS ECONÓMICAS DE LA ENFERMEDAD</b> _____	27
<b>2. RESPUESTA INMUNE CONTRA INFECCIONES VIRALES</b> _____	28
<b>2.1 RESPUESTA HUMORAL: ISOTIPOS</b> _____	30
<b>2.2 RESPUESTA HUMORAL: AVIDEZ DE LOS ACS</b> _____	31
<b>3. RESPUESTA INMUNE CONTRA EL VFA</b> _____	32
<b>4. VACUNAS Y VACUNACIÓN</b> _____	34
<b>4.1 EVALUACIÓN DE VACUNAS</b> _____	36
<b>5. MODELOS ALTERNATIVOS PARA LA EVALUACIÓN DE VACUNAS</b> _____	40

<b>6. RESPUESTA INMUNE FRENTE AL VFA EN EL MODELO MURINO</b>	<b>42</b>
<i>HIPOTESIS Y OBJETIVOS</i>	<b>48</b>
<i>MATERIALES Y METODOS</i>	<b>49</b>
<b>2. Líneas celulares</b>	<b>50</b>
<b>3. Virus</b>	<b>50</b>
<b>4. Formulaciones vacunales</b>	<b>51</b>
<b>5. Inmunizaciones</b>	<b>52</b>
<b>6. Obtención de muestras de ratones</b>	<b>52</b>
6.1.1. Obtención de sangre	52
6.4. Obtención de órganos	53
<b>7. Titulación viral por el método de punto final</b>	<b>53</b>
<b>8. Desafío en el modelo murino y evaluación de viremia</b>	<b>54</b>
<b>9. Desafío en bovinos: Prueba de Protección a la Generalización Podal (PGP)</b>	<b>55</b>
<b>10. Preparación de reactivos para el ELISA FL</b>	<b>58</b>
10.1 Obtención de suero anti VFA de conejo	58
10.2 Obtención de sueros Hiperinmune de cobayo	58
10.3 Purificación del VFA A2001 y O1 Campos: para la inmunización de conejos	58
10.4 Preparación del antígeno para los ELISA	58
10.5 Sueros de Referencia para el ELISA FL de ratón.	58
<b>11. ELISA en Fase Líquida (ELISA FL)</b>	<b>59</b>
<b>12. ELISA para detección de isotipos murinos</b>	<b>59</b>
<b>13. ELISA para detección de Acs IgA contra el VFA en saliva murina:</b>	<b>60</b>
<b>14. ELISA para evaluación de Avidéz en suero murinos:</b>	<b>60</b>
<b>15. ELISA para la determinación de la concentración de IFN<math>\gamma</math> en sobrenadantes de células murinas:</b>	<b>61</b>
<b>16. Análisis estadístico de los datos</b>	<b>62</b>
16.1 Repetibilidad del ELISA FL desarrollado en INTA.	62

16.2 Construcción del modelo logístico de predicción de protección.	62
16.3 Concordancia de la protección raton-bovino.	63
<b>17. Medidas de bioseguridad</b>	<b>64</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>65</b>
<b>Capitulo 1:VFA O1CAMPOS: ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS Y CARACTERIZACIÓN DE LA INFECCIÓN</b>	<b>66</b>
1.1. Desarrollo de un ELISA FL para la evaluación de los Acs contra VFA serotipo O1 Campos en ratones.	68
1.3. Repetibilidad del ensayo de vacunación y determinación serológica.	77
1.4. Estandarización del modelo murino	79
1.5. Caracterización de la infección por VFA serotipo O1Campos en ratones BALB/c.	80
1.6. Determinación de la dosis viral para realizar los desafíos	82
1.7. Cinética de la infección con VFA O1Campos	83
1.8. Determinación del efecto del virus sobre los ratones luego del desafío.	84
1.9. Distribución del virus en sangre y diferentes órganos luego de la infección	85
1.10. Evaluación histopatológica.	86
<b>Capitulo 2: PREDICCIÓN DE LA PROTECCIÓN CONTRA VFA O1 CAMPOS</b>	<b>88</b>
2.1. Curva dosis respuesta inducida por vacunas experimentales con diferente masa viral.	89
2.2 Evaluación de vacunas contra VFA. Acs inducidos en ratón y en bovinos	91
2.3. Asociación entre niveles de Acs contra VFA medidos por ELISA FL en ratones y bovinos.	92
2.4. Asociación entre niveles de protección en ratón y bovino.	94
2.5. Clasificación de las vacunas según protección en ratón y en bovino	96
<b>Capitulo 3: NUEVOS PARÁMETROS PARA EL AJUSTE DE LA PREDICCIÓN</b>	<b>98</b>
3.1. Estudio de la protección inducida por la vacunación en ratones.	100
3.3. Incorporación de los parámetros evaluados en un estudio estadístico.	114
3.4. Concordancia entre la protección predicha y la protección real en el ratón.	123
3.5. Concordancia entre la protección predicha por el modelo y la protección real obtenida en bovinos	129
<b>Capitulo 4: VFA A2001: ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS Y CARACTERIZACIÓN DE LA INFECCIÓN</b>	<b>131</b>
4.1. Desarrollo de un ELISA FL para la evaluación de los Acs contra VFA serotipo A2001 en ratones	132

4.2. Estandarización del modelo murino	134
4.3. Caracterización de la infección por VFA serotipo A2001 en ratones BALB/c	135
4.4. Determinación del efecto del virus sobre los ratones luego del desafío.	137
4.5. Localización del virus en sangre y en diferentes órganos luego de la infección.	137
4.6. Evaluación histopatológica	138
<b>Capitulo 5: PREDICCIÓN DE LA PROTECCIÓN CONTRA VFA A2001</b>	<b>141</b>
5.1. Curva dosis respuesta generada por vacunas experimentales con diferente masa viral.	142
5.2. Evaluación de vacunas contra VFA. Acs inducidos en ratón y en bovinos	143
5.3. Evaluación de la inducción de anticueros y la protección heteróloga inducida por vacunas contra el VFA serotipo A24 en ratones y bovinos.	144
<b>ANEXO 1</b>	<b>147</b>
1.1. DESARROLLO DEL ELISA FL PARA VFA O1 CAMPOS.	147
<b>ANEXO 2</b>	<b>151</b>
2.1. CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN DE PROTECCIÓN EN RATONES Y EN BOVINOS	151
<b>ANEXO 3</b>	<b>156</b>
3.1. DESARROLLO DEL ELISA FL PARA VFA A2001	156
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>158</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>178</b>

## RESUMEN

### **“Modelo animal alternativo para el control de eficacia de vacuna antiaftosa y su correlación con métodos indirectos”**

La protección contra el Virus de la Fiebre Aftosa (VFA) ha sido relacionada con el desarrollo de la respuesta humoral, ya que coincide con la eliminación de lesiones, disminución de la viremia y con la reducción de la excreción viral. Los test controles oficiales en Argentina para evaluar la potencia de las vacunas de VFA son: la Prueba de Generalización Podal (PGP) en bovinos vacunados y desafiados y la cuantificación de anticuerpos (Acs) a los 60 días post-vacunación por ELISA en fase líquida con el cual se estima la Expectativa Porcentual de Protección (EPP) para la evaluación de la eficacia de las vacunas a nivel de lote.

En este trabajo se demuestra que el ratón BALB/c podría reemplazar al bovino en las pruebas de potencia de las vacunas y se propone que a partir de parámetros inmunológicos humorales evaluados en ratón se pueda estimar el porcentaje de protección en bovinos luego de la vacunación y el desafío.

Se estudió la correlación de la respuesta inmune de bovinos y ratones frente a la vacunación y al desafío viral contra el serotipo O1Campos del VFA. La relación entre los niveles de Acs en bovinos y ratones a los 60 y 21 días post-vacunación respectivamente, fue estadísticamente significativa (90%) entre los niveles de Acs anti-VFA de ambas especies, apoyada por el cálculo del índice Kappa (0,75) en un total de 39 vacunas oleosas. Asimismo, se determinó que la protección en ambas especies luego de la vacunación y desafío también resultaba en una buena concordancia 88% (Kappa 0,75).

Sin embargo, en algunos casos se observó que vacunas que presentaban un alto nivel de anticuerpos en ambas especies no protegían frente al desafío por lo que se realizó la medición de una serie de parámetros inmunológicos que podrían mejorar la predicción de la protección en ratones, sin la necesidad de utilizar virus infectivo.

Los parámetros analizados fueron, IgA en saliva, IFN- $\gamma$  secretado por los esplenocitos de ratones vacunados, el isotipo de inmunoglobulina inducida por la vacunación, la relación entre los tipos de IgG y el índice de avidéz de los sueros. Con los resultados obtenidos de estas mediciones se planteó el diseño de un modelo logístico de predicción de la protección que incluyó un subconjunto óptimo de variables explicativas. Se realizó a partir de una base de datos que contenía las posibles variables predictoras de protección (variables continuas) y la respuesta de Protección o No protección (variable dicotómica).

Las variables Acs ELISA FL, Relación entre isotipos (IgG2b/IgG1) e índice de Avidéz fueron identificadas como buenas predictoras, obteniéndose un modelo de predicción de protección óptimo. Con este modelo se sometieron a evaluación los datos de predicción de protección estimados por el modelo murino con los datos reales de protección en el bovino para una serie de vacunas, se obtuvo una concordancia del 88% asociada a un Kappa de 0,75. Esto indica que el modelo murino propuesto podría servir como alternativa rápida, económica y en concordancia con el concepto de las 3 Rs (Reemplazar, Refinar y Reducir) para la evaluación de la eficacia de vacunas contra el VFA serotipo O1Campos.

## ABREVIATURAS

**Acs:** Anticuerpos

**ADN:** ácido desoxiribonucleico

**AIC:** Criterio de Akaike

**Al(OH)<sub>3</sub>:** Hidróxido de aluminio.

**ARN:** ácido ribonucleico

**BHK:** Baby hámster Kidney

**BCR:** Receptor Linfocito B

**CD:** célula dendrítica

**CV:** Coeficiente de variación

**DIB:** Dosis infectiva bovino

**DITC<sub>50</sub>/ml:** dosis infectivas cultivo de tejido 50%/mililitro

**DLRL<sub>50</sub>/ml:** dosis letales ratón lactante 50%/mililitro

**DO:** densidad óptica

**dpi:** días post-infección

**dpv:** días post-vacunación

**ds:** desvío standart

**ECP:** efecto citopático

**ELISA**

**EPP:** Expectativa porcentual de protección

**FA:** Fiebre Aftosa

**FcR:** receptores para la porción Fc de Acs

**FL:** Fase líquida

**Hpi:** Horas post inoculación

**IFN:** interferón

**IC:** intervalo de confianza

**Ig:** Inmunoglobulina

**IL:** Interleuquina

**ip:** intraperitoneal

**LB:** linfocito B

**LT:** linfocito T

**NK:** célula "natural killer"

**nm:** nanómetros

**OIE:** Organización Internacional de Epizootias.

**PD50:** Dosis protectora 50

**PGP:** protección contra la generalización podal

**SN:** seroneutralizantes

**SNC:** Suero normal de conejo

**Th1:** linfocitos T colaboradores tipo 1

**Th2:** linfocitos T colaboradores tipo 2

**TD:** timo dependiente

**TI:** timo independiente

**TLR:** receptores tipo Toll

**VFA:** virus de la Fiebre Aftosa

**µg:** microgramo

# INTRODUCCIÓN

## 1. LA ENFERMEDAD Y SU AGENTE

En el año 1514 fue realizada en Italia, la primera descripción escrita de una enfermedad en bovinos con características similares a la Fiebre Aftosa (FA). Casi 400 años después, en 1897, Loeffler y Frosch demostraron que un agente filtrable era el causante de la FA (Grubman y Baxt, 2004).

La FA es la enfermedad más contagiosa de los mamíferos y posee un gran potencial para causar graves pérdidas económicas. Esta enfermedad afecta a animales biungulados de pezuña hendida, como el ganado vacuno, porcino, ovino, caprino y búfalos dentro de las especies domésticas, y más de 70 especies salvajes como ciervos, antílopes y búfalos africanos. La sintomatología característica está dada por fiebre y lesiones vesiculares en lengua, patas, nariz y pezones, que dificultan el movimiento y la alimentación de los animales (Cottral y Bachrach, 1968).

El agente etiológico de esta enfermedad es un virus que, dentro del Orden *Picornavirales*, pertenece al género *Aftovirus*.

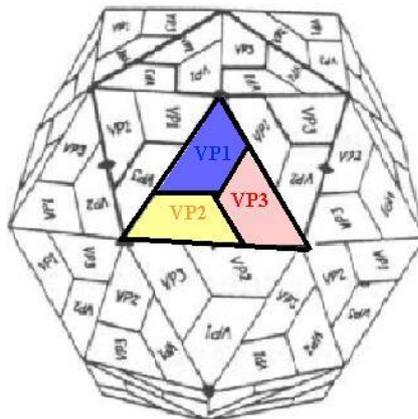
### 1.1 ESTRUCTURA DEL VIRUS VFA

El virus de la Fiebre Aftosa (VFA), presenta un coeficiente de sedimentación de 140S consistente de un ARN de cadena simple y polaridad positiva, de aproximadamente 8500 bases rodeado de cuatro proteínas capsidales, cuya denominación más conocida es VP1, VP2, VP3 y VP4, con 60 copias de cada una de ellas, formando una cápside icosaédrica de aproximadamente 22 nm de diámetro (Vázquez y col., 1978). El virus carece de envoltura lipoproteica (Drzeniek y Bilello, 1974). En su interior, la cápside aloja dos proteínas minoritarias VP0, precursor de VP2 y VP4 de 40 kDa y la polimerasa viral 3D de 52 kDa (Sangar y col., 1976; Newman y Brown, 1997). Asimismo, una copia de la proteína 3B (VPg) se encuentra covalentemente unida al ARN (Figura 1).

Durante el ensamblaje de la partícula viral una copia de VP1, una de VP0 y una de VP3 se agrupan para formar un protómero; cinco protómeros se agrupan a su vez, formando un pentámero (Curry y col., 1997). Estos pentámeros con coeficiente

de sedimentación 12S constituyen las caras del icosaedro (Burroughs y col., 1971). Doce pentámeros se asocian con una molécula de ARN para formar la cara externa de la partícula viral (Talbot y col., 1973) (1-1). El clivaje de VP0, originando VP2 y VP4, es autocatalítico y ocurre únicamente luego de la encapsidación del ARN viral, la adquisición de infectividad del pro-virion y los sucesos primarios de la entrada del virus a las células blanco (Moscufo y col., 1993).

La proteína VP1 formada por alrededor de 211 residuos de aminoácidos (según el serotipo de VFA al que nos refiramos) es la más antigénica y la que incluye los determinantes de neutralización viral, consecuentemente es importante para el diseño de las vacunas. Asimismo es la proteína que presenta mayor variabilidad genética y donde se encuentra el sitio responsable de la adsorción a las células. (Bittle y col., 1982; DiMarchi y col., 1986).



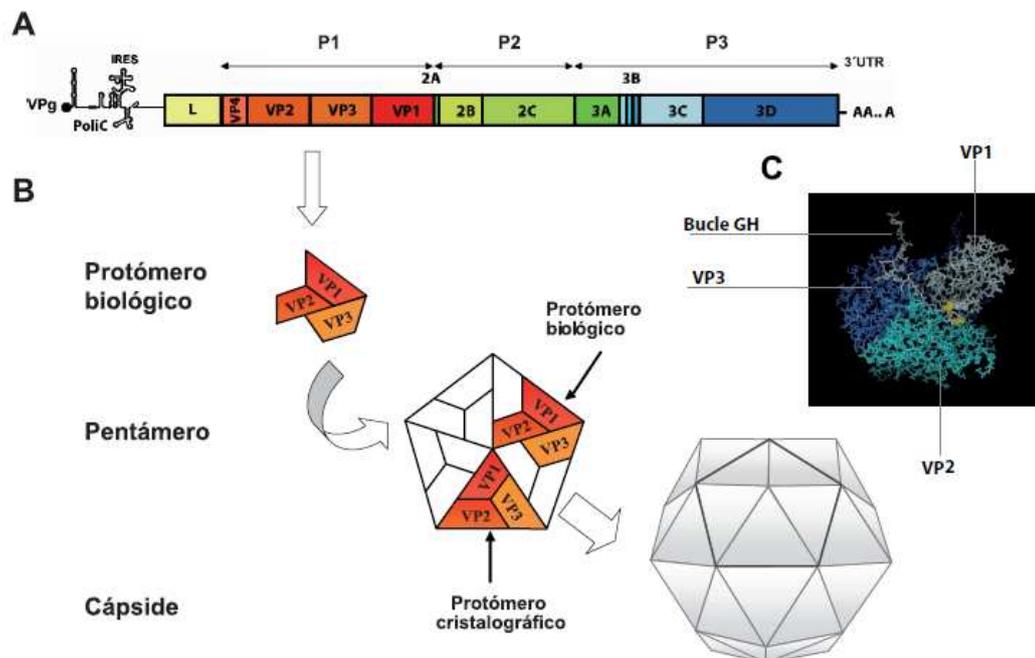
**Figura 1:** Esquema de la estructura icosaédrica de la cápsula del VFA. En el centro se representa un protómero formado por las proteínas VP1-VP2-VP3. El conjunto de 5 protómeros (contorneado en negro) conforman un pentámero 12S (Luo y col., 1988).

## 1.2 ORGANIZACIÓN GENÓMICA Y PROTEÍNAS CODIFICADAS POR EL VFA.

El genoma del VFA tiene una organización básica similar a otros miembros de la familia *Picornaviridae*. El ARN viral es traducido en un único marco abierto de lectura que resulta en una poliproteína, la cual luego de una serie de clivajes proteolíticos postraduccionales da origen a los productos intermedios y finalmente a las proteínas maduras, tanto capsidales como no capsidales (Grubman y col.,

1984; Roberrtson y col., 1985; Rueckert y Wimmer, 1984). Además de la región codificante, el genoma presenta regiones 5' y 3' no codificantes.

El ARN genómico es poliadenilado en su extremo 3' y presenta en el extremo 5' una proteína codificada por él mismo, denominada VPg (*virion protein genome*) que juega un rol importante en la iniciación de la síntesis del ARN viral (Paul y col., 1998; Ferrer-Orta y col., 2006a). La replicación del ARN está catalizada por una ARN polimerasa ARN-dependiente (3D) codificada por la región P3 del genoma. La baja fidelidad de copia de esta proteína es el origen de la variabilidad genética del VFA (Ferrer-Orta y col., 2006b).



**Figura 2:** Organización genómica y estructura de la partícula del VFA A) Esquema del genoma; B) Esquema de la cápside; C) Representación de la estructura tridimensional de un protómero biológico con el bucle GH (Ojosnegros Martos, 2008).

El primer producto maduro de la traducción viral es Lpro, una proteasa tipo papaína de papel fundamental en la virulencia (Kleina y Grubman, 1992). Los productos maduros dan lugar a una cápside icosaédrica compuesta de 60 copias de cada una de las cuatro proteínas estructurales VP4, VP2, VP3 y VP1 (también conocidas como 1A, 1B, 1C y 1D) codificadas dentro de la región P1 (Rueckert y Wimmer, 1984). El sitio más antigénico en todos los serotipos de FMDV se

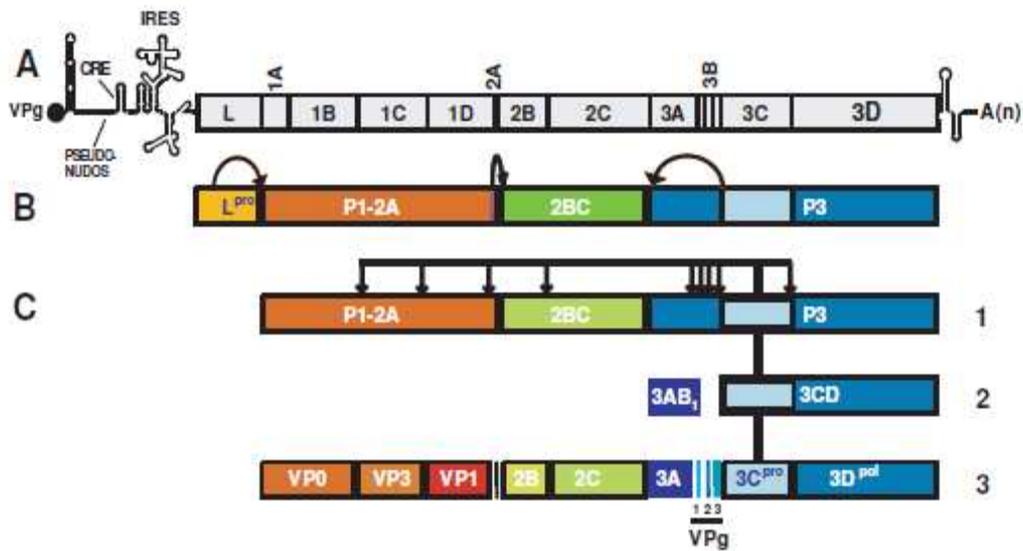
encuentra dentro de un loop altamente variable en VP1 (1D). En consecuencia, la variación en esta región ha impedido el desarrollo de vacunas que puedan proporcionar protección cruzada entre los serotipos (Brehm y col., 2008). Las regiones P2 y P3 codifican la mayor parte de las proteínas virales no estructurales (NS) que se requieren para la replicación incluyendo 2A, 2B, 2C, 3A, 3 copias de 3B (también denominado VPg), 3Cpro y 3Dpol. 3Cpro es la cisteína proteasa codificada por el virus, responsable de la mayoría de los clivajes proteolíticos en P1, P2 y P3 que dan lugar a productos maduros (Vakharia y col., 1987). Al final del ORF hay una 3'UTR relativamente corta compuesta de dos bucles de poli (A), ambos requeridos para la infectividad viral y que se sabe estimulan la actividad de IRES (Serrano y col., 2006)(Figura 2).

### 1.3 CICLO DE REPLICACIÓN VIRAL

En general el ciclo de replicación del VFA es corto, aproximadamente 6 horas. Este ciclo es lítico con generación de efecto citopático (ECP), presentando como efecto más destacado la reorganización de membranas subcelulares (Rueckert, 1996; Knox y col., 2005; Monaghan y col., 2004). La adsorción es mediada por la proteína capsidal VP1, a través del tripéptido compuesto por los residuos de Arg-Gly-Asp (sitio RGD) en las posiciones 145, 146 y 147, en el bucle GH de la proteína VP1 (Fox y col., 1989), responsable por la ligación virus-célula. El tripéptido RGD se encuentra conservado en los distintos serotipos y se expone en la superficie del virión (Logan y col., 1993; Baxt y Becker, 1990). Aminoácidos situados en las posiciones 203-213 también parecen participar durante el proceso de interacción con los receptores celulares.

La unión a las células se realiza a través de receptores celulares que para el VFA son familia de integrinas (Burman y col., 2006). El bucle de unión al receptor coincide con el sitio antigénico principal del VFA (sitio A) (Mateu y col., 1996).

El procesamiento del polipéptido P1 (1ABCD-2A) da lugar a las cuatro proteínas de la cápside. La asociación de las mismas para formar la cápside viral es favorecida por el orden de traducción de esas proteínas NH<sub>2</sub>-VP4-VP2-VP3-VP1-COOH (Grubman y col., 1984; Sangar y col., 1980).



**Figura 3:** Representación esquemática del procesamiento de la poliproteína viral. A) Esquema del genoma de VFA. B) Se representan los 3 precursores intermedios que se generan tras la síntesis de la poliproteína viral. C) Los 3 polipéptidos obtenidos tras la síntesis de la poliproteína viral (Ojosnegros Martos, 2008).

3Dpol es la ARN polimerasa ARN dependiente (RdRp) que proporciona fidelidad durante la replicación (Domingo y col., 2002). Se utiliza como molde para la síntesis de nuevas cadenas de ARN de polaridad (+) (Sangar y col., 1979). Las nuevas cadenas positivas podrán ser traducidas, encapsidadas formando una nueva partícula viral o servir de molde para nuevas cadenas de polaridad (-) (Baltimore y col., 1966) (Figura 3).

Durante el inicio de la infección la baja concentración de P1 y de la enzima responsable del clivaje (3C o 3CD) regula este proceso. 3Cpro se dirige a los factores de iniciación de la traducción que contribuyen a la desactivación de la traducción de Lpro de células huésped (Belsham y col., 2000), y la proteína de unión a ARN para promover la traducción viral (Lawrence y col., 2012; Rai y col., 2015).

En la etapa tardía del ciclo replicativo, ocurre un aumento de concentración del precursor y de la enzima, dejando disponibles las proteínas para armado de los pentámeros, los que recubren las cadenas positivas de RNA asociadas a VPg para formar los pro virus (Olascoaga y col., 1999).

El empaquetamiento del ARN viral es un proceso específico, ya que apenas las cadenas de polaridad positiva asociadas a VPg son empaquetadas, son excluidas las cadenas que sirven como mensajero, cadenas negativas y cualquier otro ARN celular. Existen estudios que atribuyen ese proceso de señalización a la polimerasa viral, la que permanecería ligada a las cadenas positivas nacientes indicando el proceso de empaquetamiento (Newman y col., 1994).

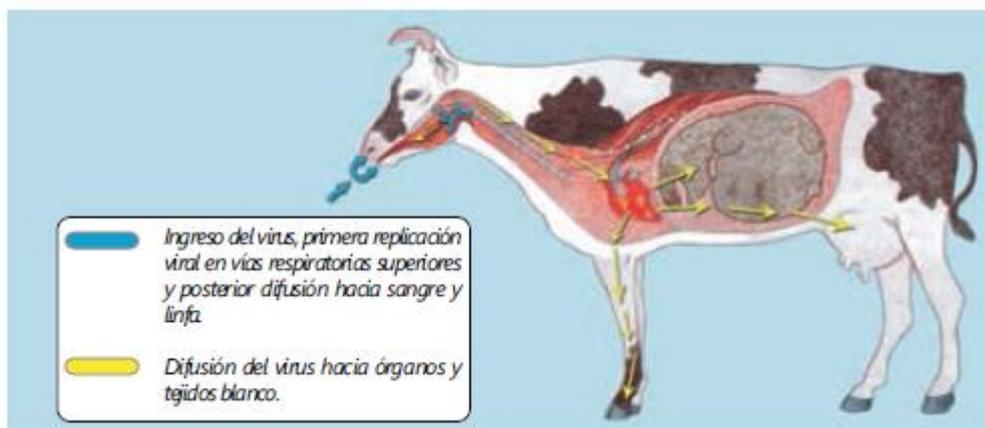
Finalmente, ocurre el clivaje de VPO, formando las cuatro subunidades maduras características de los picornavirus (VP4, VP2, VP3 e VP1). Con los clivajes el provirus inmaduro se torna infeccioso. Las partículas virales maduras forman cristales en las células infectadas y, posteriormente son liberadas por desintegración de las mismas, una vez que la síntesis de macromoléculas de las células del hospedador fue inhibida.

#### 1.4 PATOGENIA

A pesar que la FA afecta a una gran variedad de animales de pezuña hendida, la patogénesis de la enfermedad ha sido estudiada principalmente en bovinos y cerdos. La infección en bovinos generalmente ocurre por el ingreso por vía respiratoria de partículas virales aerolizadas seguida por la infección de las células del área orofaríngea (Donaldson, 1987). La infección puede ocurrir también a través de lesiones en las membranas mucosas o en la piel, pero esta vía es menos eficiente, requiriendo 10.000 dosis más de virus (Donaldson y col., 1987) (Figura 4).

Varios estudios han sugerido que el área pulmonar o faríngea son los sitios principales de replicación viral del virus con rápida diseminación del mismo a los epitelios de las áreas podales y (Brown y col., 1992; Suttmoller y Mc Vicar, 1976). El virus se replica en mucosa nasal, laríngea, faríngea, esofágica, traqueal y pulmonar, diseminándose luego a las zonas adyacentes a través de la corriente sanguínea y linfática, infectando los ganglios linfáticos, otras glándulas, y los sitios de preferencia para desarrollar las lesiones. Luego de ello, el virus se presenta en alta concentración en las secreciones nasales, bucales, heces, orina, leche, mucus vaginal, semen, etc. Comienza la aparición de las vesículas en la cavidad oral, nasal, patas, pezones y esporádicamente en rumen. Generalmente la aparición de

las vesículas está precedida por fiebre. La presencia de vesículas conlleva a la manifestación de los signos clínicos de la enfermedad: salivación, descarga nasal y cojeras. Luego de un corto tiempo las vesículas se rompen formando úlceras y evolucionan los signos clínicos, finalizando la fiebre y la viremia, para comenzar la producción de Acs detectables. En este período se inicia la cicatrización de las lesiones del animal, volviendo éste a alimentarse y disminuyendo los títulos de virus en los fluidos y tejidos. Aunque la cicatrización se haya completado, el virus puede persistir en la región faríngea, dando como resultado el estado de portador. El período de incubación puede ser entre 2 y 14 días, dependiendo con la dosis del virus a que fue expuesto el animal y la ruta de infección.



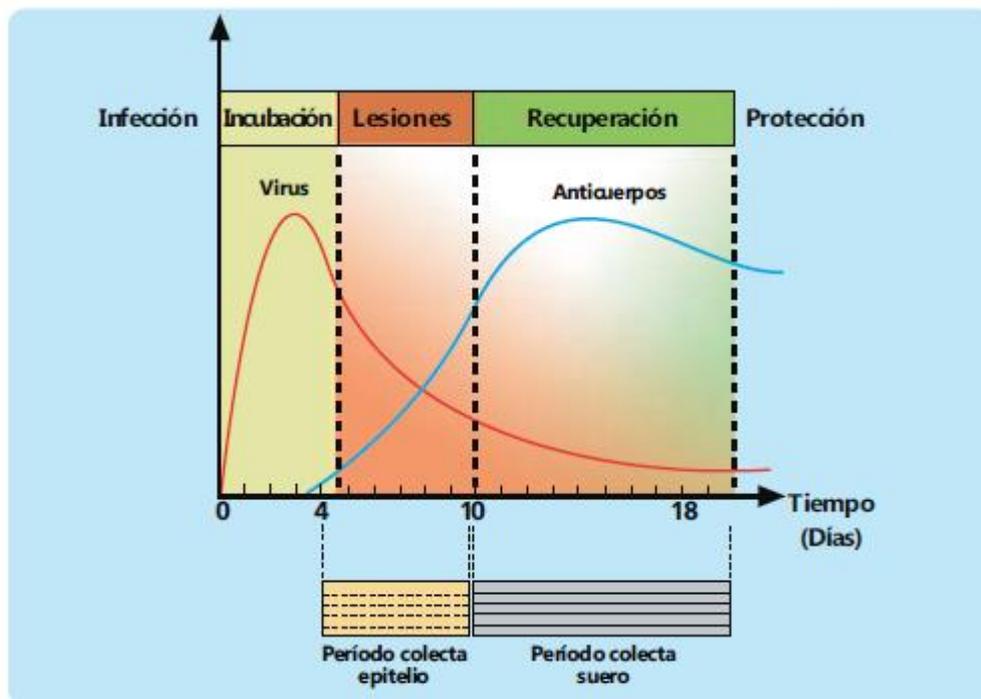
**Figura 4:** Ingreso y difusión del VFA. Fuente: Guía para la atención de focos y situaciones de emergencia sanitarias de Fiebre Aftosa 2013.

Los cerdos pueden infectarse tanto por vía respiratoria como por vía digestiva ingiriendo alimentos contaminados con el VFA. Aunque los porcinos son mucho menos susceptibles a la infección por aerosoles que los bovinos, (Alexandersen y col., 2002), ellos excretan mucho más virus aerolizado que los bovinos u ovinos. (Alexandersen y Donaldson, 2002). Como en los bovinos, el período de incubación dependerá de la cantidad de virus infectante así como de la vía de entrada, pero en general es a partir de los dos días.

## 1.5 SIGNOS CLÍNICOS EN BOVINOS

Una vez infectados los animales se observan los primeros signos inespecíficos aproximadamente a las 72 horas post infección presentándose inicialmente fiebre (40.5-42°C), apatía, falta de apetito, retardo o cese de la rumia y reducción de la producción de leche. Posterior a las 96 horas post infección (periodo de incubación promedio) comienzan a aparecer las vesículas secundarias, con un fluido de color amarillo claro en el epitelio de las mucosas bucales, nasales, espacio interdigital, el rodete coronario y ubres o pezones. Ocasionalmente las vesículas pueden producirse en otros lugares, tales como vulva y prepucio. Al principio, son pequeñas zonas blanqueadas. El líquido se acumula en estas áreas para formar vesículas. Sin embargo, las vesículas intactas no se ven a menudo porque suelen romperse en un plazo de 24 horas desde su aparición, dejando al descubierto la dermis rodeada de restos de epitelio de color blanquecino (Guía para la atención de focos y situaciones de emergencia sanitarias de Fiebre Aftosa 2013).

La presencia de vesículas y lesiones en cavidad bucal produce sialorrea, rechinar y chasquido de dientes. Las lesiones ubicadas en el rodete coronario aparecen como áreas de epitelio blanqueado, y las ampollas no son evidentes a menos que el epitelio sea arrancado. Puede presentarse dolor podal, que se manifiesta con cojera de apoyo en los cuatro miembros y un caminar cauteloso. En caso de verse afectado el rodete coronario es posible que se pierda una o más pezuñas de los miembros. Los animales se recuperan de las lesiones entre los 8 a 15 días. En la lengua, el epitelio nuevo carece de las características papilas linguales (Figura 5). Es posible detectar complicaciones tales como infecciones secundarias de las úlceras en cavidad bucal y extremidades, deformación de pezuñas, disminución de peso, problemas reproductivos, mastitis y/o abortos. La mortalidad en animales adultos es muy baja, encontrándose como hallazgo de necropsia vesículas con subsecuentes erosiones en pilares del rumen. En el caso de animales jóvenes afectados se puede observar una presentación sobreaguda con hasta un 50% de letalidad, observándose muchas veces como hallazgo de necropsia una miocarditis (corazón atigrado), sin otros hallazgos detectables.



**Figura 5:** Patogénesis de la fiebre aftosa. Fuente: Guía para la atención de focos y situaciones de emergencia sanitarias de Fiebre Aftosa 2013.

## 1.6 TRANSMISIÓN Y SUPERVIVENCIA DEL VFA

La forma más usual de contagio de la FA es por el movimiento de animales infectados, que puede ser, durante el período de incubación, animales clínicamente enfermos o animales enfermos subclínicos.

Una fuente importante de contagio y transmisión de la enfermedad son los productos animales contaminados que pueden infectar cuando son consumidos sobre todo por los cerdos (Ryan y col., 2008). Hay muchos ejemplos, como lo descrito por Fogedby y col., 1963, donde fue demostrado que la transmisión de la enfermedad también puede ocurrir por contacto con personas contaminadas, objetos contaminados como instrumental veterinario: jeringas, agujas, mochetas, vehículos y maquinarias, forrajes e inclusive otras especies no susceptibles a la enfermedad como los equinos. Se presume que paja importada, infectada con VFA fue la causa de las epidemias ocurridas en Corea y Japón en el año 2000 (Sugiura y col., 2001). Según determinadas condiciones atmosféricas de humedad, frío, y vientos suaves de constante dirección, el VFA puede recorrer hasta 10 km en tierra

y hasta 200 km sobre agua (Donaldson, 1972). La supervivencia del VFA varía mucho según a la temperatura y el pH a que esté expuesto. Otro aspecto importante a considerar en la transmisión del VFA es su prolongada supervivencia fuera del animal, cuando se dan como ya se mencionó las condiciones ambientales de temperatura y humedad adecuadas (Cottral, 1969).

### 1.7 SEROTIPOS DEL VFA

Los dos primeros serotipos fueron descubiertos por Vallé y Carré en el año 1922 quienes los nombraron por su lugar de origen: O por el departamento de Oise en Francia y A por Allegmane. Más tarde el grupo de investigadores de Waldmann y Trautwein descubrieron en Alemania, el tercer serotipo que denominaron C. En 1940, Galloway, Brooksby y Henderson del laboratorio de Pirbright, Inglaterra, descubrieron tres serotipos más aislados del sur de África, por lo que los denominaron SAT1, SAT 2 y SAT3 (Southern African Territories). El último serotipo descubierto fue el Asia 1 aislado de una muestra de Pakistán en el año 1958 (Brown, 2003).

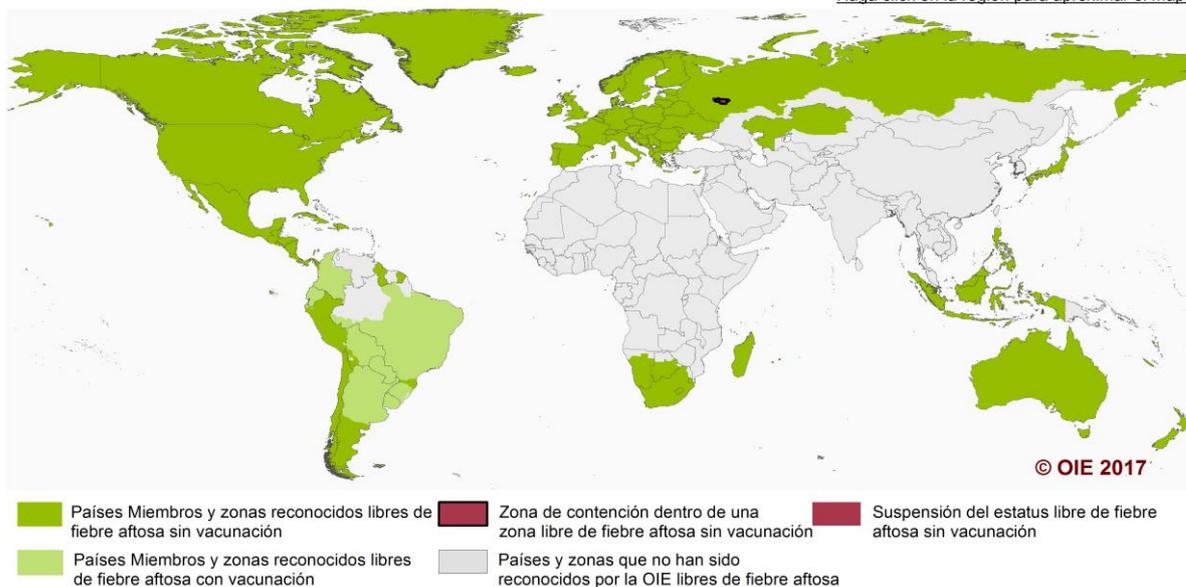
### 1.8 DISTRIBUCIÓN MUNDIAL DE LA FA

Han ocurrido episodios de la enfermedad en todas las regiones ganaderas del mundo con excepción de Nueva Zelanda. Actualmente la enfermedad puede encontrarse en todos los continentes excepto Australia y América del Norte. Los siete serotipos del VFA no están distribuidos uniformemente alrededor del mundo (Grubman y Baxt, 2004). Los serotipos SAT están normalmente restringidos a la zona localizada al sur del Sahara en África con esporádicas incursiones en otras regiones como en Libia en el año 2003 o más recientemente en Egipto ocurrida en febrero del año 2012. Los serotipos O y A tienen una más amplia distribución, presentándose en varias zonas de África, Asia y América del Sur. El serotipo C se encuentra en los mismos continentes que el O y el A pero en general con una menor dispersión mientras que el serotipo Asia 1 normalmente sólo se presenta en Asia.

### Mapa del estatus oficial de fiebre aftosa de los Países Miembros de la OIE

Última actualización enero de 2017

[Haga click en la region para aproximar el mapa](#)



**Figura 6:** Estatus oficial de Fiebre Aftosa en el mundo. Fuente: Manual OIE 2017.

## 1.9 FIEBRE AFTOSA EN EL MUNDO

Beck y Strohmaier (1987) sugirieron que el origen de algunos virus tipo O aislados de los brotes de Europa en los años 1970 y 1980 podría haber sido fuera del continente europeo. Esto se demostró serológicamente en los casos ocurridos en Austria (1981) y Alemania del Oeste (1982) donde se encontraron marcadas diferencias con las cepas de referencia, pero no fue hasta varios años después, con el advenimiento de la epidemiología molecular, que se pudo comprobar que esos virus estaban muy relacionados con cepas usualmente limitadas a China y Hong Kong.

El virus tipo O Panasia, responsable del terrible brote del 2001 ocurrido en el Reino Unido, fue aislado previamente en el norte de India en 1990, desde donde se dispersó a Arabia Saudita, probablemente por el comercio de ovejas y cabras vivas. Durante 1994 el virus se propagó dentro de Arabia Saudita alcanzando los países vecinos, por lo que en 1996 ya se encontraba en Turquía. Desde Turquía se produjo el ingreso a Grecia a través del río Evros, probablemente por el movimiento ilegal de ovejas. Durante los siguientes dos años se reportaron importantes brotes de FA causados por la misma cepa de virus de serotipo O en Irán, Irak, Siria, Israel,

Líbano, Jordania y Arabia peninsular. Tanto la República de Corea como Japón reportaron brotes en marzo de 2000 y en abril el virus se propagó a Rusia y Mongolia. En septiembre del 2000 el serotipo O apareció por primera vez en Sudáfrica, el brote se atribuyó a la alimentación de cerdos con una oveja originaria de Asia. Un mes después de originarse los brotes en el Reino Unido, el virus se había propagado a Irlanda, Francia y Holanda (Knowles y Samuel, 2003).

Beck y Strohmaier (1987) demostraron que una cepa viral tipo A aislada en un brote en Alemania en 1976 tenía un origen sudamericano. Análisis filogenéticos comparando cepas del serotipo A en África indicaron que un grupo de ellas estaba más relacionada con virus originarios de Europa y América del Sur (Knowles y Samuel, 2003).

El serotipo C fue introducido en Filipinas por primera vez en 1976, demostrándose que la cepa viral causante de este primer brote estaba muy relacionada con cepas localizadas en América del Sur. También parece aparente que el linaje del serotipo C en Angola evolucionó de cepas sudamericanas (Knowles y Samuel, 2003). Se ha demostrado que la epizootia de FA causada por el serotipo Asia 1 en 1999 que se esparció por Irán y Turquía, y alcanzó la parte este de Grecia en el 2000, tuvo su origen a mediados de la década de 1990 en Pakistán, India y Bangladesh. Periódicamente epizootias del serotipo Asia 1 se propagan de India a Irán y Turquía peligrando las fronteras con Europa (Knowles y Samuel, 2003).

Los serotipos SAT están normalmente confinados al sur del Sahara en África, sin embargo se han registrado brotes causados por SAT1 en el Medio Este y en Grecia y por el tipo SAT2 en Arabia Saudita y Kuwait (Knowles y Samuel, 2003).

En el año 2010, después de casi 10 años de no presentarse la enfermedad, se declaran focos de FA en Japón, país donde importantes recursos tanto humanos como económicos están abocados a impedir el ingreso de la enfermedad.

Otro ejemplo más reciente, de que las enfermedades no respetan fronteras es la confirmación, en abril del 2012, de animales enfermos por el VFA, serotipo SAT2 en la ciudad de Rafah, en la frontera de Gaza, fronteriza con Egipto, luego de los

brotos de FA, serotipo SAT2 ocurridos en febrero del 2012 en Egipto y Libia. Si el SAT2 se adentra aún más en Oriente Medio podría propagarse en amplias zonas, amenazando a los países del Golfo, e incluso al sur y al este de Europa (FAO, 2012).

Rusia presentó documentación solicitando la evaluación para el establecimiento de una zona de contención tras un foco de fiebre aftosa en la zona libre de Rusia que fue notificado a la OIE el 20 de octubre de 2016 (OIE, 2017) (Figura 6).

### 1.10 ANTECEDENTES DE FA Y SITUACIÓN ACTUAL EN AMÉRICA DEL SUR.

En Sudamérica, la introducción y diseminación de la FA, ha sido publicada por Correa Melo (Correa Melo y col., 2002) donde se describe que luego del primer reporte de la enfermedad en 1870 en el Cono Sur (Argentina, Brasil, Chile y Uruguay), la FA se diseminó rápidamente a Perú, Bolivia y Paraguay en la primera mitad del siglo 20. El primer reporte de FA en Venezuela fue en 1950 mientras que en Ecuador fue en 1961, cuando la enfermedad ya era considerada endémica en el continente. La presencia de la enfermedad con el concomitante cierre de mercados para el comercio internacional de productos ganaderos y el compromiso político de los diferentes países para controlar y erradicar la enfermedad del continente dieron pie a la implementación en el año 1988 del Plan Hemisférico de Erradicación de Fiebre Aftosa (PHEFA). Desde entonces, avances muy significativos se han logrado en el control de la enfermedad, principalmente en el Cono Sur, pero también en algunos países de la región Andina. Como resultado de estas acciones coordinadas el status sanitario de la mayoría de los países o regiones reconocido por la OIE es Libre de FA con o sin vacunación, siendo:

-Áreas libres sin vacunación: Chile, Guyana Francesa, Patagonia Argentina, Estado de Santa Catarina de Brasil, Perú, Sudoeste de Bolivia.

-Áreas libres con vacunación: Uruguay, el resto del territorio Argentino, Brasil, Ecuador.

Los países en el continente con situación endémica de la enfermedad se restringen actualmente a Colombia, tras haber recibido una notificación inmediata informando la detección de un brote de fiebre aftosa en el Departamento de Arauca

se suspende, a partir del 11 de Junio de 2017, el estatus de “zona libre de fiebre aftosa con vacunación” (OIE, 2017) (Figura 7).



**Figura 7:** Status de FA según reconocimiento en la última Sesión General de la OIE, en el año 2016. Fuente: OIE, 2016.

### 1.11 ANTECEDENTES DE FA Y SITUACIÓN ACTUAL EN LA ARGENTINA

En los Anales de la Sociedad Rural Argentina, del año 1870, su presidente Sr. Olivera alude a noticias de que en San José de Flores y Lomas de Zamora, Provincia de Buenos Aires, aparecieron focos de FA, diagnosticados por los doctores Wilke y Douglas, del Colegio de Londres (Pecker, 2007).

Desde entonces ha sido la enfermedad con más relevancia que ha afectado la producción animal. La superficie total de la Argentina es de 2.780.199 km<sup>2</sup>, contando con aproximadamente 55 millones de cabezas de ganado vacuno y 14 millones de ovejas. El sistema de producción y los movimientos usuales de ganado vacuno dentro de extensas áreas geográficas dificulta el manejo y la contención de brotes de FA. Históricamente los brotes han ocurrido dos veces al año, con picos en los meses de mayo/junio, y septiembre/octubre, debido al mayor movimiento de

animales y la presencia de ganado vacuno con bajo niveles de Acs, ya sea por el destete reciente o por el comienzo de las campañas de vacunación (Pizzi, 1998).

El Programa Argentino de Control de Fiebre Aftosa desarrollado entre los años 1990-1997 llevó al control y erradicación de la enfermedad logrando en 1997 el estatus oficial otorgado por la OIE de país libre de FA con vacunación. El buen desarrollo de la campaña de erradicación estaba respaldado por el progresivo descenso en el número de brotes, el último de los cuales fue detectado en abril de 1994, y la evidencia aportada por estudios serológicos, de la constante disminución de actividad viral y la presencia de una sostenida y potente inmunidad en el ganado. Esto llevó a la suspensión de la vacunación en 1999 y el reconocimiento por parte de la OIE como país libre de FA sin vacunación (OIE, 2012; Mattion y col., 2004).

En julio del año 2000, 14 meses luego de la suspensión de la vacunación, reaparecieron focos de FA en el país. La epidemia duró 18 meses y se reportaron más de 2500 focos. El serotipo O fue responsable de unos pocos brotes al comienzo de la epidemia, mientras que el serotipo A circuló hasta enero de 2002 (Mattion y col., 2004). Las medidas tomadas por el Servicio Nacional de Sanidad Animal y Calidad Agroalimentaria (SENASA), incluyeron junto con otras medidas preventivas, rifle sanitario, vacunación en anillo, restricción del movimiento de animales y la incorporación de la nueva cepa circulante a la vacuna.

En julio de 2003 la Argentina fue reconocida nuevamente por la OIE como país libre de FA con vacunación, estatus que se perdió luego de detectarse la enfermedad en febrero de 2006 en el Departamento de San Luis del Palmar en la provincia de Corrientes. Cabe destacar que a lo largo de todos estos acontecimientos se mantuvo el estatus de libre de FA sin vacunación de la región patagónica, al sur del paralelo 42, otorgado en mayo del año 2002.

Luego de intensos trabajos tanto de la comunidad ganadera, servicios privados y oficiales de salud animal se logró nuevamente a principios de 2007 el reconocimiento de la OIE de país libre de FA con vacunación al norte del paralelo 42.

En junio del año 2008 la Unión Europea reconoce a la región denominada Patagonia Norte B (Río Negro y Neuquén) como libre de FA sin vacunación (Figura 8).



**Figura 8:** Status de FA en Argentina según reconocimiento en la Sesión General de la OIE, en el año 2015. Fuente: OIE, 2015.

## 1.12 CONSECUENCIAS ECONÓMICAS DE LA ENFERMEDAD

A nivel local la infección del ganado resulta en pérdidas de hasta un 25% en la producción láctea anual del ganado lechero. (Broosky y col., 1982); reducción en la

velocidad de crecimiento y producción de carne. Se ha informado hasta un 20% de tiempo extra necesario para alcanzar la madurez en bovinos y una reducción en la producción anual de carne porcina del 20 %; reducción en la fertilidad debido a abortos y retrasos en la concepción; altos índices de mortalidad en animales jóvenes; costos por el descarte de animales improductivos y crónicamente infectados; interrupción de las actividades en los establecimientos afectados, con disminución de los ingresos económicos, pérdida de stock genético e interrupción de programas de mejoramiento genético.

A nivel nacional los efectos de la enfermedad son: interrupción de la producción ganadera afectando la disponibilidad y los precios de productos pecuarios en el mercado local, llevando en algunos casos a recurrir a la importación de alguno de esos productos; cierre de mercados de exportación impuestos por los países importadores. Estas pérdidas están a menudo en el orden de millones de dólares; costos directos e indirectos del control y erradicación de la enfermedad como ser compensación a los ganaderos, salarios a veterinarios y personal operacional y de soporte, interrupción de negocios en general, etc.

## 2. RESPUESTA INMUNE CONTRA INFECCIONES VIRALES

Todos los virus son patógenos intracelulares obligatorios que dependen para su supervivencia de huéspedes susceptibles donde replicar.

Las infecciones virales pueden ser clasificadas en dos grandes grupos de acuerdo a las características citopatogénicas de los virus involucrados: infecciones citopáticas y no citopáticas. El VFA, pertenece al primer grupo.

La estrategia de supervivencia de los virus citopáticos es infectar al huésped, replicar rápidamente causando extenso daño celular, lo que induce una rápida respuesta de Acs neutralizantes. Esto hace que antes de ser controlado por el sistema inmune, el virus deba transmitirse a un nuevo huésped susceptible (Hilleman y col., 2004). Por este motivo, los virus citopáticos son alta y rápidamente contagiosos. Sin embargo, esta estrategia viral presenta el inconveniente de que, con cada transmisión, el número de huéspedes susceptibles no inmunes en una población disminuye.

Consecuentemente, la posibilidad de replicación viral en la población se reduce rápidamente. Por lo tanto, la mayoría de los virus citopáticos escapan a este estado de inmunidad poblacional mediante mutaciones que genera variantes virales, que si bien presentan reacción cruzada con la variante viral original en varios epitopes reconocidos por Acs, no reaccionan de manera cruzada con aquellos epitopes involucrados en la neutralización o protección. Como resultado, individuos que presentan inmunidad contra un serotipo viral, no poseerán inmunidad protectora contra virus pertenecientes a serotipos distintos, y por lo tanto, serán susceptibles a la infección con estos últimos.

Las infecciones con virus citopáticos y no citopáticos suelen inducir los mismos mecanismos de defensa innatos, tales como la producción de IFN tipo 1 y activación de células NK. Sin embargo, las respuestas inmunes adaptativas contra estos, presentan características diferenciales notorias.

Las respuestas contra virus citopático se caracterizan como ya se mencionó por inducir rápidamente (entre los 2 y 4 días post-infección) altos títulos de Acs SN, generalmente en forma timo independiente (TI). Estos Acs son los principales encargados de controlar la infección, al evitar la diseminación del virus a órganos vitales. En cambio las respuestas de LT citotóxicos no suelen ser importantes en el control inicial de las infecciones por virus citopáticos, ya que las mismas, si bien son inducidas, lo hacen tardíamente, una vez que la replicación viral ha sido controlada por los Acs (Bachmann y col., 1997).

Los antígenos TI tipo 2 son aquellos incapaces de inducir una respuesta eficiente en los ratones CBA/N y se caracterizan por la presencia de epitopes ordenadamente repetidos. Los antígenos TI de tipo 2 clásicos son polisacáridos capsulares bacterianos y polímeros sintéticos. Asimismo, muchos virus citopáticos se comportan como antígenos TI tipo 2. Por ejemplo el VFA (Borca MV y col, 1986), virus coxsackie (Burns y col. 1975), encephalomyocarditis y virus Sindbis (Burns y col., 1975), polyomavirus (Szomolanyi-Tsuda y col., 1996), influenza (Lee y col., 2005), Virus de la Estomatitis Vesicular (Battegay y col., 1996) y rotavirus (Franco y col., 1997). La capacidad de estos virus de inducir una respuesta TI ha sido asociada, al menos en parte, con la alta organización de los antígenos presentes en

la superficie de los mismos. En efecto, el umbral de activación de las células B es menor para antígenos repetitivos y organizados, separados por una distancia de 5-10 nm, que para antígenos monoméricos no estructurados (Bachmann y col., 1997, Dintzis y col., 1976). La estimulación de los LB específicos con este tipo de antígenos induce el entrecruzamiento multivalente de los BCRs, produciéndose así la primer señal para las respuestas TI tipo 2 (Vos y col., 2000).

También existen segundas señales necesarias para la activación de los linfocitos involucrados. Sin embargo, a diferencia de las respuestas timo dependiente (TD), las segundas señales provendrían directamente del patógeno. Ha sido demostrado que la señalización a través de toll like receptor 9 (TLR-9) presente en LB, actúa de forma sinérgica con la señalización mediada a través del BCR, estimulando la proliferación B y la secreción de Acs (Goeckeritz y col., 1999).

## 2.1 RESPUESTA HUMORAL: ISOTIPOS

La respuesta inmune humoral frente a las infecciones virales depende de Acs que bloqueen la unión del virus a la célula huésped y su entrada. Los Acs que se producen sólo son eficaces frente a los virus durante la fase extracelular, actúan como neutralizantes uniéndose a la envoltura o cápside del virus. La neutralización requiere solo las regiones de los Acs que se unen al antígeno. Por lo tanto, puede estar mediada por cualquier isotipo presente en la circulación y en las secreciones mucosas. La mayoría de los Acs neutralizantes presentes en la sangre son del tipo IgG, mientras que el principal en las mucosas es IgA. Los más eficaces son los que presentan una alta afinidad por su antígeno, que se producen por maduración de la misma.

Además de la neutralización, los Acs pueden opsonizar las partículas víricas y favorecer su eliminación por los fagocitos. Los fagocitos expresan varios receptores de superficie que se unen directamente a los microbios y lo ingieren, incluso sin Acs. Pero la eficiencia aumenta si el fagocito puede unirse a la partícula con afinidad alta. Los fagocitos, mononucleares y neutrófilos expresan receptores para las porciones Fc de los Acs IgG que se unen específicamente a las partículas

cubiertas de Acs (opsonizadas), se denominan Fc $\gamma$ R. Hay diferentes subclases, que muestran afinidades para diferentes subclases de IgGs (Abbas y col., 2012).

El Fc $\gamma$ RI es el principal receptor para el Fc $\gamma$  del fagocito. Se expresa en macrófagos y neutrófilos y es un receptor de afinidad alta que se une a IgG1 y a IgG3, aunque en los ratones, Fc $\gamma$ RI se une preferentemente a IgG2a e IgG2b con una  $K_d$  de  $10^{-8}$  a  $10^{-9}$  (Abbas y col., 2012).

El IFN $\gamma$  estimula la transcripción del gen del Fc $\gamma$ RI y expresión en los macrófagos. Así como también media el cambio de isotipo (en ratones IgG2a e IgG2b) de los LB (Abbas y col., 2012).

## 2.2 RESPUESTA HUMORAL: AVIDEZ DE LOS ACS

Un anticuerpo con alta afinidad por su antígeno puede funcionar más eficazmente en el sistema inmune (por ejemplo, en reacciones biológicas como la hemaglutinación, neutralización del virus, la inactivación de la enzima, la hemólisis, la eliminación de antígenos extraños, etc.), sin embargo, una molécula de anticuerpo con alta afinidad por el antígeno diana no suele existir en un primer momento. El anticuerpo generalmente aumenta la afinidad durante una respuesta inmune (llamado maduración). La naturaleza nos provee de numerosos ejemplos de moléculas con afinidad baja intrínseca que son capaces de interacciones de alta avidez con sus antígenos debido a la unión multivalente. Por ejemplo, la baja afinidad intrínseca de la IgM producida durante la respuesta inmune primaria se compensa por su estructura pentamérica resultando en una alta avidez hacia determinantes antigénicos repetitivos presentes en la superficie de bacterias o virus. Por lo tanto, una de las maneras más eficaces para aumentar la actividad de unión de un anticuerpo a una superficie (por ejemplo, superficie de la célula) es hacer uso del efecto multivalencia. Por lo tanto, incluso si la afinidad intrínseca de una molécula de anticuerpo hacia varios invasores (por ejemplo, virus) es relativamente baja, la alta avidez puede superar la afinidad intrínseca baja. La producción de moléculas de Acs con alta afinidad intrínseca se produce por el antígeno diana a través de la maduración de la afinidad en el sistema inmune. (Koyama y col., 2010).

La avididad es una medida de fuerza total de un complejo Antígeno-Anticuerpo, depende de tres parámetros principales:

- La afinidad del anticuerpo para el epítopo.
- La valencia del anticuerpo.
- La disposición estructural de las partes que interactúan.

Mientras que la afinidad se refiere a la fuerza de la unión entre un único determinante antigénico y un sitio de combinación del anticuerpo individual, la avididad se refiere a la resistencia global de la unión entre antígenos y Acs multivalentes.

Los sueros contienen Acs policlonales que pueden unirse a múltiples determinantes antigénicos, los Acs son potencialmente multivalentes en su reacción con un antígeno. Cuando el antígeno lleva múltiples copias del determinante antigénico (macromoléculas o microorganismos) se combina con un anticuerpo multivalente, la fuerza de unión se aumenta en gran medida debido a que todos los enlaces antígeno-anticuerpo se deben romper simultáneamente antes de que el antígeno y anticuerpo se pueden disociar. La avididad se ha utilizado para determinar infecciones primarias de Citomegalovirus, ya que la primera respuesta está constituida por Acs IgG con baja avididad, los cuales desarrollan la unión al antígeno específico de fácil disociación (Botelho., 2010). También se ha utilizado en pruebas para la realización de curvas de maduración de avididad de las IgG específicas anti *Toxoplasma gondii* (Elizabeth Torres-Morales y col., 2008).

### 3. RESPUESTA INMUNE CONTRA EL VFA

El VFA desencadena una rápida respuesta humoral, en animales infectados, caracterizada por altos niveles séricos de Acs específicos con actividad neutralizante, los cuales persisten hasta 18 meses pos-infección (Wigdorovitz y Sadir, 1996). Una respuesta inmune específica con la presencia de inmunoglobulina M (IgM) se puede observar entre los 4 y 5 días pos-infección. En bovinos infectados la respuesta por IgG1 predomina sobre la IgG2 (Lavoria y col 2012). En el tracto

respiratorio superior también se evidencia una respuesta humoral, incluida la presencia de IgA.

Entre los 7 y 14 días pos-infección se puede observar una buena inmunidad protectora, en los animales que reciben vacunas de alta calidad inmunogénica o animales infectados. La respuesta es dirigida a los epitopes de las tres proteínas de la cápside externa, lo que explica que la protección por Acs es serotipo específica, o sea, como ya se mencionó que los Acs inducidos por un serotipo no protegen contra la infección producida por otro serotipo del VFA, inclusive, podrían no proteger contra subtipos dentro del mismo serotipo.

La neutralización del virus dentro del animal puede ocurrir por mecanismos similares que acontecen en la neutralización "*in vitro*" (McCullough, y col., 1992), aunque hay sugerencias que los macrófagos podrían tener una acción clarificadora del virus por mecanismos de opsonización (McCullough, y col., 1988; Quattrocchi y col., 2011; Quattrocchi y col., 2014). La protección frente a la infección por el VFA ha sido siempre relacionada con la presencia de Acs neutralizantes específicos, sin embargo, es posible encontrar animales protegidos con bajos niveles de Acs neutralizantes (Sobrino y col., 2001), lo que sugiere que la protección estaría mediada además, por otros componentes del sistema inmune.

Es importante resaltar, que en general, la inducción de una respuesta humoral con altos niveles de Acs específicos en suero contra proteínas de las cápside virales, garantiza una inmunidad adecuada y protección contra el virus. Hay numerosos estudios de correlación entre el nivel de Acs desarrollados por el animal y la protección a la descarga viral, con los que se puede inferir la protección "*in vivo*" según los niveles de Acs específicos medidos "*in vitro*" (Van Bekkum, 1969; PANAFTOSA, 1994; Maradei y col., 2008).

Ya que existen animales que presentan protección, con niveles de Acs que no son considerados protectivos, se han estudiado en los últimos años, otros parámetros inmunológicos que podrían presentar alguna asociación con la protección.

Eble P. L. y col. (2007) reportaron en cerdos que recibieron vacunas con alta concentración de VFA inactivado, que la inducción de IgA presenta correlación con

la protección. Asimismo, Cubillos C. y col. (2008) trabajaron en esta misma especie con una vacuna a péptidos contra aftosa y postularon una correlación entre IgA y la protección inducida.

Por otro lado, está descrito que ovejas vacunadas y desafiadas con el VFA presentan un nivel de IFN- $\gamma$  circulante que se relaciona con la carga antigénica de la vacuna (Barnett P. V. y col., 2004). Se ha sugerido que la respuesta de IFN- $\gamma$  sistémica podría ser un indicador de la habilidad de una vacuna VFA de gatillar inmunidad en la que se prevenga la infección subclínica. La producción temprana de IFN- $\gamma$  probablemente se deba a células NK activadas por citoquinas derivadas de macrófagos como parte de la respuesta inmune innata.

Parida S. y col. (2006) encontraron que la combinación del título seroneutralizante y la producción de IFN- $\gamma$  podría correlacionar mejor con el control de replicación viral en bovinos que sólo los niveles de Acs SN ya que si bien estos Acs son el principal componente que influye en la protección contra aftosa, la cantidad de IFN- $\gamma$  producida post vacunación correlaciona con la capacidad de los animales vacunados de controlar la replicación viral en faringe luego del desafío.

Por otro lado, Lavoria y col. (2012), plantea que la avidéz y la proporción de isotipos específicos contra VFA podrían servir para discriminar animales que están protegidos de los que no lo están.

#### 4. VACUNAS Y VACUNACIÓN

La vacunación es ampliamente usada para el control, prevención y erradicación de la FA siendo un importante instrumento a tener en cuenta en todo programa sanitario (Bergmann y col., 2005; Garland, 1999). Asimismo, existe una considerable transformación en cuanto a la aceptación de los beneficios de la vacunación como una alternativa a la política de sacrificio sanitario, particularmente luego de la recurrencia de la enfermedad en áreas libres (Bergmann y col. 2005).

Las vacunas de uso actual consisten en preparaciones en gran escala de partículas virales en cultivos celulares. Las mismas son inactivadas químicamente

(Bahnemann, 1975) concentradas y emulsionadas en adyuvante oleoso (Augé de Melo y col. 1977; Augé de Melo, 1982) o adsorbidas en hidróxido de aluminio.

En América del Sur contienen los serotipos O y A, y la mayoría de los países del Cono Sur incluyen el serotipo C. Las vacunas son suministradas por laboratorios productores y se preparan en base a cepas seleccionadas, armonizadas para su uso en la región, que incluyen O1/Campos, A24/Cruzeiro. Argentina incorpora la cepa A Arg/2001, y a partir del 2005, se incorporó, por Resolución SENASA N° 871/04 y su complementaria la Resolución N° 10/05, a las cepas virales arriba mencionadas, la Cepa C3 Indaial.

En general estas cepas son capaces de brindar una cobertura inmunológica satisfactoria cuando se aplican programas de vacunación sistemática.

Sin embargo, es necesario considerar que el VFA es un virus con alta variabilidad y que no existe protección cruzada entre los distintos serotipos, y solo una parcial inmunidad cruzada entre los múltiples subtipos reportados dentro de los serotipos mencionados (Broosky, 1982; Mattion y col., 2004). La selección de una cepa de vacuna apropiada es un elemento importante para el control de la FA. Cambios en la antigenicidad e inmunogenicidad que pueden ocurrir, particularmente en áreas endémicas, resultan de gran importancia para los programas de control dado que el nivel de protección de una población vacunada depende no solo de la potencia de la vacuna y de los esquemas de revacunación aplicados, sino también de la homología entre la cepa vacunal y la cepa de campo. La importancia de esta diferencia en el campo se vio claramente durante la mayor epidemia en México durante los años 1946-1954 en donde la cepa de campo perteneciente al serotipo A quebró la inmunidad inducida por la vacuna con otra cepa del mismo serotipo.

Otro ejemplo de la importancia y sus implicancias prácticas de la variación dentro de un mismo serotipo fue demostrado por la gran epidemia sufrida por varios países del Oeste de Europa durante 1965-1966 cuando un virus del serotipo O quebró la inmunidad que habían sido vacunados en el marco de un organizado programa de control de la enfermedad (Brown, 2003).

Consecuentemente, el conocimiento de las cepas que prevalecen en el campo, su distribución y evolución genética y antigénica, y particularmente la evaluación de la eficacia de la cepa de la vacuna en uso para controlar la enfermedad es de gran importancia. Además, y en caso necesario, la selección, reemplazo o inclusión de una cepa de vacuna apropiada es un elemento importante en el control de FA y es necesario para la aplicación de los programas de vacunación en regiones afectadas, así como para el establecimiento y mantenimiento de bancos de antígeno para ser usados en el caso de nuevas incursiones de FA.

#### 4.1 EVALUACIÓN DE VACUNAS

En Argentina, las vacunas a ser controladas son codificadas por el Servicio Oficial de Control de Vacuna, para contribuir a la imparcialidad del proceso.

Los animales utilizados en la prueba son aleatorizados para evitar la inclusión de la totalidad de los animales provenientes de un mismo proveedor.

El Servicio Oficial realiza la evaluación de las muestras de suero de 0 y 28-30 días pos vacunación (de bovinos vacunados y controles) para identificación de Acs inducidos por proteínas no estructurales de VFA mediante prueba ELISA 3ABC y para identificación y titulación de Acs estructurales por prueba ELISA-Fase Líquida (ELISA-FL). Los sueros de cero días deben ser negativos en pruebas para identificación de Acs de Fiebre Aftosa (proteínas estructurales y no estructurales). Los animales positivos (con Acs contra VFA) son excluidos del grupo de bovinos seleccionados para prueba de control de calidad de vacuna antiaftosa. Los sueros de 30 días pos vacunación también son estudiados para identificar Acs contra VFA (proteínas estructurales y no estructurales). El sistema utilizado para demostrar la ausencia de dichos anticuerpos está conformado por una prueba de ELISA indirecto (I-ELISA) como "screening" que utiliza la poliproteína no capsidal del VFA 3ABC, seguido de la confirmación de las muestras sospechosas o reactivas mediante un ensayo inmunoenzimático de electrotransferencia (EITB), empleando como sondas serológicas las proteínas no capsidales del VFA 3A, 3B, 2C, 3D y 3ABC, obtenidas por métodos de recombinación genética (Bergmann y col. 2000)

Prueba directa Protección a la Generalización Podal (PGP)

Para el control de vacunas anti aftosa, en Argentina y en el resto de América del Sur, se utilizan 16 bovinos vacunados y 2 bovinos control sin vacunar, con las características descritas anteriormente. A los 90 días pos vacunación los 18 bovinos, son desafiados con  $10^4$  Dosis Infecciosa bovino 50% (DIB 50%) de VFA vía intradérmica en la superficie dorsal de la lengua (Resolución SENASA 351/2006). El virus utilizado en el desafío, cuenta con titulación previa para determinar la patogenicidad del virus, así como el título infeccioso en bovinos, en cultivos celulares y/o en ratones lactantes. En cada prueba de PGP, deberán confirmarse en el laboratorio las dosis infecciosas inoculadas así como la identidad del virus inoculado y de aquel aislado de los epitelios vesiculares de los animales con lesión. La lectura final de la prueba se realiza 7 días post desafío, observándose la presencia de lesiones de generalización podal en animales testigos y vacunados.

Para la interpretación de los datos: los bovinos controles deben presentar lesiones podales como máximo 72h después del desafío con  $10^4$  DIB50%. Ante la presencia de lesión podal en bovino vacunado éste es considerado como animal no protegido.

Regla de decisión: una vacuna es aprobada si 12 o más bovinos están protegidos en el grupo de 16 vacunados, y es rechazada si menos de 10 bovinos están protegidos en el grupo de 16 vacunados. Se realiza la repetición de prueba si entre 10 y 11 bovinos estuvieron protegidos de los 16 vacunados.

Las pruebas de eficacia en otras especies blanco, como ovejas, cabras, cerdos, búfalos todavía no han sido estandarizadas. En general, una prueba exitosa en el ganado bovino se considera prueba suficiente de la calidad de una vacuna para apoyar su uso en otras especies. En circunstancias en que una vacuna se produce principalmente para uso en una especie distinta de ganado, que puede ser más apropiado para la prueba de potencia vacuna en esa misma especie.

#### Prueba Dosis media de Protección (PD50)

Otro método para determinar la calidad de las vacunas utilizado en Europa, según el cual, el número de dosis de protección en una vacuna se estima a partir de

la resistencia al desafío viral de animales que reciben diferentes cantidades de vacuna.

Se utilizan bovinos de aproximadamente 6 meses de edad, obtenidos a partir de zonas libres de fiebre aftosa en que no hayan sido vacunados contra la fiebre aftosa y deben estar libres de Acs contra el virus de fiebre aftosa. Tres grupos de no menos de cinco animales por grupo deben ser vacunados por la ruta recomendada por el fabricante.

La vacuna debe ser administrada a diferentes dosis por grupo mediante la inyección de diferentes volúmenes de la misma. Por ejemplo, si la etiqueta indica que la inyección de 2 ml corresponde a la administración de 1 dosis de vacuna, una dosis de 1/4 de la vacuna se obtendría mediante la inyección de 0,5 ml, y una dosis de 1/10 se obtiene mediante la inyección de 0,2 ml. Estos animales y un grupo control de dos bovinos no vacunados, se deben desafiar ya sea 3 semanas (acuosa) o hasta 4 semanas (oleosa) después de la vacunación con una suspensión de virus bovino virulento y adecuada para los tipos de virus presentes en la vacuna bajo prueba (10.000 DIB50-50% de la dosis infecciosa bovina-) por vía intradérmica en dos sitios en la superficie superior de la lengua (0,1 ml por sitio). Los animales se observan durante al menos 8 días. Animales no protegidos mostrarán lesiones en otros sitios distintos de la lengua al igual que los bovinos control. A partir del número de animales protegidos en cada grupo, se calcula el contenido DP50 de la vacuna.

Goris y col., en el año 2010, han informado la precisión de la prueba de PGP realizando seis pruebas homólogas (control de calidad de la vacuna) y cuatro ensayos de desafío heterólogo (vaccine matching). Los resultados indicaron que la prueba homóloga PGP era más repetible y reproducible que la PD50, excepto para el grupo de dosis completo de esta última prueba, que era similar a PGP.

Prueba indirecta ELISA Fase Líquida

Expectativa Porcentual de Protección (EPP) (ELISA - FL/EPP)

La evaluación de vacunas contra el VFA está determinada por la Expectativa porcentual de protección (EPP), que estima según el nivel de Acs contra VFA

(medidos con ELISA FL) la probabilidad de que el ganado esté protegido contra un desafío de 10.000 dosis infecciosas después de una sola dosis de vacunación (Alonso y col., 1987).

En Argentina, la prueba de PGP ha sido sustituida parcialmente por la expectativa porcentual de protección (EPP), determinado por títulos de Acs contra VFA medidos por ELISA FL en sueros de bovinos vacunados, aunque desafío viral todavía se utiliza en el caso de las vacunas en proceso de concesión de licencias, para las nuevas cepas que deben incluirse en las vacunas, o para fines que coincidan con las vacunas (Maradei y col., 2008).

La prueba se realiza con 18 bovinos, 16 vacunados y 2 controles. Los sueros tomados a los 60 dpv, se titulan por ELISA-FL, se eliminan los dos sueros con títulos extremos, juzgándose la vacuna con los 16 restantes.

Regla de decisión: la vacuna se aprueba si el promedio de EPPs del grupo de los 16 bovinos mayor o igual a 75%. Se rechaza si el promedio de EPPs del grupo de los 16 bovinos menor a 62.5%. Se realiza una repetición de la prueba si el promedio de EPPs del grupo de los 16 bovinos menor a 75% e igual o mayor a 62.5%. (Resolución SENASA 111/2010 Artículo 47).

Sin embargo, el estudio de Robiolo y col., 2010 sugiere que, con el fin de aumentar la potencia estadística de la prueba ELISA FL, se debe aumentar el número de animales, lo cual es difícil de implementar e inaceptable desde el punto de vista del bienestar de los animales. En este sentido, las pruebas alternativas indirectas de potencia de las vacunas están en curso en varios laboratorios.

De acuerdo con el Manual de la OIE, las pruebas indirectas, tales como la medición de Acs neutralizantes en cultivo de células, los Acs por ELISA FL, o seroprotección en ratones lactantes, pueden ser utilizadas para evaluar la potencia de una vacuna, siempre que con una evaluación estadística tenga establecida una correlación satisfactoria.

Teniendo en cuenta la importancia económica de la fiebre aftosa y la confianza en las pruebas indirectas "ex vivo" debido a la correlación estadísticamente

significativa que se ha demostrado con el ensayo “in vivo” (Maradei y col., 2008) es crucial la sustitución de los experimentos con desafío viral.

## 5. MODELOS ALTERNATIVOS PARA LA EVALUACIÓN DE VACUNAS

Actualmente existe un consenso internacional para Reducir, Reemplazar y Refinar (3Rs) los métodos de experimentación con animales teniendo en cuenta las buenas prácticas de bienestar animal. De los aproximadamente diez millones de animales utilizados cada año en la producción de vacunas y otros productos biológicos, el 80% se utiliza para el control de calidad de rutina y pruebas de lotes de productos terminados.

La evaluación de la potencia de las vacunas, por lo general requiere de un gran número de animales, en las cuales a menudo sufren dolor y malestar, además, muchas de estas pruebas tienen una gran variabilidad y por lo tanto no son tan precisas en cuanto a la predicción de la protección. Se han desarrollado pruebas de control de calidad que reducen el número o eliminan el uso de animales, pero no se ha garantizado la aceptación de estos métodos por parte de los reguladores o los fabricantes (Dozier y col., 2011).

En general, los enfoques incluyen: la reducción del número total de animales requerido para los procedimientos, el refinamiento mediante el uso de serología para sustituir las pruebas de desafío, el reemplazo de los animales con métodos “in vitro”. Los métodos serológicos que cuantifican Acs protectivos en los animales vacunados se utilizan actualmente para varias pruebas de potencia.

Muchas vacunas, especialmente vacunas veterinarias, a menudo contienen adyuvantes, que pueden interferir con los métodos de cuantificación “in vitro” mediante la modificación del antígeno de interés. Por esta razón, se utilizan en algunos casos, modelos animales alternativos para la evaluación de la respuesta inmune (Kulpa y col., 2011; Schiffelers y col., 2014; De Mattia y col., 2011).

Actualmente se utilizan métodos serológicos para la evaluación de la potencia de vacunas contra el virus de la rabia, en las cuales se reemplazó totalmente la prueba de desafío con vigencia desde el año 1950. Esta involucraba un gran

número de animales a evaluar por lote, además del sufrimiento de los ratones por la sintomatología característica, el impacto emocional al operador, los altos costos, la variabilidad y el tiempo para la obtención del resultado. Con el método serológico alternativo se superan los problemas que acarrea el ensayo de desafío. Consta de una única inmunización y la medición de los Acs neutralizantes a los 15 días post vacunación. Las ventajas de este método son que utiliza un menor número de ratones y causa menos sufrimiento, necesita menos tiempo y la manipulación es más sencilla. En Alemania, este método se utiliza para el control de los lotes de vacunas antirrábicas inactivadas y los resultados son aceptados en toda la comunidad europea (Lewis y col., 2010).

Otra prueba de potencia que fue reemplaza por métodos serológicos es la de la Erisipela porcina causada por una bacteria *Erysipelothrix rhusiopathiae*, en las cuales las pruebas de potencia para vacunas inactivadas se realizaban utilizando ratones para el ensayo de desafío desde el año 1952. Se realizaron modificaciones en cuanto al número de animales utilizado para las pruebas de desafío, pero sin embargo el bajo número de animales también disminuía la potencia del ensayo debido a la alta variabilidad de los resultados. Un refinamiento de los métodos se realizó para evitar la exposición de los animales a la bacteria. Los ratones actualmente solo reciben la vacunación y se determina la eficacia de las vacunas mediante serología (Balks y col., 2011).

La prueba de eficacia de vacunas para enfermedades clostridiales también ha modificado los métodos. La potencia de la vacuna se evaluaba por neutralización de la toxina "in vivo" como prueba de desafío. El desarrollo de alternativas para las pruebas de eficacia se basó en pruebas ELISA capaces de medir los niveles de Acs anti toxinas específicas, estos ensayos alternativos mostraron una alta correlación con la prueba de neutralización de toxina "in vivo" y son actualmente aceptadas por la Comunidad Europea (Redhead y col., 2011).

Para evaluar la eficacia de las vacunas contra el virus de Newcastle también se diseñó un ELISA como prueba alternativa, evitando las pruebas de desafío viral. Esta fue aprobada por la Farmacopea Europea (Oei., 2011).

En el Instituto de Virología de INTA Castelar, se desarrolló un método basado en un modelo de cobayo para la evaluación de la eficacia de vacunas contra la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina, causada por el Herpes Virus Bovino Tipo I. Se desarrollaron y validaron ELISAs para la determinación de Acs contra IBR en suero de bovinos y cobayos. El ensayo se puede aplicar al control de potencia de vacunas contra IBR con 100% de especificidad. Este modelo ha sido validado y actualmente se utiliza en Argentina para realizar las pruebas de vacunas contra IBR, no solo en Argentina, sino también en Latinoamérica (Parreño y col., 2010).

Para el virus de la Fiebre Aftosa en Argentina, como se describió en el apartado anterior, se utiliza ELISA en fase líquida para las pruebas oficiales de control de potencia de vacunas antiaftosa en bovinos, junto con la prueba de protección contra la generalización podal (PGP) (Maradei y col., 2008). A partir de ésta se calcula la Expectativa Porcentual de Protección estima según el nivel de Acs contra VFA (medido por ELISA FL) la probabilidad de que el bovino esté protegido contra el desafío viral (Alonso y col., 1987). Éste es un método estadísticamente fiable para ser utilizado como un sustituto de la protección con una muy buena concordancia estadística (Maradei y col., 2008; Robiolo y col., 2010).

Dus Santos y col., 2000 utilizaron el modelo murino para realizar la comparación de la eficacia de vacunas en bovinos y ratones con el fin de reemplazar el bovino en pruebas de potencia en obteniéndose resultados similares en ambas especies. También compararon diferentes métodos serológicos para la evaluación de la eficacia de vacunas en ratón seleccionando el ELISA FL como un método económico, rápido y sin la necesidad de utilización de virus infeccioso.

## 6. RESPUESTA INMUNE FRENTE AL VFA EN EL MODELO MURINO

Si bien las diferencias que existen entre los ratones y los hospedadores naturales, en cuanto a forma de infección por el VFA y curso de la enfermedad, son numerosas, se han podido establecer paralelismos entre el modelo murino y los bovinos (Borca y col. 1986 y 1993; Fernández y col. 1986; Quattrocchi y col., 2012; Quattrocchi y col., 2014; Lopez y col. 1990; Piatti y col. 1991; Langellotti y col., 2012; Ostrowski y col., 2007; Zamorano y col. 1998; Dus Santos y col. 2000) como así

también entre murinos y cerdos (Chinsangaram y col., 2003; Eble y col., 2004; Song y col. 2005).

La infección por el VFA está descrita en cepas de ratones CH3, Swiss, BALB/c y nude si el virus es inoculado por vía ip (Fernandez y col., 1986, Collen y col., 1989) y está muy bien caracterizada. Ésta comprende una importante replicación viral en el páncreas mientras que la enfermedad cursa de forma subclínica. Durante las primeras 48-72 hs de la infección, se produce una viremia de alto título ( $\sim 10^5$ - $10^6$  DLRL50/ml), la cual es rápidamente controlada por Acs SN (Fernandez y col., 1986). Ante la imposibilidad de producir Acs SN, como sucede luego del tratamiento inmunosupresor con ciclofosfamida, los ratones infectados con VFA presentan una viremia persistente, indicando el papel central desempeñado por el sistema inmune adaptativo en el control de esta infección (Borca y col., 1986). Una vez superada la fase aguda de la infección, los títulos séricos de Acs SN se mantienen elevados por largos períodos de tiempo (López y col., 1990).

Algunos trabajos indican que la importancia de los Acs podría residir más en su capacidad opsonizante que en la neutralizante. Experimentos realizados "in vivo" en el modelo de ratón lactante demostraron que era posible obtener protección inoculando Acs monoclonales de moderado título neutralizante previamente al desafío viral y que era la opsonización de los viriones lo que correlacionaba con la protección más que la neutralización de la infectividad. (Mc Cullogh y col. 1986). La seroprotección resultaba efectiva solo si se mantenían intactas tanto las porciones Fc de los Acs como las funciones de fagocitosis de los ratones inoculados. En este sentido los autores discuten que es probable que la protección observada en este modelo, requiera que los Acs opsonicen los viriones para que luego los complejos virus-anticuerpo sean fagocitados. Más tarde este mismo grupo de trabajo (Mc Cullogh y col. 1988), corroboró, utilizando células peritoneales murinas, que la fagocitosis del VFA opsonizado por parte de células con FcR, como son los monocitos y macrófagos, constituye la defensa inmune efectora más importante en el modelo utilizado.

Contrariamente a lo que sucede cuando los ratones se infectan con el VFA infeccioso, la duración de la inmunidad luego de la vacunación con VFA inactivado

depende de la dosis de antígeno utilizada y de la formulación de la vacuna. La inmunización con 0.1  $\mu\text{g}$  de VFA en PBS induce una respuesta neutralizante protectora pero de corta duración, en la que los títulos de Acs SN comienzan a disminuir a partir de los 60 dpv. En efecto, luego de transcurridos tres meses desde el momento de la vacunación, el nivel de Acs en el suero de estos animales ya no es suficiente para controlar la viremia, y los ratones vuelven a ser susceptibles a la infección. Sin embargo, si la inmunización se realiza con 10  $\mu\text{g}$  de VFA en PBS o con 0.1  $\mu\text{g}$  de VFA en una emulsión agua en aceite, se induce una respuesta de duración prolongada (Lopez y col., 1990; Piatti y col., 1991). Las respuestas contra VFA infeccioso o inactivado no solo presentan diferencias en la duración de la inmunidad generada, sino que además difieren en la dependencia de colaboración de LT para inducir la producción de Acs. Mientras que el virus infeccioso se comporta como un antígeno TI, el virus inactivado inoculado a bajas dosis se comporta como un típico antígeno TD, requiriendo de colaboración T para inducir Acs (Piatti y col., 1991).

En experimentos de transferencia adoptiva de linfocitos a ratones receptores vírgenes irradiados y luego infectados, se observó que la transferencia de LB provenientes de dadores infectados 8 días antes, rápidamente generaba una respuesta neutralizante. Por el contrario, la transferencia de LB provenientes de dadores vacunados con 0.1  $\text{mg}$  de VFA era incapaz de generar una respuesta de Acs SN. En cambio, si conjuntamente con los LB provenientes de animales inmunizados se transferían LT, la respuesta era inducida. De modo que el mecanismo de eliminación del virus continuaba siendo mediado por LB, ya que la transferencia exclusiva de LT no inducía inmunidad. Por lo tanto, cuando se realiza la inmunización con virus inactivado, la inducción de una respuesta de Acs SN requiere colaboración T. Por el contrario, la respuesta generada luego de la infección, no precisa de LT para ser inducida (Piatti y col., 1991).

Pérez Filgueira y col (1995) han reportado sobre las diferencias cualitativas en el tipo de respuesta inducida por el virus infeccioso e inactivado también han demostrado que pueden ser evidenciadas por el perfil de isotipos que se produce en cada caso. En ratones infectados, a partir de los siete dpi es posible detectar en

suero, además de la IgM neutralizante producida ya desde el tercer dpi, a los isotipos IgG1 e IgG3. Desde el día 14, IgG2a e IgG2b también comienzan a ser producidos, siendo IgG1 e IgG2b los isotipos predominantes a partir de los 14 dpi. Por el contrario, en ratones vacunados con vacunas convencionales (hidróxido de aluminio o emulsión de agua en aceite) IgG1 e IgG2a son los sub-isotipos que predominan, acompañados de bajos niveles de IgG2b. La subclase IgG3 no se detecta en animales vacunados (Perez Filgueira y col., 1995).

Ha sido demostrado, tanto “in vitro” como “in vivo”, que las células dendríticas (CDs) juegan un rol fundamental en la respuesta inmune de los murinos hacia el VFA. Ostrowsky y col. (2005) demostraron que estas células se infectan de forma abortiva con el VFA, lo que induce una diferenciación hacia un fenotipo macrofágico que resulta en una falla en el desarrollo de la respuesta TD durante la infección aguda. También se demostró que esta falla de las CDs en la estimulación de la respuesta T está asociada con la producción de IL10. La inhibición de la respuesta T por IL10 está caracterizada (de Waal Malefyt y col. 1998) y ha sido reportada en otras infecciones virales (Graneli Piperno y col. 2004).

Los autores discuten que la respuesta de Acs contra el VFA infeccioso parece proceder en dos fases. En la fase temprana, durante la primer semana de infección, se desarrolla una producción rápida, TI, de Acs SN los cuales son suficientes para eliminar el virus en aproximadamente tres días. Seis días luego de la infección, se produce la segunda fase de la respuesta inmune que depende de colaboración T. Como resultado de esta segunda fase se produce la secreción de Acs por largos períodos de tiempo, el cambio del isotipo de los Acs y se establece la memoria inmunológica. Por el contrario el VFA inactivado estimula a las CDs para producir una respuesta de Acs de tipo TD.

En 2007, Ostrowsky y col., demostraron que la modulación de las CDs mediada por el VFA infeccioso, es clave para el desarrollo de la respuesta inmune temprana contra el virus, dado que son estas CDs infectadas las que estimulan a los LB de la zona marginal (ZM) del bazo, para producir los Acs de forma TI. También reportaron que el principal órgano donde tiene lugar esta producción de Acs, es el

bazo mientras que los nódulos linfáticos no participan de forma alguna (Langellotti y col., 2013).

El desarrollo de una enfermedad aguda y una infección clínicamente manifiesta producida por VFA en ratones, ha sido descrita por Salguero y col (2005) en las cepas Swiss, BALB/c y C57/BL6 infectados experimentalmente con VFA de los serotipos C-S8c1 o SAT-1. La enfermedad se caracteriza clínicamente por apatía, pelo erizado, lomo encorvado y moderada pérdida de peso a las 24 hs post infección. Subsiguientemente se observa sintomatología neurológica, manifestada principalmente por el desarrollo de ataxia del tren posterior. Microscópicamente, se detectan importantes alteraciones en el estrato espinoso en la piel de la almohadilla plantar. En un primer momento se observa degeneración de este estrato de la epidermis, seguido luego de edema intercelular y formación de microvesículas, localizadas fundamentalmente cerca de la membrana basal. Salguero y col (2005) en ratones C57BL/6 infectados con VFA C-S8c1 demostraron que el virus se propaga en casi todos los órganos analizados, causando una infección sistémica. Los animales mostraron una linfopenia severa, así como las lesiones microscópicas en varios órganos similares a los descritos en los huéspedes naturales. Además, los ratones vacunados con una vacuna inactivada virus de fiebre aftosa clásica mostraron una protección completa contra una dosis letal de virus de fiebre aftosa.

La infección de ratones adultos con VFA es dependiente de un número de variables, incluyendo la dosis, la vía de inoculación y el fondo genético del ratón. Está descrito que los ratones Swiss son menos susceptibles al virus C-S8c1 que los ratones C57BL/6 y los ratones BALB/c.

La vía de inoculación es otro determinante importante de los resultados en las infecciones virales (Bray y col., 1998; Houtman y Fleming., 1996; Rai y col., 1996; Turner y Moyer., 2002; Wichmann y col., 2002). Las inoculaciones subcutáneas (almohadilla de la pata) y las inoculaciones intraperitoneales de ratones C57BL/6 con VFA fueron letales, aunque la inoculación intraperitoneal causó una muerte más rápida. Este resultado no es sorprendente ya que con la inoculación subcutánea generalmente se produce una replicación más lenta, que puede

permitir al hospedador disponer de suficiente tiempo para activar los mecanismos de defensa.

Una diferencia importante entre las vías de infección subcutánea e intraperitoneal que puede explicar las diferencias en el resultado es las poblaciones de células presentadoras de antígenos implicadas en la iniciación de la respuesta inmune. Las diferencias en la cinética viral entre las dos rutas de infección puede ser debida a las diferencias en las poblaciones celulares presentadoras de antígeno o al entorno de citoquinas asociadas con DC y los macrófagos peritoneales (Banchereau y col., 2000; Pulendran y col., 2001).

La inoculación oronasal, sin embargo, no condujo a la muerte en ratones C57BL/6 aunque desarrollaron lesiones microscópicas. La resistencia mostrada por los ratones C57BL/6 al virus cuando son inoculados por vía oronasal se compara con la relación resistencia que los cerdos muestran a la infección con VFA en aerosol (Alexandersen y Donaldson y col., 2002).

Por todo ello, podría ser posible que el virus se propagara más lento después de la inoculación oronasal y el control de la infección antes de que el virus cause una infección sistémica.

Dus Santos y col., 2000 utilizaron el modelo murino para realizar la comparación de la eficacia de vacunas en bovinos y ratones, en un total de 6 vacunas para O1Campos, obteniéndose los mismos resultados en ambas especies. También compararon diferentes métodos para la evaluación de la eficacia de vacunas en ratón, utilizaron un ELISA sándwich, neutralización viral y ELISA FL. A partir de esa comparación se determinó que esta última técnica era la que mejor se correlacionaba con los datos bovinos tanto de Acs como de protección, además de tratarse de un ensayo económico, aplicable, sencillo e independiente de la utilización de virus infectivo. Por esta razón, es que se decidió profundizar en la investigación del modelo murino como predictor de la protección de la eficacia de las vacunas contra VFA y estandarizar la técnica para poder establecer una correlación estadísticamente válida.

# HIPOTESIS Y OBJETIVOS

## HIPÓTESIS:

La respuesta inmune humoral inducida por las vacunas contra aftosa en el modelo murino, permite predecir el comportamiento de las mismas en bovinos en cuanto a la inducción de protección.

## OBJETIVO GENERAL:

Desarrollar un modelo animal alternativo para predecir la capacidad protectora de las vacunas contra aftosa en bovinos tanto frente al desafío con VFA.

## OBJETIVOS PARTICULARES:

- Estandarizar la utilización del modelo murino desarrollado en nuestro laboratorio.
- Determinar la eficacia de vacunas contra Aftosa en bovinos adultos y en el modelo murino mediante la medición de niveles de Acs, isotipos inducidos, IFN- $\gamma$ , IgA y protección. Comparar los datos obtenidos con los resultados de la vacunación y desafío en bovinos adultos.
- Evaluar la capacidad del modelo murino de predecir la protección heteróloga inducida por vacunas.

## MATERIALES Y METODOS

Para cumplir con el primer objetivo particular: Validar la utilización del modelo murino desarrollado en nuestro laboratorio fue necesario contar con una metodología estandarizada la cual se realizó en base a la selección de animales, células y virus a utilizar en los diferentes ensayos y a la elección de formulaciones vacunales, inmunizaciones y toma de muestras. Los resultados se muestran en Capítulo 1 de la sección Resultados para el virus O1 Campos y en el Capítulo 4 de la misma sección para el virus A2001).

### 1. Animales

Se utilizaron ratones endocriados de la cepa BALB/c machos libres de patógenos provenientes del bioterio de la Universidad de la Plata. Todos los animales tenían entre 8 a 12 semanas de edad. También se trabajó con ratones lactantes de la misma cepa de entre 2 y 7 días.

Los bovinos utilizados por SENASA fueron seronegativos para VFA de más de 300 kg provenientes de zona libre de Fiebre Aftosa que no practica la vacunación (Prov. de Chubut).

### 2. Líneas celulares

Para la amplificación y la titulación del VFA, se utilizó la línea celular BHK-21 clon 13, (Baby Hamster Kidney) proveniente de riñón de hámster (*Mesocricetus auratus*) de 1 día de edad (catálogo de la American Type Culture Collection - ATCC-, N°CCL-10 (ATCC, 2012). Estas células han sido certificadas por la Asociación Banco Argentino de Células, como libres de micoplasmas y virus adventicios.

### 3. Virus

La manipulación tanto de los virus activos como de las muestras sospechosas de FA que se utilizaron en las diferentes pruebas diagnósticas se realizaron en Cabinas de Seguridad Biológica Clase II ubicadas en el Laboratorio de Bioseguridad Nivel 3 de INTA Castelar, que sigue los lineamientos planteados por la OIE para un laboratorio con ese nivel de bio-contención (OIE, 2012) y habilitada por SENASA.

En los estudios se incluyó la cepa vacunal de referencia VFA O1Campos/Brasil/58 (O1 Campos), y VFA A/Argentina 2001 utilizándose un segundo pasaje en células BHK-21 proveniente de un pasaje previo en epitelio lingual bovino. La suspensión viral de las cepas vacunales O1Campos y A2001 utilizadas en las diferentes pruebas diagnósticas se conservó fraccionada en criotubos de 1,8ml conservados en congeladora a  $-75^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 1^{\circ}\text{C}$ ).

Para la formulación de las vacunas se utilizaron VFA inactivo del serotipo O1 Campos y A2001 inactivados con Bromoetilamina (BEI) y concentrados con polietilenglicol (PEG), concentración de  $216 \mu\text{g/ml}$  (título  $7,21 \times 10^{10}$  DICT<sub>50</sub>/ml) gentilmente cedido por la empresa Biogénesis Bagó.

Para las pruebas de desafío viral se utilizó virus activo del mismo serotipo gentilmente cedido por el Servicio Nacional de Sanidad Animal y Calidad Agropecuaria (SENASA). Este virus proviene de vesículas de bovinos infectados con VFA y ha sido amplificado mediante dos pasajes en BHK-21.

#### 4. Formulaciones vacunales

Para la curva dosis-respuesta se utilizaron vacunas monovalentes que contenían VFA O<sub>1</sub>Campos o A2001 con diferentes cantidades de virus (0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.5, 1 y 2  $\mu\text{g}$  de virus/dosis).

Para la formulación de estas vacunas se utilizó antígeno crioconservado del Banco de Antígenos de FA de Argentina. La cepa viral O<sub>1</sub>Campos o A2001 se propagó en células BHK-21 en suspensión por 18hs, transcurrido este tiempo, se procedió a la doble inactivación de la suspensión viral con BEI (Bahnmann, 1975). Luego de los dos ciclos de inactivación, la suspensión viral se concentró y purificó con PEG 6000.

Las vacunas se prepararon como una emulsión agua/aceite como ha sido descrito (Mattion y col., 1998). El adyuvante oleoso utilizado fue el mismo que en las vacunas comerciales. A estos lotes de vacunas monovalentes O<sub>1</sub>Campos, y A2001 se les realizaron los controles de esterilidad, inocuidad, pureza, tolerancia, potencia y físico-químicos según la resolución 351/2006 de SENASA. Luego de

haber aprobado todos los controles, las vacunas se utilizaron para las pruebas de potencia *in vivo* en ratón

## 5. Inmunizaciones

Los ratones fueron inmunizados con las distintas formulaciones vacunales con un volumen de 0,2 ml por vía intraperitoneal y por vía subcutánea. Todos los animales controles fueron inoculados de la misma forma con solución salina (PBS), se los nombra en el trabajo como grupo normal.

Los bovinos fueron inmunizados con 2 ml de vacuna por vía intramuscular o subcutánea en el cuarto trasero izquierdo.

## 6. Obtención de muestras de ratones

### 6.1.1. Obtención de sangre

Se realizó una incisión transversal ventral en la cola del ratón seleccionando una vena coccígea, luego se recogió un volumen de sangre de 200  $\mu$ l. Posteriormente se centrifugó a 5000 rpm durante 3 minutos para lograr la separación del suero. Se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

### 6.1.2. Obtención de saliva

Se inocularon ratones con Pilocarpina al 0,5% en PBS por vía i.p. Luego de 2 minutos se coleccionó la saliva y se inactivaron las proteasas durante 1 hora a  $56^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se centrifugaron a 9000 g, se colectó el sobrenadante y se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### 6.3. Obtención de esplenocitos

Los ratones fueron anestesiados y eutanasiados por dislocación cervical. Se extrajo el bazo de los ratones y los esplenocitos se obtuvieron por perfusión del mismo con RPMI 1640. Luego se adicionó 14 ml de RPMI 5% SFB y se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos para obtener las células. El pellet obtenido fue resuspendido en 1 ml de RPMI 1640 10% SFB adicionado con HEPES (10mM), Aminoácidos no esenciales (100 $\mu$ M), L-Glutamina (2mM), Piruvato (1mM) y  $\beta$ -

Mercaptoetanol ( $5 \times 10^{-2}$  mM). Se estableció la viabilidad mediante conteo en cámara de Neubauer con el colorante de exclusión Tripán Blue o con colorante de Turk.

#### 6.4. Obtención de órganos

Los ratones fueron anestesiados con Isoflurano (Baxter) y eutanasiados por dislocación cervical. Se realizó la extracción de bazo, pulmón, páncreas e hígado.

-Detección de viremia: Los órganos fueron homogeneizados, centrifugados y los sobrenadantes se sembraron sobre células BHK-21. La detección de la viremia y la titulación viral se realizó del mismo modo que en el apartado nº 7.

-Cortes histológicos: Los órganos fueron conservados en formol (20%) hasta su utilización. Los cortes histológicos fueron realizados de manera tradicional y se realizó la tinción con Hematoxilina y Eosina.

#### 7. Titulación viral por el método de punto final

Placas de 96 pocillos fueron sembradas con células BHK-21, a una densidad de  $1 \times 10^4$  células por pocillo. A las 24 hs., las monocapas con una confluencia de 80%, fueron enjuagadas con MEM-D libre de suero. Se realizaron diferentes diluciones en base 10 de la muestra a titular en MEM-D con 5% de Suero Fetal Bovino (SFB). Se colocaron 100  $\mu$ l/pocillo de cada dilución por cuadruplicado.

La presencia o ausencia de efecto citopático fue evaluada a las 48 hs. de incubación a 37 °C en estufa con 5% de CO<sub>2</sub>, por observación en microscopio y utilizada para determinar la titulación por punto final por el método de *Reed y Muench* (Reed y Muench, 1938) según la fórmula:

$$\text{Log DICT50\% / ml} = (\log A + (\log B \times \log C) / \text{Volumen del inóculo.}$$

Donde:

**A**= Log de la dilución anterior al 50%

**B**= Log de la distancia relativa entre las diluciones que contienen el 50%, calculada como: % positivo anterior al 50%-50%/ %positivo anterior al 50% -% positivo posterior al 50%

**C**= Log del factor de dilución.

Con el segundo objetivo particular se busca determinar la eficacia de vacunas contra Aftosa en bovinos adultos y en el modelo murino mediante la medición de niveles de Acs, isotipos inducidos, IFN- $\gamma$ , IgA y protección. Comparar los datos obtenidos con los resultados de la vacunación y desafío en bovinos adultos. Para ello fue necesario desarrollar la metodología de desafío en ratones (el desafío en bovino realizado fue el oficial según resolución de SENASA 351/2006) y realizar ensayos que permitan la medición de Acs, Isotipos, IgA, IFN- $\gamma$ . Los resultados de estos se encuentran en los capítulos 2 y 3 de la sección resultados para el virus O1 Campos y en los capítulos 4 y 5 para el virus A2001 y A24).

#### 8. Desafío en el modelo murino y evaluación de viremia

En este modelo la protección está definida por la presencia o ausencia de viremia (López O y col. 1989; Piatti P.G. y col 1991; Carrillo C. y col 1998), considerándose protegidos a aquellos animales que 24 hs luego de la infección no presentan viremia detectable (ver esquema 1).

Para evaluar la protección inducida por las vacunas se procedió de la siguiente manera: los ratones vacunados a 21 días post vacunación fueron infectados con VFA, el título de la alícuota de inoculación fue  $10^{4.5}$  DICT<sub>50</sub>/ml para O1Campos y de  $10^{2.5}$  DICT<sub>50</sub>/ml para A2001.

Luego de 24 hs fueron anestesiados con 100  $\mu$ l de Isoflurano (Baxter) por vía inhalatoria y sangrados a blanco por vía retro-orbital. La sangre completa heparinizada (heparina diluida en PBS) de cada animal fue diluida 1:1 con medio Dulbecco's modified Eagle's (MEM-D) suplementado con 2% de SFB.

Evaluación de viremia en células ratones lactantes: La sangre heparinizada proveniente de los ratones inoculados con el virus fue diluída en PBS e inoculada intramuscularmente en ratones lactantes para determinar presencia de virus. Esta se determinó a partir de la muerte de los ratones lactantes si la sangre inoculada presentaba virus.

Evaluación de viremia en células BHK21: la sangre heparinizada proveniente de los ratones inoculados con el virus fue sembrada por duplicado sobre monocapa de células BHK-21 crecidas en placa de 48 pocillos. Luego de 40 minutos en estufa de 37°C y 5%CO<sub>2</sub>, las monocapas fueron lavadas tres veces con PBS y se adicionó MEM-D 2% SFB. Las células se mantuvieron en estufa de 37°C y 5%CO<sub>2</sub> por 48 hs, tiempo luego del cual se procedió a la lectura del efecto citopático. Se consideró al animal no protegido si al menos uno de los duplicados poseía efecto citopático. Se consideró al animal protegido, si luego de dos pasajes ciegos la muestra no presentaba efecto citopático.

En cada ensayo se incluyeron animales inoculados con PBS como controles positivos de infección, que resultaron infectados en todos los experimentos de desafío viral mostrados en este trabajo. En todos los casos luego de la infección de los animales se procedió a la titulación de la alícuota utilizada para corroborar el título viral utilizado en cada infección.

#### 9. Desafío en bovinos: Prueba de Protección a la Generalización Podal (PGP)

Esta prueba es considerada la prueba de referencia para la evaluación de la capacidad protectora de una vacuna. En Argentina la prueba de protección a la generalización podal para evaluar la potencia de las vacunas antiaftosa está regida en el marco de la resolución N° 351/2006 de SENASA (SENASA, 2006).

Se utilizaron 16 bovinos vacunados y 2 bovinos control sin vacunar. A los 30 o 90 días post vacunación los 18 bovinos, fueron desafiados con 10<sup>4</sup> Dosis Infecciosa bovino 50% (DIB 50%) por vía intradérmica en la superficie dorsal de la lengua. El virus utilizado en el desafío, contó con titulación previa para determinar la patogenicidad del virus, así como el título infeccioso en bovinos, en cultivos celulares y/o en ratones lactantes.

En cada prueba de PGP, se confirmaron en el laboratorio las dosis infecciosas inoculadas así como la identidad del virus inoculado y de aquel aislado de los epitelios vesiculares de los animales con lesión.

A los 7 días del desafío viral, los bovinos se sujetaron individualmente en la manga de contención donde se revisó la lengua y cada una de las extremidades para corroborar clínicamente la presencia o ausencia de lesiones compatibles con FA. La lectura se dejó asentada en la planilla de PGP. La prueba fue considerada válida si ambos testigos presentan lesiones compatibles con FA en sus extremidades (ver esquema 1).

La eutanasia de bovinos fue realizada de manera humanitaria y eficiente. Todo el procedimiento fue realizado en referencia al manual interno de ética elaborado por el INTA "Guía para cuidado y uso de animales de experimentación".

El % de PGP sobre los animales vacunados se calcula aplicando la siguiente fórmula:

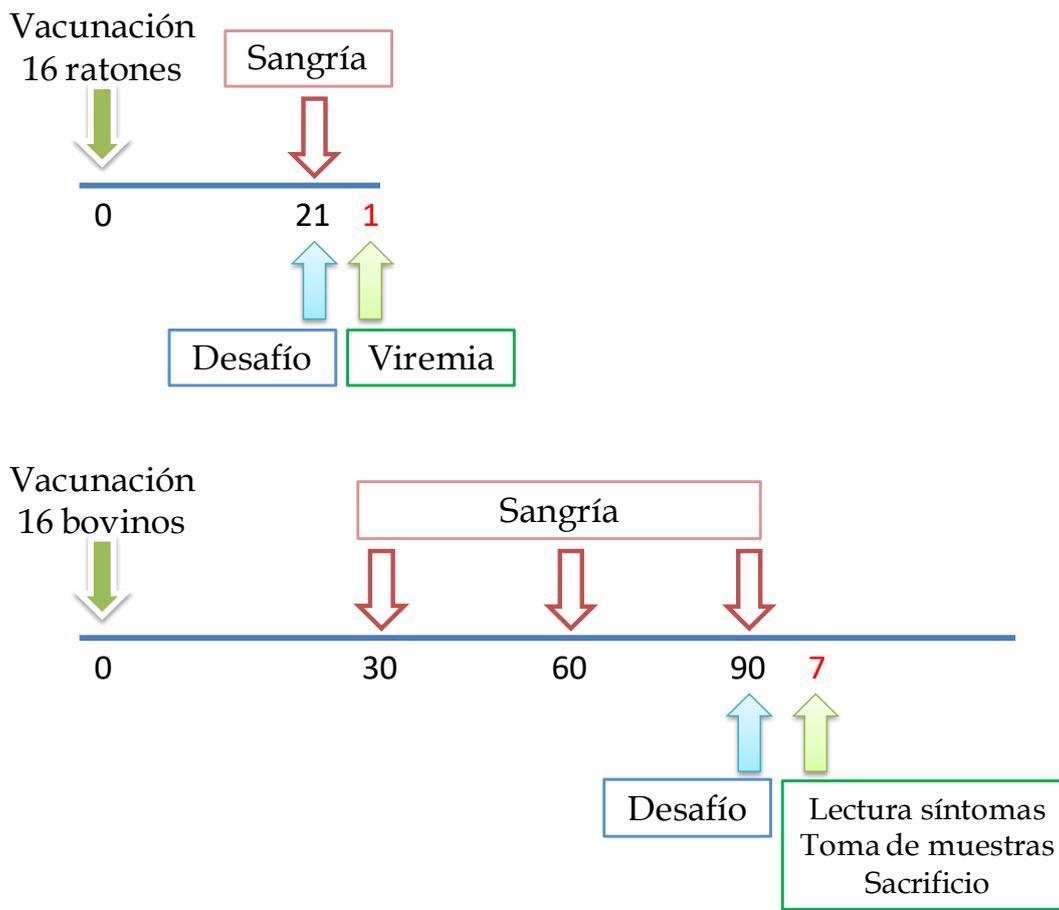
$$\%PGP = P/N \times 100$$

Donde:

**P:** son los animales vacunados y protegidos

**N:** son el total de animales vacunados

De acuerdo con la resolución N° 351/2006 de SENASA (SENASA, 2006) una vacuna es aprobada cuando 12 de los 16 animales vacunados fueron protegidos (75% de PGP), puede ir a recontrol si 10 u 11 animales vacunados fueron protegidos y es rechazada si 9 o menos animales vacunados presentan lesiones (% PGP menor al 62%).



**Esquema 1:** Diseño experimental llevado a cabo con ratones y bovinos. Los animales se vacunaron en las fechas indicadas como el día 0 y a los 21 y 90 dpv respectivamente fueron ingresados al box de seguridad o al laboratorio de alta seguridad y se desafiaron. A los bovinos, luego de una semana del desafío se leyeron los síntomas (7 días post desafío) Los animales con sintomatología positiva fueron los primeros en ser sacrificados. Los ratones fueron sangrados 24 hs post desafío.

Previo a la vacunación, los bovinos fueron sangrados para ser testeados por la prueba de ELISA 3 ABC, y ELISA en FL para descartar la presencia de Acs contra proteínas no estructurales y estructurales (Periolo y col., 1993; Robiolo y col., 1995; Robiolo y col., 2005).

La inmunización con las vacunas comerciales se realizaron en el Campo Experimental de SENASA, ubicado a 1100 km de Buenos Aires, en Colonia 25 de Mayo, provincia de La Pampa. Los bovinos, en el cepo, fueron vacunados vía intramuscular en el tercio superior de la tabla del cuello.

## 10. Preparación de reactivos para el ELISA FL

### 10.1 Obtención de suero anti VFA de conejo

Con el fin de obtener un suero policlonal de conejo anti VFA para utilizarlo como suero captura para los ensayos de ELISA se procedió a la inoculación de una vacuna conteniendo 40 ug de VFA inactivado y purificado por vía intradérmica y 2 booster con un intervalo de 15 días entre cada vacunación. La primera inoculación se realizó con adyuvante completo de Freund y los booster se realizaron con adyuvante incompleto de Freund.

### 10.2 Obtención de sueros Hiperinmune de cobayo

Para realizar el test de ELISA los sueros hiperinmunes de cobayos se obtuvieron luego de infectar los animales con VFA activo, O1 Campos/ o A2001 (PANAFTOSA., 1994)

### 10.3 Purificación del VFA A2001 y O1 Campos: para la inmunización de conejos

Suspensiones inactivadas de VFA A2001 y O1 Campos fueron gentilmente proporcionadas por Biogénesis Bagó y las partículas virales fueron purificadas siguiendo el protocolo de Seki y col., 2009.

### 10.4 Preparación del antígeno para los ELISA

Para los test de ELISA, se utilizó VFA inactivo del serotipo O1 Campos y A2001, inactivado con Bromoetilamina (BEI) y peleteado con polietilenglicol (PEG) gentilmente cedido por la empresa Biogenesis-Bagó. Luego fue purificado utilizando un gradiente discontinuo de densidad de sacarosa (15%- 45%).

### 10.5 Sueros de Referencia para el ELISA FL de ratón.

Como sueros de referencia se utilizaron sueros bovinos individuales y un pool de sueros bovinos, todos obtenidos de bovinos vacunados, ya que sueros de animales convalecientes demostraron ser menos específicos (Rweyemamu, 1984). Se utilizaron vacunas monovalente O1Campos o de A2001, y la sangría de los bovinos fue entre los 30 y 60 DPV. A todos los sueros utilizados se les determinó previamente el nivel de Acs neutralizantes por seroneutralización para seleccionar

aquellos con títulos SN medios a altos según las recomendaciones de trabajos previos (Mattion y col., 2009).

### 11. ELISA en Fase Líquida (ELISA FL)

El ensayo fue adaptado originalmente del realizado para la evaluación de sueros bovinos (Hamblin y col., 1987), con modificaciones.

Las muestras de suero se ensayaron en placas de 96 pocillos en diluciones (desde 1:10 a 1:250) y se incubaron durante 1 hora a 37°C con una dosis de pre titulada de la cepa de virus correspondiente en una fase líquida. Las mezclas se incubaron a continuación durante 1 h a 37°C en pocillos recubiertos con anticuerpo policlonal de conejo VFA cepa específica, con la finalidad de que se una el virus que no reaccionó con el suero murino en el paso anterior.

Después de una etapa de lavado (cinco veces con PBS que contenía 0,05 % de Tween 20 (PBST) se incubó 30 minutos a 37°C, con una concentración óptima de suero hiperinmune de cobayo (cepa específico) utilizado como detector del virus libre. Se añadió un conjugado anti IgG de cobayo conjugado con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch. EE.UU), y el desarrollo de color se obtuvo después de la adición de o-fenilenediamina (OPD)-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como cromógeno y sustrato de la peroxidasa. Las placas se leyeron a 490 nm en un lector MR 5000 microplate. Seis sueros de control de títulos conocidos (sueros de referencia de bajo, medio y alto título) se analizaron simultáneamente.

### 12. ELISA para detección de isotipos murinos

Se utilizó un ELISA captura para la determinación de isotipos murinos. Se cubrieron placas Immulon II toda la noche a 4°C, con suero anti VFA de conejo diluido a la concentración óptima en buffer carbonato-bicarbonato pH 9,6. Luego de lavar con PBST se adicionó el virus inactivo a concentración óptima en PBST y se incubó durante 30 min. a 37°C con agitación. Las placas se lavaron con PBST, se bloquearon con buffer polivinilpirrolidona y se adicionaron los sueros en dilución 1:50 en buffer de bloqueo. Se incubó 2 hs a temperatura ambiente; se lavaron las placas y se adicionó el anticuerpo anti-isotipo conjugado con biotina en dilución

apropiada en PBST 5% suero normal de conejo (SNC). Se incubó 1 h a temperatura ambiente, luego se lavaron las placas y se adicionó Peroxidasa conjugada con strepto-avidina en PBST 5% SNC. Se incubó 1 h a temperatura ambiente, luego se lavaron las placas y se reveló utilizando OPD-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Las placas se leyeron a 490 nm en un lector MR 5000 microplate. Se consideraron positivos aquellos sueros que superaron la D.O. del punto de corte establecido como la media de las D.O. alcanzadas por los sueros negativos más dos desvíos estándar. Se incluyeron controles positivos y sin suero en cada placa.

### 13. ELISA para detección de Acs IgA contra el VFA en saliva murina:

Se cubrieron placas Immulon II toda la noche a 4°C, con suero anti VFA de conejo diluido a la concentración óptima en buffer carbonato-bicarbonato pH 9,6. Luego de lavar con PBST se adicionó el virus inactivo a concentración óptima en PBST y se incubó durante 30 min. a 37°C con agitación. Las placas se lavaron con PBST, se bloquearon con PBST-OVA 1% una hora 37 ° C. Se añadieron 50 ul por pocillo de la saliva se diluyó con PBST OVA 1% y se incubaron una hora 37 ° C, se lavó cuatro veces con PBST. Se añadió suero de conejo anti IgA biotinilado diluido 1:1000 y se incubó una hora 37 ° C, se lavó cuatro veces con PBST. Se agregó posteriormente estreptavidina conjugada con peroxidasa y se incubaron una hora 37 ° C, se lavó cinco veces con PBST y se reveló con OPD. La reacción se detuvo con ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y la absorbancia a 490 nm se midió en un lector de microplacas MR 5000. Se consideraron positivos aquellos sueros que superaron la D.O. del punto de corte establecido como la media de las D.O. alcanzadas por los sueros negativos más dos desvíos estándar. Se incluyeron controles positivos y sin suero en cada placa.

### 14. ELISA para evaluación de Avidéz en suero murinos:

Se sensibilizaron placas Greiner Bio One HB toda la noche a 4°C, con suero anti VFA de conejo diluido a la concentración óptima en buffer carbonato-bicarbonato pH 9,6. Luego de lavar con PBST se adicionó el virus inactivo a concentración óptima en PBST y se incubó durante 30 min a 37°C con agitación. Las placas se

lavaron 5 veces con PBST y se agregó a cada pocillo 50 µl de una dilución 1/50 de los sueros correspondientes, en solución dilución (50 µl/pocillo), y se incuban las placas 1 h a 37°C. Al término de esta incubación se realizaron 2 lavados con PBST, 1 lavado con concentraciones crecientes de urea (1M a 7M), de 15 minutos, a temperatura ambiente (300 µl/pocillo) y finalmente 2 lavados con PBS Tween-20 0,05 %. Las distintas soluciones de urea se prepararon en el día. Se agregó 50 µl de una dilución apropiada (1/100) del anticuerpo comercial anti IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Jackson), y se incubó 1 h a 37°C. Las placas se lavaron 5 veces con PBS-Tween-20 0,05 %. Se revelaron utilizando OPD/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La reacción se frenó con 50µl de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) por pocillo y la absorbancia a 490 nm se midió en un lector de microplacas MR 5000.

Se realizó el cálculo del Índice de Avidéz mediante la siguiente fórmula:

$$\%IA = \text{DO Pocillo tratado} / \text{DO Pocillo sin tratar} \times 100$$

#### 15. ELISA para la determinación de la concentración de IFN $\gamma$ en sobrenadantes de células murinas:

La concentración de IFN $\gamma$  fue determinada en los sobrenadantes de esplenocitos provenientes de animales vacunados, luego de 72hs de incubación. Placas de ELISA (Maxisorp) fueron cubiertas con Acs de rata anti IFN $\gamma$  (eBioscience) diluidos en el buffer de pegada (Coating buffer de eBioscience) e incubadas durante una noche a 4°C.

Las placas fueron luego lavadas tres veces con PBST y bloqueadas con buffer de bloqueo (Assay diluent de eBioscience) 1 h. a temperatura ambiente. Los sobrenadantes de cultivo y el estándar de IFN $\gamma$  fue agregado a las placas e incubados durante 2 hs. a temperatura ambiente. Luego del lavado se agregó el correspondiente anticuerpo anti- IFN $\gamma$  conjugado con biotina y se incubaron las placas por 1 h. a temperatura ambiente. Luego de lavar se adicionó peroxidasa de rábano (HRP) conjugada con strepto-avidina durante 1 h. a temperatura ambiente. Luego de lavar, fue agregado el sustrato y el 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB).

La absorbancia a 450 nm se midió en un lector de microplacas MR 5000. Las concentraciones de IFN $\gamma$  fueron calculadas interpolando las DO obtenidas en una curva realizada en base a las densidades ópticas y concentraciones (en pg/ml) de los estándares.

Mediante el tercer objetivo particular se busca investigar la capacidad del modelo murino de predecir la protección heteróloga inducida por vacunas. Para ello se realizó el análisis estadístico de los datos (Capítulo 3 de Resultados).

## 16. Análisis estadístico de los datos

Con el asesoramiento de Laura Marangulich y Virginia Lopez (FAUBA), se realizaron los análisis estadísticos correspondientes para establecer la correlación entre los datos obtenidos en el modelo propuesto y el bovino adulto entre los que se encuentran:

### 16.1 Repetibilidad del ELISA FL desarrollado en INTA.

El análisis estadístico abordó básicamente el cálculo de las componentes de variancia atribuibles a las repeticiones, los ensayos y los observadores. Se utilizó un Análisis de Variancia, basado en un modelo jerárquico o anidado.

Las estimaciones de repetibilidad se realizó utilizando sueros que contienen bajo, intermedio y alto nivel de Acs contra el VFA (controles: débil, medio y fuerte). Los Coeficientes de Variación (CV) relacionados con la repetibilidad no deben exceder el 10 %

### 16.2 Construcción del modelo logístico de predicción de protección.

Se empleó la técnica de regresión logística. Siguiendo la metodología recomendada por Hosmer y Lemeshow (1989), en una primera etapa se analizaron las regresiones simples para cada variable predictora, seleccionando aquellas variables asociadas a valores p menores a 0.25 para incorporarlas en un modelo múltiple.

Se analizaron tres modelos múltiples de similar poder predictivo, seleccionando el más parsimonioso como el óptimo. Para la selección del modelo se consideró el criterio de Akaike (el menor AIC) y el área bajo la curva ROC (ABC-ROC).

La bondad del ajuste del modelo fue probada mediante la prueba de Hosmer-Lemeshow (Hosmer y Lemeshow, 1989; Agresti, 1996). En esta prueba, los datos son agrupados en clases con aproximadamente el mismo número de casos por clase de acuerdo a las probabilidades estimadas. Se calculan los valores observados para cada clase sumando los valores de esa clase (suma de unos).

$$O_{j1} = \sum y_i$$

$$O_{j0} = \sum (1 - y_i) = n_j - O_{j1}$$

donde  $O_{j1}$  son los observados protegidos y  $O_{j0}$  son los observados no protegidos.

Se calculan también los valores esperados de acuerdo al modelo de la siguiente forma:

$$E_{j1} = \sum \hat{\pi}_i$$

$$E_{j0} = \sum (1 - \hat{\pi}_i) = n_j - E_{j1}$$

El estadístico de prueba es:

$$X^2 = \sum_{j=1}^c \sum_{k=0}^1 \frac{(O_{jk} - E_{jk})^2}{E_{jk}}$$

El estadístico de prueba sigue una distribución Chi-cuadrado bajo la hipótesis nula cierta. Un valor pequeño del estadístico de prueba asociado a un valor-p alto indica un buen ajuste del modelo a los datos.

Otras medidas de evaluación del modelo que se presentan en este trabajo se basan en el porcentaje de valores concordantes y discordantes.

La transformación de las variables a escala binaria se realizó utilizando los puntos de corte obtenidos a partir de la técnica no paramétrica de Árboles de Clasificación. El análisis de árboles de clasificación (Breiman y col., 1984) se realizó mediante CART (*Classification And Regression Trees*), un programa de árboles de clasificación que emplea una búsqueda exhaustiva de todas las posibles particiones univariadas para encontrar los puntos de corte.

### 16.3 Concordancia de la protección raton-bovino.

A partir de la aplicación simultánea del criterio de categorización en bovinos y ratones, se generaron tablas de contingencia, para evaluar la concordancia entre ambos

criterios. El nivel de concordancia fue evaluado mediante el índice Kappa, acompañado de su SE asintótico, el valor-p unilateral y el intervalo de confianza del 95 % (Altman, 1991).

### 17. Medidas de bioseguridad

Toda manipulación de virus vivo para la reproducción experimental de la enfermedad fue realizada bajo estrictas normas de bioseguridad en el Box NSB 3A del INTA. La manipulación de virus vivo para la realización de pruebas con murinos fue realizada bajo estrictas normas de bioseguridad en el bioterio del laboratorio de Bioseguridad de INTA.

Asimismo, cualquier procedimiento que requiriera la manipulación de muestras infecciosas fue realizada en el laboratorio de Bioseguridad NSB 3A del INTA.

## RESULTADOS

## CAPÍTULO 1:

# VFA O1CAMPOS: ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS Y CARACTERIZACIÓN DE LA INFECCIÓN

### Objetivos:

- Desarrollar y validar un ELISA Fase Líquida para la detección de Acs contra VFA O1 Campos en ratones.
- Caracterizar la infección con VFA O1 Campos en el ratón BALB/c.
- Estandarizar las pruebas de desafío viral en el modelo.

La protección en bovinos contra el VFA está fuertemente relacionada con el nivel de Acs específicos en la circulación sanguínea (Maradei y col., 2008). Está descrito que el desarrollo de la respuesta humoral coincide en bovinos, con la eliminación de las lesiones, de la viremia y la reducción de la excreción viral (Sobrino y col., 2001).

De acuerdo con el Manual de la OIE (OIE, 2008), las pruebas indirectas como la medición de Acs neutralizantes en cultivo de células, los Acs medidos por ELISA o la seroprotección en ratón lactante, pueden ser utilizados para evaluar la potencia de una vacuna, siempre que tengan establecida una correlación estadística con la prueba de protección en bovinos. Sin embargo, la ventaja del ELISA con respecto a las otras dos pruebas reside en la independencia de la manipulación del virus infectivo con todos los peligros e infraestructura que conlleva.

El ELISA en fase líquida (FL) para la detección de Acs contra el VFA es una técnica sensible, específica, cuantitativa que permite identificar diferentes serotipos. Puede ser utilizado para el estudio de un gran número de muestras por ensayo, ya que es rápida, reproducible e independiente del empleo de cultivos celulares. En Argentina es utilizada para las pruebas oficiales de control de potencia de vacunas antiaftosa en bovinos, junto con la prueba de protección contra la generalización podal (PGP) (Maradei y col., 2008).

La Expectativa Porcentual de Protección estima según el nivel de Acs contra VFA (medido por ELISA FL) la probabilidad de que el bovino esté protegido contra el desafío viral (Alonso y col., 1987). Éste es un método estadísticamente fiable para ser utilizado como un sustituto de la protección con una muy buena concordancia estadística (Maradei y col., 2008; Robiolo y col., 2010).

En esta investigación se trabajó principalmente con el VFA Serotipo O ya que tiene una amplia distribución. Fue responsable de grandes brotes ocurridos en el Reino Unido, Irán, Irak, Siria, Israel, Líbano, Jordania, Arabia peninsular, Sudáfrica y Corea. En el año 2000 en Argentina aparecieron focos de fiebre aftosa de los cuales algunos fueron causados por este serotipo. En los últimos años fue

responsable también de los brotes ocurridos en Ecuador (2009-2010) y en Paraguay (2011).

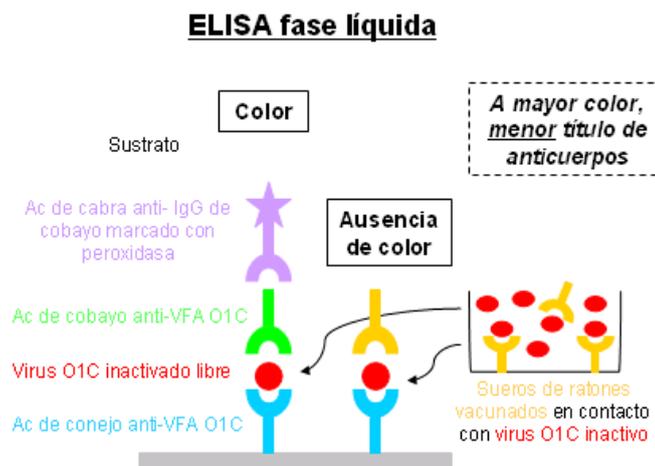
El VFA O1 Campos, es uno de los 4 serotipos incluidos en las vacunas comercializadas en Sudamérica y es protagonista de la mayor parte de las pruebas de desafío realizadas actualmente en nuestro país.

### 1.1. Desarrollo de un ELISA FL para la evaluación de los Acs contra VFA serotipo O1 Campos en ratones.

Con el objeto de evaluar el nivel de Acs específicos para el VFA en los sueros de ratones que recibieron vacunas antiaftosa contra el serotipo O1 Campos, se desarrolló en nuestro laboratorio un ELISA FL con la colaboración del Instituto de Ciencias y Tecnología “Dr. Cesar Milstein”.

La necesidad de desarrollar un test de ELISA en nuestro laboratorio surgió debido a que como era de esperarse, los resultados obtenidos al evaluar los sueros de ratones con la técnica de ELISA FL desarrollada por el Instituto de Ciencias y Tecnología “Dr. Cesar Milstein” no fueron satisfactorios ya que esta técnica fue desarrollada y validada con otra finalidad. Por esta razón, se adaptó el ensayo ya desarrollado y validado para bovinos en ratones.

Como se observa en el esquema 2, como anticuerpo de captura se utilizó el suero proveniente de un conejo inmunizado con el VFA inactivado purificado, producido en nuestro laboratorio en dilución óptima para la sensibilización de las placas de ELISA. En una placa auxiliar se realizó la fase líquida, en la cual los sueros problema y los controles positivos y negativos se diluyeron apropiadamente. A estas diluciones se le agregó el antígeno VFA O1 Campos inactivo previamente titulado. Se incluyeron los controles de antígeno y blanco de prueba. Luego, se transfirió la fase líquida a la placa conteniendo el suero captura. Posteriormente, se utilizó un suero hiperinmune proveniente de cobayo como detector del virus que quedó libre en la fase líquida. Luego se incubó con un anticuerpo anti Inmunoglobulina de cobayo conjugado a peroxidasa y se agregó el sustrato (Figura 9 A).



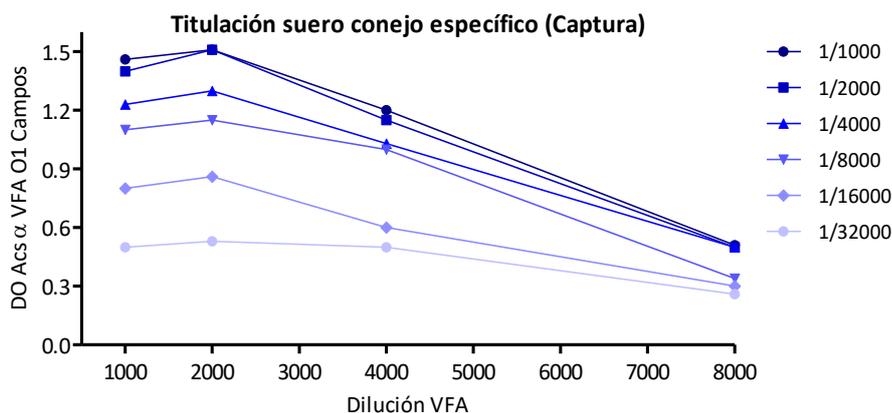
**Esquema 2:** Esquema del ELISA FL. Interpretación del resultado y componentes.

Para determinar las condiciones óptimas del ELISA FL, se procedió a la obtención del suero de conejo específico contra VFA O1 Campos, para ello se purificó el VFA O1 Campos por gradiente de sacarosa para la obtención del suero de conejo específico contra VFA O1 Campos. Luego se procedió a la titulación del suero policlonal de conejo anti VFA O1 Campos utilizado como captura en los ensayos (Figura 9A).

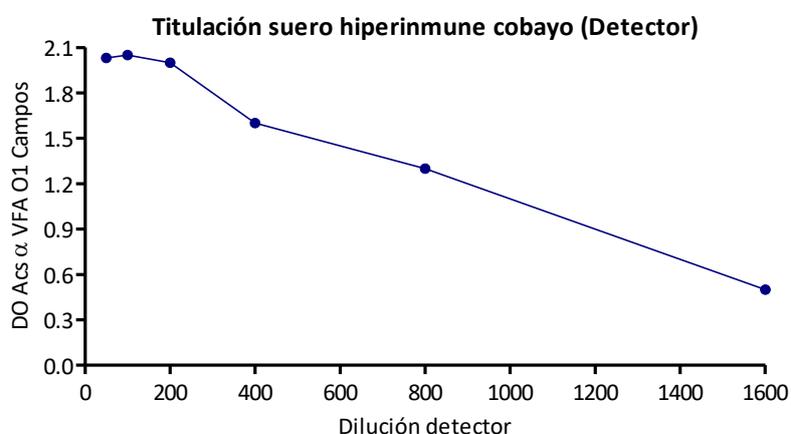
Para la titulación se sensibilizaron placas Immulon II y se siguió el protocolo descrito por Quattrocchi y col (2011). Finalmente se seleccionó la dilución del suero de conejo captura contra VFA O1 Campos 1/2000 para continuar los experimentos.

Luego se determinó la concentración óptima de suero hiperinmune de cobayo (gentilmente cedido por SENASA) utilizado como detector del VFA en el ELISA FL. Se siguió el mismo protocolo mencionado anteriormente y se seleccionó la dilución del suero de cobayo detector contra VFA O1 Campos 1/200 para continuar los experimentos (Figura 9B).

A



B



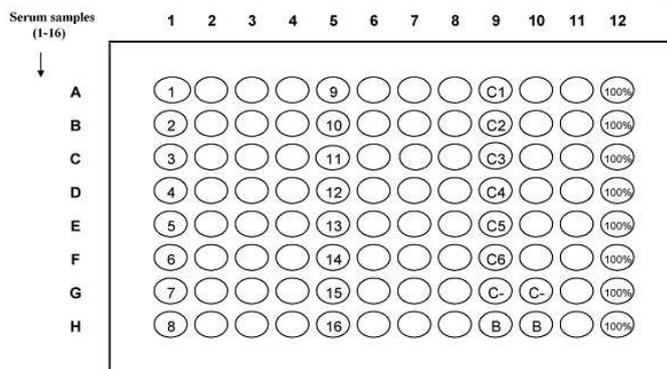
**Figura 9:** A- Titulación de suero conejo específico anti VFA. Diferentes concentraciones de Captura fueron evaluadas frente a diluciones seriadas de VFA O1 Campos purificado. B- Titulación de suero hiperinmune de cobayo anti VFA. Diferentes concentraciones de detector fueron evaluadas frente a diluciones seriadas de VFA O1 Campos purificado.

En cada placa de ELISA se evaluaron sueros provenientes de ratones que recibieron las vacunas (21 dpv) en 4 diluciones. Como controles se utilizaron controles de virus 100% (sin suero) 8 pocillos por placa y 3 pocillos blancos (ver esquema de placa). También se colocaron sueros controles provenientes de bovinos vacunados contra aftosa con títulos de Acs conocidos (medidos por un ELISA FL desarrollado en el Instituto de Ciencias y Tecnología “Dr. Cesar Milstein” método oficial utilizado para la evaluación de vacunas comerciales) dentro de los siguientes rangos:

- C1 y C2 Control positivo fuerte: Título de Acs 3,51 - 4,18.
- C3 y C4 Control positivo medio: Título de Acs 1,75 - 2,29.
- C5 y C6 Control positivo débil: Título de Acs 1,43 - 1,75.

- C- Suero normal: Título de Acs 1,00.

### Esquema de placa de ELISA FL.



Con el fin de procesar los resultados de un modo rápido, sencillo y evitar errores por parte del operador, se desarrolló una planilla de cálculo (Dra. Blanca Robiolo. Instituto de Ciencias y Tecnología “Dr. Cesar Milstein”) que valida las lecturas de las DO de los controles presentes en las placas de ELISA (Anexo 1).

Una vez ajustados los parámetros y constatada la funcionalidad de los controles dentro del rango aceptado (Ver Anexo 1), se procedió a realizar la evaluación de la repetibilidad del test teniendo en cuenta lo recomendado por la OIE.

#### 1.2. Repetibilidad del ELISA FL

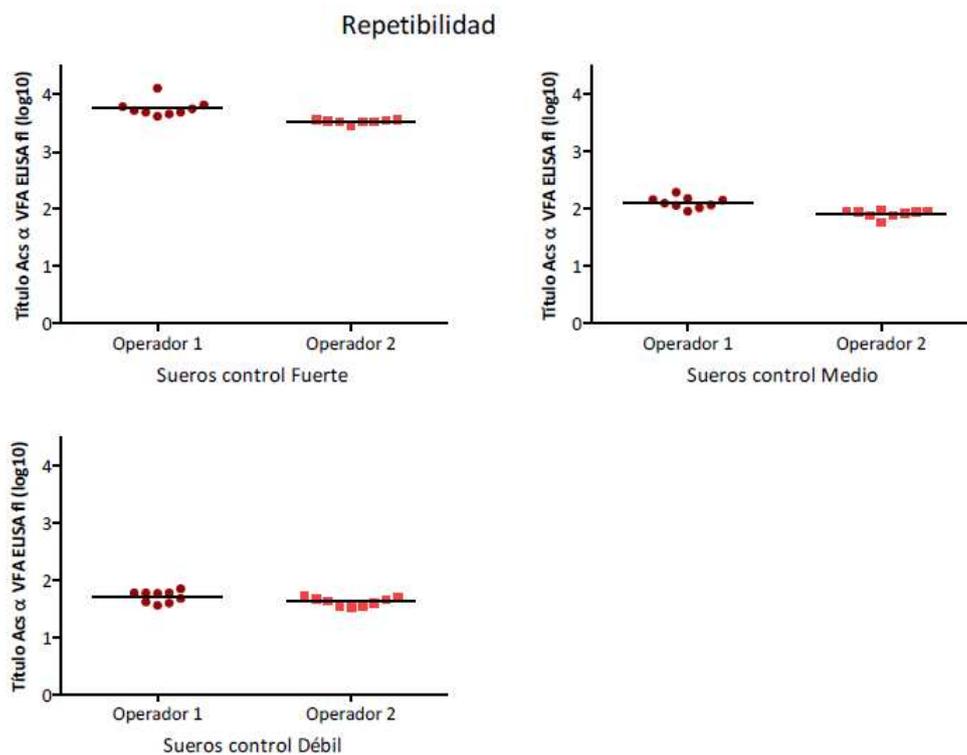
Los estudios de repetibilidad analizan la variación de las mediciones realizadas en las mismas condiciones.

Con el objeto de evaluar la repetibilidad de la técnica para la determinación del nivel de Acs contra VFA, se emplearon tres tipos de sueros: control positivo débil, medio y fuerte (menor a mayor nivel de Acs contra VFA O1 Campos). Se realizó un total de 9 ensayos con dichos sueros controles por duplicado por 2 operadores (18 por suero). Los resultados se detallan en la tabla 1 y se grafica la media de los títulos con su desvío standard (DS) para cada operador en la figura 9.

Medidas descriptivas de las evaluaciones de anticuerpos para los controles

DEBIL				MEDIO				FUERTE			
Ensayo	Operador	Media (DS)	Mín-Máx	Ensayo	Operador	Media (DS)	Mín-Máx	Ensayo	Operador	Media (DS)	Mín-Máx
1	1	1,77 (0,03)	1,75-1,79	1	1	2,15 (0,04)	2,12-2,18	1	1	4,11 (0,42)	3,81-4,4
	2	1,54 (0,01)	1,53-1,54		2	1,96 (0,01)	1,95-1,96		2	3,53 (0,08)	3,47-3,58
2	1	1,59 (0,10)	1,52-1,66	2	1	2,06 (0,02)	2,04-2,07	2	1	3,72 (0,10)	3,65-3,79
	2	1,70 (0,01)	1,69-1,70		2	1,94 (0,03)	1,92-1,96		2	3,55 (0,03)	3,53-3,57
3	1	1,77 (0,16)	1,65-1,88	3	1	2,10 (0,01)	2,09-2,10	3	1	3,75 (0,04)	3,72-3,78
	2	1,62 (0,04)	1,59-1,65		2	1,89 (0,04)	1,86-1,91		2	3,45 (0,08)	3,40-3,52
4	1	1,61 (0,04)	1,58-1,63	4	1	2,29 (0,01)	2,28-2,29	4	1	3,66 (0,01)	3,65-3,66
	2	1,71 (0,04)	1,68-1,73		2	1,94 (0,01)	1,93-1,94		2	3,52 (0,02)	3,50-3,53
5	1	1,67 (0,04)	1,64-1,69	5	1	2,18 (0,04)	2,15-2,20	5	1	3,69 (0,01)	3,68-3,70
	2	1,51 (0,02)	1,49-1,52		2	1,89 (0,01)	1,88-1,90		2	3,56 (0,04)	3,52-3,55
6	1	1,77 (0,02)	1,75-1,78	6	1	2,02 (0,06)	1,98-2,06	6	1	3,69 (0,01)	3,68-3,69
	2	1,54 (0,00)	1,54-1,54		2	1,77 (0,18)	1,64-1,89		2	3,56 (0,04)	3,53-3,59
7	1	1,76 (0,02)	1,74-1,77	7	1	2,07 (0,02)	2,05-2,08	7	1	3,79 (0,08)	3,73-3,84
	2	1,59 (0,01)	1,58-1,60		2	1,96 (0,01)	1,95-1,96		2	3,54 (0,00)	3,54-3,54
8	1	1,84 (0,10)	1,77-1,91	8	1	2,16 (0,04)	2,13-2,19	8	1	3,82 (0,06)	3,78-3,86
	2	1,65 (0,02)	1,63-1,66		2	1,98 (0,08)	1,97-1,98		2	3,53 (0,01)	3,52-3,53
9	1	1,55 (0,01)	1,54-1,55	9	1	1,96 (0,08)	1,90-2,02	9	1	3,62 (0,14)	3,52-3,72
	2	1,66 (0,06)	1,62-1,70		2	1,92 (0,04)	1,89-1,95				

**Tabla 1:** Medidas descriptivas del título de Acs (medidos por ELISA FL) para el control débil, medio y fuerte (se realizaron 9 ensayos por suero control por cada operador. Se calculó la media, el desvío estándar y los valores mínimo y máximo de cada una de las mediciones.



**Figura 10:** Título de Acs anti VFA por ELISA FL de los sueros control fuerte, medio y débil, por operadores 1 y 2. Cada punto representa el título obtenido por cada uno de los operadores.

En la Tabla 1 y Figura 10, se observa una baja dispersión de los datos para los sueros control débil, medio y alto.

A partir de los valores obtenidos, se realizaron los cálculos de los componentes de la variancia.

		Componentes de Variancia				Media Total
		Total	Observador	Ensayo	Repetición	
<b>Control débil</b>	Variancia ( $S^2$ )	0.0125	0.0031	0.0062	0.0032	1.66
	%Variación total <sup>(1)</sup>		24.8	49.6	25.6	
	%Media Total <sup>(2)</sup>		3.35	4.74	3.41	
<b>Control medio</b>	Variancia ( $S^2$ )	0.0262	0.0181	0.0052	0.0029	2.01
	%Variación total <sup>(1)</sup>		69.1	19.8	11.1	
	%Media Total <sup>(2)</sup>		6.69	3.59	2.68	
<b>Control fuerte</b>	Variancia ( $S^2$ )	0.0436	0.0263	0.0044	0.0129	3.64
	%Variación total <sup>(1)</sup>		60.3	10.1	29.6	
	%Media Total <sup>(2)</sup>		4.46	1.82	3.12	

**Tabla 2:** Valores de variancia, % variación total y % media total para los títulos de los sueros control distinguiendo el aporte de sus componentes operador, ensayo y repetición

$S_i^2$ : Variancia

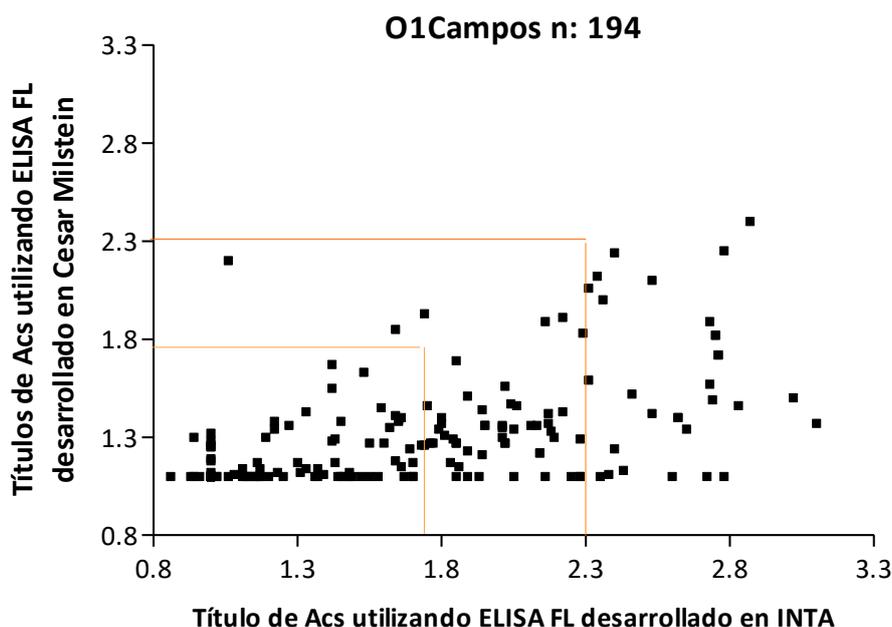
1) Calculado como  $\frac{S_i^2}{S_{Total}^2}$  2) Calculado como  $\frac{\sqrt{S_i^2}}{MediaTotal}$

Como se observa en la tabla 2, en los controles medio y fuerte, los componentes de la variancia asociados a la observador son superiores a aquellos asociados a la repetibilidad, mientras que en el control débil las cifras asociadas a estos parámetros son similares.

El análisis estadístico abordó básicamente el cálculo de los componentes de la variancia atribuibles a las repeticiones, los ensayos y los operadores. En todos los casos, el porcentaje de variación relativo a la media es aceptablemente bajo, siempre por debajo del 5% para los controles fuerte y débil. Para el control medio, es de 6,69%, siempre por debajo CV recomendado por la OIE menor al 10% (OIE, 2008).

Comparación del nivel de Acs de ratones vacunados, obtenidos por ELISA FL del Instituto "Cesar Milstein" y ELISA FL de INTA.

La comparación de los resultados de una serie de sueros evaluados por la técnica desarrollada en esta tesis (ELISA FL INTA) y los niveles de Acs evaluados por el ELISA FL del Instituto de Ciencias y Tecnología "Dr. Cesar Milstein" se muestran en la figura 10.



**Figura 11:** Título de Acs anti VFA de 194 sueros de ratones, evaluados por ELISA FL desarrollado en INTA y desarrollado en el Instituto de Ciencias y Tecnología "Dr. Cesar Milstein.

La figura 11 muestra los niveles de anticuerpos de ratones vacunados con diferentes formulaciones y sangrados a los 21 dpv, estos niveles fueron determinados por las dos técnicas, mediante el ELISA desarrollado por el Instituto de Ciencias y Tecnología "Dr. Cesar Milstein" no se observaron diferencias en sueros con diferentes niveles de anticuerpos, según este ELISA, la mayor parte de los sueros presentaban niveles de anticuerpos considerados bajos y algunos considerados medios. Sin embargo, al evaluar los mismos sueros por el ELISA desarrollado en nuestro laboratorio estos presentaron títulos altos, medio y bajos, permitiendo realizar una cuantificación más precisa.

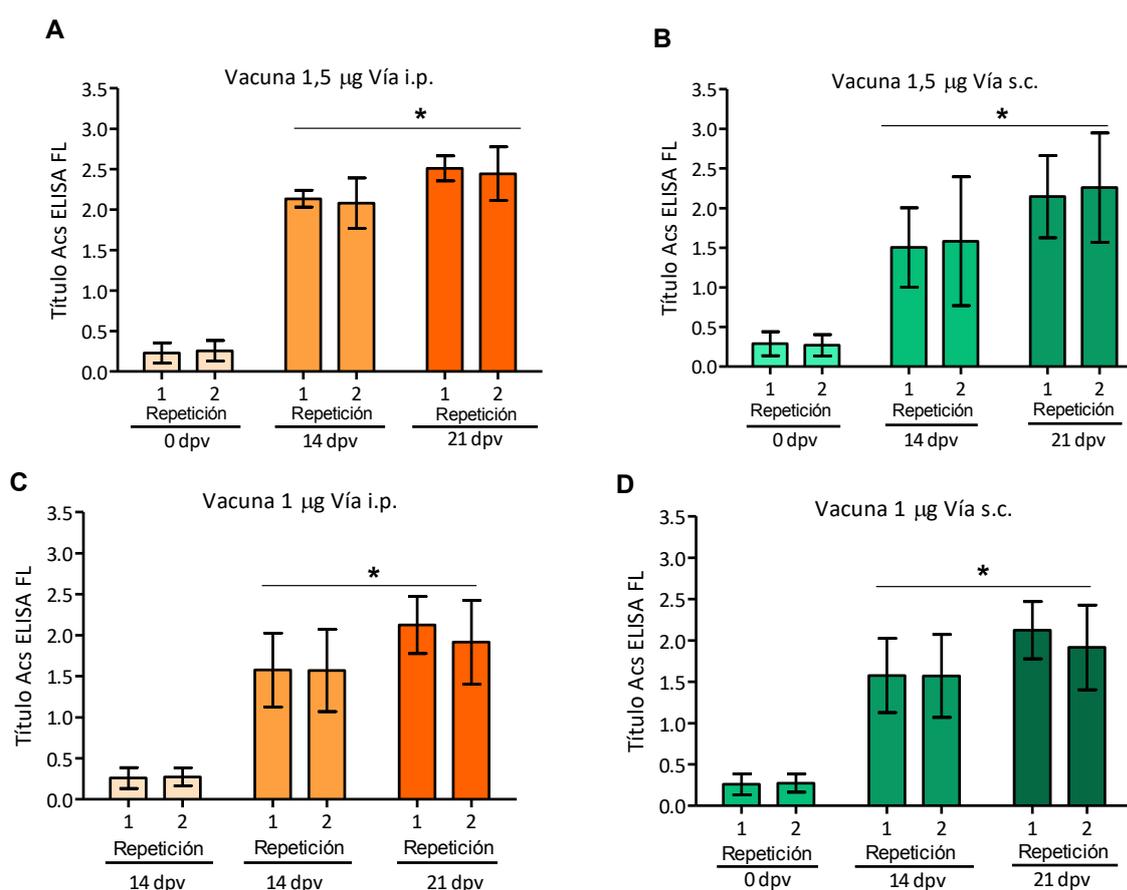
*En resumen:*

*Los niveles de Acs medidos utilizando el ELISA FL desarrollado en el laboratorio presentan una repetibilidad aceptable, ya que el porcentaje de variación relativo está por debajo del 10% recomendado por la OIE. Por lo tanto, la técnica puede ser empleada para evaluar la respuesta humoral inducida en ratones por vacunas contra la fiebre aftosa.*

### 1.3. Repetibilidad del ensayo de vacunación y determinación serológica.

El modelo murino descrito por Dus Santos y col (2000) utiliza el raton Balb/c para evaluar las vacunas comerciales contra fiebre aftosa. En este trabajo de tesis se planteó la necesidad de evaluar la repetibilidad de los ensayos de vacunación y de las mediciones de Acs realizadas. La repetibilidad del ensayo de vacunación se evaluó mediante la inmunización (en 2 oportunidades) de 10 ratones por grupo con vacunas que contenían 1,5 $\mu$ g y 1 $\mu$ g de VFA O1 Campos/dosis/ratón y adyuvante comercial. La inmunización se realizó por vía intraperitoneal (i.p.) o subcutánea (s.c.). Se midieron los Acs contra VFA serotipo O1 Campos a los 0, 14, 21 y 40 dpv.

#### Respuesta inducida en ratones inmunizados con vacunas de 1,5 y 1 $\mu$ g/dosis VFA O1Campos (vía de inoculación i.p. y s.c.)



**Figura 12:** Las barras Indican los promedios de los títulos de Acs (ELISA FL) obtenidos luego de vacunar 10 ratones/grupo en 2 ensayos (repetición:1, 2) a los 14 y 21 dpv. Los animales fueron vacunados por vía intraperitoneal (i.p.) o subcutánea (s.c) con A- 1,5  $\mu$ g VFA/dosis vía i.p.; B- 1,5  $\mu$ g VFA/dosis vía s.c. C- 1  $\mu$ g VFA/dosis vía i.p.; D- 1  $\mu$ g VFA/dosis vía s.c.

En la figura 12 se observa que a los 21 dpv hay un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en el título de Acs medido por ELISA FL con respecto a los títulos alcanzados a los 14 dpv. El aumento se mantiene hasta los 40 dpv (dato no mostrado), esto se observó utilizando ambas vacunas (1,5 $\mu$ g y 1 $\mu$ g) y en ambas vías de inoculación (i.p. y s.c).

A pesar de que no hubo notables diferencias entre los niveles de Acs inducidos luego de vacunar por vía intraperitoneal o vía subcutánea, se decidió proseguir los experimentos utilizando la vía de inoculación intraperitoneal, debido principalmente a una mayor homogeneidad de los datos observados.

La vía subcutánea fue mantenida como técnica de respaldo en caso de detectar trazas de toxicidad de las vacunas inoculadas en ratones por vía intraperitoneal.

*En resumen:*

*Se demostró la repetibilidad de la respuesta inmune humoral inducida por las vacunas que contenían 1 y 1,5  $\mu$ g VFA/dosis.*

*Se seleccionó (mediante la técnica de ELISA FL) el tiempo de 21 dpv para la evaluación de las vacunas.*

*Se seleccionó la vía de inoculación intraperitoneal ya que mostró mayor homogeneidad en la respuesta humoral inducida por ambas dosis de VFA inactivo.*

#### 1.4. Estandarización del modelo murino

La medición de la viremia en el modelo murino descrito por Dus Santos y col., 2000 involucró la inoculación del virus en una dosis de  $10^4$  dosis letal ratón lactante (DLRL50). La presencia de viremia fue demostrada mediante la inoculación de la sangre del ratón en 6 ratones lactantes, es decir, por cada ratón desafiado, eran necesarios 6 ratones lactantes de entre 3 y 6 días de vida. Por otro lado, cuando se deseaba titular la cantidad de virus en sangre del ratón adulto desafiado, eran necesarios 6 ratones lactantes por cada dilución de sangre.

Teniendo en cuenta el consenso internacional para alcanzar el concepto de las 3 R (Reducir, Reemplazar y Refinar el uso de animales), en este trabajo de investigación se realizó la comparación de la titulación de virus por un lado con ratones lactantes y por otro lado utilizando células susceptibles al VFA BHK21.

<b>Titulación VFA O1 Campos</b>	
BHK 21	Ratón Lactante
<b><math>10^{6.5}</math></b>	<b><math>10^{7.8}</math></b>

**Tabla 3:** Título de VFA O1 Campos obtenido luego de la titulación en monocapa de BHK21 y en ratones lactantes calculado por Reed y Muench.

A pesar de la diferencia en los títulos obtenidos con las dos metodologías (tabla 3), se decidió utilizar en este trabajo de investigación la titulación en monocapa de BHK21 no solo por las ventajas económicas, metodológicas y de homogeneidad que presentan las líneas celulares, sino principalmente para respetar el concepto de las 3 R.

Debido a las modificaciones realizadas en cuanto a la medición de la viremia luego del desafío del ratón adulto, se procedió a la estandarización del modelo murino.

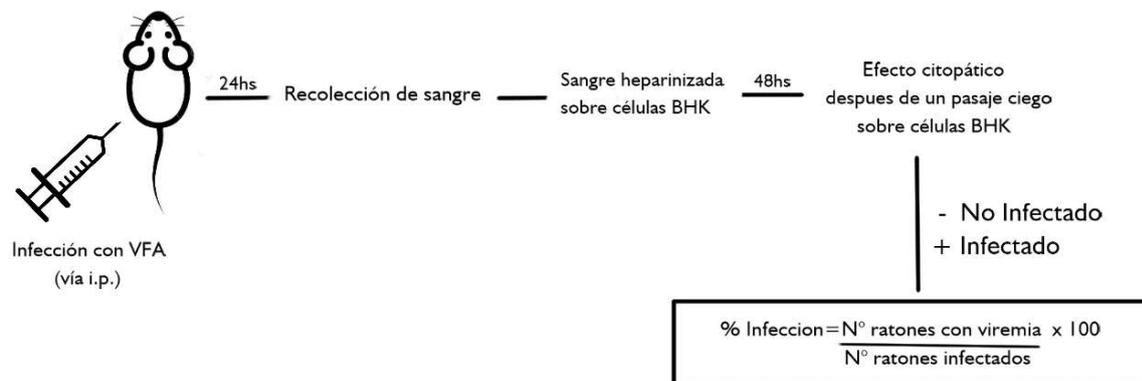
### 1.5. Caracterización de la infección por VFA serotipo O1Campos en ratones BALB/c.

Como fue reportado previamente por Fernández y col., 1986, el ratón adulto no es susceptible a la infección natural con VFA, pero puede infectarse experimentalmente por la inoculación del virus por vía intraperitoneal. Se describió además, que la progresión de la infección y la capacidad del virus de generar sintomatología depende de tres factores: la vía de inoculación del mismo, la cepa de ratón utilizada y el serotipo de virus seleccionado para la infección (Salguero y col., 2005).

Con el objetivo de conocer en detalle el sistema a utilizar en este trabajo para evaluar la eficacia de las vacunas contra el VFA, se realizó una caracterización de la infección en ratones BALB/c. Para ello se tuvo en cuenta el título de virus necesario para infectar el 100% de los ratones y la progresión de la viremia producida por la infección con VFA.

La metodología utilizada, involucra el desafío viral por vía intraperitoneal, la sangría de los ratones a las 24 hs y la medición de la viremia utilizando células BHK21. La sangre heparinizada proveniente del ratón desafiado, se siembra en placas con células BHK21 y se observa la presencia de efecto citopático a las 48 hs.

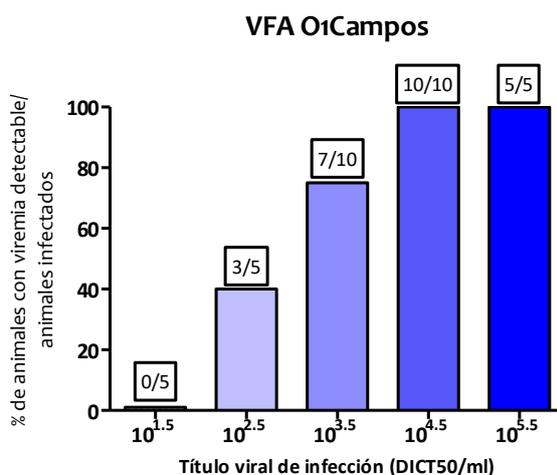
Como se representa en el esquema 2, si se detecta el efecto citopático, el animal se considera infectado; si el efecto no es detectado, se realiza un pasaje ciego en células BHK21 para confirmar el dato negativo que indica que el animal no se ha infectado.



**Esquema 3:** Representación de la prueba de infección en ratones BALB/c adultos y cálculo de % de infección.

### 1.6. Determinación de la dosis viral para realizar los desafíos

Con el objeto de corroborar lo publicado en 1986 por Borca y colaboradores en cuanto a la dosis de infección óptima en ratones BALB/c, se realizó una curva dosis respuesta, utilizando en este caso las células BHK21 en reemplazo del ratón lactante para detectar la viremia. Para ello se trabajó con ratones adultos endocriados de la cepa BALB/c. Grupos de animales se infectaron con 0,5 ml de diferentes concentraciones virales.

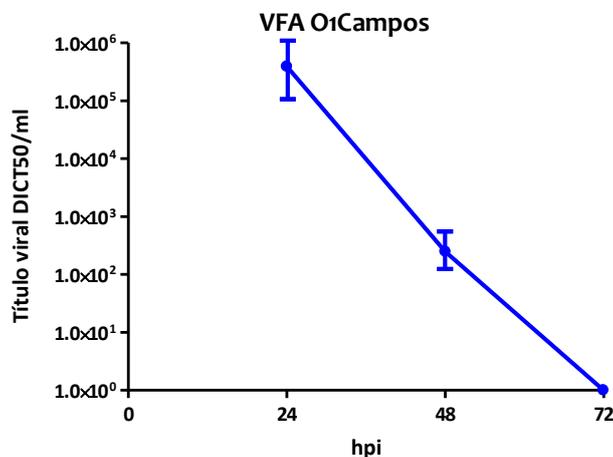


**Figura 13:** Selección de dosis infectiva (VFA O1 Campos) en ratones BALB/c. Cada barra representa el % de ratones con viremia detectable con respecto al total de los animales infectados 24hs después de haber sido inoculados con diferentes dosis de VFA. El recuadro indica el número de animales con viremia detectable/el número de animales infectados.

Como se observa en la figura 13, a las 24 hpi es necesario una dosis de VFA O1 Campos de  $10^{4.5}$  DICT50/ml para que el 100% de los ratones se infecten, cuando la dosis infectiva es menor ( $10^{2.5}$ ;  $10^{3.5}$  DICT50/ml) el número de animales infectados es menor al 100%. Al infectar con  $10^{1.5}$  DICT50/ml, no se detectó viremia en ninguno de los ratones. Este dato confirma lo publicado por Borca y colaboradores en 1986 en cuanto a la dosis mínima de infección necesaria para infectar al 100% de los ratones y revalida la técnica utilizada en esta tesis para la medición de la viremia.

### 1.7. Cinética de la infección con VFA O1Campos

Una vez seleccionada la dosis infectiva, se realizó la medición de los títulos virales en sangre a diferentes horas post infección (24, 48 y 72hpi), para conocer la cinética de la viremia.



**Figura 14:** Curva de viremia en función de hpi: ratones BALB/c (n=4) fueron inoculados con  $1 \times 10^{4.5}$  DICT50/ml de O1 Campos. Se muestra en el eje y el título viral (DICT50/ml) alcanzado en sangre por ratones BALB/c luego de la infección con VFA O1Campos a las 24, 48 y 72 hpi. Cada punto corresponde al promedio de los títulos virales alcanzados por los animales que integran los distintos grupos y representan la media y sus correspondientes DS.

Como se ve en la figura 14, en los ratones, luego de la infección con VFA O1 Campos se detecta una disminución de los niveles de virus en sangre a medida que transcurre el tiempo, el promedio de los títulos virales en sangre son  $4 \times 10^5$  DICT50/ml a las 24hpi, de  $2.5 \times 10^2$  DICT50/ml a las 48 hpi y a las 72hpi no se detecta viremia.

### 1.8. Determinación del efecto del virus sobre los ratones luego del desafío.

Con el objeto de evaluar el efecto del VFA O1 Campos en los ratones BALB/c, se infectaron ratones (n=4) y se los observó a diferentes horas post infección para registrar aparición de signos clínicos.

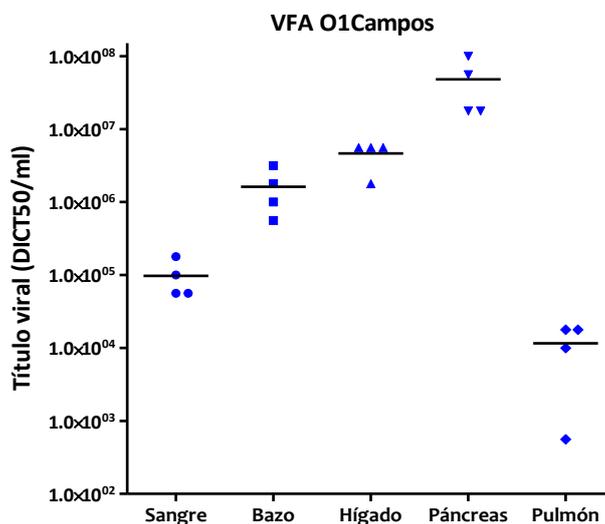
<b>Signos clínicos 96 hpi</b>	
<b>Apatía</b>	-
<b>Piloerección</b>	-
<b>Pérdida de peso</b>	-
<b>Dificultad respiratoria</b>	-
<b>Lomo encorvado</b>	-
<b>Sobrevida</b>	<b>100%</b>

**Tabla 4:** Signos clínicos en ratones infectados con VFA a las 96hpi y el % de sobrevida de ratones BALB/c.

En la tabla 4 puede observarse que los animales no presentaron signos clínicos frente a la infección con VFA O1 Campos. Además, a las 96 hpi, la sobrevida fue del 100 % en los ratones infectados. Tras un seguimiento estricto por más de 2 meses estos animales siguieron vivos y con ausencia de sintomatología clínica (dato no mostrado).

### 1.9. Distribución del virus en sangre y diferentes órganos luego de la infección

Con el fin de evaluar la distribución del virus en distintos órganos, a las 24 hpi con VFA O1 Campos por vía i.p. se realizó la extracción de sangre, bazo, páncreas, hígado y pulmón.

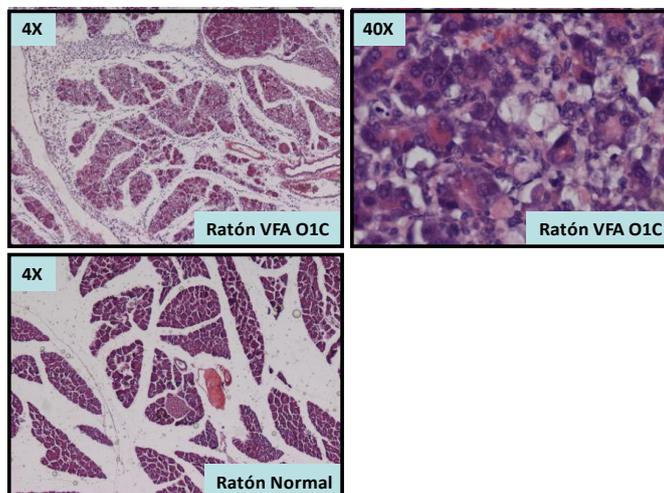


**Figura 15:** Título viral en sangre y en diferentes órganos evaluados. Se muestra en el eje y el título viral (DICT50/ml) alcanzado en sangre y en los órganos de ratones BALB/c (n=4) luego de 24 hpi con VFA O1 Campos. Cada punto corresponde al título viral detectado en el órgano de cada animal infectado. Se encuentran representados los títulos virales individuales y la media en cada órgano con su correspondiente DS.

Como se observa en la figura 15 hubo detección viral en sangre y en todos los órganos analizados indicando una infección sistémica. Los títulos virales varían entre los órganos, evidenciándose una mayor replicación en páncreas. En la saliva de 3 de 4 de los ratones infectados se detectó virus aunque en un título bajo (dato no mostrado).

### 1.10. Evaluación histopatológica.

Con el objeto de conocer el efecto viral en los órganos estudiados a las 24 hpi, se realizaron cortes histológicos de bazo, páncreas, hígado, y pulmón.



**Figura 16.** Corte histológico de páncreas de ratón infectado con VFA O1 Campos (24 hpi.) y de ratón normal.

Como se observa en la figura 16, el páncreas presenta un infiltrado intenso de células mononucleares en el estroma, con edema. Los lobulillos pancreáticos muestran diferente grado de degeneración celular, con vacuolización, necrosis, apoptosis e infiltrado mononuclear leve. Los islotes de Langerhans se encuentran conservados. Se detecta pancreatitis no supurativa, con degeneración vacuolar y necrosis difusa del epitelio acinar.

Al no observarse la misma degeneración tisular en animales normales, las lesiones observadas en el páncreas de los ratones infectados con el VFA O1 Campos, indicarían que las mismas están asociadas a la replicación del VFA en este órgano. Pudo observarse sintomatología clínica en forma de lesiones pancreáticas, no fue posible detectar una patología a nivel tisular en el resto de los órganos evaluados.

*En resumen:*

*Se determinó que la dosis de  $10^{4.5}$  DICT50/ml de VFA O1 Campos es la necesaria para infectar el 100% de los ratones BALB/c.*

*Se demostró que el VFA O1 Campos en ratones BALB/c no induce infección clínicamente manifiesta ni la muerte de los mismos.*

*El VFA O1 Campos a las 24 hpi se detecta en sangre, bazo, páncreas, hígado y pulmón, también en saliva en un bajo título.*

*El páncreas es el órgano más afectado desde el punto de vista histológico.*

## CAPÍTULO 2:

### PREDICCIÓN DE LA PROTECCIÓN CONTRA VFA O1 CAMPOS

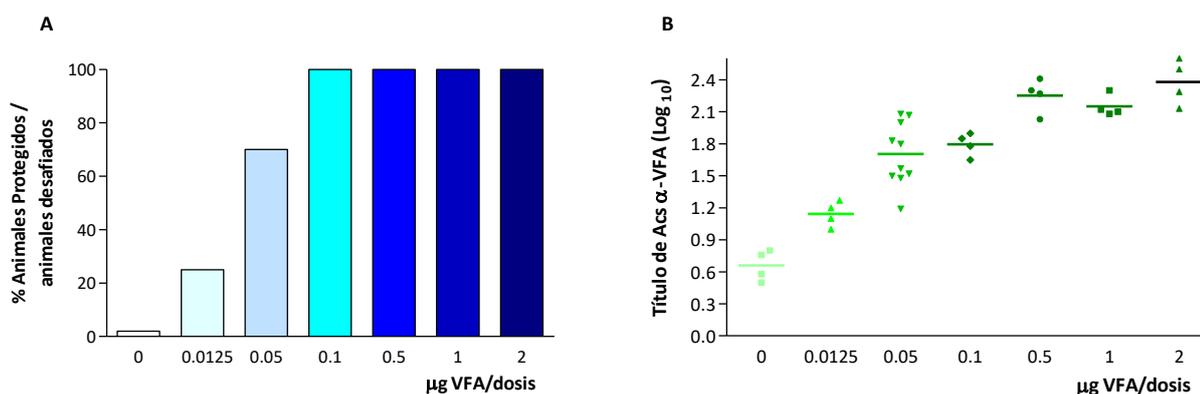
#### Objetivos:

- Determinar la capacidad del modelo murino de predecir la eficacia de las vacunas contra aftosa en cuanto al nivel de Acs y a la protección frente al desafío viral en bovinos.
- Comparar estadísticamente los datos obtenidos en el modelo murino con los obtenidos en el modelo bovino (método gold estándar).

## 2.1. Curva dosis respuesta inducida por vacunas experimentales con diferente masa viral.

Una vez caracterizada la infección con VFA O1 Campos y desarrollado el ELISA FL, se procedió a la evaluación de la capacidad del ratón de generar una respuesta inmune dependiente de la dosis de VFA inactivo incluido en las vacunas.

Se formularon diferentes vacunas monovalentes que contenían: 0,0125; 0,05; 0,1; 0,5; 1 y 2µg/dosis de VFA inactivo serotipo O1 Campos y el adyuvante oleoso utilizado en las vacunas comerciales contra fiebre aftosa. Dichas vacunas se inocularon en ratones BALB/c y a los 21 dpv se procedió a realizar una sangría exploratoria para la evaluación de Acs y posteriormente se realizó el desafío viral de los animales. Se evaluó la viremia 24hs posteriores al desafío (según esquema 3).



**Figura 17: Respuesta protectora y de Acs de los ratones que recibieron vacunas con diferente masa viral** A) Porcentaje animales protegidos luego de la vacunación y el desafío. Cada barra representa el % de ratones protegidos luego de ser vacunados y desafiados a los 21 dpv (número de ratones protegidos/número de ratones desafiados x 100). B) Título de Acs medidos por ELISA FL a los 21 dpv con las diferentes dosis de VFA O1Campos inactivo, formuladas con adyuvante comercial. Cada punto representa el título de Acs de cada animal. Las líneas horizontales muestran la media de cada grupo experimental.

En la figura 17A se observa que solo un 25% de los ratones vacunados con 0,0125 µg/dosis están protegidos frente al desafío con virus activo. La vacuna que contenía 0,05 µg/dosis de antígeno indujo protección en el 70% de los ratones vacunados, mientras que aquellas con dosis de VFA de 0,1µg; 0,5 µg; 1 µg y 2 µg indujeron protección en el 100% de los animales. La vacuna placebo (sin virus, sólo adyuvante) no

protegió frente al desafío. Es decir se observó un efecto dependiente de la dosis de virus inactivo presente en la formulación vacunal en el modelo murino.

Como se observa en la figura 17 B, el nivel de Acs totales inducido por las vacunas es mayor a medida que aumenta la masa viral presente en las vacunas.

*En resumen:*

*En el modelo murino se observó una correlación entre los microgramos de VFA inactivo incluidos en las vacunas y la protección frente al desafío viral, así como también con los niveles de Acs alcanzados en cada uno de los grupos.*

## 2.2 Evaluación de vacunas contra VFA. Acs inducidos en ratón y en bovinos

Nuestra hipótesis de trabajo plantea que el modelo murino puede predecir el comportamiento de las vacunas en bovinos en cuanto a la inducción de protección.

Una vez establecidos los parámetros de desafío y el ELISA FL para el modelo murino, se evaluaron 39 vacunas (comerciales y experimentales de empresas productoras de vacunas contra fiebre aftosa) en este modelo. Todas fueron inoculadas en bovinos y el nivel de Acs de estos animales fue evaluado por ELISA FL. Solo a 16 vacunas se le realizó la prueba PGP.

### **Número total de vacunas evaluadas en ambas especies: 39**

<b>Por metodología</b>	<b>Ratones</b>	<b>Bovinos</b>
Anticuerpos ELISA FL	<b>39</b>	<b>39</b>
Desafío viral	<b>39</b>	<b>16</b>

### 2.3. Asociación entre niveles de Acs contra VFA medidos por ELISA FL en ratones y bovinos.

Se tomó como punto de partida la información de los niveles de Acs (medidos por ELISA FL) inducidos por vacunas comerciales y experimentales (n=39) en bovinos (datos suministrados por SENASA). Posteriormente, como parte de este trabajo de investigación, se inocularon ratones con las mismas vacunas y se evaluó la inmunidad humoral inducida.

La estimación de protección se efectuó a través de los títulos de Acs medidos por ELISA FL en bovinos (60 dpv) y en ratón (21 dpv).

Se consideraron como protectivas, aquellas vacunas que indujeron en los bovinos un título promedio de Acs: 2,11 como indica la reglamentación oficial de SENASA (Resolución 111/2010) (a 60dpv). Se adoptó el mismo punto de corte para los títulos de Acs en ratones.

Se midió la asociación entre resultados superiores a los puntos de corte (en que se pronostica protección) y resultados inferiores a los puntos de corte (en que se pronostica no-protección). La tabla de contingencia obtenida con 30 vacunas arroja los siguientes resultados.

		Acs $\alpha$ VFA Bovinos		
		Protectiva	No protectiva	Total
Acs $\alpha$ VFA	Protectiva	22	0	22
Ratones	No protectiva	3	5	8
	Total	25	5	30

$$\chi^2 = 16,50 \quad p \text{ (Fisher Exact Tests)} = 0,0004$$

**Tabla 5:** Tabla de contingencia que clasifica las vacunas (n=30) como protectivas y no protectivas de acuerdo al título de Acs promedio en ratón a los 21 dpv y en bovino a los 60 dpv (punto de corte: título  $\log_{10} > 2,11$ ). Se calculó el test chi cuadrado y el valor p mediante el test exacto de Fisher para los resultados obtenidos luego de la clasificación de las 30 vacunas.

Más tarde, se incorporaron 9 vacunas, las cuales habían sido evaluadas por la prueba de desafío en ratón y por la prueba PGP en bovinos.

		Acs α VFA Bovinos			
		Protectiva	No protectiva	Total	
Acs α VFA	Protectiva	26	0	26	
Ratones	No protectiva	4	9	13	
		Total	30	9	39
Concordancia 90%					
Kappa 0,75					

$$\chi^2 = 23.4 \quad p(\text{Fisher Exact Tests}) = < 0.0001$$

**Tabla 6:** Tabla de contingencia que clasifica las vacunas (n=39) como protectivas y no protectivas de acuerdo al título de Acs promedio en ratón a los 21 dpv y en bovino a los 60 dpv (punto de corte: título <2,11). Se calculó el test Chi cuadrado y el valor p mediante el test exacto de Fisher para los resultados obtenidos luego de la clasificación de las 39 vacunas.

La predicción sobre estas 9 vacunas arrojadas por la tabla 6, fue confirmada por la prueba de descarga en bovinos (ver anexo 2, figura 40).

Como se observa en la tabla 6, utilizando el mismo valor de corte para los Acs en bovinos y en ratones, la concordancia fue del 90% asociada a un índice Kappa de 0,75 esto indica una concordancia sustancial entre los datos.

En general, las vacunas que indujeron niveles de Acs superiores al punto de corte en bovinos también lo hicieron en el modelo murino.

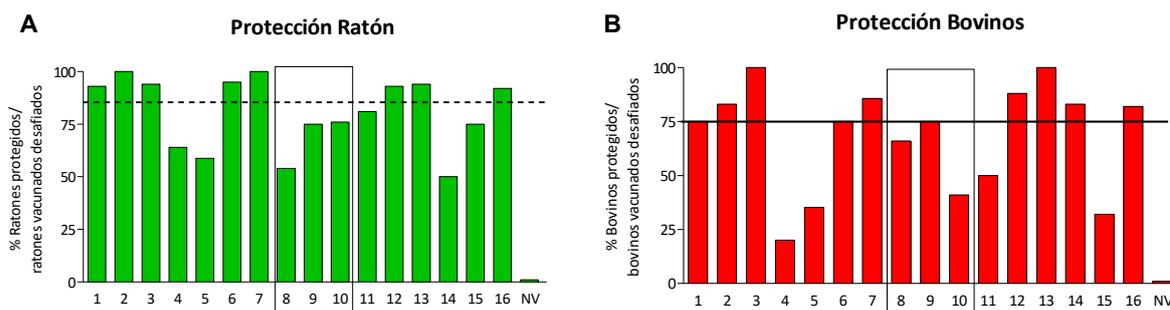
***En resumen:***

*Se encontró una buena asociación entre los niveles de Acs inducidos por vacunas contra fiebre aftosa en bovinos y ratones cuando se compararon los títulos de Acs medidos por ELISA FL de cada grupo vacunal. La concordancia obtenida fue de un 90% asociada a un índice Kappa de 0,75 considerado como una buena concordancia*

#### 2.4. Asociación entre niveles de protección en ratón y bovino.

Como ya se mencionó, de las 39 vacunas evaluadas en bovinos en cuanto al nivel de Acs, solo 16 fueron evaluadas por la prueba de PGP para el serotipo O1 Campos.

Se compararon los porcentajes de protección obtenidos luego de la vacunación, en ratones a los 21 dpv y en bovino a los 90 dpv.



**Figura 18:** A- Porcentaje de ratones vacunados protegidos/desafiados. Protección en ratones medida por la presencia o ausencia de viremia 24 horas después del desafío de los animales a los 21 dpv (16 ratones por vacuna). Todos los controles negativos (no vacunados) no estuvieron protegidos. B- Porcentaje de protección en bovinos determinada por la prueba de Protección a la Generalización Podal (PGP), protección medida como ausencia de lesiones en las patas luego de un desafío por vía intradermolingual (16 bovinos por grupo).

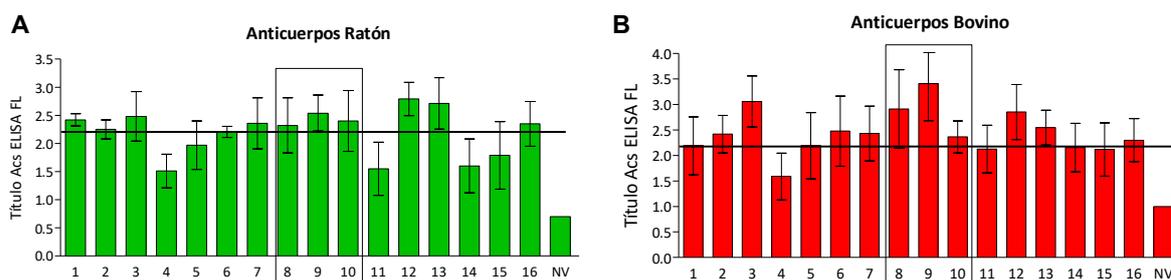
En este trabajo de investigación se estudiaron diferentes niveles de protección de ratones vacunados frente al desafío viral para establecer un sitio de corte que tenga una buena correlación con la prueba de PGP, los cálculos para la obtención del punto de corte óptimo en ratón se encuentran en el Anexo 2. Se concluyó que el punto de corte de 85% en ratón resultó el mejor discriminador entre vacunas inductoras de alta o baja protección.

Como se observa en la figura 18, las vacunas que confirieron protección en bovinos por encima del 75% (nivel requerido por SENASA para aprobar oficialmente vacunas contra VFA) también lo hacen en ratón por encima del 85% a excepción de la vacuna N<sup>ro</sup>.14. Por otro lado, las vacunas N<sup>ro</sup>. 8, 9 y 10 que en bovinos no superaron el límite de

protección requerido para su aprobación, tampoco superaron el 85% de protección en el modelo de ratón

Se comparó además, en estas mismas vacunas, el nivel de Acs anti VFA inducido en ratones a los 21 dpv y bovinos a los 60 dpv.

### Nivel de Acs inducidos



**Figura 19:** Promedio de los títulos de Acs (log10) anti VFA O1 Campos medidos por ELISA FL de ratones (A) y bovinos (B) inducidos por vacunas contra VFA. Cada barra representa la media de los títulos de Acs de 16 animales a los 21 y 60 dpv (ratones y bovinos respectivamente) con sus correspondientes DS.

Como se observa en la figura 19, los niveles de Acs inducidos por las vacunas tanto en ratones como en bovinos mostraron un perfil similar. Sorprendentemente las vacunas 8, 9 y 10 indujeron altos niveles de Acs en ambas especies.

A partir de la aplicación simultánea del criterio de categorización en bovinos y ratones, se generaron tablas de contingencia, para evaluar la concordancia entre ambos criterios.

El nivel de concordancia fue evaluado mediante el índice Kappa, acompañado de su SE asintótico, el valor-p unilateral y el intervalo de confianza del 95 % (Altman, 1991).

## 2.5. Clasificación de las vacunas según protección en ratón y en bovino

En el modelo de ratón se consideró que una vacuna era inductora de buena protección si el 85% o más de los animales vacunados estaban protegidos frente al desafío viral. En el bovino se utilizó el punto de corte oficial en Argentina para la evaluación de la eficacia (75%).

		PGP		
		Protectiva	No protectiva	Total
Desafío Ratón	Protectiva	6	0	6
	No protectiva	2	8	10
	Total	8	8	16
		Concordancia 88%		
		Kappa 0,75		

$\chi^2$ : 9.6    p (Fisher exact test): 0,0070

**Tabla 7:** Tabla de contingencia que clasifica las vacunas (n=16) como protectivas y no protectivas de acuerdo al resultado obtenido por la prueba de desafío en ratón a los 21 dpv y al resultado obtenido por la prueba PGP en bovinos a los 90 dpv (puntos de corte 85% y 75% de protección, respectivamente). Se calculó el test Chi cuadrado y el valor p mediante el test exacto de Fisher para los resultados obtenidos luego de la clasificación de las 16 vacunas.

La tabla 7 muestra la concordancia entre la eficacia de las vacunas evaluada en ambas especies. La cual fue buena, de 88% asociada a un índice Kappa de 0,75 considerada una concordancia sustancial.

Se encontraron dos vacunas en las que no hubo concordancia entre la eficacia en ratón y en bovino. Estos resultados falsos negativos del modelo podrían minimizarse aumentando el número de muestras. Sin embargo ninguna vacuna que no haya sido eficaz en bovinos lo fue para el ratón, es decir, no se encontraron resultados falsos positivos.

### *En resumen:*

*Se encontró una buena correlación en ambas especies al comparar los porcentajes de protección inducido por las mismas vacunas en bovinos y ratones. La concordancia en cuanto a la eficacia de las vacunas en bovinos y ratones fue de un 88% asociada a un índice Kappa de 0,75 considerado como concordancia sustancial.*

A pesar de la buena concordancia entre ambas especies en cuanto a protección y a título de Acs, en algunos casos no se encontró asociación entre estos dos parámetros (Acs y protección) dentro de la misma especie. Esto se observó en ratones donde la sensibilidad y la especificidad del ELISA FL con respecto a la protección no fueron óptimas (0,6 y 0,7 respectivamente). Por este motivo, se planteó la posibilidad de evaluar otros parámetros inmunológicos que podrían ser capaces de intervenir en la protección además de los niveles de Acs medidos por ELISA FL.

En sueros, se evaluaron parámetros como: Isotipos y Avidéz, también se analizaron los niveles de IgA en saliva y el IFN $\gamma$  secretado por los esplenocitos de los ratones vacunados que según la bibliografía estarían relacionados con la protección (Lavoria y col., 2012; Perez Filgueira y col., 1995; Romanutti y col., 2013; Cubillos y col., 2008; Parida y col., 2008).

Principalmente se buscaron mediciones en las que no se requiriese el uso de virus activo para realizar los ensayos en el modelo de ratón y realizar una correlación entre la protección real y la predicha por el modelo.

Por otro lado, como se mencionó anteriormente, ya que la eficacia de las vacunas en ambas especies tiene una buena concordancia, el modelo de predicción de protección podrá ser comparado con la protección conferida por la prueba de potencia PGP.

## CAPÍTULO 3: NUEVOS PARÁMETROS PARA EL AJUSTE DE LA PREDICCIÓN

### Objetivos:

- Evaluar otros parámetros inmunológicos (Isotipos de las inmunoglobulinas, Avidéz de los Acs, niveles de IgA en saliva, secreción de IFN $\gamma$  por células del sistema inmune en el modelo de ratón para mejorar la predicción de la protección inducida por las vacunas.
- Desarrollar un test para la detección de avidéz de los sueros de ratones contra VFA O1 Campos.

Como se describió en el capítulo 2, el modelo de ratón en la mayoría de los casos es capaz de predecir la eficacia de las vacunas en bovinos. Las vacunas se comportaron de un modo similar en cuanto al nivel de Acs y en cuanto a la protección. Sin embargo, se observó que algunas vacunas inducen títulos de Acs que superan el punto de corte establecido como protectorio para bovino (2.11) y no confieren la protección esperada frente al desafío viral.

#### Otros parámetros para predecir la protección inducida por vacunas contra aftosa

A pesar de que la protección contra el virus ha estado comúnmente relacionada con el nivel de Acs en la circulación sanguínea, y que existe una correlación estadísticamente significativa que ha demostrado el nivel de Acs en bovinos con el ensayo de protección “in vivo” (Maradei y col., 2008), hay algunos ejemplos de vacunas en las que esta correlación no se produce: animales que pueden estar protegidos con bajos niveles de Acs seroneutralizantes (SN) (Sobrino F. y col., 2001, Quattrocchi y col., 2014), y viceversa. Se procedió entonces, como ya se mencionó, a la medición de otros parámetros que según la bibliografía podrían estar relacionados con la protección en las especies blanco (Lavoria y col., 2012; Perez Filgueira y col., 1995; Romanutti y col., 2013; Cubillos y col., 2008; Parida y col., 2008).

Para esto se utilizaron 25 de las 39 vacunas mencionadas anteriormente y se siguió el siguiente diseño experimental.



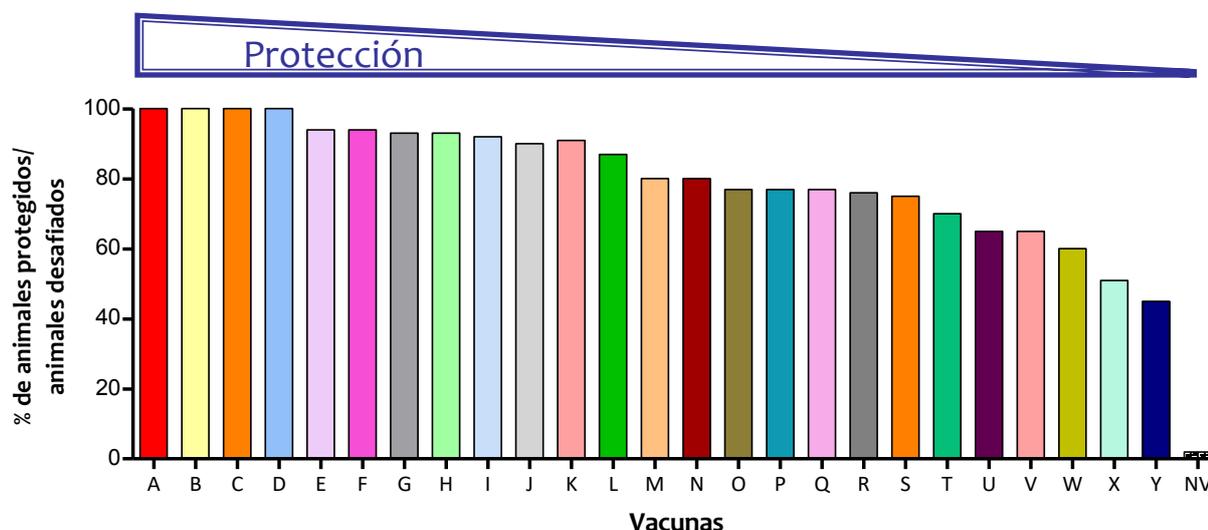
Número total de vacunas evaluadas en ambas especies: 39		
Por metodología	Ratones	Bovinos
Anticuerpos ELISA FL	39 (25+16)	39
Desafío viral	39 (25+16)	16
Anticuerpos ELISA IgG1	25	
Anticuerpos ELISA IgG2a	12	
Anticuerpos ELISA IgG2b	25	
Anticuerpos ELISA IgG3	12	
ELISA Avidéz	25	
Anticuerpos ELISA IgA	25	
ELISA IFN $\gamma$	18	

**Esquema 4:** Número de vacunas evaluadas con la metodología correspondiente

### 3.1. Estudio de la protección inducida por la vacunación en ratones.

Se utilizaron un total de 25 vacunas (A a Y). Los ratones se vacunaron y a los 21 días se tomaron muestras de sangre y se desafiaron.

La protección frente al desafío de los ratones que recibieron cada una de estas vacunas fue evaluada y se obtuvieron los siguientes resultados.

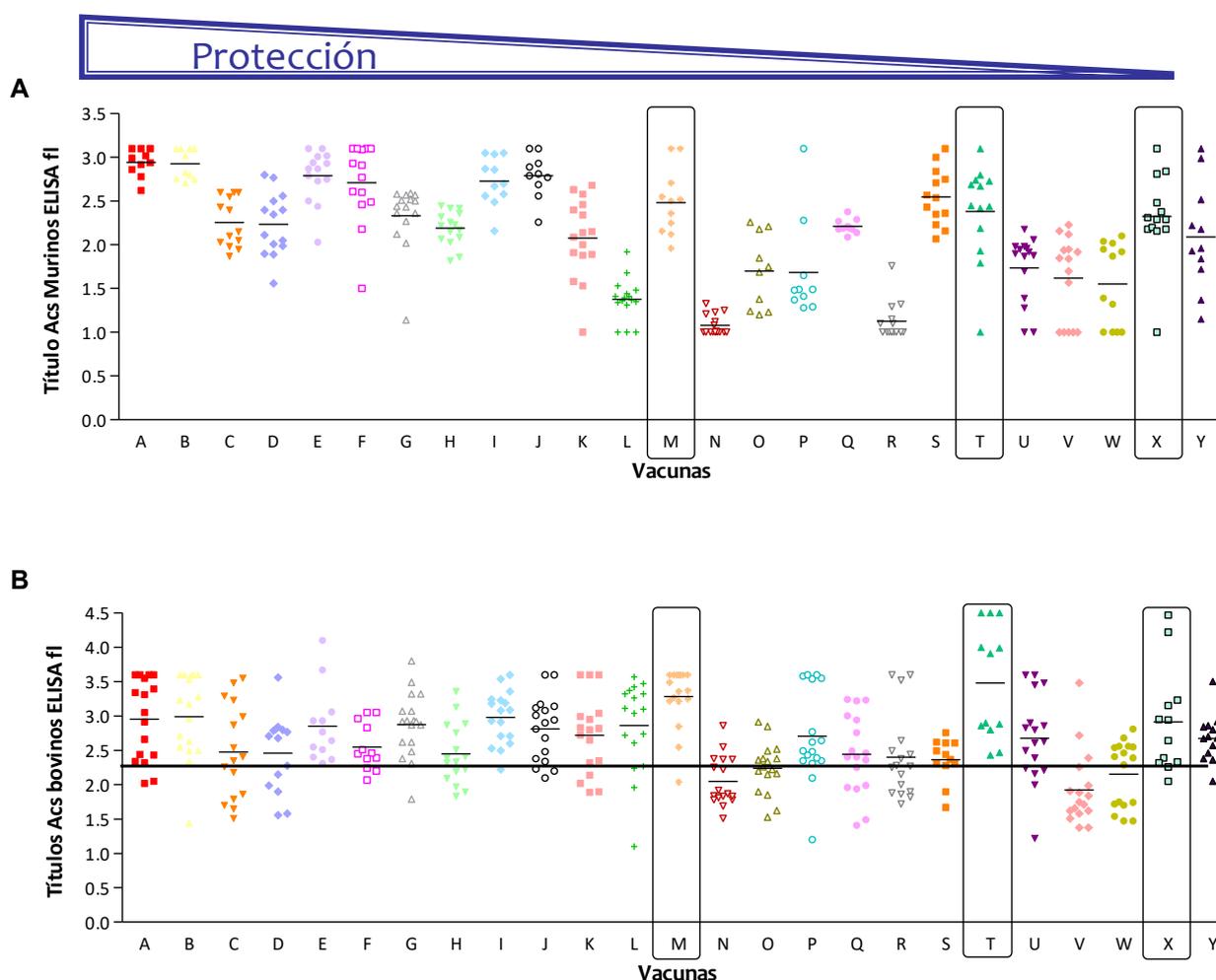


**Figura 20:** Protección inducida por las diferentes vacunas: Ratones BALB/c inoculados con diferentes vacunas (n=10-16 por vacuna) a los 21 dpv fueron desafiados por inoculación de VFA O1C infeccioso por vía i.p. A las 24 hpd los animales fueron sangrados a blanco y se evaluó la presencia de viremia mediante siembra de la sangre sobre células BHK. Se consideraron protegidos aquellos animales a los que no se les detectó virus en sangre luego de un pasaje ciego. En el eje Y se muestra el % de animales protegidos/desafiados.

### 3.2. Estudio de la respuesta inmune humoral inducida por la vacunación

Como se mencionó anteriormente, los Acs tienen un papel central en el control de la infección por VFA, tanto en el modelo murino (Borca y col., 1986) como en los hospedadores naturales (Bautista y col., 2003). Por esto los sueros de los ratones vacunados a los 21 dpv fueron evaluados utilizando ELISA FL desarrollado en nuestro laboratorio (figura 21 A). En la figura 20B se muestran los Acs inducidos en bovinos (medidos por ELISA FL) por las mismas vacunas.

#### 3.2.1. Acs totales evaluados por el ELISA FL en los sueros de ratones (21 dpv) y en bovinos (60dpv)



**Figura 21:** Título de Acs (log<sub>10</sub>) totales contra VFA medidos por ELISA FL inducidos en ratones BALB/c (A) y en bovinos (B) luego de la vacunación (n=10 a 16). Se muestran los títulos de Acs obtenidos para cada suero a los 21 dpv y a los 60 dpv respectivamente. La línea representa la media de los títulos de Acs de cada grupo. La línea representa el sitio de corte establecido por SENASA para aprobar las vacunas contra VFA en bovinos.

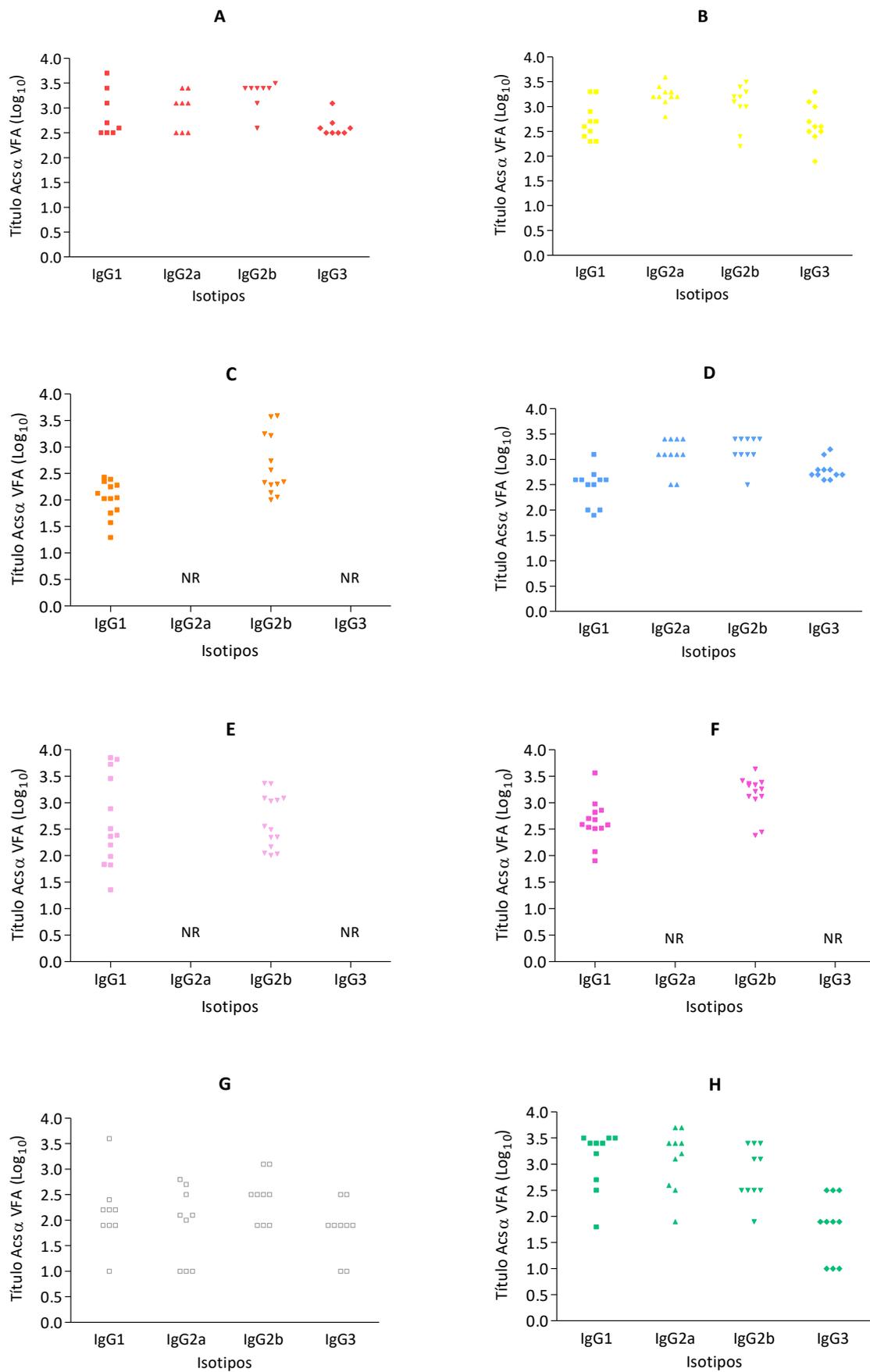
Como se observa en la figura 21 (A y B), en general, las vacunas que indujeron mayor protección en ratones, presentaron niveles de Acs superiores al punto de corte, mientras que las que no indujeron buena protección presentaron menores niveles de Acs. Sin embargo, se presentaron algunas excepciones (como las vacunas M, T y X) en las que los niveles de Acs fueron superiores al punto de corte y el porcentaje de animales protegidos tanto en ratones como en bovinos resulto bajo (% bovinos protegidos/desafiados fue de 65% y 50% para las vacunas T y X) y en el caso de la vacuna M estuvo al límite de la aprobación para bovinos pero con una EPP mayor al 90% y sin embargo en el modelo murino no llegó al punto de corte establecido para su aprobación.

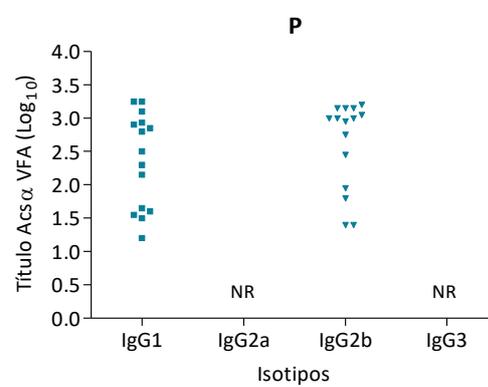
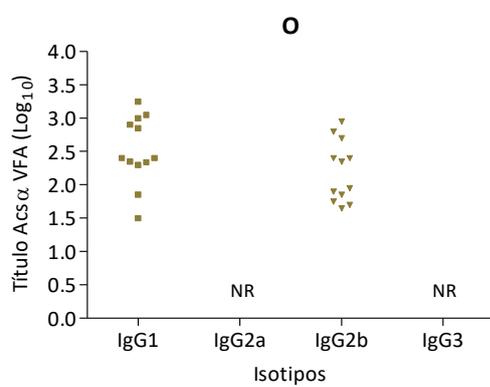
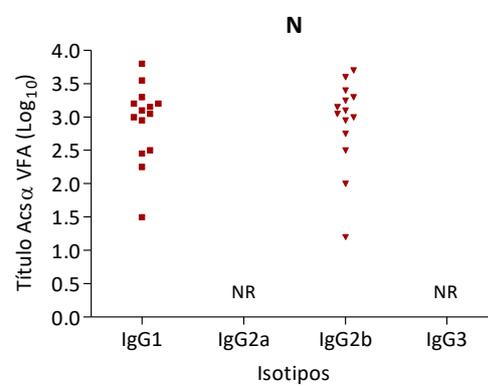
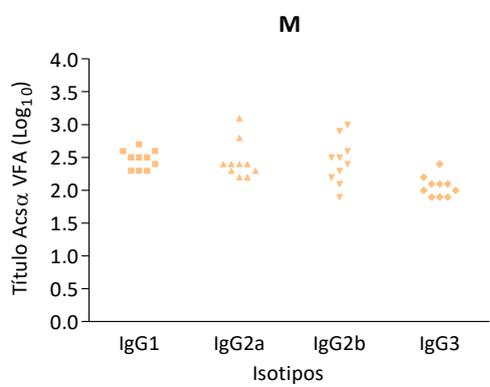
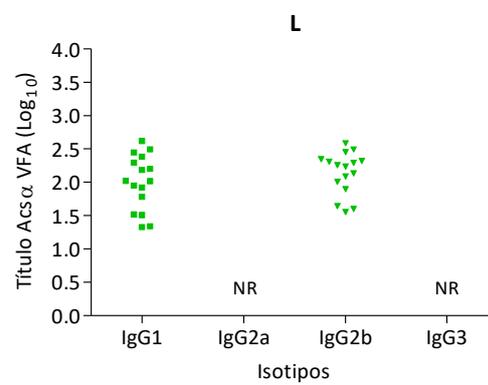
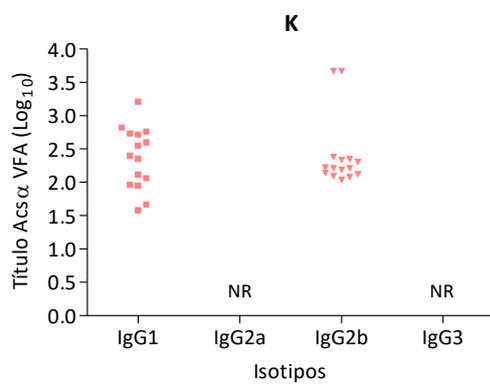
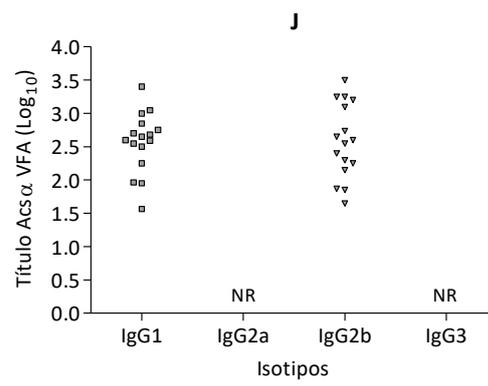
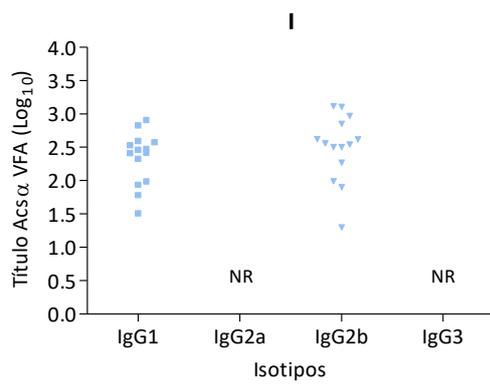
### 3.2.2. Detección de Isotipos anti-VFA.

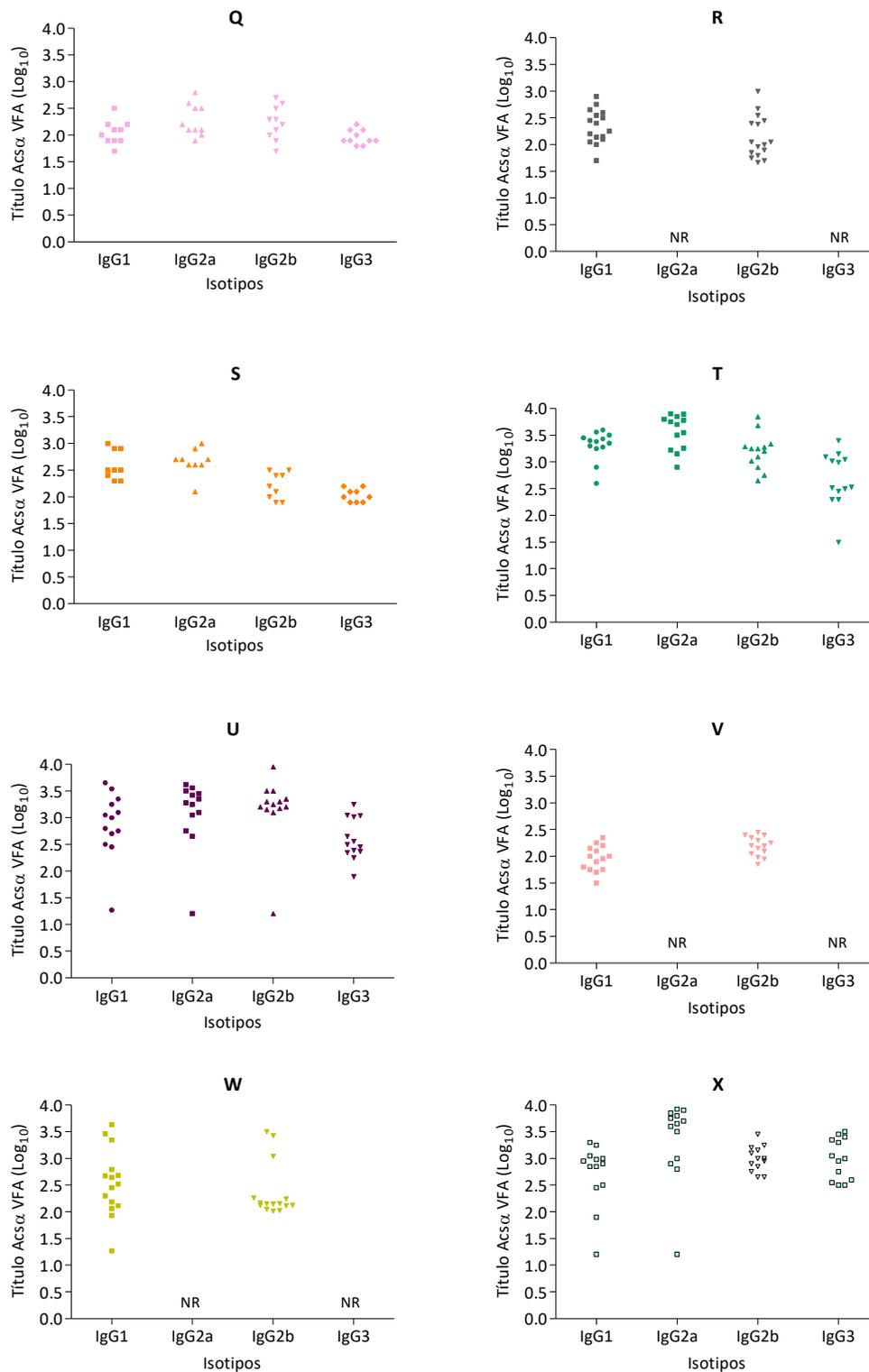
Existen evidencias sobre la importancia de los Acs para la neutralización del virus, así como también para la opsonización por parte de los Acs en la protección contra VFA (McCullough y col. 1986). En vacunas de emergencia contra fiebre aftosa, se demostró en ratones y en bovinos que la respuesta protectora inducida por la vacunación a corto plazo es independiente de la capacidad del suero de neutralizar los viriones (Quattrocchi y col., 2011; Quattrocchi V. y col., 2014;). Este mismo fenómeno ha sido observado con vacunas de rápida acción en cerdos (Salt J. S. y col., 1998; Barnett P. V. y col., 2002) y en bovinos (Doel T. R. y col., 1994; Golde W. T. y col., 2005).

Se sabe que los complejos antígeno-anticuerpo, son captados por los fagocitos que poseen receptores para Fc $\gamma$ I y que se une con mayor eficiencia a los isotipos IgG1 e IgG3 aunque en ratones, el receptor de Fc $\gamma$ I se une a IgG2a e IgG2b (Abbas y col., 2012). Se ha descrito también que tanto en bovinos como en ratones existe una inducción diferencial de los isotipos en los animales que están protegidos frente al VFA respecto a los que no lo están (Lavoria y col., 2012; Perez Filgueira y col., 1995).

Se decidió entonces evaluar si las vacunas recientemente mencionadas (de A a X) inducían diferencias en el tipo de inmunoglobulinas específicas contra el virus en ratón, para ello se detectaron en el suero de los animales vacunados los isotipos, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, contra VFA mediante un ELISA captura desarrollado en nuestro laboratorio (Quattrocchi y col., 2011) (Figura 21).







**Figura 22:** Nivel de Isotipos contra VFA O1 Campos IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 inducidos luego de la inmunización con las distintas vacunas en ratones BALB/c. Cada gráfico representa a las vacunas (A a X). Los títulos de Acs de cada Isotipo se calcularon como el  $\text{Log}_{10}$  de la mayor dilución del suero que supera el sitio de corte, calculado como la media de la D.O. de los sueros provenientes de animales no vacunados (negativos) más dos desvíos estándar. Los puntos representan el título de Acs anti VFA para cada isotipo de cada animal por grupo. NR: No realizado.

Luego de evaluar los isotipos inducidos por cada una de las vacunas, se analizaron las relaciones entre ellos. Con el fin de analizar la presencia de asociaciones entre los isotipos, se utilizó una tabla de doble entrada en la cual se clasificaron por un lado, los ratones protegidos y no protegidos, y por otro lado, la relación de los isotipos mayor o menor a 1.

Se realizaron las combinaciones de isotipos: IgG1; IgG2a; IgG2b; e IgG3.

		Relación	
		Menor a 1	Mayor a 1
Relación IgG2a/IgG1	Protegidos	43	104
	No protegidos	26	44
Relación IgG2b/IgG1	Protegidos	40	104
	No protegidos	65	8
Relación IgG3/IgG1	Protegidos	70	78
	No protegidos	55	14

**Tabla 8:** Tabla de doble entrada que muestra las relaciones entre los niveles de isotipos anti VFA (títulos) en sueros de ratones vacunados. Los ratones se clasificaron como protegidos y no protegidos frente al desafío viral en base a los resultados obtenidos luego de la vacunación y desafío (es decir según presencia o no de virus en sangre luego del desafío). Las relaciones de isotipos como mayor o menor a uno.

En la tabla 8 se muestran las relaciones de isotipos en 12 vacunas del total de 25, y se observó que la relación IgG2b/IgG1 fue la que mejor discriminó entre animales protegidos y no protegidos. Mediante la evaluación de la fracción atribuible se pudo calcular que si la relación entre los títulos de Acs (IgG2b/IgG1) era superior a 1, el ratón tenía un 90% de probabilidad de estar protegido.

Habiendo llegado a estos resultados, se decidió calcular la relación IgG2b/IgG1 en las 25 vacunas de A a Y, obteniendo una tabla con proporciones similares.

	Relación IgG2b/IgG1	
	Menor a 1	Mayor a 1
Protegidos	62	192
No protegidos	50	10

**Tabla 9:** En la tabla se muestra la relación de los títulos de IgG2b e IgG1 mayor y menor a 1 para los ratones que estuvieron protegidos y para los que no lo estuvieron.

### 3.2.3. Evaluación de los Índices de Avidéz de los sueros contra VFA.

Como se mencionó en introducción, la avidéz es un concepto importante a tener en cuenta cuando se estudia la interacción antígeno-anticuerpo de moléculas polivalentes, ya que agrupa la fuerza de interacción de todos los ligandos, en contraposición al concepto de afinidad, que considera la fuerza de unión para una interacción única, epítoto-paratoto. La Avidéz da una medida de la fuerza total del complejo de anticuerpo-antígeno y depende principalmente de la afinidad del anticuerpo con el epítoto, de la valencia tanto del anticuerpo como de la disposición estructural de las partes que interactúan. En el caso de vacunas contra el VFA, este parámetro también ha sido relacionado a la protección en bovinos (Lavoria y col., 2012; Sciciuna y col., 2001; McCullough y col., 1992).

### 3.2.4. Desarrollo del test de Avidéz para sueros de ratones que recibieron vacuna contra VFA.

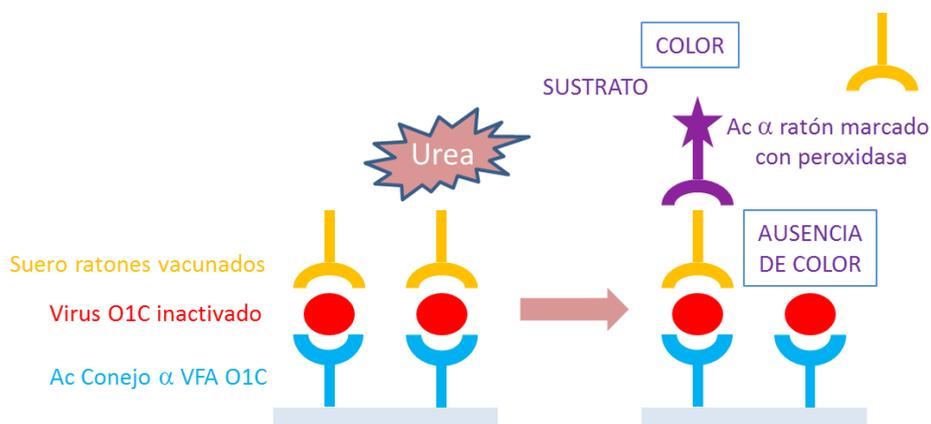
En este trabajo de investigación se desarrolló un ELISA para la medición del Índice de avidéz de los sueros provenientes de ratones que recibieron vacuna contra fiebre aftosa.

La técnica se basó en el ELISA de isotipos desarrollado en nuestro laboratorio, con adaptaciones del ELISA de avidéz publicado por Romanutti y col., 2013.

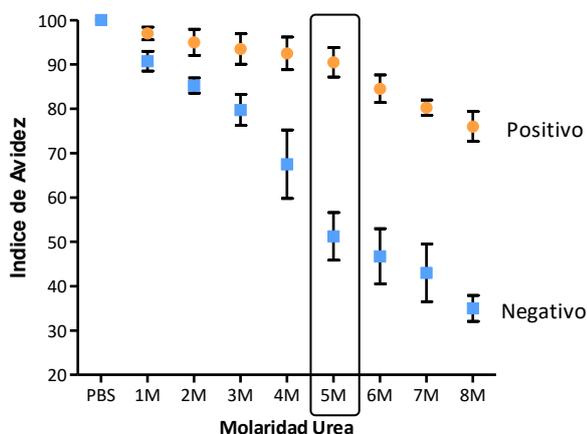
Se utilizó como anticuerpo captura, suero proveniente de conejo inmunizado con VFA purificado en dilución óptima para la sensibilización de la placa. Los sueros control positivos y negativos se obtuvieron a partir de pooles de sueros de ratones vacunados (21 dpv) evaluados previamente por seroneutralización y protección. Los sueros negativos seleccionados provenían de animales vacunados que no presentaban protección frente al desafío viral.

Este test utiliza Urea para separar las inmunoglobulinas de baja avidéz; para ello se realizó una curva con diferentes concentraciones de la misma para seleccionar la molaridad capaz de diferenciar mejor los sueros controles positivos de negativos. Posteriormente se incubó con anti inmunoglobulina de ratón conjugado con peroxidasa y se agregó el sustrato y el cromógeno (ver Mat. y Met.).

A partir de las densidades ópticas obtenidas luego de agregar cada una de las concentraciones de Urea, se procedió al cálculo del Índice de Aidez:  $IA = \frac{DO \text{ pocillo tratado (Urea)}}{DO \text{ pocillo sin tratar (PBS)}} \times 100$  y se obtuvieron los siguientes resultados.



**Esquema 5:** ELISA Aidez. Interpretación del resultado y componentes.



**Figura 23:** Índice de aizidez obtenido con los sueros de ratón control positivo (n=4) y negativo (n=4) con las diferentes concentraciones de Urea. Los puntos corresponden a la media y sus correspondientes DS.

La figura 23 muestra que a partir de la concentración de Urea 3M los controles positivo y negativo comienzan a distinguirse, sin embargo cuando se utiliza Urea 5M se observa diferencias entre los controles, sin comprometer el alto índice de aizidez del control positivo. Por lo tanto, fue utilizada en el resto de los ensayos. Con

concentraciones mayores de Urea, hay diferencias entre los controles, pero el control positivo baja su índice de avidéz.

En base a los resultados obtenidos se decidió utilizar Urea 5M en todos los ensayos de avidéz.

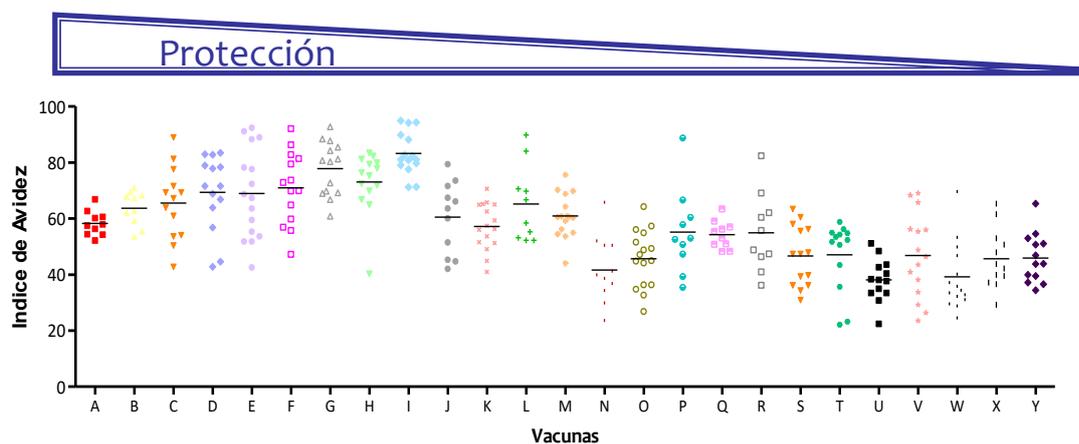
Se evaluó además la repetibilidad de los controles en un total de 16 ensayos.

Ensayo	Control +	Control -
1	91	43
2	90	46
3	94	50
4	94	49
5	88	44
6	88	46
7	89	49
8	87	47
9	86	51
10	89	51
11	87	47
12	86	44
13	87	48
14	88	47
15	86	48
16	90	48
Media	89	47
DS	2,45141	2,3616725
CV	2,761847	4,9969798

**Tabla 10:** Índice de avidéz de los controles positivo y negativo en 16 ensayos realizados en un período de 6 meses. Se realizó el cálculo de la media, el DS y el coeficiente de variación (CV) para ambos controles.

Como se observa en la tabla 10, el índice de avidéz de los controles no presenta variaciones significativas en los diferentes ensayos.

Posteriormente, los sueros de los animales vacunados con la serie de 25 vacunas se analizaron mediante el ELISA de Avidéz para sueros de ratón.



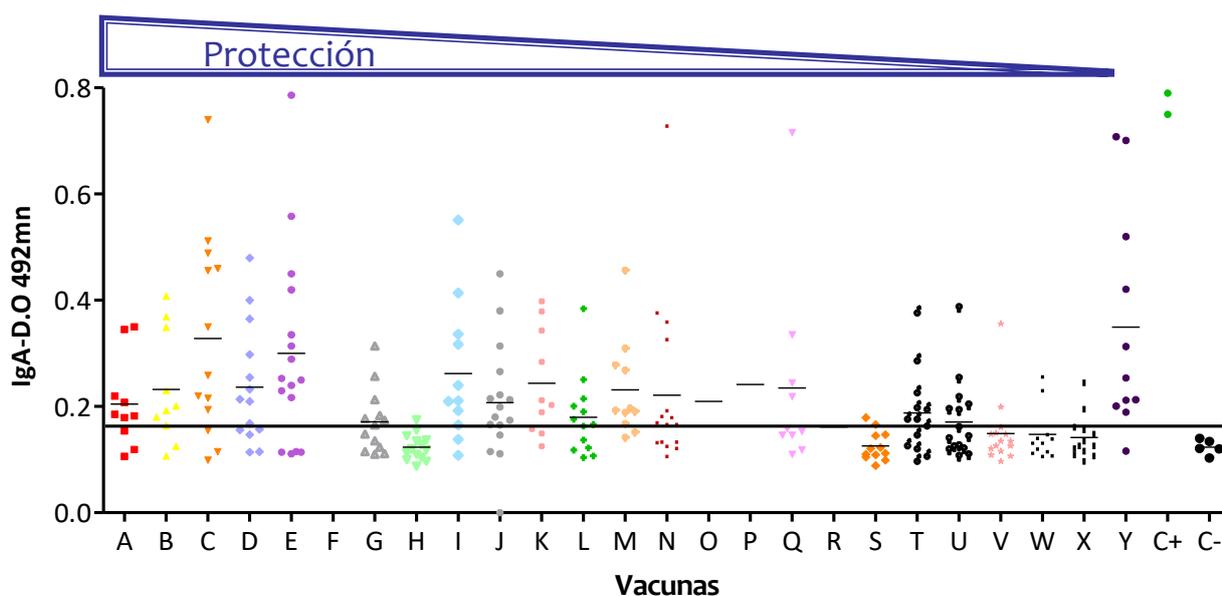
**Figura 24:** Las vacunas fueron ordenadas de acuerdo al porcentaje de animales protegidos en cada vacuna. El índice de avidéz se calculó como: la DO del pocillo tratado con urea/DO del pocillo sin tratar (PBS) x 100. Los tratamientos con Urea se realizaron posterior a la incubación de los sueros, en una concentración 5M.

Se observó una tendencia en las vacunas que indujeron mayor protección, presentaron por lo general índices de avidéz más altos (de A a L) o en algunos casos, se encontraron vacunas con la media del índice de avidéz relativamente alta pero con una gran dispersión de los datos que presentaban baja protección al desafío viral.

### 3.2.5. Niveles de IgA anti-VFA en saliva.

El virus ingresa al hospedador natural a través de la mucosa nasal, por vía aerógena, siendo esta su ruta de infección natural. Se han propuesto varios mecanismos diferentes, no excluyentes entre sí para explicar la producción de Acs secretores después de la administración parenteral del antígeno, incluyendo la difusión directa de antígenos solubles o la activación de las células presentadoras de antígenos en nódulos linfáticos (Bouvet y col., 2002). Está descrito en cerdos (Cubillos y col., 2008) que los niveles de IgA en mucosas estarían relacionados con la protección aún cuando la vía de administración utilizada en esos experimentos es parenteral.

Se estudió entonces en ratones a los 21 dpv la respuesta de Acs IgA específica para VFA en muestras de saliva de los ratones que recibieron las vacunas.



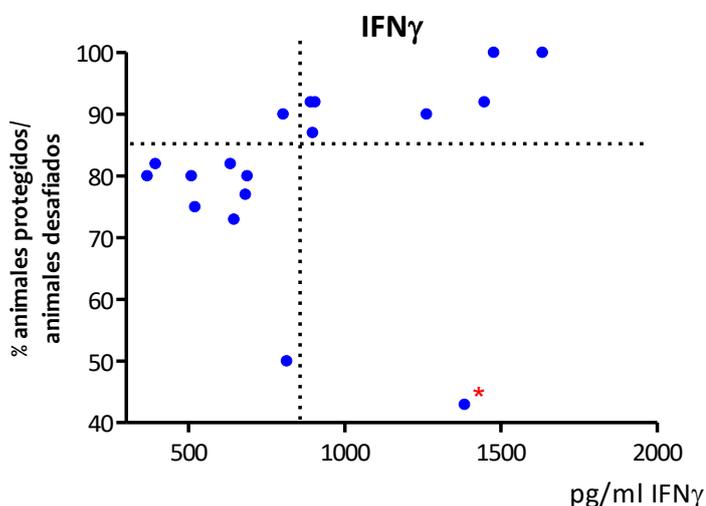
**Figura 25:** Niveles de IgA en saliva medidos por ELISA específico anti VFA. A los 21 dpv. Control negativo: ratones no vacunados. El sitio de corte se calculó como la media +2 SD de la DO de los controles negativos.

Como se observa en la figura 25, la mayoría de los animales que recibieron vacunas comerciales presentaron resultados positivos para IgA, no así en el grupo control negativo. No se observó una asociación positiva entre animales con mayores niveles de IgA en saliva y la protección frente al desafío viral.

### 3.2.6. Evaluación del IFN $\gamma$ inducido por las vacunas contra aftosa.

Con el fin de dilucidar los mecanismos inmunes a nivel celular, responsables de la protección observada, y sabiendo que la vía de inoculación i.p. es una vía sistémica, se decidió también evaluar el IFN $\gamma$  secretado por las células del sistema inmune presentes en el bazo. Para ello se extrajeron los esplenocitos a los 21 dpv, se incubaron “in vitro” con VFA inactivo durante 72 hs y los sobrenadantes de cultivo se ensayaron utilizando un test de ELISA captura.

En la figura 26 se resumen los resultados obtenidos en cuanto al promedio de IFN $\gamma$  secretado por cada una de las vacunas.



**Figura 26:** IFN $\gamma$  secretado “in vitro” por esplenocitos estimulados con VFA inactivo proveniente de ratones (n=8/grupo) que recibieron vacunas comerciales. Los puntos representan la concentración promedio de IFN $\gamma$  en el sobrenadante de los esplenocitos de los ratones que recibieron cada vacuna. (\*) Discordancia entre protección y nivel de IFN $\gamma$ . Las concentraciones se expresan en pg/ml y fueron calculadas por interpolación de la DO en una curva DO vs concentración realizada con citoquinas recombinantes de concentración conocida.

Se pudo observar en bazo (figura 26), que los esplenocitos provenientes de los ratones vacunados con vacunas comerciales y re-estimulados “in vitro” con VFA inactivo presentaron asociación positiva entre animales con mayores niveles de IFN $\gamma$  y la protección frente al desafío viral a excepción de una vacuna (señalada con asterisco) que indujo 40% de protección y altos niveles de IFN $\gamma$ .

### 3.3. Incorporación de los parámetros evaluados en un estudio estadístico.

El objetivo de todas estas mediciones (determinación de Acs totales contra VFA, isotipos: IgG1, IgG2b, IgA anti VFA; secreción de IFN $\gamma$ ), fue predecir la probabilidad de protección de los ratones vacunados frente al desafío viral.

Frente a este objetivo, se planteó el diseño de un modelo que incluya un subconjunto óptimo de variables explicativas. A pesar de que hay evidencias de que la seroneutralización tiene estrecha correlación con la protección, no se la incluyó en el modelo ya que el objetivo era encontrar una asociación con variables que no presenten la necesidad de utilizar el virus infeccioso debido a los riesgos de escape viral y por otro lado se requieren instalaciones costosas y de alta complejidad para su manejo.

Se partió de una base de datos que contenía las posibles variables predictoras de protección como el título de Acs en ELISA FL, el título de IgG2b, e IgG1, la relación entre ambos isotipos, el índice de avidéz de los Acs y los títulos de IgA (todas variables continuas) y la respuesta de Protección o No protección (variable dicotómica), de los animales que recibieron las 25 vacunas inoculadas en ratones (n=10-16).

Se trabajó con un total de 309 ratones de los cuales 250 estuvieron protegidos y 59 no protegidos.

Variable	Ratones protegidos n= 250		Ratones no Protegidos n= 59	
	Media (SD)	Mediana (Mín-Máx)	Media (SD)	Mediana (Mín-Máx)
Título de Acs FL anti-VFA	<b>2.15</b> (0.61)	<b>2.23</b> (1.00-3.10)	<b>1.76</b> (0.60)	<b>1.87</b> (1.00-3.00)
Título de IgG2b anti-VFA	<b>2.46</b> (0.61)	<b>2.35</b> (1.00-3.95)	<b>2.28</b> (0.68)	<b>2.10</b> (1.20-3.65)
Título de IgG1 anti-VFA	<b>2.38</b> (0.64)	<b>2.31</b> (1.00-4.81)	<b>2.46</b> (0.72)	<b>2.35</b> (1.20-3.80)
Relación IgG2b/IgG1	<b>1.04</b> (0.27)	<b>1.05</b> (0.40-2.34)	<b>0.95</b> (0.28)	<b>0.89</b> (0.42-2.46)
Índice Avidéz anti-VFA	<b>58.49</b> (15.82)	<b>57.02</b> (22.19-94.94)	<b>44.34</b> (11.87)	<b>43.87</b> (23.22-79.89)
DO IgA anti-VFA	<b>0.21</b> (0.13)	<b>0.17</b> (0.00-0.79)	<b>0.19</b> (0.12)	<b>0.16</b> (0.09-0.71)

**Tabla 11:** Análisis estadístico descriptivo para todas las variables analizadas teniendo en cuenta los resultados de protección de cada ratón, independientemente de la vacuna con la que fue inmunizado.

### Construcción del modelo de predicción de protección

Para la construcción del modelo de predicción de protección en ratones se empleó la técnica de regresión logística. Siguiendo la metodología recomendada por Hosmer y Lemeshow (1989), en una primera etapa se analizaron las regresiones simples para cada variable predictora, seleccionando aquellas variables asociadas a valores  $p$  menores a 0.25 para incorporarlas en un modelo múltiple.

#### 3.3.1. Análisis logístico simple.

Variable	Odds ratio (95% I de C)	Valor p
Título de Acs FL anti-VFA	2.77 (1.72-4.44)	< 0.0001
Título de IgG2b anti-VFA	1.60 (1.00-2.56)	0.0515
Título de IgG1 anti-VFA	0.84 (0.55-1.30)	0.4340
Relación IgG2b/IgG1	3.90 (1.21-12.57)	0.0225
Índice Avidéz anti-VFA	1.07 (1.05-1.10)	< 0.0001
DO IgA anti-VFA	8.90 (0.54-147.13)	0.1267

**Tabla 12:** Análisis logístico simple para todas las variables analizadas teniendo en cuenta los resultados de protección de cada ratón, independientemente de la vacuna con la que fue inmunizado.

Las variables significativas en el análisis logístico simple fueron: Acs en ELISA FL, IgG2b, Relación IgG2b/IgG1, Índice de Avidéz e IgA. La variable IgG1 no fue altamente significativa por lo que no se tuvo en cuenta para realizar el análisis múltiple.

Se analizaron tres modelos múltiples.

### 3.3.2. Análisis logístico múltiple

Modelo 1: incluyendo las variables con valores-p menores a 0.25 en el análisis simple

Variable	Odds ratio (95% I de C)	Valor p
Título de Acs FL anti-VFA	2.13 (1.27-3.59)	0.0043
Título de IgG2b anti-VFA	1.48 (0.86-2.53)	0.1572
Relación IgG2b/IgG1	5.79 (1.33-25.19)	0.0191
Índice Avidéz anti-VFA	1.07 (1.05-1.10)	< 0.0001
DO IgA anti-VFA	2.79 (0.15-53.37)	0.4948

#### Medidas de ajuste del modelo

Criterio de Akaike (AIC) = 248.01

Área bajo la curva ROC = 0.80

**Tabla 13:** Análisis logístico múltiple para todas las variables que obtuvieron un valor  $p > 0,25$  en el análisis logístico simple (Título de Acs ELISA FL, Título de Acs IgG2b, Relación Acs IgG2b/IgG1, Índice Avidéz y DO Acs IgA). Las medidas de ajuste del modelo calculadas fueron: el Criterio de Akaike y el área bajo la curva (ROC).

Las variables IgA e IgG2b no resultaron significativas en el modelo. En el siguiente análisis se excluyó IgA y se mantuvo a la variable IgG2b.

Modelo 2: excluyendo la variable IgA

Variable	Odds ratio (95% I de C)	Valor p
Título de Acs FL anti-VFA	2.11 (1.27-3.53)	0.0041
Título de IgG2b anti-VFA	1.46 (0.86-2.48)	0.1652
Relación IgG2b/IgG1	5.59 (1.31-23.77)	0.0198
Índice Avidéz anti-VFA	1.08 (1.05-1.10)	< 0.0001

#### Medidas de ajuste del modelo

Criterio de Akaike (AIC) = 248.17

Área bajo la curva ROC = 0.80

**Tabla 14:** Análisis logístico múltiple para todas las variables que obtuvieron un valor  $p > 0,05$  en el análisis logístico múltiple n° 1 (Excluyendo variable DO Acs IgA). Las medidas de ajuste del modelo calculadas fueron: el Criterio de Akaike y el área bajo la curva (ROC).

Al excluir la variable IgA del modelo logístico múltiple, la variable IgG2b tampoco resultó significativa. En el siguiente análisis también se excluyó a esta última.

Modelo 3: excluyendo la variable IgA e IgG2b

Variable	Odds ratio (95% I de C)	Valor p
Título de Acs FL anti-VFA	2.28 (1.37-3.78)	0.0015
Relación IgG2b/IgG1	6.95 (1.68-28.70)	0.0074
Índice Avidéz anti-VFA	1.07 (1.05-1.10)	< 0.0001

**Medidas de ajuste del modelo**

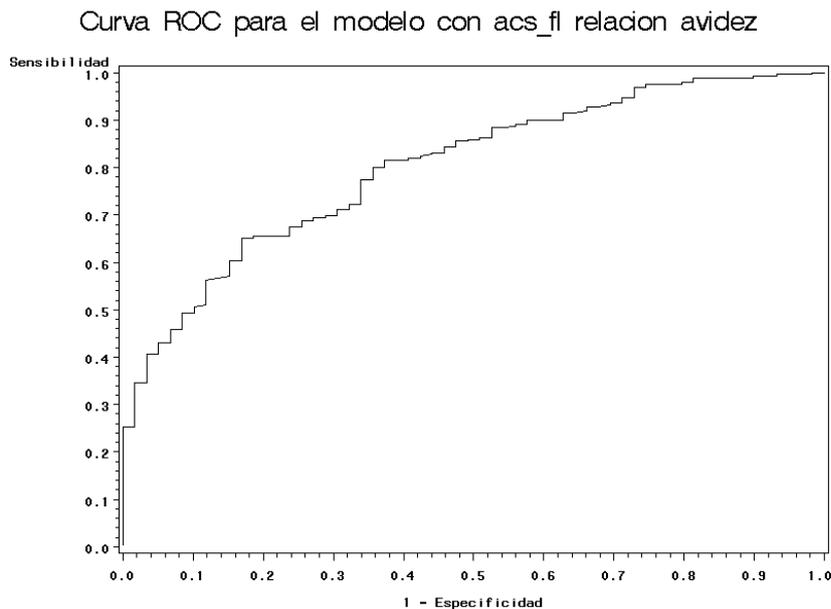
Criterio de Akaike (AIC) = 248.14

Área bajo la curva ROC = 0.80

**Tabla 15:** Análisis logístico múltiple para todas las variables que obtuvieron un valor  $p > 0,05$  en el análisis logístico múltiple n° 2 (Excluyendo variable DO Acs IgA, y Título Acs IgG2b). Las medidas de ajuste del modelo calculadas fueron: el Criterio de Akaike y el área bajo la curva (ROC).

Los modelos planteados tienen valores similares de AIC y del área bajo la curva ROC, siendo el último (Modelo 3) el más parsimonioso por lo que es el recomendado para efectuar la predicción.

Para la selección del modelo se consideró el criterio de Akaike (el menor AIC) y el área bajo la curva ROC (ABC-ROC) que grafica la probabilidad de detectar un verdadero evento (sensibilidad) y un falso evento (1-especificidad) para un rango completo de posibles puntos de corte.



**Figura 27:** El área bajo la curva va de cero a uno, y provee una medida de la habilidad del modelo para discriminar entre aquellos animales que tienen el evento de interés o cumplen una condición versus aquellos que no la cumplen.

### 3.3.3. Modelo logístico óptimo de predicción de Protección

$$\hat{\pi} = \frac{\exp(-5.64 + 0.82Acs\_FL + 1.94IgG2b/IgG1 + 0.07AVIDEZ)}{1 + \exp(-5.64 + 0.82Acs\_FL + 1.94IgG2b/IgG1 + 0.07AVIDEZ)}$$

#### Medidas de Ajuste del modelo

Criterio de Akaike (AIC) = 248.14

Área bajo la curva ROC = 0.80

#### Prueba de Bondad de ajuste del modelo de Hosmer-Lemeshow

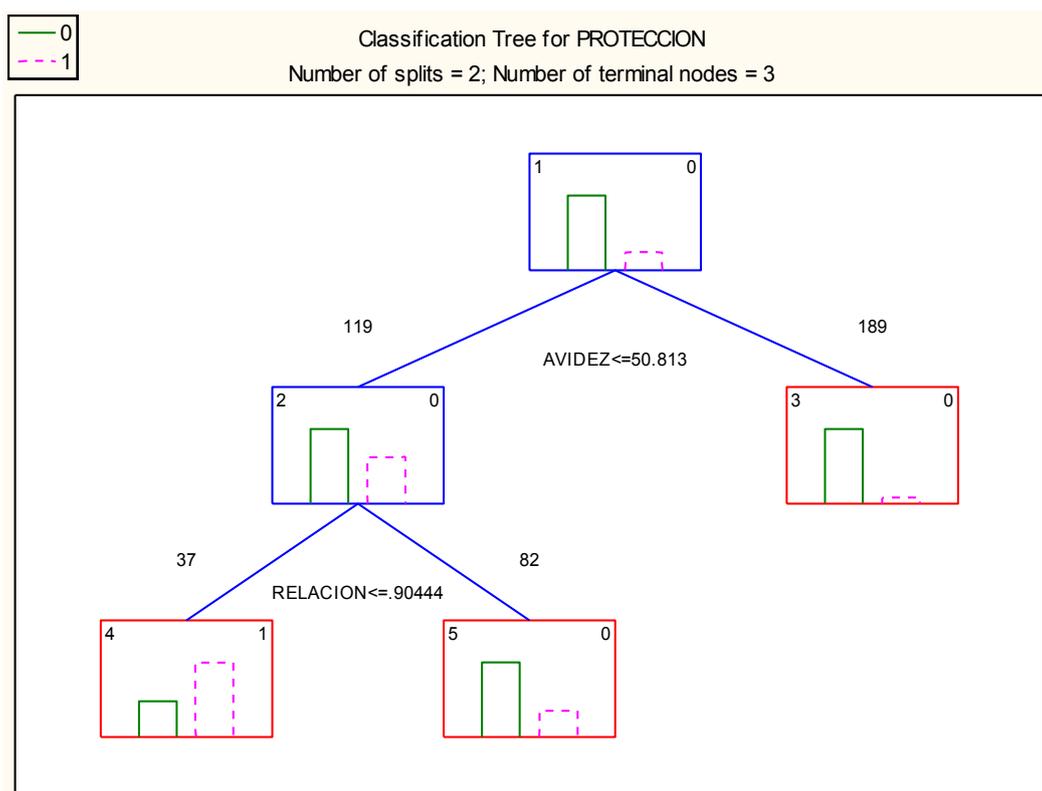
Chi-cuadrado= 2.21 valor-p = 0.9741

El valor p alto, mayor a 0.05 indica que los datos se ajustan al modelo.

La bondad del ajuste del modelo fue probada mediante la prueba de Hosmer-Lemeshow (Hosmer y Lemeshow, 1989; Agresti, 1996). En esta prueba, los datos son agrupados en clases con aproximadamente el mismo número de casos por clase de acuerdo a las probabilidades estimadas.

También se realizó la técnica de árboles de clasificación, para encontrar puntos de corte para las variables predictoras, de esta manera transformarlas a dicotómicas y analizar un nuevo modelo de predicción.

### 3.3.4. Puntos de corte de las variables predictoras según Árboles de Clasificación.



**Figura 28:** Puntos de corte de las variables predictoras para la clasificación de protección.

En una primera etapa, los animales con AVIDEZ mayor o igual a 50.8 (aproximadamente 51) son clasificados como Protegidos. De los que tienen un registro inferior a ese valor pero un valor de la relación IgG2b/IgG1 mayor a 0.90 también son clasificados como Protegidos.

En base a estos resultados, las variables AVIDEZ y RELACION IgG2b/IgG1 fueron transformadas a binarias, mientras que la variable Acs FL se mantuvo como continua, de modo que AVIDEZ >51 corresponde al valor 1 en la nueva escala. Del mismo modo, RELACIÓN IgG2b/IgG1 >0.90 corresponde al valor 1 en la escala binaria.

Con esta nueva definición de las variables se ajustó un nuevo modelo de regresión logística.

### 3.3.5. Modelo con las variables AVIDEZ y RELACION transformadas a binarias.

Variable	Odds ratio (95% I de C)	Valor p
Título Acs ELISA FL	2.35 (1.37-4.03)	0.0019
Relación IgG2b/IgG1	4.32 (2.15-8.68)	< 0.0001
Índice Avidez	9.16 (4.39-19.14)	< 0.0001

**Tabla 16:** Análisis logístico múltiple para las variables Acs ELISA FL, Relación IgG2b/IgG1 y Avidez transformadas a binarias. Las medidas de ajuste del modelo calculadas fueron: el Criterio de Akaike y el área bajo la curva (ROC).

Las variables fueron nuevamente significativas y el modelo logístico óptimo de predicción de protección fue el siguiente.

$$\pi = \frac{\exp(-2.12 + 0.85Acs\_FL + 1.46 CLASH\_IgG2b/IgG1 + 2.22 CLASE\_AVIDEZ)}{1 + \exp(-2.12 + 0.85Acs\_FL + 1.46 CLASE\_IgG2b/IgG1 + 2.22 CLASE\_AVIDEZ)}$$

#### Medidas de ajuste del modelo

Criterio de Akaike (AIC) = 302.9

Área bajo la curva ROC = 0.83

#### Prueba de Bondad de ajuste del modelo de Hosmer-Lemeshow

Chi-cuadrado= 9.40 valor-p = 0.3100

De la misma manera que con el modelo anterior, el valor  $p$  alto, indica que los datos también se ajustan al modelo. Sin embargo, a pesar de esto, no fue capaz de mejorar el nivel de predicción.

Como esta transformación binaria involucra un paso más en la evaluación, se decidió plantear el modelo con las variables continuas.

### *En resumen*

*En el análisis de los modelos de predicción considerando cada variable predictora por separado, las variables: Acs FL, Relación entre isotipos (IgG2b/IgG1) y Avidez fueron identificadas como buenas predictoras de la protección.*

*Las variables IgG2b e IgA presentaron valores  $p$  asociados a las pruebas de significación menores a 0.25 por lo que se las incluyó en el modelo de regresión logística múltiple. Asimismo, se descartó en esta etapa a la variable IgG1 como predictora.*

*El modelo de predicción de protección final óptimo incluyó a las variables Acs FL, Relación entre isotipos y Avidez. Este modelo presentó buena capacidad predictora y buen ajuste a los datos.*

*El modelo de predicción replanteado a partir de la transformación de algunas variables a escala binaria también presentó una buena capacidad predictora y buen ajuste a los datos.*

### 3.4. Concordancia entre la protección predicha y la protección real en el ratón.

Con estos resultados, y establecido el modelo más parsimonioso y de mejor ajuste, se introdujeron los datos individuales de los ratones vacunados en el modelo.

#### Ejemplos de aplicación de la fórmula para diferentes vacunas.

Se calculó el porcentaje de protección estimado por el modelo mediante la aplicación de la fórmula para dos vacunas cuyo nivel de protección real (por desafío era conocido).

**Vacuna comercial aplicada en campaña anti aftosa (Protectiva):** Se aplicó la fórmula a cada uno de los animales vacunados, por ejemplo animal N°1. Con los valores de Título de Acs, Relación de Isotipos e Índice de Avidez.

$$\text{Protección Ratón 1: } \hat{\pi} = \frac{\exp(-5.64 + 0.82 * 2.47 + 1.94 * 1.033 + 0.07 * 55.34)}{1 + \exp(-5.64 + 0.82 * 2.47 + 1.94 * 1.033 + 0.07 * 55.34)}$$

La siguiente tabla muestra los porcentajes de protección de cada uno de los animales (del 1 al 16) calculados con el modelo para la vacuna de la campaña (Vac 620/12) que tuvo alto porcentaje de protección por las pruebas de PGP y desafío en bovinos y en ratones respectivamente (100%).

Raton	% Proteccion según modelo
1	90,59%
2	90,75%
3	98,24%
4	78,75%
5	98,10%
6	98,00%
7	96,51%
8	98,12%
9	86,85%
10	92,38%
11	95,14%
12	78,14%
13	99,45%
14	92,17%
15	83,38%
16	95,55%
Promedio	92,00%

**Vacuna V (no protectiva, PGP 40%):** Se aplicó la fórmula a cada uno de los animales vacunados, por ejemplo al animal N°1 con los valores de Título de Acs, Relación de Isotipos e Índice de Avidez.

Protección Ratón 1: 
$$\hat{\pi} = \frac{\exp(-5.64 + 0.82 * 2.12 + 1.94 * 1.10 + 0.07 * 30)}{1 + \exp(-5.64 + 0.82 * 2.12 + 1.94 * 1.10 + 0.07 * 30)}$$

La siguiente tabla muestra los porcentajes de protección de cada uno de los animales calculados con el modelo. Esta tuvo un bajo porcentaje de protección para la prueba de desafío murino (66%) y la PGP en bovinos fue de 40%.

Raton	% Proteccion según modelo
1	58,72%
2	85,62%
3	91,87%
4	56,40%
5	48,14%
6	60,14%
7	52,24%
8	65,35%
9	54,63%
10	32,44%
11	87,68%
12	36,42%
13	78,95%
14	46,19%
15	83,38%
Promedio	62,00%

Como se observa la vacuna V utilizando los parámetros inmunológicos seleccionados para cada animal, dan un resultado muy similar a la protección obtenida luego del desafío.

Luego se procedió a calcular los porcentajes de protección con el modelo para las vacunas evaluadas que tuvieron mala protección y buen nivel de anticuerpos.

**Vacuna X que induce baja protección en bovinos pero cuyo nivel de Acs en bovinos y en ratones (alta EPP):** Se aplicó la fórmula a cada uno de los animales por ejemplo al animal N°1 con los valores de Título de Acs, Relación de Isotipos e Índice de Avidez.

$$\text{Protección Ratón 1: } \hat{\pi} = \frac{\exp(-5.64 + 0.82 * 2.38 + 1.94 * 1.125 + 0.07 * 54,62)}{1 + \exp(-5.64 + 0.82 * 2.38 + 1.94 * 1.125 + 0.07 * 54,62)}$$

La siguiente tabla muestra los porcentajes de protección de cada uno de los animales calculados con el modelo para esta vacuna. Ésta tuvo un bajo porcentaje de protección para la prueba de desafío murino (53%) y para el bovino fue de 60% sin embargo, la EPP para bovinos fue alta (mayor al 90%).

Raton	% Proteccion según modelo
1	91,03%
2	85,73%
3	81,09%
4	82,74%
5	70,65%
6	83,04%
7	93,77%
8	92,72%
9	90,10%
10	69,27%
11	72,11%
12	72,37%
13	80,26%
Promedio	81,91%

Como se observa, la vacuna X utilizando los parámetros inmunológicos seleccionados el modelo arroja que la vacuna V no sería una vacuna que induce buena protección (ya que el porcentaje de protección calculado por el modelo es menor al 85%, lo que coincide con el resultado del desafío murino y con la prueba de PGP).

**Vacuna M que induce protección en bovinos pero induce un nivel de Acs superior por ELISA FL (alta EPP):** Se aplicó la fórmula a cada uno de los animales, por ejemplo al animal N°1 con los valores de Título de Acs, Relación de Isotipos e Índice de Avidéz.

$$\text{Protección Ratón 1: } \hat{\pi} = \frac{\exp(-5.64 + 0.82 * 2.23 + 1.94 * 0.973 + 0.07 * 54.32)}{1 + \exp(-5.64 + 0.82 * 2.23 + 1.94 * 0.973 + 0.07 * 54.32)}$$

La siguiente tabla muestra los porcentajes de protección de cada uno de los animales calculados con el modelo para esta vacuna. Esta tuvo un bajo porcentaje de

protección para la prueba de desafío murino (77%) y para bovinos estuvo al límite de la aprobación (75%), sin embargo, la EPP para bovinos fue superior al 90%.

Raton	% Proteccion según modelo
1	86,77%
2	70,08%
3	92,17%
4	93,22%
5	87,95%
6	62,27%
7	45,15%
8	53,11%
9	86,92%
10	90,76%
11	95,28%
12	85,41%
13	87,88%
Promedio	79,77%

Como se observa, la vacuna M al utilizar los parámetros inmunológicos seleccionados por el modelo, arroja que esta no sería una vacuna que induce buena protección (ya que el porcentaje de protección calculado por el modelo es menor al 85%), lo que coincide con el resultado del desafío murino.

**Vacuna T que induce baja protección en bovinos pero un alto nivel de Acs por ELISA FL (alta EPP):** Se aplicó la fórmula para cada animal, por ejemplo al animal N°1 con los valores de Título de Acs, Relación de Isotipos e Índice de Avidéz.

$$\text{Protección Ratón 1} \quad \hat{\pi} = \frac{\exp(-5.64 + 0.82 * 2.44 + 1.94 * 0.892 + 0.07 * 33.46)}{1 + \exp(-5.64 + 0.82 * 2.44 + 1.94 * 0.892 + 0.07 * 33.46)}$$

La siguiente tabla muestra los porcentajes de protección de cada uno de los animales calculados con el modelo para esta vacuna. Esta tuvo un bajo porcentaje de protección para la prueba de desafío murino (77%) y para bovino (PGP 65%) sin embargo, la EPP para ratones y para bovinos fue alta (mayor al 85%).

<b>Raton</b>	<b>% Proteccion según modelo</b>
1	60,68%
2	70,75%
3	84,25%
4	80,68%
5	70,68%
6	84,46%
7	75,72%
8	84,01%
9	55,19%
10	59,11%
11	60,81%
12	84,77%
13	97,83%
Promedio	74,53%

Como se observa, la vacuna T al utilizar los parámetros inmunológicos seleccionados por el modelo, arroja que esta no sería una vacuna que induce buena protección (ya que el porcentaje de protección calculado por el modelo es menor al 85%), lo que coincide con el resultado del desafío murino y con la prueba de PGP.

Se puede observar, que el modelo murino es capaz de detectar y predecir con mayor eficiencia el porcentaje de protección de vacunas en las que la EPP y la PGP no tienen buena correlación.

De este mismo modo, se realizó el cálculo para todas las vacunas. En un primer lugar, para cada uno de los ratones que pertenecían a los diferentes grupos vacunales. Los resultados individuales se promediaron y se realizó el análisis de correlación entre el porcentaje de protección real en el ratón (desafío viral), y el porcentaje de protección estimado por el modelo para cada vacuna. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla de contingencia.

		Desafío Ratón		
		Protectiva	No protectiva	Total
Estimado Ratón	Protectiva	14	0	14
	No protectiva	2	13	15
	Total	16	13	29
		Concordancia 93%		
		Kappa 0,86		

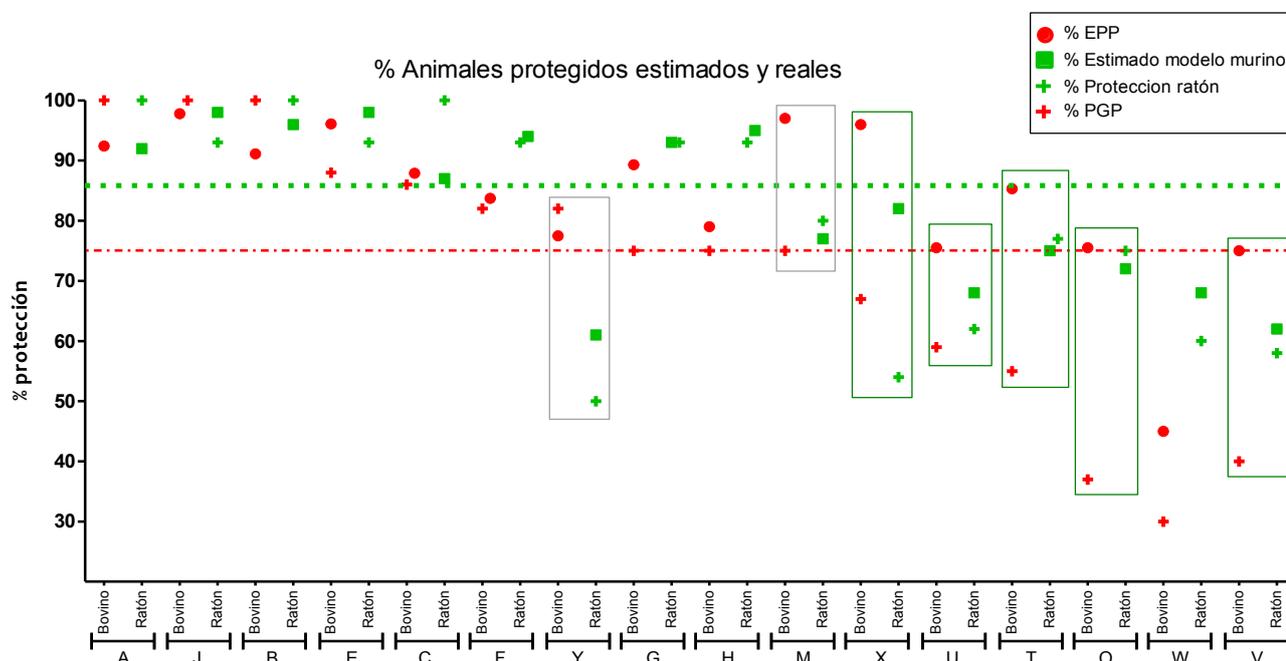
**Tabla 17:** Tabla de contingencia que clasifica las vacunas (n=29) como protectivas y no protectivas de acuerdo al resultado obtenido por la prueba de desafío en ratón a los 21 dpv y al resultado obtenido por la aplicación del modelo logístico (punto de corte 85%). Se calculó el test chi cuadrado ( $\chi^2$ : 21.99) y el valor p mediante el test exacto de Fisher (<0.0001) para los resultados obtenidos luego de la clasificación de las 29 vacunas.

La concordancia obtenida fue del 93% asociado a un índice Kappa de 0,86. Cabe destacar que el valor de Kappa obtenido es considerado como una concordancia casi perfecta.

### 3.5. Concordancia entre la protección predicha por el modelo y la protección real obtenida en bovinos

A partir de estos resultados se sometieron a evaluación los datos de predicción de protección en el modelo murino con los datos experimentales de protección en el bovino.

Debido a que la concordancia entre la protección experimental en el ratón y el modelo es muy alta, deberían obtenerse resultados similares a los mostrados anteriormente cuando se compararon las protecciones experimentales en cada una de las especies.



**Figura 29:** Porcentajes de animales protegidos. Comparación de las protecciones experimentales en bovinos (prueba PGP) y las estimadas por la EPP (según niveles de Acs por ELISA FL) y las protecciones en ratón (por desafío viral) y las estimadas por el modelo predictivo óptimo presentado. Las líneas de puntos verdes y rojos indican los niveles de corte para la clasificación de vacunas aprobadas en ratones y bovinos respectivamente.

Este análisis se realizó para un total de 16 vacunas ya que se contaban solo con los datos completos.

		PPG		
		Protectiva	No protectiva	Total
Estimado Ratón	Protectiva	8	0	8
	No protectiva	2	6	8
Total		10	6	16

Concordancia 88%  
Kappa 0,75

**Tabla 18:** Tabla de contingencia que clasifica las vacunas (n=16) como protectivas y no protectivas de acuerdo al resultado obtenido por la prueba PGP en bovinos a los 90 dpv y al resultado obtenido por la estimación de la protección por el modelo logístico en ratón a los 21 dpv (puntos de corte 75% y 85 % de protección respectivamente). Se calculó el test Chi cuadrado ( $X^2$ : 7.4) y el valor p mediante el test exacto de Fisher (0.01) para los resultados obtenidos luego de la clasificación de las 16 vacunas.

Los resultados obtenidos demuestran que el modelo de ratón es capaz de predecir efectivamente la protección obtenida con la prueba de PGP. No existen resultados falsos positivos, y los resultados falsos negativos podrían minimizarse evaluando un número mayor de vacunas. El índice Kappa obtenido es de 0,75 indicando una buena concordancia

#### *En resumen*

*En el análisis de concordancia de la protección estimada por el modelo y la real en ratones, el valor del índice Kappa fue de 0,86, indicando una muy buena concordancia entre lo predicho y lo observado.*

*En el análisis de concordancia de la protección experimental en ratones (desafío) y experimental en bovinos (PGP), el mayor valor del índice Kappa 0.75 se obtuvo para el punto de corte del 85% en ratones.*

*Se obtuvieron valores similares de índice Kappa (0.75) al considerar las protecciones estimadas en ratones. Esta coincidencia se explica porque la predicción cuantitativa según el modelo presentó una alta concordancia con los valores experimentales.*

## CAPÍTULO 4:

# VFA A2001: ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS Y CARACTERIZACIÓN DE LA INFECCIÓN

### Objetivos:

- Desarrollar un ELISA Fase Líquida para la detección de Acs contra VFA A2001 en ratones.
- Caracterizar la infección con VFA A2001 en el ratón BALB/c.
- Estandarizar las pruebas de desafío viral en el modelo

#### 4.1. Desarrollo de un ELISA FL para la evaluación de los Acs contra VFA serotipo A2001 en ratones

Con el objeto de evaluar el nivel de Acs contra VFA en los sueros de ratones que recibieron vacunas contra el serotipo A2001, se desarrolló en nuestro laboratorio un ELISA FL siguiendo el mismo esquema que el realizado para el desarrollo del ELISA contra VFA O1 Campos (Anexo 2).

##### 4.1.1. Ensayo de estandarización del método.

##### Chequeo de sueros y comparación con ELISA de referencia

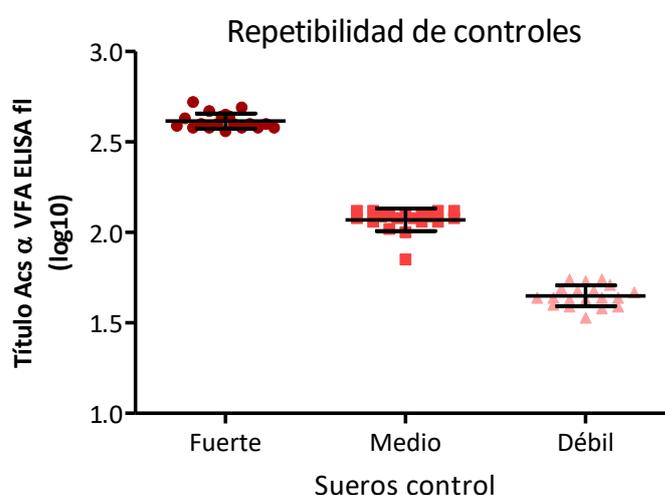
Suero Bovino Nº	Test	
	Referencia	INTA
684	3,03	3,03
685	2,25	2,14
686	2,17	2,47
687	3,6	3,8
688	3,2	2,67
689	2,3	2,13
690	2,81	2,6
691	2,51	2,29
692	1,9	1,88
693	3,6	3,8
694	2,65	2,23
695	3,6	3,59
696	2,69	2,5
697	3,31	3,04
698	1,83	1,84
699	3,29	2,94
700	2,42	2,29
183	0,9	1,34
346	0,9	1
51	1,59	1,67
52	3,6	3,66
53	2,33	2,25
54	2,41	2,37
55	2,03	2,01
56	2,09	2,04
57	3,33	3,1
58	1,97	1,92
59	2,29	2,46
60	2,23	2,12

**Tabla 19:** En la tabla se muestran los títulos Acs medidos por ELISA FL desarrollado en Instituto de Ciencias y Tecnología “Dr. Cesar Milstein” (referencia) y utilizando el ELISA FL desarrollado en este trabajo de investigación.

Al chequear sueros bovinos mediante el ELISA FL desarrollado para la detección de Acs contra VFA A2001 y al compararlos con los resultados obtenidos por el test de referencia realizado por el Instituto de Ciencias y Tecnología “Dr. Cesar Milstein”, se encontró una correlación entre los valores medidos de un 96% aplicando un test de diferencias apareadas y se calculó además la correlación lineal de Spearman

#### Estudio de la variación en la medición de sueros controles

Se realizaron 24 repeticiones del ELISA FL para los controles débil, medio y fuerte.



**Figura 30:** Media y DS del título de Acs anti VFA por ELISA FL de los sueros control fuerte, medio y débil obtenido en 24 ensayos.

En la figura 30 se observa la repetibilidad de los resultados obtenidos al medir el nivel de los Acs contra VFA A2001 en los sueros control fuerte, medio y débil. El coeficiente de variación observado es muy bajo (<5%).

La repetibilidad interplaca fue chequeada también en sueros de referencia.

Medidas descriptivas de la evaluación de anticuerpos para los sueros de referencia											
Suero N°	Ensayo	Título	Media (SD)	Suero N°	Ensayo	Media (DS)	Min-Máx	Suero N°	Ensayo	Media (DS)	Min-Máx
51	1	1.38	1.37(0.02)	55	1	1.86	1.9(0.06)	59	1	2	2.09(0.08)
	2	1.38			2	1.85			2	2.09	
	3	1.33			3	1.99			3	2.20	
	4	1.37			4	1.89			4	2.07	
52	1	3.56	3.44(0.12)	56	1	1.87	1.77(0.10)	60	1	1.79	1.84(0.06)
	2	3.28			2	1.65			2	1.78	
	3	3.42			3	1.73			3	1.87	
	4	3.48			4	1.82			4	1.91	
53	1	2.13	2.02(0.10)	57	1	3.14	2.97(0.15)	SNB	1	<1	<1
	2	2.0			2	3.02			2	<1	
	3	1.89			3	2.78			3	<1	
	4	2.05			4	2.93			4	<1	
54	1	1.95	2.00(0.07)	58	1	1.51	1.5(0.05)				
	2	1.94			2	1.52					
	3	2.05			3	1.43					
	4	2.07			4	1.54					

**Tabla 20:** Títulos de Acs (medidos por ELISA FL) para sueros de referencia. Se realizaron 4 ensayos para cada suero, se calculó el promedio y el DS para cada uno.

En la tabla se observa que la variación del título de Acs para sueros de bovinos inoculados con vacunas experimentales también es mínima entre las repeticiones de cada suero.

**En resumen:**

*Los niveles de Acs medidos utilizando el ELISA FL desarrollado en el laboratorio presentan una repetibilidad aceptable, ya que el porcentaje de variación relativo está por debajo del 10% recomendado por la OIE. Por lo tanto, la técnica puede ser empleada para evaluar la respuesta humoral inducida en ratones por vacunas contra aftosa.*

#### 4.2. Estandarización del modelo murino

Una vez desarrollado el modelo murino para la evaluación de vacunas contra el serotipo O1 Campos, y como los resultados fueron alentadores, se comenzó la caracterización de la infección del serotipo A2001, otro de los serotipos presentes en la vacuna que se comercializa actualmente y protagonista del brote de Aftosa en Argentina en el año 2001.

Se realizó la comparación de la titulación con ratones lactantes y la titulación utilizando células susceptibles al VFA (BHK21).

<b>Titulación VFA A2001</b>	
BHK 21	Ratón Lactante
$10^7$	$10^{7,7}$

**Tabla 21:** Título de VFA A2001 obtenido luego de la titulación en monocapa de BHK21 y en ratones lactantes calculado por Red y Muench.

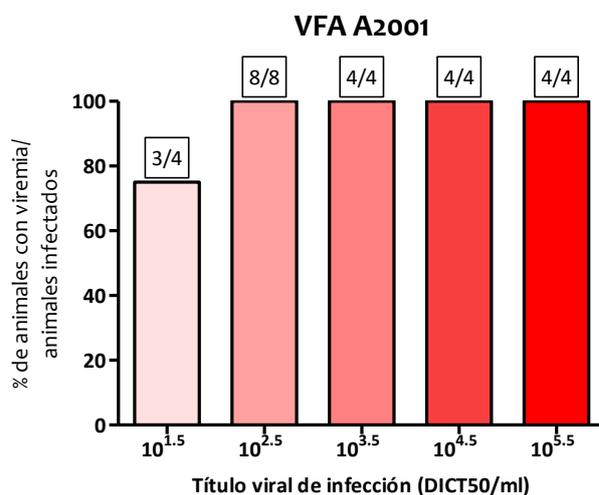
La diferencia en los títulos obtenidos con las dos metodologías para VFA A2001 fue similar y por lo tanto, se decidió utilizar en este trabajo de investigación la titulación en monocapa de BHK21 por las ventajas mencionadas anteriormente (capítulo 1). Debido a las modificaciones realizadas se procedió a la estandarización del modelo murino.

#### 4.3. Caracterización de la infección por VFA serotipo A2001 en ratones BALB/c

Como ha sido descripto anteriormente, la progresión de la enfermedad y la capacidad del virus de generar una sintomatología depende de 3 factores, la vía de inoculación utilizada para la infección, la cepa de ratón utilizada y el serotipo de virus utilizado para la infección (Salguero y col., 2005). Se ha descripto además que el serotipo A (A22 y A2001) genera sintomatología y produce la muerte de ratones de la cepa C57 (Salguero y col., 2005; García Nuñez y col., 2010)

En este trabajo se realizó la primera caracterización de la infección del serotipo A2001 en ratones BALB/c. Este serotipo está incluido en la vacuna comercializada en Argentina.

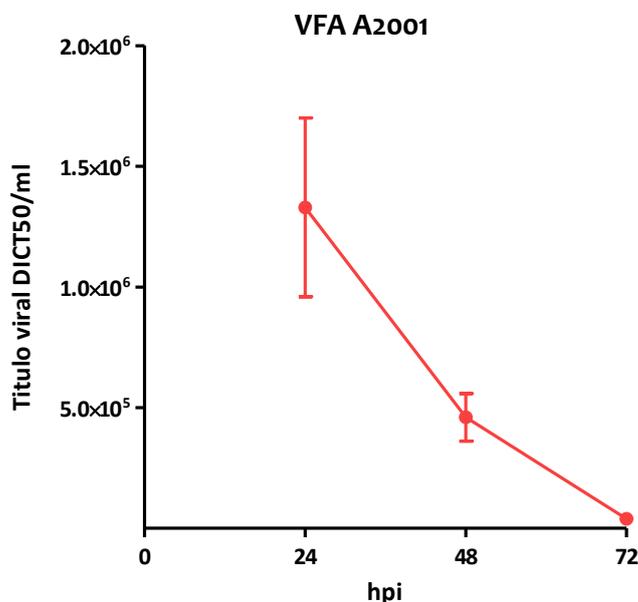
Con el objeto de determinar la dosis de infección óptima, se realizó una curva dosis respuesta, para ello se trabajó con ratones adultos endocriados de la cepa BALB/c. Cinco grupos de animales se infectaron con diferentes concentraciones virales.



**Figura 31:** Selección de Dosis infectiva (VFA A2001) en ratones BALB/c. Cada barra representa el % de ratones con viremia detectable con respecto al total de los animales infectados 24hs después de haber sido inoculados con diferentes dosis de VFA. El recuadro indica el número de animales con viremia detectable/el número de animales infectados.

Como se observa en la figura 31, a las 24 hpi para VFA A2001 es necesario  $10^{2.5}$  DICT50/ml para que el 100% de los ratones se infecten, cuando la dosis infectiva es menor ( $10^{1.5}$  DICT50/ml) el número de animales infectados es menor al 100%.

Una vez seleccionada la dosis infectiva, se realizó la medición de los títulos virales a diferentes horas post infección (24, 48 y 72hpi).



**Figura 32:** Curva de viremia a diferentes hpi: ratones BALB/c (n=4) fueron inoculados con  $1 \times 10^{2.5}$  DICT50/ml de A2001. Se muestra en el eje Y el título viral (DICT50/ml) alcanzado en sangre por ratones BALB/c luego de la infección con VFA A2001 a las 24, 48 y 72 hpi. Cada

punto corresponde al promedio de los títulos virales alcanzados por los animales que integran los distintos grupos y representan la media y sus correspondientes SD.

En la infección con VFA A2001 se observan títulos virales en sangre a las 24hpi similares a los de O1Campos ( $10^6$  DICT50/ml a las 24hpi). A las 48 hpi el título viral de los ratones infectados con VFA baja a  $10^5$ DICT50/ml y a las 72hs con el serotipo A2001 se observa viremia de título  $1 \times 10^2$  DICT50/ml.

#### 4.4. Determinación del efecto del virus sobre los ratones luego del desafío.

Con el objeto de evaluar el efecto del VFA A2001 sobre los ratones BALB/c, se infectaron ratones (n=4) y se los observó a diferentes horas post infección.

<b>Signos clínicos</b>	
<b>Apatía</b>	<b>x</b>
<b>Piloerección</b>	<b>x</b>
<b>Pérdida de peso</b>	<b>x</b>
<b>Dificultad respiratoria</b>	<b>x</b>
<b>Lomo encorvado</b>	<b>x</b>
<b>Sobrevida (96hpi)</b>	<b>60%</b>

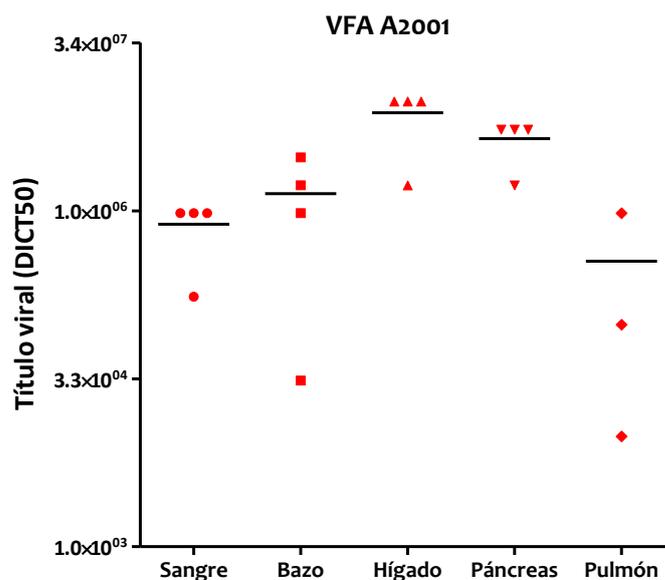
**Tabla 22:** Signos clínicos en ratones infectados con VFA a las a partir de las 48 hpi y el % de sobrevida de ratones BALB/c a las 96 hpi.

En la tabla 22 puede observarse que a diferencia de lo que ocurre en la infección con el serotipo O1 Campos, el VFA A2001 provoca a partir de las 48hs una infección clínicamente manifiesta, produciéndose la muerte en la mayoría de los animales infectados (sobrevida a las 96hpi del 40%).

La sintomatología observada se caracterizó por una pérdida de peso notable, lomo encorvado, dificultad respiratoria, piloerección y enrojecimiento de la almohadilla plantar en todos los ratones infectados, independientemente de que hayan sobrevivido o no a las 96hpi.

#### 4.5. Localización del virus en sangre y en diferentes órganos luego de la infección.

Con el fin de evaluar la localización y distribución del virus en distintos órganos, a las 24 hpi con VFA A2001 por vía i.p. se realizó la extracción de sangre, bazo, páncreas, hígado y pulmón.

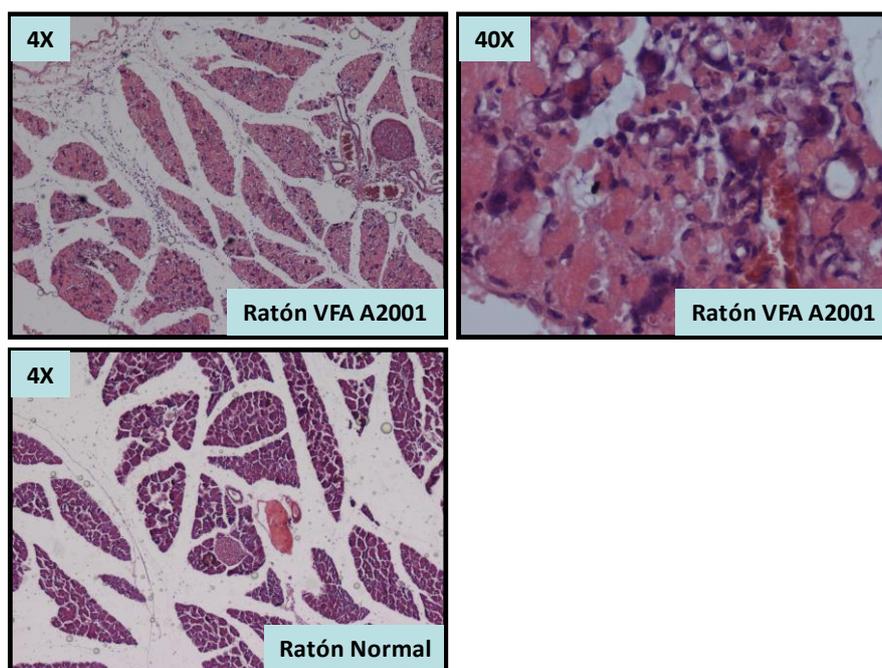


**Figura 33:** Título viral en sangre y en diferentes órganos evaluados. Se muestra en el eje Y el título viral (DICT50/ml) alcanzado en órganos de ratones BALB/c (n=4) luego de 24 hpi con VFA A 2001. Cada punto corresponde al título viral detectado en el órgano de cada animal infectado. Se encuentran representados los títulos virales medios en sangre y en cada órgano con su correspondiente SD.

Como se observa en la figura 33 hubo detección viral en sangre y en todos los órganos analizados indicando una infección sistémica. Los títulos virales varían entre los órganos, detectándose una mayor replicación en páncreas. En la saliva de 3 de 4 de los ratones infectados se detectó virus aunque en un título bajo (dato no mostrado).

#### 4.6. Evaluación histopatológica

Con el objeto de conocer el efecto viral en los órganos estudiados a las 24 hpi, se realizaron cortes histológicos de bazo, páncreas, hígado, y pulmón.



**Figura 34.** Corte histológico de páncreas de ratón normal e infectado con VFA A2001 a las 24 hpi.

Se observa un infiltrado leve de células mononucleares en el estroma, con edema de mayor intensidad que con el VFA O1 Campos. En los lobulillos se observa degeneración celular marcada, con necrosis coagulativa y escasa respuesta inflamatoria. En los mas afectados involucra la totalidad de los acinos, en los menos afectados se observan cambios similares al registrado con VFA O1 Campos.

Al no observarse la misma degeneración tisular en animales no infectados, las lesiones observadas en el páncreas de los ratones infectados con el VFA O1 Campos, indicarían que la sintomatología está asociada al patógeno inoculado.

Pudo observarse sintomatología clínica en forma de lesiones pancreáticas, no fue posible detectar una patología a nivel tisular en el resto de los órganos evaluados.

*En resumen:*

*Es la primera vez que se describe la infección del VFA A2001 en ratones BALB/c.*

*El VFA serotipo A2001 induce una enfermedad aguda y una infección clínicamente manifiesta con mortandad de ratones a las 96 horas post infección.*

*El VFA A2001 a las 24 horas post infección se detecta en sangre en todos los órganos analizados (bazo, hígado, páncreas, pulmón), en saliva en un bajo título.*

CAPÍTULO 5:  
PREDICCIÓN DE LA PROTECCIÓN CONTRA  
VFA A2001

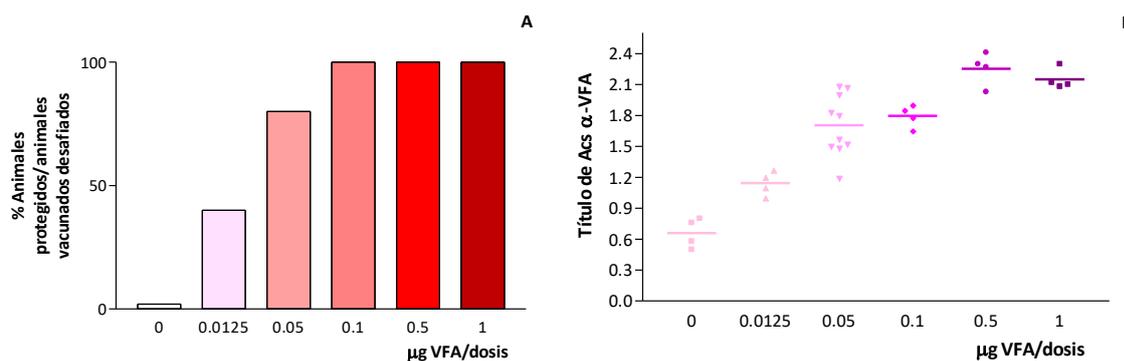
**Objetivos:**

- Determinar la capacidad del modelo murino de predecir la eficacia de las vacunas contra aftosa en cuanto al nivel de Acs.
- Comparar los datos de protección heteróloga obtenidos en el modelo murino con los que arroja el bovino que recibe las mismas vacunas.

### 5.1. Curva dosis respuesta generada por vacunas experimentales con diferente masa viral.

Una vez caracterizada la infección con VFA A2001 y desarrollado el ELISA FL, se procedió, a la evaluación de la capacidad del ratón de generar una respuesta inmune dependiente de la dosis.

Se formularon diferentes vacunas monovalentes que contenían: 0,0125; 0,05; 0,1; 0,5; 1 y 2  $\mu\text{g}$ /dosis de VFA inactivo serotipo A 2001 y el adyuvante utilizado en una vacuna comercial contra aftosa, dichas vacunas se inocularon en ratones BALB/c y a los 21 dpv se procedió a realizar una sangría exploratoria para la evaluación de Acs y posteriormente se realizó el desafío viral de los animales. Se evaluó la viremia 24hs posteriores al desafío (según esquema 2).



**Figura 35: Evaluación de la curva dosis respuesta** A) Porcentaje animales protección inducida por las diferentes vacunas. Cada barra representa el % de ratones protegidos luego de ser vacunados y desafiados a los 21 dpv (número de ratones protegidos/número de ratones desafiados x 100). B) Título de Acs medidos por ELISA FL a los 21 dpv con las diferentes dosis de VFA A2001 inactivo, formuladas con adyuvante comercial. Cada punto representa el título de Acs de cada animal. Las líneas horizontales muestran la media de cada grupo experimental.

En la figura 35 A se observa que solo un 40% de los ratones vacunados con 0,0125  $\mu\text{g}$ /dosis están protegidos frente al desafío con virus activo. La vacuna que contenía 0,05  $\mu\text{g}$ /dosis de antígeno indujo protección en el 80% de los ratones vacunados, mientras que aquellas con dosis de VFA de 0,1  $\mu\text{g}$ ; 0,5  $\mu\text{g}$ ; 1  $\mu\text{g}$  y 2  $\mu\text{g}$  indujeron protección en el 100% de los animales. La vacuna placebo (sin virus, sólo adyuvante) no

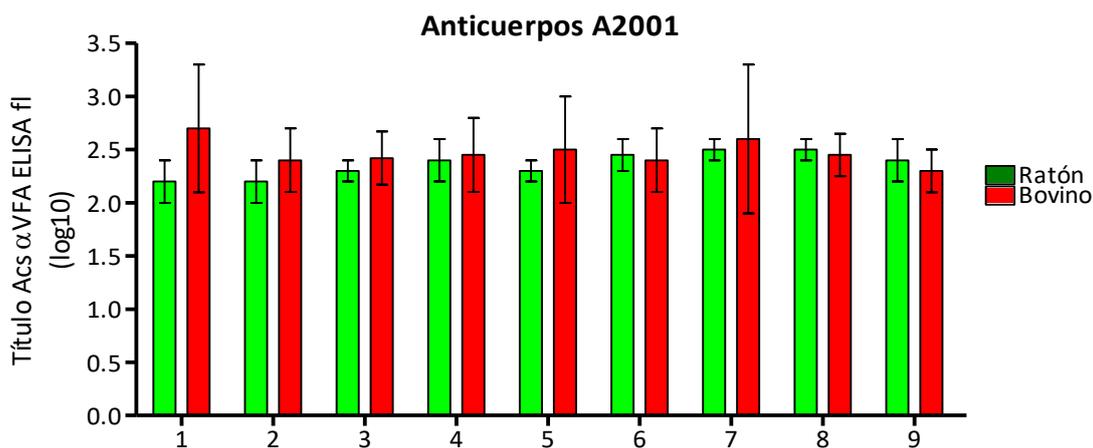
protegió frente al desafío. Es decir se observó un efecto dependiente de la dosis de virus inactivo presente en la formulación vacunal en el modelo murino.

Como se observa en la figura 35B, el nivel de Acs totales inducido por las vacunas es mayor a medida que aumenta la masa viral presente en las vacunas.

## 5.2. Evaluación de vacunas contra VFA. Acs inducidos en ratón y en bovinos

Como se vio anteriormente para O1 Campos, el sistema inmune del ratón actúa de modo similar al del bovino frente a la vacunación contra VFA, permitiendo entonces el modelo murino predecir el comportamiento de las vacunas en bovinos en cuanto a la inducción de protección.

Una vez establecidos los parámetros de desafío y el ELISA FL para A2001, se evaluaron 9 vacunas en ratón y en bovino.



**Figura 36:** Títulos de Acs anti VFA medidos por ELISA FL de ratones y bovinos inducidos por vacunas contra VFA. Cada barra representa la media de los títulos de Acs de 16 animales a los 21 y 60 dpv (ratones y bovinos respectivamente) con sus correspondientes DS.

Como se observa en la figura 36, las vacunas indujeron buenos títulos de Acs tanto en bovinos como en ratones presentando un perfil similar.

Para realizar una comparación estadística de los datos se debería contar con un número mayor de vacunas y de eficacia alta y baja. Sin embargo, este ELISA podría ser un buen candidato para predecir el comportamiento de vacunas contra virus A2001 en cuanto a la inducción de inmunidad en bovinos.

Otra posible aplicación del modelo murino (Datos preliminares).

### 5.3. Evaluación de la inducción de anticueros y la protección heteróloga inducida por vacunas contra el VFA serotipo A24 en ratones y bovinos.

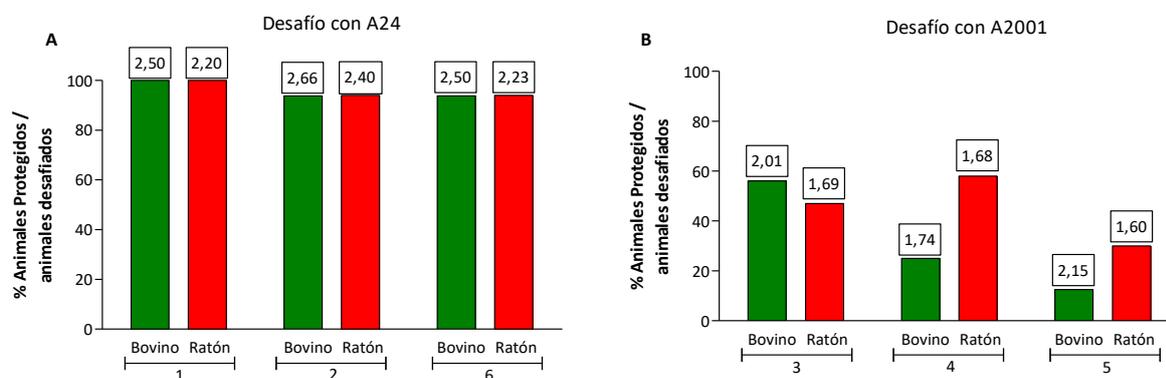
En Argentina, las vacunas comercializadas contienen los serotipos de VFA O1 Campos, A24 Cruzeiro, A2001 y C3 Indaial. En general estas cepas son capaces de brindar una cobertura inmunológica satisfactoria cuando se aplican programas de vacunación sistemática.

Generalmente estas cepas son capaces de brindar una cobertura inmunológica satisfactoria. Pero debido a la variabilidad del VFA la protección cruzada entre los distintos serotipos es baja y sólo se produce entre algunos subtipos de los serotipos mencionados (Mattion y col., 2004) y han limitado la difusión de brotes aun cuando emergieron variantes con diferencias antigénicas significativas (Maradei y col., 2013) La alta variabilidad de VFA obliga a los laboratorios de referencia al monitoreo constante de las cepas actuantes en el campo y a evaluar la capacidad de reactividad cruzada de las cepas vacunales incluidas en las vacunas en uso (vaccine matching) (Mattion y col., 2004).

Debido a que el VFA es un virus con alta variabilidad, la protección cruzada entre los distintos serotipos es baja y sólo se produce entre algunos subtipos de los serotipos mencionados (Mattion y col., 2004).

Estudiar la protección cruzada entre los serotipos y subtipos de las cepas de VFA resulta de gran importancia no solo para los programas de control, ya que la protección de una población vacunada depende no solo de la potencia de la vacuna y de los programas de vacunación aplicados, sino también de la homología entre la cepa de campo y la cepa vacunal.

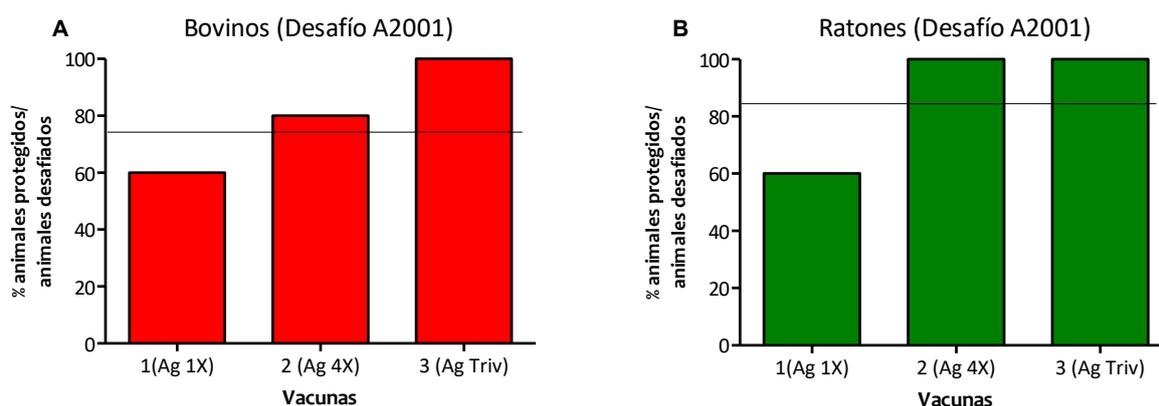
Se decidió investigar si el modelo de ratón era capaz de predecir la protección cruzada en bovinos y de predecir también la EPP, luego de inocular los animales con una vacuna conteniendo 10ug de VFA del serotipo A24 y desafiarlos con los serotipos A24 y A2001.



**Figura 37:** Porcentaje de bovinos y ratones protegidos/desafiados luego de la inoculación de una formulación vacunal que contenía 10 ug de VFA del serotipo A24. A- Protección en bovinos y ratones luego del desafío con el virus homólogo (VFA A24). B-Protección en bovinos y ratones luego del desafío con virus heterólogo (A2001). Los recuadros muestran los niveles de anticuerpos en ambas especies medidos por ELISA FL para el virus correspondiente al desafío.

Se puede observar en la figura 37, que con la masa vacunal la protección cruzada para las dos especies es baja. Esto se corresponde además con los títulos de anticuerpos detectados por el ELISA FL tanto para el virus A24 como para A2001.

Luego se compararon los porcentajes de protección cruzada obtenidos en ratones a los 21 dpv, con los obtenidos en el bovino (30 dpv) luego de vacunar a los animales y desafiarlos con A2001 pero para esta experiencia las vacunas fueron formuladas con diferente masa viral del serotipo A24, Vacuna 1 (10ug) y Vacuna 2 (40ug) y una vacuna trivalente que incluía los serotipos A24 Cruzeiro, O1 Campos y C3 Indaial (Vacuna 3).



**Figura 38:** Porcentaje de animales protegidos/desafiados. A-En bovinos la protección se determinó por la prueba de Protección a la Generalización Podal (PGP), (5 bovinos por grupo). B-En ratones medida por la presencia o ausencia de viremia 24 horas después del desafío de los animales vacunados a los 21 dpv (16 ratones por vacuna). Todos los controles negativos presentaron viremia.

Como se observa en la figura 38, las vacunas que confirieron protección en bovinos por encima del 75% (nivel requerido por SENASA para aprobar oficialmente vacunas contra VFA) también lo hacen en ratón por encima del 85%. Por otro lado, la vacuna que no superó el límite de protección requerido para su aprobación, tampoco superó el 85% de protección en el modelo de ratón.

**En resumen:**

*En el modelo murino se observó una correlación entre los microgramos de VFA inactivo incluidos en las vacunas y la protección frente al desafío viral, así como también con los niveles de Acs alcanzados en cada uno de los grupos.*

*Se determinó una asociación entre los niveles de Acs en ratones y bovinos luego de la vacunación con VFA A2001.*

*La protección heteróloga en ratones y bovinos vacunados con VFA A24 y desafiados con VFA A2001 presentó valores similares en ambas especies en las 3 vacunas evaluadas.*

*Datos preliminares indicarían que este modelo podría usarse para evaluar la protección heteróloga inducida por vacunas contra aftosa.*

## ANEXO 1

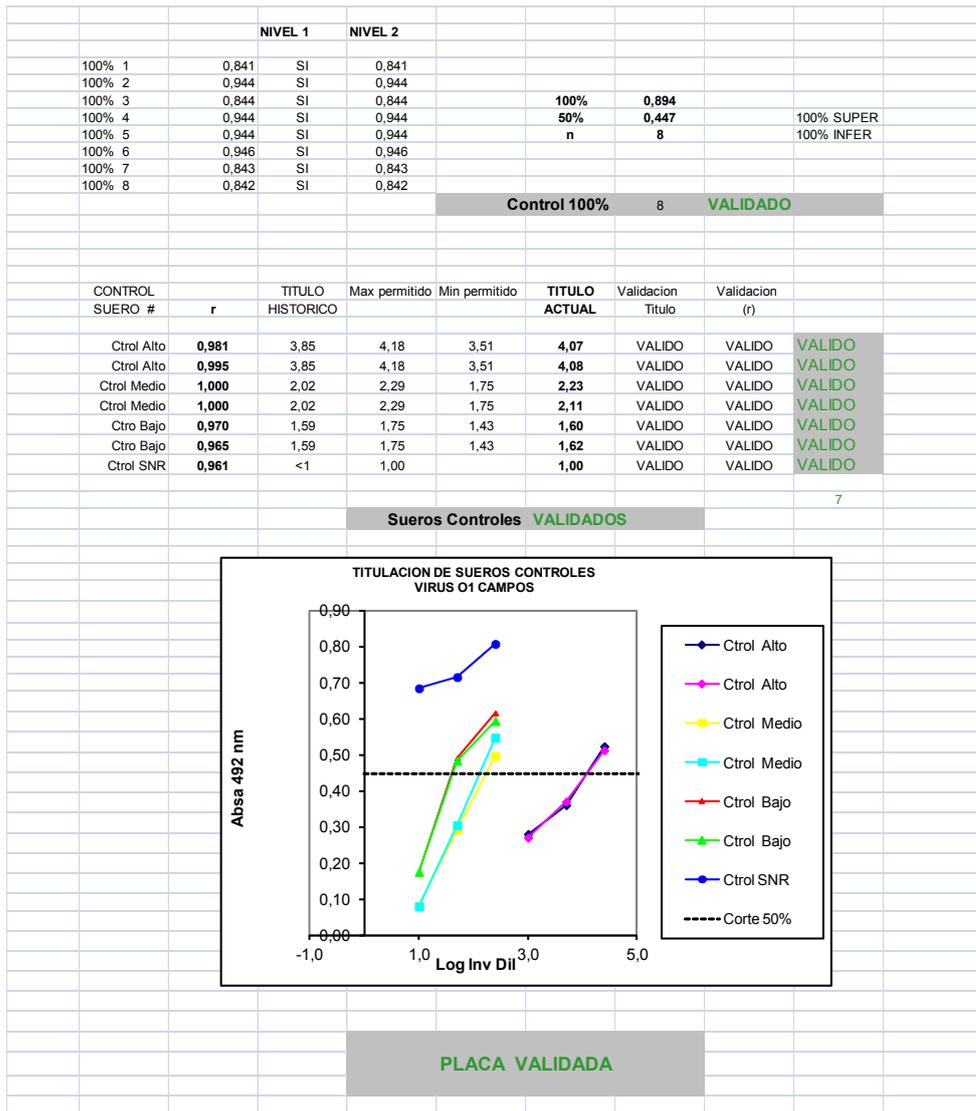
### 1.1. DESARROLLO DEL ELISA FL PARA VFA O1 CAMPOS.

#### 1.1.1 Desarrollo de una planilla de cálculo para la validación de las placas de ELISA.

Con el fin de procesar los resultados de un modo rápido, sencillo y evitar errores por parte del operador, se desarrolló una planilla de cálculo (Dra. Blanca Robiolo. Instituto de Ciencias y Tecnología "Dr. Cesar Milstein") que valida las lecturas de las DO de los controles presentes en las placas de ELISA

Representación de los datos obtenidos luego de ingresar las lecturas, nombre de sueros y diluciones de los mismos.

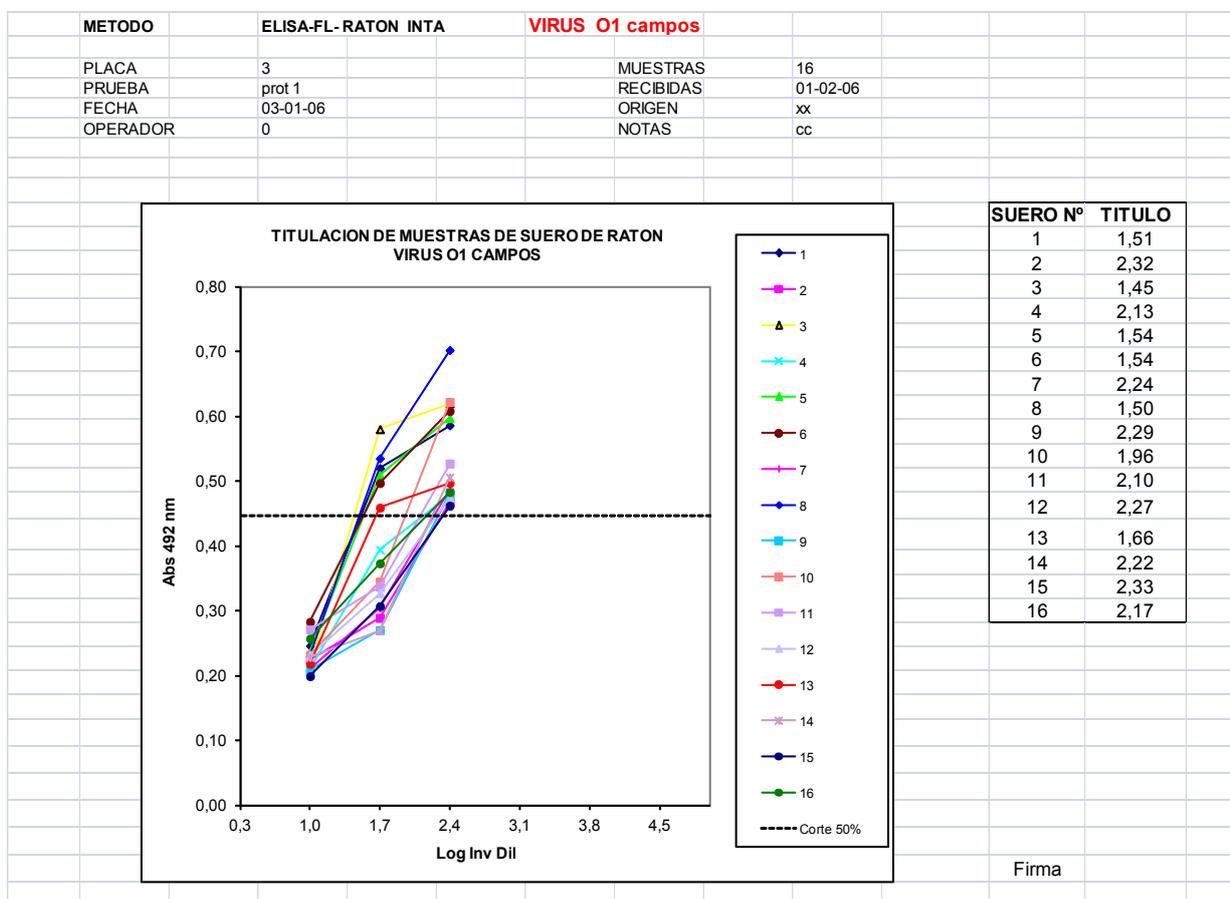
En el cuadro se representan las lecturas (DO) en el espectrofotómetro obtenidos luego de realizar el ELISA.



En el esquema se muestra la validación de la placa obtenida con el software en base a los sueros controles, blancos y 100% virus utilizados en cada prueba.

INTA Direccion TE FAX Mail											
Software Propiedad Intelectual CEVAN											
Version 2											
<b>VIRUS O1 campos</b>											
<b>PLACA 3</b>			<b>DIAGRAMA DE PLACA</b>				<b>SUEROS RATON</b>				
METODO			ELISA-FL- RATON INTA				CANTIDAD 16		LOTE xxx		
PRUEBA			prot 1				RECIBIDAS 01-02-06		Nº ORDEN xxx		
FECHA			03-01-06				ORIGEN xx				
OPERADOR							NOTAS cc				
Suero Nº	1º Dilucion	Base		Suero Nº	1º Dilucion	Base			Suero Nº	1º Dilucion	Base
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	10	5		9	10	5		100%	Ctrol Alto	1000	5
2	10	5		10	10	5		100%	Ctrol Alto	1000	5
3	10	5		11	10	5		100%	Ctrol Medio	10	5
4	10	5		12	10	5		100%	Ctrol Medio	10	5
5	10	5		13	10	5		100%	Ctrol Bajo	10	5
6	10	5		14	10	5		100%	Ctrol Bajo	10	5
7	10	5		15	10	5		100%	Ctrol SNR	10	5
8	10	5		16	10	5		100%	BL	BL	BL

Cálculo de los títulos de Acs de ratón obtenidos en la placa analizada y validada.



Para considerar validada cada placa de ELISA, se aplicaron los siguientes criterios

Control de blanco: Cada placa fue validada si la densidad óptica (D.O) de los pocillos es inferior a 0.300. El promedio de las D.O de los blancos se resta a los pocillos restantes.

Control del ciento por ciento (100%) de las D.O del virus: cada placa fue validada si en siete de los ocho pocillos se obtiene un valor de D.O dentro del rango específico en cada lote de reactivos.

Sueros Control: Para la obtención de los títulos se calcularon individualmente sus respectivas curvas de regresión utilizando las D.O de las diluciones procesadas. Se obtuvo para cada suero control el coeficiente de correlación (r) y el título 50 %.

El título para cada suero se calculó como la inversa de la dilución expresada en logaritmo 10, donde se obtuvo el 50 % de D.O del control del 100 % del virus correspondiente. Se aceptaron aquellos sueros control cuyo coeficiente de correlación ( $r$ ) no sea inferior a 0.90 y cuyos títulos no difieran en más o en menos 0.20 log del título histórico. Una vez aplicado el factor de corrección se aceptaron aquellos sueros cuyos títulos no difieran en más en menos 0.13 log del título histórico. La placa fue aceptada si al menos cuatro de los seis sueros control cumplieron con los criterios.

Curva Standard: el título de los sueros controles obtenidos se relacionó con las absorbancias producidas a una única dilución de cada suero control. Para ello se calculó la curva de regresión lineal y el coeficiente de correlación ( $r$ ). La Curva Standard fue aceptada si el  $r$  es superior a 0.90. El título de cada suero muestra fue expresado como el log 10 de la inversa de la dilución que corresponda al 50 % de densidad óptica del control del 100 % de virus. El título se redondeó al segundo decimal.

## ANEXO 2

### 2.1. CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN DE PROTECCIÓN EN RATONES Y EN BOVINOS

#### Protección real en ratones (desafío) y protección en bovinos (PGP)

Para determinar la concordancia entre la protección determinada por el desafío en ratones y la protección determinada por la prueba de PGP en bovinos, se evaluaron diferentes puntos de corte en el modelo de ratón y se generaron tablas de contingencia.

Se partió de una serie de vacunas (n=9) de las cuales se contaban con la información en ambas especies.

#### **Vacunas clasificadas según su nivel de protección real en ratones y en bovinos**

Punto de corte de 80% en ratón y 75% en bovino

<b>Ratón real (desafío)</b>	<b>Bovino PGP</b>	
	<b>No protegido</b>	<b>Protegido</b>
<b>No protegido</b>	2	2
<b>Protegido</b>	0	5

Kappa= 0.53    ADS= 0.26    valor-p= 0.037    LCI= 0.02    LCS= 1.00

Punto de corte de 85% en ratón y 75% en bovino

<b>Ratón real (desafío)</b>	<b>Bovino PGP</b>	
	<b>No protegido</b>	<b>Protegido</b>
<b>No protegido</b>	2	2
<b>Protegido</b>	0	5

Kappa= 0.53    ADS= 0.26    valor-p= 0.037    LCI= 0.02    LCS= 1.00

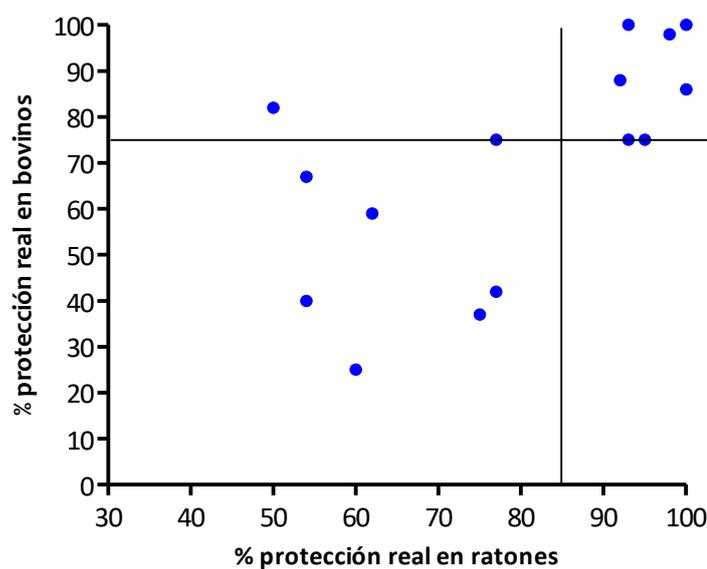
Punto de corte de 90% en ratón y 75% en bovino

Ratón real (desafío)	Bovino PGP	
	No protegido	Protegido
No protegido	2	2
Protegido	0	5

Kappa= 0.53    ADS= 0.26    valor-p= 0.037    LCI= 0.02    LCS= 1.00

El nivel de concordancia fue evaluado mediante el índice Kappa, acompañado de su DS asintótico (ADS), el valor p unilateral y el intervalo de confianza del 95% (LCI, LCS). Los puntos de corte de 80%, 85% y 90% presentan los mismos valores de índice Kappa (0,53).

Al evaluar un número mayor de vacunas (n=15) el punto de corte de 85% en ratón resultó el mejor discriminador entre vacunas inductoras de alta o baja protección.



**Figura 40:** Porcentaje de protección real en ratón según punto de corte 85% y la protección real en bovino según punto de corte oficial de 75%, para un total de 15 vacunas evaluadas en ambas especies.

**Punto de corte de 85% en ratón y 75% en bovino**

Ratón real (desafío)	Bovino PGP	
	No protegido	Protegido
No protegido	6	2
Protegido	0	7

Kappa= 0.74 ASE= 0.17 valor-p= 0.0015 LCI= 0.41 LCS= 1.00

El nivel de concordancia fue evaluado mediante el índice Kappa, acompañado de su DS asintótico (ADS), el valor p unilateral y el intervalo de confianza del 95% (LCI, LCS).

Clasificando las vacunas en ratones de acuerdo al punto de corte de 85%, la concordancia entre especies presentó un valor de índice Kappa de 0,74.

Protección estimada en ratones (Modelo logístico) y protección en bovinos (PGP)

Para determinar la concordancia entre la protección estimada por el modelo en ratones y la protección determinada por la prueba de PGP en bovinos, se evaluaron diferentes puntos de corte en el modelo de ratón y se generaron tablas de contingencia.

Se partió de una serie de vacunas (n=9) de las cuales se contaban con la información completa en ambas especies

**Vacunas clasificadas según nivel de protección predicha en ratones y real en bovinos**

Punto de corte de 80% en ratón y 75% en bovino

Ratón predicho	Bovino PGP	
	No protegido	Protegido
No protegido	1	1
Protegido	1	6

Kappa = 0.36 ASE= 0.37 valor-p= 0.142 LCI= -0.36 LCS= 1.00

Punto de corte de 85% en ratón y 75% en bovino

<b>Ratón predicho</b>	<b>Bovino PGP</b>	
	<b>No protegido</b>	<b>Protegido</b>
<b>No protegido</b>	2	2
<b>Protegido</b>	0	5

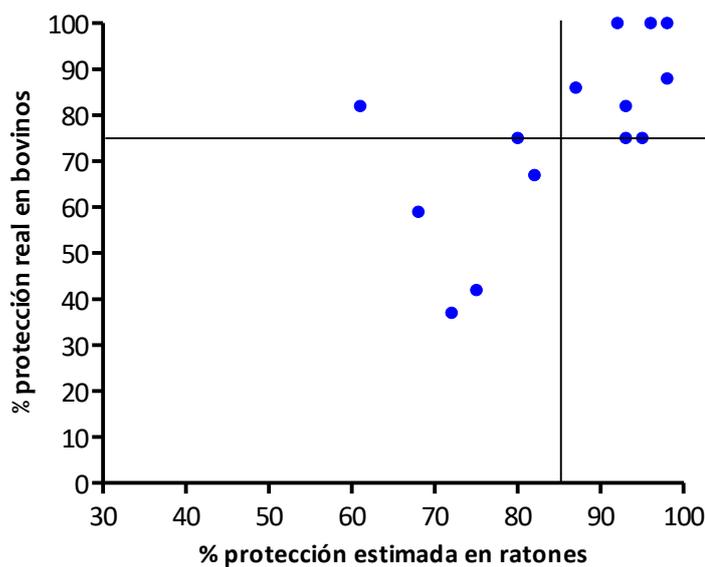
Kappa= 0.53 ASE= 0.26 valor-p= 0.037 LCI= 0.02 LCS= 1.00

Punto de corte de 80% en ratón y 75% en bovino

<b>Ratón predicho</b>	<b>Bovino PGP</b>	
	<b>No protegido</b>	<b>Protegido</b>
<b>No protegido</b>	2	3
<b>Protegido</b>	0	4

Kappa= 0.37 ASE= 0.23 valor-p= 0.08 LCI= -0.08 LCS= 0.82

Los puntos de corte de 80% y 90% presentan los valores similares de índice Kappa (0,36 y 0,37 respectivamente). El punto de corte 85% presentó un valor Kappa superior (0,53), siendo este, el mismo valor obtenido cuando se compararon las protecciones reales en ambas especies. Al evaluar un número mayor de vacunas (n= 14) el punto de corte de 85% en ratón fue el que presentó un índice Kappa superior (0,70).



**Figura 41:** Porcentaje de protección estimada por el modelo logístico de predicción en ratón según punto de corte 85% y la protección real en bovino según punto de corte oficial de 75%, para un total de 15 vacunas evaluadas en ambas especies

**Punto de corte de 85% en ratón y 75% en bovino**

Ratón Predicho	Bovino PGP	
	No protegido	Protegido
No protegido	4	2
Protegido	0	8

Kappa= 0.70 ASE= 0.19 valor-p= 0.0031 LCI= 0.32 LCS= 1.00

El nivel de concordancia fue evaluado mediante el índice Kappa, acompañado de su DS asintótico (ADS), el valor p unilateral y el intervalo de confianza del 95% (LCI, LCS).

Clasificando las vacunas en ratones de acuerdo al punto de corte de 85%, la concordancia entre especies presentó un valor de índice Kappa de 0,70.

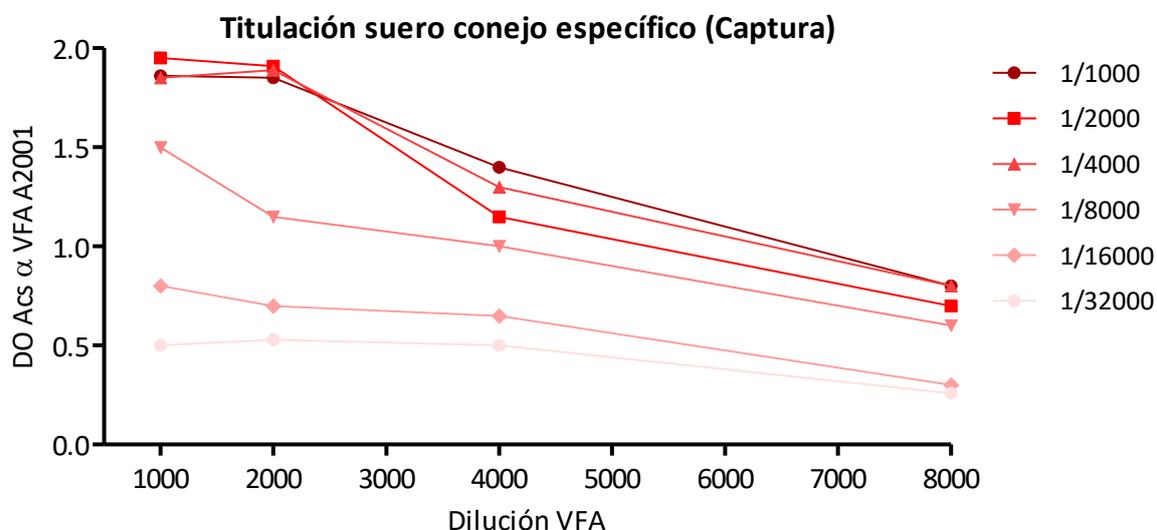
## ANEXO 3

### 3.1. DESARROLLO DEL ELISA FL PARA VFA A2001

#### 3.1.1. TITULACIÓN DEL SUERO CAPTURA

Para determinar las condiciones óptimas del ELISA FL, se procedió a la purificación del VFA A2001 por gradiente de sacarosa para la obtención del suero de conejo específico. Luego se procedió a la titulación del suero policlonal de conejo anti VFA A2001 utilizado como captura en los ensayos.

Diferentes concentraciones de captura fueron evaluadas frente a diluciones seriadas de VFA A2001 purificado.

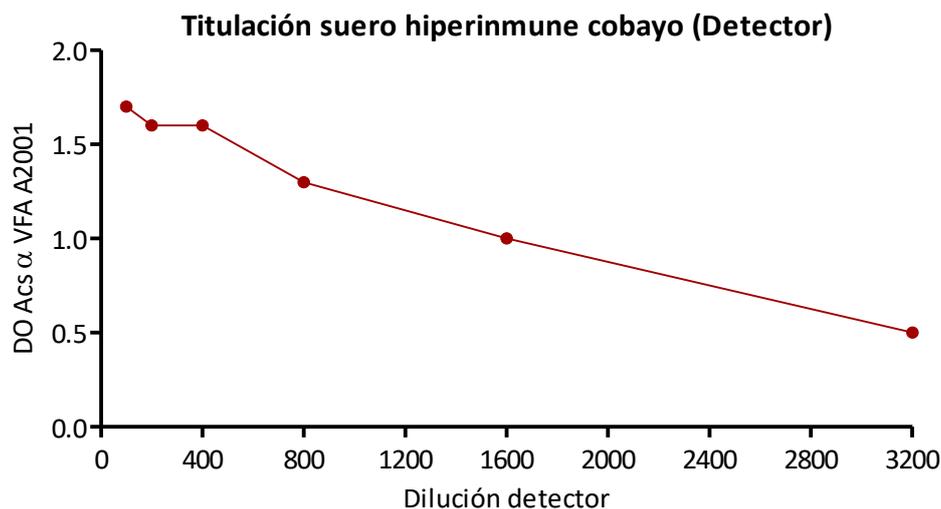


**Figura 42:** Titulación de suero conejo específico anti VFA. Diferentes concentraciones de Captura fueron evaluadas frente a diluciones seriadas de VFA A2001 purificado.

Se seleccionó la dilución del suero de conejo captura contra VFA A2001 1/4000 para continuar los experimentos.

#### 3.1.2. TITULACIÓN DEL SUERO DETECTOR

Se determinó la concentración óptima de suero hiperinmune de cobayo utilizado como detector del VFA en el ELISA FL.



**Figura 43:** Titulación de suero hiperinmune de cobayo anti VFA. Diferentes concentraciones de detector fueron evaluadas frente a diluciones seriadas de VFA A2001 purificado.

Se seleccionó la dilución del suero de cobayo detector contra VFA A2001 1/400 para continuar los experimentos.

### 3.2. DESARROLLO DEL ELISA

En cada placa de ELISA se evaluaron sueros provenientes de ratones que recibieron las vacunas (21 dpv) en 4 diluciones. Como controles se utilizaron controles de virus 100% (sin suero) 8 pocillos por placa y 3 pocillos blancos (ver esquema de placa). También se colocaron sueros controles provenientes de bovinos vacunados contra aftosa con títulos de Acs conocidos medidos por un ELISA FL desarrollado en el Instituto de Ciencias y Tecnología “Dr. Cesar Milstein”, (método oficial utilizado para la evaluación de vacunas comerciales) dentro de rangos utilizados para O1 Campos.

El desarrollo de la planilla de cálculo se realizó de la misma manera que para VFA O1 Campos.

## DISCUSIÓN

El VFA produce una de las más devastadoras enfermedades virales, afecta a biungulados salvajes y domésticos, causando importantes pérdidas económicas (Alexandersen y col., 2003). Es la enfermedad de mayor impacto en la economía de los países ganaderos. Las características del virus hacen que la enfermedad provocada sea muy difícil de erradicar (amplio rango de hospedadores, capacidad de infectar en bajas dosis, rápida tasa de replicación, altos niveles de excreción y múltiples formas de transmitirse). La vacuna utilizada actualmente contra el VFA contiene a la forma inactivada de este virus.

El objetivo de este trabajo se centró en el desarrollo de un modelo animal alternativo para predecir la capacidad de las vacunas contra la fiebre aftosa de inducir protección en bovinos frente al desafío con el virus, desarrollando para ello, modelos y estrategias de diagnóstico con el fin de enfatizar en la factibilidad del modelo murino.

En nuestro país, el Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA) ejecuta las pruebas de potencia de las vacunas anti-aftosa para registro del producto; la misma involucra bovinos de más de 300 kg, todos procedentes de zonas libres de vacunación (por debajo del paralelo 42). Los animales son transportados grandes distancias (desde el sur de Argentina) y desafiados con el virus infectivo en boxes de alta seguridad, a los 7 días post desafío se revisan las lesiones producidas por el virus y posteriormente se los sacrifica; según estos datos de protección, se aprueban o no las vacunas para su comercialización. Todas estas condiciones tienen alto costo y requieren de un complejo manejo de los animales, con gran sufrimiento de los mismos. Cabe destacar que en Argentina, existen solo 2 facilidades aprobadas por SENASA para que se realice la mencionada prueba de potencia.

Como ya se mencionó hay un consenso internacional para alcanzar el concepto de las 3 R: Reducir, Reemplazar y Refinar el uso de animales a fin de lograr un sistema económico, útil y efectivo para controlar los biológicos veterinarios, teniendo en cuenta las buenas prácticas de bienestar animal. Para el VFA, se han estudiado y se

continúan investigando métodos para reducir el número de animales en las pruebas de desafío (Reeve y col., 2011).

Por otro lado, aunque, algunos investigadores (Goris y col., 2008) sugieren aumentar el número de animales para mejorar la potencia estadística de las pruebas de protección inducida por vacunas contra la fiebre aftosa, Reeve y col (2011) demostraron que se puede reducir el número de bovinos preservando al mismo tiempo la sensibilidad y la especificidad, utilizando 16 animales en reemplazo de los 17 (15+2) bovinos utilizados en la prueba PD50 y de los 18 (16+2) utilizados en la prueba PGP.

Maradei y col (2008) publicaron resultados donde calculan la expectativa porcentual de protección (EEP) a partir de datos serológicos de bovinos que recibieron vacunas que contenían las cepas de VFA: A24, A2001, O1 Campos y C3 Indaial (cepas incluidas en la vacuna comercializada en Argentina). En el mencionado trabajo, se reporta que la concordancia entre los niveles de anticuerpos de bovino contra el VFA medidos por ELISA en fase líquida (FL) y la prueba PGP fue buena, asociada a un índice Kappa de 0,62, indicando que la prueba serológica podría servir como una primera aproximación de los resultados obtenidos por la prueba de desafío en bovinos. Por otro lado, Robiolo y col (2010) determinaron la repetibilidad y reproducibilidad de la EPP utilizando un ELISA FL similar al utilizado por Maradei y col., (2008) y la prueba de seroneutralización para A24. Una de las conclusiones derivadas de este estudio es que la EPP determinada por ambas pruebas, es estadísticamente confiable y puede utilizarse como un sustituto. Sin embargo en estos métodos se requiere suero de bovinos vacunados lo cual continúa representando un alto costo para la evaluación de vacunas contra fiebre aftosa.

Varios autores también han realizado ensayos serológicos con el objeto de reemplazar parcialmente las pruebas de potencia, han utilizado parámetros de inmunidad humoral, que independientemente del título de anticuerpos medidos por ELISA FL puedan resultar indicadores de protección. Se analizaron los isotipos presentes en los sueros de los bovinos vacunados (Capozzo y col., 1997), así como la relación entre ellos y además se relacionó la protección con los índices de avidéz de

los sueros de animales vacunados tanto para ensayos de protección homóloga como heteróloga (Lavoria y col., 2012; Brito y col., 2014), sin embargo, no sólo no se ha logrado reemplazar la prueba de desafío totalmente, siendo todavía, la prueba de referencia de la potencia de vacunas sino que estos autores plantean también el uso de suero de bovinos vacunados para las diferentes determinaciones.

En el caso de la fiebre aftosa, los modelos se basaron en el uso de especies que son susceptibles a la infección pero sólo bajo condiciones experimentales, en este grupo se encuentran los ratones, cobayos y conejos (Alexandersen y Mowat., 2005). Si bien el cobayo es el mejor modelo para la patogénesis del VFA, siendo el curso de la enfermedad similar a los hospedadores naturales, ha sido utilizado para la producción de antisueros que posteriormente son utilizados para los test diagnósticos (Ferris y col., 1998), sin embargo, la falta de reactivos limitan el uso del mismo. Por otro lado, el hecho que no sean animales endocriados, trae como consecuencia resultados difícilmente repetibles.

En este trabajo de investigación, se utilizó el ratón ya que tiene características únicas para el estudio de las infecciones de VFA abriendo grandes posibilidades de estudio, que de otro modo no serían accesibles utilizando hospedadores naturales u otros modelos animales. A diferencia de otros sistemas animales, la ventaja del modelo murino radica, no sólo en la disponibilidad de una amplia variedad de reactivos, sino también en el uso de una cepa de ratón endogámica con un fondo genético uniforme.

El modelo murino ha sido, y continúa siendo utilizado en numerosos trabajos, ya sea para la evaluación de la eficacia de vacunas de nueva generación contra fiebre aftosa, como para estudiar en detalle los mecanismos de la respuesta a este patógeno (Borca y col., 1986; Fernandez y col., 1986; Mulcahy y col., 1999; Shi y col., 2007; Pulido y col., 2009; García Nuñez y col., 2010; Quattrocchi y col., 2011; Langellotti y col., 2012; Mignaqui y col., 2013; Romanutti y col., 2013; Quattrocchi y col., 2013, Molin-Capeti y col., 2013). Como ya se mencionó, a pesar que el ratón adulto no es susceptible a la infección natural con el VFA, las cepas de ratón CH3, Swiss, BALB/c,

C57 y nude pueden infectarse experimentalmente si el virus se inocula por vía intraperitoneal (Fernández F y col., 1986; Collen T. y col., 1989).

En el presente trabajo, se plantea la hipótesis en la cual, el sistema inmune del ratón funcionaría de modo similar al del bovino frente a la vacunación contra el VFA, pudiendo el modelo predecir la eficacia de las vacunas frente al desafío en bovinos. Para demostrar esta hipótesis, fue necesario desarrollar y estandarizar un modelo de ratón estadísticamente válido, que pueda predecir la capacidad protectora de las vacunas contra aftosa en bovinos frente al desafío.

### **Importancia de la estandarización de métodos para la evaluación de eficacia de las vacunas contra VFA O1 Campos.**

Un requerimiento clave para el desarrollo de métodos de diagnóstico es la evaluación del ensayo para determinar su aptitud o capacidad para un uso particular, lo que incluye la optimización del ensayo y la demostración de su *performance* (OIE., 2008). De una forma prioritaria, debe tener un costo beneficio positivo, que integre los costos reales, la toma y el manejo de las muestras, la reducción del tiempo de análisis y la capacidad de la metodología de facilitar estudios múltiples simultáneos.

Como se mencionó en la introducción de este trabajo de tesis, las pruebas oficiales de eficacia de las vacunas en bovinos en Argentina involucran, la prueba de generalización podal (PGP) luego de la vacunación de los bovinos y el desafío con virus activo y la medición de anticuerpos contra VFA por ELISA FL, esta última se utiliza generalmente para la evaluación de lotes de vacunas mediante el cálculo de EEP (Alonso y col, 1987).

En este trabajo de investigación se lograron optimizar los resultados obtenidos y publicados por Dus Santos y col (2000) en el que evaluaron la calidad de vacunas comerciales en el modelo murino para el serotipo O.

Por un lado, en este trabajo de tesis, se amplió en forma importante el número de vacunas evaluadas, se trabajó con 16 vacunas comerciales y experimentales provenientes de empresas que estuvieron sometidas a la prueba de desafío y 39 vacunas que fueron chequeadas en bovinos por ELISA FL y en ratón por varios

métodos (además del desafío viral). Por otro lado no se utilizaron ratones lactantes, sino que se utilizaron cultivos celulares para las pruebas de viremia.

Por último a partir de lo publicado por Dus Santos y col (2000) en cuanto a la comparación de metodología utilizada para la evaluación de la eficacia de vacunas en ratón (ELISA sándwich, neutralización viral y ELISA FL), determinaron que la técnica de ELISA FL fue la que mejor se correlacionaba con los datos bovinos tanto de anticuerpos como de protección, sin embargo, no establecieron un sitio de corte para los Acs en FL. En este trabajo de investigación, se continuó utilizando el ELISA FL, no sólo por lo mencionado sino también porque se trata de un test económico, aplicable, sencillo e independiente de la utilización de virus infectivo y se establecieron puntos de corte para los títulos de anticuerpos en FL.

Inicialmente, con el objeto de lograr una mejor predicción de la eficacia de las vacunas por parte del modelo, en esta investigación, se estandarizó el ELISA FL para cuantificar anticuerpos post vacunales en ratón y se realizaron cambios en las pruebas de detección del virus luego del desafío en ratones.

Para la prueba de ELISA FL se tomó como base el ELISA desarrollado anteriormente (Robiolo y col. 1995) y se realizaron modificaciones basadas en el ELISA FL desarrollado por el Instituto Cesar Milstein para las pruebas oficiales de evaluación de vacunas contra VFA (Resolución 111/2010). Se desarrollaron los reactivos para el ensayo y se diseñó una planilla de cálculo para ingresar los datos de un modo rápido, sencillo y para evitar errores por parte del operador.

Una vez puesto a punto el ensayo, se realizaron pruebas para la determinación de la repetibilidad de la técnica teniendo en cuenta los sueros controles bajo, medio y alto; los cuales resultaron con valores de coeficiente de variación bajos, menores al 10% aceptado por la OIE. Todos estos procedimientos, no habían sido realizados hasta el momento, por lo tanto, a partir de éste trabajo se puede afirmar que el ELISA FL está validado para la medición de Acs en suero de ratones que recibieron vacuna contra fiebre aftosa.

Para la optimización de la medición de la viremia en ratones, se utilizaron células (BHK 21) susceptibles al VFA en reemplazo de los ratones lactantes utilizados por Borca y col. (1986); Dus Santos y col (2000). Luego del estudio comparativo de las titulaciones virales por ambos métodos, a pesar de que la sensibilidad de la detección del virus fue inferior en células que en ratón lactante, se decidió el uso del cultivo de células ya que presentan una serie de ventajas económicas, metodológicas y de homogeneidad, además de la aplicar del concepto de las 3R, evitando el uso de una gran cantidad de ratones recién nacidos.

La re-estandarización de la infección de la cepa O1 Campos en ratones BALB/c fue necesaria debido a las modificaciones realizadas en cuanto a la metodología para la evaluación de la viremia. Como ya se mencionó, en trabajos anteriores (Borca y col. 1986; Fernández y col. 1986; Dus Santos y col. 2000) se utilizó al ratón lactante, sin embargo la necesidad de mejorar las técnicas de diagnóstico siguiendo los estándares de bienestar animal llevaron a que esta metodología sea reemplazada por cultivos celulares y por lo tanto a redefinir los valores de dosis mínima requerida para la infección.

Con los resultados obtenidos en cuanto a la dosis mínima requerida para la infección de los ratones, se corroboró lo publicado por Fernández y col (1986), pero utilizando en este trabajo las células BHK21 para la detección del virus. También se corroboró que la infección con VFA O1 Campos, en ratones BALB/c comprende una importante replicación viral en el páncreas. Por primera vez se describe la presencia de virus en saliva de ratones BALB/c luego de la inoculación de VFA por vía intraperitoneal, y la enfermedad cursa de forma subclínica evidenciándose viremia en diferentes órganos analizados (bazo, hígado, páncreas y pulmón). Estos resultados, son similares a los descritos por Salguero y col (2005) en cepas de ratones C57 con el serotipo A22, pero en este caso, la inoculación fue realizada en la almohadilla plantar por vía subcutánea. Estos autores también reportan que los ratones BALB/c, al igual que C57 son muy susceptibles a la infección por el VFA serotipo C-S8c1, ya que a las 72 hs de realizada la infección con  $10^5$  PFU, el 100% de los animales muere. También

demonstraron que otras cepas de ratones como los SJL/J, no son susceptibles al VFA serotipo C-S8c1.

En esta investigación se observó que durante las primeras 24 hs de la infección, se produce una viremia de alto título (entre  $1.10^5$ ,  $1.10^6$  DICT50) tal como lo describió Fernández y col., 1986. Por otro lado, en este trabajo, también se detectó en páncreas un alto título viral relacionando lo observado a lo publicado por Sanz-Ramos y col (2008) para la cepa de ratón C57 infectada con VFA serotipo C-S8c1. En la saliva de los ratones infectados (24 hs postdesafío) se encontró un título viral bajo, en concordancia a lo publicado por Fernández y col 1986, quienes si bien no estudiaron saliva, detectaron VFA en las glándulas salivales a las 24 hpi. El páncreas es considerado como el sitio preferido para la replicación del VFA en los ratones adultos, a las 24 hpi la mayor carga viral se produce en el páncreas (Bachrach., 1968; Fernández y col., 1986; Sanz-Ramos y col., 2008.). Está descrito que el VFA C-S8c1 en ratones de la cepa C57 provoca pancreatitis aguda en adultos, que afecta más severamente el tejido acinar. Esto se correlaciona con las lesiones observadas en este órgano al evaluar su histología aunque las observadas en este trabajo, producidas por el VFA O1 Campos en ratones BALB/c son leves.

#### **Predicción de la protección contra VFA O1 Campos**

Una vez estandarizadas las técnicas a utilizar, ELISA FL para cuantificación de anticuerpos en ratones y detección de virus en sangre de ratones infectados, se corroboró la capacidad del ratón BALB/c utilizado en este modelo para generar una respuesta dependiente de la dosis de virus inactivo incluido en la vacuna en cuanto al título de anticuerpos específicos contra VFA.

En esta investigación, cuando se evaluaron los anticuerpos anti VFA medidos por ELISA FL se obtuvo una concordancia en los bovinos y en los ratones del 90% y al estudiar la concordancia en cuanto a las protecciones en ambas especies (en ratón mediante la medición de la viremia y en bovinos por la prueba PGP), se encontró una concordancia del 88% asociada a un índice Kappa de 0,75. Esta concordancia, superó lo descrito por Maradei y col. (2008) quienes encontraron una concordancia entre EPP y PGP del 82% (ambos en la especie bovina) asociada a un Kappa de 0,62. Este

resultado indica que algunas vacunas superan el punto de corte por la prueba PGP y sin embargo no son detectados por la EPP y viceversa. La prueba de desafío viral en el ratón utilizada en nuestro laboratorio, podría servir como predictor de la protección en bovinos que recibieron vacunas contra el VFA O1 Campos. Cabe destacar que a diferencia de lo publicado en el trabajo mencionado en el cual se encontró 1 falso positivo en 34 vacunas evaluadas, en el modelo murino estandarizado en este estudio, en ningún caso se detectaron resultados falsos positivos en la evaluación de 39 vacunas en cuanto a la predicción obtenida .

La evaluación de vacunas contra el VFA está determinada por la Expectativa porcentual de protección (EPP), que estima según el nivel de Acs contra VFA (medidos con ELISA FL) la probabilidad de que el ganado esté protegido contra un desafío de 10.000 dosis infecciosas después de una sola dosis de vacunación (Alonso y col., 1987).

En Argentina, la prueba de PGP ha sido sustituida parcialmente por la expectativa porcentual de protección (EPP), aunque desafío viral todavía se utiliza en el caso de las vacunas en proceso de concesión de licencias, para las nuevas cepas que deben incluirse en las vacunas, o para fines que coincidan con las vacunas (Maradei y col., 2008). Sin embargo, existen antecedentes bibliográficos en los que se demuestra que algunos animales a pesar de presentar bajos niveles de anticuerpos seroneutralizantes, están protegidos frente al desafío viral (Sobrino F. y col, 2001; Quattrocchi V. y col., 2014). En este trabajo de tesis, se encontraron algunos casos en los cuales los títulos de anticuerpos en bovinos vacunados eran superiores al punto de corte establecido por la EPP, y sin embargo un bajo porcentaje de animales estuvo protegido frente al desafío luego de la prueba de PGP estos resultados indican que podrían optimizarse los modelos de predicción de protección serológicos.

En este trabajo se evaluaron vacunas comerciales y experimentales, si bien en la mayoría (n=25) se observó una relación de altos niveles de anticuerpos asociados a una alta protección, también se encontraron 3 vacunas (M, T y X) que indujeron altos niveles de anticuerpos (medidos por ELISA FL) y baja protección, este fenómeno se presentó en las mismas vacunas tanto en el modelo murino como en el bovino,

apoyando la hipótesis de la similitud en las respuestas generadas por las vacunas en ambas especies.

### **Otros parámetros para el ajuste de la predicción**

Como se mencionó anteriormente, se ha establecido un paralelismo en cuanto a la respuesta inmune humoral entre bovinos y ratones luego de la vacunación contra VFA (Quattrocchi y col., 2012, 2014). En este trabajo de investigación, además de la asociación ya establecida por la EEP entre anticuerpos y PGP, se determinaron otros parámetros que puedan estar asociados a la protección para mejorar la predicción de la misma.

De las vacunas evaluadas en este trabajo de tesis, se encontraron algunas (M, T y X), las cuales generaron en bovinos y en ratones una respuesta que no seguía lo planteado por la EPP, la cual, como se mencionó previamente, establece que si los animales vacunados presentan un título de anticuerpos medidos por ELISA FL superior a 2,11 para el serotipo O1 Campos, esos animales tienen una Expectativa Porcentual de Protección superior al 75% (SENASA Resolución 111/2010).

Estas vacunas (M, T y X), a pesar de presentar niveles de anticuerpos superiores a 2,11 no indujeron protección satisfactoria, siendo esta menor al 75 %.

Con el objeto de incrementar la correlación entre los parámetros inmunológicos y protección, se evaluaron en ratones otros parámetros inmunológicos que podrían estar relacionados (según bibliografía) con la protección frente al desafío.

Como ya se mencionó, la selección de los nuevos parámetros a medir se realizó a partir de lo reportado en la bibliografía. Se evaluó la calidad de los Acs contra VFA generados luego de la vacunación, se estudió: el perfil de isotipos, el índice de avidéz, los niveles de IgA específicos contra VFA y los niveles de IFN $\gamma$  los cuales estarían relacionados con la protección (Lavoria y col., 2012; Perez Filgueira y col., 1995; Romanutti y col., 2013; Cubillos y col., 2008; Parida y col., 2008).

La manipulación del VFA en Argentina requiere el trabajo en laboratorios de alta seguridad de los cuales como ya se mencionó hay solo 2 que están certificados por SENASA para realizar los ensayos, lo que implica complicaciones, altos costos y

riesgos de escape viral. Por esta razón, se buscaron metodologías que eviten el uso de VFA activo y que permitan realizar una mejor correlación entre la protección en bovinos y la predicha que las actuales.

En este trabajo de tesis, uno parámetros evaluados en los que el análisis logístico arrojó una asociación con la protección fue la predominancia del isotipo IgG2b en los sueros de ratones que recibieron vacunas contra aftosa y que estaban protegidos frente al desafío viral, por lo tanto, este isotipo fue utilizado como un indicador para estimar la protección. En los antecedentes descriptos en ratones (Pérez Filgueira y col., 1995) y en bovinos (Lavoria y col., 2012) se observó una inducción diferencial de los isotipos en los animales que están protegidos frente al VFA respecto a los que no lo estaban. Se sabe que los complejos antígeno-anticuerpo, son captados por los fagocitos que poseen receptores para Fc $\gamma$ I y que en bovinos se une con mayor eficiencia, a los isotipos IgG1 e IgG3 mientras que en ratones, el receptor de Fc $\gamma$ I se une a los isotipos IgG2a e IgG2b. De acuerdo con Klauss y col (1979) y Kipps y col (1985), IgG2a e IgG2b son los isotipos más efectivos en la activación del complemento así también como en la respuesta inmune celular mediada por anticuerpos. Esta predominancia del isotipo IgG2b estaría de acuerdo a la hipótesis de McCullough y col (1992) quienes proponen que la protección eficaz contra VFA se lleva a cabo a través de la fagocitosis mediada por anticuerpos de las partículas virales.

Por otro lado, Batista y col. (2010), utilizando el modelo murino, demostraron que la incorporación de ciertos inmunomoduladores aumentaba significativamente los títulos de isotipos más eficientes en la fijación del complemento en ratones, IgG2a e IgG2b, con un incremento de la protección inducida.

En vacunas de emergencia, tanto en cerdos, bovinos y en ratones se ha demostrado que la respuesta protectora es independiente de los anticuerpos neutralizantes (Salt y col., 1998; Barnett y col., 2002; Doel T. R. y col., 1994; Golde W. T. y col., 2005; Quattrocchi y col., 2011; Quattrocchi V. y col., 2014).

Otro de los parámetros evaluados en los que el análisis logístico arrojó una asociación con la protección fue el índice de avidéz, este índice, ha sido utilizado ampliamente para el estudio de la maduración de la inmunidad en enfermedades

como toxoplasmosis (Hosseini y col., 2010; Reza Bonyadi y col., 2012) y meningitis (Vermont y col., 2002).

En este trabajo de investigación, utilizando el modelo murino se determinó que ciertas vacunas que inducen protección en alto número de animales, con títulos de anticuerpos medidos por ELISA FL que no superan el punto de corte establecido ( $>2,11$ ), tienen un alto índice de avidéz, es decir la fuerza total del complejo VFA-anticuerpo es alta y por esta razón posiblemente la eliminación del virus es más eficiente. Por otro lado también se encontró que las vacunas que no indujeron altos niveles de protección en ratones, presentaban índices de avidéz más bajos, y sin embargo sus títulos de anticuerpos medidos por ELISA FL superaban el punto de corte. Esta correlación se observó, analizando los datos por grupo de animales que recibieron cada vacuna (promedio de los datos individuales) así como analizando los datos para cada animal en particular.

Además, como ya se mencionó en introducción, para el VFA está descrito en bovinos que el índice de avidéz correlaciona con la protección, independientemente del título de anticuerpos presentes en la circulación sanguínea. Las pruebas de protección cruzada realizadas en bovinos, demostraron que los animales que estaban protegidos contra el desafío heterólogo, tenían anticuerpos con un índice de avidéz más alto que los bovinos no protegidos. (Lavoria y col, 2012).

Se evaluó también, si la inducción de IgA en saliva podría relacionarse con los niveles de protección inducidos por la vacunación. Eble y col (2007) reportaron que en cerdos vacunados con alta concentración de VFA inactivado, la inducción de IgA presentó correlación con la protección. Adicionalmente, Cubillos y col. (2008) encontraron correlación entre IgA en mucosa y la protección inducida en cerdos vacunados con una vacuna a péptidos contra virus aftoso.

En nuestro modelo no se encontró asociación entre los niveles de IgA específica contra VFA y la protección, este resultado posiblemente puede estar asociado a la técnica utilizada para realizar el ensayo o a que la formulación de vacunas no está dirigido a estimular inmunidad de mucosa. Nuestros resultados están en

concordancia, con los obtenidos en cerdos (Pacheco y col., 2010), en donde la vacunación no generó una respuesta específica en mucosa de IgA.

Está bien descrito que el IFN- $\gamma$  interviene en el cambio de isotipo de las Igs secretadas por los linfocitos, llevando a un incremento de los isotipos IgG2a e IgG2b (Abbas y col., 2012). En este trabajo, se midieron los niveles IFN- $\gamma$  secretado por los esplenocitos de los ratones vacunados y se evaluó si este parámetro estaba correlacionado con la protección. Reportes previos indicaron que ovejas vacunadas contra fiebre aftosa y desafiadas con el VFA presentan IFN- $\gamma$  circulante en un nivel que se relaciona con la carga antigénica (Barnett y col., 2004). Asimismo, Parida y col. (2006) encontraron que la combinación del título seroneutralizante (Acs SN) y la producción de IFN $\gamma$  podría correlacionar mejor con el control de la replicación viral en bovinos que sólo los niveles de Acs SN.

En este trabajo de tesis, se encontró una asociación (87,5%) entre los niveles de IFN $\gamma$  y la protección en ratones. Sin embargo, este parámetro no se incluyó en el modelo logístico de predicción debido a su complejidad de realización del ensayo ya que es necesario sacrificar al animal antes del desafío y realizar la extracción del bazo y el cultivo de los esplenocitos por 72 horas.

Como se presentó en el capítulo de resultados, se empleó la técnica de regresión logística para la construcción del modelo de predicción de la protección en ratones, y por ende de bovinos. En una primera etapa se analizaron las regresiones simples para cada variable predictora título de anticuerpos séricos contra el virus O1 Campos medidos por ELISA fase líquida, relación entre isotipos IgG2b, IgG2a e IgG1 en suero, índice de avidéz de los mismos, títulos de IgA en saliva, títulos de IgG1 e IgG2b), seleccionando aquellas variables asociadas a valores  $p < 0.25$  para incorporarlas en un modelo múltiple. Se analizaron tres modelos múltiples de similar poder predictivo, seleccionando el más parsimonioso como el óptimo. Para la selección del modelo se consideró el criterio de Akaike (el menor AIC) y el área bajo la curva ROC.

Akaike (1973) propuso un criterio de selección de modelo que mide el "ajuste" de un modelo dado, maximizando el valor de la función de máxima verosimilitud con

el uso de diferentes funciones de costos para tomar en cuenta el hecho de que diferentes números de parámetros desconocidos pudieron haber sido estimados para diferentes modelos bajo consideración; por otro lado, la curva ROC constituye un método estadístico para determinar la exactitud diagnóstica del modelo, siendo utilizada para evaluar la capacidad discriminativa del test diagnóstico, es decir, su capacidad de diferenciar animales protegidos de no protegidos. El modelo murino desarrollado en este trabajo, presenta una curva ROC con un valor de 0,80 lo que indica una buena discriminación, donde la probabilidad de detectar un evento verdadero (sensibilidad) y un falso evento (especificidad), aumenta cuanto mayor sea el área bajo la curva, y por lo tanto más verdaderos positivos y verdaderos negativos son detectados por la prueba, minimizando el número de falsos positivos.

El modelo logístico final, más parsimonioso, incluyó 3 variables: título de anticuerpos por ELISA FL (en Sudamérica, el ELISA FL es el parámetro utilizado en bovinos para predecir la probabilidad que tiene esa vacuna de inducir protección) y nuevas variables, las cuales podrían compensar los resultados en casos en los que la concordancia anticuerpos-protección no se produjeran. Se incluyeron, la relación de los isotipos IgG2b/IgG1 y el índice de avidéz. A partir de este modelo fue posible discriminar entre animales protegidos y no protegidos, sin la necesidad de la utilización de virus infeccioso.

El modelo logístico de predicción de protección también se sometió a la evaluación de la concordancia con la protección real en ratón obtenida a partir de la prueba de desafío. Los resultados obtenidos se caracterizaron por una gran concordancia (93%), con un porcentaje mínimo de falsos negativos (7%) y sin la presencia de falsos positivos. Esto significa, que es posible evitar el uso de virus infeccioso para realizar la predicción de la protección y sólo medir niveles de Acs (ELISA FL), isotipos y avidéz que sólo requieren virus inactivado e incluso en el futuro podrían utilizarse cápsides vacías recombinantes que expresen los antígenos inmunodominantes de la cepa de VFA de interés.

Este importante resultado, alentó a la realización del cálculo de la concordancia entre la eficacia de las vacunas predicha por el modelo logístico y la eficacia obtenida en bovinos por la prueba de PGP.

Esta evaluación se realizó con 16 vacunas (comerciales y experimentales de plantas productoras de vacunas). La concordancia obtenida entre la protección estimada por el modelo y la obtenida por la prueba PGP en bovinos fue de un 88% asociado a un índice Kappa de 0,75. Este índice Kappa fue superior al reportado por Maradei y col (2008) que fue de 0,62 al comparar el método gold estándar (PGP) con el nivel de anticuerpos medido por ELISA FL a 60 días post vacunación en bovinos.

El valor p calculado por el test exacto de Fisher arrojó un valor de 0,01 para el intervalo de confianza del 95%. El índice kappa de 0,75, representa una muy buena concordancia ya que puede tomar valores entre 0 y 1; mientras más cercano a 1, mayor es el grado de concordancia. Este índice podría superarse fácilmente evaluando un número mayor de vacunas.

Por otro lado, los datos de la concordancia fueron similares a los datos obtenidos cuando se compararon los resultados de las pruebas de protección en ratón y en bovino. Es decir, los resultados falsos negativos estuvieron presentes en un bajo porcentaje y en ningún caso se presentaron resultados falsos positivos.

En conclusión, todos estos resultados indican que el modelo logístico con las tres medidas de inmunidad humoral (anticuerpos por ELISA FL, relación de isotipos IgG2b/IgG1 y el índice de avidéz), podría ser usado para la evaluación de la eficacia de las vacunas contra el VFA serotipo O1 Campos.

El uso de un modelo logístico que utilice varios parámetros de inmunidad humoral para predecir los porcentajes de protección de una vacuna, permite evaluar no solo el nivel de anticuerpos contra el virus presente en el suero, sino también la calidad de los mismos.

## **Estandarización de métodos y caracterización de la infección para VFA**

### **A2001 en ratones BALB/c**

Como los resultados en el modelo murino para la evaluación de vacunas contra VFA O1 Campos fueron estadísticamente significativos en cuanto a la correlación con los resultados obtenidos en bovinos, en este trabajo de investigación se propuso también estudiar la eficacia del modelo para la evaluación de vacunas contra el VFA cepa A2001 de gran importancia en nuestro país. Esta cepa también está presente en la vacuna comercial y no fue incluido en estudios previos realizados en el Instituto de Virología (Dus Santos y col., 2000), por otro lado, nunca fue descrita su infección en la cepa de ratones BALB/c.

García Nuñez y col (2010) compararon la infección producida por VFA A2000 y A2001 en ratones de la cepa C57; observaron, al igual que lo que sucedió en los brotes con estas cepas, que el VFA A2001 resulta tener un mayor grado de virulencia en el modelo murino, siendo necesaria una dosis 5 veces menor que para la cepa VFA A2000 para la infección de los mismos. Este resultado indica la similitud en el comportamiento del virus al infectar al ratón C57 y al bovino y por esta razón, en este trabajo de investigación se desarrollaron las técnicas apropiadas para comprobar la correlación del modelo murino que en este trabajo utiliza la cepa BALB/c con la especie blanco en cuanto a la eficacia de las vacunas.

Se estandarizaron el ELISA FL y la prueba de desafío del mismo modo que se realizó para VFA O1 Campos, con el fin de obtener una mejor predicción de la eficacia de las vacunas por parte del modelo. Se realizaron pruebas para la determinación de la repetibilidad de la técnica teniendo en cuenta los sueros controles y sueros de referencia; resultando en todos los casos valores de coeficiente de variación bajos, menores al 10%, aceptados por la OIE.

Por otro lado, se sabe que la progresión de la enfermedad y la capacidad del virus de generar una sintomatología depende de 3 factores, la vía de inoculación empleada, la cepa de ratón y el serotipo de virus utilizado para la infección (Salguero y col., 2005 y Arzt y col., 2014). Se ha descrito además que el serotipo A, tanto A22

(Salguero y col., 2005) como A2001 (García Nuñez y col., 2010) genera sintomatología y produce la muerte de ratones de la cepa C57.

Los resultados obtenidos en esta tesis reflejan que la cantidad de VFA A2001 necesario para infectar el 100% de los ratones, es 100 veces menor a la requerida cuando se infecta con VFA O1 Campos, esto se debe probablemente a la virulencia de esta cepa, resultados similares fueron reportados por, García Nuñez y col., 2010, quienes, como se mencionó, demostraron que el VFA A2001, resultó ser muy virulento al inocularlo en ratones de la cepa C57. Esta cepa a su vez también resultó ser muy virulenta en el ganado bovino en comparación a la cepa A/Arg/2000 (García Nuñez y col., 2010).

Por otro lado, se determinó que el VFA A2001, a diferencia de lo que ocurre con O1Campos, a las 48 hpi produce una enfermedad aguda en los ratones BALB/c, clínicamente manifiesta, con una sintomatología característica del virus reportada anteriormente por Salguero y col (2005) en otras cepas de ratones y con otros serotipos de VFA. La supervivencia de los ratones también se vio afectada, ya que a las 96 hpi el 60% de los ratones murieron, dato muy diferente al obtenido con los ratones infectados con O1 Campos donde los animales sobrevivieron en el 100% de los casos.

Cabe destacar que, se demostró que virus VFA A2001 también está presente en todos los órganos analizados y desde el punto de vista histológico, sólo el páncreas se vio afectado con lesiones muy diferentes a las producidas por el serotipo O1 Campos. Estas consistieron, como se mencionó en resultados, en una degeneración celular marcada con necrosis, en la mayoría de los casos involucró a la totalidad de los acinos. En los acinos menos afectados las lesiones eran similares a las producidas por O1 Campos. Las grandes lesiones producidas a las 24 hs de la infección en el páncreas podrían ser las desencadenantes de la sintomatología observada 48 hs después. A las 24 hpi no se detectaron lesiones en bazo, hígado o pulmón, sin embargo, estas podrían haberse manifestado cuando se tomaron las muestras.

### **Predicción de la respuesta inmune contra VFA A2001**

Una vez estandarizadas las técnicas a utilizar, se corroboró la capacidad que posee el ratón para generar una respuesta dependiente de la dosis de VFA inactivo presente en la vacuna en cuanto al título de anticuerpos y al desafío viral, luego de la inoculación con formulaciones vacunales que contenían VFA A2001 con diferente masa antigénica. La curva dosis-respuesta generada fue similar a la obtenida cuando se vacunan ratones con diferentes dosis de VFA O1 Campos, demostrando que el ratón puede detectar diferentes concentraciones de este antígeno viral.

Como se determinó en este trabajo, la protección en el modelo murino se puede utilizar para predecir el comportamiento de la respuesta inmune de bovinos vacunados frente al desafío y la respuesta de anticuerpos.

Se compararon los títulos de anticuerpos medidos por ELISA FL en ambas especies de una serie de vacunas obteniéndose resultados similares en cuanto al nivel de anticuerpos inducidos por las vacunas en bovinos y en ratones. Debido al bajo número de pruebas de desafío realizadas en nuestro país para este serotipo, el modelo para VFA A2001 aún no puede determinarse de una manera estadística. Si bien no se han realizado estudios para la medición de isotipos, índice de avidéz, IgA ni IFN $\gamma$ , se propone que los resultados serán similares a los obtenidos para VFA O1 Campos, teniendo en cuenta las bases inmunológicas del modelo murino.

### **Predicción de la protección heteróloga**

Las vacunas comercializadas en la Argentina, incluyen en su formulación las cepas O1 Campos, A2001, A24 Cruzeiro y C3 Indaial. Considerando que el VFA es un virus con alta variabilidad y que no existe protección cruzada entre los distintos serotipos, y solo una parcial inmunidad cruzada entre los múltiples subtipos reportados dentro de los serotipos mencionados (Broosky, 1982; Mattion y col., 2004), la selección de una cepa de vacuna apropiada es un elemento importante para el control de la FA. Cambios en la antigenicidad e inmunogenicidad que pueden ocurrir, particularmente en áreas endémicas, resultan de gran importancia para los programas de control dado que el nivel de protección de una población vacunada depende no

solo de la potencia de la vacuna y de los esquemas de revacunación aplicados, sino también de la homología entre la cepa vacunal y la cepa de campo.

Recientemente se realizaron pruebas de protección heteróloga en bovinos para determinar la eficacia de la vacunación con una cepa de virus A en la protección de otra cepa no relacionada, se utilizaron las cepas A24 y A2001 (Goris y col., 2008). En el modelo murino se utilizaron vacunas monovalentes de A24, para probar la eficacia de la protección heteróloga (A2001) en el modelo y poder predecir la protección cruzada además de la protección homóloga.

Los resultados preliminares obtenidos a partir de la prueba de vacunación con la cepa A24 y el desafío con VFA A2001 indicarían que el modelo murino es capaz de predecir la protección homóloga y además de predecir la protección heteróloga para los VFA A24 y A2001.

En resumen:

En este trabajo se utilizó el modelo murino para inferir la capacidad de inducir protección de las vacunas contra VFA en bovinos ya que existen muchas evidencias que reflejan correlaciones de la respuesta inmune del ratón y del bovino.

El uso de un método alternativo como el modelo murino, que presenta una buena correlación y robustez con las pruebas de desafío en bovinos (PGP) para la evaluación de vacunas contra aftosa, representa un avance importantísimo para el reemplazo del uso de bovinos en pruebas de potencia. Esto no sólo significaría disminuir los costos de las pruebas de desafío en animales sino que, además, estaría en concordancia con el consenso internacional existente para alcanzar el concepto de las 3R: Reducir, Reemplazar y Refinar el uso de animales a fin de lograr un sistema económico, útil y efectivo para controlar los biológicos veterinarios

Por otro lado, en este trabajo se propone evitar el uso de VFA O1 Campos infectivo en la evaluación de vacunas contra aftosa, lo que permitiría realizar esta evaluación sin los requerimientos de un laboratorio de alta bioseguridad, teniendo en cuenta que el serotipo O es el causal de la mayoría de los brotes a nivel global, por lo tanto es el serotipo más utilizado en vacunas.

Los bovinos utilizados en las pruebas de potencia deben ser libres de anticuerpos específicos contra el VFA, esto requiere que se utilicen animales de la zona libre de vacunación (significativamente más costosos que los de la zona de vacunación) y ser trasladados al campo experimental de SENASA a ser vacunados. Este traslado incrementa los costos y el desgaste de los animales, que deben cumplir con un descanso apropiado previo a la vacunación.

Es la primera vez que se presenta este modelo con métodos estadísticamente contundentes, estandarizado para el serotipo O, usando como prototipo la cepa O1 Campos que puede utilizarse para evaluar la calidad de una vacuna contra la cepa O1 Campos.

Posiblemente el modelo murino podrá predecir además el comportamiento de las vacunas frente al desafío contra el serotipo VFA A2001 por lo que hemos presentado hasta ahora en este trabajo de tesis, aún falta realizar la estandarización de los métodos pero los resultados continúan siendo alentadores.

En este trabajo, se demostró con un fundamento estadísticamente válido los paralelismos entre ambas especies en cuanto a la respuesta inmune generada por la vacunación. La concordancia fue establecida en el nivel de anticuerpos específicos y la protección inducida luego del desafío. Se incluyeron otros parámetros inmunológicos en el ratón que permitieron complementar los indicadores de protección evitando así el uso de la especie bovina y la manipulación de virus infeccioso.

## BIBLIOGRAFIA

- Agresti, A. (1996). *An introduction to categorical Data Analysis. Annual Review of Sociology* (Vol. 22). <http://doi.org/10.1198/jasa.2008.s251>
- Akaike, H. (1973). Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. In B. N. Petrov and F. Csaki (Eds.), *Second international symposium on information theory* (pp. 267-281). Budapest: Akademiai Kiado.
- Alexandersen, S., Brotherhood, I., & Donaldson, A. I. (2002). Natural aerosol transmission of foot-and-mouth disease virus to pigs: minimal infectious dose for strain O1 Lausanne. *Epidemiology and Infection*, 128(2), 301–312.
- Alexandersen, S., & Mowat, N. (2005). Foot-and-mouth disease virus: host range and pathogenesis. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 288, 9–42.
- Alexandersen, S., Zhang, Z., Donaldson, A. I., & Garland, A. J. (2003). The pathogenesis and diagnosis of foot-and-mouth disease. *J Comp Pathol*, 129(1), 1–36.
- Alonso, A., Gomes, M. P. D., Martins, M. A., & Sondahl, M. S. (1990). Detection of foot-and-mouth disease virus infection-associated antigen antibodies: comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay and agar gel immunodiffusion tests. *Preventive Veterinary Medicine*, 9(3), 223-240.
- Altman, D. G. (1991). Statistics in medical journals: developments in the 1980s. *Statistics in medicine*, 10(12), 1897-1913.
- Augé de Melo, P. A., Astudillo, V., Gomes, I., & Garcia, J. C. (1977). Immune response of adult cattle vaccinated with oil-adjuvanted foot-and-mouth disease vaccines. *Bol Cent Panam Fiebre Aftosa*, 26, 27-29.
- Arzt, J., Pacheco, J. M., Smoliga, G. R., Tucker, M. T., Bishop, E., Pauszek, S. J., Rodriguez, L. L. (2014). Foot-and-mouth disease virus virulence in cattle is co-determined by viral replication dynamics and route of infection. *Virology*, 452-453, 12–22.
- Bachmann, M. F., McKall-Faienza, K., Schmits, R., Bouchard, D., Beach, J., Speiser, D. E., Ohashi, P. S. (1997). Distinct roles for LFA-1 and CD28 during activation of naive T cells: adhesion versus costimulation. *Immunity*, 7(4), 549-557.
- Bachmann, M. F., & Zinkernagel, R. M. (1997). Neutralizing antiviral B cell responses. *Annual review of immunology*, 15(1), 235-270.
- Bachrach, H. L. (1968). Foot-and-mouth disease. *Annual Reviews in Microbiology*, 22(1), 201-244.
- 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.
- Balks, E., Wolf, C., Loessner, H., & Werner, E. (2011). Towards in Vitro Potency Testing of Inactivated Erysipelas Vaccines. *Potency Testing of Veterinary Vaccines for Animals: The Way From in Vivo to in Vitro*, 134, 37-44.
- Baltimore, D. (1966). Purification and properties of poliovirus double-stranded ribonucleic acid. *Journal of molecular biology*, 18(3), 421-428.

- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annual review of immunology*, 18(1), 767-811.
- Barnett, P. V., & Carabin, H. (2002). A review of emergency foot-and-mouth disease (FMD) vaccines. *Vaccine*, 20(11), 1505-1514.
- Barnett, P. V., Keel, P., Reid, S., Armstrong, R. M., Statham, R. J., Voyce, C., Cox, S. J. (2004). Evidence that high potency foot-and-mouth disease vaccine inhibits local virus replication and prevents the 'carrier' state in sheep. *Vaccine*, 22(9), 1221-1232.
- Battegay, M., Bachmann, M. F., Burkhart, C., Viville, S., Benoist, C., Mathis, D., Zinkernagel, R. M. (1996). Antiviral immune responses of mice lacking MHC class II or its associated invariant chain. *Cellular immunology*, 167(1), 115-121
- Bautista, E. M., Ferman, G. S., & Golde, W. T. (2003). Induction of lymphopenia and inhibition of T cell function during acute infection of swine with foot and mouth disease virus (FMDV). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 92(1-2), 61-73.
- Baxt, B., & Becker, Y. (1990). The effect of peptides containing the arginine-glycine-aspartic acid sequence on the adsorption of foot-and-mouth disease virus to tissue culture cells. *Virus Genes*, 4(1), 73-83.
- Baxt, B., Morgan, D. O., Robertson, B. H., & Timpone, C. A. (1984). Epitopes on foot-and-mouth disease virus outer capsid protein VP1 involved in neutralization and cell attachment. *Journal of virology*, 51(2), 298-305.
- Beck, E., & Strohmaier, K. (1987). Subtyping of European foot-and-mouth disease virus strains by nucleotide sequence determination. *Journal of Virology*, 61(5), 1621-1629.
- Bergmann, I. E., Malirat V., Neitzert, E., Beck E., Panizzutti N., Sánchez C., Falczuk A (2000) Improvement of a serodiagnostic strategy for foot-and-mouth disease virus surveillance in cattle under systematic vaccination: a combined system of an indirect ELISA-3ABC with an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay. *Arch Virol* 145: 473-489
- Bergmann, I, Malirat, V, Neitzert, E. (2005). Non-capsid proteins to identify foot-and-mouth disease viral circulation in cattle irrespective of vaccination. *Biologicals*, 33(4), 235-239.
- Belsham, G.J., McInerney, G.M., Ross-Smith, N., (2000). Foot-and-mouth disease virus 3C protease induces cleavage of translation initiation factors eIF4A and eIF4G within infected cells. *J. Virol.* 74, 272-280.
- Bittle, J. L., Houghten, R. A., Alexander, H., Shinnick, T. M., Sutcliffe, J. G., & Lerner, R. A. (1982). Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. *Nature*, 298, 30-33.
- Borca, M. V., Fernandez, F. M., Sadir, A. M., & Schudel, A. A. (1984). Reconstitution of immunosuppressed mice with mononuclear cells from donors sensitized to foot-and-mouth disease virus (FMDV). *Veterinary Microbiology*.
- Borca, M. V, Garmendia, A. E., Baxt, B., Moore, D. M., Srikumaran, S., & Morgan, D. O. (1993). Cross-reactive idiotopes among anti-foot and mouth disease virus neutralizing antibodies. *Immunology*, 79(3), 368-374.

- Botelho, F. M., Gaschler, G. J., Kianpour, S., Zavitz, C. C., Trimble, N. J., Nikota, J. K., Stämpfli, M. R. (2010). Innate immune processes are sufficient for driving cigarette smoke-induced inflammation in mice. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 42(4), 394-403.
- Bouvet, J. P., Decroix, N., & Pamonsinlapatham, P. (2002). Stimulation of local antibody production: parenteral or mucosal vaccination?. *Trends in immunology*, 23(4), 209-213.
- Bray, M., Davis, K., Geisbert, T., Schmaljohn, C., & Huggins, J. (1998). A mouse model for evaluation of prophylaxis and therapy of Ebola hemorrhagic fever. *The Journal of infectious diseases*, 651-661.
- 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, 1681-1687.
- Brito, B. P., Perez, A. M., & Capozzo, A. V. (2014). Accuracy of traditional and novel serology tests for predicting cross-protection in foot-and-mouth disease vaccinated cattle. *Vaccine*, 32(4), 433-436.
- Brown, C. C., Meyer, R. F., Olander, H. J., House, C., & Mebus, C. A. (1992). A pathogenesis study of foot-and-mouth disease in cattle, using in situ hybridization. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 56(3), 189.
- Brown, F. (2003). The history of research in foot-and-mouth disease. *Virus research*, 91(1), 3-7.
- Burman, A., Clark, S., Abrescia, N. G., Fry, E. E., Stuart, D. I., & Jackson, T. (2006). Specificity of the VP1 GH loop of foot-and-mouth disease virus for  $\alpha$ v integrins. *Journal of virology*, 80(19), 9798-9810.
- Burns, W. H., Billups, L. C., & Notkins, A. L. (1975). Thymus dependence of viral antigens. *Nature*
- 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.
- Capozzo, A. V. E., 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. [http://doi.org/10.1016/S0264-410X\(96\)00284-8](http://doi.org/10.1016/S0264-410X(96)00284-8)
- Chinsangaram, J., Moraes, M. P., Koster, M., & Grubman, M. J. (2003). Novel viral disease control strategy: adenovirus expressing alpha interferon rapidly protects swine from foot-and-mouth disease. *Journal of virology*, 77(2), 1621-1625.
- Collen, T., Pullen, L., & Doel, T. R. (1989). T cell-dependent induction of antibody against foot-and-mouth disease virus in a mouse model. *Journal of general virology*, 70(2), 395-403.
- Cottral, G. E., & Bachrach, H. L. (1968). Food-and-mouth disease viremia. In *Proceedings, annual meeting of the United States Animal Health Association* (Vol. 72, p. 383).

Cottral, G. E. (1969). Persistence of foot-and-mouth disease virus in animals, their products and the environment. *Office Int Epizoot Bull.*

Cubillos, C., Beatriz, G., Jakab, A., Clementi, G., Borrás, E., Bárcena, 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.

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.

De Mattia, F., Chapsal, J. M., Descamps, J., Halder, M., Jarrett, N., Kross, I., Hendriksen, C. (2011). The consistency approach for quality control of vaccines—a strategy to improve quality control and implement 3Rs. *Biologicals*, 39(1), 59-65.

Díaz-San Segundo, F., Rodríguez-Calvo, T., de Avila, A., & Sevilla, N. (2009). Immunosuppression during acute infection with foot-and-mouth disease virus in swine is mediated by IL-10. *PLoS One*, 4(5), e5659.

DiMarchi, R., Brooke, G., Gale, C., Cracknell, V., Doel, T., & Mowat, N. (1986). Protection of cattle against foot-and-mouth disease by a synthetic peptide. *Science*, 232(4750), 639-641.

Dimmock, N. J. (1993). IgG neutralization of type A influenza viruses and the inhibition of the endosomal fusion stage of the infectious pathway in BHK cells. *Virology*, 195(2), 413-421.

Dintzis, H. M., Dintzis, R. Z., & Vogelstein, B. (1976). Molecular determinants of immunogenicity: the immunon model of immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(10), 3671-3675.

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.

Domingo, E., Baranowski, E., Escarmis, C., Sobrino, F., (2002). Foot-and-mouth disease virus. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 25, 297–308.

Donaldson, A. I. (1972). The influence of relative humidity on the aerosol stability of different strains of foot-and-mouth disease virus suspended in saliva. *Journal of General Virology*, 15(1), 25-33.

Dozier, S., Brown, J., & Currie, A. (2011). Bridging the gap between validation and implementation of non-animal veterinary vaccine potency testing methods. *Animals*, 1(4), 414-432.

Drzeniek, R., & Bilello, P. (1974). Absence of glycoproteins in poliovirus particles. *Journal of General Virology*, 25(1), 125-132.

Dus Santos, M. J., Wigdorovitz, A., Maradei, E., Periolo, O., Smitsaart, E., Borca, M. V., & Sadir, A. M. (2000). A comparison of methods for measuring the antibody response in mice and cattle following vaccination against foot and mouth disease. *Vet Res Commun*, 24(4), 261–73.

- Dus Santos, M. J., Wigdorovitz, A., Trono, K., Ríos, R. D., Franzone, P. M., Gil, F. Borca, M. V. (2002). A novel methodology to develop a foot and mouth disease virus (FMDV) peptide-based vaccine in transgenic plants. *Vaccine*, 20(7-8), 1141–1147.
- Eblé, P. L., Bouma, A., De Bruin, M. G. M., van Hemert-Kluitenberg, F., Van Oirschot, J. T., & Dekker, A. (2004). Vaccination of pigs two weeks before infection significantly reduces transmission of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine*, 22(11), 1372-1378.
- Eble, P. L., Bouma, A., Weerdmeester, K., Stegeman, J. A., & Dekker, A. (2007). Serological and mucosal immune responses after vaccination and infection with FMDV in pigs. *Vaccine*, 25(6), 1043-1054.
- Fernández, F. M., Borca, M. V., Sadir, A. M., Fondevila, N., Mayo, J., & Schudel, A. A. (1986). Foot-and-mouth disease virus (FMDV) experimental infection: susceptibility and immune response of adult mice. *Veterinary Microbiology*, 12(1), 15–24.
- Ferrer-Orta, C., Arias, A., Escarmís, C., & Verdaguer, N. (2006). A comparison of viral RNA-dependent RNA polymerases. *Current opinion in structural biology*, 16(1), 27-34.
- Ferrer-Orta, C., Arias, A., Agudo, R., Pérez-Luque, R., Escarmís, C., Domingo, E., & Verdaguer, N. (2006). The structure of a protein primer–polymerase complex in the initiation of genome replication. *The EMBO journal*, 25(4), 880-888.
- Fogedby, E. (1962). *Review of epizootiology and control of foot-and-mouth disease in Europe from 1937 to 1961*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- García-Nuñez, S., König, G., Berinstein, A., & Carrillo, E. (2010). Differences in the virulence of two strains of Foot-and-Mouth Disease Virus Serotype A with the same spatiotemporal distribution. *Virus Research*, 147(1), 149–152.
- Garland, A. J. M. (1999). Vital elements for the successful control of foot-and-mouth disease by vaccination. *Vaccine*, 17(13), 1760-1766.
- Gerdts, V., Littel-van den Hurk, S. V. D., Griebel, P. J., & Babiuk, L. A. (2007). Use of animal models in the development of human vaccines.
- Goeckeritz, B. E., Flora, M., Witherspoon, K., Vos, Q., Lees, A., Dennis, G. J., Mond, J. J. (1999). Multivalent cross-linking of membrane Ig sensitizes murine B cells to a broader spectrum of CpG-containing oligodeoxynucleotide motifs, including their methylated counterparts, for stimulation of proliferation and Ig secretion. *International immunology*, 11(10), 1693-1700.
- 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.
- Goris, N., Maradei, E., D’Aloia, R., Fondevila, N., Mattion, N., Perez, A., De Clercq, K. (2008). Foot-and-mouth disease vaccine potency testing in cattle using homologous and heterologous challenge strains: precision of the “Protection against Podal Generalisation” test. *Vaccine*, 26(27), 3432-3437.

- Goris, N., Vandebussche, F., Herr, C., Villers, J., Van der Stede, Y., & De Clercq, K. (2009). Validation of two real-time RT-PCR methods for foot-and-mouth disease diagnosis: RNA-extraction, matrix effect, uncertainty of measurement and precision. *Journal of virological methods*, 160(1), 157-162
- Granelli-Piperno, A., Golebiowska, A., Trumpfheller, C., Siegal, F. P., & Steinman, R. M. (2004). HIV-1-infected monocyte-derived dendritic cells do not undergo maturation but can elicit IL-10 production and T cell regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(20), 7669-7674.
- Griffin, J. F. T. (2002). A strategic approach to vaccine development: animal models, monitoring vaccine efficacy, formulation and delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 54(6), 851-861
- Grubman, M. J., & Baxt, B. (2004). Foot-and-mouth disease. *Clinical microbiology reviews*, 17(2), 465-493.
- Grubman, M. J., Robertson, B. H., Morgan, D. O., Moore, D. M., & Dowbenko, D. (1984). Biochemical map of polypeptides specified by foot-and-mouth disease virus. *Journal of virology*, 50(2), 579-586.
- Guía para la atención de focos y situaciones de emergencia sanitarias de Fiebre Aftosa 2013. <http://www.fao.org/3/a-i3168s.pdf>
- Hamblin, C., Kitching, R. P., Donaldson, A. I., Crowther, J. R., & Barnet, I. T. R. (1987). Enzyme linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against FMDV. III Evaluation of antibodies after infection and vaccination. *Epidemiol. Infect*, 99, 733.
- Hilleman, M. R. (2004). Strategies and mechanisms for host and pathogen survival in acute and persistent viral infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(suppl 2), 14560-14566
- Hosmer, D. W., & Lemeshow, S. (1989). Applied regression analysis. New York, John Willey.
- Houtman, J. J., & Fleming, J. O. (1996). Dissociation of demyelination and viral clearance in congenitally immunodeficient mice infected with murine coronavirus JHM. *Journal of neurovirology*, 2(2), 101-110.
- Hu, S. (1987). Akaike information criterion statistics. *Mathematics and Computers in Simulation*, 29(5), 452. [http://doi.org/10.1016/0378-4754\(87\)90094-2](http://doi.org/10.1016/0378-4754(87)90094-2)
- 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 naive cattle. *Journal of virology*, 83(8), 3626-3636.
- Kipps, T.J., Parham, P., Punt, J and Herzemberg, L.A. Importance of immunoglobulin isotype in human antibody-dependent, cell-mediated cytotoxicity directed by murine monoclonal antibodies J. Exp. Med. 1985, 161, 1-17
- Klaus, G.G.B., Pepys, M.B., Kitajina, K. and Asconas, B.A. Activation of mouse complement by different classes of mouse antibody. J. Immun. 1979, 38, 687-695

- Kleina, L.G., Grubman, M.J., (1992). Antiviral effects of a thiol protease inhibitor on foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 66, 7168–7175.
- Knowles, N. J., & Samuel, A. R. (2003). Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus. *Virus research*, 91(1), 65-80.
- Koyama, S., Aoshi, T., Tanimoto, T., Kumagai, Y., Kobiyama, K., Tougan, T., Ishii, K. J. (2010). Plasmacytoid dendritic cells delineate immunogenicity of influenza vaccine subtypes. *Science translational medicine*, 2(25), 25ra24-25ra24.
- Kulpa-Eddy, J., Srinivas, G., Halder, M., Brown, K., Draayer, H., Galvin, J., Jones, B. (2011). Alternative methods and strategies to reduce, refine, and replace animal use for veterinary vaccine post-licensing safety testing: state of the science and future directions. *Procedia in Vaccinology*, 5, 106-119.
- Langellotti, C. A., Pappalardo, J. S., Quattrocchi, V., Mongini, C., & Zamorano, P. (2011). Induction of specific cytotoxic activity for bovine herpesvirus-1 by DNA immunization with different adjuvants. *Antiviral Research*, 90(3), 134–142.
- Langellotti, C., Quattrocchi, V., Alvarez, C., Ostrowski, M., Gnazzo, V., Zamorano, P., & Vermeulen, M. (2012). Foot-and-mouth disease virus causes a decrease in spleen dendritic cells and the early release of IFN- $\alpha$  in the plasma of mice. Differences between infectious and inactivated virus. *Antiviral Research*, 94(1), 62–71.
- Lavoria, M. ángeles, 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.
- Lawrence, P., Schafer, E.A., Rieder, E., (2012). The nuclear protein Sam68 is cleaved by the FMDV 3C protease redistributing Sam68 to the cytoplasm during FMDV infection of host cells. *Virology* 425, 40–52.
- Lee, K. N., Kang, H. S., Jeon, J. H., Kim, E. M., Yoon, S. R., Song, H., Song, S. S. (2005). VDUP1 is required for the development of natural killer cells. *Immunity*, 22(2), 195-208.
- Lewis-Rogers, N., & Crandall, K. A. (2010). Evolution of Picornaviridae: an examination of phylogenetic relationships and cophylogeny. *Molecular phylogenetics and evolution*, 54(3), 995-1005.
- Llamosa R, Contretas M, Botero (2007) Study Of Repetibility And Reproducibility Using The Method Of Averages And Ranges For The Insurance Of The Quality Of The Results Of Calibration Of Agreement With The Technical Norm Ntc-Iso/Iec 17025. *Scientia et Technica* Año XIII, No 35, Agosto de 2007. Universidad Tecnológica de Pereira. ISSN 0122-1701.
- Logan, D., Abu-Ghazaleh, R., Blakemore, W., Curry, S., Jackson, T., King, A., Rowlands, D. (1993). Structure of a major immunogenic site on foot-and-mouth disease virus.
- Lopez, O. J., Sadir, A. M., Borca, M. V., Fernandez, F. M., Braun, M., & Schudel, A. A. (1990). Immune response to foot-and-mouth disease virus in an experimental murine model II. Basis of persistent antibody reaction. *Veterinary immunology and immunopathology*, 24(4), 313-321.

- Luo, M., Rossmann, M. G., & Palmenberg, A. C. (1988). Prediction of three-dimensional models for foot-and-mouth disease virus and hepatitis A virus. *Virology*, *166*(2), 503-514.
- Malirat, V., Bergmann, I. E., de Mendonça Campos, R., Conde, F., Quiroga, J. L., Villamil, M., Ortiz, S. (2012). Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus type A in South America. *Veterinary microbiology*, *158*(1), 82-94.
- 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 aphthovirus vaccines in Argentina. *Vaccine*, *26*(51), 6577-6586.
- Maradei, E., Malirat, V., Beascochea, C. P., Benitez, E. O., Pedemonte, A., Seki, C., Mattion, N. (2013). Characterization of a type O foot-and-mouth disease virus re-emerging in the year 2011 in free areas of the Southern Cone of South America and cross-protection studies with the vaccine strain in use in the region. *Veterinary microbiology*, *162*(2), 479-490.
- Mateu, M. G., Valero, M. L., Andreu, D., & Domingo, E. (1996). Systematic replacement of amino acid residues within an Arg-Gly-Asp-containing loop of foot-and-mouth disease virus and effect on cell recognition. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(22), 12814-1281.
- Mattion, N., Goris, N., Willems, T., Robiolo, B., Maradei, E., Beascochea, C. P. La Torre, J. (2009). Some guidelines for determining foot-and-mouth disease vaccine strain matching by serology. *Vaccine*, *27*(5), 741-747.
- Mattion, N., König, G., Seki, C., Smitsart, 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.
- McCullough, K. C., Parkinson, D., & Crowther, J. R. (1988). Opsonization-enhanced phagocytosis of foot-and-mouth disease virus. *Immunology*, *65*(2), 187.
- 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.
- Melo, E. C., 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-Office international des épizooties*, *21*(3), 429-433.
- Mignaqui, A. C., Ruiz, V., Perret, S., St-Laurent, G., Chahal, P. S., 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.
- Molin-Capeti, K. C., Sepulveda, L., Terra, F., Torres-Pioli, M. F., Costa-Casagrande, T., Fran??a, S. C., & Thomaz-Soccol, V. (2013). A proposal for an alternative quality control test procedure for inactivated vaccines against food-and-mouth disease virus. *Vaccine*, *31*(9), 1349-1352.

Monaghan, P., Cook, H., Jackson, T., Ryan, M., & Wileman, T. (2004). The ultrastructure of the developing replication site in foot-and-mouth disease virus-infected BHK-38 cells. *Journal of general virology*, 85(4), 933-946.

Moscufo, N., Yafal, A. G., Rogove, A., Hogle, J., & Chow, M. (1993). A mutation in VP4 defines a new step in the late stages of cell entry by poliovirus. *Journal of virology*, 67(8), 5075-5078.

Mulcahy, G., O'CONNOR, F., Clery, D., Hogan, S. F., Dowd, A. J., Andrews, S. J., & Dalton, J. P. (1999). Immune responses of cattle to experimental anti-Fasciola hepaticavaccines. *Research in veterinary science*, 67(1), 27-33. Knox y col., 2005

Newman, J. F., & Brown, F. (1997). Foot-and-mouth disease virus and poliovirus particles contain proteins of the replication complex. *Journal of virology*, 71(10), 7657-7662.

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*, 91(2), 733-737.

Oei, H. L. (2011). The Quantitative ELISA for Inactivated Newcastle Disease Virus Antigen: Development of the Test System and the Way to. *Potency Testing of Veterinary Vaccines for Animals: The Way From in Vivo to in Vitro*, 134, 51-53.

OIE., 2008 Evaluation of Performance of Veterinary Services using the OIE PVS Tool.

OIE, 2013 Principles And Methods Of Validation Of Diagnostic Assays For Infectious Diseases.

OIE, 2015 [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal\\_Health\\_in\\_the\\_World/map/E\\_Argentina.jpg](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/map/E_Argentina.jpg)

OIE 2017 <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/estatus-sanitario-oficial/fiebre-aftosa/lista-de-los-miembros-libres-de-fiebre-aftosa/#c222>.

Ojosnegros, S., Agudo, R., Sierra, M., Briones, C., Sierra, S., González-López, C., Cristina, J. (2008). Topology of evolving, mutagenized viral populations: quasispecies expansion, compression, and operation of negative selection. *BMC evolutionary biology*, 8(1), 1.

Olascoaga, R. C., Gomes, I., Rosenberg, F. J., De Mello, P. A., Astudillo, V. M., & Magallanes, N. (1999). *Fiebre aftosa*. Centro Panamericano de Fiebre Aftosa.

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.

PANAFTOSA de Fiebre Aftosa, C. P. (1994). Catálogo de Publicaciones 1952-1993., *Río de Janeiro*, 1-90.

Pacheco, J. M., Brum, M. C. S., Moraes, M. P., Golde, W. T., & Grubman, M. J. (2005). Rapid protection of cattle from direct challenge with foot-and-mouth disease virus (FMDV) by a single inoculation with an adenovirus-vectored FMDV subunit vaccine. *Virology*, 337(2), 205–209.

- 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.
- Parreño, V., López, M. V., Rodríguez, D., Vena, M. M., Izuel, M., Filippi, J., Marangunich, L. (2010). Development and statistical validation of a guinea pig model for vaccine potency testing against Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) virus. *Vaccine*, 28(13), 2539–2549 Paul y col., 1998
- Filgueira, D. P., Berinstein, A., Smitsaart, E., Borca, M. V., & Sadir, A. M. (1995). Isotype profiles induced in Balb/c mice during foot and mouth disease (FMD) virus infection or immunization with different FMD vaccine formulations. *Vaccine*, 13(10), 953-960. Pecker, 2007
- Piatti, P. G., Berinstein, A., Lopez, O. J., Borca, M. V., Fernandez, F., Schudel, A. A., & Sadir, A. M. (1991). Comparison of the immune response elicited by infectious and inactivated foot-and-mouth disease virus in mice. *Journal of general virology*, 72(7), 1691-1694.
- Pizzi, J. C. (1998). *La fiebre aftosa en Argentina*. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires.
- Pulendran, B., Banchereau, J., Maraskovsky, E., & Maliszewski, C. (2001). Modulating the immune response with dendritic cells and their growth factors. *Trends in immunology*, 22(1), 41-47.
- Pulido, M. R., Sobrino, F., Borrego, B., & Sáiz, M. (2009). Attenuated foot-and-mouth disease virus RNA carrying a deletion in the 3' noncoding region can elicit immunity in swine. *Journal of virology*, 83(8), 3475-3485.
- Quattrocchi, V., Bianco, V., Fondevila, N., Pappalardo, S., Sadir, A., & Zamorano, P. (2004). Use of new adjuvants in an emergency vaccine against foot-and-mouth disease virus: evaluation of conferred immunity. *Developments in Biologicals*, 119, 481–497.
- Quattrocchi, V., Molinari, P., Langellotti, C., Gnazzo, V., Taboga, O., & Zamorano, P. (2013). Co-inoculation of baculovirus and FMDV vaccine in mice, elicits very early protection against foot and mouth disease virus without interfering with long lasting immunity. *Vaccine*, 31(24), 2713–2718.
- Quattrocchi, V., Pappalardo, J. S., Langellotti, C., Smitsaart, E., Fondevila, N., & Zamorano, P. (2014). Early protection against foot-and-mouth disease virus in cattle using an inactivated vaccine formulated with Montanide ESSAI IMS D 12802 VG PR adjuvant. *Vaccine*, 32(19), 2167–2172. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.02.061>
- Quattrocchi, V., Langellotti, C., Pappalardo, J. S., Olivera, V., Di Giacomo, S., van Rooijen, N., & Zamorano, P. I. (2011). Role of macrophages in early protective immune responses induced by two vaccines against foot and mouth disease. *Antiviral research*, 92(2), 262-270.
- Rai, S. K., Cheung, D. S., Wu, M. S., Warner, T. F., & Salvato, M. S. (1996). Murine infection with lymphocytic choriomeningitis virus following gastric inoculation. *Journal of virology*, 70(10), 7213-7218.

- Redhead, K., Wood, K., & Jackson, K. (2011). Testing of veterinary clostridial vaccines: from mouse to microtitre plate. *Potency Testing of Veterinary Vaccines for Animals: The Way From in Vivo to in Vitro*, 134, 45-50.
- Reeve, R., Cox, S., Smitsaart, E., Beascochea, C. P., Haas, B., Maradei, E. & Barnett, P. (2011). Reducing animal experimentation in foot-and-mouth disease vaccine potency tests. *Vaccine*, 29(33), 5467-5473.
- Reid, S. M., Forsyth, M. A., Hutchings, G. H., & Ferris, N. P. (1998). Comparison of reverse transcription polymerase chain reaction, enzyme linked immunosorbent assay and virus isolation for the routine diagnosis of foot-and-mouth disease. *Journal of virological methods*, 70(2), 213-217.
- Bonyadi, M. R., & Bastani, P. (2013). Modification and evaluation of avidity IgG testing for differentiating of *Toxoplasma gondii* infection in early stage of pregnancy. *Cell J*, 15, 238-43.
- Robertson, B. H., Grubman, M. J., Weddell, G. N., Moore, D. M., Welsh, J. D., Fischer, T. & Kleid, D. G. (1985). Nucleotide and amino acid sequence coding for polypeptides of foot-and-mouth disease virus type A12. *Journal of virology*, 54(3), 651-660.
- Robiolo B, Grigera PR, Periolo OH, Seki C, Bianchi T, Maradei E. (1995) Assessment of foot and mouth disease vaccine potency by liquid-phase blocking ELISA: a proposal for an alternative to the challenge procedure in Argentina. *Vaccine* 13.
- Robiolo, B., La Torre, J., Maradei, E., Beascochea, C. P., Perez, A., Seki, C., Mattion, N. (2010). Confidence in indirect assessment of foot-and-mouth disease vaccine potency and vaccine matching carried out by liquid phase ELISA and virus neutralization tests. *Vaccine*, 28(38), 6235–6241.
- Romanutti, C., D'Antuono, A., Palacios, C., Quattrocchi, V., Zamorano, P., La Torre, J., & Mattion, N. (2013). Evaluation of the immune response elicited by vaccination with viral vectors encoding FMDV capsid proteins and boosted with inactivated virus. *Veterinary Microbiology*, 165(3-4), 333–340.
- Rueckert, R. R. (1996). Picornaviridae: the viruses and their replication. *Fields virology*, 1, 609-654.
- Rueckert, R. R., & Wimmer, E. C. K. A. R. D. (1984). Systematic nomenclature of picornavirus proteins. *Journal of virology*, 50(3), 957.
- Rweyemamu, M. M. (1984). Antigenic variation in foot-and-mouth disease: studies based on the virus neutralization reaction. *Journal of biological standardization*, 13(3), 323-337.
- Ryan, E. (2008). E. Ryan, J. Gloster, SM Reid, Y. Li, NP Ferris, R. Waters, N. Juleff, B. Charleston, B. Bankowski, S. Gubbins, JW Wilesmith, DP King, DJ Paton. *The Veterinary Record*, 163, 139-147.
- Salguero, F. J., Sánchez-Martín, M. A., Díaz-San Segundo, F., De Avila, A., & Sevilla, N. (2005). Foot-and-mouth disease virus (FMDV) causes an acute disease that can be lethal for adult laboratory mice. *Virology*, 332(1), 384–396.
- Sangar, D. V. (1979). The replication of picornaviruses. *Journal of General Virology*, 45(1), 1-13.

- Salt, J. S., Barnett, P. V., Dani, P., & Williams, L. (1998). Emergency vaccination of pigs against foot-and-mouth disease: protection against disease and reduction in contact transmission. *Vaccine*, *16*(7), 746-754.
- Sangar, D. V., Rowlands, D. J., Cavanagh, D., & Brown, F. (1976). Characterization of the minor polypeptides in the foot-and-mouth disease particle. *Journal of General Virology*, *31*(1), 35-46.
- Sanz-Ramos, M., Díaz-San Segundo, F., Escarmís, C., Domingo, E., & Sevilla, N. (2008). Hidden virulence determinants in a viral quasispecies in vivo. *Journal of virology*, *82*(21), 10465-10476.
- Schiffelers, M. J., Blaauboer, B., Bakker, W., & Hendriksen, C. (2014). Replacing the NIH test for rabies vaccine potency testing: A synopsis of drivers and barriers. *Biologicals*, *42*(4), 205-217.
- Scicluna, L. A., Bruckner, L., & McCullough, K. C. (2001). Qualitative assessment of the humoral immune status against FMDV in post-vaccination cattle. *Vaccine*, *19*(20), 2975-2986.
- Seki, C., Robiolo, B., Periolo, O., Iglesias, M., D'Antuono, A., Maradei, E., Mattion, N. (2009). Rapid methodology for antigenic profiling of FMDV field strains and for the control of identity, purity and viral integrity in commercial virus vaccines using monoclonal antibodies. *Veterinary microbiology*, *133*(3), 239-251.
- Serrano, P., Pulido, M.R., Saiz, M., Martinez-Salas, E., (2006). The 3' end of the foot-and-mouth disease virus genome establishes two distinct long-range RNA–RNA interactions with the 5' end region. *J. Gen. Virol.* *87*, 3013–3022.
- Shi, X. J., Wang, B., & Wang, M. (2007). Immune enhancing effects of recombinant bovine IL-18 on foot-and-mouth disease vaccination in mice model. *Vaccine*, *25*(7), 1257-1264.
- Skinner, H. H. (1951). Propagation of strains of foot-and-mouth disease virus in unweaned white mice. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, *44*(12), 1041.
- Sobrinho, F., Sáiz, M., Jiménez-Clavero, M. A., Núñez, J. I., Rosas, 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.
- Song, H., Wang, Z., Zheng, D., Fang, W., Li, Y., Liu, Y., Qiu, B. (2005). A novel mucosal vaccine against foot-and-mouth disease virus induces protection in mice and swine. *Biotechnology letters*, *27*(21), 1669-1674.
- Sugiura, K., Ogura, H., Ito, K., Ishikawa, K., Hoshino, K., & Sakamoto, K. (2001). Eradication of foot and mouth disease in Japan. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties*, *20*(3), 701-711.
- Sutmoller, P., & McVicar, J. W. (1976). Pathogenesis of foot-and-mouth disease: clearance of the virus from the circulation of cattle and goats during experimental viraemia. *Journal of Hygiene*, *77*(02), 245-253.
- Szomolanyi-Tsuda, E., & Welsh, R. M. (1996). T cell-independent antibody-mediated clearance of polyoma virus in T cell-deficient mice. *The Journal of experimental medicine*, *183*(2), 403-411.

- Talbot, P., Rowlands, D. J., Burroughs, J. N., Sangar, D. V., & Brown, F. (1973). Evidence for a group protein in foot-and-mouth disease virus particles. *Journal of General Virology*, 19(3), 369-380.
- Torres-Morales, E., & Gómez-Marín, J. E. (2008). Evaluating a toxoplasma IgG avidity ELISA test for diagnostic purposes during pregnancy and correlating it with Toxoplasma IgM and IgA in the biomedical research centre's laboratory at the Universidad del Quindío, 2008. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 59(3), 199-206.
- Turner, P. C., & Moyer, R. W. (2002). Poxvirus immune modulators: functional insights from animal models. *Virus research*, 88(1), 35-53.
- Vakharia V.N., Devaney, M.A., Moore, D.M., Dunn, J.J., Grubman, M.J., 1987. Proteolytic processing of foot-and-mouth disease virus polyproteins expressed in a cell-free system from clone-derived transcripts. *J. Virol.* 61, 3199–3207.
- Van Bekkum, J. G. (1969). Correlation between serum antibody level and protection against challenge with FMD. *Session of Research Group of the standing Technical Committee of the European Commission for the Control of Foot and Mouth Disease, Brescia, Italy, FAO*.
- Vasquez, C., Denoya, C. D., La Torre, J., & Palma, E. L. (1979). Structure of foot-and-mouth disease virus capsid. *Virology*, 97(1), 195-200.
- Vermont, C. L., van Dijken, H. H., Van Limpt, C. J. P., de Groot, R., van Alphen, L., & van den Dobbelsteen, G. P. (2002). Antibody avidity and immunoglobulin G isotype distribution following immunization with a monovalent meningococcal B outer membrane vesicle vaccine. *Infection and immunity*, 70(2), 584-590.
- Waal, M. R. (1997, June). The role of type I interferons in the differentiation and function of Th1 and Th2 cells. In *Seminars in oncology* (Vol. 24, No. 3 Suppl 9, pp. S9-94).
- Wichmann, D., Gröne, H. J., Frese, M., Pavlovic, J., Anheier, B., Haller, Feldmann, H. (2002). Hantaan virus infection causes an acute neurological disease that is fatal in adult laboratory mice. *Journal of virology*, 76(17), 8890-8899.
- Wigdorovitz A, S. A. (1996). [Mechanisms involved in the protein. *Rev Argent Microbiol* 1996 Jan-Mar. *PubMed - NCBI*, 28(1), 45–54.
- Zamorano, P. I., Wigdorovitz, A., Filgueira, D. P., Escribano, J. M., Sadir, A. M., & Borca, M. V. (1998). Induction of anti foot and mouth disease virus T and B cell responses in cattle immunized with a peptide representing ten amino acids of VP1. *Vaccine*, 16(6), 558-563.