

Tesis de Posgrado

Inmunomodulación de la respuesta inmune inducida por vacunas inactivadas contra herpesvirus bovino-1

Romera, Sonia Alejandra

Tesis presentada para obtener el grado de de la Universidad de Buenos Aires

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

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

Cita tipo APA:

Romera, Sonia Alejandra. (). Inmunomodulación de la respuesta inmune inducida por vacunas inactivadas contra herpesvirus bovino-1. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3408_Romera.pdf

Cita tipo Chicago:

Romera, Sonia Alejandra. "Inmunomodulación de la respuesta inmune inducida por vacunas inactivadas contra herpesvirus bovino-1". Tesis de . Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. . http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3408_Romera.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**INMUNOMODULACION DE LA RESPUESTA INMUNE
INDUCIDA POR VACUNAS INACTIVADAS CONTRA
HERPESVIRUS BOVINO-1**

Sonia Alejandra Romera

Director de Tesis: Dra. Ana María Sadir

Instituto de Virología
Centro de Ciencias Veterinarias y Agronómicas
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - Castelar

123408

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

2001

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**IMMUNOMODULATION OF THE IMMUNE RESPONSE
INDUCED FOR INACTIVATED VACCINES AGAINST
BOVINE HERPESVIRUS-1**

Sonia Alejandra Romera

Director de Tesis: Dra. Ana María Sadir

Instituto de Virología
Centro de Ciencias Veterinarias y Agronómicas
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - Castelar

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

2001

Resumen

Se evaluó en bovinos la respuesta inmune humoral y celular inducida después de la vacunación con vacunas contra HVB-1 y el subsecuente desafío con la cepa LA de HVB-1. Los animales fueron vacunados intramuscularmente (IM) con vacunas inactivadas contra HVB-1 conteniendo aceite mineral , aceite mineral con Avridine (emulsiones agua en aceite), o aceite no mineral (squalane) con un sulfolipociclodextrin (SL-CD/S/W, emulsión aceite en agua). No se registraron diferencias significativas en los niveles de anticuerpos inducidos por las 3 vacunas evaluadas. Sin embargo la respuesta celular fue más elevada y temprana cuando estaba incluido en la formulación vacunal el SL-CD/S/W. Se evaluó la eficacia de las vacunas después del desafío intranasal con la cepa virulenta LA de HVB-1. Los animales vacunados con SL-CD/S/W tuvieron menor excreción viral y menores síntomas clínicos que los animales controles sin vacunar. Cuando se relacionaron los niveles de IgG2 e IgG1 con la reducción de excreción viral se observó que, independientemente del adyuvante utilizado, el grupo que presentó al momento del desafío, niveles de la relación IgG2/IgG1 mayores a 1 fue el grupo que presentó menor número de animales con excreción viral. Además los animales inoculados con SL-CD/S/W no presentaron reacciones adversas. Todos estos factores combinados con la gran eficacia y la fácil manipulación del aceite biodegradable hace de la vacuna formulada con este nuevo adyuvante una importante contribución para la industria de vacunas veterinarias.

Palabras claves: *Herpesvirus Bovino-1, Adyuvantes, Sulfolipo-ciclodextrin, Avridine, Respuesta inmune.*

Summary

The antibody and cell mediated immune responses induced by BHV-1 were analysed in cattle after vaccination and challenge exposure to the virulent strain LA of BHV-1. Animals were vaccinated intramuscularly (IM) with inactivated virus vaccines against BHV-1 containing either a water in mineral oil adjuvant (W/O), a water in mineral oil adjuvant plus Avridine (W/O+Avridine) or sulfolipo-cyclodextrin in squalane in-water emulsion (SL-CD/S/W). No significant differences were registered in the antibody response induced by the three evaluated vaccines. However, the BHV-1 specific cell-mediated immune response was stronger and appeared earlier when SL-CD/S/W was included in the formulation. The efficacy of the vaccines was also evaluated after intranasal challenge of the calves with a virulent BHV-1 LA strain. Animals vaccinated with SL-CD/S/W had reduced virus excretion and clinical symptoms compared with the mock-vaccinated animals. Comparison of levels of BHV-1 specific IgG2 and IgG1 with virus shedding revealed that, regardless of the adjuvant administered, animals showing BHV-1 specific IgG2/IgG1 ratios higher than 1 were those with a significant lower number of individuals shedding virus. Additionally, animals vaccinated with SL-CD/S/W presented no post-vaccinal reactions. These factors, combined with the higher efficacy and the ease of manipulation of the biodegradable oil, makes the vaccine formulated with this new adjuvant an important contribution for the veterinary vaccines industry.

Keywords: *Bovine herpesvirus-1, adjuvants, sulfolipo-cyclodextrin, Avridine, immune response.*

*Este trabajo de tesis fue publicado en la
Revista Vaccine 19: 132-141 (2000)*

ABREVIATURAS

HVB-1	Herpesvirus bovino tipo 1
Col.	colaboradores
IPV	Vulvovaginitis pustular infecciosa
IPB	Balanopostitis infecciosa
IBR	Rinotraqueítis infecciosa bovina
nm	Nanómetros
DNA	Acido desoxinucleido
pb	Pares de bases
kpb	Kilopares de base
Da	Daltons
kDa	Kilo Daltons
PM	Peso molecular
LA	Los Angeles
HSV	Herpes simplex virus
aac	Aminoácidos
pi	Post infección
dpi	Días post-infección
°C	Grados centígrados
LT	Linfocitos T
LB	Linfocitos B
PMN	Neutrófilos polimorfonucleares
NK	Natural killer
IFN	interferón
ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
IgM	Inmunoglobulina M
IgG	Inmunoglobulina G
IgA	Inmunoglobulina A
IMC	Inmunidad mediada por células

ADCC-C	ADCC facilitada por complemento
IL	Interleuquina
hs	Horas
BEI	Bromo etil imina binaria
UV	Ultravioleta
SN	Seroneutralizantes
AV	Avridine
VFA	Virus de la fiebre aftosa
SLP-CD/S/W	Sulfolipopolisacárido ciclodextrin squalane en agua
MDBK	Madin Darby Bovine Kidney
VDVB	Virus de la diarrea viral bovina
AcsMs	Anticuerpos monoclonales
dpv	Días post-vacunación
RIC	Respuesta inmune mediada por células
TLP	Test de linfoproliferación
dpd	Días post-desafío
pd	Post-desafío
PRV	Virus de la pseudorabia
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
TFB	Testículo fetal bovino
MEM-E	Medio esencial mínimo-Eagle
SFB	Suero fetal bovino
DICT	Dosis infectivas en cultivo de tejidos
moi	Multiplicidad de infección
TN	Título neutralizante
BB	Buffer de bloqueo
PBST	PBS-Tween 0.5%
PBST-O	PBST-ovoalbúmina
D.O	Densidad óptica
TEN	Tris-EDTA-cloruro de sodio
OPD	Orto fenil diamina
ECP	Efecto citopático
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

ANOVA	Análisis de variancia
SEM	Standart error means
PHA	Fitohemaglutinina
Con A	Concanavalina A
LPS	Lipopolisacárido de bacterias Gram negativas
TCR	Receptor celular T
GM-CSF	Factor de estimulación de colonias granulocito/macrófago
TNF- α	Factor de necrosis tumoral
Th	Linfocito T helper
BRSV	Virus sinsicial respiratorio bovino
CTB	Subunidad β de la tóxina colérica
GRC	Glóbulos rojos de carnero
min	minutos
PBS	Bufer fosfato salino
hpi	Horas post-infección
HVS-1	Herpes virus simplex 1
HVS-2	Herpes virus simplex 2
Ag	Antígeno
ABTS	2,2'-azino bis (3etilbenzeno-tiazolina-6 ácido sulfónico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
PPD	Proteína purificada de Mycobacterium
SRBC	células rojas de oveja
Us	Región única corta
Ul	Región única larga
L	Componente largo
S	Componente corto
CMH	Complejo mayor de Histocompatibilidad
TFB	Testículo fetal bovino
UV	Luz ultravioleta
I.E	Indice de Estimulación

***A los pequeñitos que día a día me comprometen con la vida y me alientan
para que siga luchando, mis hijos Valeria e Iván***

***A la memoria de mi esposo quien me enseñó que tanto los sueños como
las historias de amor pueden tornarse realidad***

A la memoria de mamá y abuela Valeria –

AGRADECIMIENTOS

A mi directora Dra. Ana María Sadir por darme la oportunidad de realizar este trabajo de tesis, por su afecto y estímulo constante en lo laboral y en los momentos difíciles.

A la Dra. Laura Weber y el Dr. Norberto Fondevila por su constante apoyo y la lectura crítica de este trabajo.

A Patricia por la lectura crítica, por su orientación, interés e invaluable colaboración dentro y fuera del Laboratorio y hacer crecer juntas el “grupo de Herpes”.

A Andy y Mariano por ayudarme desde el comienzo.

A Mariana Puntel por acompañarme desde el principio en este trabajo de tesis.

A Mariana Dominguez por ser amiga, tía de mis hijos y por su desinteresada colaboración.

A Valeria Quattrocchi, Valeria Alcón y Paula Del Médico, por sus buenos sentimientos, por creer en mí y por ayudarme siempre. Paula, gracias!!! por el apoyo de último momento.

A María Jose y Karina por tantos favores.

A Juancho y todos los compañeros de Virología que ayudaron de una u otra manera, con el trabajo, los consejos, la contención...

A María Barrandeguy por su afecto y contención

A Luis Ricci por su valiosa colaboración

A Betty, por su eficiencia, por estar siempre dispuesta a ayudar en todo y por su amistad.

A Osvaldo Zabal y los chicos de Cultivos Celulares por su invaluable colaboración.

Al Dr Javier Blancoviera por su permanente y desinteresada colaboración.

A La Dra Laura Marangunich por el estudio estadístico de los datos y su calidez.

A Antonio, Diego, Marta, Juanita, Matilde, Horacio , Mari; Marcelo, Sandra, Eva, Perla y Claudia Vallejos por su excelente apoyo técnico y facilitarme las cosas.

A Estela y Marcela de Biblioteca por su buena predisposición.

Al personal del Campo Experimental del INTA por su valiosa colaboración.

A Cristina y todo el personal del Jardín por tanto cariño y comprensión.

A mis hermanos Mauricio y César por el apoyo y cariño incondicionales.

A mis amigos Mariana, Roberto, Ana y Carmen, por confiar en mí, apoyarme en todo y por ser amigos.

A mis amigos de Bahía Blanca que a pesar de la distancia siempre están presentes en mi corazón.

Al Dr. Daniel Tanzola y el Dr Nestor Cazzaniga de la Universidad del Sur de Bahía Blanca por alentarme en mis primeros pasos en la investigación.

INDICE

1. INTRODUCCION	1
1.1. Antecedentes	2
1.2. Clasificación	4
1.3. Herpesvirus bovino 1	8
1.3.1. Organización del genoma de HVB-1	8
1.3.2. Propiedades fisicoquímicas	9
1.3.3. Proteínas y antígenos	10
1.3.4. Replicación viral	12
1.3.5. Rango de huéspedes	13
1.3.6. Cuadros clínicos	16
1.3.7. Latencia	17
1.3.8. Patogenia	19
1.3.9. Epizootología	19
1.3.10. Respuesta inmune	32
1.3.11. Control y erradicación	32
1.3.12. Vacunas	32
1.3.13. Adyuvantes	36
1.3.14. Inmunomoduladores	38
1.3.14.1. Inmunomoduladores utilizados en este trabajo	39
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	43
2. MATERIALES Y METODOS	45
2.1. Animales de experimentación	46
2.2. Cultivos celulares	46
2.3. Virus	46
2.3.1. Obtención de virus vacunal	46
2.3.2. Titulación viral	47
2.3.3. Inactivación del virus	47
2.4. Vacunas	47
2.4.1. Inmunomoduladores	47

2.4.2. Vehículos	48
2.4.3. Formulación de las vacunas	49
2.4.4. Inocuidad de las vacunas	49
2.4.5. Esterilidad de las vacunas	49
2.4.6. Estabilidad de las vacunas	49
2.5. Esquema de inmunización	50
2.6. Extracción de sangre y suero	50
2.7. Serología	50
2.7.1. Seroneutralización	50
2.7.2. ELISA	51
2.7.2.1. Obtención de virus para ELISA	51
2.7.2.2. ELISA indirecto para detectar anticuerpos totales contra herpesvirus bovino	52
2.7.2.3. Puesta a punto del ensayo de ELISA para detectar isotipos de IgG anti HVB-1 en sueros bovinos	53
2.7.2.4. ELISA indirecto para detectar isotipos de IgG anti HVB-1 en sueros bovinos	55
2.8. Inmunidad celular - Test de Linfoproliferación	56
2.9. Desafío viral	57
2.9.1. Diseño experimental	57
2.9.2. Observación clínica y toma de muestras	58
2.9.3. Aislamiento viral	62
2.9.4. Extracción de DNA de hisopados nasales	62
2.9.5. Reacción en cadena de la polimerasa	63
2.10. Tratamiento estadístico de los datos	63
3. RESULTADOS	65
3.1. Estudio de la respuesta inmune humoral	66
3.1.1. Cinética de anticuerpos totales	66
3.1.2. Cinética de las subclases de IgG	67
3.1.2.1. Puesta a punto del ELISA para detectar isotipos de IgG en sueros bovinos anti-HVB-1	67
3.1.2.2. Cinética de anticuerpos IgG ₁ e IgG ₂	71
3.1.2.3. Relación entre los títulos de IgG ₂ e IgG ₁	73

3.1.2.4. Correlación entre la relación IgG ₂ /IgG ₁ y cada subclase	74
3.1.3. Evaluación de los anticuerpos neutralizantes inducidos	76
3.1.3.1. Influencia de los inmunomoduladores en la inducción de anticuerpos neutralizantes	76
3.1.3.2. Correlación entre anticuerpos totales y anticuerpos neutralizantes	77
3.2. Evaluación de la respuesta inmune celular a largo plazo	79
3.2.1. Puesta a punto del test de linfoproliferación para HVB-1	79
3.2.2. Influencia de los inmunomoduladores en estudio en la inducción de respuesta inmune celular	81
3.3. Protección conferida por las distintas vacunas frente al desafío viral	83
3.3.1. Evaluación de signos clínicos	84
3.3.1.1. Temperatura	84
3.3.1.2. Tipo de secreción nasal	86
3.3.1.3. Lesiones vaginales	87
3.3.2. Aislamiento viral	88
3.3.2.1. Aislamiento en cultivos celulares	88
3.3.2.2. Detección de DNA de HVB-1 por PCR en muestras de secreciones nasales	94
3.3.3. Cinética de anticuerpos totales en suero	96
3.3.3.1. Correlación estadística entre niveles de anticuerpos y niveles de excreción viral	97
3.3.4. Perfil isotípico de anticuerpos en suero	98
3.3.4.1. Relación IgG ₂ /IgG ₁ en tiempos post-desafío	99
3.3.4.2. Rol de la subclase IgG ₂ en la protección	100
3.3.5. Cinética de anticuerpos neutralizantes en suero	101
3.3.5.1. Rol de los anticuerpos neutralizantes en la protección	102
3.3.6. Respuesta inmune celular	102
4. DISCUSION	104
5. CONCLUSIONES	116

1. INTRODUCCION

El Herpesvirus bovino tipo 1 (HVB-1) por sus propiedades fisicoquímicas y morfológicas fue clasificado como miembro de la familia Herpesviridae. Estudios posteriores basados en sus características de crecimiento “*in vitro*” y su estructura genómica llevaron a clasificarlo en la subfamilia Alphaherpesvirinae (Roizman, 1982) en el género Varicellovirus (Brown, 1989).

El HVB-1 afecta en forma natural al bovino produciendo pérdidas económicas en términos de mortalidad, morbilidad y complicaciones con otras patologías infecciosas. Provoca un amplio espectro de manifestaciones clínicas: rinotraqueítis, vulvovaginitis pustular infecciosa (IPV), balanopostitis (IPB), conjuntivitis, aborto, enteritis y encefalitis (Benitez, 1990).

1.1. ANTECEDENTES

Originalmente la enfermedad en bovinos fue descrita en Europa al comienzo del siglo XX y llamada Exantema Vesicular Coital (Bläschenausschlag). La descripción clinico-patológica es amplia en textos de la época (Hutyra, 1910). Promediando el siglo se estableció en Estados Unidos de Norteamérica la etiología viral del cuadro conocido como Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR) y se estableció su relación con el virus de la IPV (Gillespie, 1959).

La IPV es una enfermedad venérea del bovino descrita por primera vez en Alemania en la mitad del siglo pasado por Bucher (citado por Kokles (1967)) en 1894. Trommsdorf le dió su nombre definitivo: Bläschenausschlag. La misma enfermedad venérea fue descrita por Steddom en Estados Unidos por primera vez en 1895. Estos datos indican que la IPV bovina existía antes que la IBR tanto en Europa como en Estados Unidos. La mayoría de los investigadores concuerda en el hecho de que el virus de la rinotraqueítis emergió a partir del virus de la IPV en los Estados Unidos, más tarde en Europa, como resultado de ciertos cambios importantes en la cría del ganado como el hacinamiento de numerosos animales dentro de un mismo rodeo (Pastoret, 1978; Suarez, 1992). El agente causal de la IPV se aisló en 1958, un año después que el causante de IBR (Studdert, 1994).

La IBR es una enfermedad respiratoria del bovino, por primera vez descrita en Estados Unidos en 1954 (Schroeder, 1954; Mc Kercher, 1959; Jensen, 1955; Miller, 1955).

El primer aislamiento viral fue anunciado en 1956 a partir de casos de rinotraqueítis infecciosa en bovinos en los Estados Unidos (Madin, 1956). En 1961, Armstrong y col.

sugirieron que el virus de la IBR pertenecería al grupo de los herpesvirus (Studdert, 1994). Brotes epizooticos de encefalitis en bovinos jóvenes en distintas partes del mundo causados por Herpesvirus bovino parecen responder a una nueva entidad patológica y etiológica: el herpesvirus bovino 5 (HVB-5) (Roizman, 1992).

Las epizootias clínicamente manifiestas como meningoencefalitis registradas en Australia por French en 1962 (Studdert y col., 1985; Studdert y col, 1989) y en California por Barenfus y col. aproximadamente en el mismo período (Mc Kercher, 1970) son el punto de partida de estas investigaciones. Posteriormente se notifica de casos clínicos en la Argentina a partir de 1980 (Carrillo y col. 1983; Schudel y col; 1986, 1987).

La distribución del virus es mundial y en nuestro país el cuadro clínico típico respiratorio de la enfermedad se lo observó por primera vez en Las Flores, Provincia de Buenos Aires, en el año 1959. Luego, en el año 1972, se aísla el virus en nuestro país, sin llegar a caracterizarlo (Epstein y col. 1971) y en el año 1980, Lager y col. aíslan y caracterizan la cepa L-114 (Lager y col., 1981), demostrándose experimentalmente su patogenicidad en ese año. Relevamientos serológicos, han demostrado que una importante proporción de la población bovina es reactiva serológica positiva a este agente (Fondevila y col., 1981; Lager y col., 1983), por lo que actualmente constituye una de las infecciones virales de mayor repercusión en nuestros rodeos bovinos.

Se estudió en distintos establecimientos de Argentina la prevalencia de anticuerpos circulantes específicos para el HVB-1 y los resultados demostraron que en el 100% de los establecimientos existe virus activo en la población (Fondevila, 1981; Schudel, 1987). Cuando los resultados se expresaron como proporción de reaccionantes (número de reactores/total), se demostró que HVB-1 se encuentra difundido en todo el país, con índices de prevalencia entre 36 y 66%. Los índices de prevalencia aumentan progresivamente con la edad de los animales (Fondevila, 1981; Schudel, 1987), hecho que se repite en otros lugares del mundo.

Datos más actuales de un relevamiento realizado por el INTA en 1999 determinan una seroprevalencia de 21-56% en Corrientes, 17-65% en La Rioja, 79,6% en Pergamino y 70-82% en Olavarria (Alegre, 2001).

A comienzos de la década del 80 se notificaron en Argentina importantes brotes de meningoencefalitis (Schudel, 1986) que luego de la reclasificación corresponderían a

HVB-5. Para la enfermedad nerviosa la mortalidad en animales jóvenes puede llegar al 100% (Carrillo, 1983; Studdert, 1994).

1.2. CLASIFICACION

La palabra herpes se ha usado en medicina desde hace por lo menos 25 siglos. La palabra griega ερπησ (lesión) fue usada antaño para definir el cáncer de piel o excema. En los últimos 19 siglos se continuó usando la palabra herpes para diversas lesiones de la piel. La primera referencia de “herpes febrilis” como herpes fue hecha por Morton en 1694. Luego se siguieron registrando en la literatura distintas denominaciones de herpes, algunas descripciones son claras pero otras muy confusas y nombres como “herpes miliaris”, “herpes exedens” y “herpes esthiomenos” se aplicaron para enfermedades con distintas manifestaciones. Turner, en 1714, en su tratado de enfermedades de la piel escribió: “El Herpes es una pústula en la piel que recibe diversos nombres”. El distinguió herpes facial (simplex), serpigo (tiña), herpes miliaris y esthiomenos o exedens que sería más apropiado llamar úlcera. A partir del siglo 18 se hicieron populares la clasificación y sistematización, desarrollándose la clasificación clínica (Kaplan, 1973).

El estudio del grupo de los herpesvirus fue puntualizado por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) a través del subcomité de virus de vertebrados para considerar la nomenclatura y clasificación de los virus comprendidos en la familia Herpesviridae, y establecieron tres subfamilias Alfaherpesvirinae, Betaherpesvirinae, Gammaherpesvirinae (Roizman, 1981).

Familia Herpesviridae

La inclusión de virus dentro la familia Herpesviridae se basa en la arquitectura del virión. Un típico virión de herpes consiste en un “core”, conteniendo un DNA lineal doble cadena enrollado alrededor de un huso fibrilar; una cápside, de simetría icosaédrica de aproximadamente 100 a 110 nanómetros (nm) de diámetro conteniendo 12 capsómeros pentaméricos y 150 capsómeros hexaméricos; el tegumento (material asimétrico que rodea la cápside) y que conecta su cara externa con la interna de la envoltura, que es una membrana lipoproteica en donde se insertan las glicoproteínas virales como espículas que se proyectan hacia la superficie. Se han publicado medidas del herpesvirion desde 120 nm a 300 nm. Una posible explicación para el grado de esta

variabilidad sería el espesor del tegumento. Sin embargo, la mayor fuente de variabilidad es la integridad de la envoltura. Viriones con la envoltura intacta son impermeables a la tinción negativa y generalmente retienen una forma esférica, mientras que viriones con envolturas dañadas son permeables a la tinción negativa y tienen una apariencia más ovalada con forma irregular y un diámetro generalmente más grande que el virión intacto (Roizman, 1992).

La familia Herpesviridae se subdivide en tres subfamilias según sus propiedades biológicas:

Subfamilia Alfaherpesvirinae: la integran aquellos virus de ciclo replicativo relativamente corto, amplio rango de hospedadores naturales, rápida diseminación en cultivos celulares, eficiente destrucción de células infectadas y alta citopatogenicidad. Establecen infecciones latentes en neuronas ganglionares y causan infecciones agudas. Comprende 2 géneros: Simplexvirus (ej. Herpes simplex 1) y Varicellovirus (ej. Varicella Zoster, Herpesvirus bovino 1 y 5) (Roizman, 1992).

Subfamilia Betaherpesvirinae: pertenecen a ella los virus con un restringido rango de hospedadores, ciclo replicativo prolongado, lenta diseminación en cultivos celulares y baja citopatogenicidad. Pueden hacer latencia en células linfocitárias, glándulas salivares, riñón y otros tejidos. Frecuentemente originan infecciones con persistente diseminación de virus. Comprende los géneros Citomegalovirus (ej. Citomegalovirus humano) y Muromegalovirus (ej. Citomegalovirus murino).

Subfamilia Gammaherpesvirinae: el rango de huéspedes experimentales para estos virus es frecuentemente, pero no exclusivamente, limitado a la familia u orden al que pertenece el hospedador natural. *In vitro* replican en células linfoblásticas y fibroblásticas. Infectan linfocitos, tendiendo a ser específicos para células T o B (aunque pueden ocurrir excepciones), a los que pueden transformar y producir tumores. Desarrollan latencia en tejido linfático. Comprende los géneros: Linfocriptovirus (ej. Virus Epstein-Barr) y Rhabdinovirus (ej. Herpesvirus saimiri) (Roizman, 1992).

En cuanto al genoma de herpesvirus, la mayor parte del DNA extraído de los viriones son moléculas grandes de doble cadena lineales. En el caso de herpesvirus humano, que se toma como un caso general, el DNA inmediatamente después de liberarse de la cápside se circulariza dentro del núcleo de la célula infectada (Poffenberger, 1985). Los DNA difieren en sus medidas y composición de bases. El tamaño del DNA de los herpesvirus varía entre 124 y 235 kilopares de base (kpb) aproximadamente (Roizman, 1992). La longitud del genoma viral es característica de cada virus, sin embargo no es

una característica determinante para considerar a un virus distinto, ya que aislamientos independientes de un mismo virus pueden variar hasta en 10 kpb. Frecuentemente, reflejan el número de secuencias terminales y secuencias internas repetidas, por lo que los pesos moleculares varían entre 80 y 150×10^6 Daltons (Da). El DNA genómico está compuesto de 2 regiones denominadas componente largo (L) y componente corto (S). Los arreglos de secuencia son un hecho característico del genoma de herpesvirus, se encuentran secuencias terminales repetitivas de más de 100 pares de bases (pb).

De acuerdo a la localización y presencia de estas secuencias los herpesvirus pueden dividirse en 6 grupos designados desde A a F. En el grupo A, ambos extremos del genoma poseen la misma secuencia repetitiva. En el grupo B, la secuencia terminal de los dos extremos es una región con repeticiones directas. En el grupo C, el número de repeticiones terminales es pequeño. En la región única del genoma también existen secuencias repetidas ubicadas en tramos específicos. En el grupo D la región terminal de un extremo se repite en una orientación invertida en el interior. Estas dos secuencias flanquean la región única corta (US). Esta zona puede estar invertida con respecto a la restante región única larga (UL), entonces de una célula infectada se pueden extraer dos poblaciones equimolares de DNA difiriendo en la orientación del componente US con respecto a la región fija UL. En el grupo E, las secuencias de ambos extremos están repetidas en una orientación invertida y dividen el genoma en dos componentes L y S cada uno de los cuales consiste en una única secuencia flanqueada por repeticiones invertidas. Estas regiones pueden invertirse una respecto a la otra y entonces el DNA extraído de viriones de una célula infectada consiste en 4 poblaciones equimolares difiriendo en la orientación relativa de los dos componentes. Para los genomas pertenecientes al grupo F, las secuencias de los extremos no son idénticas y no se repiten. Se pueden observar los distintos tipos de genoma en el Figura 1 (Roizman, 1992).

GRUPO

ORDEN DE LA SECUENCIA

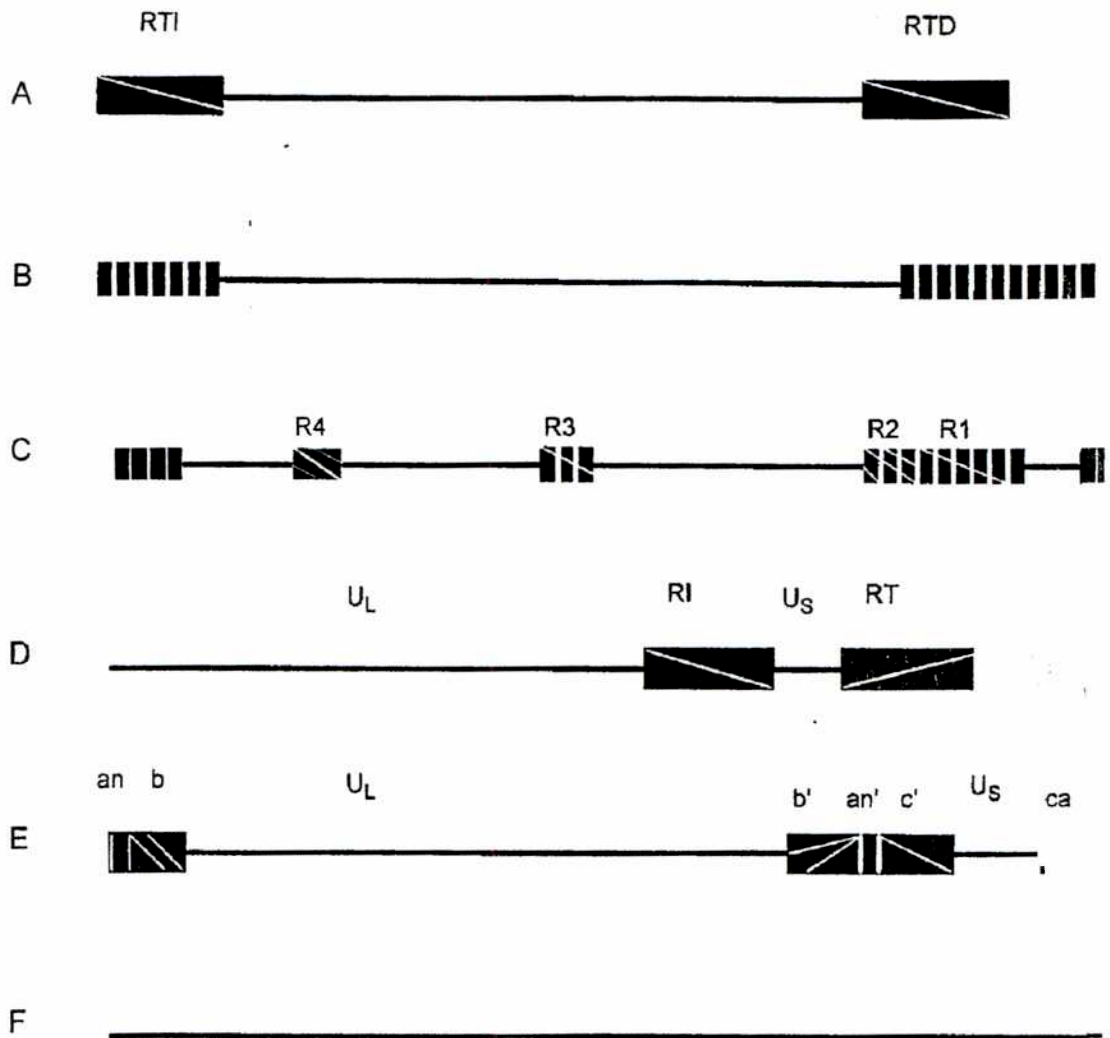


Figura 1. Diagrama esquemático de los 6 grupos de genomas de los virus que comprenden la familia Herpesviridae. La línea horizontal representa regiones únicas o casi únicas. Los dominios repetitivos se muestran como rectángulos y se designan como: repeticiones terminales derecha e izquierda (RTD y RTI) para el grupo A, en el grupo B, la secuencia terminal de los dos extremos es una región con repeticiones directas, repeticiones internas R1 a R4 para el grupo C y repeticiones interna y terminal para el grupo D. En el grupo E existen 2 elementos, designados b y c respectivamente. Las secuencias terminales $a_n b$ y ca están insertas con orientación invertida dividiendo las secuencias únicas en dominios U_L y U_S . Repeticiones terminales en los genomas del grupo F no han sido descritas (Roizman y col., 1992)

1.3. HERPESVIRUS BOVINO

El virus HVB aislado por Madin y col, (1956) fue clasificado como miembro de la familia *Herpesviridae* comparando el crecimiento *in vitro* y la morfología del virus con el herpes simplex (Armstrong, 1961). Más adelante, cuando se realizaron estudios del genoma, se lo clasificó dentro de la subfamilia *Alfaherpesvirinae* (Roizman, 1981, 1992), género *Varicellovirus* (Brown, 1989).

1.3.1. Organización del genoma de HVB

El genoma es una molécula lineal de DNA doble cadena de aproximadamente 135-140 kpb. Este tamaño fue inferido sobre la base de los mapas obtenidos mediante el uso de enzimas de restricción, el rango refleja en parte las particularidades propias de cada cepa y en menor proporción las distintas metodologías y modos de interpretación (Wylér, 1989). El tamaño no parece relacionarse con el tipo de cepa estudiada: la cepa Cooper (subtipo 1) parece ser menor (136,9 kpb) que la cepa K22 (subtipo 2), pero otras cepas subtipo 1 (LA y 3,156) de 138,7 kpb y 139,1 kpb respectivamente, no muestran esta reducción de tamaño (Wylér, 1989). Las longitudes de las repeticiones invertidas y de *Us* encontradas son cepa-específicas y explican en parte las variaciones del PM de los DNAs (Engels, 1986). Basados en análisis del genoma y patrones de polipéptidos virales, HVB-1 se clasificó en 5 subtipos: 1, 2a, 2b, 3a, y 3b (Wylér, 1989). Los subtipos no presentan una correlación estricta con el origen clínico de los aislamientos, sin embargo, habría una correlación parcial que determinaría que el subtipo 1 comprende la cepa de IBR, el subtipo 2 la cepa de IPV y el subtipo 3 contiene la cepa neurológica (Tikoo, 1995). Este último subtipo (HVB- 1.3) se ha reclasificado sobre la base de estudios bioquímicos y genéticos, entre otros, y actualmente se denomina HVB-5 (Roizman, 1992; Studdert, 1994). Engels y col. (1986) estimaron un 85% de similitud entre HVB-1 y HVB-5. Seal (1985), estimó más de un 95% de similitud entre HVB-1.1 y 1.2. Las diferencias entre HVB-1.1 y HVB-1.2 se restringen a determinadas regiones del genoma, caracterizadas por pérdida o ganancia de sitios de restricción. En cambio, HVB-5 posee alteraciones en los sitios de restricción a nivel de todo el genoma, por lo que difiere de HVB-1.1 y 1.2 (Engels, 1986).

No se ha encontrado correlación entre el patrón de restricción enzimática y las manifestaciones clínicas (Misra, 1983; Seal, 1985; Engels, 1986). Misra y col (1983) citan a House (1972), donde describen que aislamientos de origen genital pueden causar

infecciones respiratorias y viceversa, por esta razón sugieren que el tipo de enfermedad causada por el virus puede estar determinado más por la vía de infección y las prácticas de manejo que por propiedades inherentes de ciertos tipos de HVB-1.

La densidad de la molécula de DNA es de aproximadamente de 1,22g/ml en tartrato de potasio y 1,21 g/ml en gradiente de sacarosa 20-65%, 1,730 g/ml en cloruro de cesio y se correlaciona con el contenido de guanina + citosina (G+C) de 72% (Plummer, 1969). Su coeficiente de sedimentación es de 1680-1830 S. El peso molecular es de 91.5×10^6 Da (Wyler, 1989).

La organización del genoma es típico del grupo D de herpesvirus, en el que el genoma se divide en un único segmento largo de aproximadamente 102 a 104 kpb y un único segmento corto de aproximadamente 10.5 a 11 kpb, flanqueado por repeticiones internas y terminales invertidas (RI_s y RT_s). Se pueden encontrar dos poblaciones equimolares de DNA extraído de los viriones de una célula infectada que solo difieren en la orientación del componente U_s en relación a la orientación fija del componente U_L (Studdert, 1994). Alrededor del 10% del DNA viral transporta en el extremo terminal derecho una “cola” de DNA celular, lo que indicaría que el DNA del HVB-1 puede recombinarse frecuentemente con el DNA de la célula (Wyler, 1989).

1.3.2. Propiedades fisicoquímicas

El HVB-1 es estable en un amplio rango de temperatura. El título viral permanece constante después de nueve meses almacenado a -60°C , a 4°C hay una pérdida de 1 logaritmo después de 30-40 días de almacenamiento. A 24°C se produce la inactivación completa después de 50 días. No hay pérdida de actividad viral hasta 3 días a 24°C pero el título baja un logaritmo a partir del quinto día. Después de 10 días a 37°C no hay actividad viral. A 56°C se inactiva en 21 minutos. Se pierde un logaritmo de actividad cuando se liofiliza el virus.

El HVB-1 es sensible a la acción del éter, acetona y alcohol etílico, la inactivación ocurre en cada caso luego de las 24 horas. La formalina inactiva el virus pero en menor proporción.

El virus es estable en un rango de pH de 6 a 9 pero pierde actividad rápidamente por debajo de 6 (Griffin, 1958).

1.3.3. Proteínas y antígenos

Al igual que otros herpesvirus el genoma de HVB-1 codifica para por lo menos 69 proteínas. Tikoo (1995) en su actualización de datos de HVB-1 realizó una revisión de las proteínas virales identificadas hasta el momento y sus funciones.

1.3.4. Replicación viral

La infección de células permisivas por HVB-1 tiene lugar inicialmente por la unión de glicoproteínas virales de la envoltura a los receptores celulares (por ej. residuos heparan sulfato de proteoglicanos celulares) (Liang y col, 1993; Schwizer y col, 1996). Esta interacción inicial es primariamente mediada por las glicoproteínas virales más importantes (gB, gC y gD) (McLain, 1994). Así como para otros herpesvirus, gC junto con gB son consideradas unas de las principales proteínas involucradas en la unión del virus a la célula a través del receptor celular (los residuos heparan sulfato de proteoglicanos celulares) (Liang, 1992; Okasaki y col, 1994). Aunque es conocido que muchos virus utilizan sólo un receptor para la unión a la célula, no es el caso de HVB-1 ya que mutantes gC⁻ pueden iniciar la infección y replicar tanto *in vitro* como *in vivo*, se cree que otras glicoproteínas como gB y gD (Byrne y col, 1995) son ligandos de unión secundarios. Además de la unión, gB y gD están involucradas en la penetración y fusión celular (Babiuk, 1996; Schroder y col, 1997). Una cuarta glicoproteína viral que está muy conservada en los miembros de la subfamilia Alfaherpesvirinae, la gH, también es esencial para la penetración de HVB-1 a la célula blanco y para la diseminación celular aunque no lo es para la unión (Meyer y col, 1998). Hasta el momento, se creía que la entrada a las células se producía vía fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática y que la nucleocápside y las proteínas del tegumento ganaban acceso al citoplasma por endocitosis (Sodeik, 1997; Fuller 1992; Granzow, 1997). Los últimos trabajos realizados indican un mecanismo de entrada completamente nuevo del HVB-1 a células Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) que puede ser subdividido en cuatro fases: pegado, fusión, perforación y penetración, y difusión y transporte intracelular. Este proceso incluye un tipo de fusión única de la envoltura viral con la membrana plasmática con la consiguiente entrada de toda la partícula viral envuelta dentro del citoplasma. Durante la entrada de HVB-1, la fusión inicial procede como una fusión de la membrana externa de la envoltura viral con la capa interna (citoplasmática) de la

membrana plasmática y viceversa, lo cual resulta en la formación de un “crossing”. La naturaleza hidrofílica e hidrofóbica de los fosfolípidos demanda que los fosfolípidos de la capa externa de la envoltura viral deban ser dirigidos dentro de la capa fosfolipídica externa de la membrana plasmática y finalmente a través de ésta, proceso posiblemente mediado por una o más de las glicoproteínas que se supone actúan como proteínas de fusión (Fuller, 1992; Peeters, 1992). De esta manera, la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática resulta en una inserción parcial de la envoltura viral dentro de la membrana celular. La importancia de este tipo de fusión de membrana aún no es clara, aunque ciertamente no habilita al virus a penetrar la membrana plasmática, sino que el virus gana acceso al citoplasma a través de una invaginación que se desarrolla cerca del área de fusión y que se abre hacia el citoplasma (Wild y col., 1998).

Durante la infección con virus Herpes, ocurren al menos dos tipos distintos de procesos que involucran la fusión de membrana. Luego del pegado de los viriones libres a la membrana, la penetración es inducida por fusión de la envoltura viral con la membrana citoplasmática celular como se explicó anteriormente. Durante la formación de los viriones, una capa proteínica o tegumento, se adiciona a las cápsides, la cual a su vez, es encerrada en una bicapa lipídica que contiene las proteínas codificadas por el virus y que constituye la envoltura viral (Roizman 1992; Mettenleiter, 1994). Se ha propuesto que las cápsides, las cuales adquieren una envoltura primaria por gemación a través de la membrana nuclear interna, subsecuentemente se fusionan con la membrana nuclear externa, liberándose así hacia el citoplasma. La envoltura final, conteniendo las glicoproteínas maduras, es entonces adquirida por gemación de las cápsides intracitoplasmáticas dentro de vesículas de la red del trans Golgi.

En el núcleo la transcripción de genes comienza de una manera regulada (Figura 2). Las proteínas del tegumento (como Bt1f y VP8), junto a proteínas celulares reguladoras, inducen la transcripción y traducción de genes virales que codifican para proteínas inmediatamente tempranas (Misra, 1981) como BICP0, BICP4 y BICP22 (Schwyzer, 1993; Wirth, 1992). Estas proteínas inducen la transcripción y traducción de proteínas tempranas (Misra, 1981) tales como timidina kinasa y DNA polimerasa. Estas están involucradas principalmente en la replicación del genoma y en la inducción de la síntesis de proteínas tardías (proteínas estructurales del virión) tales como la gC y VP8 entre otras. El ensamble entre el genoma y la nucleocápside (DNA viral y algunas proteínas tempranas y tardías) ocurre en el núcleo de células infectadas (Hammerschmidt, 1988; Ludwig, 1983). La nucleocápside se rodea de la envoltura

cuando pasa a través de la membrana nuclear y adquiere la envoltura final por gemación de las cápsides intracitoplasmáticas dentro de las vesículas de la red trans Golgi. Las partículas virales maduras son liberadas por ruptura de células infectadas o fusión de células infectadas con células no infectadas. Mas tarde en el ciclo de infección, el virus es directamente transmitido desde las células primariamente infectadas a las células vecinas no infectadas. Este proceso, se denomina dispersión directa célula a célula. No es claro si las membranas de las células infectadas y no infectadas se fusionan, si hay una modificación de las regiones de unión entre las células o si los viriones son liberados dentro del espacio intercelular y luego se fusionan con las células vecinas.

La cinética de la replicación viral es muy rápida después de la unión y entrada a la célula (Ludwig, 1987; Misra, 1981) (Figura 2). La expresión de antígenos sobre la superficie celular ocurre a las 3 a 4 horas post-infección (hpi), la encapsidación viral aproximadamente a las 6-7 hpi y la diseminación viral a células contiguas y liberación al espacio extracelular suceden aproximadamente entre media hora y una hora después del ensamble, respectivamente (Babiuk, 1975). Estos primeros eventos inician en el hospedador la cascada de acciones inmunológicas requeridas para eliminar el virus.

Evento	Tiempo post-infección (horas)					
	1	3	5	7	9	11
Unión/ penetración	□					
Antígenos en superficie	▬					
Virus intracelular	▬					
Diseminación célula -célula	▬					
Virus extracelular	▬					

Figura 2. Cascada de eventos en el ciclo de replicación.

1.3.5. Rango de huéspedes

Son susceptibles los bovinos de todas las edades. El virus ha sido aislado de cabras enfermas, con síntomas propios del cuadro respiratorio (Mohanty y col., 1972). El cerdo es susceptible a la infección natural, donde produce vaginitis/balanitis (Debyshire, 1976).

El virus no ha sido encontrado como causante de la enfermedad en especies de vida salvaje, sin embargo fue aislado del prepucio del Búfalo de agua (St George, 1972), y también de visones, hurones (Porter, 1975) y antílopes (Hoff, 1973)

No hay muchas especies de animales de laboratorio de utilidad, pues sólo el hurón (Smith, 1978) y el conejo (Lupton, 1980) son susceptibles a la infección experimental en tanto que el ratón, la rata, el cobayo y el embrión de pollo son resistentes a la infección (McKercher, 1959).

1.3.6. Cuadros clínicos

Las manifestaciones clásicas de una infección con HVB-1 son la IBR y la IPV. El virus invade los tractos respiratorio y genital, causando rinotraqueítis y vulvovaginitis ó balanopostitis en hembras y machos, respectivamente.

A diferencia de la IPV, la IBR puede ser una enfermedad severa particularmente cuando el cuadro presenta infecciones bacterianas (Yates, 1982). Mientras las infecciones genitales son de naturaleza local y se caracterizan por no dejar secuelas, la infección del tracto respiratorio puede asociarse a conjuntivitis y secundariamente a abortos, casos raros de enteritis y ocasionalmente, meningoencefalitis en terneros (Wellemans, 1974; Pastoret, 1978).

Enfermedad respiratoria

La clásica IBR se caracteriza por pirexia (40.5°C a 42°C), incremento de la actividad respiratoria, anorexia, depresión y una severa disminución en la producción de leche. Otro síntoma característico de la enfermedad es la descarga nasal bilateral (primero transparente, luego mucopurulenta) e hiperemia en dicha región ("red nose"). Las lesiones clínicas están restringidas al tracto respiratorio superior, con exudado nasal y traqueítis, pero pueden también extenderse al tracto respiratorio inferior con bronquitis y neumonía. El espectro de lesiones en tráquea y cavidad nasal incluye membranas mucosas serosas, hiperémicas y edematosas, exudado mucopurulento, necrosis focal y finalmente inflamación pseudomembranosa en casos severos (Wylter, 1989).

La infección experimental del bovino por vía intranasal con virus aislado de casos de IBR produce un cuadro que mimetiza a la enfermedad natural de desarrollo agudo aunque generalmente menos severa (Pastoret, 1978). El período de incubación de la enfermedad es de 2-3 días. Se cree que en la infección natural este período es más largo, probablemente de una semana. Los signos clínicos locales están precedidos y

acompañados por una hipertemia intensa (Schroeder, 1968). En la enfermedad leve, sin complicaciones producida por HVB-1, los signos consisten esencialmente en rinitis con exudación serosa en la cavidad nasal. Las células del tracto respiratorio superior (faringe y tráquea), se infectan inmediatamente después de la exposición, resultando en una inflamación catarral aguda. Dentro de las 24-48 horas los animales presentan fiebre y depresión. El apetito usualmente disminuye y consecuentemente se registra pérdida de peso. La conjuntivitis frecuentemente acompaña los signos respiratorios. Si no hay complicaciones, el curso de la infección es de 7-10 días seguida de una rápida recuperación. En los casos más severos puede presentarse bronconeumonía como consecuencia de infección bacteriana secundaria. La muerte puede sobrevenir a la forma aguda o luego de una enfermedad crónica. Los animales que sobreviven a la neumonía nunca se recuperan totalmente.

Algunos animales con IBR desarrollan también una conjuntivitis que puede confundirse fácilmente con queratoconjuntivitis causada por *Moraxella bovis*, sin embargo, las lesiones quedan limitadas a la conjuntiva (Blood, 1988).

Enfermedad genital

Vulvovaginitis pustular infecciosa y balanopostitis

Kendrick y col. (1958), aislaron un herpesvirus de una infección genital que llamaron IPV. Estos autores vieron que esta infección era similar a una enfermedad previamente reconocida en Europa, principalmente en Alemania, desde mitad de siglo 19 como “Bläschenausschlag” sinónimo de exantema coital, enfermedad venérea vesicular y vaginitis vesicular. En Holanda, se aisló un herpesvirus de machos con IPB y se encontró que este aislamiento produjo IPV en hembras (Bouters, 1960).

La IPV se caracteriza por una vulva edematosa e hiperémica en donde se observan pequeñas pústulas (1-2mm de diámetro) diseminadas sobre la superficie mucosa, acompañadas a veces con una descarga vaginal mucopurulenta, debido a la invasión bacteriana secundaria, que es una secuela frecuente. Las pústulas están cubiertas por una membrana fibrinosa blanco amarillenta que es fácilmente removible provocando la formación de úlceras. La fase aguda de la enfermedad dura 2-4 días, etapa en la que el animal puede tener fiebre, anorexia y depresión. Las lesiones desaparecen 10-14 días después, aunque en algunos animales la descarga vaginal mucopurulenta persiste por varias semanas (Wylter, 1989).

La IPB también se desarrolla después de un período de incubación de 1-3 días. Se observan lesiones similares a las de IPV, hay hiperemia en la mucosa genital, precedida por un cuadro genital transitorio. En casos severos la infección se caracteriza por hipertermia y pústulas, principalmente en la mucosa de los pliegues prepuciales y en el glande. Luego de algunos días las pústulas se escarifican, dejando úlceras crateriformes (Suarez, 1992). Son comunes las infecciones secundarias en las lesiones, esto se agrava si el apareamiento continúa, y se pueden formar cicatrices en el tejido. Algunas secuelas incluyen constricción anular y distorsión del pene. En casos sin complicaciones, los animales se recuperan entre los 10-14 días, pero algunos pueden perder la libido o fallar en la erección.

Las epidemias de enfermedad respiratoria y genital combinadas son muy raras (Gibs, 1977; Wyler, 1989).

Abortos

Los abortos ocurren generalmente entre el 4° y 7° mes de gestación después de un período variable de ocurrida la infección natural (Gibbs, 1977). No se encuentran cambios morfológicos macroscópicos característicos ni en placenta ni en feto, pero se encuentran en muchos tejidos lesiones histológicas. Estas lesiones histológicas microscópicas se caracterizan por necrosis focal y hemorragias en muchos órganos del feto (Wyler, 1989).

Los abortos pueden comenzar cuando los signos respiratorios son evidentes en el hato y continuar por 90-100 días, o bien ocurrir en bovinos que escapen a la afección respiratoria.

Enfermedad nerviosa

Los signos neurológicos incluyen incoordinación, ataxia y períodos alternados de depresión e hiperexcitación, pudiendo en algunos animales presentarse ceguera (Gibbs, 1977). También suele observarse temblor muscular, rechinación y eventualmente muerte (Wyler, 1989).

Pidone (1995) cita a Barenfus y col. (1963), quienes informaron la aparición de signos neurológicos (meningoencefalitis) sin la presencia de signos respiratorios. Sin embargo, Bartha y col (1969), informaron casos en los cuales los problemas de índole respiratoria precedieron a los de naturaleza nerviosa, aunque no se pudo inducir encefalitis experimentalmente con estos aislamientos virales (Carrillo, 1983).

Si bien se aceptaba que los casos de encefalitis podrían ser secuelas o complicaciones de la enfermedad respiratoria o de la reactivación de virus latente y de su diseminación centrípeto hacia el cerebro, las características de la enfermedad nerviosa y de su agente causal incitaron a creer que esta forma clínica es provocada sólo por cierto tipo de cepa viral. La encefalitis usualmente ocurre sin otros signos clínicos de enfermedad por HVB-1 (Brake, 1985; Studdert, 1985). Si bien los episodios de meningoencefalitis fatal en bovinos jóvenes ya descritos y ocurridos en Australia y Argentina se han asociado al HVB-5, Seal (1985) y d'Offay (1993) encontraron que aislamientos provenientes de animales con signos nerviosos, analizados con enzimas de restricción, tenían un patrón de migración similar al del HVB-1 subtipo respiratorio.

El curso de la enfermedad neurológica es de 4-5 días. En los animales muertos por encefalitis sólo se observa una leve congestión en las meninges aunque las lesiones histológicas están presentes en todo el cerebro, siendo más severas en cerebelo, tálamo y ganglios basales.

Se han descrito otros cuadros causados por HVB-1 tales como mastitis, enteritis, metritis y dermatitis (Wyler, 1989).

1.3.7. Latencia

La latencia es el fenómeno definido como la persistencia silenciosa del virus en el organismo, no detectable por procedimientos virológicos convencionales, con episodios intermitentes de excreción (Wyler, 1989). Esta propiedad es común a muchos miembros de la familia Herpesviridae. La diseminación del virus al sistema nervioso desde una infección local ocurre por la entrada del virus a células nerviosas periféricas, y desnudo (sin la nucleocápside) se transporta por las terminales nerviosas por acción retrógrada hacia los ganglios trigémino y sacro, donde permanece en un estado latente (Ackerman, 1984). Esta localización del virus fue demostrada usando la técnica de hibridización *in situ* con sondas radioactivas (Schudel, 1987; Wyler, 1989).

Las cepas de HVB-1, incluyendo las cepas de vacunas atenuadas, pueden establecer latencia. La reactivación del virus puede ocurrir o ser inducida por una amplia variedad de estímulos naturales o artificiales tales como estrés, parto, transporte, tratamientos inmunosupresores con corticoides, superinfección con otros virus o microorganismos, irradiación ultravioleta, etc (Tikoo, 1995). Experimentalmente la enfermedad fue inducida con dexametasona para demostrar la reactivación del HVB-1 en el ganglio trigémino. Si bien no se intentó el aislamiento del virus, la inmunofluorescencia

específica detectada revelaría la reactivación del virus latente en la células ganglionares degeneradas (Narita, 1983). Otros autores informan haber aislado HVB-1 de muestras de ganglio trigémino de bovinos adultos que no presentaban signos clínicos de enfermedad (Homan, 1980).

La reactivación del virus latente es la responsable de la perpetuación y transmisión del virus en la población bovina (Kutish, 1990).

La latencia de los alfa herpesvirus involucra el mantenimiento del DNA viral en forma extracromosomal (como episoma circularizado), típicamente en las neuronas de los ganglios sensoriales trigéminos y ciático (Studdert, 1989, 1994). Aún no se conocen los mecanismos exactos por los que el virus es mantenido en estado de latencia, pero se sugiere que puede ser mantenido en estado de dormancia por factores celulares de la célula hospedadora o mecanismos de defensa del sistema inmune (Babiuk, 1979).

Experimentos realizados para determinar la base molecular de una infección latente por HVB-1 determinaron que, en contraste con lo que ocurre en una infección lítica (donde se expresan 70 u 80 genes virales), sólo una pequeña región del genoma es activamente transcrita en las neuronas infectadas por virus latente, región denominada "gen relacionado a la latencia" (LR) (Kutish, 1990).

La principal función de los mecanismos de inmunidad en este aspecto está relacionada con la recrudescencia de la infección. Animales con niveles bajos de inmunidad específica muestran signos más severos y excretan mayores niveles de virus luego de la reactivación (Wylar, 1989).

La latencia es una de las características principales que condicionan la patogenicidad del HVB-1.

1.3.8. Patogenicidad

El HVB-1 invade generalmente el organismo por vía respiratoria o a través del tracto genital. En la enfermedad respiratoria de bovinos, el virus multiplica inicialmente en tejidos del tracto respiratorio. La infección local inicial involucra a las células epiteliales de la mucosa del tracto respiratorio y se extiende aparentemente vía conductos lacrimales a tejidos oculares, donde se establece el sitio de infección secundaria. Después de una infección local puede seguir una infección generalizada. Tal generalización puede ser causada por viremia, por diseminación neural o por diseminación a través de puentes intercelulares (esta diseminación jugaría un papel solo en infecciones locales y no en aquellas generalizadas) (Pastoret, 1982). Después de la

infección primaria en el portal de entrada de la mucosa respiratoria o genital, el virus es transportado por monocitos, y probablemente otras células blancas, vía corriente sanguínea a órganos blanco tales como sistema nervioso central, tracto digestivo, feto o ubre. HVB-1 puede infectar macrófagos alveolares y monocitos de sangre periférica y alterar sus funciones (Bielefeldt, 1985; Nyaga, 1980). Estudios *in vivo* de las interacciones entre linfocitos T (LT) bovinos y HVB-1 indicaron que los linfocitos de sangre periférica unen pocas partículas virales marcadas radioactivamente y que no hay replicación viral en los cultivos de linfocitos (Nyaga, 1980). Sin embargo, Wynkler y col (1999) demostraron que HVB-1 no infectan LT CD8⁺, puede infectar LT CD4⁺ que conducen a la apoptosis de estas células y a la supresión de la inmunidad mediada por células, sugiriendo que los LT CD4⁺ expresan una proteína que podría servir como receptor para la infección viral. La infección con HVB-1 y la apoptosis de células T CD4⁺ contribuyen a la inmunosupresión del animal *in vivo* y favorece el establecimiento de latencia. Esta es una estrategia común para aumentar la replicación del virus *in vivo*. Luego de la infección con HVB-1 existe una marcada infiltración linfocitaria en la submucosa del tracto respiratorio y una activación de LT de sangre periférica con incremento en la producción de IL-2 (Griebel, 1988). Estas observaciones, junto con los datos obtenidos a partir de investigaciones realizadas con HSV-1, sugieren que una interacción entre HVB-1 y LT bovinos activados puede explicar parcialmente la alteración de la respuesta inmune inducida por HVB-1. Los LT infiltrados en tejidos juegan un rol importante en la eliminación de infecciones locales por herpesvirus (Schmidd, 1988). La infección con HVB-1 resulta en una supresión de las defensas pulmonares (Wynkler, 1999).

A nivel respiratorio, el virus destruye el epitelio del tracto superior, lo que, sumado a la inmunosupresión que provoca en el organismo, favorece el asentamiento de infecciones bacterianas secundarias. Entre otros factores, el HVB-1 inhibe la migración de polimorfonucleares neutrófilos, la citotoxicidad mediada por células y la respuesta mitótica de los linfocitos sanguíneos periféricos, como así también algunas actividades funcionales del macrófago alveolar (Wyler, 1989; Wynkler, 1999).

Algunas características de la infección en ganado bovino sugieren que, la forma genital proviene de la entrada del virus en la mucosa del tracto genital más que de una fase virémica. No es necesario que exista lesión en la mucosa para que se establezca la infección (Pastoret, 1982).

1.3.9. Epizootología

La infección natural ocurre por contacto del virus con membranas mucosas. Gran cantidad de virus se disemina principalmente por secreciones respiratorias, oculares y genitales de animales infectados (Wylter, 1989).

La entrada del virus en el tracto respiratorio ocurre generalmente por aerosol o por contacto directo con virus presente en secreciones nasales. En contraste, la transmisión genital ocurre solo por contacto directo o a través de semen infectado. Esto adquiere relevante importancia en países que erradicaron la enfermedad, como Suiza, donde se imponen controles serológicos regulares en los Centros de Inseminación Artificial (Wylter, 1989). Se ha podido comprobar que toros serológicamente positivos, sin sintomatología, son portadores del virus, ya que se lo ha logrado aislar de muestras de semen congelado (Fondevila, 1981; Bielanski, 1988; van Oirschot, 1993). Por esta razón, se requiere la certificación de seronegatividad en machos utilizados para inseminación artificial (Tikoo, 1995).

El período de incubación de la infección varía entre 2 y 6 días, pues depende de la dosis, ruta de inoculación y otros factores (Kahrs, 1977). Luego de la infección inicial los animales desarrollan fiebre, se produce inapetencia y disminución en la producción de leche. Se observan áreas necróticas de la mucosa nasal desencadenando una descarga nasal/ocular serosa y conjuntivitis.

Aunque se acepta para el caso de la IBR, que el virus está presente en las secreciones nasales por 12-14 días pi (Yates, 1982), se ha recuperado el virus en forma intermitente por un período de hasta 578 días (Studdert, 1989^a). Bielanski y col. (1994) recolectaron oocitos de animales infectados (natural y experimentalmente) y fueron madurados, fertilizados e incubados *in vitro*, para luego buscar presencia viral. Los resultados de este experimento indicaron la infección en 19 de 21 embriones y fluidos foliculares, lo que reafirma la transferencia embrionaria como potencial forma de transmisión.

Se conoce que existe infección natural en caprinos y cerdos pero no parecen tener un papel prominente en la epidemiología de la enfermedad (Blood, 1988). El papel del ovino en la epidemiología de HVB-1 no está del todo claro y el del conejo probablemente no ha sido tenido en cuenta (Wylter, 1989).

1.3.10. Respuesta inmune

Los mecanismos de defensa que utilizan los animales y el hombre para resistir a una infección viral o recuperarse de ésta comprometen ambos factores, inespecíficos y

específicos. Los mecanismos inespecíficos usualmente se activan contra una variedad de virus y constituyen la inmunidad nativa, y son en su mayor parte, propiedades genéticas de especie. Por el contrario, los mecanismos inmunes específicos son más determinantes de un individuo.

Como en muchas infecciones virales, la respuesta inmune a HVB-1 puede dividirse en aquella respuesta que previene la infección (humoral) y la que actúa en la recuperación de la infección (celular y humoral). También se puede dividir en respuesta específica mediada por linfocitos B y T (LB y LT) y respuesta inespecífica mediada por neutrófilos polimorfonucleares (PMN), macrófagos y células natural killer (NK), interferón, complemento y otros factores que pueden limitar la unión del virus al epitelio respiratorio (Denis, 1994a). Algunos de los mecanismos inespecíficos, como el complemento son constitutivos, mientras que otros, como el interferón, son inducidos después de la infección viral. Sin embargo, muchos de estos mecanismos efectores actúan en conjunto para modular la replicación del virus y ayudan a su eliminación. Por otro lado, la importancia de cada mecanismo efector variará dependiendo de si estamos en presencia de una primoinfección o de una infección secundaria, en donde los anticuerpos y las células de memoria están siempre presentes (Babiuk, 1996).

A. Respuesta inmune inespecífica

Dada la característica de parásitos intracelulares obligados, los virus requieren de la presencia de tejidos susceptibles en el animal para que la multiplicación viral tenga lugar. La ausencia de tales tejidos confiere una condición de total resistencia al agente independientemente de la dosis infecciosa o la resistencia general del hospedador a enfermedades infecciosas (Smorodintsev, 1960). Sin embargo, virus potencialmente patógenos pueden fallar en la entrada al organismo o en la replicación inicial, cuando el hospedador utiliza eficientemente factores inespecíficos para combatir el agente infeccioso.

A.1 Superficies epiteliales- piel y membranas mucosas

Las superficies epiteliales provistas por la piel y membranas mucosas ofrecen una barrera física a la entrada de virus. Además, la acción pasiva del ácido láctico y la lisozima presentes en secreciones sebáceas confiere propiedades bactericidas y antivirales (Raffel, 1961). Factores similares existen en las mucosas de tracto respiratorio y genital, en la saliva y secreciones gastrointestinales, donde cambios de pH

y una fuerte actividad enzimática confieren protección. Los movimientos ciliares del epitelio respiratorio son muy efectivos en limpiar materiales particulados de las vías respiratorias y probablemente sean un factor importante en la resistencia a infecciones respiratorias. Sin embargo, muchos virus pueden sortear este mecanismo de eliminación.

A.2 Factores neutralizantes virales en sangre y otros tejidos

Una serie de sustancias presentes en suero, fluidos corporales y tejidos son capaces de neutralizar un amplio rango de virus. La enzima bactericida lisozima se encuentra en varios tejidos y fluidos corporales (Raffel, 1961). Su actividad antiviral fue reconocida por Ferrari y col. (1959). Una variedad de inhibidores inespecíficos termolábiles se encuentran en el suero y varios tejidos del hombre y una variedad de animales de sangre caliente (Raffel, 196; Nash, 1971). Estos pueden inhibir la actividad infectiva y hemoaglutinante de un amplio rango de virus, incluyendo todos los myxovirus, muchos arbovirus, adenovirus y enterovirus (Ginsberg, 1949; Porterfield, 1960). Se demostró que enzimas fosfatasas de tejidos pueden neutralizar herpes simplex virus (HSV) (Amos, 1953).

A.3 Interferon (IFN)

El IFN α/β aparece tanto en secreciones nasales como vaginales en el bovino expuesto a la infección con HVB-1, alcanzando títulos máximos, en el caso de inoculación intranasal, a las 72 a 96 hpi. Esta producción inmediata puede ser importante para la rápida protección local en estadios tempranos de la infección.

Se ha confirmado experimentalmente que el IFN α bovino puede modular funciones efectoras no específicas, como ser la migración leucocitaria, la fagocitosis y la liberación de componentes potencialmente bactericidas y, por estas razones, el tratamiento con esta proteína reduciría las posibilidades de daño por causa de ocasionales invasiones bacterianas secundarias (Wylar, 1989).

El HVB-1 es un inductor de IFN muy eficaz, pero no es tan susceptible a él como lo son muchos otros virus (House, 1980). Este hecho condice con experimentos que indican que animales vacunados por vía intranasal, a pesar de la presencia de IFN en sus secreciones nasales, enfermaron cuando tres días después de la vacunación se los enfrentó al virus salvaje (Savan, 1979).

A.4 Fagocitos

Las células fagocíticas son muy importantes como mecanismos de defensa debido a su capacidad de ingerir material foráneo.

Se sabe que *in vitro* el macrófago alveolar bovino es susceptible al HVB-1 (Forman, 1982) por que altera su capacidad funcional. Es así que sería importante la función del interferón en proteger a estas células frente a la infección por el virus .

Los macrófagos pueden producir IFN, tienen actividad citostática y participan en el fenómeno de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (Wylter, 1989). Se han propuesto varios mecanismos para explicar como los macrófagos y células NK pueden eliminar células infectadas con HVB-1 (Campos, 1986, 1989). Se encuentra aceptado el hecho que estas dos poblaciones adquieren su capacidad de eliminar células infectadas de una manera no restringida al complejo mayor de histocompatibilidad luego de la activación con citoquinas. La activación de monocitos puede inducirse *in vitro* por tratamiento de las células con IFN γ y las células NK pueden activarse por tratamiento con citoquinas (Jensen, 1990). Sin embargo, la naturaleza de esta respuesta inmune requiere de LT para producir IFN γ en respuesta a antígenos de HVB-1. Existen numerosas evidencias del rol de las células T, quienes secretan IFN γ , en la activación de macrófagos para eliminar células infectadas con HVB-1. Una de ellas es que los anticuerpos anti-IFN γ causan una marcada reducción de la citotoxicidad, otra evidencia es que la capacidad de los leucocitos de sangre periférica de inducir lisis de células infectadas correlaciona cinéticamente con la capacidad de producir IFN γ . *In vivo*, las actividades citotóxicas aparecen una semana después de la infección, coincidiendo con el momento en que se inicia la cascada de producción de citoquinas tardías incluyendo IFN γ (Campos, 1989). La observación de que estas células no sólo lisan las células infectadas sino que previenen el desarrollo de placas de lisis *in vitro*, hace pensar que esta población es muy importante en limitar la replicación viral en los primeros estadios de la infección, antes de que se encuentren niveles significativos de anticuerpos (Rouse, 1977). También, se ha demostrado que las células NK no están genéticamente restringidas y que pueden reconocer células infectadas de animales no relacionados. La interferencia en la expresión de antígenos en la superficie celular por tratamiento con actinomicina D en la etapa temprana de la infección evita las lisis celular por parte de las NK. Sin embargo, no se requiere la síntesis de proteínas tardías para la lisis celular por NK. Para analizar los posibles blancos de las células NK, se utilizaron células

transfectadas con varias glicoproteínas de HVB-1, demostrando que gB y gD son blancos primarios de NK teniendo gC menor importancia (Palmer, 1990). El hallazgo de que la proteínas tempranas son blanco de NK, es interesante para limitar la diseminación viral *in vivo*, si se considera la importancia de eliminar las células infectadas antes que ocurra una mayor diseminación a células contiguas no infectadas (Babiuk, 1996).

B. Respuesta específica

La respuesta específica se asocia con el reconocimiento de una sustancia extraña, microorganismos o células introducidas al cuerpo, y la consecuente respuesta del hospedador a esos materiales extraños. Esta reacción comprende una serie de interacciones celulares a través de la elaboración de productos celulares y cambios específicos en la morfología o función (o ambas). Las características que diferencian la respuesta inmune específica de la inespecífica son: 1) especificidad de las reacciones contra el agente 2) heterogeneidad de tipos de células y productos celulares y sus mecanismos de acción; 3) memoria, una propiedad que amplifica la respuesta a través de la proliferación y diferenciación de células luego de la nueva exposición al antígeno. En general, hay dos tipos de mecanismos efectores que median la inmunidad específica, aquellos mediados por productos celulares de tejidos linfoides (anticuerpos, inmunidad humoral) y aquellos mediados por linfocitos con o sin cooperación de otros tipos de células denominada inmunidad mediada por células (IMC).

Los linfocitos funcionalmente distintos son designados como células T y células B. Estos dos tipos de linfocitos tienen características diferenciales como presencia o ausencia de inmunoglobulinas de superficie, receptores, distribución en tejidos, función y respuesta a mitógenos (Greaves, 1973).

B.1 Respuesta humoral a infecciones virales, especialmente a HVB-1

La replicación viral en el hospedador produce diferentes antígenos que inducen anticuerpos específicos, algunos son componentes estructurales, pero muchos de ellos son enzimas inducidas por el virus. Probablemente sólo unos pocos antígenos juegan un rol importante en protección (Fenner, 1974).

En bovinos se han identificado tres clases de inmunoglobulinas (IgG, IgM e IgA) (Porter, 1973). Los procesos de neutralización viral son probablemente más efectivos *in*

vivo debido a la acción de complemento. La subclase IgG1 de bovinos fija complemento (Porter, 1973), pero la IgM bovina es un débil fijador de complemento (Rice, 1968).

B.1.1 Anticuerpos humorales y citólisis anticuerpo-independiente

La respuesta de anticuerpos se considera más importante en prevenir la infección secundaria que su acción en la recuperación. Las razones son: 1) los anticuerpos no previenen la diseminación célula a célula *in vitro* (el virus disemina a través de puentes intercelulares en presencia de anticuerpos) y 2) la respuesta de anticuerpos comienza a ser detectable cuando se inicia la recuperación. Por lo tanto para una infección primaria los anticuerpos serían menos importantes que la respuesta IMC. En contraste, en una infección secundaria los anticuerpos son probablemente importantes en prevenir la infección y ayudar a la eliminación del virus a través de varios mecanismos (Babiuk, 1996) que se describirán más adelante. La caracterización de anticuerpos específicos durante una infección primaria con HVB-1 mostró que las tres glicoproteínas de superficie (gB, gC y gD) de HVB-1 son inductores primarios y blanco de las células B (Babiuk, 1987). Esta respuesta se incrementa después de una reactivación o después de una infección secundaria, en estos casos se incrementan los niveles de anticuerpos contra las glicoproteínas mayores y comienza a ser detectable la respuesta a glicoproteínas menores como la gE. Los anticuerpos neutralizantes, dirigidos contra las glicoproteínas de la envoltura, probablemente tengan importancia en la inmunidad a largo plazo (Studdert, 1994).

Dado que los anticuerpos no están presentes en una infección primaria, no pueden modular el estadio inicial de infección. Por el contrario, en una infección secundaria o luego de una reactivación la inhibición de la unión por los anticuerpos, podría tener mayor impacto sobre la infectividad (Babiuk, 1996). Sin embargo, el papel de los anticuerpos humorales es cuestionable en relación a la prevención de la diseminación del virus, fundamentalmente porque al igual que otros herpesvirus, el HVB-1 puede escapar de la acción de éstos debido a su progreso a través de puentes intercelulares y dentro de ramas nerviosas.

La detección de anticuerpos específicos contra HVB-1, es posible por medio de las técnicas de seroneutralización y ELISA a los 8-12 días post-infección (dpi), y persisten durante 5 años y medio aunque esta persistencia requiere alguna reestimulación. Las inmunoglobulinas M son las primeras en aparecer, seguidas por las inmunoglobulinas G. Los bovinos recién nacidos se proveen de anticuerpos vía calostro principalmente en las primeras 12 hs post parto, fundamentalmente de la subclase IgG₁. Estos persisten

durante 1 a 6 meses, y si bien no producen una protección absoluta, disminuyen la agresividad de la infección. La actividad neutralizante puede ser también detectada en secreciones nasales y genitales debido a la presencia de inmunoglobulina A e IgG1. En el caso de la IBR, la IgA está restringida al tracto respiratorio superior, mientras que son los mecanismos celulares los que predominan en pulmón y vías aéreas profundas.

El principal significado de los anticuerpos humorales radica en su cooperación en los mecanismos que destruyen células infectadas con virus (Wyler, 1989; Babiuk, 1996).

B.1.2 Lisis mediada por anticuerpo-complemento

Este mecanismo ocurre en la infección secundaria y puede también ser importante en la fase tardía de recuperación o durante la recrudescencia de infecciones latentes (van Drunen Littel-van den Hurk, 1986b, Wyler, 1989). Este complejo (anticuerpo-complemento) destruye las células infectadas permitiendo a los anticuerpos neutralizar los virus liberados (Dubuisson, 1992). Sin embargo, dado que para que este mecanismo ocurra son necesarios tanto una alta concentración de anticuerpos como una elevada densidad de antígenos virales sobre la superficie de células infectadas (Rouse, 1977) y como este último punto no ocurre hasta una etapa tardía de la infección, la muerte celular por anticuerpo-complemento no inhibe significativamente la diseminación célula a célula y su rol en la recuperación es limitado (Babiuk, 1996). Este mecanismo sería más importante en infecciones secundarias (Rouse, 1978).

B.1.3 Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos

Este proceso ocurre por la unión de células efectoras a la porción Fc del anticuerpo (Rouse, 1976). Varias células pueden actuar como efectoras en ADCC, pero en el bovino se postula que los polimorfonucleares (una de las primeras células que migran al sitio de infección) son las células más importantes en la lisis de células infectadas (McGuire, 1984; Wyler, 1989; Bielefeldt, 1991). Se sabe que la IgG es más efectiva en eliminar células infectadas por ADCC que la IgM o la IgA (Grewal, 1977).

Resultados de experimentos *in vitro* demuestran que la muerte celular ocurre 7 hpi, el tiempo en que el virus comienza a diseminarse a las células adyacentes y la eficiencia de este mecanismo aumenta en presencia de interferón, una molécula que siempre está presente en el sitio de infección. Estos resultados indican la importancia de ADCC en la recuperación, especialmente en infecciones secundarias y luego de una reactivación del virus. Sin embargo, es imposible demostrar este mecanismo *in vivo*. Para demostrar que la combinación de anticuerpos y PMN podría inhibir la diseminación viral, se infectaron células *in vitro* y se agregó al cultivo los componentes que están involucrados en

ADCC. Estos estudios demostraron que los PMN y anticuerpos inhibieron la replicación viral y la diseminación del virus, sosteniendo la hipótesis que ADCC sería un mecanismo importante en limitar la diseminación viral *in vivo* (Rouse, 1976, 1978). El aumento en la eficiencia de ADCC en eliminar células infectadas mediante la adición de interferón no es sorprendente ya que éste aumenta los receptores Fc y activa a los polimorfonucleares (Babiuk, 1996).

B.1.4 ADCC facilitado por complemento (ADCC-C)

La eficiencia de ADCC aumenta en presencia de complemento (Rouse, 1977). Esto se evidenció utilizando condiciones subóptimas cuando el rango de células efectoras a célula blanco o la concentración de anticuerpos era baja. La IgM puede mediar lisis por ADCC-C (Rouse, 1978; Babiuk, 1996).

Probablemente ADCC-C juegue un papel principal en estadios tempranos de la recuperación, cuando la IgM es predominante y las células efectoras son escasas.

Se ha descrito que los polimorfonucleares pueden matar células infectadas en presencia solo de complemento (Bielefeldt, 1988). El mecanismo propuesto es que la gC puede unirse al componente del complemento C3b y éste puede unirse a PMN a través de sus receptores para complemento (Bielefeldt, 1988; Huemer, 1993) creando un puente entre las células y el PMN quien se activaría y eliminaría a la célula infectada. Si este mecanismo ocurriera *in vivo*, podría ser importante en mediar la recuperación antes de que los anticuerpos protectivos o los linfocitos T citotóxicos estén activos (Babiuk, 1996).

Estos mecanismos son efectivos *in vitro*, pero su funcionalidad *in vivo* aún es especulativa (Wyler, 1989).

B.2 Respuesta inmune mediada por células frente a infecciones virales

Los virus pueden expresar antígenos virales en las membranas celulares del hospedador (por ej. poxvirus, herpesvirus, virus oncogénicos, etc.) induciendo respuesta inmune mediada por células y éstas parecen ser esenciales para la resistencia del hospedador. Con infecciones virales que desarrollan viremia y donde las modificaciones en las membranas celulares no son muy importantes (por ej. enterovirus, togavirus), los anticuerpos circulantes parecen jugar un rol importante en la resistencia del hospedador (Allison, 1971). En cambio, la recuperación de las infecciones en donde hay diseminación intercelular del virus, como es el caso de HVB-1, está particularmente basada en la IMC (Wyler, 1989; Rouse 1984). El mismo rol de la IMC está

documentado para HSV-1 (Milligan, 1995; Morrison, 1997) y para HSV-2 (Manickan, 1995).

Por mucho tiempo, la reacción de hipersensibilidad retardada era el único método de medir la respuesta mediada por células en animales. Más adelante se identificaron los linfocitos sensibilizados por estudios histológicos y más tarde los estudios de la interacción *in vitro* entre antígenos y linfocitos sensibilizados (Lawrence, 1969).

B.2.1 Estimulación de linfocitos

El cultivo de linfocitos *in vitro* expuestos a una variedad de agentes estimulantes conduce a una respuesta linfoproliferativa. Esta proliferación celular puede ser cuantificada por conteo de linfoblastos en preparaciones coloreadas, o midiendo la timidina tritiada incorporada como un indicador de la síntesis total de DNA, o por la incorporación de aminoácidos radioactivos como un indicador de la síntesis total de proteínas (McCluskey y col, 1974).

Los linfocitos pueden estimularse con antígenos específicos o por estimulantes inespecíficos (los cuales no requieren una sensibilización previa de las células para ser efectivos) (Oppenheim, 1968). Fitohemaglutinina (PHA), Concanavalina A (Con A) y lipopolisacárido (LPS) son los estimulantes inespecíficos más empleados (Hirschhorn, 1974). PHA y Con A estimulan células T (Mellstedt, 1975), en tanto que LPS es un buen estimulador de células B (Ivanyi, 1974).

Los estimulantes antígeno-específicos requieren una previa sensibilización de los linfocitos del donador. Esta sensibilización constituye una respuesta inmune específica, que implica un paso de reconocimiento por receptores específicos sobre las membranas de los linfocitos. Los LB tienen una inmunoglobulina de membrana como receptor y pueden unirse a los antígenos libres para los cuales la célula es específica. Los LT, en cambio, tienen un receptor de células T (TCR) que se une al epítopo específico sólo cuando este se encuentra presentado en el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de la célula presentadora, quien a través de enzimas, degrada y presenta partes procesadas del antígeno en el CMH y de esta manera la célula T reconoce el nuevo complejo péptido-CMH a través de su receptor TCR. Waldron y col. (1973), demostraron que se requieren macrófagos para la estimulación *in vitro* de linfocitos de cobayos sensibilizados con PPD. Se ha demostrado que es necesario la interacción macrófago-LT para una óptima estimulación de los linfocitos por el antígeno (Rosenthal, 1973).

La estimulación de linfocitos específicos con HVB-1 se ha usado para evaluar la respuesta inmune mediada por células inducida por este virus (Davies, 1973; Rouse, 1974) y se pueden medir las funciones efectoras de las células T mediante la incorporación de timidina (^3H) (proliferación) (Davies, 1973; Rouse, 1974; Gerber, 1978; Miller-Edge, 1986; Rutten, 1990; Wentink, 1990; Denis, 1994a); producción de citoquinas y citotoxicidad (Campos, 1986; Hutchings, 1990; Denis, 1993).

En bovinos, se detectó respuesta inmune mediada por células por linfoproliferación, citotoxicidad directa y por producción de citoquinas.

Empleando ensayos proliferativos, se observó que HVB-1 inducía proliferación de células T CD4+. Las células B y las células T gamma delta y CD8+ no parecen estar involucradas (Denis, 1994b). En muchos estudios se evidenció que el período de reactividad de los linfocitos es corto, se detecta a los 3-5 días después de la inoculación, teniendo un pico a la semana y bajando a niveles basales a las 2-3 semanas post inoculación (Davies, 1973; Rouse, 1974; Gerber, 1978). En los primeros estudios sobre la inducción de una respuesta linfoproliferativa después de una infección con HVB-1, se vió que estos ensayos correlacionaban con la recuperación de la enfermedad medida como disminución en los niveles de excreción viral y reducción de signos clínicos (Davies, 1973). Estudios posteriores establecieron que tanto el virus inactivo como la versión recombinante de las tres glicoproteínas mayores (gB, gC y gD) inducían proliferación de CD4+ (Hutchings, 1990; Leary, 1990a), siendo la gIV (gD) quien estimula una respuesta más fuerte y consistente (van Drunen Littel-van den Hurk, 1993; Tikoo, 1995; Hutchings, 1990). También se ha reportado la respuesta proliferativa contra VP8 (una proteína mayor del tegumento) (Hutchings, 1990).

B.2.2 Reacciones de Citotoxicidad

La membrana celular de células infectadas con virus incorpora antígenos virales no estructurales, que sirven como blanco para los linfocitos T citotóxicos (Studdert, 1994). Se ha demostrado respuesta citotóxica de células T primadas después de ser estimuladas con fibroblastos autólogos infectados con HVB-1 (Lawman, 1987, 1988; Splitter, 1988). Cuando se utilizó vaccinia recombinante con cada una de las tres glicoproteínas mayores la respuesta demostró estar principalmente dirigida a gC y gD (Denis, 1993). Linfocitos T citotóxicos obtenidos después de una estimulación con HVB-1 fueron mas eficientes en eliminar células blanco expresando gC que en eliminar células expresando gD, mientras que la estimulación de poblaciones efectoras con fibroblastos autólogos

infectados con HVB-1 promovieron una fuerte respuesta de células T específicas contra gD (Denis, 1993).

La población respondedora en ensayos proliferativos puede ser también responsable de la producción de citoquinas, detectadas después de la estimulación con el antígeno. La activación de linfocitos T CD4+ (colaboradores) es necesaria para generar una respuesta de linfocitos T citotóxicos en otros virus como ectromelia, vaccinia, coriomeningitis, sarcoma Moloney (Leist, 1989) y HSV (Jenninigs, 1991). Si consideramos que en HVB-I puede darse la misma asociación el medir la activación de los LT colaboradores estaría directamente relacionado con la activación de LT citotóxicos (Winkler, 1999). Se ha demostrado que IL-2 e IFN- γ activan mecanismos citotóxicos que podrían ser esenciales en la recuperación de la infección (Campos, 1986, 1989). La IL-2 ha sido muy usada para la expansión de LT citotóxicos CD8+ (Lawman, 1987,1988, Denis, 1993). Células capaces de producir IFN- γ en respuesta a una estimulación viral pueden ser recuperadas desde la circulación a los 3 dpi y las consecuencias funcionales de esta producción (por ejemplo, la inducción de la expresión de MHC clase II y citotoxicidad) pueden evidenciarse en el parénquima pulmonar a los 2 días post infección (Campos, 1992). El IFN- γ interviene, también, en actividades citotóxicas no restringidas al MHC mediadas por macrófagos (Campos, 1989).

Se han desarrollado una variedad de técnicas experimentales para caracterizar las reacciones de toxicidad y la destrucción de células blanco.

B.2.3 Citoquinas

Una vez establecida la infección, especialmente en una infección primaria, reacciones inflamatorias inespecíficas y reacciones celulares constituyen la primera respuesta a la infección y aparecen citoquinas “tempranas”. La respuesta de interferón α y β se induce en las primeras células infectadas al tiempo que ocurre la síntesis de antígeno viral. Esta molécula se encuentra a las 5 hs pi y a las 36hs-72 hs se observa el pico en secreciones nasales y en sangre, manteniéndose elevada hasta el cese de la replicación viral (Bielefeldt, 1985; van Drunen Littel, 1994). Esta familia de citoquinas es inducida tanto por replicación directa del virus dentro de la célula como por células reclutadas al sitio de infección (macrófagos). El interferón, como resultado de la infección viral induce, además, otros cambios celulares, modulando el tráfico de leucocitos y reclutamiento de varias células efectoras como macrófagos, PMN y células NK al sitio de infección (Bielefeldt, 1991; Griebel, 1988, 1989). Estas células inducen un patrón de citoquinas

tempranas que instrumentan e inician la respuesta inflamatoria (reclutamiento y activación de células inflamatorias) y organizan la respuesta específica al virus (Campos, 1994). Es claro, entonces, que la cinética y magnitud de esta respuesta de citoquinas tempranas podría influenciar la capacidad del hospedador de manejar una infección primaria.

Entre las 24-48 hs pi. ocurre una infiltración masiva de PMN en el pulmón como resultado de la síntesis de citoquinas proinflamatorias por los macrófagos alveolares y células epiteliales (Bochner, 1987). Estas citoquinas tempranas inducen la expresión de moléculas de adhesión intracelular (ICAM-1) sobre las células endoteliales y promueven la adherencia de leucocitos. Con el incremento de la permeabilidad vascular y adhesión, las células migran al sitio de infección y liberan distintos metabolitos y enzimas que ayudan a eliminar al virus y células infectadas junto con otras defensas específicas e inespecíficas (Milks, 1986). Las citoquinas tempranas IL-1 e IL-6 también inducen la producción de GM-CSF por células parenquimáticas y linfocitos, quienes contribuyen a la diferenciación de macrófagos rápidamente a las 24 hs pi. Además, el GM-CSF induce a los macrófagos a liberar otras moléculas tales como TNF- α .

El interferón- α influye marcadamente en el tráfico de linfocitos con una depleción selectiva de CD8- de la sangre y el flujo de estas células al pulmón donde están involucradas en la producción de citoquinas tardías, las cuales activan macrófagos para matar células infectadas así como también la citotoxicidad por parte de células CD8+ (Babiuk, 1996).

Además de la acción directa de los macrófagos y NK sobre las células infectadas también producen citoquinas quienes influyen el desarrollo de la respuesta inmune específica.

No se ha demostrado directamente la existencia de células Th1 y Th2, sin embargo, evidencias indirectas utilizando el perfil de citoquinas producidas por linfocitos bovinos, sugieren su existencia (Babiuk, 1996; Brown, 1998). Aunque aún no se conoce el mecanismo inicial del "switch" de respuesta Th1 o Th2, se postula que el microambiente que se crea durante el contacto inicial con el antígeno y las citoquinas producidas por las células inflamatorias inespecíficas dirigen la respuesta a Th1 o Th2 (Mosmann, 1986). El aumento de la expresión de antígenos CMH II sobre macrófagos pulmonares durante una infección con HVB-I, aumenta la presentación antigénica en clase II. Una vez activados, los macrófagos producen otras citoquinas que actúan como disparadores de la respuesta T e indirectamente de la respuesta B. Entonces, una vez

disparada la respuesta Th1, estas células producen un repertorio específico de citoquinas tardías (IL-2, IL-12, IFN γ) quienes dirigen la respuesta inmune mediada por células. En contraste, las células Th2 producen un repertorio diferente de citoquinas (IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10) que dirigen la respuesta de anticuerpos (Campos, 1994).

Es claro, entonces, que las citoquinas son esenciales en la diferenciación, amplificación y sincronización de la respuesta inmune a HVB-1. La infección con HVB-1 induce una respuesta balanceada celular y humoral. Esto es de fundamental importancia ya que mientras los anticuerpos son importantes en prevenir la infección y colaborar en la recuperación de infecciones secundarias, la respuesta IMC está principalmente involucrada en la recuperación de una infección primaria (Babiuk, 1996) (Figura 3).

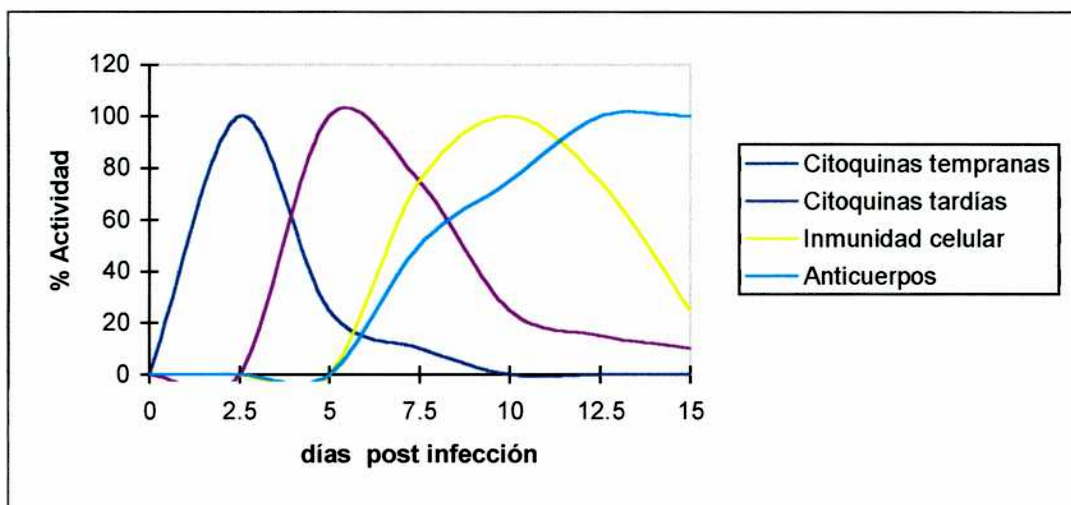


Figura 3. Respuesta inmune a la infección viral.

Basados en los estudios de los mecanismos inmunológicos involucrados en la defensa a HVB-1, muchos autores concluyen que los anticuerpos son importantes en prevenir la infección y es aún cuestionable su importancia en la diseminación del virus. En contraste, la respuesta IMC está involucrada en la recuperación de la infección. Sin embargo, ninguno de estos mecanismos ocurre aisladamente en el organismo. La importancia de cada mecanismo efector dependerá del estado inmunitario del animal, es decir, si es su primer contacto con el virus o si se trata de una reexposición al mismo después de una vacunación o infección. En una infección primaria no hay interferencia de anticuerpos y el virus puede entrar a las células iniciando una infección. Después de la infección inicial, la síntesis de proteínas induce una serie de eventos que estimulan la

respuesta no específica del hospedador, mediada principalmente por productos virales que inducen citoquinas (Babiuk,1996).

La eliminación del virus depende en gran medida de los factores mediadores solubles producidos por los linfocitos sensibilizados, tales como las interleuquinas, los IFNs, la linfoxina, el factor quimiotáctico y las prostaglandinas. El modo de acción durante la infección con herpes virus no está aún claramente elucidado (Wylter, 1989). Estos inhibidores solubles actúan sobre la propagación del virus de una célula a otra, así como también sobre la replicación vírica, a través de los macrófagos y otras células (House, 1980).

Las características propias del HVB-1 impiden que el sistema inmune lo elimine por completo del organismo, hecho que juega un papel fundamental en la epizootiología de esta enfermedad.

1.3.11. Control y erradicación

La prevalencia y severidad de la infección con HVB-1 en distintos países, tienen un impacto directo en los programas de control y erradicación (Wylter, 1989). La vacunación es común en la mayoría de los países del mundo. En Europa solo dos países, Suiza y Dinamarca, lograron controlar la infección con HVB-1 sin vacunación hasta erradicarla.

En la República Argentina, la explotación ganadera ocupa un lugar preponderante dentro de la economía nacional, por lo cual, el control de la infección por HVB-1, resulta fundamental para evitar su mayor distribución y reducir las pérdidas económicas directas o indirectas que ocasiona a nivel de restricciones de transacciones comerciales nacionales e internacionales de animales, semen, embriones y productos de biotecnología previstas en el Código Internacional de Salud Animal (OIE, 1995).

Para controlar la amplia difusión de la infección en rodeos bovinos del país se han comenzado a utilizar masivamente vacunas contra HVB-1.

1.3.12. Vacunas

La primera intención al usar vacunas contra HVB-1 fue reducir los signos clínicos de la enfermedad después de una infección y así reducir el impacto económico de las infecciones con HVB-1. Dado que varios estados miembro de la Unión Europea erradicaron o están en vías de erradicar el HVB-1, otros países fueron estimulados a implementar programas para reducir, por lo menos, la incidencia de la infección

(Babiuk, 1996), por lo que se usan comercialmente en todo el mundo vacunas convencionales contra HVB-1 tanto con virus vivo modificado o atenuado como con virus inactivado (mono y polivalentes).

Dependiendo de la capacidad de la vacuna para inducir inmunidad, la vacunación contra HVB-1 puede ser efectiva en reducir los síntomas clínicos, duración y título de la excreción viral después de una infección con la cepa salvaje y, en consecuencia, las pérdidas económicas, pero no logran proteger completamente de la infección.

Vacunas atenuadas

La primera vacuna comercial, administrada intramuscularmente, se desarrolló con la cepa "Colorado 1" de HVB-1. Se atenuó por pasajes seriados en cultivo primario de riñón bovino seleccionando la variante de baja virulencia y rápida multiplicación. Otra forma de atenuación es por mutagénesis seleccionando las mutantes sensibles a la temperatura. Una vacuna atenuada muy utilizada fue la que contiene la cepa RLB 106 que fue modificada por tratamiento con ácido nitroso y luego seleccionada según su sensibilidad a la temperatura (Zygraich, 1974). En este tipo de vacunas no se conoce la modificación en el genoma (mutación o delección) que produce la atenuación. Usualmente puede diferenciarse la cepa vacunal de la cepa salvaje por análisis con enzimas de restricción (Whetstone, 1986).

Si bien las vacunas atenuadas inducen una rápida y relativamente larga inmunidad, tienen la desventaja de que pueden producir abortos (Wyler, 1989; Miller, 1991). Sin embargo Cravens, y col. (1996) evaluaron una vacuna mutante termosensible y concluyeron que protege a hembras gestantes del aborto.

El hecho de que las vacunas con virus atenuado pueden establecer por sí mismas infecciones latentes, o no previenen la infección latente por el virus salvaje, constituye una permanente amenaza para animales vírgenes no inmunizados (Gilliam, 1993). Además, pueden causar epizootias inducidas por la vacunación (Whetstone, 1986).

Cuando se realizaron estudios sobre la persistencia de anticuerpos luego de una vacunación con una mutante termosensible se determinó que un 21% de animales no vacunados seroconvirtieron, lo que sugiere que el virus vacunal fue transmitido a los animales controles (van der Poel y col, 1995). Por otra parte, los autores concluyeron que dado que los anticuerpos (indistinguibles de los inducidos por la cepa salvaje) persisten por años, pueden interferir con programas de control para HVB-1 que están basados sobre monitoreo serológico (van der Poel, 1995). A su vez, estos virus

atenuados podrían causar inmunosupresión aumentando así la susceptibilidad de animales vacunados a infecciones bacterianas (Yates, 1982).

Otras desventajas de las vacunas atenuadas sería su posible interferencia con la respuesta inmune a otras vacunas como la vacuna contra *Pasteurella hemolytica*, cuando son administradas simultáneamente (Harland, 1992). Dado que las prácticas agrícola-ganaderas actuales incluyen inmunizaciones con vacunas múltiples, la respuesta inmune podría no ser la esperada si la vacuna viva atenuada contra HVB-1 es uno de los componentes de la vacuna (Tikoo, 1995).

Las primeras vacunas atenuadas se administraron por vía intramuscular pero luego comenzaron a administrarse intranasalmente, como es el caso de las vacunas con mutantes de HVB-1 sensibles a la temperatura (Zygraich, 1974). Aunque la duración de la inmunidad inducida por este tipo de vacunas (administradas intranasalmente) se desconoce, se sabe que induce una rápida protección local y producción de interferón (Todd, 1972). Además, como son altamente atenuadas pueden ser administradas a hembras gestantes sin peligro de abortos como ocurre con las vacunas atenuadas administradas intramuscularmente (Tikoo, 1995). Entre las desventajas de este tipo de vacunas podemos mencionar el riesgo de reversión a la cepa salvaje (Tood, 1974; Zygraich, 1974; Mc Kercher, 1971). También, pueden causar reacciones adversas como fiebre, descarga nasal, placas intranasales y una disminución temporaria en la producción de leche (Khars, 1977; Frerichs, 1982).

Vacunas inactivadas

Dado los problemas que ocasionan las vacunas atenuadas una gran parte de los productores prefieren el uso de vacunas inactivadas. De hecho en nuestro país no se permite el empleo de vacunas atenuadas contra el herpesvirus bovino. La cepa vacunal se multiplica en células hasta obtener altos títulos y luego se inactiva por diferentes procedimientos. Estas vacunas son completamente inocuas, el virus vacunal no replica ni se reactiva (Durand 1981; Peters, 1987). Ha sido intensamente estudiada en bovinos la inmunogenicidad de estas vacunas realizadas con distintos inactivantes como formol (Schipper, 1975, Matzuoka, 1972), detergentes no iónicos solubilizados (Lupton, 1980) etanol o β propiolactona (Haralambiev, 1976; Levings, 1984), BEI (Bahnmann, 1975; Smitsaart, 1987) y calor o UV (Hristov, 1975).

Sin embargo existen controversias en cuanto a la efectividad de las vacunas inactivadas con formol. Esto puede estar relacionado con la destrucción de algunos de los antígenos

ligados a la inducción de protección durante el proceso de inactivación, fenómeno demostrado a través del uso de anticuerpos monoclonales específicos (Schipper, 1975; Frerichs, 1982). Otra desventaja de las vacunas inactivadas es que, como sucede con otros virus inactivados, es necesario administrarlas con potentes adyuvantes o inmunomoduladores para inducir una respuesta inmune efectiva. Por otro lado, no se ha observado protección inducida por vacunas inactivadas hasta los 7-10 días después de la segunda dosis (van Drunen Littel y col, 1993a).

Como contrapartida a su baja inmunogenicidad comparándola con las vacunas atenuadas, es importante destacar que son seguras, no inducen abortos, el virus no se disemina después de una vacunación, por lo tanto no hay riesgo para otros animales no vacunados que estén en contacto, el virus vacunal no puede establecer infección latente (Straub y col, 1984; Wyler y col, 1989), además no causan inmunosupresión. Las vacunas inactivadas no presentan riesgos para su uso en vacas gestantes y se comprobó que pueden prevenir la infección en útero, protegiendo a los fetos de la infección (Pospisil, 1996).

Una ventaja adicional sería su relativa buena estabilidad cuando es almacenada.

La elección del adyuvante, la cantidad y calidad del antígeno, así como la inactivación del mismo, son factores críticos y determinantes de la calidad de una vacuna inactivada (Duque y col, 1989; Kaashoek y col, 1995).

Un punto importante en el desarrollo de vacunas veterinarias es que tengan bajo costo. Deben ser genética y térmicamente estables. También necesita ser segura para la aplicación en hembras preñadas y animales jóvenes, no causando reacciones adversas como inmunosupresión o interferencia con la inmunidad a otras vacunas cuando se administran simultáneamente (Babiuk y col, 1996).

El uso de adyuvantes es crucial para mejorar la calidad de las vacunas inactivadas o a subunidades ya que estos inducen una respuesta inmune más rápida, mayor y más duradera. Con el uso de adyuvantes se necesita menos antígeno para evocar la respuesta inmune, reduciendo los costos de producción (Gupta y col, 1993).

La búsqueda de mejores adyuvantes y la inclusión de citoquinas, como por ejemplo interleukina 1 β , interleukina 2 (Hughes y col, 1992; Reddy y col, 1993) e IL-12 (Baca y col, 1997) en las vacunas puede aumentar su calidad. También la aplicación de materiales de liberación lenta pueden aumentar su eficacia.

1.3.13. Adyuvantes

Se los define como sustancias capaces de aumentar la respuesta inmune humoral o celular contra un antígeno. La naturaleza química y biológica de las sustancias adyuvantes es muy amplia. Fisiológicamente, los adyuvantes suelen ser sustancias extrañas para el organismo, a excepción de las interleuquinas empleadas como inmunomoduladores (Gupta y col, 1993). En este trabajo de tesis, arbitrariamente llamaré adyuvante a aquellas sustancias que aumentan la respuesta inmune y además son utilizadas como vehículo e inmunomodulador a aquellas sustancias que también modulan la respuesta inmune y son vehiculizadas junto con el antígeno por el adyuvante.

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

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

El efecto de depósito, implica por un lado la liberación lenta del antígeno lo cual permite prolongar el tiempo de interacción entre el antígeno, las células presentadoras de antígeno y los linfocitos. Por otro lado, genera un sitio de inflamación con la consecuente atracción de las células inmunocompetentes al lugar de inoculación. Este modo de acción lo poseen las sales de aluminio y las emulsiones agua en aceite (Allison, 1973; Beh, 1985). Los aceites minerales, especialmente en emulsiones agua en aceite, han sido utilizadas desde hace mucho tiempo y son considerados muy eficaces para mejorar la respuesta inmune a un determinado antígeno. El aumento de anticuerpos que ocurre luego de la inoculación de antígeno incorporado en una emulsión agua en aceite está asociado con la mayor persistencia del antígeno *in vivo*. Las gotas de aceite conteniendo el antígeno pueden viajar hasta los órganos inmunes secundarios facilitando la presentación al sistema inmune. Esta actividad adyuvante de efecto depósito es una forma de extender el período de estimulación antigénica y la interacción entre antígeno, célula presentadora y linfocitos. Las sales de aluminio tienen además la capacidad de activar los factores del complemento (Ramanathan y col, 1979), aumentando el foco inflamatorio y facilitando el establecimiento de la memoria B (Klaus y col, 1977). También ha sido descrito el llamado “trapping” linfocitario, que

consiste en la migración selectiva de linfocitos circulantes hacia un órgano linfoide en especial. La importancia de este mecanismo reside en que el antígeno se pone en contacto con una mayor cantidad de células inmunocompetentes. Esta forma de estimulación es inducida por adyuvantes tales como el Adyuvante completo de Freund y *Corynebacterium parvum*, entre otros. Una generalización de los probables mecanismos estimulados por los adyuvantes e inmunomoduladores se muestran en la figura 4.

Las células involucradas en la respuesta inmune que están afectadas por los adyuvantes e inmunomoduladores incluyen macrófagos fijos y en circulación, células de Langerhans, células dendríticas, LT y sus subpoblaciones, células plasmáticas, células NK, y toda variedad de LB (Edelman y col, 1980). Los adyuvantes pueden variar el fenotipo y comportamiento de un determinado tipo celular, cambiando sus receptores de superficie, moléculas de adhesión, moléculas accesorias o induciendo la síntesis de citoquinas u otros mediadores químicos.

Estos efectores tienen profunda implicancia en las células ya que modifican la respuesta a los estímulos exteriores, la migración y establecimiento en un determinado tejido y la comunicación con otras células. En particular, en los LB estas modificaciones pueden llevar a la regulación del isotipo de los anticuerpos producidos (Finkelman y col, 1990).

Mientras que el efecto depósito es importante, es también reconocido que estos adyuvantes inducen efectos adversos debido a las interacciones celulares (Murray y col, 1972; Osebold y col, 1982). Es necesario hacer un balance entre el grado de inmunomodulación dado por un adyuvante y la severidad y aceptación de los efectos adversos que provocan en los animales vacunados (Coe Clough y col, 1995). Como se dijo anteriormente, dos propiedades determinan el valor de una vacuna, es decir, la conveniencia de una vacunación profiláctica: inocuidad y eficacia. Estas son las que determinan en último término, la decisión sobre el empleo de un tipo u otro de vacuna. En principio, se preferirá siempre la vacuna que con una eficacia similar logre la mayor inocuidad posible.

Es por ello que desde hace algunos años se han intensificado las investigaciones para desarrollar formulaciones no tóxicas, seguras y eficaces (Woodard y col, 1985).

En las emulsiones aceite en agua las gotas de aceite pueden migrar llevando el antígeno desde el sitio de inoculación a los nódulos linfáticos, mientras que la fase líquida del vehículo inoculado, desaparece rápidamente, formándose depósitos de antígeno sobre las células presentadoras de antígeno en tejidos linfoides pero no en el sitio de inoculación (Allison y col, 1992). Squalene, un precursor de la síntesis de colesterol, y

preferentemente su forma saturada, squalane, han sido seleccionados reiteradamente para ser empleados en emulsiones aceite no mineral en agua (Allison y col, 1992).

1.3.14. Inmunomoduladores

La capacidad de los inmunomoduladores de estimular la respuesta inmune de bovinos ofrece una buena herramienta para mejorar la inmunidad inducida por las distintas vacunas. A su vez, según la respuesta inmune que se desea estimular (humoral y/o celular) ciertos inmunomoduladores pueden ser usados para dirigir la reactividad y aumentar la formación de una clase de inmunoglobulina, o preferentemente, estimular la IMC más que la formación de anticuerpos o viceversa (Oselbod, 1982).

Se han utilizado diferentes inmunomoduladores en vacunas contra HVB-1 como levamisole, avridine, isoprinosine, citoquinas.

Las citoquinas se han utilizado como inmunomoduladores en combinación tanto con 1) vacunas atenuadas contra HVB-1 (Reddy, 1989, 1990, 1993), 2) vacunas a subunidades con distintas dosis de IL-2 con gD (Hughes, 1991), (IL-2 y/o , IFN α , IFN γ) combinados con distintas dosis de gD (Hughes, 1992), IL-1 bovina beta recombinante con gI que potencia la inducción de inmunidad de mucosas (Gao, 1995) vacunas inactivadas contra HVB-1 combinadas con interferón humano (Amadori, 1994). En general los animales tratados con citoquinas tienen mayores niveles de anticuerpos neutralizantes (Reddy, 1989, 1990, 1993). La administración de citoquinas permite la utilización de menor cantidad de antígeno (Hughes, 1992) y disminuye tanto los síntomas clínicos como la excreción viral.

Cuando se utilizaron los complejos inmunoestimulantes (ISCOM) conteniendo glicoproteínas de la envoltura de HVB-1, resultaron ser efectivos en conferir protección, ya que los animales no presentaron síntomas clínicos ni excreción viral (Marza y col, 1991).

Fue probado *in vitro*, que levamisole aumenta la respuesta linfoproliferativa al virus o sus glicoproteínas y estimula la actividad de macrófagos y la producción de IFN γ (Babiuk y col, 1981). Otros autores concluyen que cuando se aplica este inmunomodulador por vía sistémica y el virus por vía nasal se logra proteger a los bovinos del desafío viral (Le Jan y col, 1980).

Otro inmunomodulador utilizado es CTB, ya que administrado junto con gD protege por completo a los animales del desafío (Zhu y col, 1996). Cuando se administró con

proteínas de la envoltura de HVB-1 generó una respuesta local que actuó de barrera frente a la infección de la mucosa epitelial y previno la replicación (Israel, 1992).

También se han probado subunidades antigénicas obtenidas por tratamiento con detergentes no iónicos como Triton X-100 y NP-40 con adyuvante incompleto de Freund's y se logró inducir un aumento de los títulos neutralizantes. La aplicación de dos dosis de Triton X-100 y NP-40 previene la aparición de síntomas clínicos en bovinos y la aplicación de dos dosis de NP-40 previene la diseminación viral. En un trabajo reciente fue comprobado que la administración de Baypamun (Bayer, A.C) en vacunas contra HVB-1 reduce la excreción viral (Castrucci y col, 2000)

1.3.14.1 Inmunomoduladores utilizados en este trabajo

Avridine

El Avridine (AV) es una amina lipoidal sintética (N,N dioctadecil-N',N': bis (2-hidroxiethyl) propanodiamina) (Hoffman y col, 1973, Pfizer, Inc., USA), caracterizada por sus propiedades inmunomoduladores (Anderson y col, 1979; Niblack, 1979; Siddiqui, 1981). El principal efecto promovido por esta sustancia es la inducción de la síntesis de citoquinas. Avridine es un buen inductor de IFN γ (Hoffman, 1973, 1984), también induce IL-1 (Staruch, 1983; Rweyemamu, 1986). Como consecuencia de la inducción de estas citoquinas, el AV funciona también como activador de la actividad macrofágica (Niblack, 1979) y presenta amplia actividad proliferativa de linfocitos B y T, por lo que se sugiere que esta sustancia produce una expansión de los clones inmunoreactivos (Rweyemamu, 1986). Estudios *in vivo* de este inmunomodulador han demostrado que produce una migración de leucocitos al sitio de inoculación y una expansión en los nódulos linfoides regionales (Anderson, 1983).

La inoculación de AV se asoció con la mayor capacidad de los leucocitos polimorfonucleares para fagocitar *Staphylococcus aureus* y de funcionar como mediadores de la citotoxicidad mediada por anticuerpos (Woodard, 1983; Roth, 1985). También aumenta la citotoxicidad de linfocitos (Niblack, 1979). El AV actúa a través de su capacidad inductora de IFN γ , activando la función NK, aunque en ciertos esquemas de inmunización puede ser un factor refractario de la síntesis de esta citoquina (Talcott, 1986). Cobayos tratados con Avridine estuvieron protegidos del desafío con el virus de la fiebre aftosa (FMDV) (Knudsen, 1986). También se ha demostrado que el uso de Avridine reduce la severidad de infecciones por herpes genital en cobayos (Zheng, 1983). Este inmunomodulador también se ha utilizado en vacunas con las tres

glicoproteínas mayores de HVB-1 (gI, gIII y gIV) aplicadas solas o en distintas combinaciones, resultando protegidos los bovinos vacunados (disminución de síntomas clínicos y excreción viral) (Babiuk, 1987). En nuestro grupo de trabajo fue probada su eficiencia en vacunas antiaftosa en ratones (Berinstein, 1993; Perez Filgueira, 1995; Wigdorovitz, 1998) y en vacunas antiaftosa en bovinos (Perez Filgueira, 1999).

Sulfolipopolisacárido β ciclo dextrin en emulsión squalane en agua

En trabajos anteriores se estudió la influencia del tipo de polisacárido y el tipo de aceite en los 3 criterios considerados más importantes para los adyuvantes, reactividad, adyuvancia y estabilidad. Se evaluaron polisacáridos con distintos pesos moleculares y diferentes estructuras, unidos químicamente a grupos sulfatos y lipídicos e incorporados en emulsiones aceite en agua, utilizando como aceite, squalane, aceite mineral, hexadecano o aceite de soja (Hilgers, 1999).

El sulfolipopolisacárido es un producto sintético elaborado a base de 1) polisacárida cíclica (aproximadamente 2000 monosacáridos); 2) grupos sulfato (a razón de 0.2/monosacárido) 3) grupos lipídicos (1.5 /monosacárido). (Figura 5).

Datos previos revelaron que la administración en ratones de distintos antígenos con una combinación de agentes lipofílicos y dextran sulfato (Hilgers, 1985, 1986), o la conjugación de determinantes químicos de ambos agentes a polisacárida (SLP) (Hilgers, 1987) o la incorporación de SLP en una emulsión squalane en agua (SLP/S/W) (Hilgers, 1994^a, 1994b), lograban una fuerte actividad inmunoestimulante. Mc Carthy y col (1977), demostraron la eficacia de un dextran sulfato (compuesto básico del SLP sintético) como un poderoso adyuvante para inducir respuesta celular (medida por ensayos de hipersensibilidad retardada) tanto en ratones como en cobayos.

La capacidad inmunoestimulante del sulfolipopolisacárido sintético (SLP) fue probada en ratones usando como antígeno células rojas de oveja (SRBC) y seroalbúmina bovina con dinitrofenil (DNP-BSA). La capacidad inmunoestimulante de SLP a SRBC depende en forma crítica del balance entre grupos hidrófilos y lipofílicos, mientras que la capacidad inmunoestimulante a DNP-BSA solo requiere la presencia de regiones lipofílicas (Hilgers, 1987). Una vez establecida la mejor combinación de grupos sulfatos y lipídicos, se probó en ratones y cobayos la mejor combinación de SLP en una emulsión squalane (aceite no mineral, biodegradable) en agua (SLP/S/W) con distintos antígenos como DNP-BSA, virus influenza inactivado, una mezcla de tres cepas de virus influenza y virus de la pseudorabia en animales de laboratorio (Hilgers, 1994a) y

en cerdos (Hilgers, 1994b), demostrando que la combinación SLP/S/W fue más eficiente en inducir títulos de anticuerpos contra los antígenos específicos, que los componentes por separado sulfolipopolisacárido y squalane en agua (SLP y S/W) o el adyuvante solo aceite en agua (O/W). La formulación conteniendo virus de la pseudorrabia y SLP/S/W resultó más eficaz que la vacuna comercial contra PRSV. Sin embargo, esta formulación producía en cerdos una moderada reacción local y tenía una limitada estabilidad a altas temperaturas (60°C) (Hilgers, 1999). Es por ello que en vías de optimizar la formulación, disminuyendo la reactogenicidad, aumentando la estabilidad y manteniendo la adyuvanticidad, se probaron distintos polisacáridos unidos a grupos sulfatos y lipídicos, incorporados a distintos aceites, seleccionándose el sulfolipo-ciclodextrin en una emulsión squalane en agua (SL-CD/S/W). Esta formulación resultó ser más eficaz ya que fue más estable que los otros tipos de SL-polisacáridos siendo estable por más de dos años a 4°C, 18 semanas a 37°C y entre 10 días y 18 semanas a 60°C dependiendo del batch. Después de dos años a 4°C la formulación exhibió pequeñas gotas ($< 0,1 \mu\text{m}$) y la subsecuente incubación por dos semanas a 37°C causó solo un pequeño incremento en el tamaño de las gotas. En cuanto a la reactogenicidad ésta disminuye con la disminución del PM del polisacárido. Además la adyuvanticidad, medida en términos de aumento del nivel de anticuerpos, del SL-CD/S/W administrado tanto con PRV como con influenza fue mayor que cuando estos antígenos se formulan con aceite mineral.

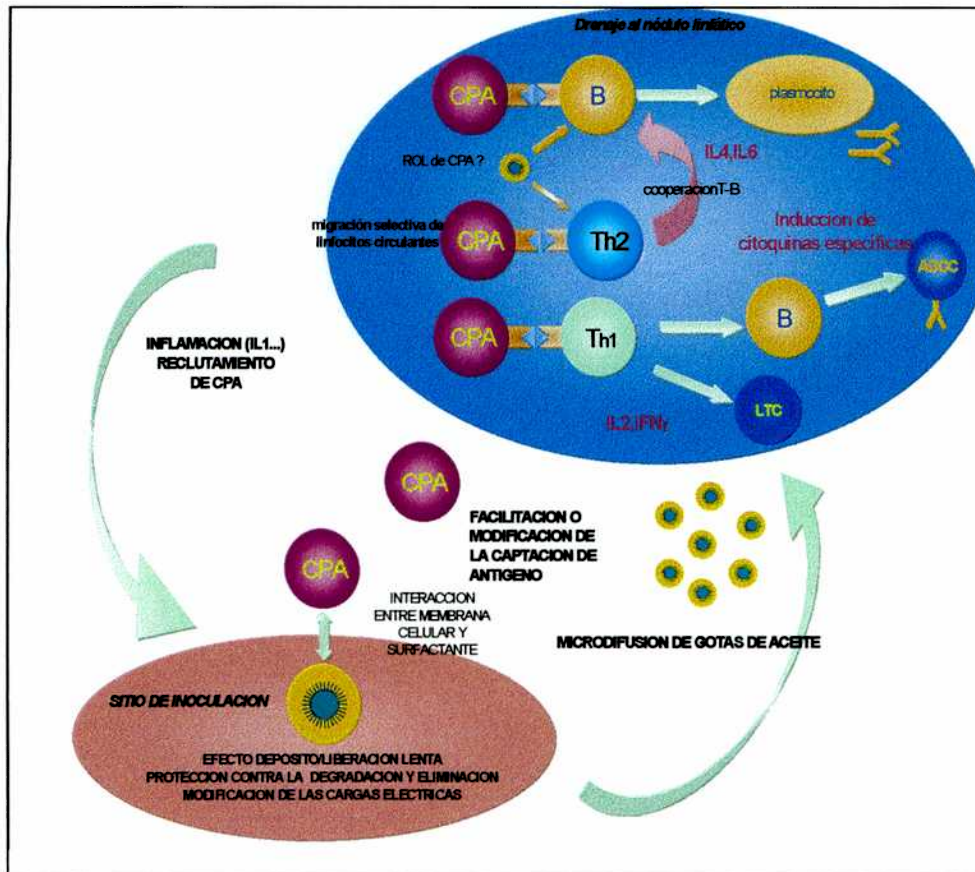


Figura 4. Mecanismo de acción de los adyuvantes e inmunomoduladores.

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

HIPOTESIS

LA VACUNA INACTIVADA BIODEGRADABLE CONTRA HVB-1 ES CAPAZ DE INDUCIR UNA RESPUESTA PROLONGADA Y UNA PROTECCION AL DESAFIO, IGUAL O SUPERIOR A LAS ACTUALMENTE EN USO ELABORADAS CON ACEITE MINERAL

OBJETIVOS

Para lograr vacunas más eficaces debemos enfatizar el estudio de diferentes áreas referidas a la infección de HVB-1 y la respuesta inmune ligada a la protección. Es necesario conocer las diferentes interacciones entre las células inmunes y la forma de inducir una respuesta rápida, eficiente, larga y duradera. En muchos estudios se evaluó la eficacia inicial de una vacunación, pero no se ha monitoreado la respuesta a lo largo de un año después de la vacunación y en pocos trabajos se ha evaluado la respuesta inmune celular por extensos períodos. A su vez, en el desarrollo de vacunas inactivadas es cada vez más necesario evaluar la seguridad y eficacia de nuevos adyuvantes no minerales. A partir de estas necesidades surgen los objetivos principales de este trabajo.

OBJETIVO GENERAL

◆ **EVALUAR EN BOVINOS LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL Y CELULAR INDUCIDA A LARGO PLAZO POR DIFERENTES FORMULACIONES DE VACUNAS INACTIVADAS CONTRA HERPESVIRUS BOVINO 1**

◆ **LOGRAR UNA VACUNA INACTIVADA BIODEGRADABLE CONTRA HVB-1 CAPAZ DE INDUCIR UNA RESPUESTA PROLONGADA Y UNA PROTECCION AL DESAFIO, IGUAL O SUPERIOR A LAS ACTUALMENTE EN USO ELABORADAS CON ACEITE MINERAL**

OBJETIVO PARCIAL

COMPARAR LA RESPUESTA INMUNE INDUCIDA CONTRA HVB-1 POR DOS VACUNAS INACTIVADAS CONTENIENDO INMUNOMODULADORES SINTETICOS EN RELACION A LA VACUNA CONVENCIONAL.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se utilizaron 48 bovinos de raza Holando y Angus x Hereford de 12 a 14 meses de edad, libres de anticuerpos específicos contra el HVB-1, y un bovino seropositivo utilizado como control positivo de las pruebas de blastogénesis, seroneutralización y ELISA.

Para descartar la presencia de virus de la diarrea viral bovina (VDVB) se realizó inmunofluorescencia de los linfocitos de sangre periférica. Por medio de la prueba de tuberculina se aseguró que el rodeo estaba libre de tuberculosis.

2.2. CULTIVOS CELULARES

Se utilizaron células de la línea MDBK y cultivos primarios de testículo Fetal Bovino (TFB). Las células fueron propagadas en MEM-E (GIBCO) con antibióticos (penicilina, streptomycin) y 10% de SFB. La concentración de suero fue disminuída al 2% en el medio de mantenimiento utilizado para la producción viral.

2.3. VIRUS

Se utilizó HVB-1 cepa "Los Angeles" (LA) perteneciente al cepario del Instituto de Virología, CICVyA-INTA. La semilla se encuentra almacenada en el banco de nitrógeno líquido del CICV-INTA-Castelar. Su título es $10^{7,6}$ dosis infectiva en cultivos de tejidos 50% (DICT₅₀/ ml).

2.3.1. Obtención de virus vacunal

Se utilizó el antígeno viral sin purificar.

El virus utilizado se multiplicó a partir de un virus semilla, en frascos rotantes de 4 litros con monocapas de células MDBK, realizando infecciones cortas y con alta moi. Se inoculó 1 ml del virus semilla, se adsorbió por una hora a 37°C y luego del agregado de medio MEM-E se dejó progresar la infección aproximadamente durante 24 horas hasta detectar un 80% de la monocapa afectada para congelar a -70°C inmediatamente. Se descongeló, y se centrifugó a 3000 g durante 30 min. a 4°C para eliminar los restos celulares. Del sobrenadante se separaron alícuotas para su titulación por infectividad en cultivo de tejidos, el resto se guardó a -70°C hasta su utilización.

2.3.2. Titulación viral

La titulación se realizó en placas de 96 pocillos con cultivos secundarios de TFB. Se efectuaron diluciones en base 10 del virus para calcular DICT 50%, que representa la dosis (dilución) que produce efecto citopático en el 50% de los cultivos celulares infectados, interpolándose el punto final de acuerdo al método de infectividad de Reed y Muench modificado. Las placas se incubaron durante 72 hs a 37°C. El título viral fue $10^{7,6}$ DICT₅₀ / ml.

2.3.3. Inactivación de virus

El virus fue clarificado por centrifugación a 3000 g durante 30 min., para luego ser inactivado con bromo etil imina binaria (BEI). Brevemente, se agregó a la suspensión viral, BEI 0,1M al 1% y se mantuvo a 37°C en agitación permanente, durante 24 horas. El inactivante excedente se neutralizó con tiosulfato de sodio 1M al 1%. El virus inactivado se dejó reposar por 48 horas a 4°C y luego se centrifugó a 2800 g por 30 min. a 4°C.

2.4. VACUNAS

2.4.1. Inmunomoduladores

Se utilizaron 2 inmunomoduladores diferentes para formular las vacunas:

(1) SL-CD/S/W: un sulfolípidio ciclo dextrin sintético (SL-CD) derivado del polisacárido poliglucosa cíclico de 1,135 Da (beta-ciclodextrin), con una razón de grupos sulfatos por monosacárido de 0,15-0,23, y una razón lipídica de 1,15-1,29 en una emulsión squalane (aceite no mineral) en agua (S/W) (Hilgers, 1999) (Figura 5).

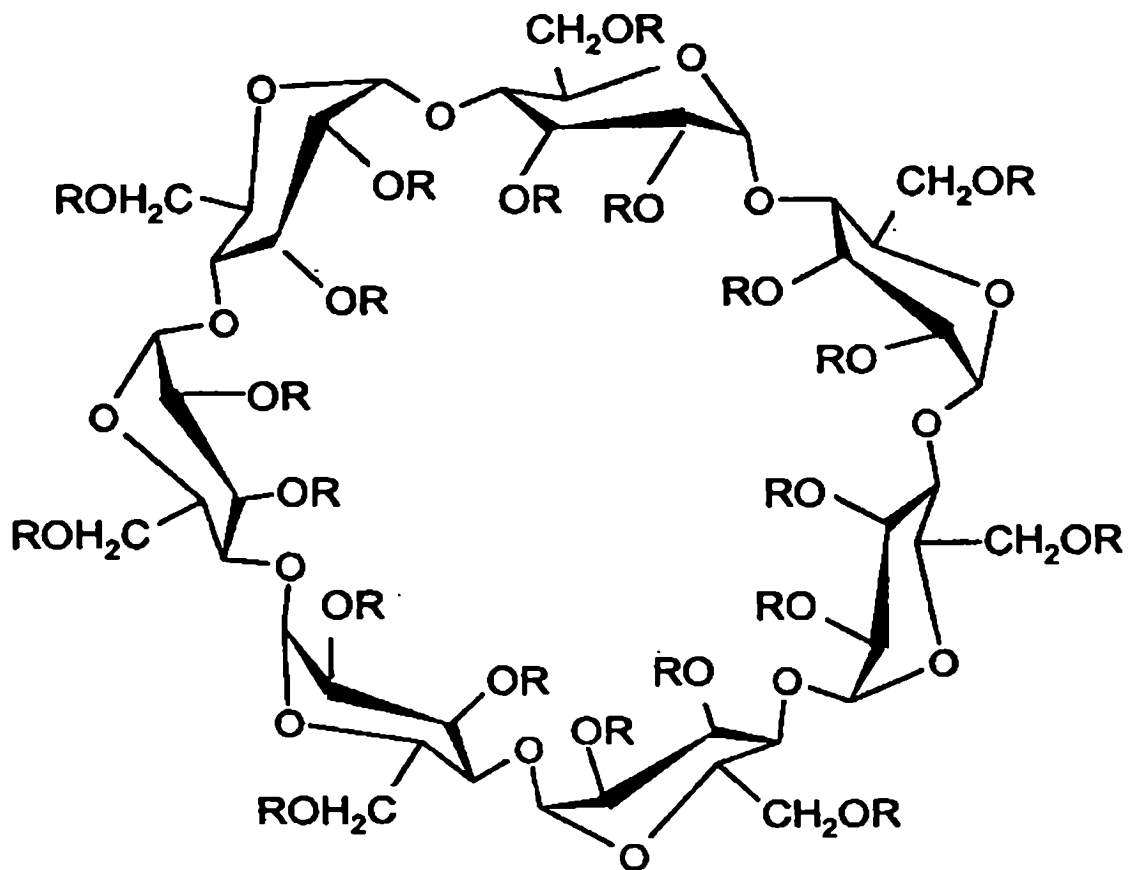


Figura 5. Estructura química de la SL-ciclodextrina. R= S ó SO₃⁻ ó C(=O)-(CH₂)₁₀-CH₃, H + SO₃⁻ + C(=O)-(CH₂)₁₀-CH₃ =21 y el radio promedio es de H: SO₃⁻ : C(=O)-(CH₂)₁₀-CH₃. =11.6: 1.2: 8.2

(2) Avridine (AV): [(*N,N* dioctadecil-*N', N'*-bis) (2-hidroxietyl) propanodiamina] (Hoffman 1973, Pfizer, Inc., USA) en una emulsión agua en aceite mineral. Avridine fue agregado a la fase oleosa en una dosis de 20 mg por bovino.

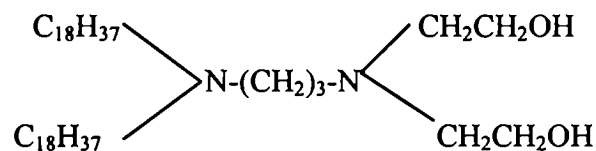


Figura 6. Estructura química de Avridine. *N,N*-dioctadecil-*N,N'*-bis(2-hidroxietyl) propanodiamina.

2.4.2. Vehículos

- Squalane: adyuvante basado en un aceite no mineral, biodegradable, en una emulsión aceite en agua.

- Adyuvante oleoso INTA [aceite mineral: Markol 52, emulsificador Arlacel C (preparación altamente purificada de manida mono-oleato) y Tween 80] de acuerdo a la formulación INTA emulsión agua en aceite, no biodegradable.

2.4.3. Formulación de las vacunas

Todas las vacunas fueron formuladas con HVB-1 inactivado.

Vacuna 1: formulada con iguales volúmenes de SL-CD/S/W y antígeno viral (HVB-1) inactivado.

Vacuna 2: formulada mezclando iguales volúmenes de Adyuvante INTA conteniendo AV y antígeno viral (HVB-1) inactivado.

Vacuna 3: formulada mezclando iguales volúmenes de Adyuvante INTA y antígeno viral (HVB-1) inactivado.

2.4.4. Inocuidad de las vacunas

El control de inocuidad se realizó por pasajes ciegos en subcultivos de células de TFB para descartar la posible presencia de virus infectivo residual, resultando éste negativo a la presencia de virus.

2.4.5. Esterilidad de las vacunas

Se controló que las vacunas estuvieran libres de bacterias y hongos. Se realizaron los controles en caldo triptosa fosfato (detección de aerobios), tioglicolato (detección de anaerobios), Saboraud (detección de hongos).

2.4.6. Estabilidad de las vacunas

Una fracción de cada vacuna se dejó una semana a 56°C y un mes a 37°C para evaluar, al cabo de estos tiempos, su integridad.

2.5. ESQUEMA DE INMUNIZACION

En este experimento se utilizaron 48 bovinos seronegativos a HVB-1, de 8 a 12 meses de edad. Los bovinos fueron separados al azar en 3 grupos de 10 animales, que recibieron respectivamente una dosis de 5 ml de una de las tres vacunas en estudio, y 3 grupos controles, 2 grupos controles de 4 animales cada uno quienes recibieron una dosis de 5 ml de adyuvante INTA+Avridine o SL-CD/S/W, y el restante grupo control, de 10 animales, fue mantenido sin vacunación alguna, como control negativo y también como animales centinelas de una posible actividad viral en el potrero de aislamiento. Los animales fueron revacunados a los 46 días post-vacunación (dpv) y a los 226 dpv.

2.6. EXTRACCIÓN DE SANGRE Y SUERO

Los bovinos fueron sangrados a distintos tiempos, con heparina para ensayos de blastogénesis y sin heparina para serología. En este último caso se obtuvo suero, el cual se separó por centrifugación por 20 min. a 125 g a 4°C, para luego ser fraccionado y guardado a -20°C hasta su uso. Se extrajo, además, suero de animales normales y se los reunió en una misma fracción, para luego ser usado como control negativo en la medición de las reacciones inespecíficas de las pruebas serológicas.

2.7. SEROLOGIA

2.7.1 Seroneutralización

Básicamente se usó el método descrito por Rouse y col (1974), en microplacas de 96 pocillos de fondo plano con cultivos secundarios de TFB. Se utilizó el método de cantidades variables de suero frente a una cantidad constante de virus. A los sueros inactivados a 56° C durante 30 minutos se les realizaron diluciones en base 4 y se mezclaron con 100 DICT 50% de virus según titulación previa. Tras una incubación de una hora a 37° C en estufa de CO₂ (5%) se inoculó a una monocapa celular conteniendo 150000 células/ml de cultivo secundario de TFB. Se mantuvo 1 hora a 37° C en estufa de CO₂ (5%) para adsorción, y luego se adicionó medio de mantenimiento. La lectura del efecto citopático (ECP) se realizó después de 3 días de incubación a 37°C. El título fue calculado por el método de Reed y

Muench (1938) considerando como título neutralizante (TN) el logaritmo en base 10 de la inversa de la dilución más alta del suero que neutralizó el efecto citopático específico producido por HVB-1.

2.7.2 ELISA

2.7.2.1 Obtención de virus para ELISA

Se obtuvo el antígeno parcialmente purificado a partir del lisado de células MDBK infectadas con HVB-1. El virus se propagó en frascos rotantes con monocapas de células MDBK a una m.o.i de 0,1. Para obtener células no infectadas, como antígeno control, se incubaron frascos rotantes con monocapas de MDBK con medio de mantenimiento. Luego de 45 minutos de adsorción se le agregó medio de mantenimiento y se incubó durante 24-48 hs hasta que el efecto citopático fue confluyente. Se congeló y descongeló (-70°C y 20°C respectivamente) 3 veces, para romper las células y liberar el antígeno. La suspensión viral fue clarificada a 3000 g por 30 minutos a 4°C. El sobrenadante fue ultracentrifugado a 120000 g durante 60 min. El pellet se resuspendió en buffer Tris-EDTA-Cloruro de Sodio (TEN) y fue clarificado 2 min. a 8000 g. El sobrenadante fue fraccionado en alícuotas y conservado a -70°C. El mismo procedimiento se siguió para las células no infectadas.

El antígeno fue titulado mediante un ELISA siguiendo el procedimiento descrito por Bratanich (1990). Brevemente, placas sensibilizadas con el antígeno (Ag) viral y control (células no infectadas) en diluciones dobles y bloqueadas se incubaron en presencia de diluciones de suero positivo de título conocido y suero negativo. Luego fueron incubadas con anti-Ig de bovino conjugada con la enzima peroxidasa (KPL). Se añadió una solución reveladora de buffer citrato (pH=5)/2,2'-azino-bis(3 etilbenzeno-tiazolina-6-ácido sulfónico (ABTS)/ peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (3%). La absorbancia resultante fue leída a los 20 minutos a 410 nm de longitud de onda en un lector Dynatech MR5000 Microplate Reader (Dynatech Laboratories, Inglaterra). La concentración óptima de antígeno a utilizar fue aquella que ofreció la mayor diferencia entre el Ag control y el Ag viral para el suero positivo y en donde las diferencias fueron nulas para el suero negativo.

2.7.2.2. ELISA indirecto para detectar anticuerpos totales contra herpesvirus bovino-1.

Básicamente, se usó el método descrito por Bratanich y col. (1990). Se sensibilizaron placas de 96 pocillos Inmulon I (Dynatech), en las filas pares con antígeno viral y en las filas impares con antígeno control (células no infectadas), diluidos en buffer carbonato-bicarbonato pH 9,6. Luego de una incubación de 12 hs a 4°C se lavaron las placas 3 veces con PBS-T pH 7,4 (todos los lavados se realizaron con el mismo buffer) y se incubaron por 30 minutos en agitación constante a 37°C (todas las incubaciones se realizaron bajo las mismas condiciones, con buffer de bloqueo (BB), consistente en buffer fosfato (PBS) Tween ovoalbúmina al 1% (PBST-O 1%). Posteriormente, las placas fueron incubadas con diluciones, hechas en BB, de los sueros a testear. Se agregaron los sueros problema y controles en diluciones de base 4 (1/10, 1/40, 1/160, etc). Se incubó 1 hora a 37°C y se repitieron los lavados. Las placas fueron incubadas con un suero comercial policlonal anti-Ig de bovino producido en cabra y conjugado con la enzima peroxidasa (KPL). Finalmente, se lavaron las placas 5 veces y se les añadió una solución reveladora de buffer citrato (pH=5)/2,2'-azino-bis (3 etilbenzeno-tiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS)/ peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (3%). La absorbancia resultante fue leída a 410 nm de longitud de onda en un lector Dynatech MR5000 Microplate Reader (Dynatech Laboratories, Inglaterra).

Se calculó para cada suero la densidad óptica (D.O) corregida (D.O de filas con antígeno viral-D.O de filas con células no infectadas). El punto final se determinó como la máxima dilución cuya D.O corregida es > 0,11. Este nivel de corte se estableció tomando dos desvíos standard por encima de la D.O media de un grupo de sueros negativos.

Los títulos se expresaron como el logaritmo de la inversa de la máxima dilución del suero cuya lectura superó la densidad óptica corregida de 0,11.

El ensayo de ELISA diseñado para la identificación y cuantificación de anticuerpos específicos contra HVB-1 presentes en el suero bovino se esquematiza en la Figura 7.

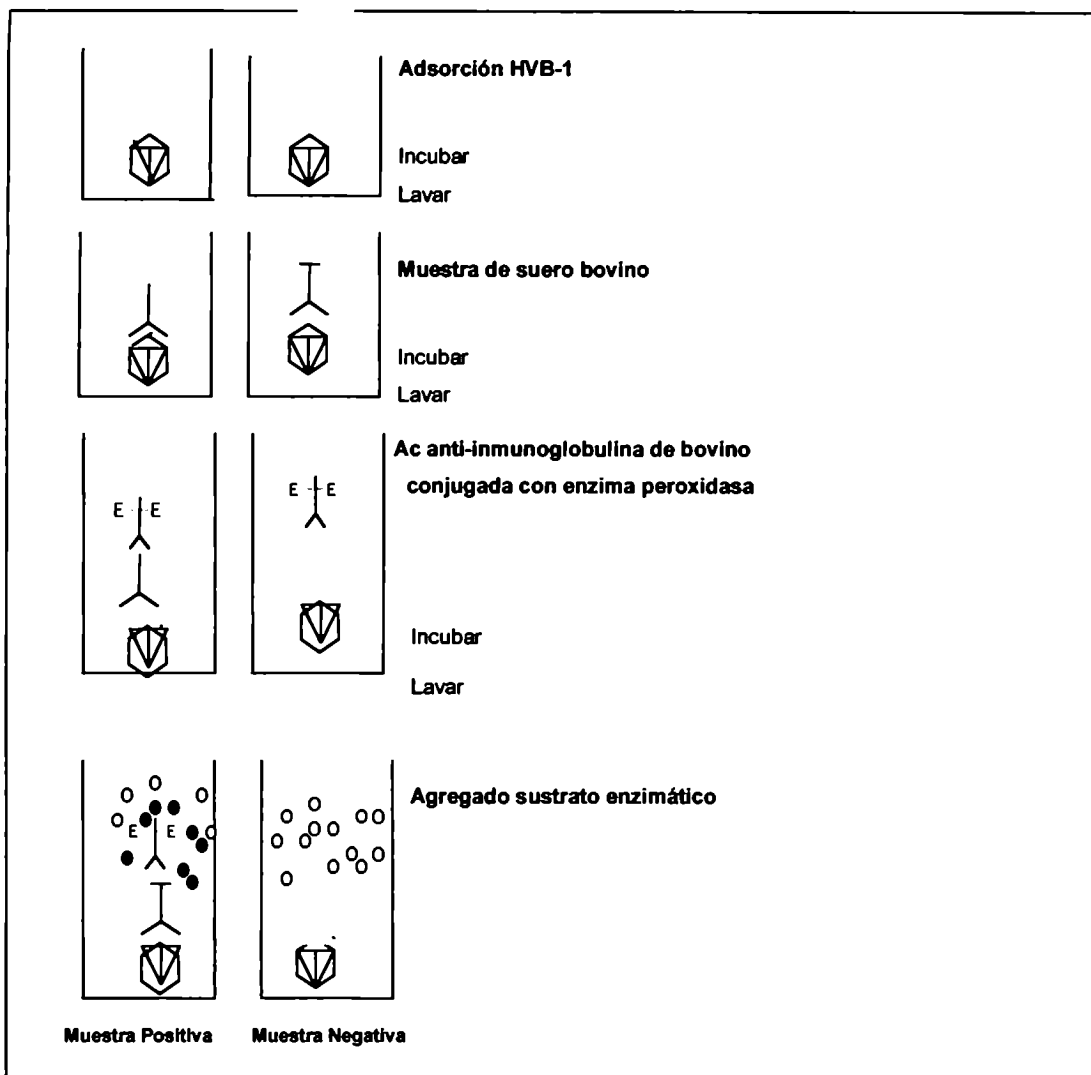


Figura 7. ELISA empleado para la detección de anticuerpos bovinos anti-HVB-1

2.7.2.3. Puesta a punto del ensayo de ELISA para detectar isotipos de IgG anti HVB-1 en sueros bovinos

Propagación viral

Con el fin de producir antígeno para sensibilizar las placas, se propagó el virus en cultivo secundario de células de TFB (células diferentes a las utilizadas en la obtención del virus para la elaboración de la vacuna, MDBK, de manera tal de evitar reacciones inespecíficas, ya que el virus vacunal no es purificado y contiene restos de células MDBK). Para descartar la existencia de reacciones inespecíficas con las células de TFB se realizaron los controles pertinentes de restos celulares.

Para la propagación viral se infectaron rollers de Testículo Fetal Bovino con HVB-1 con una m.o.i de 0,1. A las 24-48 hs, cuando el efecto citopatogénico fue confluyente, se congelaron y descongelaron los rollers 3 veces (-70°C y 20°C respectivamente) para romper las células y liberar el antígeno. La suspensión viral fue recolectada y centrifugada a 3000 g descartándose el “pellet” y luego ultracentrifugando el sobrenadante a 120000 g durante 60 minutos. Se resuspendió el pellet en buffer TEN y se clarificó a 8000 g durante 2 minutos, guardándose el sobrenadante a -70°C hasta la titulación del virus.

Titulación del antígeno

Se efectuaron diluciones del antígeno en buffer carbonato-bicarbonato pH 9,6 y se realizó un ELISA enfrentando las diluciones del antígeno a diluciones de sueros control positivos y negativos conocidos según lo mencionado en el ítem 2.7.2.1. La dilución considerada óptima fue 1/200.

En cada placa se incluyeron los siguientes controles:

- 1) Control positivo: suero positivo para HVB-1.
- 2) Control negativo: suero negativo para HVB-1.
- 3) Sin suero.
- 4) Sin el agregado del Anticuerpo anti-isotipo.
- 5) Filas sensibilizadas con células de TFB no infectadas (Ag(-))

Los controles 3 y 4 dieron D.O bajas, lo que indicó que no había reacciones inespecíficas (Fig. 10c y d). También la D.O del control 5 (con células TFB no infectadas) resultó muy baja, por lo que podemos decir que no hubo unión inespecífica a las células donde se propagó el virus. Esto nos permitió sensibilizar las placas sólo con antígeno viral (HVB-1).

El punto de corte (D.O: $\geq 0,3$) fue establecido como la media de un conjunto de sueros negativos más dos desvíos estándar. (Fig. 10e y f)

Titulación del anticuerpo anti-isotipo:

Se realizó un ELISA enfrentando diluciones de los anticuerpos anti-isotipo a diluciones de sueros control positivo.

Se realizó una curva con las diluciones del anti-isotipo en función de las D.O y se consideró como título la dilución anterior al punto de inflexión de la curva (mayor dilución donde las

lecturas son constantes). Estas diluciones resultaron 1/40000 para el anticuerpo anti- IgG₁ (Fig. 10 a) y 1/4000 para el anticuerpo anti-IgG₂ (Fig. 10b).

Titulación del anticuerpo conjugado con la enzima peroxidasa:

Se realizó un ELISA enfrentando diluciones del anticuerpo anti-ratón (KPL) conjugado con la enzima peroxidasa (diluciones seriadas al medio) a diluciones de un suero control positivo conocido.

Se realizó una curva con las diluciones del conjugado en función de las D.O y se consideró como título la dilución anterior a la inflexión de la curva (mayor dilución donde las lecturas son constantes), resultando como óptimo un título de 1/1000 (datos no mostrados).

Para estos ensayos se contó con anticuerpos monoclonales (AcsMs) de especificidad probada contra cada uno de los dos isotipos bovinos a determinar. Los AcsMs DAS-17 (anti-IgG₁) y DAS-2 (anti-IgG₂) fueron cedidos gentilmente por el Dr. S. Srikumaran de la Universidad de Nebraska, EE.UU.

Para probar la especificidad del ensayo, se realizaron pruebas de reacción entre los AcM y otras etapas del ELISA.

2.7.2.4 ELISA indirecto para detectar isotipos de IgG anti-HVB-1 en sueros bovinos

Para determinar los diferentes isotipos de Ig inducidos por las diferentes formulaciones vacunales se diseñó en nuestro laboratorio, un ensayo de ELISA que posee básicamente, los mismos pasos que el presentado en la figura 7. Las diferencias son que los anticuerpos detectores de isotipos de IgG bovinas fueron AcMs y que el conjugado fue un suero anti-Ig de ratón/peroxidasa. Se sensibilizaron placas Inmulon I (Dynatech) de 96 pocillos con antígeno viral en buffer carbonato-bicarbonato pH 9,6. Luego de una incubación de 12 horas a 4°C se lavaron las placas 3 veces con PBST pH 7,4 (todos los lavados se realizaron con el mismo buffer) y se incubaron por 45 min. en agitación constante a 37°C (todas las incubaciones se realizaron bajo las mismas condiciones) con BB (PBST-O). Las placas fueron incubadas con las diluciones de los sueros a evaluar (factor de dilución en base 4 y comenzando con la dilución 1/40) también hechas en BB. Luego del lavado, se incubaron con los AcMs contra los isotipos IgG₁ e IgG₂ de bovino, diluídos 1/40000 y 1/4000 respectivamente en BB. Las placas se incubaron con suero comercial de cabra anti-inmunoglobulina de ratón conjugado con la enzima peroxidasa (KPL) en dilución 1/1000,

luego de 5 lavados. Por último, las placas fueron lavadas 3 veces y se revelaron con solución buffer citrato-fosfato (pH 5) / orto fenil diamina (OPD) / H₂O₂ (3%). Se frenó la reacción con H₂SO₄ 2,5 N y se leyó la D.O a 490 nm. (Figura 8).

Los títulos se expresaron como el logaritmo de la inversa de la máxima dilución cuya lectura superara una D.O de 0,3. Este punto de corte fue establecido como la media de un conjunto de sueros negativos más dos desvíos estándar.

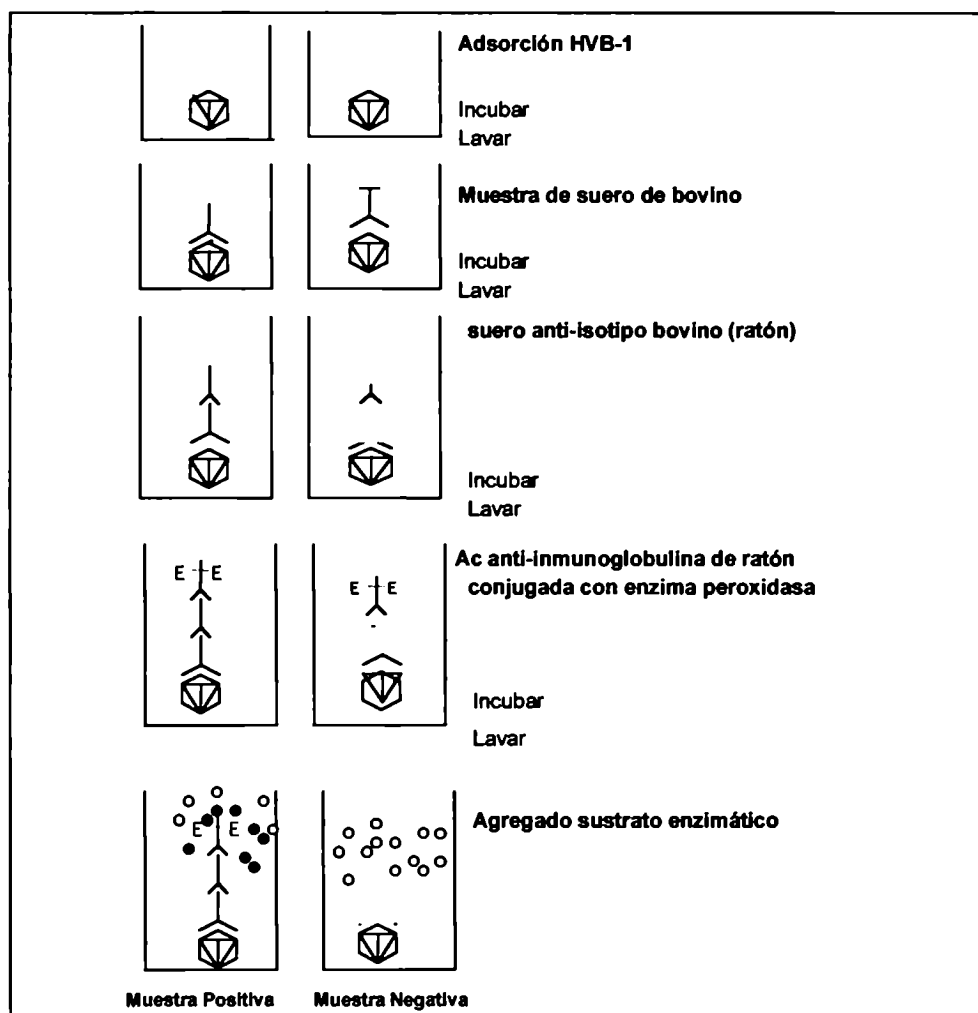


Figura 8. ELISA empleado para la detección de isotipos anti HVB-1 en sueros bovinos

2.8. INMUNIDAD CELULAR. Test de linfoproliferación

Para medir la respuesta inmune de las células T se llevó a cabo básicamente el método descrito por Rutten et al. (1990), poniéndose a punto algunas condiciones para nuestro sistema como cantidad óptima de células, diferentes tiempos de incubación y distintas diluciones de antígeno utilizado para la estimulación (Fig. 16a, 16b y 16c).

Los bovinos se sangraron con jeringas conteniendo 200 μ l de heparina estéril. Las muestras se centrifugaron a 125 g durante 20 minutos a 4°C, obteniéndose la fracción rica en leucocitos (“buffy coat”) que se resuspendió en PBS. Esta fracción se depositó sobre 3 ml de Lymphoprep (densidad 1,077 g/ml) (Nycomed Pharma A.S). Después de centrifugar durante 20 minutos a 421 g a 20°C se colectó la fracción enriquecida en linfocitos desde la interfase entre el Lymphoprep y el plasma. Las células se lavaron dos veces en medio RPMI 1640 suplementado con 5% de SFB.

El stock de HVB-1 utilizado para estimular a los LT en el test de linfoproliferación, con un título de 10^5 DICT_{50%}/ml, fue inactivado con luz ultravioleta (UV). Para ello se colocó el virus en una caja de Petri a una distancia de 11 cm de los tubos UV (General Electric G875) durante 1 minuto. El clarificado de células MDBK usado como control también fue expuesto a la misma radiación. Luego de la radiación se agregó 0,1 ml de HVB-1 y su respectivo control de células MDBK inactivados, diluidos 1:100 en medio RPMI 1640 a placas de cultivo conteniendo 2×10^6 cel/ml. Se utilizaron como controles negativos células MDBK o medio solo. Se agregó 1 μ g/pocillo del mitógeno Con A (Sigma), a los pocillos controles positivos. Los cultivos fueron incubados por 4 días a 37°C en estufa de CO₂. Se agregó 0,4 μ Ci/pocillo de (³H) timidina 18 horas antes de cosechar. La timidina incorporada se midió en un contador de centelleo (LKB,Wallac, 1219 Rackbeta) y se calculó el promedio de las mediciones realizadas por triplicado. Los resultados se obtuvieron como cpm y se expresaron como índice de estimulación (I.E.= media de cpm de cultivo con HVB-1/media de cpm del cultivo con MDBK). El punto de corte fue establecido en 3.

Se evaluó la respuesta linfoproliferativa a los 0, 6, 21, 76, 226, 234, 264, 375, 400, 406, y 470 dpv.

2.9. DESAFIO VIRAL

2.9.1 Diseño experimental

La eficacia de las vacunas fue evaluada a los 400 dpv en una experiencia controlada de desafío viral. El desafío se realizó en boxes de nivel de seguridad 2 con aire filtrado y presión negativa.

Cinco animales de cada grupo de vacunados y diez bovinos seronegativos a HVB-1, fueron desafiados con $10^{7,5}$ DICT_{50%}/ml de la cepa virulenta LA de HVB-1. Este inóculo fue

administrado individualmente (2 ml en cada fosa nasal) utilizando un nebulizador ultrasónico (ELECTROLAB AP 300) (Foto 1). Los bovinos involucrados en la experiencia fueron agrupados al azar en 6 boxes separados en grupos de 4 y un grupo de 5 animales.

Durante los 18 días siguientes al desafío, los bovinos fueron examinados clínicamente por un veterinario que desconocía el tratamiento realizado a cada individuo. Los parámetros evaluados incluyeron anorexia, temperatura corporal, conjuntivitis, rinitis y vulvovaginitis (Foto 2 a, b, c, d y 3).

Cuando cesaron de excretar virus y estaban recuperados clínicamente, los animales se trasladaron a corrales de aislamiento, donde permanecieron hasta los 70 días post-desafío (dpd).

2.9.2. Observación clínica y toma de muestras

Los bovinos fueron examinados clínicamente durante toda la experiencia en boxes. Se registró la temperatura corporal y se tomaron muestras de sangre y secreciones nasales antes del desafío, para establecer los valores basales.

Las secreciones nasales se obtuvieron insertando hisopos en el meatus ventral de los pasajes nasales (Foto 4). Las muestras se tomaron a los 4, 6, 8, 11, 13, 15 y 18 dpd. El medio de transporte utilizado para las secreciones nasales fue MEM-E con antibióticos (5000IU/ml de penicilina, 2500 ug /ml de streptomina y 10 ug/ml de anfotericina B) se centrifugaron a 784 g durante 10 minutos a efectos de clarificar y extraer la mayor cantidad de partículas virales. Parte del sobrenadante fue inoculado inmediatamente en monocapas de células MDBK y el resto guardado a -80°C .

Se tomaron muestras de sangre para serología (evaluadas por ELISA y seroneutralización) a los 7, 11, 14, 21, 40 y 70 dpd y para evaluar la respuesta inmune celular por el test de linfoproliferación (TLP) a los 7, 40 y 70 dpd.



Foto 1. Desafío viral de bovinos utilizando un nebulizador ultrasónico (ELECTROLAB AP 300). Cada animal recibió un inóculo de $10^{7.5}$ DICT₅₀/ml.



Foto 2 (A). Rinitis serosa presente en bovinos vírgenes infectados con HVB-1.

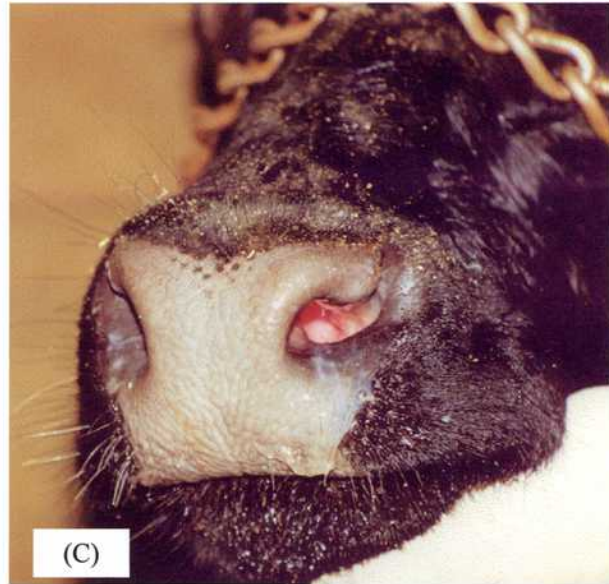


Foto 2 (B, C y D) . Rinitis seromucosa presente en bovinos vírgenes infectados con HVB-1. En (D) se observa una manifestación más severa que en las fotos (B) y (C).



Foto 3. Manifestación de vulvovaginitis en bovinos vírgenes infectados con HVB-1.



Foto 4. Recolección de secreciones nasales de bovinos desafiados con HVB-1. Las muestras se obtuvieron insertando hisopos en el meatus ventral de los pasajes nasales.

2.9.3. Aislamiento viral

Las secreciones se procesaron el mismo día de su recolección para aislamiento viral. Básicamente, se siguió el procedimiento descrito por Kit y col. (1986). Brevemente, se inoculó 0,1 ml del fluido nasal sobre laminillas con células MDBK en placas con 24 pocillos. Se controlaron las monocapas inoculadas durante 3 días para observar la aparición de ECP típico de HVB-1. Las muestras con ECP positivo fueron evaluadas por el test de inmunofluorescencia directa para corroborar la presencia de HVB-1 (datos no mostrados). Las muestras con ECP negativo fueron sometidas a dos pasajes ciegos en monocapas de MDBK y se les realizó PCR, para verificar su condición de negativas.

2.9.4. Extracción de DNA de hisopados nasales

Se siguió el procedimiento descrito por Alegre y col. (2001). Se realizó la extracción de DNA de muestras secuenciales de animales vacunados e infectados experimentalmente con $10^{7,5}$ DICT_{50%}/ml de la cepa LA de HVB-1, que habían resultado negativas al aislamiento en cultivos celulares. Se analizaron muestras de los hisopados nasales correspondientes a los 6, 8, 11, 13 y 15 dpd.

Para la extracción de DNA se utilizó el siguiente protocolo: Se agregó 250 ul de muestra a 250 ul de buffer de extracción (Tris 10mM, EDTA disódico 1mM, SDS 0.5%, Proteinasa K 1,6U/ml, pH 5,8). Se utilizó como controles positivos sobrenadantes de cultivos de MDBK inoculados con LA (HVB-1). Se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se agregaron 500ul de Fenol : Cloroformo: Alcohol Isoamílico (25:24:1) Tris buffer pH 7,9 (Ambion cat 9730) y se realizó una centrifugación a 16000 g durante 2 minutos. Al sobrenadante recuperado se le realizó una nueva extracción con cloroformo-isoamílico (24:1). Se centrifugó a 16000 g rpm por 2 min. El DNA suspendido en la fase acuosa fue precipitado con 1 ml de etanol absoluto más 100 μ l de NaAc 3M pH 5,8. Se centrifugó a 16000 g por 30 min. El "pellet" obtenido fue lavado con 1 ml de etanol 70%, secado al vacío a 40°C, resuspendido en 10 μ l de H₂O bidestilada y se mantuvo a -20°C hasta su utilización.

2.9.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):

Para verificar la presencia de DNA viral se llevó a cabo un ensayo de PCR utilizando primers específicos que amplifican un fragmento de la Timidina Kinasa de HVB-1 según el protocolo de Alegre y col. (2001).

Los primers utilizados fueron los siguientes:

TK1: 5' AGACCCAGTTGTGATGAATGC 3'

TK2: 5' ACACGTCCAGCACGAACACC' 3

El ensayo se llevó a cabo en un termociclador Perkin Elmer Gen Amp PCR 2400.

A 5 ul de cada muestra de DNA se le agregó 29 ul de agua de alta calidad y 1ul (100 ng) de cada primer. Se mantuvieron durante 10 min. a 99°C y cuando la temperatura bajó a 88°C, se agregó 14ul de la mezcla de PCR (5ul de buffer PCR (10x); 5ul glicerina 87%; 1,5ul MgCl₂ 50 mM; 0,5 ul dNTP 10mM; 0,5ul Taq DNA polimerasa). Las muestras se sometieron 1 min. a 95°C y luego a 35 ciclos de desnaturalización con las siguientes condiciones: 1 min a 95°C (desnaturalización); 1 min a 61,4°C (apareamiento) 1 min a 72°C (extensión). La extensión final se realizó durante 5 min a 72°C. Los productos de PCR se corrieron en gel de agarosa al 1,8% en TBE 0,5X, pH:8 y se detectaron por tinción con bromuro de etidio. El tamaño de los fragmentos de DNA se estimó por comparación con un marcador de peso molecular (escalera de 100pb BRL).

2.10. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Las observaciones (niveles de anticuerpos y respuesta celular generados por los bovinos) a través del tiempo para cada vacuna fueron comparados mediante un ANOVA (Statistical) para mediciones repetidas con la corrección de Greenhouse y Geisser para los niveles de significación que fueron fijados en el 5%. Se utilizó el procedimiento GLM del SAS. Se calculó el SEM. Una vez encontradas estas diferencias se empleó, como técnica post ANOVA para desglosar las diferencias, el test de Bonferroni al mismo nivel de significación. Las variables dicotómicas en el test de linfoproliferación y síntomas clínicos se compararon mediante la prueba de homogeneidad X^2 o el test exacto de Fisher para tamaños muestrales chicos, indicándose en cada caso el nivel de significación resultante. Para

variables de dudoso comportamiento normal (como en el caso de títulos virales excretados) se utilizó el test no paramétrico de Kruskal Wallis.

En los casos en los que se estudió la correlación entre dos variables se aplicó el método de regresión lineal.

Se realizaron las siguientes correlaciones:

1- Acs neutralizantes y protección (medida en términos de máxima excreción viral y tiempo máximo de excreción).

2- Acs totales y protección (medida en términos de máxima excreción viral y tiempo máximo de excreción).

3- Niveles de IgG2 /IgG1 y protección (en este caso se realizó además una correlación no paramétrica "rho de Spearman". Relación IgG2/IgG1 vs cada subclase de IgG.

Se utilizó el análisis de correlación para intentar describir la posible relación entre anticuerpos totales y neutralizantes, y el método de Alman para analizar concordancia numérica.

El conocimiento de los mecanismos de defensa desencadenados en la respuesta inmune contra HVB-1 y sus roles en la protección de la enfermedad resultan importantes en la elección de una vacuna y para definir las medidas de control y futura erradicación más adecuadas. Como contribución a esta área se estudió la respuesta inmune y la protección conferida por diferentes vacunas durante un período de 470 días. A su vez, se realizó la evaluación comparativa de la acción de dos inmunomoduladores Avridine y SL-CD/S/W en relación a la vacuna convencional formulada con aceite mineral.

3.1. Estudio de la respuesta inmune humoral.

3.1.1. Cinética de anticuerpos totales

Con el propósito de estudiar la cinética de anticuerpos desarrollada por los animales vacunados, se cuantificaron durante un período de 400 días los niveles de anticuerpos totales específicos contra HVB-1 mediante un ensayo de ELISA indirecto. Se evaluó en forma comparativa la influencia de los inmunomoduladores en la inducción de respuesta inmune humoral con respecto a la vacuna convencional.

En la figura 9 se muestran los niveles de anticuerpos en sueros inducidos por la vacuna formulada con aceite no mineral y biodegradable SL-CD/S/W (1), formulada con aceite mineral más Avridine (2) y formulada con aceite mineral solamente (3). La comparación de los títulos promedio de anticuerpos totales específicos contra HVB-1 mostró que no existen diferencias significativas en los niveles de anticuerpos inducidos por las diferentes vacunas (Fig. 9). La inclusión de inmunomoduladores (SL-CD/S/W y Avridine) no logró superar la capacidad inductora de anticuerpos del vehículo oleoso.

En todos los casos se observó un incremento significativo luego de las revacunaciones, alcanzando niveles que oscilan entre 4,31- 4,67 a los 60 dpv y de 5,12-5,33 a los 264 dpv. SEM: 0,16 (Fig. 9).

A lo largo de la experiencia no se registraron anticuerpos contra HVB-1 en ninguno de los dos grupos controles vacunados con Adyuvante + AV sin antígeno o SL-CD/S/W sin antígeno, demostrando que no hubo circulación viral en el campo (datos no mostrados).

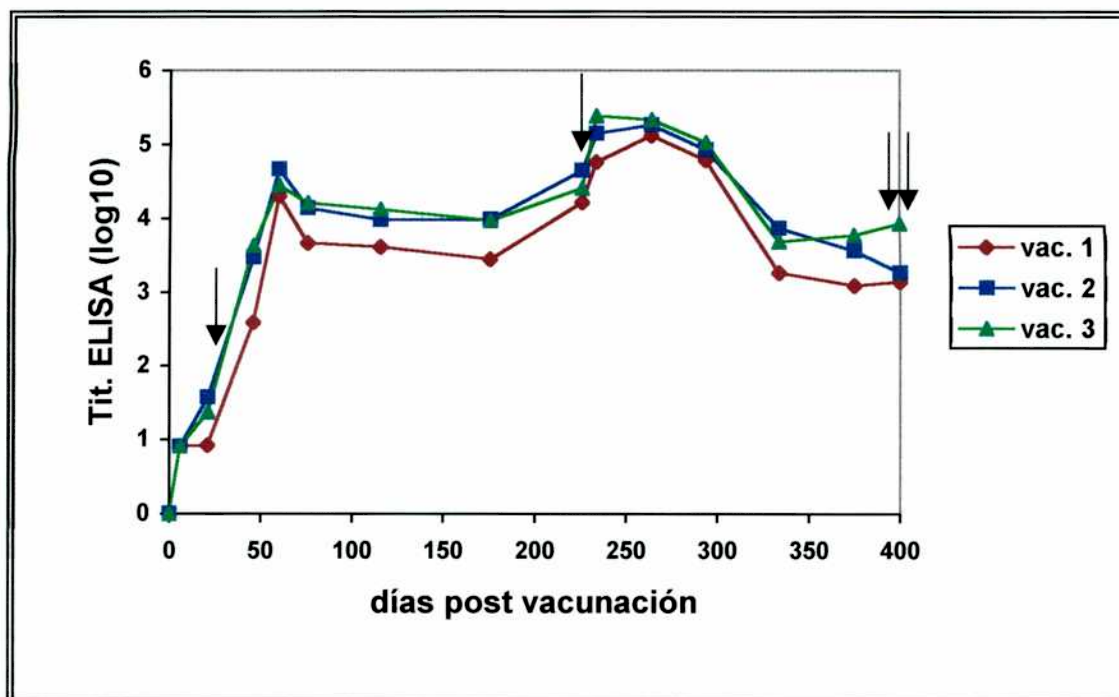


Fig. 9. Cinética de anticuerpos anti-HVB-1 post vacunación de bovinos vacunados con: vacuna 1 (HVB-1 inactivo +SL-CD/S/W); vacuna 2 (HVB-1 inactivo +Avridine en Adyuvante oleoso INTA); vacuna 3 (HVB-1 inactivo + Adyuvante oleoso INTA). \uparrow revacunación. \blacktriangle Desafío. SEM: 0.16.

3.1.2. Cinética de las subclases de IgG

La inducción de isotipos específicos que favorezcan el desarrollo de mecanismos efectores, junto con la respuesta celular, puede ser importante en la eficacia de una formulación vacunal (Worku, 1994). Por este motivo, se propuso estudiar la cinética de las subclases de IgG desarrollada por las distintas vacunas.

3.1.2.1. Puesta a punto del ELISA para detectar isotipos de IgG en sueros bovinos anti-HVB-1

Para la detección de las subclases de IgG en sueros de bovinos contra la partícula de HVB-1 se emplearon AcMs contra cada uno de los isotipos IgG₁ e IgG₂, cedidos gentilmente por el Dr. Sirkumaran (Universidad de Nebraska, USA). Para probar la especificidad del ensayo, se realizaron pruebas de reacción entre los AcMs y las diferentes etapas del ELISA.

En la Fig. 10 se observan las curvas de titulación y de control de reacciones inespecíficas para los ensayos de IgG₁ (a y c) e IgG₂ (b y d) de los anticuerpos

monoclonales antisotipos de IgG. Ambos ensayos de ELISA demostraron un bajo nivel de reacciones cruzadas entre etapas previas y discontinuas del ensayo y no mostraron reactividad en presencia de sueros negativos para HVB-1. La dilución de uso para cada uno de los anticuerpos monoclonales en estos ensayos resultaron ser 1/40000 para el anti IgG₁ (Figura 10a) y 1/4000 para anti-IgG₂ (Figura 10d).

El punto de corte fue establecido como la media de un conjunto de sueros negativos más dos desvíos estandar (Fig. 10 e y 10 f).

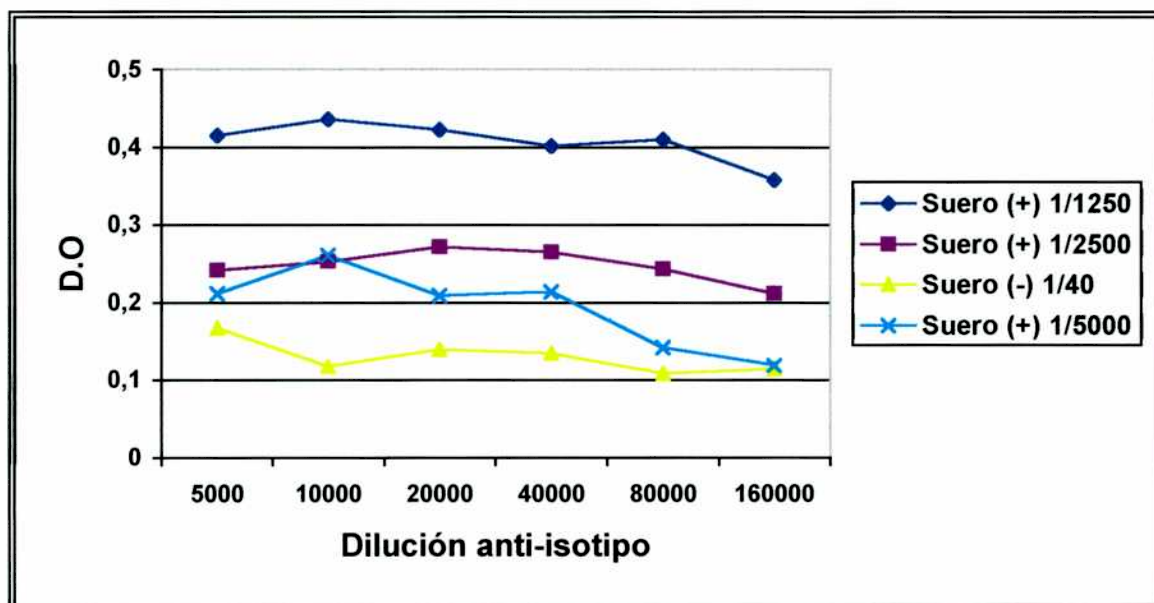


Fig. 10 a. Titulación del anticuerpo monoclonal anti-IgG₁. Se enfrentaron diluciones seriadas del anticuerpo anti-isotipo a diluciones de la muestra control positiva y de la muestra control negativa.

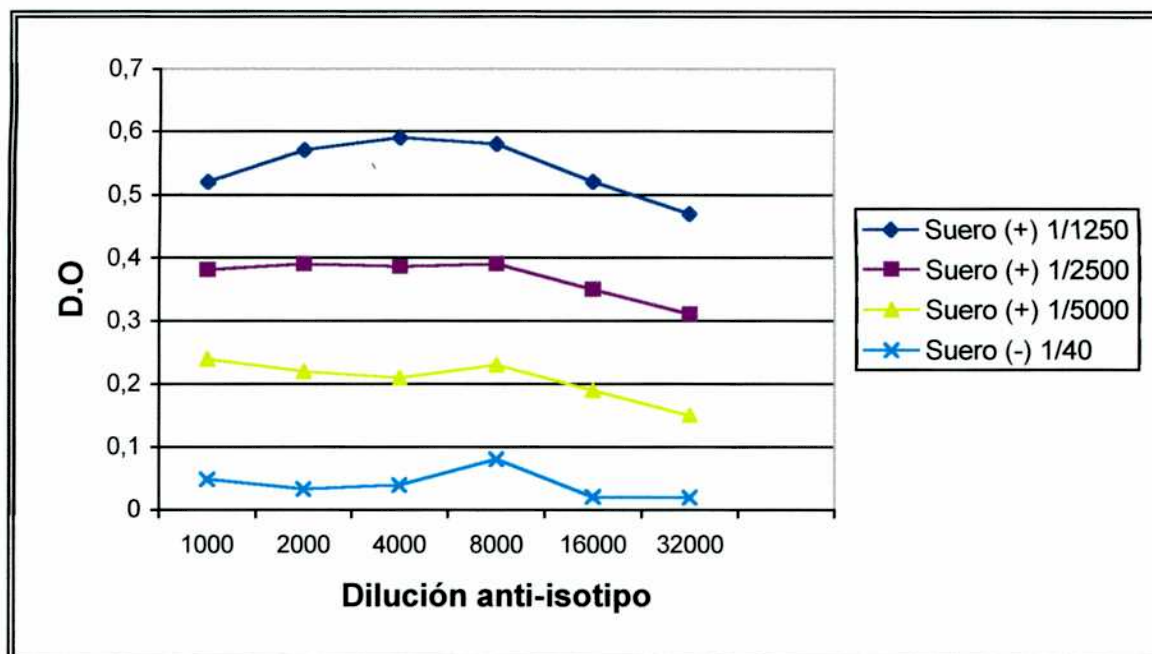


Fig. 10 b. Titulación del anticuerpo monoclonal anti-IgG₂. Se enfrentaron diluciones seriadas del anticuerpo anti-isotipo a diluciones de la muestra control positiva y de la muestra control negativa.

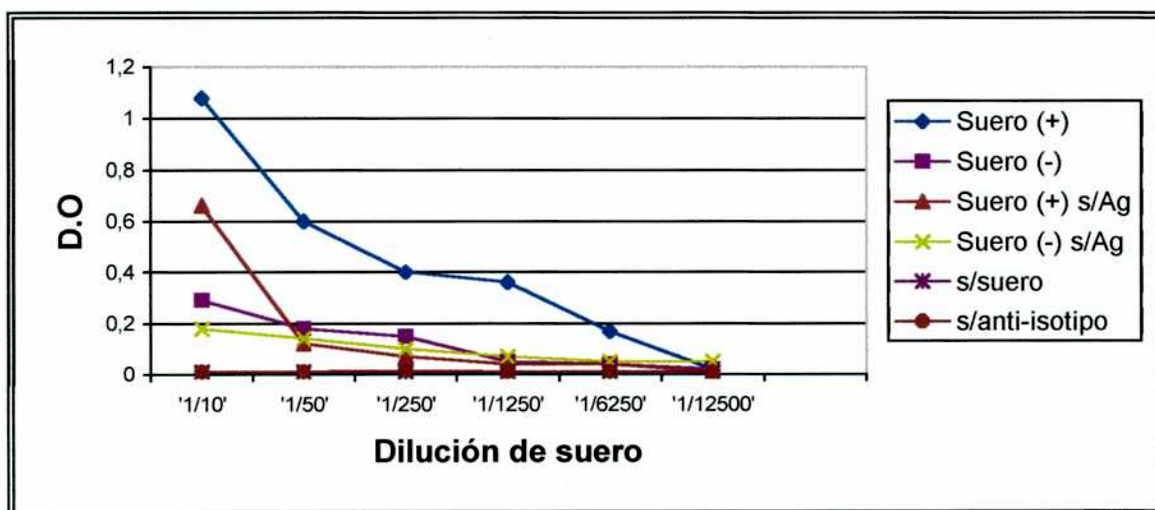


Figura 10 c. Control de reacciones inespecíficas para el ensayo de ELISA que cuantifica IgG₁ contra HVB-1.

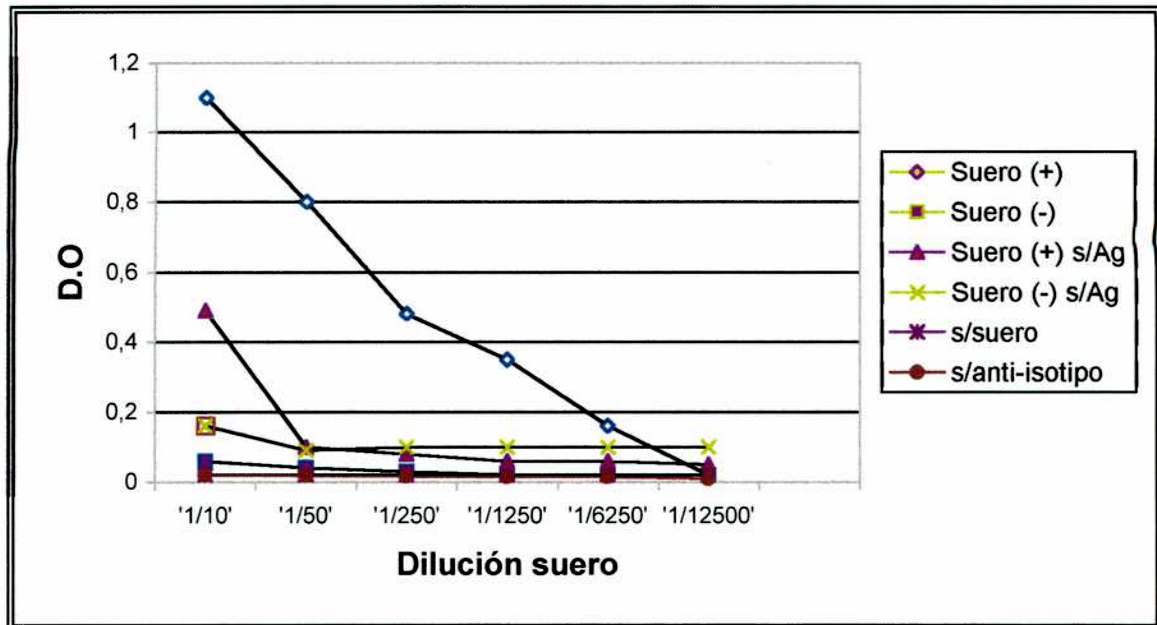


Figura 10d. Control de reacciones inespecíficas para el ensayo de ELISA que cuantifica IgG₂ contra HVB-1.

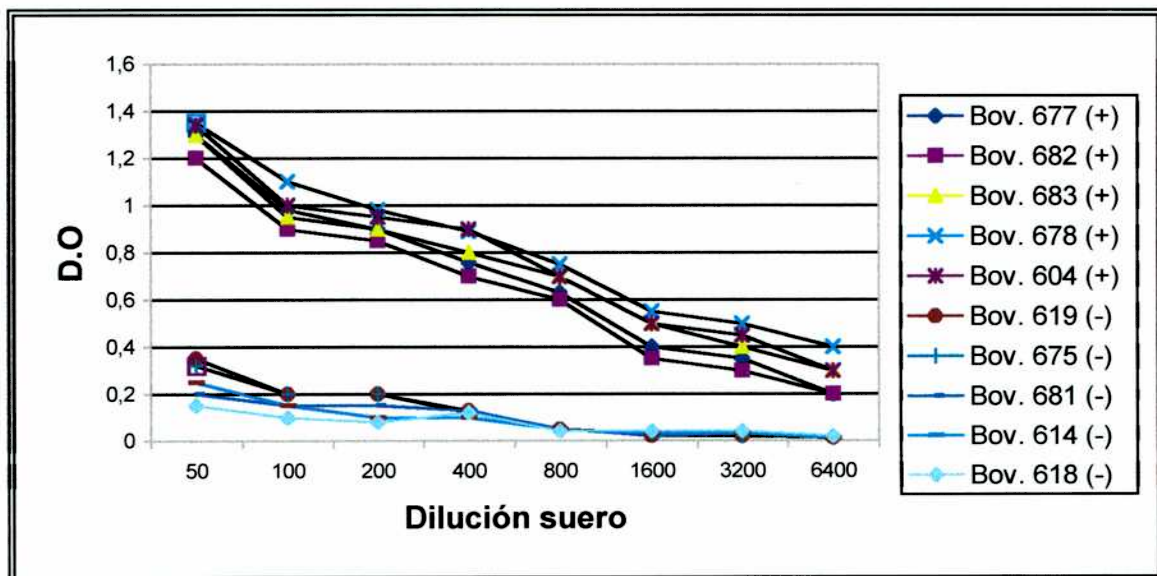


Fig. 10e. Nivel de corte del ELISA para cuantificar IgG1 anti HVB-1 bovina. El punto de corte fue obtenido como la media de un conjunto de sueros negativos (evaluados por seroneutralización) más dos desvíos estándar. Este punto de corte seleccionado fue 0.3.

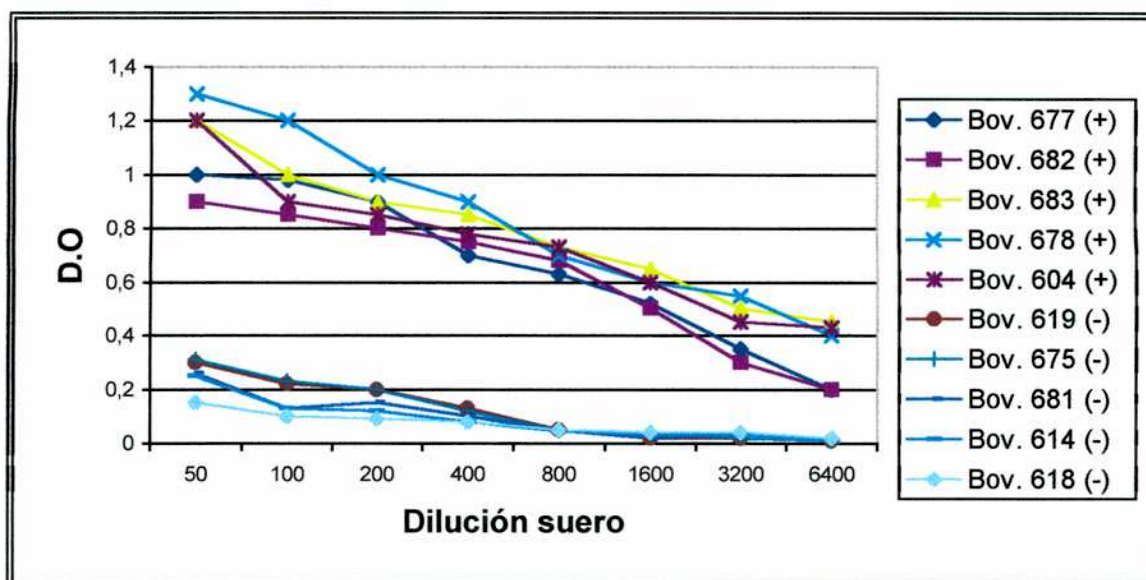


Fig. 10f. Nivel de corte del ELISA para cuantificar IgG2 anti HVB-1 bovina. Este punto de corte fue obtenido como la media de un conjunto de sueros negativos (evaluados por seroneutralización) más dos desvíos estándar. Este punto de corte seleccionado fue 0.3.

3.1.2.2. Cinética de anticuerpos IgG₁ e IgG₂

Una vez puesto a punto el ensayo de ELISA para detectar isotipos de IgG anti-HVB-1 en suero se propuso evaluar a largo plazo el perfil isotípico desarrollado por cada grupo de animales y la influencia de los inmunomoduladores.

Los perfiles inducidos por las distintas vacunas no presentaron diferencias significativas en los valores de IgG₁ (Fig. 11a). Luego de las revacunaciones se observó un incremento significativo de los títulos en todos los animales vacunados, alcanzando un pico máximo a los 60 dpv con valores entre 3,4 y 4,6. La segunda re-vacunación (a los 226 dpv) produjo un incremento de los títulos promedio de IgG₁ con un pico entre 3,4 y 4,4 a los 294 dpv (Fig. 11a). SEM: 0,19.

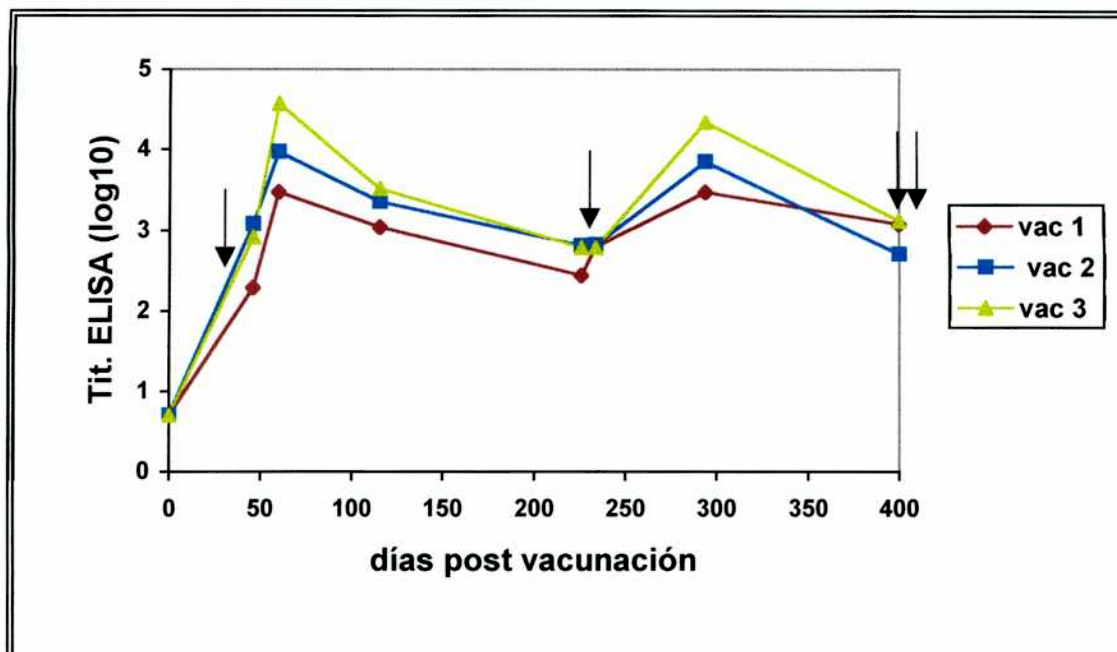


Fig. 11a. Cinética de anticuerpos IgG1 anti-HVB-1 post vacunación de bovinos vacunados con: vacuna 1 (HVB-1 inactivo +SL-CD/S/W); vacuna 2 (HVB-1 inactivo +Avridine en Adyuvante oleoso INTA) ; vacuna 3 (HVB-1 inactivo + Adyuvante oleoso INTA). ▲ revacunación. ▲▲ Desafío. SEM: 0.19.

En cuanto a la subclase IgG₂, las revacunaciones también condujeron a un aumento significativo del título promedio, siendo éste mayor luego de la segunda revacunación, con valores entre 2,9 y 4,5, mientras que tras la primera revacunación los títulos alcanzaron valores entre 1,5 y 2,7 (Fig. 11b). En este caso, se observaron mayores variaciones entre los perfiles inducidos por las distintas vacunas. En el tramo 60-294 dpv los niveles promedio de los animales vacunados con las vacunas formuladas con aceite mineral con y sin Avridine (grupos 2 y 3 respectivamente) superan significativamente a los vacunados con la vacuna formulada con aceite no mineral (grupo 1), desapareciendo esta diferencia al momento del desafío (400 dpv) ya que todos los animales presentaron similares niveles de IgG₂ oscilando entre (2,83-3,48). (Fig. 11b). SEM= 0,25.

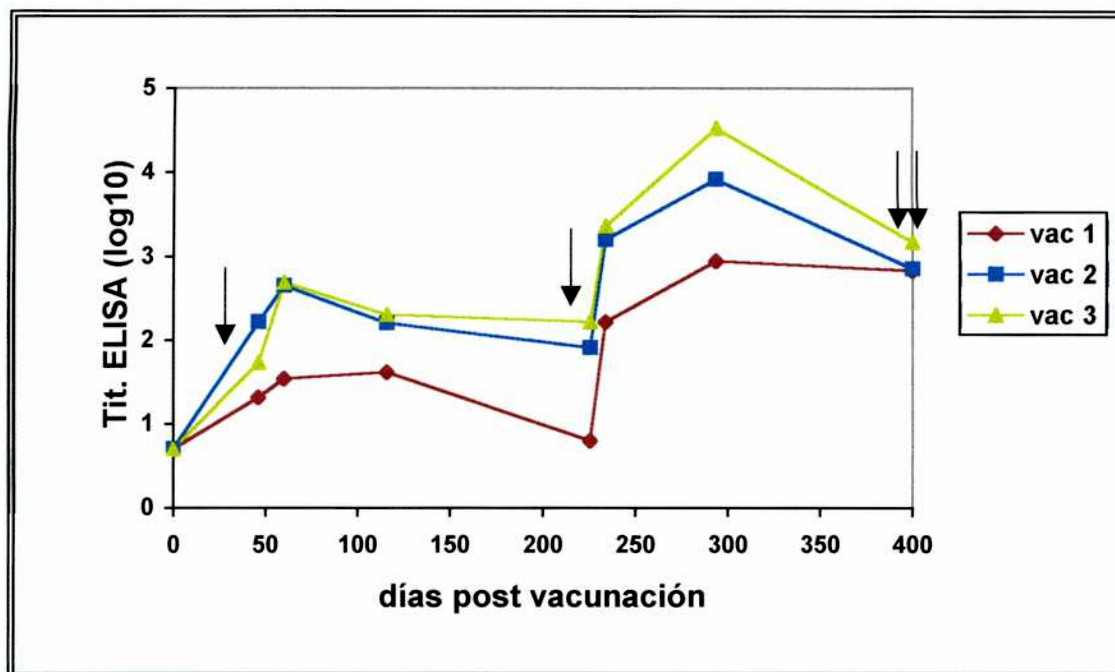


Fig. 11b. Cinética de anticuerpos IgG2 anti-HVB-1 post vacunación de bovinos vacunados con: vacuna 1 (HVB-1 inactivo +SL-CD/S/W); vacuna 2 (HVB-1 inactivo +Avidine en Adyuvante oleoso INTA) ; vacuna 3 (HVB-1 inactivo + Adyuvante oleoso INTA). ▲ revacunación. ▲▲ Desafío. SEM: 0.25.

3.1.2.3. Relación entre los títulos de IgG₂ e IgG₁

Para analizar la variación que presentan entre sí los títulos de IgG₂ e IgG₁ en el tiempo para cada formulación vacunal, además de presentarlos por separado, ambos datos medidos para cada caso fueron reunidos en un solo índice resultante del cociente entre tales títulos. Este índice expresa la proporción de ambos para un determinado tiempo y grupo experimental.

En la Fig. 12 se muestra el cociente de los promedios de los títulos de IgG₂ e IgG₁ para las tres vacunas durante el período post-vacunación. Al comienzo los niveles de IgG₂ descendieron, luego se mantuvieron constantes hasta los 246 dpv, aumentando significativamente luego de la segunda revacunación y manteniéndose constantes hasta el momento del desafío.

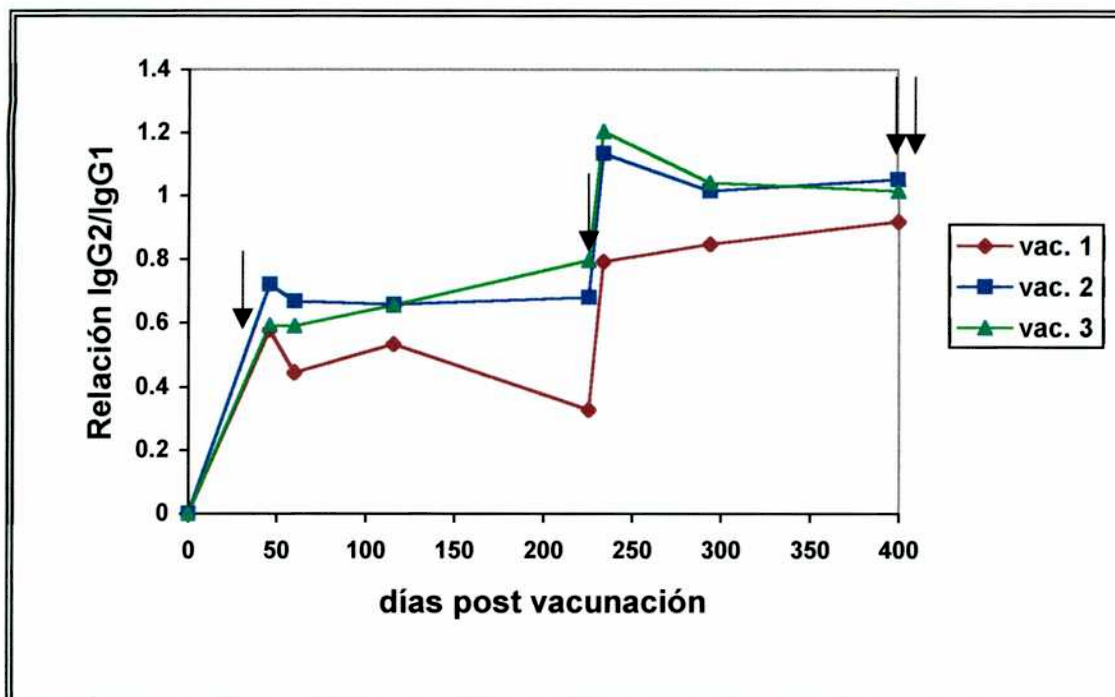


Fig. 12. Relación IgG₂/IgG₁ post vacunación de bovinos vacunados con: vacuna 1 (HVB-1 inactivo +SL-CD/S/W); vacuna 2 (HVB-1 inactivo +Avridine en Adyuvante oleoso INTA); vacuna 3 (HVB-1 inactivo + Adyuvante oleoso INTA). ↑ Revacunación. ↑↑Desafío.

3.1.2.4. Correlación entre la relación IgG₂/IgG₁ y cada subclase.

Cuando se estudió la existencia de correlación entre título de IgG₂ vs relación IgG₂/IgG₁ (Fig. 13 a) y título de IgG₁ vs relación IgG₂/IgG₁ (Fig. 13 b), se observó que el aumento de IgG₂/IgG₁ se correlaciona positivamente con el aumento de los títulos de IgG₂ ($r=0.80^{*1}$)(Fig. 13 a). Esto estaría indicando que el aumento en la relación se debe a un aumento relativo en los títulos de IgG₂ específicos con respecto a los de IgG₁. Entonces, como se vió en la Fig. 12, los aumentos en este índice en los tiempos post-vacunación se debe, a incrementos de la IgG₂.

¹ * significativo

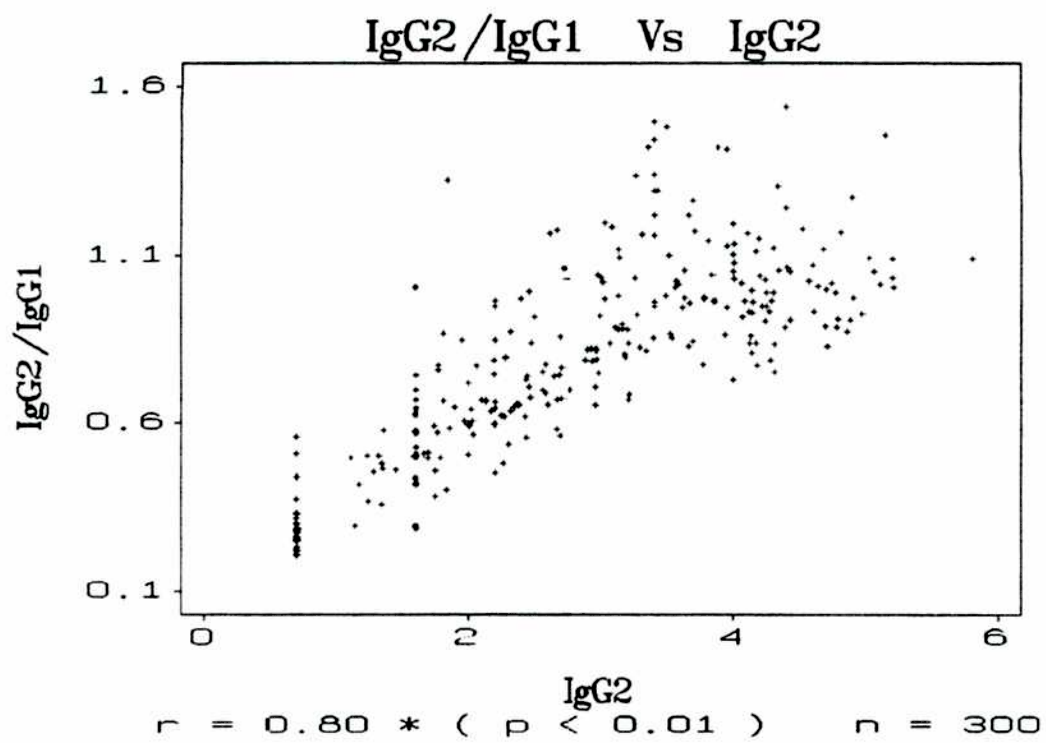


Figura 13a. Correlación de los niveles de IgG2/IgG1 vs IgG2.

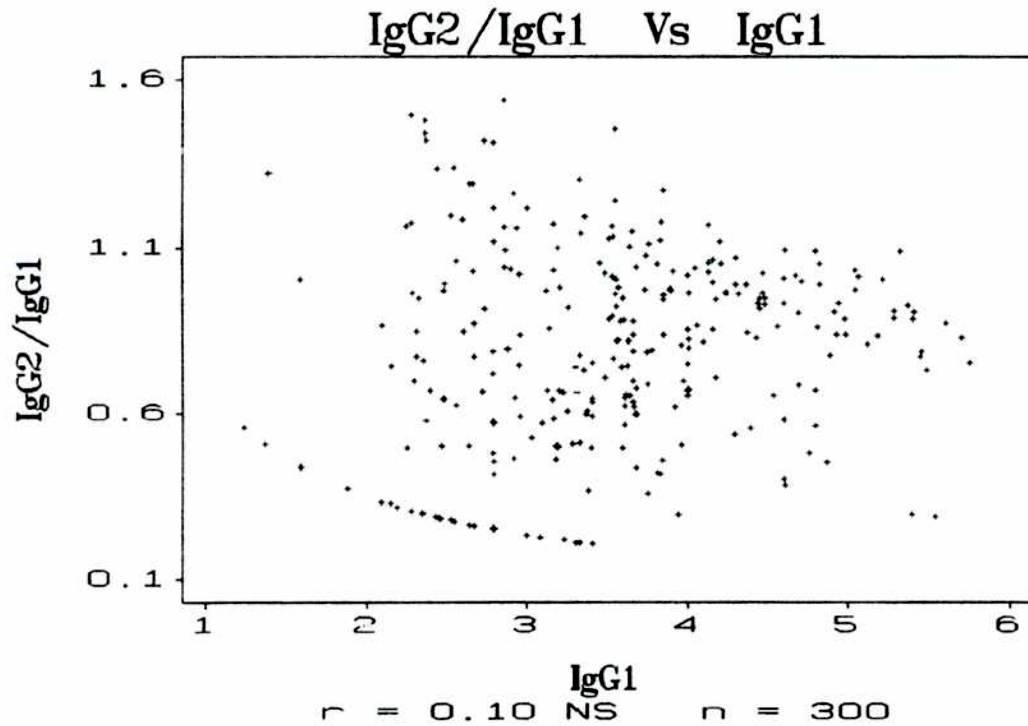


Figura 13b. Correlación de los niveles de IgG2/IgG1 vs IgG1.

3.1.3. Evaluación de los anticuerpos neutralizantes inducidos.

3.1.3.1 Influencia de los inmunomoduladores en la inducción de anticuerpos neutralizantes.

Con el propósito de estudiar la funcionalidad de los anticuerpos inducidos en los animales vacunados, se cuantificaron mediante el ensayo de seroneutralización los niveles de anticuerpos neutralizantes específicos contra HVB-1 durante un período de 400 días.

Los niveles de anticuerpos neutralizantes medidos mediante el test de seroneutralización comenzaron a ser detectables a partir de la primera revacunación (Fig. 14). Las tres vacunas mostraron el mismo perfil, con incrementos significativos luego de las revacunaciones, observándose picos a los 76 dpv con niveles entre 1,44-2,3 y a los 234 dpv (8 días post-segunda revacunación) con títulos entre 2,15-3,06. No se encontraron, a lo largo del período de estudio, diferencias significativas en los niveles de anticuerpos inducidos por las vacunas formuladas con aceite mineral (grupos 2 y 3). A su vez, entre los 60 y 334 días los valores en animales vacunados con la vacuna 2 (formulada con Avridine) y 3 (convencional) superan significativamente a los que recibieron la vacuna 1, formulada con aceite no mineral. Al momento del desafío los niveles de anticuerpos neutralizantes eran bajos, oscilando entre 0,54 y 1,16 no hallándose diferencias significativas entre las vacunas (Fig. 14). SEM=0,13.

A lo largo de la experiencia no se registraron títulos de anticuerpos neutralizantes en ninguno de los dos grupos controles vacunados con Adyuvante + AV sin antígeno o SL-CD/S/W sin antígeno (datos no mostrados).

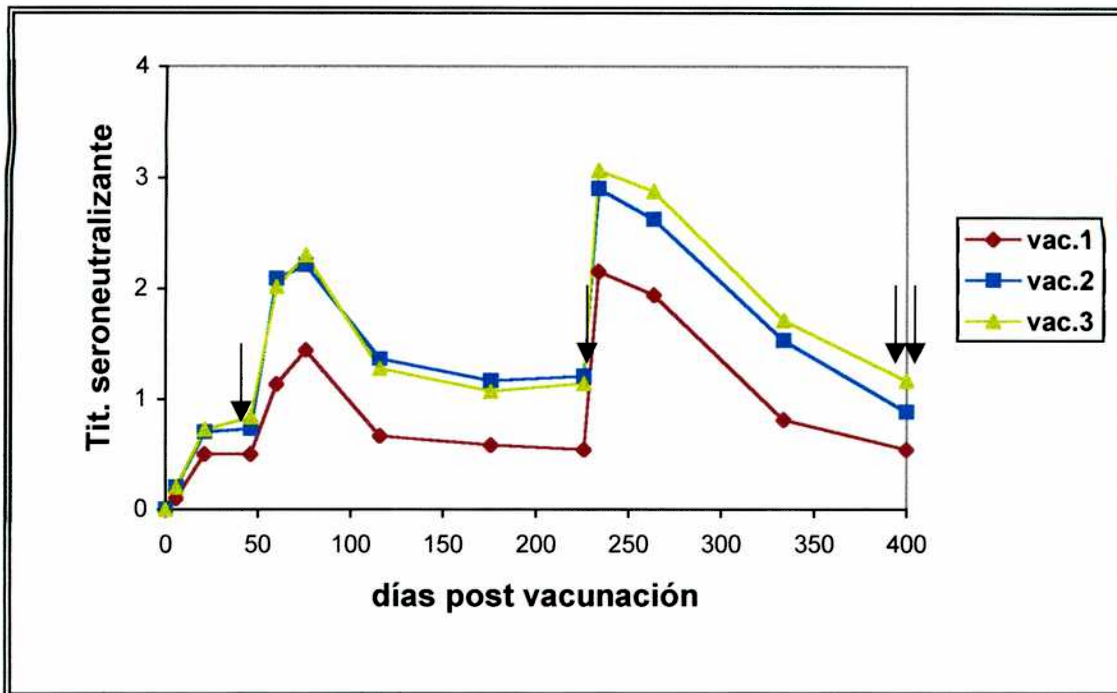


Fig. 14. Cinética de anticuerpos neutralizantes anti-HVB-1 post vacunación de bovinos vacunados con: vacuna 1 (HVB-1 inactivo +SL-CD/S/W); vacuna 2 (HVB-1 inactivo +Avridine en Adyuvante oleoso INTA) ; vacuna 3 (HVB-1 inactivo + Adyuvante oleoso INTA). \blacktriangle revacunación. $\blacktriangle\blacktriangle$ Desafío. SEM: 0.13

3.1.3.2. Correlación entre anticuerpos totales y anticuerpos neutralizantes

Asimismo, para analizar la relación entre anticuerpos totales y neutralizantes se estudió la correlación existente entre estas dos variables. Se vislumbró una asociación positiva entre las mediciones obtenidas que puede ser descripta por la función $ELISA = 2,56 + 0,93SN$ ($r^2 = 0,47$), donde la ordenada al origen es equivalente a la diferencia sistemática entre ambas mediciones, evaluada previamente por el método de Altman (Fig. 15b) y la pendiente resulta no significativamente distinta de 1 (Fig. 15a). Sin embargo, aunque hay una concordancia numérica, biológicamente esta relación o concordancia sería válida en intervalos acotados (con valores de $SN > 1,2$) ya que para valores bajos de $SN (< 1)$, considerados negativos, no se puede encontrar un valor equivalente de ELISA ya que se corresponden con valores que se consideran positivos por ELISA.

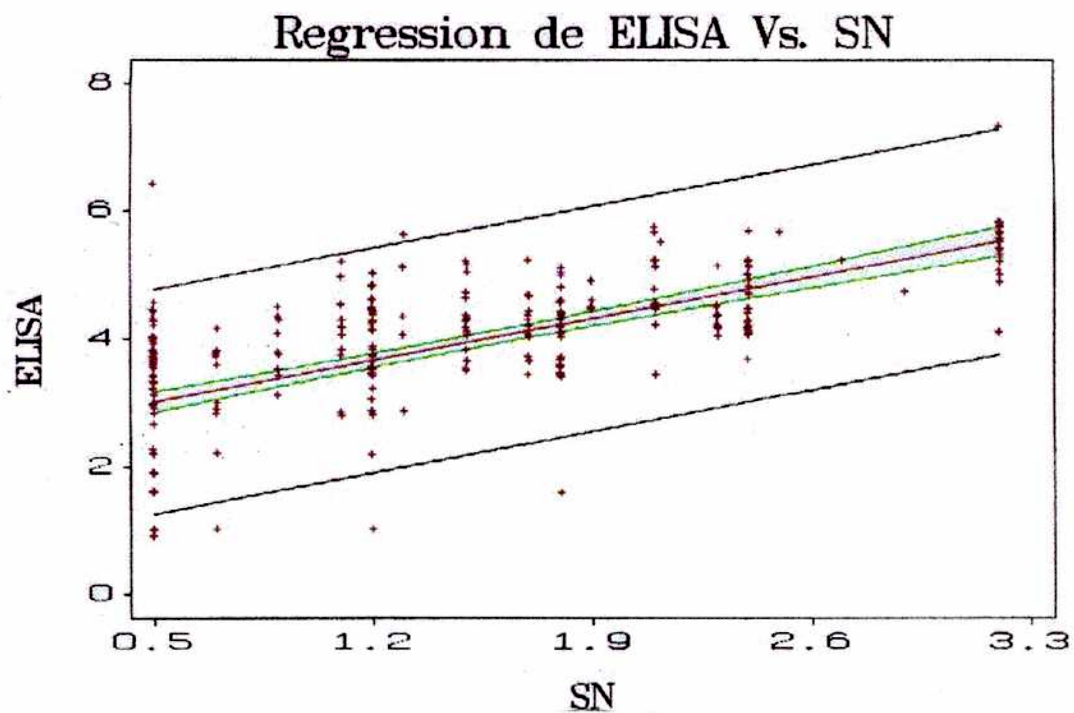


Figura 15a. Correlación entre anticuerpos totales y anticuerpos neutralizantes medidos por seroneutralización.

$$\text{ELISA} = 2.56 + 0.97\text{SN}$$

$$(r^2 = 0.47)$$

$$n = 315$$

$$\text{ELISA} = 0.97(\text{SN} + 2.56)$$

$$\text{Se acepta } \beta = 1 \Rightarrow \text{ELISA} = \text{SN} + 2.56$$

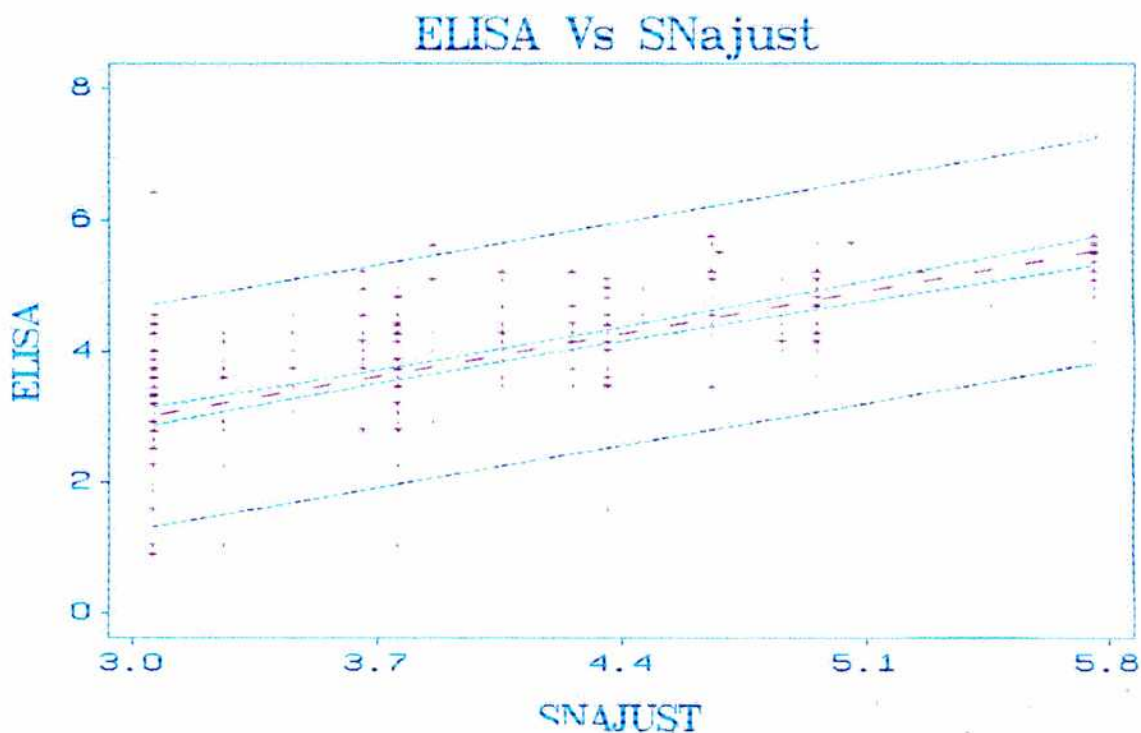


Figura 15b. Correlación entre anticuerpos totales y neutralizantes ajustados según el método de Almann.

3.2. Evaluación de la respuesta inmune celular a largo plazo.

Igual que para otros herpesvirus los ensayos de linfoproliferación, liberación de citoquinas y citotoxicidad han servido para demostrar el rol principal que posee la IMC en la recuperación a infecciones por HVB-1, ya que estos ensayos resultan positivos en etapas más tempranas que los test que cuantifican anticuerpos humorales (Rouse, 1978; Babiuk, 1996). La recuperación de una infección por HVB-1 correlaciona con el pico de actividad de la respuesta celular (entre 5 y 10 dpi) antes de que sean detectables los niveles de anticuerpos (Rouse, 1974; Gerber, 1978; Babiuk, 1996). Por este motivo en este trabajo se evaluó la respuesta celular inducida por las distintas vacunas mediante el test de linfoproliferación por un período de 400 días.

3.2.1. Puesta a punto del test de linfoproliferación para HVB-1

Conociendo la importancia de evaluar la respuesta inmune celular (RIC) en este tipo de infecciones donde el virus pasa el mayor tiempo dentro de las células (Rouse, 1974; Gerber, 1978; Babiuk, 1987), fue necesario poner a punto el test de linfoproliferación para este sistema en particular. El TLP *in vitro* es importante para estudiar la expansión de poblaciones de linfocitos T colaboradores específicos para un antígeno dado (Denis, 1994).

Para la puesta a punto se tuvieron en cuenta las siguientes variables: distinto número de células, diferentes tiempos de incubación y distintas diluciones del antígeno utilizado para la estimulación (Fig. 16 a,b,c) considerándose óptimas las que se detallan en materiales y métodos.

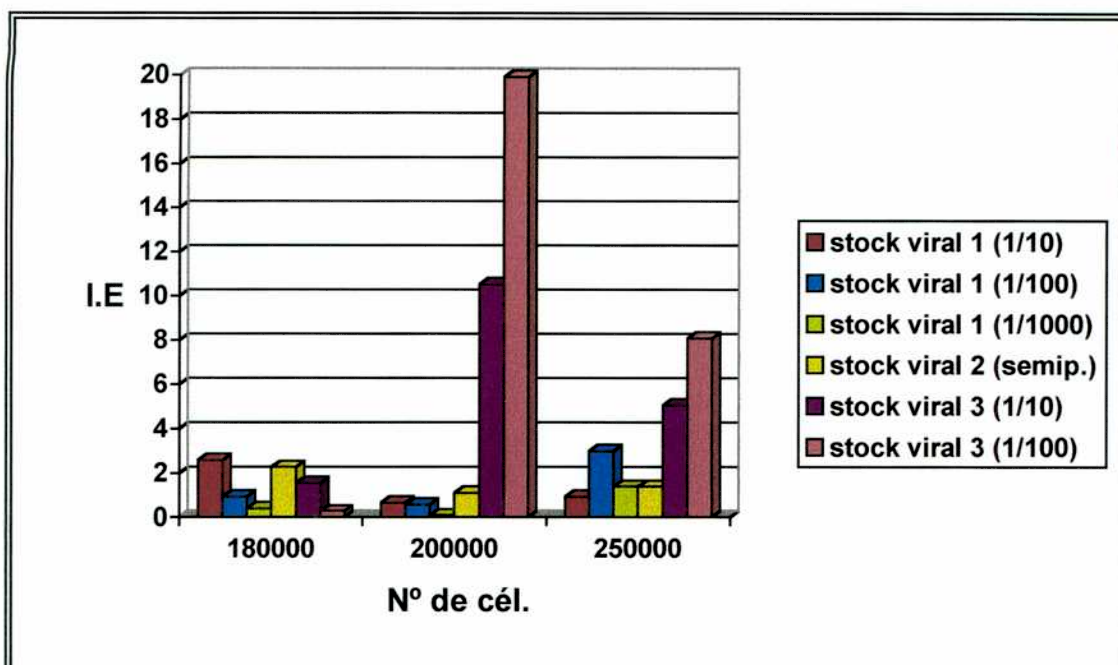


Fig. 16 a. Puesta a punto del Test de blastogénesis con 4 días de cultivo, variando el número de células.

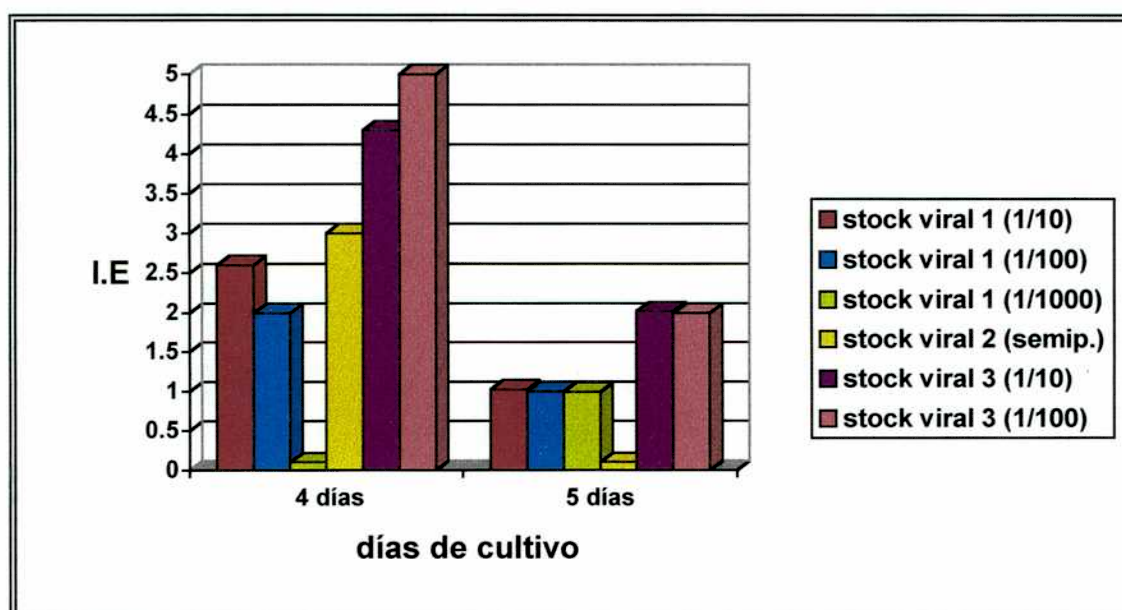


Fig. 16 b. Puesta a punto del Test de blastogénesis con 200000 células por pocillo, variando el número de días de cultivo.

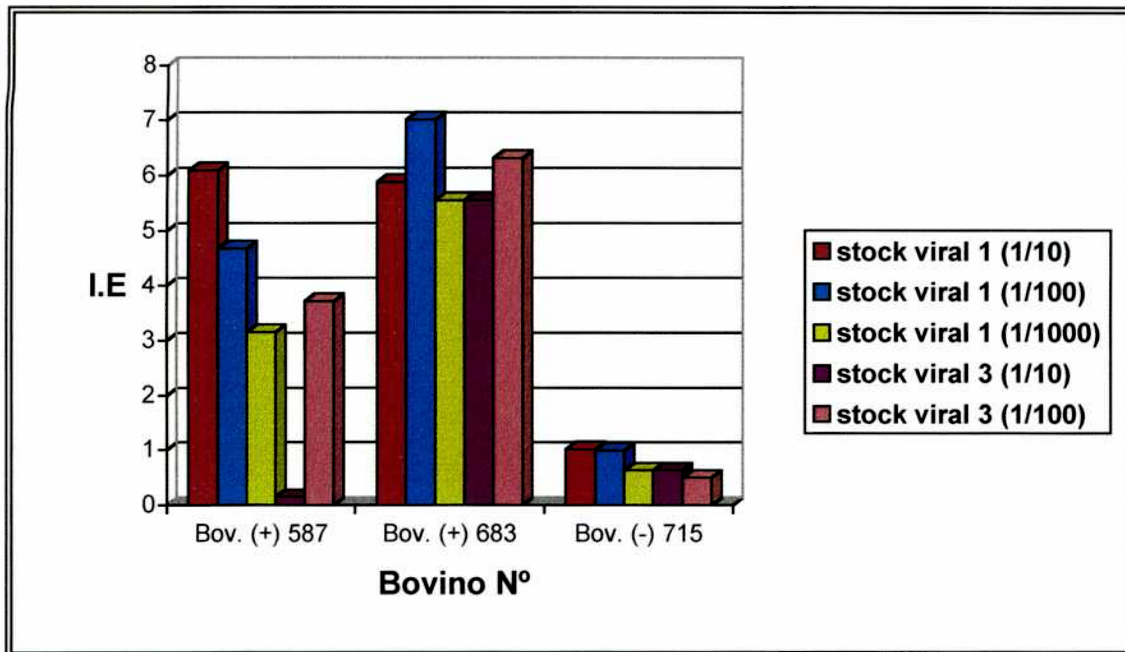


Fig. 16c. Puesta a punto del Test de blastogénesis con 4 días de cultivo, 200000 células por pocillo y linfocitos de animales positivos y negativos evaluados por seroneutralización.

3.2.2. Influencia de los inmunomoduladores en estudio en la inducción de RIC.

Una vez puesto a punto el test de linfoproliferación se propuso evaluar la RIC inducida por las distintas vacunas.

El pico de actividad linfoproliferativa fue detectado entre los 5 y 7 días post-vacunación (antes de que sean detectables los niveles de anticuerpos), ya que fue el tiempo donde se observó en el mayor número de animales una respuesta linfoproliferativa más elevada (Fig. 17). Estos resultados concuerdan con lo observado por otros autores al emplear otras formulaciones vacunales contra HVB-1, tales como (Rouse y col., 1974; Gerber, 1978; Davies, 1973; Tsvetkov, 1987; Babiuk, 1996).

Dado que la variabilidad que se observa de individuo a individuo en cuanto al índice de estimulación es muy alta (hecho observado también por otros autores (Miller-Edge, 1986; Denis, 1994), los resultados se expresan como porcentajes de bovinos positivos al TLP de cada grupo, considerándose como TLP positivo a aquellos animales que presentan un índice de estimulación igual o mayor a 3.

La vacuna 1 formulada con SL-CD/S/W fue la más efectiva en sensibilizar el sistema T a la reestimulación viral *in vitro* (test de linfoproliferación). A los 6 dpv el 90% de los bovinos inoculados con esta formulación mostraron linfoproliferación positiva, frente al 50% de los otros dos grupos. La respuesta positiva en TLP generada por la vacuna 1 se mantuvo en el 50% de los animales hasta los 76 dpv, mientras que tanto en la vacuna 2 (formulado con Avridine) como en la 3 (convencional) sólo el 20% de los bovinos presentaron linfoproliferación positiva en ese tiempo.

Al momento de la segunda revacunación (226 dpv) sólo el 10 % de los bovinos de cada vacuna presentaron linfoproliferación positiva. Las 3 vacunas mostraron un incremento significativo a los 234 dpv (7 días después de la segunda revacunación) presentando un 50% de bovinos positivos en el grupo vacunado con la vacuna 1 (formulada con SL-CD/S/W) mientras que sólo el 20% de los animales que recibieron la vacuna 2 (formulada con Avridine) ó la 3 (convencional) fue positivo en TLP (Fig. 17).

A lo largo de la experiencia no se registró TLP positivo al antígeno viral en ninguno de los dos grupos controles vacunados con los adyuvantes sin antígeno viral.

Al comparar los porcentajes de animales positivos, se observa que en el inicio de la experiencia, el grupo vacunado con la vacuna formulada con aceite no mineral SL-CD/S/W (grupo 1) supera significativamente a los otros dos vacunados con aceite mineral con y sin Avridine (grupos 2 y 3 respectivamente) (90% vs 50%) ($p < 0,07$). La superioridad del porcentaje correspondiente a la vacuna 1 se repite en las revacunaciones ($p:0,17$) (aunque por el número de individuos de la muestra ($n=10$) esta diferencia no alcanza a ser significativa).

Cabe destacar que los bovinos que no fueron vacunados utilizados como controles negativos no desarrollaron anticuerpos así como tampoco respuesta inmune celular a lo largo del período de estudio (pre-desafío), tal como ocurrió con los grupos de bovinos utilizados como control de adyuvante. Esto corrobora el hecho de adjudicar el aumento tanto en el nivel de anticuerpos como de RIC a la vacunación recibida por los animales y no a una posible infección natural.

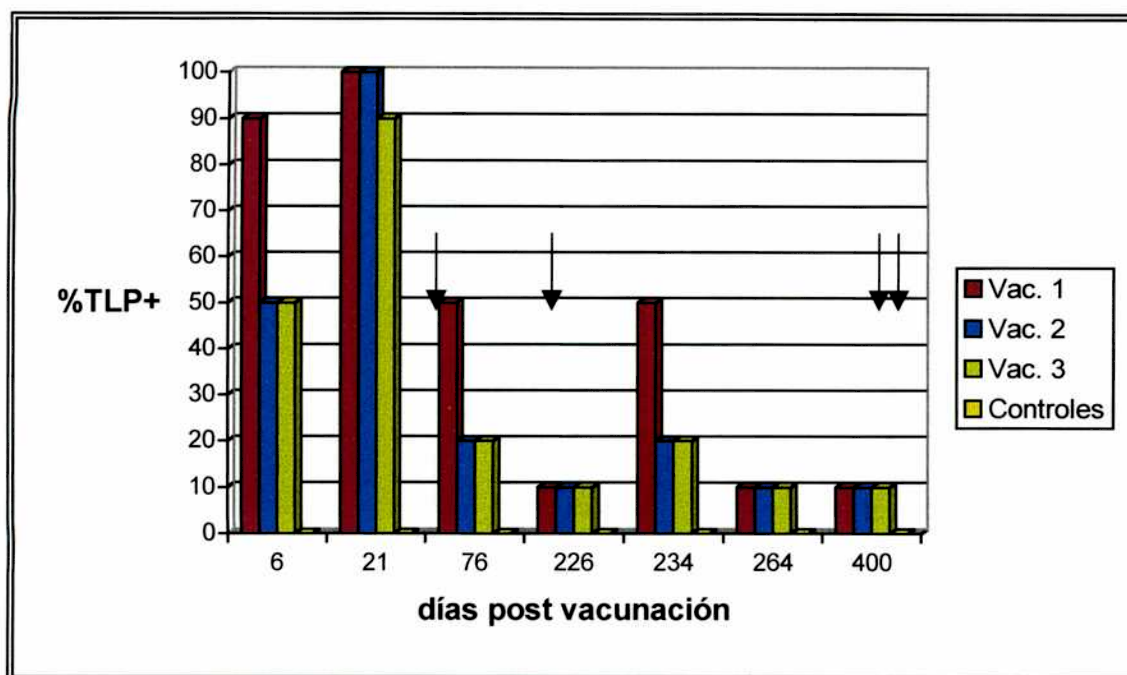


Fig. 17. Porcentaje de animales con TLP+ (IE>3) después de la vacunación y subsecuente desafío.
 ↑ Revacunación ↑↑ . Desafío.

3.3. Protección conferida por las distintas vacunas frente al desafío viral.

Con el propósito de estudiar la protección conferida por las distintas vacunas se realizó un ensayo controlado de desafío viral.

Aproximadamente un año después de la primera vacunación (400 dpv) fue evaluada la eficacia de las vacunas en una experiencia controlada de desafío viral. Se intentó repetir las condiciones en que se encuentran los bovinos en el campo. A los 400 dpv los niveles de anticuerpos eran bajos al igual que la inmunidad celular.

Previamente al desafío, los animales fueron clínicamente evaluados en cuanto a su estado general y se les tomó la temperatura para establecer los valores basales. Para poder controlar bien la experiencia se trabajó sólo con 5 de los 10 bovinos de cada grupo de animales vacunados, seleccionados al azar, y diez bovinos controles seronegativos a HVB-1. Fue necesario trabajar con mayor número de animales negativos a HVB-1 para evidenciar claramente las respuestas provocadas por el desafío viral, ya que en este tipo de infecciones las vacunas no confieren una total protección y ésta se define en términos de disminución de síntomas clínicos, títulos y período de

excreción viral con respecto a bovinos controles no vacunados. Los animales fueron desafiados con $10^{7,5}$ DICT₅₀/ml (2 ml en cada nostril) de la cepa virulenta LA de HVB-1. La infección por aerosol mediante nebulizador fue efectiva ya que se logró inducir en los animales controles los síntomas típicos observados en infecciones experimentales.

3.3.1. Evaluación de signos clínicos

Se evaluaron, luego del desafío viral los signos clínicos típicos en infecciones por HVB-1.

3.3.1.1. Temperatura

Luego del desafío la temperatura corporal de los animales vacunados se mantuvo con una media de 38°C.

Sólo en tres bovinos del grupo control se registraron temperaturas superiores a 40°C entre los 4 y 6 dpd (Fig. 18 a,b,c,d).

Aunque en muchos trabajos se registraron aumentos de la temperatura corporal luego de infecciones experimentales, nuestros resultados concuerdan con lo observado por otros autores (Moraga, 1990; Bosch, 1997) quienes sostienen que el pico de excreción viral no siempre va acompañado de un aumento de la temperatura corporal.

3.3.1.2. Tipo de secreción nasal

Se evaluó el tipo de secreción nasal descargada por los animales vacunados y los animales controles sin vacunar, luego del desafío con $10^{7.5}$ DICT₅₀/ml de la cepa LA de HVB-1- Comparación entre las vacunas.

La examinación clínica reveló lesiones características de necrosis y descarga nasal producto de la rinitis producida en la mucosa respiratoria. Para evaluar el tipo de secreción nasal observada en cada animal, se estableció la siguiente escala de severidad de la rinitis: (0) ausencia de rinitis ; (+) rinitis leve y serosa y (++) rinitis severa y sero-mucosa.

Las distintos tipos de descarga nasal en los grupos experimentales se muestran en la tabla 1. Los primeros síntomas se observaron a partir del día 4, caracterizados por la presencia de una rinitis bilateral serosa que fue aumentando en severidad y que, en el día 8, se tornó sero-mucosa, retornando a la normalidad a los 14 dpd aproximadamente.

Los bovinos controles estuvieron muy afectados por la infección experimental presentando una mayor cantidad de animales rinitis severa y sero-mucosa (Tabla 1).

0				
Vacuna/dpi	4	8	12	14
Vacuna 1	0	0	40	60
Vacuna 2	0	0	20	60
Vacuna 3	20	0	0	40
Controles	0	0	10	40

+				
Vacuna/dpi	4	8	12	14
Vacuna 1	60	80	40	40
Vacuna 2	60	60	80	40
Vacuna 3	40	60	60	60
Controles	40	30	30	60

++				
Vacuna/dpi	4	8	12	14
Vacuna 1	40	20	20	0
Vacuna 2	40	40	0	0
Vacuna 3	40	40	40	0
Controles	60	70	60	0

Tabla 1. Porcentaje de animales vacunados y controles con secreción nasal luego del desafío viral con HVB-1. Intensidad de la secreción: O: ausente; +: leve y serosa; ++: severa y sero-mucosa.

Los bovinos vacunados con SL-CD/S/W al día 8pd (día en que se registraron los síntomas más severos) difieren significativamente ($p < 0.07$) en la rinitis sero-mucosa secretada con respecto a los controles sin vacunar (20% versus 70%, respectivamente) (Fig. 19).

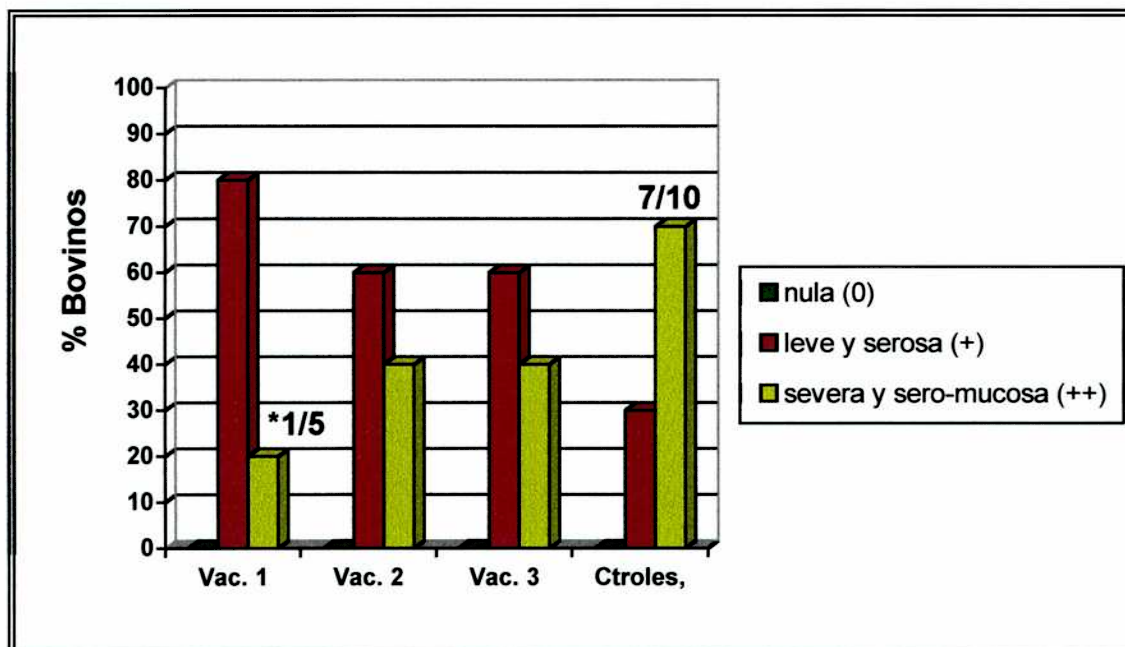


Fig. 19. Porcentaje de animales vacunados y controles sin vacunar con secreción nasal a los 8 dpi. Intensidad de la secreción: O: ausente; +: leve y serosa; ++: severa y sero-mucosa.

* ($p < 0.07$).

3.3.1.3. Lesiones vaginales

Durante los 18 días siguientes al desafío, las hembras fueron examinadas para evaluar la presencia de lesiones vaginales. A los 11 dpd se observó una fuerte secreción vaginal y pústulas blancas en 3 de las hembras involucradas en la experiencia de desafío (Foto 3). Se realizaron hisopados de las secreciones vaginales y se inocularon sobre monocapas de MDBK para evaluar la presencia de virus. Solo de una de las hembras (que pertenecía al grupo control) se aisló HVB-1. Sin embargo, no fue posible aislar el virus en sangre, debido posiblemente a que en el día 11 pd ya se había superado la viremia. En un trabajo realizado por Kit y col. (1986) con una vacuna timidina kinasa negativa (TK⁻), solo se pudo aislar virus desde el "buffy coat" de un bovino a los 6 y 7 dpi. No se descarta que este aislamiento se deba a una infección local producto de contacto directo.

3.3.2. Aislamiento Viral.

3.3.2.1. Aislamiento viral en cultivos celulares.

Se evaluó la presencia de virus en los hisopados nasales por pasaje de éstos en cultivos celulares de MDBK. Comparación entre vacunas

Se tomaron muestras de secreciones nasales durante los 18 días siguientes al desafío. Los resultados presentados en la Fig. 20 corresponden a los títulos virales excretados luego del desafío viral por 10 bovinos controles sin vacunar y 15 bovinos vacunados (cinco de cada grupo de vacunados).

Fue posible detectar virus desde el día 4 pd.

En la Fig. 20 se muestran los títulos virales detectados en la secreciones nasales de los animales pertenecientes a los distintos grupos. En contraste con lo que ocurrió con el grupo control en que se aisló virus de todos los animales desafiados sólo se logró aislar virus de algunos de los animales vacunados.

Del grupo de animales vacunados con SL-CD/S/W se aisló virus en 3 de 5 animales desafiados (60%). El animal 644 excretó virus por un período de 4 días y el mayor nivel de excreción lo presentó a los 4 dpd ($10^{2.5}$ DICT_{50/ml}), luego descendió a niveles de $10^{1.25}$ DICT_{50/ml} a los 6 dpd y 8 dpd no detectándose virus a partir del día 11 pd.

En el bovino 643 se detectó virus a partir de los hisopados nasales correspondientes al día 8pi, con un título de $10^{2.75}$ DICT_{50/ml}, manteniéndose este nivel de excreción hasta el día 15 y descendiendo a $10^{0.66}$ DICT_{50/ml} a los 18 dpd.

En el bovino 665 se detectó virus a partir de los 4 dpd con niveles de $10^{2.25}$ DICT_{50/ml} elevándose el título de excreción viral a los 6 dpd a $10^{3.5}$ DICT_{50/ml} y observándose el pico a los 8 dpd (10^4 DICT_{50/ml}) para descender luego a $10^{0.66}$ DICT_{50/ml} a los 11 dpd.

En los bovinos 669 y 670 no fue posible aislar virus cuando se realizaron las inoculaciones de los hisopados de secreciones nasales en cultivos celulares.

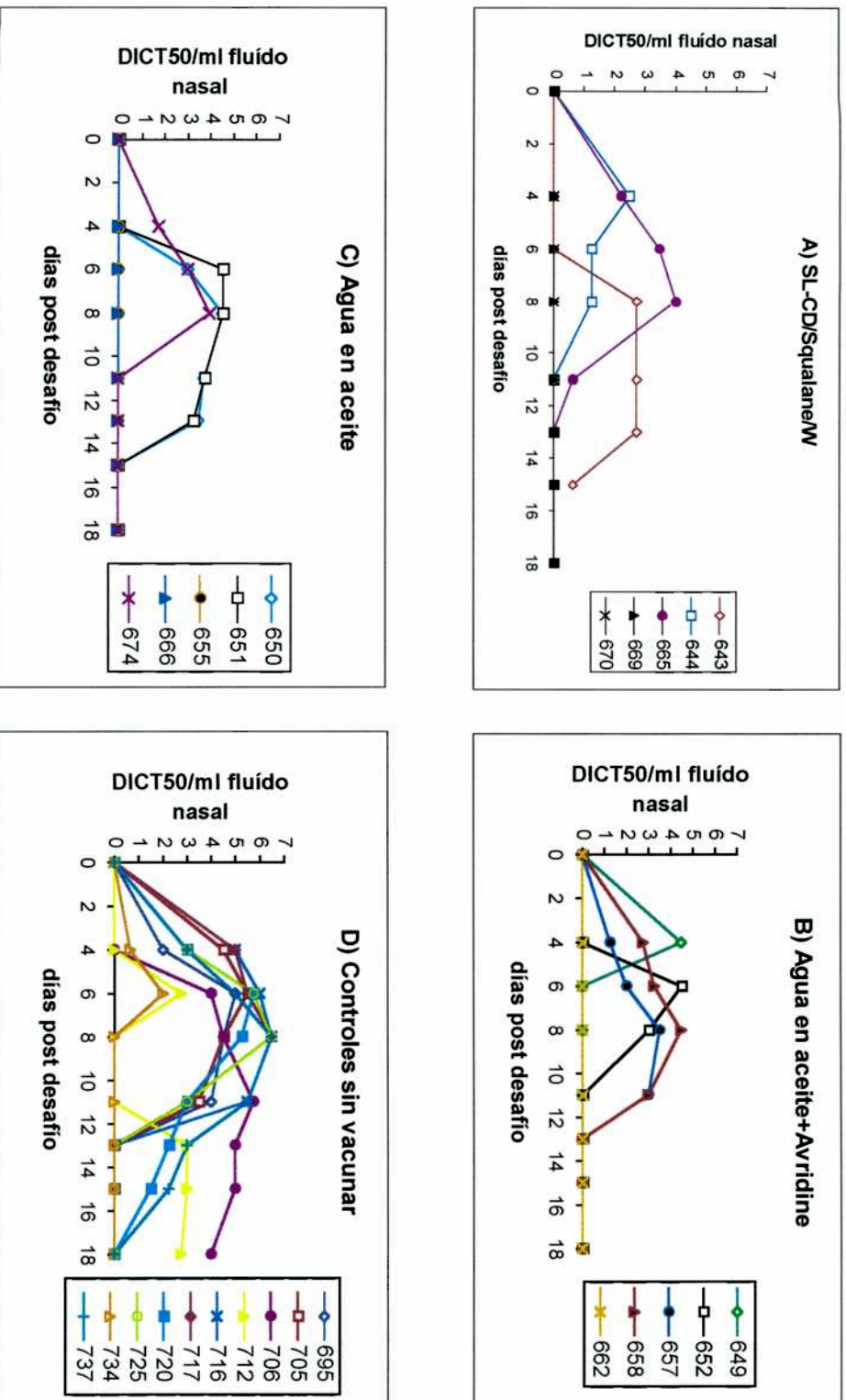
En general, podemos decir que en los bovinos vacunados con la formulación conteniendo SL-CD/S/W sólo hubo niveles detectables de excreción viral en 3 de los 5 bovinos del grupo, dos de ellos excretaron virus por un período de 7 días y el restante durante 4 días y sólo uno de ellos llegó a nivel de 10^4 DICT_{50/ml} a los 8dpd, los restantes tuvieron títulos máximos de $10^{2.75}$ DICT_{50/ml} entre los 8 y 13 dpd y $10^{2.25}$ DICT_{50/ml} (a

los 4 dpd). Este grupo excretó en promedio significativamente menores niveles de virus que los controles sin vacunar (Fig. 21a).

En el grupo de bovinos que recibió la vacuna convencional también excretaron 3 de los 5 bovinos en estudio, pero 2 de ellos eliminaron mayores niveles de virus que los vacunados con SL-CD/S/W, como es el caso del 650 en el que se detectó virus a partir de los hisopados nasales del día 6 con títulos de 10^3 DICT_{50/ml}, llegando el pico de excreción a los 8 dpd con un título de $10^{4.5}$ DICT_{50/ml} y descendiendo a $10^{3.75}$ DICT_{50/ml} y $10^{3.5}$ DICT_{50/ml} a los 11 y 13 dpd respectivamente. Un comportamiento similar se observó con las muestras del bovino 651, detectándose virus a partir del día 6 pd con un título de $10^{4.5}$ DICT_{50/ml}, manteniéndose este nivel de excreción hasta los 8 dpd y descendiendo a $10^{3.75}$ DICT_{50/ml} y $10^{3.25}$ DICT_{50/ml} a los 11 y 13 dpd respectivamente. En el bovino 674, comenzó a detectarse virus a partir del día 4 pd con niveles de $10^{1.75}$ DICT_{50/ml} elevándose luego a 10^3 DICT_{50/ml} a los 6 dpd y llegando al mayor nivel (10^4 DICT_{50/ml}) a los 8 dpd. En los bovinos 655 y 666 no se aisló virus en los pasajes en cultivos celulares en todo el período de estudio. Este grupo, si bien excretó menores niveles de virus que los animales controles sin vacunar, no alcanzó a diferenciarse de este grupo (Fig. 21b).

En el grupo de animales vacunados con vacuna viral conteniendo Avidine, 4 de los 5 bovinos excretaron virus y 3 de ellos con niveles máximos de $10^{4.5}$ DICT_{50/ml}. En el caso del bovino 649 solo pudo detectarse excreción viral a partir del hisopado del día 4 pd con un título de $10^{4.5}$ DICT_{50/ml}. En el bovino 652 se aisló virus a partir del día 6 pd con título de $10^{4.5}$ descendiendo a los 8 dpd a 3 DICT_{50/ml}. En el caso del bovino 658 se detectó virus a partir del día 4 pd con niveles de $10^{2.75}$ DICT_{50/ml} aumentando luego a niveles de $10^{3.25}$ DICT_{50/ml} y $10^{4.5}$ DICT_{50/ml} a los 6 y 8 dpd respectivamente y descendiendo a 10^3 DICT_{50/ml} a los 11 dpd. En el bovino 657 también se detectó virus a partir del día 4 pd con niveles de $10^{1.25}$ DICT_{50/ml} ascendiendo, luego, a 10^2 DICT_{50/ml} y $10^{3.5}$ DICT_{50/ml} a los 6 y 8 dpd respectivamente para descender a los 11 dpd a 10^3 DICT_{50/ml}. No se hallaron niveles detectables de virus en los hisopados nasales inoculados en cultivos celulares del bovino 662. Los niveles de virus excretados en este grupo no se diferenciaron significativamente de los niveles del grupo control (Fig. 21c).

Figura 20. Excreción viral en bovinos vacunados y controles sin vacunar. La cantidad de virus presente en secreciones nasales después del desafío fue expresada como $DICT_{50}$ por ml de fluido nasal.



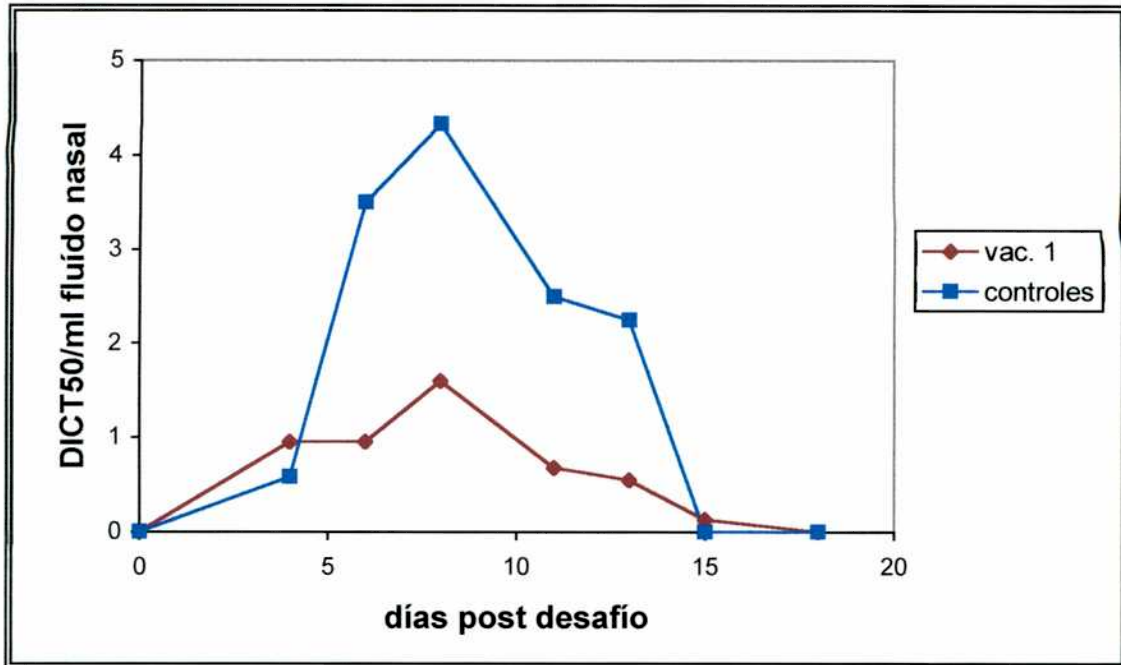


Fig. 21 a. Promedio de los títulos virales excretados por los animales vacunados con SL-CD/S/W en comparación con el promedio de los títulos virales excretados por los animales controles.

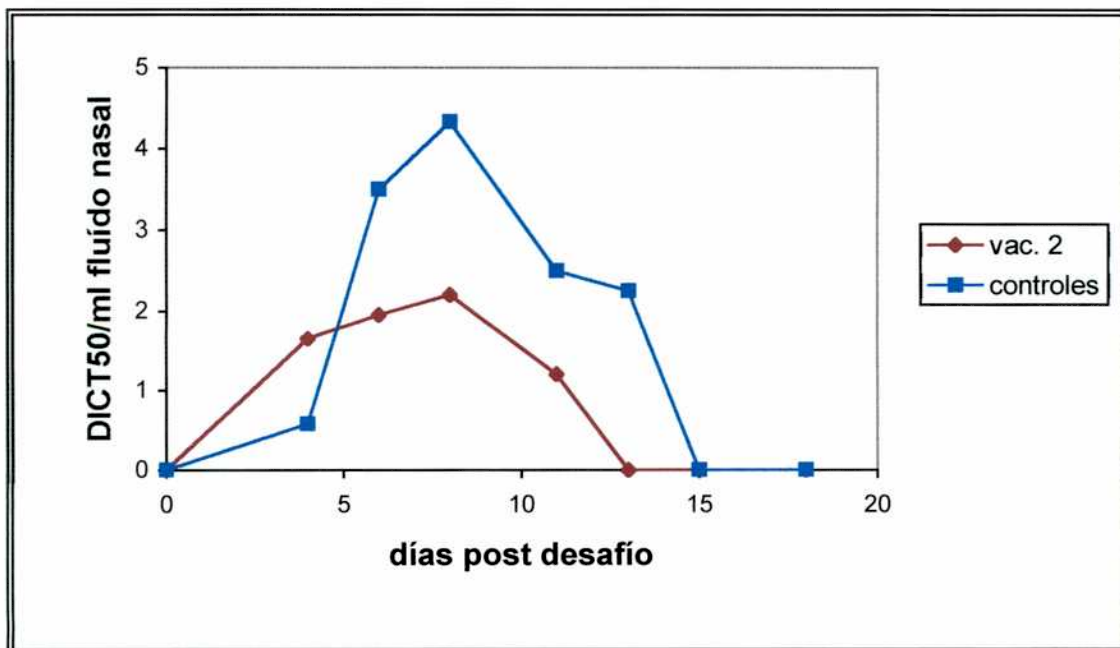


Fig. 21 b. Promedio de los títulos virales excretados por los animales vacunados con vacuna con aceite mineral más Avridine en comparación con el promedio de los títulos virales.

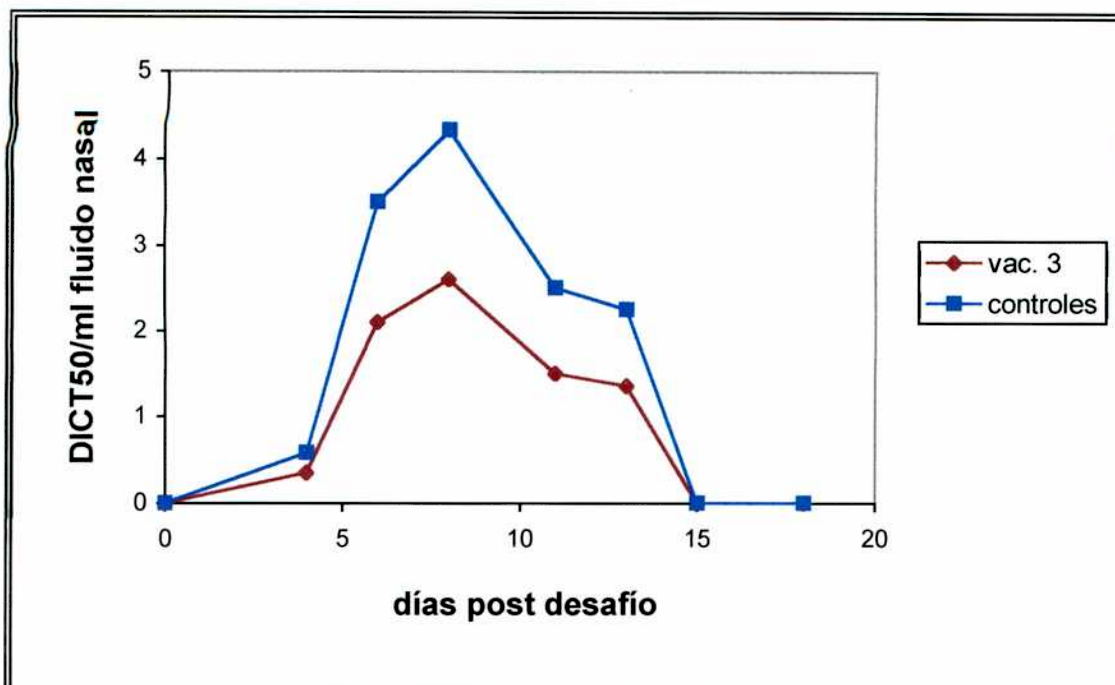


Fig. 21 c. Promedio de los títulos virales excretados por los animales vacunados con vacuna con aceite mineral en comparación con el promedio de los títulos virales excretados por los animales controles.les excretados por los animales controles.

Todos los animales del grupo control presentaron partículas virales en las secreciones nasales. En 4 de ellos se detectaron niveles máximos de excreción a los 8 dpd ($10^{6.5}$ DICT_{50/ml}). Otros dos bovinos (706 y 720) excretaron niveles máximos a los 11 y 6 dpd respectivamente con títulos de $10^{5.75}$ DICT_{50/ml}. Los bovinos 695 y 705 excretaron niveles de 10^5 DICT_{50/ml} y $10^{5.5}$ DICT_{50/ml} respectivamente a los 6 dpd. Sólo 2 bovinos (712 y 734) tuvieron títulos menores al resto en los picos de máxima excreción (10^3 DICT_{50/ml} y 10^2 DICT_{50/ml} respectivamente, a los 13 y 6 dpd).

Cuando se analizó luego de la descarga viral, el promedio de la máxima excreción viral registrada por cada grupo de bovinos inmunizados con las 3 diferentes vacunas (Tabla 2c) y el tiempo máximo promedio de excreción (Tabla 2d), se vió que sólo el grupo tratado con la vacuna 1 (SL-CD/S/W) presentó valores significativamente menores de excreción máxima promedio que el grupo control. Cuando comparamos al grupo vacunado con SL-CD/S/W con los grupos vacunados con el aceite mineral las diferencias no llegan a ser significativas. Tampoco hay diferencias significativas entre los grupos inmunizados con aceite mineral y el grupo control. En cuanto al período de

excreción viral, éste fue significativamente mayor en los animales del grupo control sin vacunar que en los vacunados (Tabla 2d).

	(a) Títulos de anticuerpos neutralizantes	(b) Títulos de anticuerpos totales	(c) Títulos de virus excretado	(d) Días de excreción viral
Vacuna 1	0.54	3.1	1.9	4
Vacuna 2	0.88	3.3	3.4	4
Vacuna 3	1.16	3.9	2.6	4.2
control	0.5	0.5	5.2	9.3

Tabla 2. Correlación entre títulos de ELISA , títulos seroneutralizantes y excreción viral (título y período de excreción) en bovinos vacunados y controles, desafiados intranasalmente con HVB-1 a los 400 días post-vacunación.

(a): Títulos de anticuerpos neutralizantes a los 400 dpv.

(b): Títulos de anticuerpos totales medidos por ELISA a los 400 dpv.

(c): Títulos de virus excretado (expresado como el promedio por grupo de los máximos títulos alcanzados por cada animal) luego del desafío con HVB-1.

(d): Días de excreción viral (expresado como el promedio por grupo de los días en que se detectó excreción viral).

Los mayores títulos virales se presentaron en general a los 8 dpd, momento en el que también se observaron los mayores síntomas clínicos.

Tomando en conjunto los resultados descriptos previamente, se observa que los animales vacunados con SL-CD/S/W excretaron a los 8 dpd (momento en que se registraron los mayores síntomas) significativamente menores títulos ($p < 0.05$) (Fig. 22) y tuvieron significativamente menor porcentaje ($p < 0.07$) de bovinos con rinitis severa a los 8 dpd que los animales controles sin vacunar (Fig. 19).

Todos los bovinos se recuperaron de la enfermedad entre los 15 y 18 dpd, momento en que dejó de observarse descarga nasal y en el que no se detectó virus en las secreciones nasales.

Para evitar cualquier brote en el campo se mantuvo a los bovinos de la experiencia durante 40 días en un campo de aislamiento. Durante este período se continuó con la evaluación clínica y la toma de muestras de sangre para serología.

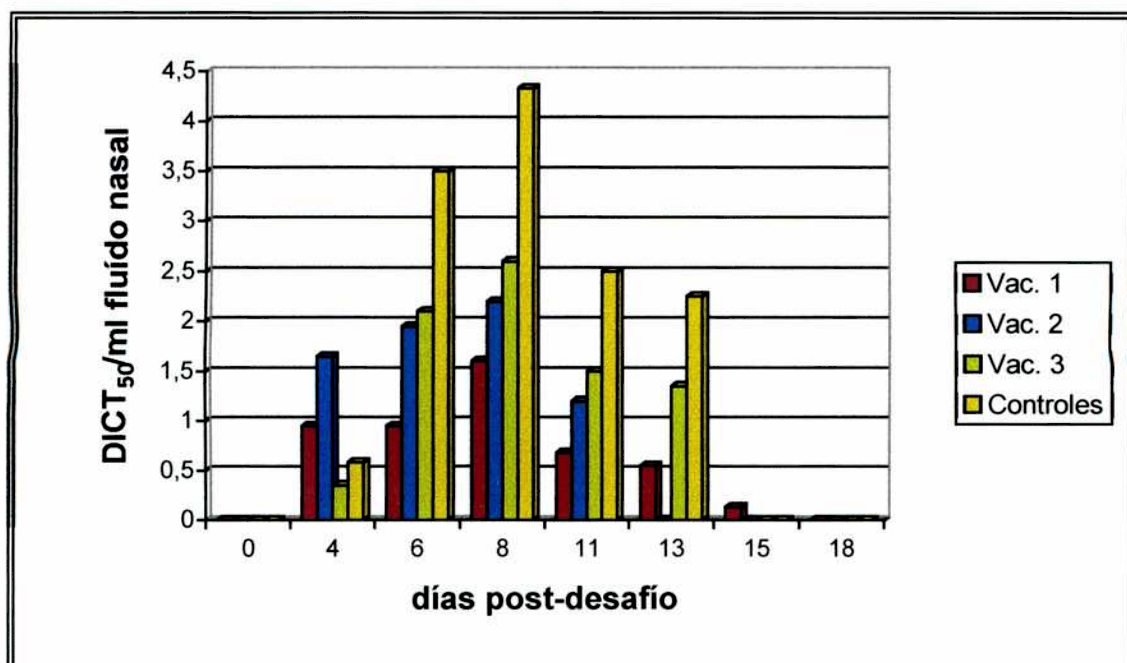


Fig.22. Promedio de los títulos virales excretados por animales vacunados y controles sin vacunar luego del desafío viral.

3.3.2.2. Detección de DNA de HVB-1 por PCR en muestras de secreciones nasales.

Se realizó el ensayo de PCR sobre las muestras que resultaron negativas al aislamiento viral en cultivos celulares y a una muestra que resultó positiva, como control positivo de la prueba.

Todas las muestras de los distintos días post infección de los bovinos 662, 655, 666 y 669 analizadas por PCR resultaron negativas. En estos bovinos tampoco se aisló virus a partir de los pasajes en cultivos celulares en todo el período de estudio.

Sin embargo, la PCR realizada a los hisopados del bovino 670, que habían resultado negativas al aislamiento viral en cultivos celulares, resultó positiva. La discrepancia entre estos resultados posiblemente se deba a que los niveles de excreción de este animal fueron tan bajos que no fue posible aislarlo en cultivos celulares o bien se trataba de partículas defectivas inviables en cuanto a la infectividad.

La muestra que había resultado positiva al aislamiento viral en cultivos celulares resultó positiva por PCR, de acuerdo a lo esperado.

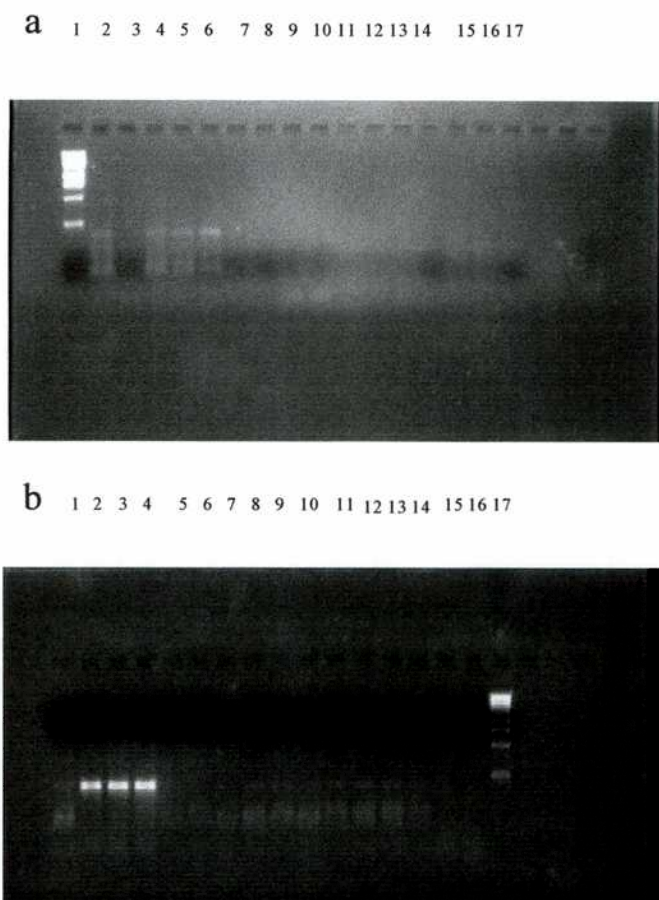


Foto 5. Productos de amplificación por PCR de muestras de bovinos que resultaron negativos al aislamiento viral en cultivos celulares analizados en un gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio. La calle 1 de la figura a corresponde al marcador de peso molecular, calle 2 control (+) de PCR, las calles 3,4,5,6,7 corresponden a las muestras de los 3,6,8,11 y 15 dpd del bovino 716 (vírgen desafiado), las calles 8,9,10,11,12 corresponden a las muestras de los 3,6,8,11 y 15 dpd del bovino 669 (bovino vacunado con vacuna 1 (HVB-1 inactivo + SL-CD/S/W), las calles 13,14,15,16,17 corresponden a las muestras de los 3,6,8,11 y 15 dpd del bovino 666 (bovino vacunado con vacuna 3 (HVB-1 inactivo + adyuvante oleoso INTA), las calles 1,2,3,4,5 de la figura b corresponden a las muestras de los 3,6,8,11 y 15 dpd del bovino 670 (bovino vacunado con vacuna 1 (HVB-1 inactivo + SL-CD/S/W) las calles 6,7,8,9,10 corresponden a las muestras de los 3,6,8,11 y 15 dpd del bovino 655 (bovino vacunado con vacuna 3 (HVB-1 inactivo + adyuvante oleoso INTA) las calles 11,12,13,14,15 corresponden a las muestras de los 3,6,8,11 y 15 dpd del bovino 662 (bovino vacunado con vacuna 2 (HVB-1 inactivo + Avridine en adyuvante oleoso INTA) la calle 16 corresponde al control (-) de PCR y la calle 17 al marcador de peso molecular.

3.3.3. Cinética de anticuerpos totales en suero

Cinética de anticuerpos totales desarrollada por animales vacunados y controles sin vacunar luego del desafío viral

En el momento en que se decidió realizar el desafío los niveles de anticuerpos totales de los bovinos vacunados habían descendido a valores que oscilan entre 3,14 y 3,93. Estos niveles de anticuerpos estaban más cercanos a los niveles que podrían encontrarse en las poblaciones vacunadas a campo que aquéllos alcanzados inmediatamente después de las revacunaciones. De esta manera se logró simular condiciones que se aproximaban a la de la realidad del campo ante una infección.

Luego del desafío los bovinos vacunados desarrollaron una clara respuesta inmune secundaria, observándose un importante incremento (aproximadamente de dos logaritmos) en el nivel de anticuerpos totales en suero, registrándose entre los 11 y 21 dpd los mayores títulos (5,27-5,84). En cambio, en los bovinos controles los anticuerpos aparecieron alrededor del día 6 pd (tiempo que llevó montar la respuesta inmune primaria contra el virus). Una vez desencadenada la respuesta inmune humoral los animales no vacunados tuvieron los mayores niveles (5,53) a los 40 dpd (Fig. 23).

Las respuestas post-desafío desarrolladas por los grupos que recibieron las distintas vacunas no difieren significativamente entre sí, pero sí con los controles sin vacunación previa (Fig. 23). SEM: 0,21.

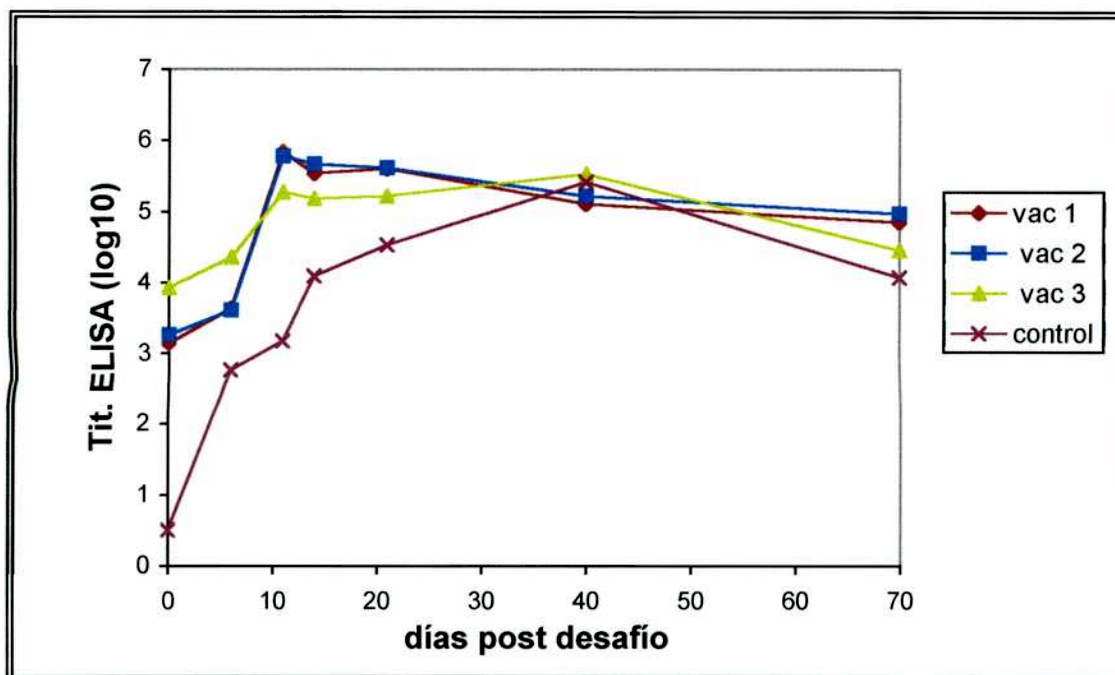


Fig. 23. Cinética de anticuerpos anti-HVB-1 post desafío de bovinos vacunados con: vacuna 1 (HVB-1 inactivo +SL-CD/S/W); vacuna 2 (HVB-1 inactivo +Avidine en Adyuvante oleoso INTA) ; vacuna 3 (HVB-1 inactivo + Adyuvante oleoso INTA) y bovinos controles. SEM: 0.21.

3.3.3.1 Correlación estadística entre niveles de anticuerpos y niveles de excreción viral

Para evaluar el rol de los anticuerpos totales en la protección frente al desafío viral se analizó la correlación estadística entre niveles de anticuerpos y niveles de excreción viral

Dada la importancia de analizar la relación entre niveles de anticuerpos y protección (tomándose este último parámetro como promedio por grupo de excreción viral máxima y como máximo período de excreción) se estudió la correlación entre estas variables.

Los resultados indican que habría una asociación inversa entre anticuerpos totales medidos por ELISA y excreción viral máxima (a mayores títulos de anticuerpos medidos por ELISA menores niveles de excreción viral), medida a través de $r=-0,59^*$ ($p<0,01$) y entre anticuerpos totales y período máximo de excreción, medido a través de un $r= -0,65$ ($p<0,01$) (Tabla 2).

3.3.4. Perfil isotípico de anticuerpos en suero

Perfil isotípico desarrollado en animales vacunados y controles sin vacunar luego del desafío viral. Influencia de los inmunomoduladores.

Luego del desafío viral se evidencia un incremento significativo en los títulos de ambas inmunoglobulinas que se extiende hasta los 21 dpd alcanzando niveles de 4,78-5,44 para la IgG₁ (SEM= 0,17), y de 4,81-4,91 para la IgG₂ (SEM= 0,21). No se observaron diferencias en los niveles de anticuerpos inducidos por las diferentes vacunas pero los grupos vacunados sí difieren del grupo control en todo el período estudiado (Fig. 24 a y 24 b).

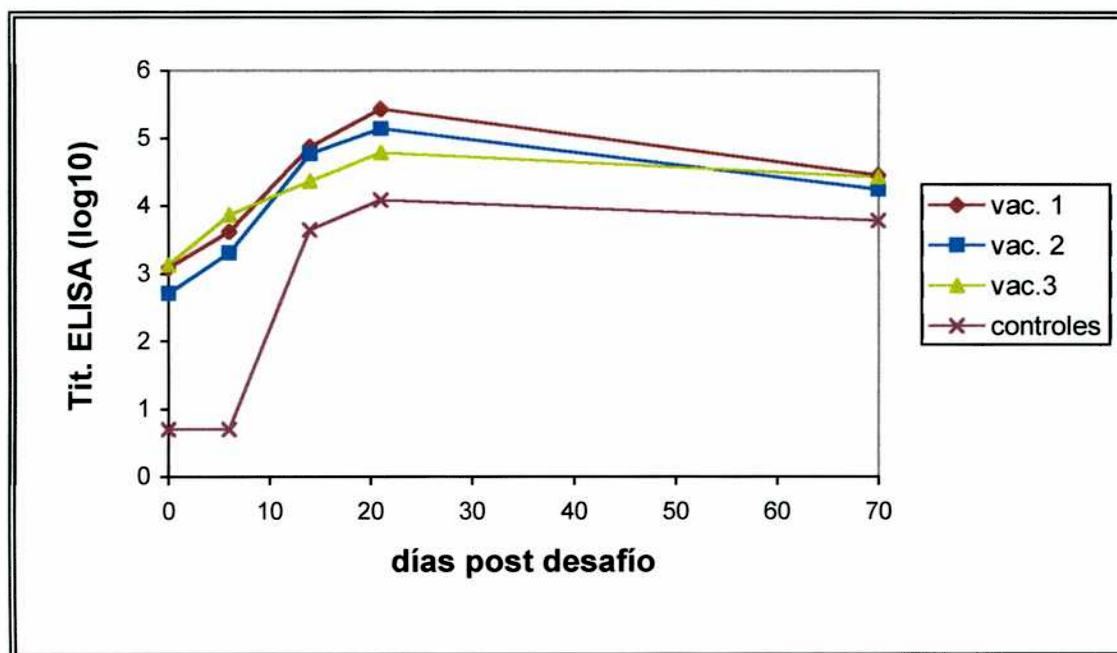


Fig. 24 a. Cinética de anticuerpos IgG1 anti-HVB-1 post desafío de bovinos vacunados con: vacuna 1 (HVB-1 inactivo +SL-CD/S/W); vacuna 2 (HVB-1 inactivo +Avidine en Adyuvante oleoso INTA) ; vacuna 3 (HVB-1 inactivo + Adyuvante oleoso INTA) y bovinos controles. SEM: 0.17.

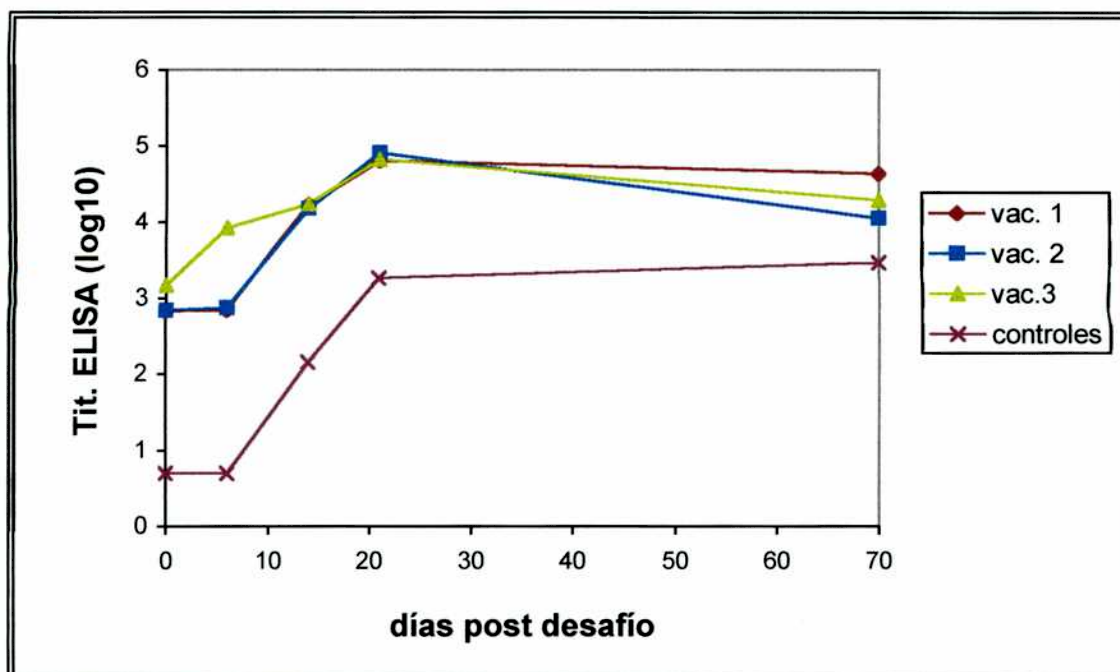


Fig. 24 b. Cinética de anticuerpos IgG2 anti-HVB-1 post desafío de bovinos vacunados con: vacuna 1 (HVB-1 inactivo +SL-CD/S/W); vacuna 2 (HVB-1 inactivo +Avridine en Adyuvante oleoso INTA) ; vacuna 3 (HVB-1 inactivo + Adyuvante oleoso INTA) y bovinos controles. SEM: 0.21.

3.3.4.1. Relación IgG₂/IgG₁ en tiempos post-desafío.

En los días post-desafío se mantienen los niveles de IgG₂ en los animales vacunados. En los animales controles se registró un aumento en la relación entre los 14 y 21 días y este incremento se debería a aumentos de los niveles de IgG₂ en este período (Fig. 25).



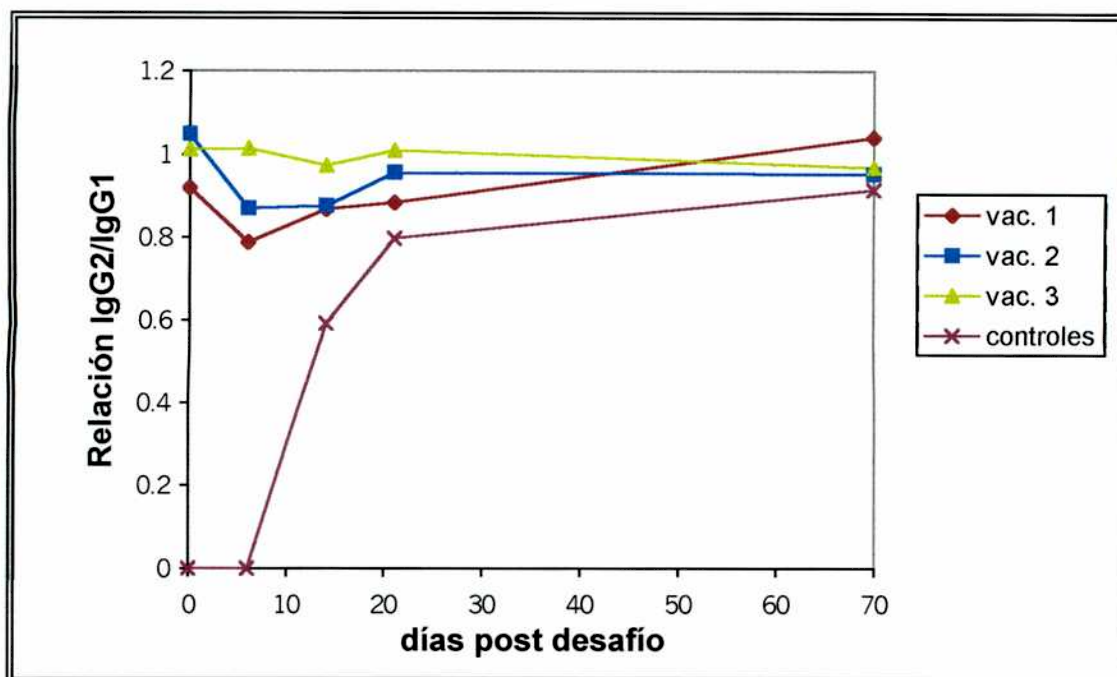


Fig. 25. Relación IgG₂/IgG₁ post desafío de bovinos vacunados con: vacuna 1 (HVB-1 inactivo +SL-CD/S/W); vacuna 2 (HVB-1 inactivo +Avridine en Adyuvante oleoso INTA) ; vacuna 3 (HVB-1 inactivo + Adyuvante oleoso INTA) y bovinos controles.

3.3.4.2. Rol de la subclase IgG₂ en la protección.

Con el objeto de estudiar la existencia de correlación entre la relación IgG₂/IgG₁ y protección se agruparon los animales en dos grupos independientemente de la formulación recibida. Estos grupos quedaron comprendidos por animales que al momento del desafío presentaban valores ≥ 1 o < 1 , de la relación IgG₂/IgG₁. Se pudo observar que el grupo de animales que presentaron niveles de la relación IgG₂/IgG₁ ≥ 1 presentó un porcentaje significativamente menor de animales con excreción viral luego del desafío y significativamente menor promedio de días con excreción viral ($p < 0,01$) (Tabla 3).

IgG ₂ /IgG ₁	Bovinos con excreción viral	Título viral	Días de excreción viral
> 1	2/7 (28,57%)	1.2 (0-4.5)	1.57 (0-2)
< 1	8/8 (100%)	3.84 (2.5-4.5)	5.25 (1-7)

Tabla 3. Excreción viral (título y período de excreción) y su correlación con la relación IgG₂/IgG₁ detectada en suero a los 400 dpv.

3.3.5. Cinética de anticuerpos neutralizantes en suero

Cinética de anticuerpos neutralizantes desarrollada por animales vacunados y controles sin vacunar luego del desafío viral

Al momento del desafío, los niveles de anticuerpos neutralizantes en los animales vacunados se encontraban entre 0,5 y 1,16. A partir de este momento comenzaron a aumentar registrándose los mayores títulos (entre 2,5 y 2,95) entre los 11 y 14 dpd.

En los bovinos controles los anticuerpos neutralizantes aparecieron más tarde (alrededor del día 14 pd) y alcanzaron sus mayores niveles, alrededor de 1,5, entre los 21 y 40 dpd. (Fig. 26).

En el período post-desafío, los grupos de animales vacunados se diferenciaron del grupo control sin vacunar, pero no hubo diferencias entre sí (SEM= 0,17).

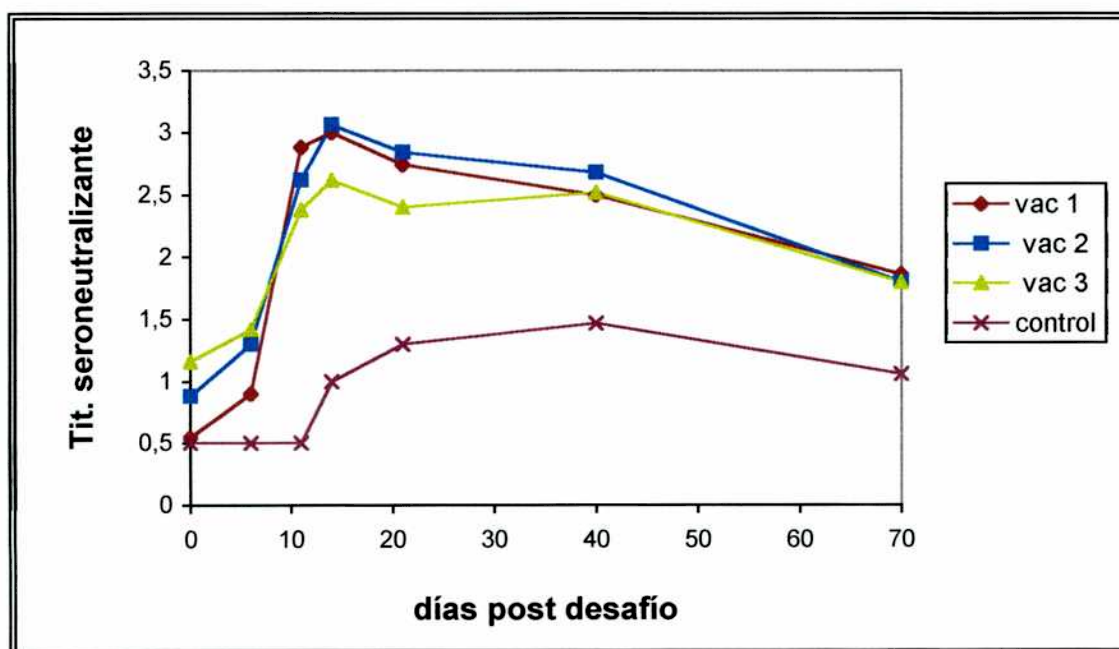


Fig. 26. Cinética de anticuerpos neutralizantes anti-HVB-1 post desafío de bovinos vacunados con: vacuna 1 (HVB-1 inactivo +SL-CD/S/W); vacuna 2 (HVB-1 inactivo +Avridine en Adyuvante oleoso INTA); vacuna 3 (HVB-1 inactivo + Adyuvante oleoso INTA) y bovinos controles. SEM: 0.17

3.3.5.1. Rol de los anticuerpos neutralizantes en la protección.

Con el objeto de evaluar la relación entre anticuerpos neutralizantes y protección se estudió si existía o no correlación entre ambos parámetros. En este trabajo no se encontró una correlación entre anticuerpos neutralizantes en suero y protección. Estos resultados confirman hallazgos previos (Bosch, 1996, 1997). Cabe destacar que aunque al igual que los otros dos grupos de vacunados al momento del desafío los animales vacunados con SL-CD/S/W no presentaban niveles detectables de anticuerpos neutralizantes, este grupo presentó mayor protección en comparación al resto de los animales vacunados (Tabla 2).

3.2.6. Respuesta inmune celular

Respuesta inmune celular desarrollada por animales vacunados y controles sin vacunar luego del desafío. Influencia de los inmunomoduladores.

Al momento del desafío el porcentaje de bovinos positivos al TLP fue del 10% en cada grupo de vacunados, incrementándose a valores del 100% en todos los animales vacunados y 80% en el grupo control a los 6 dpd. A los 70 dpd no se registró TLP positivo en ninguno de los bovinos estudiados (Fig. 27).

Cuando se estudió la relación entre linfoproliferación y protección no pudo detectarse correlación, así como tampoco entre linfoproliferación y niveles de anticuerpos.

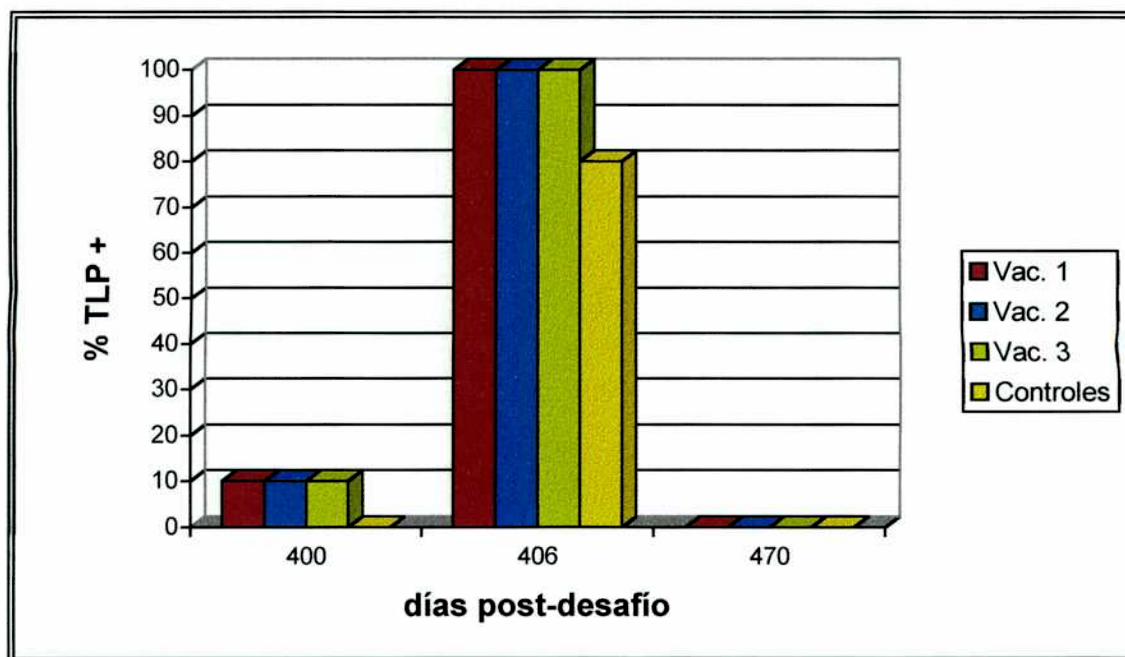


Fig. 27. Porcentaje de animales con TLP+ (I.E \geq 3) después del desafío viral.

Las vacunas inactivadas contra HVB-1 si bien tienen la ventaja de ser inocuas, son inmunogénicamente pobres por lo que necesitan de adyuvantes e inmunomoduladores para mejorar la respuesta inmune inducida (Kahrs, 1977; Lupton, 1980a; Wyler 1989).

Los mayores esfuerzos puestos en el desarrollo de vacunas inactivadas son la búsqueda y perfeccionamiento de los adyuvantes, que son sustancias que refuerzan de manera inespecífica la acción inmunogénica de los antígenos, y eventualmente, pueden favorecer, preferentemente, determinadas funciones inmunitarias. En este orden de ideas, interesan sobre todo, las sustancias tenso-activas de efecto estimulante sobre los macrófagos y los linfocitos B y T. La inmunogenicidad de vacunas inactivadas contra herpesvirus bovino 1 con distintos adyuvantes ha sido extensamente estudiada en bovinos, pero en algunos casos no han logrado aumentar eficientemente la RIC o tienen efectos adversos (ver Introducción).

Existen numerosas evidencias de que los mecanismos de defensa mediados por células T son importantes en infecciones con herpesvirus (Sin, 1999). Por tal motivo en este trabajo se usaron inmunomoduladores con conocida acción estimulante sobre la inmunidad celular (Mc Carthy y col, 1977; Knudsen y col, 1986).

Con el objeto de aumentar la inmunidad inducida por las vacunas contra HVB-1 con virus inactivo se probaron dos inmunomoduladores sintéticos SL-CD/S/W y Avridine.

En esta investigación para el estudio del efecto de los inmunomoduladores SL-CD/S/W y Avridine sobre la inmunidad se hizo un seguimiento de la respuesta inmune humoral y celular inducida en bovinos durante 400 días, comparando la eficiencia de las distintas formulaciones para conferir protección frente a la descarga con el virus. Es la primera vez que se prueban en vacunas con HVB-1 inactivo tanto la emulsión SL-CD/S/W formulada en aceite no mineral y biodegradable (condición definitiva para ser usada en los países de la Comunidad Económica Europea, en los que no se acepta el empleo de aceites minerales en vacunas para bovinos), como Avridine formulada con aceite mineral.

Se seleccionó Avridine como inmunomodulador para ser formulado con HVB-1 inactivado en una emulsión agua en aceite mineral porque Babiuk y col (1987) demostraron que trabajando con altas dosis de gI, gC y gD de HVB-1 y Avridine se induce una completa protección frente al desafío viral. Además se conoce que la inclusión de Avridine en vacunas contra FMDV formuladas con baja concentración de antígeno indujo en bovinos

los mismos niveles de anticuerpos, que las vacunas conteniendo el doble de concentración de virus y sin Avridine (Pérez y col, 1999, Sadir y col, 1999). Por otro lado, antecedentes de que Avridine promovía la inmunidad mediada por células fueron reportados por Knudsen y col. (1986), quienes encontraron altos niveles de protección en cobayos desafiados con FMDV en presencia de bajos títulos de anticuerpos, sugiriendo que la respuesta inmune protectora fue mediada por células y promovida por Avridine.

El otro inmunomodulador seleccionado fue el SL-CD/S/W, ya que en numerosos trabajos se demostró que tiene una fuerte actividad estimulante sobre la inmunidad humoral (Hilgers, 1985, 1986, 1987, 1994a, 1994b, 1999), y el dextran sulfato (compuesto básico del SL-CD/S/W) induce una alta respuesta celular en ratones y cobayos (McCarthy y col, 1977). La gran ventaja de este producto es que es biodegradable, condición indispensable en numerosos países, para que la vacuna pueda ser empleada en especies comestibles.

Se trabajó directamente en el bovino, especie blanco de HVB-1, con el objetivo de lograr una vacuna más eficaz que ayude a contrarrestar las grandes pérdidas económicas que provoca en muchos países, incluido el nuestro, el HVB .

Cuando se evaluaron los anticuerpos totales contra HVB-1 utilizando el test de ELISA, los tres grupos de vacunados desarrollaron altos niveles, no hallándose diferencias significativas entre los grupos (Fig. 9). A pesar de los antecedentes bibliográficos de la eficiencia de AVR (Pérez y col, 1999) y SL-CD/S/W (Hilgers, 1985, 1986, 1987, 1994a, 1994b, 1999) para aumentar la respuesta humoral, en este trabajo no se logró detectar un incremento en los niveles de anticuerpos en los grupos que recibieron las vacunas inmunomoduladas con respecto a la vacuna sin inmunomodulador, probablemente porque la masa viral contenida en la formulación fue suficientemente grande para generar *per se*, con dos inmunizaciones, una buena estimulación.

Cuando se evaluó la relación entre anticuerpos totales y protección, se encontró una relación inversa entre títulos de anticuerpos totales detectados por ELISA y la disminución de excreción viral (a mayores niveles de anticuerpos menor nivel de excreción) (Tabla 2). Al momento del desafío los animales vacunados con SL-CD/S/W tenían en promedio títulos de anticuerpos totales de 3,14 (Fig. 9) y este grupo se diferenció significativamente de los controles sin vacunar en los síntomas clínicos a los 8 dpd (Fig. 19) y títulos virales excretados (Fig. 21a).

Así como ocurre con otros herpesvirus, el rol de los anticuerpos neutralizantes en infecciones con HVB-1 es cuestionable ya que aparecen tarde en una infección y el virus se disemina célula a célula por puentes intercelulares (Kahrs, 1977; Rouse, 1978) antes de que las células en que se replica sean destruidas (Lodmell, 1972). En nuestra experiencia, cuando se evaluaron en bovinos los anticuerpos neutralizantes inducidos por las diferentes vacunas se vió que los niveles comenzaron a ser detectables luego de la primera revacunación realizada a los 46 dpv y tuvieron un incremento significativo luego de la segunda revacunación (Fig. 14). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Pospisil y col. (1996), quienes observaron, en animales que habían recibido vacuna inactivada contra HVB-1, un incremento significativo de los títulos a las tres semanas de la segunda vacunación, siendo 4 veces mayores que luego de la primera vacunación. Si bien los animales que recibieron la vacuna con aceite no mineral SL-CD/S/W (vacuna 1) tuvieron durante algunos períodos menores niveles de anticuerpos neutralizantes que los vacunados con las vacunas formuladas con aceite mineral con y sin Avridine (vacunas 2 y 3 respectivamente), luego se equilibraron las respuestas, no hallándose diferencias significativas en los niveles de anticuerpos neutralizantes inducidos por las tres vacunas al momento del desafío. Los anticuerpos neutralizantes luego del desafío comenzaron a incrementarse a los 6 dpd en los animales vacunados y a partir de los 14 dpi en los controles sin vacunar (Fig. 26). Estos resultados coinciden con lo observado por Nettleton y col. (1980), en experimentos realizados con una vacuna atenuada contra HVB-1. Los resultados obtenidos en el presente trabajo indicarían que no existe correlación entre los mecanismos mediados por anticuerpos neutralizantes y protección, ya que al momento del desafío los animales vacunados con SL-CD/S/W, al igual que los controles sin vacunar, no tenían niveles detectables de anticuerpos neutralizantes (Fig. 14). Sin embargo, este grupo de vacunados luego del desafío, excretó en promedio niveles significativamente inferiores de virus respecto a los controles (Fig. 21a). Estos datos estarían en concordancia con los obtenidos por el grupo de Gerber (1978) quienes demostraron que la presencia de IgG e IgA no necesariamente protege de la infección y excreción luego del desafío con HVB-1. Si bien van Drunen y col. (1994a) detectaron correlación entre anticuerpos neutralizantes y protección, Bosch y col. (1996; 1997a) no hallaron esta correlación. También se ha descrito en experimentos de inmunidad pasiva, la falta de protección frente al desafío viral

en bovinos previamente inoculados con anticuerpos neutralizantes (Marshall y col, 1988), además se ha descrito que el aislamiento de virus desde secreciones nasales, prepuciales y vaginales es independiente de los títulos de anticuerpos en suero (Snowden y col, 1965).

Por otra parte, cuando se realizó el estudio de la inmunidad celular inducida, se observó que el grupo inoculado con la formulación con SL-CD/S/W, que fue el que desarrolló menores niveles de anticuerpos neutralizantes, tuvo mayor porcentaje de bovinos con linfoproliferación positiva frente al virus (Fig. 17). Estos resultados concuerdan con lo observado por Miller-Edge (1986), que encontró una correlación negativa entre anticuerpos neutralizantes y linfoproliferación.

En este trabajo se trató de conocer si el uso de los inmunomoduladores había inducido cambios en los isotipos de inmunoglobulinas secretadas. Los perfiles de IgG desarrollados por las vacunas estudiadas son similares a los reportados por Rodak (1983), con aumentos significativos de ambas subclases luego de la revacunaciones y el desafío viral. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de IgG1 inducidos por las distintas vacunas. El perfil isotípico inducido en los tres grupos de animales vacunados es similar al inducido durante la infección con 7 diferentes cepas de HVB-1 (Madic, 1995).

Es importante destacar que independientemente de la vacuna recibida, se observó que el grupo de animales con valores de la relación IgG2/IgG1 mayores que 1 fue el que presentó mayores niveles de protección frente al desafío (menor porcentaje de animales con excreción viral y menor período de excreción) (Tabla 3). Estos resultados marcarían así una correlación entre estos dos fenómenos: el principal isotipo inducido (IgG2) y protección. Posiblemente la IgG2 participa en la protección contra la infección con HVB-1 mediante ADCC. Este mecanismo, en numerosos estudios *in vitro*, se ha citado como de importancia en relación a la protección contra el HVB-1 (Rouse, 1976; Grewal, 1977; Grewal, 1980; Thome, 1984; van Drunen Littel, 1986; Hanton, 1986; Babiuk, 1987) así como en otros herpesvirus (Stokes, 1988). A pesar de que la ADCC es un fenómeno que se comprueba *in vitro*, muchos grupos de investigación sugieren que el modelo de ADCC es un mecanismo de defensa que también ocurre *in vivo* (Rouse, 1976; Rager-Zisman, 1974). También se ha sugerido que este mecanismo tendría un rol más importante que los anticuerpos seroneutralizantes en la defensa natural contra HVB-1 (Wardley, 1976, Rouse, 1978a), dado que es bien conocido que la neutralización del virus no es el único mecanismo por

medio del cual los anticuerpos podrían controlar la infección, ya que por sí mismos no pueden destruir células infectadas. Sin embargo, pueden cooperar *in vivo* con otros componentes del sistema inmune tales como complemento, ADCC o ADCC-C (Rouse, 1976). Estos mecanismos serían de particular importancia si la destrucción ocurre antes del ensamble final de la partícula viral.

Los neutrófilos son una de las células efectoras más importantes en ensayos de ADCC que involucran células “blanco” infectadas con herpes bovino (Wardley, 1976, Rouse, 1978a). En bovinos, los neutrófilos y macrófagos (células efectoras de ADCC) poseen receptores para la subclase IgG2 (McGuire, 1979). Estudios más recientes realizados por Worku y col (1994) sobre unión y expresión de receptores para IgG2 e IgM en neutrófilos bovinos muestran que el mayor porcentaje de neutrófilos que unen IgG e IgG2 exógena indica la mayor abundancia de receptores para este isotipo y subclase en neutrófilos que para la IgM. Teniendo en cuenta que el mecanismo de ADCC participaría en la defensa contra HVB-1 sería importante la inducción de inmunoglobulinas específicas de la subclase IgG2, que fueran favorables para el desarrollo de esta modalidad de respuesta inmune. Además está descrito que el IFN γ en ratones induce a los linfocitos B a secretar IgG2 y el incremento de esta subclase en relación a IgG1 está asociado con respuesta de tipo Th1, que dirige la respuesta inmune celular (Estes, 1996; Wood, 1996). En bovinos se ha reportado que los linfocitos B también son inducidos por el IFN γ a secretar preferentemente inmunoglobulinas de la subclase IgG2 (Estes, 1994; Estes, 1996) indicando que una relación similar puede existir en el sistema inmune bovino y que la relativa proporción de IgG1 e IgG2 pueden reflejar los diferentes tipos de células T que están respondiendo (West, 1997). Aunque trabajos recientes realizados en bovinos indican que la respuesta es más heterogénea y con un perfil menos definido que la observada en ratones, puede ocurrir que se desarrolle predominantemente una respuesta Th1 o Th2 dependiendo del antígeno (Brown, 1998).

En el presente trabajo, como se mencionó anteriormente, se demostró que la presencia de altos niveles de IgG2 en bovinos está relacionada con una mayor protección (Tabla 3). Esto podría reflejar la actividad de la subpoblación Th1, que además de activar macrófagos a través del incremento en la síntesis de IFN γ (Lan, 1996), secretan IL-2 e IL-12 que

promueven la actividad de células NK y células T, incrementando la respuesta citotóxica (Merberg, 1992).

Estos resultados indican que estudiar el perfil de isotipos inducido por las diferentes vacunas, además de la respuesta celular, puede ser importante cuando se evalúa la eficacia de una formulación vacunal, ya que según la estimulación deseada de la inmunidad (humoral y/o celular), ciertos adyuvantes pueden ser usados para dirigir la reactividad y aumentar la formación de una clase de inmunoglobulina, o estimular preferentemente la IMC más que la formación de anticuerpos o viceversa (Oselbod, 1982).

Como se mencionó anteriormente, dadas las numerosas evidencias de que los mecanismos de defensa mediados por células T son importantes en infecciones con herpesvirus (Rouse, 1984), en este trabajo se usaron inmunomoduladores con conocida acción estimulante sobre la inmunidad celular (Mc Carthy y col, 1977; Knudsen y col, 1986).

Los datos obtenidos en esta experiencia muestran que los linfocitos sensibilizados específicos tienen el pico de actividad entre los 5 a 10 dpd, ya que mayor porcentaje de animales resultó positivo al TLP en este tiempo (Fig. 17). Esto coincide con lo reportado por otros autores (Rouse, 1974; Gerber, 1978; Davies, 1973; Tsvetkov, 1987; Babiuk, 1996). Nosotros detectamos que los bovinos vacunados con SL-CD/S/W presentaron un porcentaje significativamente mayor de bovinos con linfoproliferación positiva a los 6 dpv (90% versus 50%) (Fig. 17) y este grupo de animales fue el más eficiente en mantener células T de memoria, ya que presentaron en general a lo largo de la experiencia mayor porcentaje de animales positivos al TLP. A su vez se pudo observar que este grupo presentó mayor porcentaje de bovinos con síntomas leves a los 8 dpd (Fig. 19) y en promedio menores niveles de excreción viral (Fig. 21a). La eficacia de SL-CD/S/W sobre la estimulación de células T podría deberse al dextran sulfato (compuesto básico del SL-CD/S/W) descrito por Mc Carthy y col. (1977) como potente estimulador de la respuesta celular en ratones y cobayos.

En este trabajo no se pudo hallar una correlación directa entre el I.E positivo individual y excreción viral o síntomas clínicos. Sin embargo, no resultó tan sorprendente, ya que está documentado que en bovinos existe una gran variabilidad en la respuesta proliferativa a HVB-1 (Miller-Edge, 1986; Rutten, 1990; Wentink, 1990). Denis y col. (1994b), demostraron con su ensayo de dilución límite de linfocitos que los animales que

presentaron mayores I.E no fueron necesariamente los que tuvieron mayores frecuencias de linfocitos T colaboradores específicos para HVB-1, ya que *in vitro* se pueden activar selectivamente, por las condiciones del cultivo, ciertos clones en preferencia de otros sin que ello implique mayor frecuencia de los mismos. Por este motivo, en este trabajo se refleja el porcentaje de bovinos dentro de cada grupo de vacunados en los que era posible inducir proliferación *in vitro* (indicando una buena sensibilización previa) y no los I.E individuales. El hecho de que mayor número de bovinos de los vacunados con SL-CD/S/W resultaran sistemáticamente positivos al TLP marcaría un perfil de mayor estimulación de la RIC por esta formulación, y dado que este grupo resultó más protegido al desafío viral (mayor porcentaje de animales con síntomas leves a los 8 dpd (Fig. 19) y menores niveles de excreción viral (Fig. 21 a)), podríamos pensar que, en este grupo, la respuesta celular inducida junto con otros mecanismos protectivos han sido más efectivos.

Se ha visto que individuos con deficiencia en células T tuvieron infecciones más severas que aquellos normales (Rouse, 1978, Allison, 1974, Bloom, 1975). En humanos infecciones fatales con HSV, varicella-Zoster y citomegalovirus fueron asociadas con deficiencias inmunológicas que involucran el sistema inmune dependiente del timo e inmunosupresión por órganos transplantados (Merigan, 1971). En trabajos realizados con HSV se ha sugerido que la IMC tendría un rol más importante en eliminar las células infectadas y controlar la infección por HSV-1 a través de los linfocitos T citotóxicos que la inmunidad humoral (Sethi, 1983). También se observó una mayor protección de ratones frente al desafío y reducción de lesiones herpéticas cuando se coadministró el DNA que codifica para la gD de HSV-2 con citoquinas tipo Th1 (IL-2; IL-12; IL-15; IL-18), particularmente con IL-12 ya que la coadministración de esta citoquina induce una fuerte proliferación de células T colaboradoras y activación de linfocitos T citotóxicos (Sin, 1999). En otros alfa herpesvirus como PRV se ha postulado que los linfocitos T CD4+ y células efectoras en la hipersensibilidad retardada son mecanismos cruciales para la protección, ya que en ratones tratados *in vivo* con anti-CD4+ y luego desafiados se observa una reducción en la protección (Bianchi, 1998). Recientemente, Smith y col (1998) han demostrado en experimentos de transferencia de células que la depleción de células CD4+ y CD8+ de ratones dadores inoculados con una cepa atenuada de PRV a receptores irradiados impidió la eliminación del virus, al contrario de lo que ocurre cuando se transfieren las células

totales de los dadores a los receptores, mientras la eliminación selectiva de una u otra subpoblación sólo tuvo efecto leve. Esto sugiere que ambas subpoblaciones contribuyen a la eliminación de este alfa herpesvirus.

La actividad específica de los linfocitos puede medirse a través de ensayos de *linfoproliferación*, de inhibición de placas virales, liberación de citoquinas después de la estimulación con el antígeno, ó citotoxicidad contra células blanco que presentan el antígeno en el CMH. Ensayos como los de linfoproliferación de linfocitos (Davies, 1973, Rouse, 1974), de inhibición de placa (Rouse, 1975) y pruebas de citotoxicidad con Cr^{51} (Rouse, 1977a), han servido para demostrar el mayor rol de la inmunidad mediada por células en la recuperación de la infección por HVB-1, al igual que para otros herpesvirus (Pfizenmaier, 1977; Rosenberg, 1972; Gerber, 1972). La activación de linfocitos T $CD4^+$ (colaboradores) es necesaria para generar una respuesta de linfocitos T citotóxicos en otros virus como ectromelia, vaccinia coriomeningitis, sarcoma Moloney (Leist, 1989) y HSV (Jenninigs, 1991). Si consideramos que en HVB-1 puede darse la misma asociación el medir la activación de los LT colaboradores estaría directamente relacionado con la activación de LT citotóxicos (Winkler, 1999). Estos tests son positivos en etapas más tempranas de la infección que los ensayos que cuantifican anticuerpos humorales (Rouse, 1978). Además, *in vivo*, la recuperación de una infección por HVB-1 se relaciona con el pico de actividad de la respuesta celular (entre los 5 y 10 días post-infección) antes de que sean detectables los niveles de anticuerpos (Rouse, 1974; Gerber, 1978; Davies, 1973; Tsvetkov, 1987; Babiuk, 1996a). Esto refuerza la hipótesis de que la inmunidad mediada por células está involucrada principalmente en la recuperación de la enfermedad (Rouse, 1974; Gerber, 1978, Babiuk, 1987).

Nuestros resultados corroborarían esto ya que en el desafío viral los animales controles, sin vacunar, se recuperaron de los síntomas clínicos y cesaron de excretar virus alrededor de los 15 días post-infección en promedio (Fig. 20d) antes de alcanzar el pico de anticuerpos (observado a los 40 dpi aproximadamente) (Fig. 23). Como se mencionó anteriormente, la evaluación de la IMC se lleva a cabo, entre otras técnicas, usando el ensayo de linfoproliferación que dá información acerca de la capacidad de los linfocitos T $CD4^+$ de reconocer antígenos específicos, que mediante la interacción con otras células y la liberación de citoquinas regulan la respuesta inmune (Denis, 1994b).

Dado que hasta el presente las vacunas contra IBR no logran proteger totalmente a los animales, el criterio para la evaluación de la eficacia de las vacunas después del desafío intranasal con la cepa LA de HVB-1 infecciosa fue la disminución de los síntomas clínicos, de los títulos virales excretados y el período de excreción viral con respecto a los animales no vacunados. En estos términos, la vacuna más eficiente es aquella que induce en la población un grado de inmunidad tal que frente a una exposición de estos animales al virus logre reducirse el período y los niveles de excreción viral, así como los síntomas clínicos.

En este trabajo de tesis, por primera vez se evaluó la actividad inmunomoduladora de SLP/S/W y Avridine con HVB-1 inactivo. Mediante el desafío viral por aerosol se logró reproducir la infección, ya que los animales controles sin vacunar tuvieron la respuesta típica de infecciones experimentales con HVB-1 en el desarrollo de respuesta humoral con anticuerpos detectables desde los 7 dpi (Fig. 23), en coincidencia con lo observado por Fillion, (1983); respuesta celular con pico de actividad entre los 5 y 10 días post-infección (Fig. 27), coincidente con lo observado por Rouse, (1974); Gerber, (1978); Davies, (1973); y síntomas clínicos típicos (Tabla 1). En cuanto al curso de la enfermedad, se desarrolló de acuerdo a lo descrito por otros autores (Soulebot, 1982). Sorprendentemente, la temperatura rectal en general no se elevó luego del desafío, excepto en 3 animales pertenecientes al grupo control, que desarrollaron temperaturas mayores a 40°C (Fig.18). Sin embargo, otros autores también observaron que el pico de excreción viral no siempre va acompañado de elevación de la temperatura corporal (Bosch, 1997a). La presencia de sintomatología típica de infecciones con HVB-1 en estos ensayos estuvo relacionada con el estado inmune inicial previo a la exposición, siendo los bovinos vírgenes, lógicamente, los que desarrollaron síntomas más severos, presentando a los 8 dpi el mayor porcentaje de animales con rinitis sero-mucosa y mayores títulos virales. El período de excreción de 4 a 18 días post infección observado en este trabajo concuerda con lo descrito por otros autores (Soulebot, 1982).

Los resultados demuestran que las tres vacunas fueron igualmente eficientes en disminuir el período de excreción. La vacuna que contenía SL-CD/S/W fue la más eficiente en producir una disminución (por lo menos 100 veces) en los títulos virales excretados en los animales vacunados (Fig. 20a). Los animales vacunados con este inmunomodulador se diferenciaron significativamente de los animales controles sin vacunar en los títulos virales excretados en

promedio (Fig. 21a). Para confirmar los resultados obtenidos por aislamiento en cultivos celulares del virus excretado, se realizó el ensayo de PCR en cinco animales en los que el aislamiento viral fue negativo (Fig. 20). De estos animales sólo el bovino 670 fue positivo por PCR y probablemente excretó virus en niveles muy bajos, no detectables cuando se hicieron pasajes en cultivos celulares, aunque también podría tratarse de partículas defectivas, con el genoma íntegro pero no infeccioso.

Tomando en conjunto los resultados de la evaluación de síntomas clínicos y excreción viral, se observa que a los 8 dpd la vacuna conteniendo SL-CD/S/W fue más efectiva en reducir en promedio los títulos virales excretados (Fig. 21a) y los síntomas de la enfermedad (Fig. 19) que las otras dos formulaciones vacunales (vacuna convencional y vacuna con Avridine).

Cuando se evaluó la seguridad de las vacunas experimentales, se observó que los bovinos vacunados con la vacuna inactivada formulada con el aceite no mineral (squalane) no presentaron efectos adversos post-vacunales, este hecho fue confirmado en el campo por el alto nivel de tolerancia en los animales vacunados, medidos en términos de ausencia de formación de nódulos en el sitio de inoculación. Por el contrario se registraron nódulos en la mayoría de los animales inoculados con el aceite mineral, ya que el remanente de la fase oleosa permanece en el sitio de inoculación, generando inflamación, con la consecuente infiltración de macrófagos y otras células inmunocompetentes, ocasionando la producción de granulomas (Allison, 1992, Murray, 1972). Todos estos datos demuestran que la vacuna formulada con SL-CD/S/W (aceite biodegradable y no mineral) fue más eficaz que las dos vacunas formuladas con aceite mineral en términos de inocuidad. La emulsión resultó de fácil preparación (simple mezclado), de baja viscosidad y muy estable, aspecto de fundamental importancia para la inclusión de nuevos inmunomoduladores en formulaciones vacunales, ya que la inestabilidad de una emulsión sugiere una rápida liberación del antígeno desde la emulsión *in vivo*, conduciendo a una respuesta mayor pero menos prolongada, además esta emulsión aceite (no mineral) en agua resultó fácil de inocular por su reducida viscosidad. Este es un aspecto importante para el empleo de una vacuna a campo, donde la facilidad de la aplicación dada por la baja viscosidad es fundamental.

Como último elemento a considerar cabe mencionar que desde ambos puntos de vista de seguridad y potencia, podemos decir que la vacuna formulada con SL-CD/S/W no produjo

efectos adversos en los animales inoculados y resultó más inmunogénica que las vacunas formuladas con aceite mineral, ya que fue más eficiente en reducir tanto los síntomas clínicos de la enfermedad como los niveles de excreción viral. Los resultados presentados demuestran que el SL-CD/S/W, un nuevo adyuvante no mineral y biodegradable podría ser un buen candidato para la elaboración de vacunas destinadas a la protección de bovinos.

5. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES PARCIALES

Las tres vacunas indujeron altos niveles de anticuerpos no hallándose diferencias significativas entre los grupos.

No se halló una asociación entre niveles de anticuerpos neutralizantes y protección.

El perfil isotípico inducido por las vacunas evaluadas fue similar al inducido por una infección.

La presencia de altos niveles de IgG2 estaría relacionada con la disminución de la excreción viral.

Las tres vacunas fueron igualmente eficientes en reducir el período de excreción viral. La vacuna conteniendo SL-CD/S/W fue la más efectiva en reducir, en promedio, los títulos virales excretados y los síntomas de la enfermedad.

Se detectó un mayor porcentaje de bovinos con resultados positivos a la linforproliferación cuando se incluyó el SL-CD/S/W en la formulación vacunal.

CONCLUSION GENERAL

En términos de seguridad y potencia, la vacuna conteniendo el nuevo inmunomodulador en base a un aceite no mineral biodegradable (SL-CD/S/W) no produjo efectos adversos en los animales inoculados y resultó más eficiente en cuanto a la inducción de una respuesta celular y protección en los bovinos que las vacunas formuladas con aceite mineral con y sin inmunomodulador (Avridine).



**Dra. ANA M. SADIR
DIRECTORA DE INVESTIGACION (INT.)
CENTRO CS. VETERINARIAS Y AGRONOMICAS**

CONCLUSIONES PARCIALES

Las tres vacunas indujeron altos niveles de anticuerpos no hallándose diferencias significativas entre los grupos.

No se halló una asociación entre niveles de anticuerpos neutralizantes y protección.

El perfil isotípico inducido por las vacunas evaluadas fue similar al inducido por una infección.

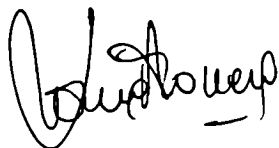
La presencia de altos niveles de IgG2 estaría relacionada con la disminución de la excreción viral.

Las tres vacunas fueron igualmente eficientes en reducir el período de excreción viral. La vacuna conteniendo SL-CD/S/W fue la más efectiva en reducir, en promedio, los títulos virales excretados y los síntomas de la enfermedad.

Se detectó un mayor porcentaje de bovinos con resultados positivos a la linforproliferación cuando se incluyó el SL-CD/S/W en la formulación vacunal.

CONCLUSION GENERAL

En términos de seguridad y potencia, la vacuna conteniendo el nuevo inmunomodulador en base a un aceite no mineral biodegradable (SL-CD/S/W) no produjo efectos adversos en los animales inoculados y resultó más eficiente en cuanto a la inducción de una respuesta celular y protección en los bovinos que las vacunas formuladas con aceite mineral con y sin inmunomodulador (Avridine).



Dra. ANA M. SADIR
DIRECTORA DE INVESTIGACION (INT.)
CENTRO CS. VETERINARIAS Y AGRONOMICAS



6. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Ackermann M.** and Wyler R. (1984). The DNA of an IPV strain of bovid herpesvirus 1 in sacral ganglia during latency after intravaginal infection. *Vet. Microbiol.* 9:53-63.
- Alegre M.**, Nanni M. and Fondevila N.A. (2001). Development of multiplex-PCR for the differentiation of bovine herpes virus 1 and 5. *The Journal of Veterinary Medicine. Series B.* In press
- Allison A.C.** (1971). The role of membranes in the replication of animal viruses. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 10:181-242.
- Allison A.C.** (1973). Effects of adjuvants on different cell types and their interactions in immune responses. In *Immunopotentiality*. Ciba Foundation Symposium N° 18:73-79 ed. G.E.W. Wolstenholme and J. Knight. Elsevier, Amsterdam.
- Allison A.C.** (1974). Interactions of antibodies complement components and various cell types in immunity against virus and pyogenic bacteria. *Transplant Revs.* 19:3-55.
- Allison A.C.** and Byars N.E. (1992). Characteristics and practical use of new-generation adjuvants as an acceptable alternative to Freund's complete adjuvant. *Syntex adjuvant formulation.* 44th. Forum in Immunology.
- Amadori M.**, Archetti I.L., Berneri C., Lodetti E., Salvalai M., Cordioli P. and Callegari S. (1994). Human lymphoblastoid interferon as vaccine adjuvant in cattle. *J. Bio. Regul. Homeost Agents.* 8(1):9-14.
- Amos H.** (1953). The inactivation of herpes simplex virus by phosphatase enzymes. *J. Exp. Med.* 98:365-372.
- Anderson A.O.** and Reynolds G.A. (1979). Adjuvant effects of the lipid amine CP 20961. *J. Reticuloendothel. Soc.* 26:667-680.
- Anderson A.O.**, Plotner A., and Rubin D.H. (1983). Effect of enteric priming with reovirus and lipoidal amine adjuvant on mucosal lymphatic tissue and anti-viral IgA secretion. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 409:769-775.
- Babiuk L.A.**, Wardley, R.C. and Rouse, B.T. (1975). Defense mechanisms against bovine herpesvirus: Relationship of virus-host cell events susceptibility to antibody-complement cell lysis. *Infect. Immunol.* 12:958-963.
- Babiuk L.A.** and Rouse B.T. (1979). Immune control of herpesvirus latency. *Can. J. Microbiol.* 25:267-274.
- Babiuk L.A.** and Misra V. (1981). Levamisole and bovine immunity: in vitro effects on immune responses to herpesvirus immunization. *Can. J. Microbiol.* 27(12):1312-1319.

- Babiuk L.A.,** Italien J., van Drunen Littel-van den Hurk S., Zamb T., Lawman M.J.P., Hugues G. and Gifford G.A. (1987). Protection of cattle from bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) infection by immunization with individual viral glycoproteins. *Virology*. 159:57-66.
- Babiuk L.A.,** van Drunen Littel-van den Hurk S., Tikoo S.K. (1996). Immunology of bovine herpesvirus infection. *Vet. Microbiol (Netherlands)*. 53 (1-2):31-42.
- Babiuk L.A.,** van Drunen Littel-van den Hurk S., Tikoo S.K., Lewis P.J. and Liang X. (1996a). Novel viral vaccines for livestock. *Vet. Immunol. and Immunopathol.* 54:355-363.
- Baca-Estrada M.E.,** Foldavari M., Snider M., van Drunen Littel-van den Hurk S. and Babiuk L.A. (1997). Effect of IL-4 and IL12 liposomal formulations on the induction of immune response to bovine herpesvirus type-1 glycoprotein D. *Vaccine*. 15 (16):1753-1760.
- Bahnemann H.G.** (1975). Binary ethylenimine as an inactivant for foot and mouth disease virus and its application for vaccine production. *Arch. Of Virol.* 47: 47.
- Barenfus M.,** Delli Quadri C.A., McIrtyre R.W. and Schroeder R.J. (1963). *J. Amer. Vet. Med. Ass.* 143:725.
- Bartha A.,** Juhasz M. and Liebermann H. (1966). Isolation of a bovine herpesvirus from calves with respiratory diseases and keratoconjunctivitis. *Acta. Net. Acad. Sci. Hyg.* 65:357.
- Beh K.L.,** Lascelles A.K. (1985). The effect of adjuvants and prior immunization on the rate and mode of up-take of antigen into afferent popliteal lymph from sheep. *Immunology*. 54:487-495.
- Benítez M.D.** (1990). Rinotraqueítis infecciosa bovina. *INTA informa*. Ed. 2181.
- Berinstein A.,** Perez Filgueira M., Schudel A., Zamorano P., Borca M. and Sadir A. (1993). Avridine and LPS from *Brucella ovis*: Effect on the memory induced by foot-and-mouth disease virus vaccination in mice. *Vaccine* 11 (13):1295-1301.
- Bianchi A.T.J.,** Moonen-Leusen H.W.M., van Milligen F.J., Savelkoul H.F.J., Zwart R.J. and Kimman T.G. (1998). A mouse model to study immunity against pseudorabies virus infection: significance of CD4+ and CD8+ cells in protective immunity. *Vaccine*.16(16):1550-1558.
- Bielanski A.,** Loewen K.G. and Hare W.C.D. (1988). Rinotraqueítis bovina infecciosa (nariz roja) (RIB). *Med. Vet. Nva. Editorial Interamericana*. 6° ed. México, D.F.:873-879.

- Bielanski A.** and Dubuc C. (1994). In-vitro fertilization and culture of ova from heifers infected with bovine herpesvirus-1 (BHV-1) from in vitro infected bovine semen. *Theriogenology*. Vol. 30, N°4:649-656.
- Bielefeldt Ohmann H.** and Babiuk L.A. (1985). Viral bacterial pneumonia in calves: Effect of bovine herpesvirus-1 on immunological functions. *J.Infect. Dis.*151:937-947.
- Bielefeldt Ohmann H.** and Babiuk L.A. (1988). Induction of receptors for complement and immunoglobulins by herpesviruses of various species. *Virus. Res.* 9:335-342.
- Bielefeldt Ohmann H.,** Babiuk L.A. and Harland R. (1991). Cytokine synergy with viral cytopathic effects and bacterial products during the pathogenesis of respiratory tract infection. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 60:153.
- Blood D C.,** Radostits O.M. and Henderson J.A. (1988). Rinotraqueítis bovina infecciosa (nariz roja) (RIB). En medicina Veterinaria. Nva. Editorial interamericana. 6° ed., México D.F.873-879.
- Bloom B.R.** and Rager-Zisman B. (1975). Cell mediated immunity in viral infections. In *Viral immunology and Immunopathology*. A.L. Notkins, editor:113-136. New York. Academic Press.
- Bochner B.S.,** Landy S.D., Plant M., Dinarello C.A. and Scheleimer R.P. (1987). Interleukin-1 production by human lung tissue. I. Identification and characterization. *J.Immunol.* 139:2297-2302.
- Bosch J.C.,** Kaashoek M.J., Kroese A.H. and van Oirschot J.T. (1996). An attenuated bovine herpesvirus 1 marker vaccine induces a better protection than two inactivated marker vaccines. *Vet. Microbiol.* 52:223-234.
- Bosch J.C.,** Kaashoek M.J. and van Oirschot J.T. (1997). Inactivated bovine herpesvirus-1 marker vaccines are more efficacious in reducing virus excretion after reactivation than a live marker vaccine. *Vaccine.* 15(14):1512-1517.
- Bosch J.C.,** Kaashoek M.J. and van Oirschot J.T. (1997a). Inactivated bovine herpesvirus 1 marker vaccines are more efficacious in reducing virus excretion after reactivation than a live marker vaccine. *Vaccine.* 15(14): 1512-1517.
- Bosch J.C.,** Frakena K. and van Oirschot J.T. (1997b). Effect on milk production of vaccination with a bovine herpesvirus 1 gene-deleted vaccine. *Vet. Rec.* 140 (8):196-199
- Bouters R.,** Vandeplassche M., Florent A., Leunen J and Devos A. (1960). De ulcereuse balanoposthitis bij fokstieren. *Vlaams Diergeneesk. Tijdschr.* 29:171-186.

- Brake F.** and Studdert M.J. (1985). Molecular epidemiology and pathogenesis of ruminant herpesvirus including bovine, buffalo and caprine herpesvirus 1 and bovine encephalitis herpesvirus. *Aust. Vet. J.* Vol.62. 10:331-334.
- Bratanich A., Sardi S., Smitsaart E., Estevez Madero J. and Schudel A.** (1990) Comparison of three serological techniques for the diagnosis of bovine herpesvirus type 1: serum neutralization, enzyme-linked immunosorbent assay and indirect immunofluorescence. *Rev. Arg. Microbiol.* 22:192-198.
- Brown F.** (1989). The classification and nomenclature of viruses: summary of results of meetings of the International Committee on Taxonomy of Viruses in Edmonton, Canada 1987. *Intervirology* 30:181-186.
- Brown W.C., Rice-Ficht A.C. and Estes D.M.** (1998). Bovine type 1 and type 2 responses. *Vet. Immunol. and Immunopathol.* 63:45-55.
- Byrne K. M., Horohov D.W. and Kousoulas K.G.** (1995). Glycoprotein gB of bovine herpesvirus- 1 binds heparin. *Virology* 209:230-235.
- Campos M. and Rossi C.R.** (1986). Cytotoxicity of bovine lymphocytes after treatment with lymphokines. *Am. J. Vet. Res.* 47:1524-1528.
- Campos M., Bielefeldt Ohmann H., Hutchings D., Rapin N., Babiuk L.A and Lawman M.J.P.** (1989). Role of interferon gamma in inducing cytotoxicity of peripheral blood mononuclear leukocytes to bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) infected cells. *Cell. Immunol.* 120:259-269.
- Campos M., Griebel P., Bielefeldt Ohmann H. and Babiuk L.A.** (1992). Cell-mediated cytotoxic responses in lungs following a primary bovine herpes virus type 1 infection. *Immunology* 75:47-52.
- Campos M. Godson D.L., Hughes H.P.A. and Babiuk L.A.** (1994). Cytokine applications in infectious diseases. In. Eds. Goddeeris and I. Morrisons. *Cell-Mediated Immunity in Ruminants.* C.R.C Press, Boca Raton. Pp:229-240.
- Carrillo B.J., Ambrogi A., Schudel A.A., Vázquez M., Dahme E. and Pospichil A.** (1983). Meningoencephalitis caused by IBR Virus in calves in Argentina. *ZBL. Vet. Med. B.* 30:327-332.
- Castrucci G., Osborn B.I., Frigeri F., Ferrari M., Salvatori D., Lo Dico M. and Barreca F.** (2000). The use of immunomodulators in the control of infectious bovine rinotracheitis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 23(3):163-173.

- Coe Clough N. E.** and Roth J.A. (1995). Methods for assessing cell-mediated immunity in infectious disease resistance and in the development of vaccines. *J.A.V.M.A.* 206(8):1208-1216.
- Cravens R. L.,** Ellsworth A., Sorensen C. D. and White A. K. Efficacy of a temperature-sensitive modified-live bovine herpesvirus type-1 vaccine against abortion and stillbirth in pregnant heifers. *JAVMA.* 208 (12): 2031-2034. 1996.
- D'Offay J.M.,** Mock R.E. and Fulton R.W. (1993). Isolation and characterization on encephalitic bovine herpesvirus type 1 isolates from cattle in North America. *Am. J. Vet. Res.* 54. 4:534-539.
- Davies D.H.** and Carmichael L.E. (1973). Role of cell mediated immunity in the recovery of cattle from primary and recurrent infections with infectious bovine rhinotracheitis virus. *Infect. Immun.* 8:510-518.
- Denis M.,** Slaoui M., Keil G., Babiuk L.A., Ernst E., Pastoret P.P. and Thiry E. (1993). Identification of different target glycoproteins for bovine herpesvirus-1 specific cytotoxic T lymphocytes depending on the method of in vitro stimulation. *Immunology* 78:7-13.
- Denis M.,** Splitter G., Thiry E., Pastoret P.P. and Babiuk L.A. (1994a). Infectious bovine rhinotracheitis (bovine herpesvirus1): Helper T cells, cytotoxicity T cells and NK cells. In eds. B. Goddeeris and I. Morrisons, *Cell mediated immunity in ruminants.* CRC Press, Boca Ratón, p.p: 157-172.
- Denis M.,** Kaashoek M. J., van Oirschot J.T., Pastoret P.P. and Thiry E. (1994b). Quantitative assesment of the specific CD4+ T lymphocyte proliferative response in bovine herpesvirus 1 immune cattle. *Veterinary Immunology and immunopathology* 42:3-4:275-286.
- Derbyshire J.B.** and Caplan B.A. (1976). The isolation and characterization of a strain of infectious bovine rhinotracheitis virus from stillbirth in swine. *Can. J. Comp. Med.* 40:252-256.
- Dubuisson J.,** Israel B.A. and LetchworthIII G.J. (1992). Mechanisms of bovine herpesvirus type 1 neutralization by monoclonal antibodies to glycoproteins gI, gIII and gIV. *J.Gen.Virol.* 73:2031-2039.
- Duque H.,** Marshall R.L., Israel B.A. and Letchworth G. J. (1989). Effect of formalin inactivation on bovine herpesvirus –1 glycoproteins and antibody responses elicited by formalin-inactivated vaccines in rabbits. *Vaccine,* 7:513-520.

- Durand M., Libersa M., Loqueire R. and Saint-Cast Y. (1981).** Possibilitte de prevention de pneumopaties enzootiques des veasux a l'engrais par l'emploi d'un vaccin antiviral IBR inactive a adjuvant huileux. *Bull. Soc. Vet. Prat. France.* 65:193.
- Edelman R. (1980).** Vaccine adjuvants. *Rev. Infect. Dis.* 2:370-383.
- Engels M., Giuliani C., Wild P., Beck T.M., Loepfe E. and Wyler R. (1986).** The genome of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) strains exhibiting a neuropathogenic potential compared to know BHV-1 restriction site mapping and cross-hybridization. *Virus Research.* 6: (86/87):57-73.
- Epstein B., Gil Turnes C. and Etcheverrigaray M.E. (1972).** Aislamiento de feto bovino abortado de virus de la rinotraqueitis bovina infecciosa y listeria monocytogenes. *Rev. Med. Vet.* 53:99-102.
- Estes D.M., Closser N.M. and Allen G.K. (1994).** IFN- γ stimulates IgG₂ production from bovine B cells costimulated with anti- μ and mitogen. *Cell Immunol.* 154:287-295
- Estes D.M. (1996).** Differentiation of B cells in the bovine. Role of cytokines in immunoglobulin isotype expression. *Vet. Immunol and Immunopathol.* 54:61-67.
- Fenner F., McAuslan B.R., Mims C.A., Sambrook J. and White D.D. (1974).** The biology of animal viruses. 2ed. Academic Press, New York.
- Ferrari R., Callerio C. and Podio G. (1959).** Antiviral activity of ly sozime. *Nature* 183:548.
- Filion L.G., McGuire R.L., Babiuk L.A. (1983).** Nonspecific suppressive effect of bovine herpesvirus type 1 on bovine leukocyte functions. *Infect. Imm.* 42 (1):106-112.
- Finkelman F.D., Holmes J., Katona I.M., Urban J.F. Jr., Beckman M.P., Park L.S., Schooley K.A., Coffman R.L., Mosmann T.R. and Paul W.E. (1990).** Lymphokine control of *in vivo* immunoglobulin isotype selection. *Ann. Rev. Immunol.* 8:303-334.
- Fondevila N.A., Lager I.A., Sadir A.M., Carrillo B.J., Villar J., Venzano A., Zurbriggen M., González D., Ivancovich J. and Schudel A.A. (1981).** Rinotraqueítis infecciosa bovina (HVB-1) III: prevalencia de anticuerpos en rodeos bovinos del país. *Revista de investigaciones agropecuarias. INTA. Bs. As, Argentina.* Vol.XVI, N°2:285-289.
- Frerichs G.N., Woods S.B., Lucas M.H. and Sands J.J. (1982).** Safety and efficacy of live and inactivated infectious rhinotracheítis vaccines. *Vet. Rec.* 111:116-122.
- Fuller A. O. and Lee W.C. (1992).** Herpes simplex virus type 1 entry through a cascade of virus-cell interactions requires different roles of gD and gH in penetration. *J. Virol.* 66: 5002-5012.

- Gao Y., Daley M.J. and Splitter G.A. (1995).** BHV-1 glycoprotein 1 and recombinant interleukin 1 beta efficiently elicit mucosal IgA response. *Vaccine*. 13 (9):871-877.
- Gerber P. and Lucas S.J. (1972).** In vitro stimulation of human lymphocytes by Epstein-Barr virus. *Cell. Immunol.*5:318-324.
- Gerber J.D., Marron A.E. and Kucera C. (1978).** Local and systemic cellular and antibody immune responses of cattle to infectious bovine rhinotracheitis virus vaccines administered intranasally or intramuscularly. *Am. J. Vet. Res.* 39(5):753-760.
- Gibbs E.P.J and Rweyemamu (1977).** Bovine herpesviruses. Part.I. Bovine herpesvirus 1. *Veterinary Bulletin*. 47. 5: 317-343.
- Gillespie J.H., McEntee K., Kendrick J.W., Wagner W.C. (1959).** Comparison of infectious pustular vulvovaginitis virus with infectious bovine rhinotracheitis virus. *Cornell. Vet.*49:288.
- Gilliam S.E., Thackray A.M. Brown G.A. and Field H.J. (1993).** The pathogenesis of wild type and drug resistant mutant strains of bovine herpesvirus -1 (BHV-1) in the natural host. *Arch. Virol.* 128:43-54.
- Ginsberg H.S. and Horsfall F.L. (1949).** A labile component of normal serum which combines with various viruses. Neutralization of infectivity and inhibition of hemagglutination by the component. *J. Exp. Med.* 90:475-495.
- Granzow H., Weiland F., Jöns A., Klupp B. G., Karger A. and Mettenleiter T.C. (1997).** Ultrastructural analysis of the replication cycle of pseudorabies virus in cell culture: a reassessment. *J. Virol.* 71: 2072-2082.
- Greaves M.F., Owen J.J. and Raff M.C. (1973).** T and B lymphocytes: Origins, properties and roles in immune responses. *Excerpta Medica, Amsterdam.*
- Grewal A.S., Rouse B.T. and Babiuk L.A. (1977).** Mechanisms of resistance to herpesviruses: Comparison of the effectiveness of different cell types in mediating antibody-dependent cell mediated cytotoxicity. *Infect. Immun.* 15:698-703.
- Grewal A.S., Carpio M. and Babiuk L.A. (1980).** Polymorphonuclear neutrophil-mediated antibody-dependent cell cytotoxicity of herpesvirus-infected cells: ultrastructural studies. *Can. J. Microbiol.* 26(4):427-435.
- Griebel P.J., Qualtiere L., Davis W.C., Gee A., Bielefeldt Ohmann H., Lawman M.J.P. and Babiuk L.A. (1988).** Peripheral blood T lymphocyte population dynamics and function following a primary bovine herpesvirus-1 infection. *Virol. Immunol.* 1:287.
- Griebel P.J., Bielefeldt Ohmann H., Campos M., Qualtiere L., Davis W.C., Lawman M.J.P. and Babiuk L.A. (1989).** Bovine peripheral blood leukocyte population dynamics

following treatment with recombinant bovine interferon alpha 1. *J. Interferon. Res.* 9:245-257.

Griffin T.P., Howel W.V., Crandell R.A. and Maurer F.D. (1958). Stability of the virus of infectious bovine rhinotracheitis. *Am. J. Vet. Research.* 19:990-992

Gupta R., Relyveld E.H., Lindblot E.B., Bizzini B., Ben-Efraim S. and Gupta K. (1993). Adjuvants-a balance between toxicity and adjuvanticity. *Vaccine* 11(3):293-306.

Hammerschmidt W., Ludwig H. and Buhk H.J. (1988). Specificity of cleavage in replicative-form DNA of bovine herpesvirus 1. *J. Virol.* 62:1355-1363.

Hanton G., Thiry E., Brochier B., Derboven G. and Pastoret P.P. (1986). Development of specific antibodies mediating antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity following experimental infection of cattle with bovine herpesvirus 1 and subsequent viral reactivation. *Vet. Microbiol.* 11(1-2):51-59.

Haralambiev H. (1976). Immunogenicity studies of inactivated IBR vaccine administered into the nasal mucose. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* 26: 215-217.

Harland R.J., Potter A., van Drunen Littel-van den Hurk S., van Donkersgoed J., Parker M.D., Zamb T.J. and Janzen E.D. (1992). The effect of subunit or modified-live bovine herpesvirus-1 vaccines on the efficacy of a recombinant *Pasteurella haemolytica* vaccine for the prevention of respiratory disease in feedlot calves. *Can. Vet. J.* 33:734-741.

Hilgers L.A., Snippe H., Jansze M. and Willers J.M.N. (1985). Combination of two synthetic adjuvants: synergistic effects of a surfactant and a polyanion on the humoral response. *Cell. Immunol.* 92:203.

Hilgers L.A., Snippe H., Jansze M. and Willers J.M.N. (1986). Synergistic effects of synthetic adjuvants on the humoral immune response. *Int. Arch. All. Appl. Immunol.* 79:392.

Hilgers L.A., Snippe H., Jansze M. and Willers J.M.N. (1987). Synthetic sulpholipopolysaccharides: novel adjuvants for humoral immune responses. *Immunol.* 60:141-146.

Hilgers L.A.Th. and Snippe H. (1992). DDA as an immunological adjuvant. *Res. Immunol.* 143:494-503.

Hilgers L.A., Platenburg P.L.I., Luitjens A., Groenveld T., Dazelle M., Ferrari-Laloux M. and Weststrate M.W. (1994a). A novel non mineral oil based adjuvant. I. Efficacy of

a synthetic sulfolipoplysaccharide in a squalane in water emulsion in laboratory animals. *Vaccine*. 13(7): 653-660.

Hilgers L.A., Platenburg P.L.I., Luitjens A., Groenveld T., Dazelle M. and Weststrate M.W. (1994b). A novel non mineral oil based adjuvant. II. Efficacy of a synthetic sulfolipoplysaccharide in a squalane in water emulsion in pigs. *Vaccine* 12(7):661-665.

Hilgers L.A.Th., Lejeune G., Nicolas I., Fochesato M. and Boon B. (1999) Sulpholipocyclodextrin in squalane-in-water as a novel and safe vaccine adjuvant *Vaccine* 17:219-228.

Hirschhorn K. and Hirschhorn R. (1974). Mechanisms of lymphocyte activation. R. T. McCluskey and Cohen S, eds. *Mechanisms of cell-mediated immunity*. J. Wiley and Sons, New York.

Hoff G.L., Richards S.H. and Trainer D.O. (1973). Epizootic of hemorrhagic disease in North Dakota deer. *J. Wildl. Mgmt.* 37:331-335.

Hoffman W.W., Korst J.J., Niblack J.F. and Cronin T.H. (1973). N,N-Dioctadecyl-N,N-bis (2-hidroxyethyl) propanediamine: antiviral activity and interferon stimulation in mice. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 3:498-502.

Hoffman W. (1984). Lipid amines. In: *Immune modulation agents and their mechanisms* (Eds Finichel R. And Chirigos M.A.) Marcel Dekker, New York.

Homan E.J. and Easterday B.C. (1980). Isolation of bovine herpesvirus-1 from trigeminal ganglia of clinically normal cattle. *Am. J. Vet. Res.* 41(8):1212-1213.

House J.A. (1980). Prevención y control de la rinotraqueítis infecciosa bovina. *Bol. Of sanit. Panam.* 88 (1): 35-43.

Howard C.J., Taylor G. and Brownlie J. (1980). Surface receptors for immunoglobulin on bovine polymorphonuclear neutrophils and macrophages. *Res. Vet. Scien.* 28:128-130.

Hristov S. and Karadjov I. (1975). Study on the immunogenic properties of inactivated vaccines reduced with the virus of the infectious bovine rhinotracheitis. *Vet. Med.* 13: 8-13 in Bulgarian, English summary.

Huemer H.P., Larcher. G., van Drunen Littel-van den Hurk S. and Babiuk L.A. (1993). Species specific interaction of alpha herpesviridae with the "nonspecific" immune system of the host. *Arch. Virol.* 130:353-364.

Hughes H.P.A., Campos M. and Godson D. 1991. Immunopotential of bovine herpesvirus subunit vaccination by interleukin-2. *Immunology* 74:461-466.

- Hughes H.P.A.**, Campos M., van Drunen Littel-van den Hurk S., Zamb T., Sordillo L., Godson D. and Babiuk L.A. (1992). Multiple administration with cytokines potentiates antigen –specific responses to subunit vaccination with bovine herpesvirus –1 glycoprotein IV. *Vaccine* 10:226-230.
- Hutchings D.L.**, van Drunen Littel-van den Hurk S. and Babiuk L.A. (1990). Lymphocyte proliferative responses to separated bovine herpesvirus 1 proteins in immune cattle. *J. Virol.* 64:5114-5122.
- Hutyra-Marek** (1910). *Lehrbuch der speziellen pathologie und therapie der haustiere.* 6° ed. Gustav Fisher-Verlag. Jena. 1:354.
- Israel B.A.**, Herber R., Gao Y. and Letchworth G. J. (1992). Induction of a mucosal barrier to bovine herpesvirus –1 replication in cattle. *Virology* 188: 256-264.
- Ivanyi L.** and Lehner T. (1974). Stimulation of human lymphocytes by B-cell mitogens. *Clin. Exp. Immunol.* 18:347-356.
- Jennings S. R.**, Bonneau R.H., Smith P.M., Wolcott R.M. and Chervenak R. (1991). CD4-positive T lymphocytes are required for the generation of the primary but not the secondary CD8-positive cytolytic T lymphocyte response to herpes simplex virus in C57BL/6 mice. *Cell. Immunol.* 133:234-252.
- Jensen R.**, Griner L.A., Chow T.L. and Brown W.W. (1955). Infectious rhinotracheitis in feedlot cattle. I. Pathology and symptoms Proc.59th Annual meeting U.S. Livestock Sanit. Assoc: 189-199.
- Jensen J.** and Schultz R.D. (1990). Bovine natural cell mediated cytotoxicity (NCCMC). Activation by cytokines. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 24:113-124.
- Kaashoek M.J.**, Moermann A., Madic J., Weerdmeester K., Maris-Veldhuis M.A., Rijsewijk F.A.M. and van Oirschot J.T. (1995) .An inactivated vaccine based on a glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus type 1 induce protective immunity and allows serological differentiation. *Vaccine*, 13:342-346.
- Kahrs R.F.** (1977). Infectious Bovine Rhinotracheitis: A review and update. *JAVMA.* 171(10):1055-1064.
- Kahrs R.F.** (1981). *Viral disease of cattle.* Iowa State Univ. Press, Ames. Iowa.
- Kaplan A.** (1973). *The herpesviruses.* Academic Press Inc.
- Kendrick J.W.**, Gillespie J.H. and McEntee K. (1958). Infectious pustular vulvovaginitis of cattle. *Cornell. Vet.* 48: 458.

- Kit S., Kit M. and McConnel (1986).** Intramuscular and intravaginal vaccination of pregnant cows with thymidine kinase-negative temperature resistant infectious bovine rhinotracheitis virus (bovine herpes virus 1). *Vaccine* 44:55-61.
- Klaus G.G.B. and Humphrey J.H. (1977).** The generation of memory cells. *Immunol.* 33:31.
- Knigth V. (1973).** Airborne transmission and pulmonary deposition of respiratory viruses. pag. 175-182 in J.F.P.Hers and K.C. Winkler, eds. *Airborne transmission and airborne infection.* Halsted Press, J. Willey and Sons, New York.
- Knudsen R.C., Card D.M. and Hoffman W.W. (1986).** Protection of guinea pigs against local and systemic foot-and-mouth disease after administration of synthetic lipid amine (Avridine) liposomes. *Antiviral Research.* 6:123-133.
- Kokles R. (1967).** Die InfektÖse Rhinotracheitis und das Coitalexanthem des Rindes In: H. Rohrer Handbuch der Virusinfektion bei Tieren. Band. II. Veb. Gustav Fischer Verlag. Jena:901-960.
- Kutish G., Mainprize T. and Rock D. (1990).** Characterization of the latency related transcriptionally active region of the BHV-1 genome. *J. Virol.* 64:5730-5737.
- Kuwano K., Scott M., Young J.E. and Ennis F. (1989).** Active immunization against virus infection due to antigenic drift by ionduction of cross-reactive cytotoxic T lymphocytes. *J.Exp. Med.* 169:1361-1371.
- Laboissiere S. Trudel M. and Simard C. (1996).** The bovine herpesvirus type 1 major tegument protein VP8 expressed in recombinant vaccinia virus does not induce significant immunity in mice. *Virus Res (Netherlands)* 40(2): 191-198.
- Lager I.A., Fondevila N., Sadir A.M., Fernandez F. and Schudel A.A. (1981).** Rinotraqueitis infecciosa bovina (HVB-1) I: aislamiento y caracterización biológica del agente etiológico (L-114). *Rev. Med. Vet. (Bs. As).* 62, 5: 404-410.
- Lager I.A., Sadir A.M., and Schudel A.A. (1983).** Enfermedades virales respiratorias de los bovinos . IDIA. En Abril:53-67.
- Lan H.C., Chambers M.A., Ferguson J.A., Srivastava K.K. and Reddy P.G. (1996).** Effect of bovine herpesvirus-1 on expression of interleukin-2 receptors and effect of interleukin-12 on lymphocyte proliferation. *Vet. Microbiol.* 49:59-66.
- Lawman M.J.P., Gifford G., Gyongyossy-Issa M., Dragan R., Heise J. and Babiuk L.A. (1987).** Activity of polymorphonuclear (PMN) leukocytes during bovine herpes virus-1 induced respiratory disease: effect of recombinant bovine interferon alpha II. *Antiviral. Res.* 8:225-238.

- Lawman M.J.P.**, Griebel P., Huttings D.L., Davies W.C., Heise J., Qualtiere L. and Babiuk L.A. (1987/1988). Generation of IL-2 dependent bovine cytotoxic T lymphocyte clones reactive against BHV-1 infected target cells: loss of genetic restriction and virus specificity. *Viral Immunol.* 1:163-176.
- Lawrence H.S.** and Landy M. (1969). *Mediators of cellular immunity.* Academic press, New York.
- Le Jan C.** and Asso J. (1980). Induction of interferon activity in nasal mucus by association of levamisole by systemic route-inactivated virus by local route. *Ann. Rech. Vet.* 11(3):307-312.
- Leary T.P.** and Splitter G.A. (1990). A method for the rapid identification of T lymphocyte epitopes. *Peptide Res.* 3:259-263.
- Leary T.P.**, and Splitter G.A.(1990a). Recombinant herpesviral proteins produced by cell-free translation provide a novel approach for the mapping of T lymphocyte epitopes. *J. Immunol.* 145:718-723.
- Leist T.P.**, Kohler M. and Zinkernagel R.M. (1989). Impaired generation of anti-viral cytotoxicity against lymphocytic choriomeningitis and vaccinia virus in mice treated with CD4+ specific monoclonal antibody. *Scand. J. Immunol.* 30:679-686.
- Levings R.L.** (1984). The effect of some common inactivation procedures on the antigens of bovine herpes virus-1. *Vet. Microb.* 9:313-328.
- Liang X.P.**, Babiuk L.A. and Zamb T.J. (1992). An in vivo study of a glycoprotein gIII-negative bovine herpesvirus 1 (BHV-1) mutant expressing beta-galactosidase: Evaluation of the role of gIII in virus infectivity and its use as a vector for mucosal immunization. *Virology* 189:629-63.
- Liang X.**, Babiuk L.A. and Zamb T.J. (1993a). Mapping of heparin-binding structures on bovine herpesvirus 1 and pseudorabies virus gIII glycoproteins. *Virology* 194: 233-243.
- Liang X.P.**, Tang M., Manns B., Babiuk L.A. and Zamb T.J.(1993b). Identification and deletion mutagenesis of the bovine herpesvirus 1 dUTPase gene and a gene homologous to herpes simplex virus UL49.5. *Virology* 195:42-50.
- Lodmell D.L.**, Niwa A., Hayashi K. and Notkins A.L. (1972). Prevention of cell-to-cell spread of herpes simplex virus by leukocytes. *The Journal of experimental medicine.* 137:706-720.
- Ludwig H.** (1983). *The herpesviruses.* Vol. 2pp:135-214. Plenum, New York.

- Ludwig G.V.** and Letchworth G. J. (1987). Temporal control of bovine herpesvirus 1 glycoprotein synthesis. *J. Virol.* 61:3292.
- Lupton H.W.**, Barnes H.J. and Reed D.E. (1980). Evaluation of the rabbit as a laboratory model for infectious bovine rhinotracheitis virus infection. *Cornell Vet.* 70:77-95.
- Lupton H.W.** and Reed D.E. (1980a). Evaluation of experimental subunit vaccines for infectious bovine rhinotrach. *Am. J. Vet. Res.* 41:383-390.
- Madic J.**, Magdalena J., Quak J. and van Oirschot J.T. (1995). Isotype-specific antibody responses in sera and mucosal secretions of calves experimentally infected with bovine herpesvirus 1. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 46: 267-283.
- Madin S.H.**, York C.J. and Mc Kercher D.G (1956). Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus. *Science* 124:721-722.
- Manickan E.R.J.**, Rouse,Z., Yu Z., Wire, W.S. and Rouse B.T. (1996). Genetic immunization against herpes simplex virus. Protection is mediated by CD4⁺ T lymphocytes. *J. Immunol.* 155:259-265.
- Marshall R.L.** and Letchworth G.J. (1988). Passively administered neutralizing monoclonal antibodies do not protect calves against bovine herpesvirus 1 infection. *Vaccine.*6:343-348.
- Marza M.**, Tibor S., Kucera L., Bognar G., Morein B. (1991). ISCOM of BHV-1 envelope glycoproteins protected calves against both disease and infection. *Zentralbl. Veterinarmed.* 38(4):306-314.
- Matsouka T.**, Folkerts T.M. and Gale C. (1972). Evaluation in calves of inactivated bovine rhinotracheitis and parainfluenza-3 vaccine combined with pasteurella bacterium. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 160: 333-337.
- Mc. Kercher D.G.** (1959). Infectious Bovine Rhinotracheitis. *Adv. vet. Sci.*5:299-328.
- Mc Kercher D.G.**, Bibrack B. and Richards W.P.C. (1970). Effects of the infectious bovine rhionotracheitis virus on the Central Nervous System of cattle. *J.A.V.M.A.* Vol. 156, N° 10.1460-1467.
- Mc Kercher D.G.** and Crenshaw G.L. (1971). Comparative efficacy of intranasally and parenterally administered infectious bovine rhinotracheitis vaccines. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 159:1362-1369.
- McCarthy R.E.**, Arnold L.W. and Babcock G.F. (1977). Dextran sulphate: an adjuvant for cell-mediated immune responses. *Immunol.* 32:963-974.

- McCluskey R.T.** and Cohen S. eds. (1974). Mechanisms of cell-mediated immunity. J. Wiley and Sons. New York.
- McGuire T.C., Musoke A.J. and Kurtti T.** (1979). Functional properties of bovine IgG1 and IgG2: interaction with complement, macrophages, neutrophils and skin. *Immunology* 38:249.
- McGuire R.L. and Babiuk L.A.** (1984). Evidence for detective neutrophil function in lungs of calves exposed to infectious bovine rhinotracheitis virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 4:259
- McKercher D.G., Moulton J.E. and Jasper D.E.** (1954). Virus and virus-like cattle disease entities new to California. Proc. 58th Annual Meeting. U.S. Livestock Sanit. Assoc., 226.
- McLain D.S. and Fuller A.O.** (1994). Cell-specific kinetics and efficiency of herpes simplex virus type 1 entry are determined by two distinct phases of attachment. *Virology* 198:690-702.
- Mellstedt H.** (1975). In vitro activation of human T and B lymphocytes by pokeweed mitogen. *Clin. Exp. Immunol.* 19:75-82.
- Merberg D., Wolf S. and Clark S.C.** (1992). Sequence similarity between NKSF and the IL-6/G-CSF family. *Immunol. Today.* 13:77-78.
- Merigan T.C. and Stevens D.A.** (1971). Viral infections in man associated with acquired immunological deficiency states. *Fed. Proc.* 30(6):1858-1864.
- Mettenleiter T. C.** (1994). Initiation and spread of alphaherpesvirus infections. *Trends Microbiol.* 2: 2-4.
- Meyer G., Hanoon E., Georlette D., Pastoret P. and Thiry E.** (1998). Bovine herpesvirus type 1 glycoprotein H is essential for penetration and propagation in cell culture. *Journal of Gen. Virol.* 79:1983-1987.
- Milks L.C., Conyers G.P. and Cramer E.B.** (1986). The effect of neutrophil migration on epithelial permeability. *J. Cell. Biol.* 103:2729-2738.
- Miller J.M.** (1955). Infectious necrotic rhinotracheitis of cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 126:463.
- Miller J.M., Whetstone C.A., Bello L.J. and Lawrence W.C.** (1991). Determination of ability of a thymidine kinase-negative deletion mutant of bovine herpesvirus-1 to cause abortion in cattle. *Am. J. Vet. Res.* Vol. 52, N° 7:1038-1043.
- Miller-Edge M. and Splitter G.** (1986). Patterns of bovine T cell-mediated immune responses to bovine herpesvirus 1. *Vet. Immunol. and Immunopathol.* 13:301-319.

- Milligan G. N.** and Bernstein D.I. (1997). Analysis of herpes simplex virus-specific T cells in the murine female genital tract following genital infection with herpes simplex virus type 2. *Virology*.212:481-489.
- Misra V.**, Blumenthal R.M. and Babiuk L.A. (1981). Proteins specified by bovine herpesvirus 1 (Infectious Bovine Rhinotracheitis virus). *J. Virol.* 40:367-378.
- Misra V.**, Babiuk L.A. and Darcel C. le Q. (1983). Analysis of bovine herpes virus type 1 isolates by restriction endonuclease fingerprinting. *Archives of virology.* 76:341-354.
- Mohanty S.B.**, Lilie M.G., Corseilius N.P. and Beck D.J. (1972). Natural infection with infectious bovine rhinotracheitis virus in goats. *J. Am. Vet.med. Assoc.* 160:879-880.
- Morrison L.A.** and Knipe D.M. (1997). Contribution of antibody and T cell subsets to protection elicited by immunization with a replication-defective mutant of herpes simplex virus type 1. *Virology.* 239:315-326.
- Mosmann T.R.**, Cherwinski H., Bond M.W., Giedlin A. and Coffman R.L.J. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136: 2348.
- Murray R.**, Cohen P. and Hardegee M.C. (1972). Mineral oil adjuvants: Biological and chemical studies. *Ann.Allergy* 30:146.
- Nahmias A.J.**, Hirsch M.S., Kramer J.H. and Murphy F.A. (1972). Effect of antithymocyte serum on herpesvirus Hominis (type 1) infection in adult mice. *Pro. Soc. Exp. Biol. Med.* 132:696-698.
- Nansen P.** (1983). *Acta Pathologica et Microbiologica. Scandinavica section B.* 80:49. 1972.
- Narita M.**, Inui S., Nanba K. and Shinuzu Y. Detection of virus particles in trigeminal ganglion cells in a calf recurrently infected with infectious bovine rhinotracheitis. *Jpn. Vet. Sci.* 45(5): 691-693.
- Nash D.R.** Halstead A.C., Stenhouse and McCue C. (1971). Non specific factors in monkeys tissues and serum causing inhibition of plaque formation and hemagglutination by dengue virus. *Infect. Immun.*3:193-199.
- Nettleton P.F.** and Sharp J.M. (1980). Infectious bovine rhinotracheitis virus excretion after vaccination . *Veterinary record.* 107:379.
- Niblack J.F.**, Otterness I.G., Hemsworth G.R., Wolff J.S., Hoffman W.W. and Kraska A.R. (1979). Cp-20961: A structurally novel, synthetic adjuvant. *J. Reticuloendothel. Soc.* 26:655-666.

- Nyaga P.N.** and **Mc Kercher D.G.** (1980). Pathogenesis of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) infections: interactions of the virus with peripheral bovine blood cellular components. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2:587-602.
- Okazaki K.**, **Honda E.** and **Kono Y.** (1992). Heparin binding domain of bovid herpesvirus 1 glycoprotein gIII. *Archives of Virology.* 66:3888-3892.
- Onstad O.** and **Saxegaard F.** (1967). Outbreaks of vaginitis and balanitis in swine. Clinical and pathological findings. *Nord. Vet. Med.* 19:49-53.
- Oppenheim J.J.**, **Leventhal B.G.** and **Hersh E.M.** (1968). The transformation of column purified lymphocytes with nonspecific and specific antigenic stimuli. *J. Immunol.* 101:262-270.
- Osebold J.W.** (1982). Mechanisms of action by immunologic adjuvants. *J.A.V.M.A.* 181(10):983-986.
- Palmer L.D.**, **Leary T.P.**, **Wilson D.M.** and **Spliteter G.A.** (1990). Bovine natural killer-like cell responses against cell lines expressing recombinant bovine herpesvirus type- 1 glycoproteins. *J. Immunol.* 145:1009-1014.
- Pastoret P.P.**, **Burtonboy G.**, **Aguilar-Setien A.** and **Shoenaers F** (1978). Mesure de l' excretion du virus de la rinotracheite infectieuse bovine après inoculation experimentale. *Ann. Med. Vet.* 122:441.
- Pastoret P.P.** and **Thiry E.** (1985). Diagnosis and prophylaxis of infectious bovine rhinotracheitis: the role of virus latency. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 8: 35-42.
- Peeters B.N.** **De Wind M.**, **Hooisma F.**, **Wagenaar A.**, **Gielkens** and **Moorman R.** (1992). Pseudorabies virus envelope glycoproteins gp50 and gII are essential for virus penetration, but only gII is involved in membrane fusion . *J. Virol.* 66:894-905.
- Perez Filgueira D.M.**, **Berinstein A.**, **Stmitsaart E.**, **Borca M.V.** and **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.
- Pérez Filgueira D.M.**, **Wigdorovitz A.**, **Zamorano P.I.**, **Ostermann W.**, **Fernández F.M.**, **Romera A.**, **Borca M.V.** and **Sadir A.M.** (1999). Effect of Mycobacterium sp. Wall and Avridine on the antibody response, IgG isotype profile and proliferative response induced by foot and mouth disease virus (FMDV) vaccination in cattle. *Vaccine* 17:345-352.
- Peters A.R.** (1987). Vaccines for respiratory disease in cattle. *Vaccine* 5: 64.

- Pfizenmaier K.**, Starzinski-Powitz A., Rollingshoff M., Falke D. and Wagner H. (1977). T-cell-mediated cytotoxicity against herpes simplex virus-infected target cells. *Nature*. 265:630-632.
- Pidone C.L.** (1995). Estudio comparativo de cepas de virus herpes bovino-1 aisladas en la Argentina mediante patrones de restricción de ADN. Tesis Doctoral. Fac. Cs Veterinarias. Universidad de Bs As.
- Plummer G.**, Goodheart C.R., Henson D. and Bowling C.P. (1969). A comparative study of the DNA density and behavior in tissue cultures of fourteen different herpesviruses. *Virology* 39:134-137.
- Poffenberger K.L.** and Roizman B. (1985). Studies on non-inverting genome of a viable herpes simplex virus 1. Presence of head-to-tail linkages in packaged genomes and requirements for circularization after infection. *J. Virol.* 53:589-595.
- Porter P.** (1973). Functional heterogeneity of the bovine immune system. *J.A.V.M.A.* 163: 789-794.
- Porter D.D.**, Larsen A.E. and Cox N.A. (1975). Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from Mustelidae. *J. clin. Microbiol.* 1:112-113.
- Porterfield J.S.** and Rowe C.E. (1960). Hemagglutination with arthropod-borne viruses and its inhibition by certain phospholipids. *Virology* 11:765-770.
- Pospisil Z.**, Krejčí J., Jínek P., Lány P., Zedulková D. and Cíhal P. (1996). Development of a disease control programme based on the use of an inactivated vaccine against infectious bovine rhinotracheitis. *Vet. Microbiol.* 53:199-206.
- Raffel S.** (1961). *Immunity* Appleton-Century-Crofts, New York.
- Rager-Zisman B.** and Brown B.R (1974). Immunological destruction of herpes simplex virus infected cells. *Nature* 251:542.
- Ramanathan V.D.**, Bedenoch-Jones P. and Turk J.L. (1979). Complement activation by aluminium zirconium compounds. *Immunology.* 37: 881.
- Reddy D.N.**, Blecha F., Minocha H.C., Anderson G.A., Morrill J.L., Fedorka-Cray P.J. and Baker P.E. (1989). Bovine recombinant interleukin-2 augments immunity and resistance to bovine herpesvirus infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 23(1-2):61-74.
- Reddy D.N.**, Reddy P.G., Minocha H.C., Fenwick B.W., Baker P.E., Davis W.C. and Blecha F. (1990). Adjuvanticity of recombinant bovine interleukin-1 beta: influence on immunity, infection, and latency in a bovine herpesvirus-1 infection. *Lymphokine Res.* 9(3):295-307.

- Reddy D.N., Reddy P.G., Xue W., Minocha H.C., Daley M.J. and Blecha F. (1993).** Immunopotential of bovine respiratory disease virus vaccine by interleukin-1 beta and interleukin-2. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 37(1):25-38.
- Reed C.J. and Muench H.A. (1938)** A simple method of estimating fifty per cent end points. *Am. J. Hyg.* 27:493.
- Rice C.E. (1968).** Comparative serology of domestic animals. *Adv. Vet. Sci.* 12:105-162.
- Rodak K.L., Pospisil Z. and Hampl J. (1983).** A study of the dynamics of the production of class-specific antibodies to infections bovine rhinotracheitis (IBR) virus in calves using a solid-phase radioimmunoassay. *Zbl. Vet. Med. B.* 30:708-715.
- Roizman B., Carmichael F., Deinhardt G., Nahmias A.J., Plowright W., Rapp F., Sheldrick P., Takahashi M. and Wolf K. (1981).** Herpesviridae: Definición, nomenclatura provisional y taxonomía. *Intervirology.* 16:201-207.
- Roizman B., Carmichael L.E., Deinhardt F., Nahmias A.J., Plowright W., Rapp F. Sheldrick P., Takahashi M. and Wolf K. (1982).** *Intervirology* 16:201-217.
- Roizman B., Derosiers R.C., Fleckenstein B., López C., Minson A.C. and Studdert M.J. (1992).** The family Herpesviridae: an update. *Arch. Virol.* 123:425-449.
- Rosenberg G.L., Farber P.A. and Notkins A.L. (1972).** In vitro stimulation of sensitized lymphocytes by herpes simplex virus and vaccinia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69:756-760.
- Rosenthal A.S. and Shevach E.M. (1973).** Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 138:1194-1212.
- Roth J.A. and Kaeberle M.L. (1985).** Enhancement of lymphocyte blastogenesis and neutrophil function by Avridine in dexametasone-treated and non treated cattle. *Am. J. Vet. Res.* 46:53-57.
- Rouse B.T. and Babiuk L.A. (1974).** Host defense mechanisms against infectious bovine rhinotracheitis virus: In vitro stimulation of sensitized lymphocytes by virus antigens. *Infect. Immun.* 10:681-687.
- Rouse B.T. and Babiuk L.A. (1975).** Host defense mechanisms against infectious bovine rhinotracheitis virus II. Inhibition of viral plaque formation by immune peripheral blood lymphocytes. *Cell Immun.* 17:43-56.
- Rouse B.T., Wardley R.C. and Babiuk L.A. (1976).** The role of antibody-dependent cytotoxicity in recovery from herpesvirus infections. *Cell Immunol.* 22:182-186.

Rouse B.T., Wardley R.C. and Babiuk L.A. (1976a). Antibody dependent cell mediated cytotoxicity in cows: comparison of effector cell activity against heterologous erythrocyte and herpes virus infected bovine target cells. *Infection and Immunity* 13:1433-1448.

Rouse B.T. and Babiuk L.A. (1977). The direct antiviral cytotoxicity of bovine lymphocytes is not restricted by genetic incompatibility of lymphocytes and target cells. *J.Immunol.* 188:618-624.

Rouse B.T., Grewal A.S., Babiuk L.A. and Fujimiya Y. (1977a). Enhancement of antibody dependent cell toxicity of herpesvirus infected cells by complement. *Infect. Immun.* 18:660-665.

Rouse B.T. and Babiuk L.A. (1978). Mechanisms of recovery from Herpesvirus infection. A review. *Can. J. Comp. Med.* 42:414-427.

Rouse B.T., Babiuk L.A. and Henson P.M. (1978a). Neutrophils are mediators of antiviral immunity. *Experientia.* 34:346-348.

Rouse B.T. and Horohov D.W. (1984). Cytotoxicity T lymphocytes in herpes virus infection. *Vet. Immun. And Immunop.* 6:35-66.

Rutten V.P.M.G., Wentink G.H., de Jong W.A.C., van Exsel A.C.A. and Hensen E.J. (1990). Determination of BHV-1 specific immune reactivity in naturally infected and vaccinated animals by lymphocyte proliferation assays. *Vet. Immunol. and Immunopathol.* 25:259-267.

Rweyemamu M., Umehara O., de Luca-Neto D., Baltazar Mde C., Vicente F.E., Medeiros-Neto R. (1986). Efficacy of avridine as an adjuvant for new-castle disease virus antigen in chickens. *Am. J. vet. Res.* 46:1243-1248.

Sadir A.M., Zamorano P.I., Romera S.A., Wigdorovitz A., Smitzaart E., Marangunich L.; Schappacassi C. and Borca M. V. (1999). Improvement of the immune response to the foot and mouth disease vaccines in young animals using Avridine as adjuvant. *Veterinary Immunology and Immunopathology,* 6148:1-12.

Savan M., Angulo A.B. and Derbyshirf J.B. (1979). Interferon, Antibody Responses and Protection Induced by an intranasal Infectious Rhinotracheitis Vaccine. *Can. Vet.* 20:207-210.

Saxegaard F. and Onstad O. (1967). Isolation and identification of IBR-IPV virus from cases of vaginitis and balanitis in swine and from healthy swine. *Nord. Vet. Med.* 19:54-57.

- Schipper L.A.** and Kelling C.L (1975). Evaluation of inactivated infectious bovine rhinotracheitis vaccines. *Can. J. Comp. Med.* 39: 402-405.
- Schmidd D.S.** (1988). The human MHC-restricted cellular response to herpes simplex virus type 1 is mediated by CD4+, CD8-T cells and is restricted to the DR region of the MHC complex. *Journal of Immunology* 140:3610-3616.
- Schroeder R.J.** and Moys M.D. (1954). An acute respiratory infection of dairy cattle. *J.Am. Vet. Med. Assoc.* 125:471.
- Schroeder E.L.** and Easterday B.C. (1968). Studies on the pathogenesis of infectious bovine rhinotracheitis following aerosol exposure. *Cornell. Vet.* 58:442.
- Schroder C., Linde G., Fehler F. and Keil G.M.** (1997). From essential to beneficial: glycoprotein D loses importance for replication of bovine herpesvirus 1 in cell culture. *Virology* 71:25-33.
- Schudel A.A., Carrillo B.J., Wyler R. and Metzler A.E.** (1986). Infectious of calves with antigenic variants of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurological disease. *J. Vet. B.* 33:303-310.
- Schudel A.A.** (1987). Rodríguez, M y Carrillo, B.J. Biotecnología en el diagnóstico, caracterización y prevención de la encefalitis bovina a BHV-1. INTA informa.
- Schwzyer M., Vlcek C., Menekse O., Fraefel C. and Paces V.** (1993). *Virology* 197:349-357.
- Schwzyer M. and Ackermann M.** (1996). Molecular virology of ruminant herpesviruses. *Vet. Microbiol.* 53: 17-29.
- Seal B.S., St. Jeor S.C and lee Taylor R.E.** (1985). Restriction endonuclease analysis of bovine herpesvirus 1 DNA and Nucleic acid homology between isolates. *J.Gen. Virol.*66:2787-2792.
- Sethi K.K., Omata Y. and Shneweis K.E.** 1983. Protection of mice from lethal herpes simplex virus type 1 infection by adoptive transfer of cloned virus-specific and H-2-restricted cytotoxic T lymphocyte. *J. Gen. Virol.* 64: 443-447.
- Siddiqui W.A., Kan S.C., Kramer K., Case and Palmer K.** (1981). Use of a synthetic adjuvant in an effective vaccination of monkeys against malaria. *Nature.* 289:64-66. 1981
- Sin J., Kim J., Boyer J.D., Ciccarelli R., Higgins T.J. Weiner D.** (1999) In vivo modulation of vaccine-induced immune responses toward a Th1 phenotype increases potency and vaccine effectiveness in Herpes Simplex Virus type 2 mouse model. *J. Virol.* 73(1):501-509.

- Smith P.C.** (1978). Experimental infectious bovine rhinotracheitis virus infections of English ferrets (*Mustela putorius furo* L.). *Am. J.vet.Res.* 39:1369-1372.
- Smith P.M., Zhang Y., Jennings S.R. and O'Callaghan D.J.** (1998). Characterization of the cytolytic T-lymphocyte response to a candidate vaccine strain of equine herpesvirus 1 in CBA mice. *Journal of virology*. 72(7):5366-5372.
- Smitssart E.N., Bratanich A.C., Ruiz M., Sardi S., Blancoviera F.J., Leon E., Gonzalez, Pugliese M. and Schudel A.A.** (1987). Comportamiento inmunogénico de vacunas inactivadas polivalentes para herpesvirus bovino1 *Rev. Med. Vet. (Bs As)*. 68:3. 148-154.
- Smorodintsev A.A.** (1960). Basic mechanisms of non specific resistance to viruses in animals and man. *Adv. Virus Res.* 7:327-376.
- Snowden W.A.** (1965). The IBR-IPV virus: reaction to infection and intermittent recovery of virus from experimentally infected cattle. *Aust. Vet. J.* 41:135.
- Sodeik B., Ebersold M.W. and Helenius A.** (1997). Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J. Cell Biol.* 136: 1007-1021.
- Soulebot J.P., Guillemin F., Brun A., Dubourget P., Espinase J. and Terre J.** (1982). Infectious bovine rhinotracheitis: Study on the experimentally induced disease and its prevention using an inactivated adjuvated vaccine. *Develop. Biol. Standart.* 52:463-483.
- Splitter G.A., Eskra L. and Abruzzini A.F.** (1988). Cloned bovine cytolytic T cells recognize bovine herpes virus-1 in a genetically restricted, antigen-specific manner. *Immunology* 63:145-150.
- St. George T.D. and Philpott M.** (1972). Isolation of infectious bovine rhinotracheitis from the prepuce of water buffalo bulls in Australia. *Aust. Vet. J.* 48:126.
- Staruch M.J. and Wood D.D.** (1983). The adjuvanticity of interleukin 1 in vivo. *J. Immunol.*130:2191-2194.
- Stokes A. and Wardley R.C** (1988). ADCC and complement-dependent lysis as immune mechanisms against EHV-1 in the horse. *Research in Veterinary Science.* 51:141-148.
- Straub O.C.** (1984). *Latent herpes virus infectious in veterinary medicine* (Eds. G. Wittmann R.M Gaskell H.J Rziha). Martinus Nijhoff Publishers, Boston.
- Studdert M.J., Brake F. and Browning G.F.** (1985). Bovine encephalitis herpesvirus is different from bovine herpesvirus 1 and from other ruminant herpesviruses. *Proceedings. International Conference of Veterinary Preventive medicine and Animal Production:* 149-150.

- Studdert M.J.** (1989). Bovine encephalitis herpesvirus. *Vet. Rec.* 125, 58 II:584.
- Studder M. J.** (1994). Bovine herpesvirus. *Encyclopedia of Virology*. Edit by R.G. Webster and A. Granoff (Academic Press). Great Britain, Vol.1:155-158.
- Suarez Heinlein A.** (1992). Caracterización molecular y diagnóstico rápido de herpesvirus bovino-1. Tesis Doctoral. Fac. Cs. Exactas. Univ. Bs.As.
- Talcott P.A., Koller L.D., Woodard L.F. and Whitbeck G.A.** (1986). Opposing effects of the interferón inducer, avridine: enhancement or suppression of tumor growth depending on treatment regimen. *Int. J. Immunopharmacol.* 8:553-559.
- Thorne K.J., Noman J.M., Haydock S.F., Lamma D.A. and Duffus P.H.** (1984). Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against IBR-infected bovine kidney cells by ruminant neutrophils: the role of liposomal cationic protein. *Immunology.* 53(2):275-282.
- Tikoo S., Campos M. and Babiuk L.** (1995). Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): biology, Pathogenesis, and Control. *Adv. Virus Research.* 45:191-223.
- Todd J.D., Volenec F.J. and Paton I.M.** (1972). Interferon in nasal secretions and sera of calves after intranasal administration of avirulent infectious bovine rhinotracheitis virus: Association of interferon in nasal secretions with early resistance to challenge with virulent virus. *Infect. Immun.* 5: 699-706.
- Todd J.D.** (1974). Development of intranasal vaccination for the immunization of cattle against infectious bovine rhinotracheitis. *Can Vet. J.* 15:257-259.
- Tsvetkov P., Pavlov V., Kalcheva M., Ivanov T. and Botsova L.** (1987). Cellular and humoral immune responses in calves after experimental infection with bovine herpesvirus 1. *Vet. Med. Nauki.* 24(8):17-22.
- Van der Poel W.H.M., Kramps J.A., Quak J., Brand A. and Van Oirschot J.T.** (1995). Persistence of bovine herpesvirus-1-specific antibodies in cattle after intranasal vaccination with a live virus vaccine. *Vet. Rec.* 137: 347-348.
- Van Drunen Littel-van den Hurk S. and Babiuk L.A.** (1986a). Synthesis and processing of bovine herpesvirus- 1 glycoproteins. *J. Virol.* 59:401-410.
- Van Drunen Littel-van den Hurk S. and Babiuk L.A.** (1986b). Polypeptide specificity of the antibody response after primary and recurrent infection with bovine herpesvirus 1. *Journal of clinical Microbiology.* 23(2):274-282.
- Van Drunen Littel-van den Hurk S., Parker M.D., Massie B., van den Hurk J.V., Harland R., Babiuk L.A and Zamb J.T.** (1993). Protection of cattle from BHV-1 infection by immunization with recombinant glycoprotein gIV. *Vaccine.* 11(1):25-35.

- Van Drunen Littel-van den Hurk S., Tikoo S.K., Liang X. and Babiuk L.A. (1993a).** Bovine Herpesvirus vaccines. *Immunol. And Cell Biology* 71:405-420.
- Van Drunen Littel-van den Hurk S., Van Donkersgoed J., Kowalski J.V., Van den Hurk R., Harland L.A., Babiuk L.A. and Zamb T.J. (1994a).** A subunit gIV vaccine produced by transfected mammalian cells in culture, induce mucosal immunity against bovine herpesvirus-1 in cattle. *Vaccine* 12.14: 1295-1302.
- Van Oirschot J.T., Straver P.J., van Lieshout J.A.H., Quak J., Westenbrink F. and van Exsel A.C.A. (1993).** A subclinical infection of bulls with bovine herpesvirus type 1 at an artificial insemination centre. *The Veterinary Record.* 132:32-35.
- Vitetta E.S., Fernandez-Botran R., Myers C.D. and Sanders V.M. (1989).** Cellular interactions in the humoral immune response. *Adv. Immunol.*45:1-105.
- Waldron J.A., Horn R.G. and Rosenthal A.S. (1973).** Antigen induced proliferation of guinea pig lymphocytes in vitro: Obligatory role of macrophages in the recognition of antigen by immune T lymphocytes. *J. Immunol.* 111:58-64.
- Wardley R.C., Rouse B.T. and Babiuk L.A. (1976).** Antibody-dependent cytotoxicity mediated by neutrophils: a possible mechanisms of antiviral defense. *J. Reticuloendothelial. Soc.* 19:323-332.
- Wellems G. and Leunen J. (1974).** Le tropisme digestif du virus IBR. II examenes serologiques. *Ann. Méd. Veét.* 118:243.
- Wentink G.H., Rutten V.P.M.G., van Exsel A.C.A., de Jong W.A.C., Vleugel H. and Hensen E.J. (1990).** Failure of an in vitro lymphoproliferative assay to detect immunised or latently infected animals. *The Vet. Quarterly.* 12(3): 175-182.
- West K. and Ellis J. (1997).** Functional analysis of antibody responses of feedlot cattle to bovine respiratory syncytial virus following vaccination with mixed vaccines. *Can. J.Vet.Res.* 61:28-33.
- Whetstone C.A., Wheeler J.G. and Reed D.E. (1986).** Investigation of possible vaccine induced epizootics of infectious rinotracheitis, using restriction endonuclease analysis of viral DNA. *Am.J. Vet. Res* 47: 1789-1795.
- Wigdorovitz A., Zamorano P., Borca M. and Sadir A. (1998).** Modulation of the antigen presentation activity in foot and mouth disease virus (FMDV) vaccines by two adjuvants: avridine and a water soluble fraction of *Mycobacterium* sp. *Vaccine.* 16(179):1627-1632.
- Wild P., Schraner E.M., Peter J., Loepfe E. and Engels M. (1998).** Novel entry pathway of bovine herpesvirus 1 and 5. *Journal of Virology* 72 (12): 9561-9566.

- Wirth U.V., Fraefel C., Vogt B., Vlcek C., Places V. and Schwyer M. (1992).** Immediate-early RNA 2.9 and early RNA 2.6 of bovine herpesvirus 1 are 3' coterminal and encode a putative zinc finger transactivator protein. *J. Virol.* 66:2763-2272.
- Wood P.R. and Seow H.F. (1996).** T cell cytokines and disease prevention. *Vet. Immunol. And Immunopathol.* 54:33-44.
- Woodard L.F., Jasman R.L., Farrington D.O. and Jensen K.E. (1983).** Enhanced antibody-dependent bactericidal activity of neutrophils from calves treated with a lipid amine immuno potentiator. *Am. J. Vet. Res.* 44:389-394.
- Woodard L.F. and Jasman R.L. (1985).** Stable oil-in-water emulsions: preparations and use as vaccine vehicles for lipophilic adjuvants. *Vaccine.* 3:137-144.
- Worku M., Paape M.J., Filep R. and Miller R.H. (1994).** Effect of in vitro and in vivo migration of bovine neutrophils on binding and expression of Fc receptors for IgG₂ and IgM. *Am. J. Vet. Res.* 55(2):221-226.
- Wyler R., Engels M. and Schwyzer M. (1989).** Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis BHV-1. In: G. Wytman and Becker (ed). *Herpesvirus disease of cattle, horses and pigs. Developments in veterinary virology ser.* Kluwer Academics Publishers, Boston: 1-72.
- Wynkler M. T. C., Doster A. and Jones C. (1999).** Bovine herpesvirus 1 can infect CD4⁺ T lymphocytes and induce programmed cell death during acute infection of cattle. *J. Virol.* 73: 8657-8668.
- Wynkler M.T.C., Doster A. and Jones C. (2000).** Persistence and Reactivation of bovine Herpesvirus 1 in the tonsils of latently infected calves. *Journal of Virol.* 74(11):5337-5346.
- Yates W.D.G. (1982).** A review of infectious Bovine Rhinotracheitis. Shipping Fever pneumonia and viral-Bacterial Synergism in respiratory disease of cattle. *Can. J. Comp. Med.* 46:225-263.
- Zheng Z., Mayo D.R. and Hsiung G.D. (1983).** Effect of CP20961 on genital herpes in guinea pigs. *Antiviral Res.* 3:275-283.
- Zhu X. and Letchworth G.J. (1996).** Mucosal and ystemic immunity to bovine herpesvirus-1 glycoprotein D confer resistance to viral replication and latency in cattle. *Vaccine.* 14(1):61-69.
- Zygraich N., Lobmann M. and Vasdcoboinic E. (1974).** In vivo and in vitro properties of a temperature sensitive mutant of infectious bovine rhinotrachetitis virus. *Rews. Vet. Sci.* 16:328-335.