

RESPUESTA INMUNITARIA EN LA DIARREA VIRICA BOVINA

M. PEDRERA^{1*}, P.J. SÁNCHEZ CORDÓN¹, M.A. RISALDE¹, V. MOLINA¹, E. RUIZ-VILLAMOR², J.C. GÓMEZ-VILLAMANDOS¹

RESUMEN

El Virus de la diarrea vírica bovina (vDVB) es un virus ARN clasificado dentro de la familia *Flaviviridae* junto con otros pestivirus como el virus de la peste porcina clásica y el virus de la enfermedad de la frontera de la oveja. El vDVB se ha dividido tradicionalmente en base a sus diferencias genéticas en 2 genotipos o especies distintas, conocidas como genotipo 1 y 2 habiéndose podido tipificar genéticamente distintos aislados de ambos genotipos. Independientemente del genotipo al que pertenezcan, el virus se clasifica en función del efecto que produce sobre ciertos cultivos de células epiteliales bovinas en 2 biotipos: biotipos citopáticos (CP) y biotipos no citopáticos (NCP). Sin embargo, la importancia de las lesiones en el transcurso de procesos causados por cepas NCP no se correlaciona con su virulencia *in vitro*.

Un aspecto poco estudiado en la DVB, fundamental para el desarrollo y mejora de vacunas, es el referente a la respuesta inmunitaria que se desarrolla tanto a nivel sistémico como local en el tejido linfoide de la mucosa intestinal. Trabajos recientes han puesto de manifiesto la existencia de una translocación de la respuesta inmunitaria Th1/Th2, lo que dará lugar a una respuesta inmune aberrante, en la que la respuesta Th1 protectora estaría inhibida por la Th2. Este hecho favorecería una

¹ Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba, Edificio Sanidad Animal, Campus de Rabanales, 14014, Córdoba, España.

² Laboratorio Central de Veterinaria de Santa Fe, Camino del Jau s/n, 18320, Santa Fe, Granada, España

*E-mail: v72pemam@uco.es

inadecuada proliferación y transformación de los linfocitos B hacia células plasmática, comprometiendo la activación de una respuesta inmunitaria específica frente al vDVB y la producción de anticuerpos neutralizantes. Esta alteración de la respuesta Th1 protectora, junto a la intensa depleción debida a una masiva apoptosis de linfocitos, que sufre tanto el tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal (tonsilas y placas de Peyer) como distintos órganos linfoides, serían las responsables del estado de inmunosupresión que caracteriza a estos animales y predispone a la aparición de procesos bacterianos secundarios.

1. ASPECTOS GENERALES DE LA RESPUESTA INMUNITARIA

1. 1. Desarrollo y diferenciación de células T

Los linfocitos T derivan de las células precursoras de la médula ósea y maduran en el timo, órgano linfoide primario, en cuya corteza se encuentran densamente agrupados y en fase de división activa. En la región medular se encuentran en menor cantidad y entre ellos hay un gran número de células presentadoras de antígeno, tanto macrófagos como células interdigitantes ricas en antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase II, además de células reticuloepiteliales, cuya función es decisiva en la diferenciación de los linfocitos T (1,2,3).

Estudios funcionales y de los marcadores de superficie celular indican que los timocitos corticales son menos maduros que los medulares, siendo en la migración desde corteza a médula donde aparecen y desaparecen distintos marcadores de diferenciación (CD, *Cluster Differentiation*). El mejor marcador de células T es el receptor de antígenos de células T (TCR, *T-cell receptor*), distinguiéndose dos tipos principales, el TCR-2, heterodímero compuesto de dos polipéptidos (α y β) unidos por enlaces disulfuro, y el TCR-1, compuesto de los polipéptidos γ y δ . Ambos receptores se encuentran asociados a un conjunto de 5 polipéptidos, el complejo CD3, formando así el complejo receptor de células T (complejo TCR/CD3). La predisposición de los timocitos tempranos a convertirse en células T queda demostrada por la expresión del complejo TCR/CD3 en el citoplasma (4,5).

En una primera fase de la diferenciación de los linfocitos T, los timocitos son conocidos como "células triples negativas" (CD3-CD4-CD8-) (6,7,8). En una segunda fase, nos encontramos con los denominados timocitos intermedios o comunes, los cuales se caracterizan por la aparición de marcadores de superficie adicionales, como el CD1, así como por la expresión simultánea de los marcadores CD4 y CD8 en la

misma célula, denominándose “células dobles positivas”. La mayoría de los timocitos corticales (90-100%) expresan estos antígenos en superficie, si bien no son capaces de responder a estímulos antigénicos ni mitogénicos, siendo considerados como células T inmaduras. En la superficie celular comienza a expresarse una pequeña cantidad de las dos cadenas del receptor $\alpha\beta$, asociadas a polipéptidos del complejo antigénico CD3 (6,7,8).

En una fase final, la cual tiene lugar en la médula tímica y en la que encontramos los denominados timocitos maduros, desaparece en su mayoría el marcador CD1, sólo expresado por un 5-10% de los linfocitos T, surgiendo la presencia en la membrana celular de CD3 asociado con gran cantidad de TCR $\alpha\beta$ y diferenciándose en dos subpoblaciones celulares, una de las cuales expresa CD4 y la otra CD8 (6,7,8). En la médula es donde tienen lugar los fenómenos de selección positiva, por la cual sólo los timocitos CD4-CD8+ y CD4+CD8- con receptores de afinidad intermedia por las moléculas del CMH expresadas por las células reticuloepiteliales siguen madurando, y aquellos que presentan una baja o muy elevada afinidad por las moléculas CMH propias, son destruidos por apoptosis y fagocitados por macrófagos.

En la región limítrofe entre corteza y médula, mediante el contacto con autoantígenos presentados junto al CMH por las células interdigitantes y los macrófagos, y en la que también pueden intervenir células reticuloepiteliales de la médula, se eliminan los timocitos con complejos TCR autorreactivos contra macromoléculas propias, en un proceso denominado selección negativa. El 98% de las células T mueren en la corteza, siendo sus restos fagocitados por los macrófagos residentes, pasando los linfocitos T supervivientes a médula como linfocitos T “vírgenes”, pero inmunocompetentes. Será aquí donde adquirirán sensibilidad frente a distintos antígenos exógenos y desde donde se distribuirán hacia órganos linfoides secundarios por el sistema vascular (6,7,8).

1.2. Poblaciones de células T

Las células T TCR $\alpha\beta$ se pueden subdividir en dos subpoblaciones. La primera posee el marcador CD4, y va a “colaborar” o actuar como inductora de la respuesta inmune, denominándose a esta población Th (T-helper). Estas células T CD4+ van a reconocer sus antígenos específicos asociados con moléculas del CMH de clase II de las células presentadoras de antígeno (7). Dentro de la población de linfocitos T CD4 existen a su vez dos subpoblaciones con funciones distintas. Por un lado se encuentran las células de memoria, que son CD29+ y que expresan también una variante

del antígeno leucocitario común CD45, denominada CD45R0, siendo la expresión de CD45R0/CD29 por las células Th CD4+ dependiente del estado de activación celular. Estas células responden a dosis más bajas de antígeno, lo que implica que sus receptores actúan con mayor eficacia, sintetizando además citoquinas de forma precoz y más rápidamente que otras poblaciones de células T (6,7,8). Por otro lado, se incluyen células que llevan a cabo funciones supresoras/citotóxicas sobre las células CD8+, denominadas células “ingenuas”, las cuales expresan otra variante de la molécula CD45, conocida como CD45RA (9,10).

La otra subpoblación existente de células T TCR $\alpha\beta$ posee el marcador CD8 y van a ejercer una función predominantemente citotóxica, denominándose a esta población como Tc (T-cytotoxic). A diferencia de las células T CD4+, que reconocen los antígenos asociados al CMH de clase II, las células T CD8+ los reconocen asociados con moléculas del CMH de clase I que se encuentran presentes en la membrana celular de cualquier célula nucleada (7,8). Las células T CD8+ también se subdividen en subpoblaciones funcionales. Una produce IL-2 y expresa la molécula CD28 cuando es activada (11), mientras que la otra expresa la molécula heterodimérica CD11b/CD18 y va a responder a la presencia de IL-2, aunque no la produce (12,13).

La mayoría de los linfocitos T que se encuentran en los órganos linfoides secundarios y en circulación son TCR $\alpha\beta$, existiendo una variante TCR (TCR $\gamma\delta$) que se encuentra en una población minoritaria de linfocitos T periféricos, en una pequeña proporción de timocitos maduros (menos del 1%) y en algunas células dendríticas epidérmicas (14,15). Estas células son prácticamente indistinguibles de las T maduras circulantes y todas ellas expresan el receptor CD44, relacionado con la migración y el asentamiento en tejidos linfoides periféricos (16). Carecen de moléculas de superficie CD4 y CD8, aunque una pequeña parte de las mismas pueden ser CD8+. Así, en ratones, la mayoría de los linfocitos intraepiteliales localizados en mucosas son TCR $\gamma\delta$ y CD8+, los cuales actúan frente a antígenos bacterianos, de ahí su papel protector de las superficies mucosas del organismo (17,18). Este heterodímero, cuya estructura es análoga al TCR $\alpha\beta$, no se asocia covalentemente y su función no está claramente definida, tratándose de un receptor temprano de células T inmaduras, las cuales pueden participar en una respuesta temprana y mediada por células, principalmente en aquellos animales cuyas inmunoglobulinas no atraviesan la placenta (6,19). Así, en cerdos las células T $\gamma\delta$ constituyen una subpoblación relevante de células T circulantes, siendo un 10% de los linfocitos sanguíneos CD4-CD8- (14,20), mientras que en los rumiantes pueden constituir hasta el 60% de la población de células circulantes (21).

Las células asesinas naturales (NK, *natural killer*), no expresan los receptores de antígeno TCR ni BCR (*B-cell receptor*), propios de las poblaciones de células T y

B respectivamente. La estimulación directa con IL-2 también provoca su activación, liberando IFN γ y otras citoquinas como IL-1 y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), importantes en la regulación de la hemopoyesis y en la respuesta inmune (22,23). Estas células poseen capacidad destructora inespecífica no restringida a la presencia del CMH en la célula diana, siendo capaces, por ejemplo, de destruir células infectadas con determinados virus. Algunos virus, como el virus de la peste porcina africana, son capaces de suprimir la actividad de las células NK (24,25). Además, son responsables de la citotoxicidad celulómediada dependiente de anticuerpos, gracias a la cual se destruyen células con antígenos extraños en su superficie frente a los que se han producido anticuerpos, los cuales son reconocidos a través de los receptores Fc que poseen las células NK (22,23).

1.3. Respuesta TH1/TH2

Dependiendo de los mediadores producidos por los linfocitos T que predominen en el curso de un proceso patológico, la respuesta inmune puede clasificarse en tipo 1(Th1) y tipo 2 (Th2), creándose el denominado paradigma Th1/Th2. En las fases más tempranas de estos procesos puede existir una alternancia de ambas respuestas en función del predominio de citoquinas que exista, imponiéndose finalmente una sobre la otra en fases más avanzadas, o en respuesta a estímulos repetitivos, siendo a partir de este momento dicho proceso irreversible (26).

Respuesta inmunitaria tipo 1 (Th1)

Se produce cuando existe un predominio de las citoquinas de tipo 1, como son la interleuquina (IL)-2, interferón (IFN) γ y TGF β después de la estimulación por pequeñas cantidades de antígeno o IL-12, principal citoquina inductora de una respuesta Th1, producida por las células dendríticas y los macrófagos activados (27). Las células que se encuentran sintetizando las citoquinas de tipo 1 son incapaces de responder a la IL-1 ya que carecen de receptores para este mediador (28, 29).

El IFN γ interviene en la activación de la inmunidad celular, estimulando la presentación antigénica y la generación de linfocitos T citotóxicos CD8 $^{+}$ (30,31,32,33,34), activando e incrementando la capacidad microbicida de los macrófagos (30,33) e induciendo apoptosis (35,36), siendo su función de vital importancia en las enfermedades víricas (36). La IL-2 induce el crecimiento y proliferación de células T (37) estimulando

su citotoxicidad. Así, esta respuesta se asocia frecuentemente a inflamación y daño tisular (29,34,38). También estimula la proliferación de células B y la producción de inmunoglobulinas, en especial IgM e IgG (isotipos IgG2a y IgG3), favoreciendo la opsonización y la fagocitosis a través de su unión a receptores Fc γ y del complemento, aunque no estimulan de manera específica la formación de anticuerpos (36).

Cuando finalmente se impone un tipo de respuesta inmune sobre la otra, las citoquinas producidas por los linfocitos T favorecen la expansión clonal de éstos, suprimiendo la otra respuesta Th. Así, mientras que el IFN amplifica el desarrollo de una respuesta Th1 e inhibe la proliferación de células y la secreción de citoquinas inductoras de la respuesta Th2 (39), la IL-2 favorece la proliferación de células responsables de la respuesta Th1 (27).

En enfermedades inmunosupresoras como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), se produce una inhibición de la respuesta Th1, que se refleja en una bajada temprana de la producción de IL-2, IFN γ e IL-12, favoreciendo la persistencia del virus que infecta preferentemente los clones de células Th2 (27). Durante la Diarrea Vírica Bovina (DVB), el virus favorece la producción de IL-2 e IFN γ , pero no la producción de IL-4 por parte de los CD8+, favoreciendo así una respuesta semejante a la Th1, siendo las células T CD8+ capaces de actuar como células efectoras contra células infectadas (40), contribuyendo a la eliminación vírica a pesar de no ser esenciales en el control de la infección (41).

Respuesta inmunitaria tipo 2 (Th2)

Entre las citoquinas que predominan en la respuesta inmune de tipo 2 destacan la IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, producidas después de la estimulación por grandes cantidades de antígeno o IL-1 (27), aunque en el caso de los rumiantes, la IL-10 no está incluida en el grupo de las citoquinas tipo 2 (42). La presentación de antígeno por las células B estimula el desarrollo de una respuesta Th2, aunque el mecanismo por el que la concentración de antígeno influye en el desarrollo de una tipo de respuesta u otra y de cómo intervienen las CPA son mecanismos aún por aclarar. Las citoquinas tipo 2 estimulan la producción por parte de las células B de IgE, la cual provoca la degranulación de los mastocitos y la activación de los eosinófilos, contribuyendo a las reacciones inmunes en las alergias e infecciones parasitarias. Sin embargo, no intervienen en reacciones de hipersensibilidad retardada u otras reacciones mediadas por células (7). La IL-4 estimula la diferenciación a células plasmáticas de los linfocitos B para la producción de altos niveles de anticuerpos IgG1 e IgM (7,43,44,45). Varias

citoquinas producidas durante la respuesta Th2 tienen actividad antiinflamatoria, destacando a la IL-10 (46) y a la IL-4 que, al contrario que el IFN γ , aparecen de manera tardía limitando las consecuencias del daño que provoca la respuesta Th1 (27). Así, inhiben la activación de los macrófagos, estimulan la respuesta Th2 y bloquean la activación de una respuesta Th1 (47). Además, la IL-10 va a intervenir en la diferenciación y actividad citotóxica de los linfocitos T CD8+ y las células NK (*natural killer*), favoreciendo la desaparición de estas células cuando la actividad predominante es Th2 (7,48,49).

El virus de la Diarrea Vírica Bovina (vDVB) estimula la producción por parte de los linfocitos T CD4+ de altos niveles de IL-4, pero no de IL-2 e IFN γ , favoreciendo una respuesta Th2, con lo que los CD4+ intervendrían ayudando a la producción de anticuerpos neutralizantes para limitar la diseminación del virus (40), no estando relacionada esta Th2 con funciones efectoras antivíricas por los CD4+. En muchos procesos víricos, el predominio de la respuesta Th2 se ha relacionado con un estado de inmunosupresión. En el caso de la DVB, la respuesta Th2 de células T CD4+ que se produce podría interferir con el desarrollo de una respuesta Th1 protectora frente a otros agentes patógenos como el herpesvirus bovino-1, pudiendo además contribuir también al establecimiento de infecciones persistentes (40).

2. RESPUESTA INMUNITARIA INNATA FRENTE AL VIRUS DE LA DVB

Muchos virus intentan evadir la respuesta inmune del hospedador por varios mecanismos, destacando la infección de sitios inmunoprivilegiados, entrando el virus en latencia, mediante la síntesis de citoquinas y receptores, con la mutación del genoma viral que interferirá con el procesamiento y la presentación de antígenos o alterando la maquinaria celular del hospedador (50, 51).

En respuesta a la infección con **cepas citopáticas (CP)** del vDVB en el transcurso de infecciones agudas, se produce una rápida y potente respuesta temprana local con la liberación de IFN tipo I (α/β) por parte de los monocitos-macrófagos o las células dendríticas, responsable de activar a las células efectoras de la respuesta inmune innata como los eosinófilos, los macrófagos y las células NK, limitando de esta forma la replicación del virus a nivel de las mucosas. Esto dará lugar a la captura de antígenos por las células dendríticas y su posterior maduración y migración hacia los nódulos linfáticos locales para presentar el antígeno a través del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) a los linfocitos T, los cuales migrarán hacia el tejido dañado para eliminar al virus y a las células dañadas. Por su parte, las células

B activadas migrarán para formar centros germinales en los nódulos linfáticos, donde madurarán hacia células plasmáticas productoras de anticuerpos que neutralizarán al virus (52,53). Sin embargo, en estos animales no se producirían niveles detectables de IFN tipo I en suero, sugiriendo que la infección permanecería confinada a nivel de las mucosas (53).

In vitro, la infección con cepas CP del vDVB da lugar a la producción de IFN tipo I, al igual que ocurre cuando se infectan fetos con el mismo biotipo, lo que impide la instauración de infecciones persistentes en fetos bovinos (54).

La infección por **cepas no citopáticas (NCP)** del vDVB no estimula una respuesta temprana a nivel local con liberación de citoquinas, por lo que no se producirá una respuesta inmune a nivel de las mucosas. Por tanto, la replicación del virus no estará limitada y éste se disemina en gran medida por todo el organismo. A pesar de ello, el virus es vehiculado hacia los nódulos linfáticos locales donde interacciona con células dendríticas, las cuales van a producir grandes cantidades de IFN α , aumentando a su vez la activación de estas células y limitando la replicación vírica. Se genera así una respuesta inmune primaria efectiva (55,56), que sin embargo, no evita la diseminación del virus (52,53). Esta fuerte respuesta de IFN tipo I induce una elevación transitoria de los niveles de las proteínas de fase aguda como son la haptoglobina (Hp) y la amiloide A sérica (AAS), siendo sobretodo la Hp un indicador de la gravedad de la infección (57,58). Esta respuesta innata es seguida de una respuesta inmune adaptativa que se ve reflejada en la producción de anticuerpos (58).

In vitro, por el contrario, la infección de las células por cepas NCP produce la disminución de IFN α que podría relacionarse con un estado de inmunosupresión (59,60,61), situación que no se produce en animales infectados experimentalmente, indicando que su disminución no sería la causa de la inmunosupresión (55), aunque la falta de producción de esta respuesta en fetos se propone como un factor predisponente para el establecimiento de infecciones persistentes (54,58). La naturaleza de los mecanismos responsables del bloqueo en la producción de IFN tipo I sigue siendo objeto de debate. Se ha sugerido la intervención de las proteínas víricas E^{ms} y N_{pro} en este proceso, ya que la alteración de ambas estimula la producción de IFN tipo I (62).

Se ha demostrado que el vDVB puede infectar a células del sistema inmune afectando su función (56,61,63,64), sugiriendo que la inmunosupresión y la inmunotolerancia frente al vDVB en los animales persistentemente infectados (PI) está relacionada con el tropismo que presenta el virus por las células presentadoras de antígenos (65).

La infección *in vitro* con ambos tipos de cepas del vDVB modula las funciones de células del sistema inmune como los **macrófagos**, incrementando la producción de óxido nítrico (66) y de inhibidores de la actividad de la IL-1 (67), a la vez que disminuye la producción de factor de necrosis tumoral (TNF) α frente a lipopolisacáridos (LPS) (68). También disminuye la expresión de receptores Fc y C3 y la actividad fagocítica de los macrófagos alveolares (69). De esta forma las cepas NCP contribuirían a establecer un estado de inmunotolerancia frente al vDVB, favoreciendo la predisposición a infecciones secundarias en los animales PI, así como en animales que sufren infecciones agudas, que afectan sobretodo al tracto respiratorio (70).

Algunos virus comprometen la capacidad de las células presentadoras de antígeno (CPA) infectadas de estimular la respuesta de células T favoreciendo un estado de inmunosupresión, afectando la capacidad de generar una respuesta inmune tipo Th1 (27), por medio de la producción de TGF β por macrófagos infectados como en el caso del virus de la peste porcina Africana, bloqueando las vías de presentación de antígeno por el CMH de clase I y II en el caso de infecciones por herpesvirus y reduciendo la capacidad de las CPA infectadas de secretar IL-12 en el caso del VIH (50,51). En el caso de animales PI, los monocitos infectados no parecen tener afectada su capacidad de presentar antígenos, ya que son capaces de estimular las respuestas de células T CD4+ y T CD8+ por el CMH de clase II y I respectivamente (71,72). Por otro lado, las células dendríticas se muestran más resistentes, *in vitro*, a la infección con cepas NCP que los monocitos. Además, mientras que las células dendríticas no ven afectada su capacidad para presentar el antígeno vírico a los linfocitos T, los monocitos infectados con cepas NCP muestran una alteración de sus funciones presentadoras (56). Para unos autores, dicha alteración no se debió a cambios en la expresión de moléculas de superficie co-estimuladoras, sugiriendo el posible papel de factores solubles (56). Sin embargo, otros autores señalan la existencia de una disminución en la expresión del CMH de clase II por parte de monocitos infectados tanto por cepas NCP (71,73), como por cepas CP (73), habiéndose señalado además una disminución del CMH de clase I en monocitos infectados por cepas NCP y un aumento en el caso de infectarse con cepas CP (73), cambios no apuntados en otros trabajos (56,71).

La **enfermedad de las mucosas (EM)**, afecta solamente a los animales PI que sufren una superinfección poco después del nacimiento, generalmente entre los 6 y 18 meses de edad, por un biotipo CP homólogo antigénicamente al biotipo NCP que produjo la inmunotolerancia. En **fases tempranas de la EM**, en los centros germinales de los folículos linfoides afectados por una intensa depleción de linfocitos B se observaron escasas **células dendríticas foliculares (CDF)**, asociando este hecho

bien a la propia depleción de los linfocitos B (74), al efecto inhibitorio que sobre la proliferación celular tienen la IL-1 y el TNF α (75), o bien a los efectos citotóxicos de linfocitos T CD4+ (76), mostrándose estas CDF, sin embargo, capaces de presentar el antígeno vírico a los linfocitos B (77). En **fases avanzadas de la EM** se observó un elevado número de CDF activadas en los centros germinales, sugiriendo una recuperación de estas células a partir de pequeños focos de CDF subcapsulares (77), hecho que podría estar inducido y modulado por la liberación de GM-CSF por parte de los macrófagos (78).

3. RESPUESTA INMUNITARIA ADAPTATIVA FRENTE AL VDVB

3.1. Respuesta inmunitaria celular

El número de linfocitos T γ/δ circulantes en rumiantes jóvenes se encuentra por encima de un 60%, proporción que disminuye hasta un 30% al año de edad, representando en el animal adulto sólo un 5-10% de los leucocitos en circulación. Son especialmente abundantes en el intestino, sobretodo como linfocitos intraepiteliales. A ellos se les atribuye el efecto protector no específico que durante el primer año de vida tienen los animales PI frente al desarrollo de la EM (79). El epitelio y la lámina propia a nivel del intestino también presentan un elevado número de linfocitos T γ/δ , siendo su principal función la de proteger las superficies mucosas (80). *In vitro*, se ha demostrado que frente a ciertos virus ejercen una función antivírica similar a la de las células NK (81,82). En la EM se produce una disminución de células efectoras de la respuesta inmune a nivel de mucosas, destacando una disminución de linfocitos T CD4+ y células plasmáticas en lámina propia y de linfocitos T CD8+ y T γ/δ en el epitelio. Esta disminución se atribuye a la depleción que sufren los precursores de estas células efectoras a nivel de las placas de Peyer, contribuyendo a la aparición de lesiones y facilitando la infección de las células epiteliales (83,84). Los linfocitos T γ/δ son activados por la combinación de IL-1 e IL-7, mostrándose muy vulnerables a la falta de IL-7 y mostrándose el epitelio como una fuente importante de esta citoquina (85). En la Peste Porcina Clásica (PPC) enfermedad producida, al igual que la DVB, por un pestivirus, se ha sugerido que el daño epitelial estaría relacionado con la pérdida de los linfocitos T γ/δ (86), los cuales intervendrían en el control inmunológico y en el crecimiento de las células epiteliales (84,87).

La infección con el vDVB produce una linfopenia media del 50% que puede llegar a ser, dependiendo de la cepa del virus, de hasta un 90%. Entre las subpoblaciones de linfocitos T, el número de CD8+ se ve más disminuido que el de CD4+, siendo escasa

la afectación de las células T γ/δ circulantes (71,89,90). La depleción de los linfocitos CD4+, acentuada por la presencia del virus, provoca el establecimiento de una viremia prolongada. Por el contrario, ni la depleción de los linfocitos T CD8+ ni de los T γ/δ prolonga la viremia, por lo que estas subpoblaciones no parecen desempeñar un importante papel durante las infecciones con el vDVB (41). Sin embargo, parece que las células T CD4+ juegan un papel importante en la coordinación de la respuesta celular durante la fase temprana de la infección, participando en el mecanismo inmune de control de infecciones primarias con el vDVB (41,91). Esta respuesta CD4+ se dirige contra las proteínas virales E2 y NS3 principalmente, las cuales se presentan asociadas a las CPA (92,93,94,95).

En los folículos linfoides de las PP de animales moribundos con la EM, paralelamente a la depleción de los linfocitos B IgM+ y coincidiendo con las mayores cantidades de antígeno, se produce un incremento importante de linfocitos T CD4+ y no tanto de los linfocitos T CD8+ (83,96). En ocasiones, los linfocitos T CD4+ acuden y pueden ejercer una actividad citotóxica en el sitio de infección, induciendo apoptosis por la vía del Fas-Fas ligando, como ocurre con otros miembros de esta familia como el virus de la hepatitis C (97). Su unión a los linfocitos B, que expresan altos niveles del receptor para el Fas-ligando (98), podría contribuir a la depleción de los folículos linfoides y explicaría los bajos títulos de anticuerpos neutralizantes en estos animales (96).

En infecciones con cepas CP se observó un patrón de respuesta inmune Th1 que provocó una proliferación de linfocitos T citotóxicos regulada por la IL-2 a las 3-4 semanas postinfección (40,41,93). Sin embargo, infecciones con cepas NCP, se produjo preferentemente una respuesta CD4+ Th2, lo que impidió la producción de una respuesta inmune celular temprana debido a la capacidad del virus para impedir la presentación de antígenos por parte de monocitos y células B, no detectándose una proliferación de linfocitos T hasta las 6-8 semanas postinfección (40,55,56,92,93). Existen evidencias de que el vDVB actúa potenciando el efecto de otras infecciones víricas, como ocurre en el caso de la rinotraqueitis infecciosa bovina (99) y en infecciones bacterianas como la causada por *Pasterella haemolytica* (100,101), en los que los animales infectados ven disminuida su capacidad de frenar y contener a éstos agentes patógenos en el sitio de entrada. Así, trabajos experimentales demostraron que la disminución del IFN γ en las infecciones agudas con cepas NCP causaría la inhibición de la respuesta inmune celular frente a *Mycobacterium bovis*, lo que podría suponer una dificultad para identificar a los animales tuberculosos (102). Sin embargo, otros estudios mostraron que los animales infectados con cepas NCP sorprendentemente

se produce una fuerte respuesta de $IFN\gamma$ y de $IFN\alpha/\beta$, a pesar de mostrar una disminución en la proliferación de células T, sugiriendo que las cepas NCP inducen una respuesta T aberrante (55).

3. 2. Respuesta inmunitaria humoral

La inmunidad humoral puede producirse por una respuesta inmune activa después de una exposición al antígeno o por inmunidad pasiva mediante la ingestión de los anticuerpos presentes en el calostro. La presencia de altas concentraciones de anticuerpos maternos puede bloquear la respuesta inmune mediada por células B al vacunar con el vDVB (103). Sin embargo, la vacunación en presencia de anticuerpos maternos parece ser efectiva, ya que estos anticuerpos protegen al animal de infecciones intranasales del vDVB, pudiéndose observar además una respuesta mediada por células T. Además, estos animales son capaces de generar una respuesta de células B de memoria (104,105). La adquisición de los anticuerpos neutralizantes maternos por los animales PI reduce temporalmente la viremia, aunque no la frena. Por tanto, la inmunidad humoral es insuficiente para la eliminación de las células infectadas, sugiriendo que la inmunidad celular es fundamental para resolver la infección (106).

El vDVB posee glucoproteínas que inducen la producción de anticuerpos neutralizantes, siendo la glucoproteína E2 la inmunodominante (107). La presencia de anticuerpos neutralizantes frente al vDVB es detectable en suero entre las 2 y 4 semanas, dependiendo de la cepa involucrada (71), manteniéndose hasta las 10-12 semanas aproximadamente (41). La cantidad de anticuerpos neutralizantes producida depende del genotipo que cause la infección, siendo mayor en los animales infectados por el genotipo II (108).

En la EM, la activación de los linfocitos T $CD4+$, que se produce en fases temprana de la respuesta inmune, induce una respuesta inmune humoral (109). Sin embargo, la intensa depleción que se produce en los tejidos linfoides causada por la apoptosis de los linfocitos B $IgM+$, explicaría los bajos títulos de anticuerpos neutralizantes detectados en estos animales (96), coincidiendo a su vez estos altos niveles de apoptosis con la disminución de la proliferación celular (77,110).

La infección con cepas NCP altera el patrón de respuesta inmune con el desarrollo temprano de una respuesta $CD4+$ Th2, lo que induce en los animales una respuesta primaria de anticuerpos más rápida y superior que la que se produce con cepas CP homólogas, teniendo este hecho gran importancia en el desarrollo de vacunas (40,92).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia a través de los proyectos AGL 2003-00252 y AGL 2006-01536. Pedro José Sánchez Cordón es beneficiario de un contrato dentro del "Programa Ramón y Cajal" del Ministerio de Ciencia e Innovación, España.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Rajewsky K, Von Boehmer H (1992). Lymphocytes development. *Curr Opin Immunol* 4: 131-181
2. Boyd RL (1993). The thymic environment. *Immunology Today*. 14: 445-449.
3. Schuurman HJ, Kuper CF, Kendall MD (1997). Thymic microenvironment at light microscopic level. *Microscopic Research and Technique* 38: 216-226.
4. Kearse KP, Roberts JP, Singer A (1995). TCR α -CD3 $\delta\epsilon$ association is the initial step in $\alpha\beta$ dimer formation in murine T cell and is limiting in immature CD3+CD8+ thymocytes. *Immunity* 2: 391-399.
5. Arnaud J, Chenu C, Huchenaq A, Gouaillard C, Kuhlmann J, Rubin B (1996). Defective interactions between TCR chains and CD3 heterodimers prevent membrane expression of TCR $\alpha\beta$ in human T cells. *J Immunol* 156: 2155-2162.
6. Peña Martínez J (1998) *Inmunología*. Ediciones Pirámide S.A., Madrid.
7. Roitt I, Brostoff J, Male D (1998). *Inmunología* 4ª Ed. Harcourt Brace, Madrid.
8. Abbas AK, Litchman AH (2004). *Inmunología celular y molecular*. Elsevier España SA, Génova.
9. Saalmüller A, Bryant J (1994). Characteristics of porcine T lymphocytes and T- cell lines. *Vet Immunol Immunopathol* 43: 45-52.
10. Saalmüller A, Hirt W, Maurer S, Weiland E (1994). Discrimination between two subset of porcine CD8+ cytolytic T-lymphocytes by the expression of CD5 antigen. *Immunology* 81: 578-583.
11. Kuchroo VK, Byrne MC, Greenfield E, Whitters MJ, Nalefsky EA, Rao A, Collins M, Dorf ME (1995). Transfection of TCR alpha-chains into suppressor and T helper cell hybridomas. Production of suppressor factors with predicted antigen specificity. *J Immunol* 154(10):5030-8.
12. Bierer BE, Sleckman BP, Ratnofsky SE, Burakoff SJ (1989). The biologic roles of CD2, CD4, and CD8 in T-cell activation. *Annu Rev Immunol* 7:579-99.
13. Kabelitz D (1990). Do CD2 and CD3-TCR T-cell activation pathways function independently? *Immunol Today* 11(2):44-7.
14. Binns RM (1994). The Null/ $\gamma\delta$ + T cell family in the pig. *Vet Immunol Immunopathol* 43:69-77.
15. Carr MM, Howard CJ, Sopp P, Manser JM, Parsons KR (1994). Expression on porcine $\gamma\delta$ lymphocytes of a phylogenetically conserved surface antigen previously restricted in expression to ruminant $\gamma\delta$ T lymphocytes. *Immunology* 81: 36-40.
16. Haynes BF, Telen MJ, Hale LP, Denning SM (1989). CD44: a molecule involved in leukocyte adherence and T-cell activation. *Immunology Today* 10: 423-428.

17. Raulet DH (1989). Immunology. Antigens for gamma/delta T cells. *Nature* 339(6223):342-3.
18. Thibault G, Bardos P (1995). Compared TCR and CD3 epsilon expression on alpha beta and gamma delta T cells. Evidence for the association of two TCR heterodimers with three CD3 epsilon chains in the TCR/CD3 complex. *J Immunol* 154(8):3814-20.
19. Tizard IR (1998). *Inmunología Veterinaria*. 5ª Ed McGraw-Hill. Interamericana Madrid.
20. Thome M, Hirt W, Pfaff E, Reddehase MJ, Saalmüller A (1994). Porcine T-cell receptors: molecular and biochemical characterization. *Vet Immunol Immunopathol* 43(1-3):13-8.
21. Wyatt CR, Madruga C, Cluff C, Parish S, Hamilton MJ, Goff W, Davis WC (1994). Differential distribution of gamma delta T-cell receptor lymphocyte subpopulations in blood and spleen of young and adult cattle. *Vet Immunol Immunopathol* 40(3):187-99.
22. Evans DL, Jaso-Friedmann L (1993). Natural killer (NK) cells in domestic animals: phenotype, target cell specificity and cytokine regulation. *Vet. Res. Commun.* 17: 429-447.
23. Raulet DH, Heid W (1995). Natural killer cell receptors: the offs and ons of NK cell recognition. *Cell.* 82: 697-700.
24. Yang WC, Schultz RD, Spano JS (1987). Isolation and characterization of porcine natural killer (NK) cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 14: 345-356.
25. Scott P, Trinchieri G (1995). The role of natural killer cells in host-parasite interactions. *Curr. Opin. Immunol.* 7: 34-40.
26. Karupiah G (1998). Type 1 and Type 2 cytokines in antiviral defense. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 63 (1-2): 105-109.
27. Abbas AK, Murphy KM, Sher A (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383(6603):787-93.
28. Lucey DR, Clerici M, Shearer GM (1996). Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infections, neoplastic and inflammatory disease. *Clin Microbiol Rev* 9: 532.
29. Mosmann TR, Sad S (1996). The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology Today.* 17 (3): 138-146.
30. Bach EA, Aguet M, Schreiber RD (1997). The interferon gamma receptor: a paradigm for cytokines receptor signalling. *Annu Rev Immunol* 15: 563-591.
31. Trinchieri G (1997). Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN-gamma). *Curr Opin Immunol* 9(1):17-23.
32. Gordon S (1998). The role of the macrophage in immune regulation. *Res Immunol* 149(7-8):685-8.
33. Biron CA, Sen GC (2001). Interferon and other cytokines. En: *Fields Virology*. 4th Ed. D.M. Knipe, P.M. Howley, D.E Griffin, M. Martin, B. Roizman y S.E Straus (Eds.) Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa. pp 321-351.
34. MacDonald AJ, Duffy M, Brady MT, McKiernan S, Hall W, Hegarty J, Curry M, Mills KH (2002). CD4 T helper type 1 and regulatory T cells induced against the same epitopes on the core protein in hepatitis C virus-infected persons. *J Infect Dis* Mar 15;185(6):720-7.
35. Tanaka N, Sato M, Lamphier M, Nozawa H, Oda E, Noguchi S, Schreiber RD, Tsujimoto Y, Taniguchi T (1998). Type 1 interferons are essential mediators of apoptotic death in virally infected cells. *Genes Cells* 3: 29-37.
36. Samuel CE (2001). Antiviral action of interferons. *Clinical Microbiology Reviews.* 14: 778-809.
37. Stasny BR, De Guise S, Rompato G, Garmendia AE (2001). Functional characterization of a swine CD4+/CD8+ double positive lymphoblastoid T-cell line with a CD25+/CD45RA- phenotype generated in vitro with IL-2. *Vet Immunol Immunopathol* 78: 57-70.

38. Murtaugh MP (1994). Porcine cytokines. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 43: 37-44.
39. Fitch FW, McKisick MD, Lancki DW, Gajewski TF (1993). Differential regulation of murine T lymphocyte subsets. *Annu Rev Immunol* 11:29-48.
40. Rhodes SG, Cocksedseg JM, Collins RA, Morrison WI (1999). Differential cytokine responses of CD4+ and CD8+ T cells in response to bovine viral diarrhoea virus in cattle. *J Gen Virol* 80: 1673-9.
41. Howard CJ, Clarke MC, Sopp P, Brownlie J (1992). Immunity to bovine viral diarrhoea virus in calves: The role of different T-cell subpopulations analyzed by specific depletion in vivo with monoclonal antibodies. *Vet Immunol Immunopathol* 32: 303-14.
42. Brown WC, Rice-Ficht AC, Estes DM (1998). Bovine type 1 and type 2 responses. *Vet Immunol Immunopathol* May 15;63(1-2):45-55. Review.
43. Mosmann TR, Coffman RL (1989). Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev Immunol* 7: 145-173.
44. Coffman RL, Leberman DA, Rothman P (1993). Mechanism and regulation of immunoglobulins isotype switching. *Adv Immunol* 54: 229-270.
45. Van Miert A (1995). Pro-inflammatory cytokines in a ruminant model: pathophysiological, pharmacological, and therapeutic aspects. *Veterinary Quarterly* 175: 41-50.
46. Muraille E, Leo O (1998). Revisiting the Th1/Th2 paradigm. *Scand J Immunol* 47(1):1-9.
47. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR (1989). Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokines production by Th1 clones. *J Exp Med* 170:2081-2095.
48. Chen WF, Zlotnik A (1991). IL-10: a novel cytotoxic T cell differentiation factor. *J Immunol* 147: 528-534.
49. Carson WE, Lindemann MJ, baiocchi R, Linett M, Tan JC, Chou CC, Narula S, Caliguri MA (1995). The functional characterization of IL-10 receptor expression in human natural killer cells. *Blood*. 85: 3577-3585.
50. Spriggs MK (1996). One step ahead of the game: viral immunomodulatory molecules. *Ann Rev Immunol* 14:101-130.
51. Tortorella D, Gewurz BE, Furman MH, Schust DJ, Ploegh HL (2000). Viral subversion of the immune system. *Ann Rev Immunol* 18:861-926.
52. Palucka K, Banchereau J (2002). How dendritic cells and microbes interact to elicit or subvert protective immune responses. *Curr Opin Immunol* 14: 420-31.
53. Brackenbury LS, Carr BV, Charleston B (2003). Aspects of the innate and adaptive immune responses to acute infections with BVDV. *Vet Microbiol* 96: 337-44.
54. Charleston B, Fray MD, Baigent S, Carr BV, Morrison WI (2001). Establishment of persistent infection with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus in cattle is associated with a failure to induce type I interferon. *J Gen Virol* 82(8):1893-7.
55. Charleston B, Brackenbury LS, Carr BV, Fray MD, Hope JC, Howard CJ, Morrison WI (2002). Alpha/beta and gamma interferons are induced by infection with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus in vivo. *J Virol* 76(2): 923-7.
56. Glew EJ, Carr BV, Brackenbury LS, Hope JC, Charleston B, Howard CJ (2003). Differential effects of bovine viral diarrhoea virus on monocytes and dendritic cells. *J Gen Virol* 84: 1771-80.
57. Gånheim C, Hultén C, Carlsson U, Kindahl H, Niskanen R, Waller KP (2003). The acute phase response in calves experimentally infected with bovine viral diarrhoea virus and/or *Mannheimia haemolytica*. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* May;50(4):183-90.

58. Müller-Doblies D, Arquint A, Schaller P, Heegaard PM, Hilbe M, Albini S, Abril C, Tobler K, Ehrensperger F, Peterhans E, Ackermann M, Metzler A (2004). Innate immune responses of calves during transient infection with a noncytopathic strain of bovine viral diarrhoea virus. *Clin Diagn Lab Immunol* 11:302-12.
59. Adler B, Adler H, Pfister H, Jungi TW, Peterhans E (1997). Macrophages infected with cytopathic bovine viral diarrhoea virus release a factor(s) capable of priming uninfected macrophages for activation-induced apoptosis. *J Virol* 71(4):3255-8.
60. Schweizer M, Peterhans E (2001). Noncytopathic bovine viral diarrhoea virus inhibits double-stranded RNA-induced apoptosis and interferon synthesis. *J Virol*. 75: 4692-8.
61. Peterhans E, Jungi TW, Schweizer M (2003). BVDV and innate immunity. *Biologicals* 31: 107-12.
62. Meyers G, Ege A, Fetzner C, Von FM, Elbers K, Carr V, Prentice H, Charleston B, Schürmann EM (2007). Bovine viral diarrhoea virus: prevention of persistent fetal infection by a combination of two mutations affecting Erns RNase and Npro protease. *J Virol* 0 02372-06.
63. Potgieter LND (1995). Immunology of bovine viral diarrhoea virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 11: 501-20.
64. Lambot M, Hanon E, Lecomte C et al (1998). Bovine viral diarrhoea virus induces apoptosis in blood mononuclear cells by a mechanism largely dependent on monocytes. *J Gen Virol* 79: 1745-9.
65. Sopp P, Hooper LB, Clarke MC, Howard CJ, Brownlie J (1994). Detection of bovine viral diarrhoea virus p80 protein in subpopulations of bovine leukocytes. *J Gen Virol* 75: 1189-94.
66. Adler H, Frech B, Meier P et al. (1994). Noncytopathic strains of bovine viral diarrhoea virus prime bovine bone marrow-derived macrophages for enhanced generation of nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 202: 1562-8.
67. Jensen J, Schultz RD (1991). Effect of infection by bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in vitro on interleukin-1 activity of bovine monocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 29 (3-4):251-65.
68. Adler H, Jungi TW, Pfister H, Strasser M, Sileghem M, Peterhans E (1996). Cytokine regulation by virus infection: bovine viral diarrhoea virus, a flavivirus, downregulates production of tumor necrosis factor alpha in macrophages in vitro. *J Virol* 70(4):2650-3.
69. Welsh MD, Adair BM, Foster JC (1995). Effect of BVD virus infection on alveolar macrophage functions. *Vet Immunol Immunopathol* 46:195-210.
70. Fulton RW, Purdy CW, Confer AW, Saliki JT, Loan RW, Briggs RE and Burge LJ (2000). Bovine viral diarrhoea infections in feeder calves with respiratory disease: Interactions with *Pasteurella* spp., parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus. *Can J Vet Res* 64: 151-9.
71. Archambault D, Beliveau C, Couture Y, Carman S (2000). Clinical response and immunomodulation following experimental challenge of calves with type 2 noncytopathogenic bovine viral diarrhoea virus. *Vet Res* 31(2):215-27.
72. Glew EJ, Howard CJ (2001). Antigen-presenting cells from calves persistently infected with bovine viral diarrhoea virus, a member of the Flaviviridae, are not compromised in their ability to present viral antigen. *J Gen Virol* 82:1677-85.
73. Chase CCL, Elmowalid G, Yousif AAA (2004). The Immune response to bovine viral diarrhoea virus: a constantly changing picture. *Vet Clin Food Anim* 20:95-114.

74. Yoshida K, van den Berg TK, Dijkstra CD (1994). The functional state of follicular dendritic cells in severe combined immunodeficient (SCID) mice: role of the lymphocytes. *Eur J Immunol* 24(2):464-8.
75. Tyor WR, Glass JD, Baumrind N, McArthur JC, Griffin JW, Becker PS, Griffin DE (1993). Cytokine expression of macrophages in HIV-1-associated vacuolar myelopathy. *Neurology* May;43(5):1002-9.
76. Hahn S, Gehri R, Erb P (1995). Mechanism and biological significance of CD4-mediated cytotoxicity. *Immunol Rev* 146:57-79.
77. Teichmann U, Liebler-Tenorio EM, Pohlenz JF (2000). Ultra-structural changes in follicles of small-intestinal aggregated lymphoid nodules in early and advanced phases of experimentally induced mucosal diseases in calves. *Am J Vet Res* 61:174-82.
78. Clark EA, Grabstein KH, Shu GL (1992). Cultured human follicular dendritic cells. Growth characteristics and interactions with B lymphocytes. *J Immunol* 148(11):3327-35.
79. Bruschke CJ, Haghparast A, Hoek A et al (1998). The immune response of cattle, persistently infected with noncytopathic BVDV, after superinfection with antigenically semi-homologous cytopathic BVDV. *Vet Immunol Immunopathol* 62: 37-50.
80. Haas W, Pereira P, Tonegawa S (1993). Gamma/delta cells. *Annu Rev Immunol* 11:637-85.
81. Amadori A, Zamarchi R, De Silvestro G, Forza G, Cavatton G, Danieli GA, Clementi M, Chieco-Bianchi L (1995). Genetic control of the CD4/CD8 T-cell ratio in humans. *Nat Med* 1(12):1279-83.
82. Amadori M, Archetti IL, Verardi R, Berneri C (1995). Characterization of a distinct subpopulation of bovine gamma delta T cells. *Zentralbl Veterinarmed B* 42(3):162-74.
83. Liebler EM, Küsters C, Pohlenz JF (1995). Experimental mucosal disease in cattle: changes of lymphocyte subpopulations in Peyer's patches and in lymphoid nodules of large intestine. *Vet Immunol Immunopathol* 48: 233-48.
84. Liebler EM, Pohlenz JF, Moennig V (1996). Lymphocyte subpopulations in gut-associated lymphoid tissue of cattle with experimental mucosal disease. *Adv Exp Med Biol* 371B:825-7.
85. Hayday AC (2000). [gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu Rev Immunol* ;18:975-1026. Review.
86. Reddehase MJ, Saalmüller A, Hirt W (1991). Gamma/delta T-lymphocyte subsets in swine. *Curr Top Microbiol Immunol* ;173:113-7. Review.
87. Boismenu R, Havran WL (1994). Modulation of epithelial cell growth by intraepithelial gamma delta T cells. *Science* Nov 18; 266(5188):1253-5.
89. Ellis JA, West K, Cortese V, Myers SL, Carman S, Martin KM, Haines DM (1998). Lesions and distribution of viral antigen following an experimental infection of young seronegative calves with virulent bovine virus diarrhoea virus-type II. *Can J Vet Res* 62(3):161-9.
90. Brodersen BW, Kelling CL (1999). Alteration of leukocyte populations in calves concurrently infected with bovine respiratory syncytial virus and bovine viral diarrhoea virus. *Viro Immunol* 12: 323-34.
91. Liebler-Tenorio EM, Ridpath JF, Neill JD (2004). Distribution of viral antigen and tissue lesions in persistent and acute infection with homologous strain of noncytopathic bovine viral diarrhoea virus. *J Vet Diagn Invest* 16: 388-96.
92. Lambot M, Douart A, Joris E et al (1997). Characterization of the response of cattle against non-cytopathic and cytopathic biotypes of bovine viral diarrhoea virus. *J Gen Virol* 78: 1041-7.

93. Collen T, Morrison WI (2000). CD4 (+) T-cell responses to bovine viral diarrhoea virus in cattle. *Virus Res* 67: 67-80.
94. Collen T, Douglas AJ, Paton DJ, Zhang G, Morrison WI (2000). Single amino acid differences are sufficient for CD4(+) T-cell recognition of a heterologous virus by cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *Virology* 276: 70-82.
95. Collen WV, Elliott RD, French TW et al (2002). Analysis of the repertoire of cattle CD4 (+) T cells reactive with bovine viral diarrhoea virus. *Vet Immunol Immunopathol* 87: 235-8.
96. Frink S, Grummer B, Pohlenz JF, Liebler-Tenorio EM (2002). Changes in distribution and numbers of CD4+ and CD8+ T-lymphocytes in lymphoid tissues and intestinal mucosa in the early phase of experimentally induced early onset mucosal disease in cattle. *J Vet Med B Infect. Dis. Vet. Public Health.* 49, 476-483.
97. Heinz FX, Collet MS, Purcell RH, et al (2000). Genus pesivirus. In *Virus Taxonomy*. Eds. Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, et al., pp. 867-72. Academic Press, New York.
98. Yoshino T, Kondo E, Cao L, Takahashi K, Hayashi K, Nomura S, Akagi T (1994). Inverse expression of bcl-2 protein and Fas antigen in lymphoblasts in peripheral lymph nodes and activated peripheral blood T and B lymphocytes. *Blood* 83(7):1856-61.
99. Potgieter LN, McCracken MD, Hopkins FM, Walker RD (1984a). Effect of bovine viral diarrhoea virus infection on the distribution of infectious bovine rhinotracheitis virus in calves. *Am J Vet Res* Apr;45(4):687-90.
100. Potgieter LN, McCracken MD, Hopkins FM, Walker RD, Guy JS (1984b). Experimental production of bovine respiratory tract disease with bovine viral diarrhoea virus. *Am J Vet Res* Aug;45(8):1582-5.
101. Potgieter LN, McCracken MD, Hopkins FM, Guy JS (1985). Comparison of the pneumopathogenicity of two strains of bovine viral diarrhoea virus. *Am J Vet Res* Jan;46(1):151-3.
102. Charleston B, Hope JC, Carr BV, Howard CJ (2001b). Masking of two in vitro immunological assays for *Mycobacterium bovis* (BCG) in calves acutely infected with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Vet Rec* Oct 20;149(16):481-4.
103. Ellis JA, West K, Cortese V, et al (2001). Effect of maternal antibodies on induction and persistence of vaccine-induced immune responses against bovine viral diarrhoea virus type II in young calves. *J Am Vet Med Assoc* 219: 3351-6.
104. Endsley JJ, Roth JA, Ridpath J, Neill J (2003). Maternal antibody blocks humoral but not T cell responses to BVDV. *Biologicals* 31: 123-5.
105. Ridpath JE, Neill JD, Endsley J, Roth JA (2003). Effect of passive immunity on the development of a protective immune response against bovine viral diarrhoea virus in calves. *Am J Vet Res* Jan;64(1):65-9.
106. Howard CJ, Clarke MC, Brownlie J (1989). Protection against respiratory infection with bovine virus diarrhoea virus by passively acquired antibody. *Vet Microbiol* Mar;19(3):195-203.
107. Bolin SR, Ridpath JF (1990). Range of neutralizing activity and molecular specificity of antibodies induced in cattle by inactivated bovine viral diarrhoea virus vaccines. *Am J Vet Res* 51: 703-7.
108. Bolin SR, Grooms DL (2004). Origination and consequences of bovine viral diarrhoea virus diversity. *Vet Clin Food Anim* 20: 51-68.
109. Liebler-Tenorio EM, Greiser-Wilke I, Pohlenz JF (1997). Organ and tissue distribution of the antigen of the cytopathogenic bovine virus diarrhoea virus in the early and advanced phase of experimental mucosal disease. *Arch Virol.* 142: 1613-34.

110. Liebler-Tenorio EM, Pohlenz JF (1997). Experimental mucosal disease of cattle: altered cell proliferation in lymphoid tissues and intestinal epithelium. *J. Comp. Pathol.* 117, 339-350.

