

## Tesis de Posgrado

# Nuevas vacuna contra herpesvirus bovino tipo 1 : Desarrollo de una cepa viral con patrón antigénico diferencial con respecto al de las cepas circulantes en el campo

Puntel, Mariana

2002

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas 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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

#### Cita tipo APA:

Puntel, Mariana. (2002). Nuevas vacuna contra herpesvirus bovino tipo 1 : Desarrollo de una cepa viral con patrón antigénico diferencial con respecto al de las cepas circulantes en el campo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3434\\_Puntel.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3434_Puntel.pdf)

#### Cita tipo Chicago:

Puntel, Mariana. "Nuevas vacuna contra herpesvirus bovino tipo 1 : Desarrollo de una cepa viral con patrón antigénico diferencial con respecto al de las cepas circulantes en el campo". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2002.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3434\\_Puntel.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3434_Puntel.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
DEPARTAMENTO DE QUIMICA BIOLOGICA**

**NUEVAS VACUNAS CONTRA HERPESVIRUS BOVINO TIPO 1:  
DESARROLLO DE UNA CEPA VIRAL CON PATRÓN  
ANTIGÉNICO DIFERENCIAL CON RESPECTO AL DE LAS  
CEPAS CIRCULANTES EN EL CAMPO**

**Lic. Mariana Puntel**

**Directora: Dra. Ana María Sadir**

**Instituto de Virología  
Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas  
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. INTA-Castelar.**

**Tesis para optar por el grado de Doctor de la Universidad de Buenos Aires.**

**Buenos Aires - Marzo del 2002**

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**  
**DEPARTAMENTO DE QUIMICA BIOLÓGICA**

**NOVEL VACCINES AGAINST BOVINE HERPESVIRUS TIPE 1:  
DEVELOPMENT OF A VIRUS STRAIN WITH A DIFFERENTIAL  
ANTIGENIC PATTERN RESPECT TO THE STRAINS  
CIRCULATING IN THE FIELD**

**Lic. Mariana Puntel**

**Directora: Dra. Ana María Sadir**

**Instituto de Virología**  
**Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas**  
**Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. INTA-Castelar.**

**Tesis para optar por el grado de Doctor de la Universidad de Buenos Aires.**

**Buenos Aires - Marzo del 2002**

El presente desarrollo se realizó con los valiosos aportes del Dr. Manuel V. Borca y la Dra. Consuelo Carrillo, Instituto de Virología, INTA-Castelar.

Parte del presente proyecto fue llevado a cabo en colaboración con Dr. F. Maleandi, San Jorge-Bagó; y Dr. S.I. Chowdhury, Kansas State University, US.

El presente trabajo se desarrolló con financiación proveniente del subsidio competitivo BID 802 OC-AR PMT/ PIT 053, del año 1999.

La cepa viral desarrollada se encuentra en proceso de depósito con fines de patentamiento, en la American Tissue Culture Collection.

La cepa viral desarrollada, así como las vacunas estudiadas se encuentran en proceso de patentamiento frente al Instituto Nacional de la Propiedad Industrial de la República Argentina.

## RESUMEN

*Se obtuvo la cepa HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal, a partir de la cepa HVB-1 LA en la cual el gen de la glicoproteína E (gE) fue reemplazado por el gen de la enzima  $\beta$ galactosidasa, por técnicas de ingeniería genética. La cepa fue caracterizada tanto a nivel genómico y antigénico, como en cuanto a sus propiedades de crecimiento en cultivo celulares.*

*La inmunogenicidad de la cepa HVB-1 $\Delta$ gE- $\beta$ gal se mantuvo intacta, comparada con la cepa parental, cuando se la utilizó como un inmunógeno inactivado y permitió la diferenciación entre animales vacunados e infectados en base a su respuesta de anticuerpos.*

*Utilizado como vacuna atenuada, HVB-1 $\Delta$ gE- $\beta$ gal indujo una buena respuesta inmune específica que resultó protectora frente al desafío viral, independientemente de la vía de inoculación. Además, se comprobó la seguridad de la cepa HVB-1 $\Delta$ gE- $\beta$ gal ya que, en las condiciones de la experiencia, no se transmitió por contacto, ni fue abortigénica.*

*Asimismo, se verificó la respuesta inmune diferencial inducida frente a la vacunación con la cepa desarrollada, con respecto a la inducida por la infección viral. La respuesta inducida por la vacuna atenuada en bovinos adultos fue sostenida durante 330 días y se mantuvo negativa contra gE.*

*La vacuna atenuada fue altamente inmunogénica tanto cuando fue administrada en animales adultos como en terneros jóvenes. En particular, en aquellos bovinos que al momento de la vacunación tenían 3 meses de vida, hijos de madres vacunadas y que por lo tanto contaban con niveles detectables de anticuerpos específicos. Si bien se evidenció un efecto de interferencia de los anticuerpos maternos frente al desarrollo de una respuesta inmune específica, fue posible detectar el aumento de los anticuerpos frente a una revacunación realizada cuando los bovinos contaban con 8 meses de vida (160dpv).*

**Palabras clave:** *Herpesvirus bovino-1, cepa HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal, vacuna atenuada, respuesta inmune, anticuerpos calostrales.*

## ABSTRACT

*A glycoprotein E gene-deleted and  $\beta$ gal expressing bovine type 1 recombinant (BHV-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal) was developed by deleting the glycoprotein E (gE) gene and replacing it by the  $\beta$ galactosidase coding region, into the BHV-1 LA parental strain. The new BHV-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal strain was characterized both by genetic, antigenic, as well as related to its properties about growing in tissue culture conditions.*

*The immunogenicity of the strain BHV-1 $\Delta$ gE- $\beta$ gal was maintained intact compared with the parental strain and allowed immunologic differentiation between infected and vaccinated animals in studies as an inactivated vaccine made in bovines. At the same time, bovines resulted protected against virus infection in a challenge experience.*

*Pathogenicity of BHV-1 $\Delta$ gE- $\beta$ gal virus in calves was mild and the immune induced response was protective against virus challenge with the parental strain, independently of the inoculation route used for the live vaccine. In addition, it was demonstrated the security of the live vaccine none abortigenic effect or change in the pregnancy period were observed; neither transmission between vaccinated and unvaccinated bovines.*

*It was verified a differential immune response to the live BHV-1 $\Delta$ gE- $\beta$ gal strain when compared to the virus infection, and the long lasting immunity during 330 days since vaccination.*

*The live vaccine was highly immunogenic as well in adults bovine as in young calves. In particular, in those calves that were 3 months old at vaccination time born from vaccinated seropositive heifers, it was detected interference effect on the immune response of the calf but that effect disappeared when the same vaccinated calves were 8 months old. It was possible to detect a rise in the humoral response level when the calves were first vaccinated at 3 months of age and revaccinated at 8 months of age.*

**Key words:** *Bovine Herpesvirus-1, BHV-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal strain, attenuated vaccine, immune response, colostral antibodies.*

*A mis padres,*

*A mis hermanos*

*Y a mis amigos*

*Con quienes quiero compartir la felicidad de este escalón más, juntos.*

**GRACIAS**

*A mi familia y mis amigos*

*A Alcira y Diego, Viviana y Daniel, por todo*

*A Alejandra y Patricia por su apoyo incondicional*

*A Karina, María José y Andrés por el nido que compartimos a lo largo de  
estos años*

*A Ana Sadir,*

*por la oportunidad de desarrollar este trabajo y de crecer juntas en el  
camino que trazamos.*

*Gracias también Silvina, Anita, Diego, Norberto, Mariano y Oscar por  
todos los consejos, técnicos y de los otros.*

*A Eva, Bety, Sandra y los peones del campo*

*Gracias, a todos!*



## INDICE

	Pág.
<b>I. INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
<b>I.1. El Herpesvirus bovino tipo 1</b>	<b>1</b>
<b>I.2. El ciclo viral</b>	<b>2</b>
<b>I.3. La enfermedad</b>	<b>3</b>
<b>I. 4. Importancia económica de la enfermedad</b>	<b>5</b>
<b>I.5. Situación epidemiológica del HVB-1</b>	<b>6</b>
<b>I.6. Epidemiología y diagnóstico</b>	<b>7</b>
<b>I.7. Respuesta inmune del bovino</b>	<b>8</b>
<b>I.8. Inmunidad del recién nacido</b>	<b>11</b>
<b>I.9. Estrategia viral para la evasión del sistema inmune</b>	<b>13</b>
<b>I.10. Vacunas contra Herpesvirus bovino</b>	<b>14</b>
<b>I.10.a. Vacunas inactivadas convencionales</b>	<b>14</b>
<b>I.10.b. Vacunas atenuadas convencionales</b>	<b>15</b>
<b>I.10.c. Vacunas marcadoras</b>	<b>16</b>
<b>I.10.d. Vacunas vivas vs. vacunas inactivadas</b>	<b>16</b>
<b>I.10.e. Vacunas vivas modificadas</b>	<b>17</b>
<b>I.10.f. Vacunas marcadoras. La clave para el control de la enfermedad</b>	<b>18</b>
<b>I.11. La glicoproteína E candidata para la deleción en una cepa de HVB-1</b>	<b>19</b>
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>22</b>
<b>II.a. Objetivos generales</b>	<b>22</b>
<b>II.b. Objetivos parciales</b>	<b>22</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>24</b>
<b>III.a. Diseño y obtención del vector de recombinación</b>	<b>24</b>
<b>III.a.1. Cepas virales y líneas celulares</b>	<b>24</b>
<b>III.a.2. Titulación viral</b>	<b>24</b>
<b>III.a.3. Purificación viral</b>	<b>24</b>
<b>III.a.4. Aislamiento del ADN viral</b>	<b>25</b>
<b>III.a.5. Diseño de los cebadores utilizados en el proceso de obtención de la cepa HVB-1<math>\Delta</math>gE<math>\beta</math>gal</b>	<b>25</b>
<b>III.a.6. Amplificación de las regiones de interés por reacción en cadena de</b>	<b>26</b>

**la polimerasa**

**III.a.7. Transformación de bacterias *E.Coli* DH5 competentes**

**III.a.8. Obtención del vector de recombinación**

**III.a.9. Preparación de ADN para la selección primaria de clones recombinantes**

**III.a.10. Preparación de ADN para su utilización en el clonado**

**III.a.11. Preparación del ADN plasmídico para la cotransfección.**

**III.a.12. Secuenciación de las regiones flanqueantes al gen gE**

**III.b. Obtención de partículas virales recombinantes**

**III.b.1. Ensayo de transfección**

**III.b.2. Ensayo de cotransfección**

**III.b.3. Selección de clones virales recombinantes**

**III.b.4. Purificación de los posibles recombinantes por plaqueo**

**III.b.5. Marcación de la sonda**

**III.b.6. Southern blot**

**III.b.7. Western blot**

**III.b.8. Ensayos de replicación viral**

**III.b.9. Software utilizado en este trabajo**

**III.b.10. Tratamiento estadístico de los datos**

**III.c. Caracterización inmunogénica de la partícula viral HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal..**

**Prueba de la vacuna inactivada en bovinos**

**III.c.1. Bovinos**

**III.c.2. Inactivación viral**

**III.c.3. Formulación de vacunas inactivadas**

**III.c.4. Diseño experimental de la prueba de protección de la vacuna inactivada**

**III.c.5. Toma de muestras**

**III.c.6. Extracción de ADN de hisopados nasales**

**III.d. Prueba de inmunogenicidad y protección inducidas por la vacuna atenuada**

**III.d.1. Bovinos y diseño experimental de la prueba de protección de la vacuna atenuada**

<b>III.d.2. Seguridad de la vacuna atenuada en cuanto a transmisión vertical</b>	<b>38</b>
<b>III.e. Toma de muestras</b>	<b>38</b>
<b>III.f. Excreción viral</b>	<b>38</b>
<b>III.g. Evaluación de la respuesta humoral específica contra HVB-1</b>	<b>38</b>
<b>III.h. Evaluación de la respuesta humoral específica contra la glicoproteína E de HVB-1</b>	<b>39</b>
<b>III.i Respuesta celular específica contra HVB-1</b>	<b>39</b>
<b>III.i.1.Preparación de linfocitos de sangre periférica</b>	<b>39</b>
<b>III.i.2. Ensayo de linfoproliferación</b>	<b>39</b>
<b>III.i.3. Cuantificación de interferón gamma bovino</b>	<b>40</b>
<b>III.j. Interferencia de anticuerpos maternos</b>	<b>41</b>
<b>III.j.1. Bovinos y diseño experimental</b>	<b>41</b>
<b>III.j.2.a.Terberos de 3 meses de edad</b>	<b>41</b>
<b>III.j.2.a.Terberos de 3 meses de edad</b>	<b>41</b>
<b>III.j.3. Vía de inmunización e inóculo</b>	<b>42</b>
<b>III.k. Inmunogenicidad a largo plazo inducida por la vacuna atenuada</b>	<b>42</b>
<b>IV. RESULTADOS</b>	<b>44</b>
<b>IV.1. Construcción del vector de recombinación</b>	<b>44</b>
<b>IV.2. Obtención de partículas virales recombinantes</b>	<b>45</b>
<b>IV.3. Identificación del ADN recombinante por amplificación específica</b>	<b>45</b>
<b>IV.4. Caracterización genética por Southern blot</b>	<b>46</b>
<b>IV.5. Caracterización proteica por Western blot</b>	<b>46</b>
<b>IV.6. Caracterización de la habilidad replicativa del clon HVB-1<math>\Delta</math>gE<math>\beta</math>gal</b>	<b>47</b>
<b>IV.7. Caracterización inmunogénica de la partícula viral HVB-1<math>\Delta</math>gE<math>\beta</math>gal.</b>	<b>48</b>
<b>Prueba de la vacuna inactivada en bovinos</b>	
<b>IV. 7.a. Respuesta humoral específica contra HVB-1</b>	<b>48</b>
<b>IV.7.a.i. Respuesta de anticuerpos totales</b>	<b>48</b>
<b>IV. 7.a.ii. Respuesta de anticuerpos neutralizantes</b>	<b>48</b>
<b>IV. 7.b. Respuesta celular específica contra HVB-1</b>	<b>49</b>
<b>IV. 7.b.i. Linfoproliferación</b>	<b>49</b>
<b>IV. 7.b.ii. Respuesta de Interferón gamma</b>	<b>49</b>
<b>IV. 7.c. Excreción viral post-desafío</b>	<b>42</b>

IV. 7.d. Sintomatología clínica	53
IV.7.e. Detección de HVB-1 en secreciones nasales y oculares por PCR	53
<b>IV. 8. Prueba de inmunogenicidad y protección inducidas por la vacuna atenuada</b>	<b>54</b>
IV. 8.a. Respuesta humoral específica contra HVB-1	54
IV. 8.a.i. Respuesta de anticuerpos totales en el período pot-vacunación	55
IV. 8.a.ii. Respuesta de anticuerpos totales en el período pot-desafío	55
IV. 8.b. Respuesta celular específica contra HVB-1. Linfoproliferación	56
IV. 8.b.i. Seguridad de la vacuna viva	56
IV. 8.b.ii. Eficacia protectora de la vacuna atenuada	56
IV. 8.b.ii.1. Período post-vacunación	56
IV. 8.b.ii.2. Período post-desafío	56
IV. 8.c. Respuesta de Interferón gamma	56
IV. 8.c.i. Seguridad de la vacuna viva	56
IV. 8.c.ii. Eficacia protectora de la vacuna atenuada	57
IV. 8.c.ii.1. Período post-vacunación	57
IV. 8.c.ii.2. Período post-desafío	57
IV. 8.d. Excreción viral en secreciones nasales	57
IV. 8.d.i. Seguridad de la vacuna viva	57
IV. 8.d.i.1. Transmisión horizontal	57
IV. 8.d.i.1. Transmisión vertical	58
IV. 8.d.ii. Eficacia protectora	58
IV. 8. d. Sintomatología clínica	59
IV. 8.d.i. Seguridad de la vacuna viva	59
IV. 8.d.ii. Eficacia protectora de la vacuna atenuada	60
IV. 8.d.ii.1. Período post-vacunación	60
IV. 8.d.ii.2. Período post-desafío	60
IV.9. Respuesta diferencial contra gE inducida por la cepa marcadora HVB-1ΔgEβgal	60
IV.10. Inmunogenicidad a largo plazo inducida por la vacuna atenuada	61
IV.11. Interferencia de anticuerpos maternos	61
IV.11.a. Respuesta inmune específica en bovinos mayores a 3 meses de vida	61

IV.11.b.Respuesta inmune específica en bovinos mayores a 8 meses de vida	64
V. FIGURAS Y TABLAS	65
VI. DISCUSIÓN	66
VII. CONCLUSIONES	86
VIII. BIBLIOGRAFIA	87

## ABREVIATURAS

HVB-1	Herpesvirus Bovino tipo 1
HVB-5	Herpesvirus Bovino tipo 5
VDVB	Virus de la Diarrea Viral Bovina
PRV	Virus de la Pseudorabia
VHS	Virus Herpes Simplex
VZV	Virus varicella Zoster
LA	Los Angeles
IPV	vulvovaginitis pustular infecciosa
IPB	balanopostitis infecciosa
IBR	rinotraqueítis infecciosa bovina
Us	región única corta
Ul	región única larga
TR	repeticiones terminales
IR	repeticiones internas
LR	proteína relacionada con latencia
LAT	promotor activo durante la latencia
gE	glicoproteína E
ADN	ácido desoxinucleido
ARN	ácido ribonucleido
nm	nanometro
ml	mililitro
μl	microlitro
μg	microgramo
ORF	marco abierto de lectura
pb	pares de bases
kb	kilopares de bases
PM	peso molecular
aa	aminoácido
Da	dalton

kD	kilo dalton
°C	grados centígrados
SSC	<i>buffer</i> citrato de sodio, hidróxido de sodio, cloruro de sodio
SDS	Dodecil sulfato de sodio
PAGE	Gel de poliacrilamida
EDTA	Etilen diamina tetracético disódico
TE	<i>buffer</i> Tris-HCl EDTA
TAE	<i>buffer</i> Tris HCl - ácido acético- EDTA
TBE	<i>buffer</i> Tris-HCl -borato-EDTA
M	molar
pH	Logaritmo negativo de la concentración de protones
pK	Logaritmo negativo de la Ka (constante de acidez)
dNTPs	deoxinucleótidos
LT	linfocitos T
LB	linfocitos B
PMN	neutrófilos polimorfonucleares
NK	células <i>natural killer</i>
IFN	interferón
ADCC	citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
IgM	inmunoglobulina M
IgG	inmunoglobulina G
IgA	inmunoglobulina A
IMC	inmunidad mediada por células
CMH	complejo mayor de histocompatibilidad
IL	Interleuquina
pi	post infección
dpi	días post-infección
dpd	días post-desafío
pd	post-desafío
dpv	días post-vacunación

hs	Horas
BEI	bromo etil imina binaria
UV	Ultravioleta
MDBK	células de riñón bovino Madin Darby
Ac.M	anticuerpos monoclonales
TFB	testículo fetal bovino
MEM-E	medio esencial mínimo modificación Eeagle
SFB	suero fetal bovino
DICT <sub>50</sub>	dosis infectivas en cultivo de tejidos 50%
Moi	multiplicidad de infección
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
TLP	test de linfoproliferación
cpm	cuentas por minuto
IE	Indice de estimulación
Con A	concanavalina A
PPN	p-nitrofenil fosfato disódico
PBS	buffer fosfato salino
PBST	PBS Tween 20 0,05%
PBST-O	PBST-ovoalbúmina 0,1%
PBST-L	PBST-leche 5%
D.O.	densidad óptica
TEN	Tris-EDTA-cloruro de sodio
OPD	orto fenil diamina
ECP	efecto citopático
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
TCR	receptor celular T
GM-CSF	factor de estimulación de colonias granulocito/macrófago
TNF- $\alpha$	factor de necrosis tumoral
Th	linfocito T helper
min	minutos



Ag	antígeno
ABTS	2,2'-azino bis (3-etilbenzeno-tiazolina-6 ácido sulfónico)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrógeno

## **I. INTRODUCCION**

El herpesvirus bovino tipo 1 (HVB-1) es un patógeno que ocasiona pérdidas productivas, a nivel zootécnico, tanto en Argentina como en el resto del mundo. El desarrollo y empleo de vacunas que contienen marcadores antigénicos, que permitan diferenciar animales vacunados de los infectados, representa el camino de elección para iniciar campañas de control y erradicación de la enfermedad. Por otro lado, es de vital importancia determinar el rol que cumple la inmunidad pasiva en la vacunación de animales jóvenes, herramienta que será de aplicación práctica a la hora de diseñar el programa de inmunización en áreas endémicas.

### **I.1. El Herpesvirus bovino tipo 1**

El Herpes virus bovino 1 (HVB-1) es un virus neurotrópico miembro de la familia Herpesviridae, subfamilia Alphaherpesvirinae, género Varicellovirus (Roizman, 1992). Contiene una cápside icosaédrica (95-110nm) que consiste en 162 capsómeros. La cápside está rodeada por una zona denominada tegumento, y por una bicapa lipídica, que le da forma pleiomórfica a los viriones, de entre 150-200nm. El genoma consiste en una molécula de ADN doble cadena de unos 137kb (Mayfield, 1983). Tiene una organización descrita como dos unidades, una corta (Us) y una unidad larga (Ul), separadas entre sí por secuencias repetitivas (TR e IR). La expresión del genoma está regulada temporalmente. En primer lugar, se expresan los genes inmediato-tempranos ( $\alpha$ ); en segundo lugar, los genes tempranos ( $\beta$ ); en tercer lugar, los genes temprano-tardíos ( $\beta\gamma$ ); y, por último, los genes tardíos ( $\gamma$ ).

Los diferentes aislamientos pueden ser identificados por métodos moleculares – incluyendo el análisis de ADN– que abarcan patrones de restricción, hibridización y mapeo del ADN viral (Mezler, 1985; Misra, 1983, Mayfield, 1983; Christensen, 1996); o bien por medio de técnicas tradicionales como la del análisis serológico (Bratanich, 1991; Suárez, 1993).

El genoma de los herpesvirus codifica para aproximadamente unas 70 proteínas. Sólo 33 de ellas son estructurales, 13 se encuentran asociadas con la envoltura viral, 14 con la nucleocápside, y 6 aún no han sido clasificadas. Son 15 las proteínas no estructurales codificadas por el genoma (Misra, 1981; Tikoo, 1995).

Muchas de las proteínas estructurales están implicadas en los diferentes estadios de la multiplicación viral. Las glicoproteínas gB, gC, y gD son responsables de la adsorción del virión a la membrana celular (Okazaki, 1987; Liang, 1991); gB y gD intervienen en la subsiguiente penetración de la célula hospedadora (Fitzpatrick, 1990), y gB participa en el proceso de fusión celular. También, estas moléculas están involucradas en el proceso de adquisición de envoltura, una vez armada la cápside, y en el egreso de las partículas virales y su transmisión célula a célula.

Algunas glicoproteínas como gB y gD son esenciales para la replicación viral *in vitro*, otras no lo son, aunque juegan un rol importante en el fenotipo observado *in vivo*. Este fenómeno fue demostrado para herpesvirus porcino (SHV-1) y para el virus herpes simplex humano (VHS-1) (Tikoo, 1993; Chase, 1993; Turin, 1999). El genoma de HVB-1 codifica para por lo menos cuatro glicoproteínas no esenciales (gC, gG, gI y gE). La delección de la mayoría de las secuencias codificantes para estas glicoproteínas anula su expresión. Esto puede influir en su virulencia y posiblemente atenuar la cepa resultante, lo que implicaría aumentar la seguridad en el momento de su administración a bovinos en forma de inmunógeno atenuado.

## **I.2. El ciclo viral**

La puerta de entrada del virus al organismo lo constituyen las células epiteliales de la mucosa respiratoria. Cumple su primer ciclo (ciclo lítico) de replicación en estas células, momento en el cual es importante la dispersión del virus a través de puentes intercelulares. Mediante la glicoproteína C (gC), la partícula viral entra en contacto con el receptor celular, más específicamente con los residuos heparan sulfato de proteoglicanos celulares (Fitzpatrick, 1989; Liang, 1993), pierde su envoltura, y libera el ADN en el núcleo celular donde comienza a expresarse. La regulación de este proceso es mediada por genes ubicados en las secuencias repetitivas invertidas.

El genoma en la partícula viral intacta de HVB-1 es una molécula de ADN lineal que, una vez dentro de la célula luego de la infección, se circulariza. Durante los procesos de replicación viral y ensamblado, el ADN sufre un clivaje específico en unidades genómicas independientes que se ensamblan con proteínas de la matriz y de la cápside para luego adsorberse en la región de la membrana nuclear donde se encuentran ubicadas en alta concentración las glicoproteínas virales. De este modo se produce la brotación de las partículas virales de la progenie.

Luego de la replicación inicial en el tejido epitelial, el virus puede entrar en los axones de las células nerviosas locales y viajar por transporte axonal retrógrado hasta los ganglios sensoriales – generalmente, trigémino o sacro – que inervan la región, donde se establece la latencia. Durante la latencia, la expresión genética está restringida al marco abierto de lectura (ORF) codificante del RNA relacionado con latencia (LR). El producto del LR es una proteína nuclear que ha sido detectada en neuronas de ganglio trigémino, nódulos linfáticos, y mucosa nasal (Van Engelenburg, 1994) de bovinos latentemente infectados. El único promotor con actividad detectable en neuronas de ganglio es el LAT, que controla la transcripción del gen BICP0 en la orientación opuesta (Jones, 1990; Bratanich, 1992). Este tipo de transcritos puede codificar para proteínas regulatorias, o bien pueden poseer función regulatoria *per se*, por complementariedad genética con el gen por ellos regulado. Durante la infección latente no se detecta excreción viral ni sintomatología en los animales portadores, excepto luego de inmunodepresiones inducidas ya sea por stress o administración de corticoides.

### **I.3. La enfermedad**

El Herpesvirus bovino-1 es un patógeno viral neurotrópico de alta prevalencia en bovinos, agente etiológico de diferentes síndromes clínicos como rinotraqueítis, conjuntivitis, abortos, vulvovaginitis (IPV), y balanopostitis (IPB) (Engels, 1996). Este virus juega su rol principal en el complejo de infecciones respiratorias bovinas debido al sinergismo que puede provocar con otros virus y bacterias coinfectantes oportunistas (Yates, 1982). Luego de la infección primaria, el virus replica intensivamente en células epiteliales del tracto respiratorio superior por lo que es factible hallarlo en altos títulos en los exudados nasales, y se detecta una muy alta probabilidad de contagio durante el período agudo de la infección. En algunos casos, el virus puede propagarse al resto del animal por vía sistémica.

El proceso de infección comprende tres diferentes estadios: enfermedad aguda, latencia y reactivación. La sintomatología clínica de la infección puede variar la infección mediana y localizada, y la severa y generalizada que pueda implicar la muerte del animal. Estos virus son transmitidos directamente por aerosol o por contacto de mucosas entre animales infectados. La transmisión indirecta se produce a través de

alimento, agua, o semen contaminados. Las principales puertas de entrada del virus son la cavidad nasal, orofaríngea, los ojos, y el tracto genital. El primer ciclo de replicación se produce en células epiteliales de cada una de las mucosas mencionadas. Los síntomas de la enfermedad aguda son generalmente restringidos al área local, y frecuentemente asociados a la destrucción de células epiteliales causada por la lisis celular inducida por la infección viral. Este tipo de infección es normalmente autolimitante, como consecuencia de la fuerte y rápida respuesta inmune inducida en el hospedador. Pese a que la recuperación usualmente toma 1 a 2 semanas, las lesiones locales pueden facilitar infecciones bacterianas secundarias, causantes de daños más severos como neumonía.

En bovinos, la sintomatología de la enfermedad respiratoria es la siguiente: luego de 2 a 6 días, fiebre; anorexia; aumento de la frecuencia respiratoria; tos; descarga nasal bilateral; traqueítis; depresión; síntomas a menudo acompañados de conjuntivitis; y secreción ocular mucopurulenta. La infección por HVB-1 provoca una fuerte constricción bronquial que resulta en el taponamiento de los conductos de las vías respiratorias inferiores con secreciones, empeorando de esta manera los mecanismos de defensa y favoreciendo el alojamiento de infecciones bacterianas. Los animales se recuperan dentro de las 2 semanas, excepto aquellos que han sufrido una superinfección bacteriana que suele ocurrir en aproximadamente el 10% de los animales afectados. Las infecciones secundarias bacterianas que frecuentemente provocan pneumonías crónicas son las causadas por *Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Streptococcus*, *Corynebacteria* y *Klebsiella*; otros agentes provocan lesiones severas como las causadas por *Pasteurella haemolitica* y/o *Pasteurella multocida* (Rusvai, 1998).

Las infecciones del tracto genital generalmente son provocadas durante la práctica de inseminación artificial. La cantidad mínima infecciosa de virus en una inseminación ha sido calculada en 32 partículas infecciosas (Oirschot, 1995). En machos, los tejidos prepucial y peniano parecen potencialmente infectables. Los signos de infección pueden variar de grado desde mediano a severo, y están asociados a una reducción en la calidad del semen, en cuanto a la reducción de la movilidad y anomalías morfológicas de los espermatozoides (Misra, 1987).

En hembras, la infección puede provocar disturbios de infertilidad que se ven mayormente asociados a endometritis (Parsonson, 1975). El riesgo de transmitir la enfermedad a través de la inseminación artificial puede ser reducido con medidas preventivas como el análisis del semen y su preadsorción en los casos positivos. Cuando la infección tiene lugar en un rebaño que incluye vacas preñadas, puede generar abortos

dentro de las 3 a 6 semanas posteriores a la infección. En líneas generales, el período de susceptibilidad es entre el quinto y el octavo mes de gestación, lapso durante el cual el 25% de las vacas preñadas corre un alto riesgo de sufrir abortos (Wyler, 1989). La infección que conduce al aborto consiste en una serie de eventos sucesivos donde se producen la infección, la viremia, infección de la placenta, infección corta generalizada y aguda del feto, y finalmente su muerte (Conlon, 1987). Las madres suelen transmitir la infección durante o inmediatamente después del parto directamente en el útero, a través de la ruta sistémica, o bien por secreciones nasales contaminadas durante la limpieza de la cría. Por otra parte, fisiológicamente en el momento del parto existe una alta concentración de glucocorticoides en sangre por lo que se evidencia una inmunodepresión y por lo tanto, altas probabilidades de reactivación del virus latente.

#### **I.4. Importancia económica de la enfermedad**

En cuanto al aspecto productivo, la infección provocada por HVB-1 es sumamente relevante, por su habilidad de dispersión a través de animales portadores latentemente infectados que frecuentemente cumplen el rol de vectores asintomáticos. Otros posibles canales de infección son el semen congelado, y los embriones. En síntesis, cuando HVB-1 es introducido en una región libre, puede causar la enfermedad severa, abortos y disminución en la producción lechera. Esto resulta en cuantiosas pérdidas económicas. Una vez que la enfermedad es endémica, el virus no llega a altos niveles de morbilidad y ni mortalidad. En Holanda, por ejemplo, recientes infecciones siguen su curso en la forma subclínica. Sin embargo, las pérdidas han sido estimadas en 27 millones de dólares por año (Oirschot, 1998).

Actualmente, son instrumentadas medidas de control dirigidas a disminuir el impacto de la enfermedad, a través de la erradicación del agente en la Comunidad Europea. El virus ha sido erradicado de Dinamarca y Suiza a través de la eliminación del rodeo de los bovinos seropositivos. En estos países los valores de prevalencia eran bajos al inicio del programa de erradicación, y nunca fue permitida la vacunación en su territorio.

Países como Suecia, Finlandia, Noruega y Austria han permanecido libres. La mayoría de las naciones de la Comunidad Europea han establecido como prerrequisito

para la comercialización internacional que los animales sean libres de IBR. Esto se aplica tanto al ganado en pie, como al semen y embriones (Turin, 1999).

### **I.5. Situación epidemiológica del HVB-1**

El primer aislamiento de HVB-1 fue anunciado en 1956 a partir de casos de rinotraqueítis infecciosa en bovinos en los Estados Unidos (Madin, 1956). En 1961, Armstrong sugirió que el virus de IBR pertenecería al grupo de los herpesvirus (Yates, 1982; Studdert, 1994). En la Argentina, los primeros casos clínicos reportados datan de los años 80 (Carrillo, 1983; Schudel, 1985), y en el año 1981 fue aislada la cepa L114 (Lager, 1981).

Actualmente, la distribución de la infección es mundial y las incidencias varían de un país a otro (7,4 % en China; 70 % en Alemania Oriental), pero en países con sistemas productivos como el nuestro las incidencias oscilan entre 30 y el 40 % (Fondevila, 1981). Datos más actuales de un relevamiento realizado por el INTA en 1999 determinan una prevalencia de 21 al 56% en Corrientes, de 17 al 65% en La Rioja, de 7,6% en Pergamino, y de 70 al 82% en Olavarría (Alegre, 2000).

Asimismo, estudios realizados en distintos establecimientos de Argentina demostraron una prevalencia del 100% de anticuerpos circulantes específicos para el HVB-1. Los índices de prevalencia aumentan progresivamente con la edad de los animales (Fondevila, 1981), hecho que se repite en otros lugares del mundo.

### **I.6. Epidemiología y diagnóstico**

La introducción de la infección con HVB-1 en rodeos libres se produce principalmente por la inclusión de nuevos animales que estén cursando la fase aguda de la infección. El contagio se genera por contacto directo: transmisión venérea, por alimento o agua contaminados, semen infectado, o por aerosol. Asimismo, los animales latentemente infectados representan un reservorio importante de virus. Los momentos en los que los bovinos son sometidos a stress –como las situaciones de traslado al matadero, o bien situaciones de reclutamiento del rebaño para su vacunación– representan un alto riesgo de re-excreción del virus. En el proceso de reactivación, el HVB-1 es transportado intra-axonalmente a la periferia, al sitio original de entrada,

donde puede ser fuente de infección para otros animales susceptibles. La replicación viral durante el curso de la reactivación suele generar el patrón sintomatológico de la enfermedad (Narita, 1981; 1982), pero usualmente permanece subclínica.

Se desconoce cuál es el período de circulación del HVB-1 en un rodeo, si todos los animales susceptibles presentes en el rodeo finalmente resultarán infectados, o si existe virus circulante una vez que todos los animales de un rodeo seroconvierten.

Un rodeo es considerado libre de HVB-1 si dos muestreos consecutivos resultan negativos (de suero o leche) por ELISA en todos los animales. La condición de negatividad puede ser mantenida asegurando un manejo cerrado, sin mezcla de rodeos, cuidando la utilización de semen negativo en la inseminación artificial. Para el control de la condición de libre, el 10% del rodeo debe ser muestreado cada 6 meses, y todos los animales deben mantener su negatividad (Tanyi, 1992).

Un método sensible de diagnóstico debe tener en cuenta la capacidad de latencia que es característica de los herpesvirus. El diagnóstico clínico es factible en la actualidad en casos de enfermedad aguda, pero no aún en la detección de virus latente. En dichas condiciones, el virus puede ser detectado únicamente en ganglios de nervios sensitivos como trigémino luego de la infección respiratoria o ganglio sacro, después de la infección genital, mediante técnicas de co-cultivo o por hibridación *in situ* (Homan, 1980; Ackerman, 1982). Los métodos que se utilizan actualmente para el análisis de HVB-1 en laboratorios de diagnóstico incluyen aislamiento viral, inmunofluorescencia de tejidos con anticuerpos específicos y técnicas serológicas. Indudablemente, las técnicas moleculares basadas en el análisis de ácidos nucleicos poseen mayor sensibilidad y efectividad en la determinación de infecciones latentes, pero estos métodos se practican en una muy baja frecuencia.

El aislamiento viral es una técnica laboriosa y toma tiempo la determinación del resultado. Las técnicas serológicas (ELISA, hemoaglutinación pasiva, neutralización viral) son las técnicas utilizadas para la detección de anticuerpos específicos contra HVB-1 o antígenos virales específicos (Florent, 1986; Edwards, 1986; Kramps 1993; Derget, 1993). Recientemente, proteínas independientes de HVB-1 (como gH, gC y gD) expresadas en baculovirus han sido descritas como potenciales antígenos para su utilización en diagnóstico en la detección de respuesta específica en ELISA, Western blot, y dot blot (Abdelmagid, 1998).



Métodos más específicos son los basados en sondas de ADN, y específicamente diferentes técnicas de amplificación directa (PCR) sobre muestras para la detección de virus latente o en semen (Andino, 1987; Vilcek, 1993; Yason, 1995; Alegre, 2001).

### **I.7. Respuesta inmune del bovino**

La exposición del sistema inmune al virus HVB-1 salvaje induce una fuerte respuesta con dos componentes: una inespecífica y otra específica. La respuesta inespecífica incluye la acción de interferones, complemento, componentes tempranos del proceso inflamatorio y de la infiltración local de células efectoras como macrófagos, neutrófilos y células *natural killer* (NK). La respuesta específica contra HVB-1 es mediada tanto por linfocitos T (Th1), como por anticuerpos (Th2). Los patrones de excreción viral en secreciones sugieren que en mucosa la respuesta inespecífica cumple un rol fundamental en la prevención de la infección viral primaria. Mientras que junto a esta última, la respuesta específica protege al bovino frente a infecciones secundarias y frente a la reactivación viral.

Dentro de las 5 horas posteriores a la infección, se evidencia la respuesta inmune inespecífica a través del Interferón alfa ( $IFN\alpha$ ) en las secreciones nasales, que persiste hasta los 8 días post-infección. El  $IFN\alpha$  modula la migración de leucocitos, la fagocitosis y la actividad NK. Asimismo, una vez expuestos al  $IFN\alpha$ , los macrófagos desarrollan una resistencia a la infección con el HVB-1, y aumenta tanto la actividad citolítica independiente de anticuerpos, como la citotoxicidad dependiente de anticuerpos mediada por células (ADCC) (Babiuk, 1985; Lawman, 1987; Jensen, 1990; Bielefeldt, 1984; Rouse, 1977). Por otro lado, una vez activados por contacto con el antígeno en el contexto del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de tipo I (CMHI), los linfocitos T, producen interferón gama ( $IFN\gamma$ ) que activa la respuesta citotóxica no restringida por CMH. Esta respuesta citotóxica es la más importante contra HVB-1 (Campos, 1989) y es detectable entre los 5 y 10 días post-infección (dpi). Opera a través del aumento de los mecanismos mediados por células T para la eliminación del virus, por lo que es un factor crítico de la inmunidad contra el herpesvirus. La inmunidad mediada por células (IMC) cumple un papel importante en la recuperación del animal una vez infectado. La misma se evalúa *in vitro* a través de la respuesta proliferativa de células mononucleares, y se suele detectar un pico de actividad alrededor de los 6 días

post-infección (Babiuk, 1996; Romera, 2001). Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> son los responsables de esta proliferación específica de antígeno detectada por ensayos de linfoproliferación (TLP) (Denis, 1994).

La actividad citolítica de las células NK no está restringida por moléculas del CMH, en la célula blanco. En bovinos infectados con HVB-1, no se ha esclarecido aún si la actividad NK se halla asociada a la alteración de estructuras en la membrana celular inducida por la presencia de la glicoproteínas virales, o si se debería a un reconocimiento directo realizado por las células NK (Palmer, 1990).

La respuesta humoral específica puede ser detectada en distintos compartimentos del sistema inmune – a saber, suero y mucosas– en diferentes tiempos post-infección. La inmunoglobulina M (IgM) es el primer isotipo en ser detectado luego de la infección, primeramente en suero, y luego en secreciones nasales y oculares. La respuesta IgA específica es detectable después de la aparición de anticuerpos IgM, en suero y secreciones, entre los 12 y 21 días post-infección (Madic, 1995; Babiuk, 1996; Del Médico, 2001). Se detectan anticuerpos IgG<sub>1</sub> a los 13 días post-infección, primero en suero y luego en secreciones (Del Médico, 2001). Finalmente, a los 25 días post-infección son detectables los anticuerpos IgG<sub>2</sub>, sólo en suero (Madic, 1995).

Por otra parte, la respuesta de anticuerpos neutralizantes es detectable alrededor de los 10 días posteriores a la infección y requiere de una reestimulación para su persistencia. Los epítopes neutralizantes corresponden a las glicoproteínas gH, gC y gD (Babiuk, 1987; Hughes, 1988; van Drunen Littel -van den Hurk, 1985; Fitzpatrick, 1990).

Se halla parcialmente descrito el fenómeno de inmunodepresión observado en bovinos durante las infecciones causadas por HVB-1. Se conoce el efecto de regulación negativa que HVB-1 ejerce sobre la expresión de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad CMH de clase I en la superficie de células infectadas (Hariharan, 1993; Kutish, 1990). Esta disminución de la expresión probablemente interfiere con la función protectora de los linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> (CTLs), que están involucrados en la lisis de células infectadas con HVB-1 (Denis, 1994). Por otro lado, durante la infección aguda HVB-1 puede inducir apoptosis - fenómeno homeostático de reciclado de células - en linfocitos CD4<sup>+</sup> a través del simple pegado de partículas virales a las células linfoides (Hanon, 1998). Ha sido descrita la capacidad inductora de apoptosis tanto de la partícula viral HVB-1 en su estado infeccioso como inactivado por irradiación ultravioleta, sobre células mononucleares de sangre periférica (Hanon,

1996). Durante la infección aguda de bovinos se ha detectado la expresión de genes virales inmediato-tempranos (ICP0), tempranos (ribonucleótido reductasa), y tardíos (gD) en linfocitos CD4+ correspondientes a tejido linfoide asociado a mucosa (tonsilas faringeadas, ganglio linfático retrofaringeo, membrana de turbinas nasales), que luego sufrieron el proceso apoptótico (Winkler, 1999); de lo que se concluye que HVB-1 infecta células linfoides CD4+ provocando la activación de la muerte celular programada. Este fenómeno podría ser el causal de la inmunosupresión local altamente predisponente a infecciones bacterianas descriptas.

La glicoproteína D tendría un rol necesario pero no suficiente en la inducción de muerte celular programada, o sea que otros factores virales serían también necesarios para la inducción de la muerte celular. Recientemente, se identificó el receptor celular HVEM, que interactúa directamente con la glicoproteína D de VHS-1 (Mauri, 1998). Este receptor celular une dos ligandos celulares: la linfotóxina  $\alpha$  secretada (LT $\alpha$ ) y LIGHT, un nuevo miembro de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF). La molécula LIGHT ha sido identificada como una citoquina ligada a membrana con una fuerte actividad inductora del proceso de apoptosis en células linfoides (Zhai, 1998). Por lo tanto, la interacción de la gD del herpesvirus bovino 1 con el receptor bovino homólogo a HVEM podría ser responsable de la inducción de apoptosis. En conjunto, de experimentos donde la gD fue administrada como vacuna donde se pudo comprobar un aumento importante de la respuesta inmune (van Drunen, 1993), y de otros donde se comprobó una disminución de la actividad apoptótica cuando se administraba gD purificada a cultivos de células infectadas con HVB-1 (Hanon, 1999), se concluye que gD interviene directa o indirectamente en el fenómeno de inmunodepresión descrito para infecciones con HVB-1 en bovinos y constituye un buen candidato para la formulación de vacunas y/o terapias frente a la infección con HVB-1.

Asimismo, se ha descrito el efecto supresivo del HVB-1 sobre varios mecanismos inmunes como la migración de polimorfonucleares neutrófilos (PMN), la citotoxicidad natural mediada por células, la respuesta mitogénica de células de sangre periférica, y también algunas actividades funcionales de los macrófagos alveolares. En contraste la producción de anión superóxido por los PMN se encuentra transientemente aumentada (Ohmann, 1985).

## **I.8. Inmunidad del recién nacido.**

La placenta de los ungulados es impermeable a las inmunoglobulinas (Ig), por lo que nacen hipoglobulinémicos, o bien agamaglobulinémicos (Salmon, 1984). Esto es bien diferente de lo que se observa en humanos, lagomorfos y roedores quienes se benefician del pasaje transplacentario de los anticuerpos maternos del suero durante el desarrollo embrionario. Los ungulados inmunocompetentes pueden montar únicamente una respuesta inmune primaria, dado que son libres de estímulos antigénicos durante la vida fetal: esta respuesta requiere un período de retraso que es demasiado largo en relación con la rápida proliferación de muchos agentes infecciosos. Durante las primeras horas de vida la supervivencia de la cría depende de la ingestión de calostro, que provee al recién nacido de anticuerpos del suero materno provenientes de la estimulación antigénica sobre el sistema inmune de la madre. Esta inmunidad antiséptica resulta en la destrucción de los patógenos.

Debido a la ausencia de sensibilización antigénica previa, el mamífero joven es incapaz de desarrollar su propia respuesta inmune local. Los epitelios mucoso intestinal y respiratorio constituyen los primeros sitios a ser invadidos y desafiados por antígenos ambientales, por lo que resulta fundamental la respuesta inmune que allí se desarrolla.

En rumiantes adultos, el isotipo IgG<sub>1</sub> domina frente a IgA en el intestino y la glándula mamaria, pero IgA predomina en mucosa nasal, bronquial, lágrimas y saliva (Butler, 1998).

Por otro lado, se sabe que una apropiada respuesta inmune depende del estado de desarrollo de la glándula mamaria (GM); por lo que la inmunidad lactogénica podría estar concentrada en (i) sitios inductores (tracto digestivo, y posiblemente GM), (ii) incremento del tráfico celular desde el tracto digestivo hacia la GM, y (iii) el aumento de producción de Ig en el sitio efector y su excreción a la leche.

La protección pasiva en mucosas del neonato mamífero es dependiente de la absorción en forma continua de IgG<sub>1</sub> materna, hasta los seis meses de vida, momento en el cual ocurre el destete. En ovinos, se ha observado la protección a través de anticuerpos específicos en el tejido bronquial y mucosa ocular, como un mecanismo de transudación reversa, desde la sangre y a través de las células epiteliales (Porter, 1979). También ha sido descripta la presencia de células polimorfonucleares y monocitos en tracto digestivo y secreciones de la GM. Sin embargo, contrariamente a las encontradas

en intestino, estas últimas mostraron citotoxicidad reducida contra células blanco infectadas (Kohl, 1980).

Las IgGs son transferidas desde la sangre a las secreciones mamarias a través de la mediación de receptores Fc $\gamma$  en la superficie de las células epiteliales. Este transporte es altamente selectivo para IgG, y en rumiantes, es específico para IgG<sub>1</sub> y no para IgG<sub>2</sub> (Watson, 1980); el transporte transepitelial de IgG<sub>1</sub> a la glándula mamaria es máximo durante la síntesis de calostro (entre 2 y 3 semanas antes del parto) y es mantenido durante el período de lactancia (Butler, 1998).

En bovinos, la IgG<sub>1</sub> es mayoritariamente derivada del suero. Sin embargo, ha sido descrita la síntesis local de bajos niveles de inmunoglobulinas en GM, fenómeno que persiste durante el período de lactancia (Sheldrake, 1985). Además se encuentran descritas hormonas mamotrópicas que parecen influenciar el pegado de anticuerpos a las células epiteliales de la GM, así como también su transporte transepitelial (Weisz-Carrington, 1984).

Las células del plasma se acumulan en la GM en desarrollo a una velocidad que correlaciona con el estado de desarrollo de la glándula. En rumiantes, las células del plasma son más abundantes durante el período de involución de la glándula (Collins, 1986).

En el ambiente natural, la glándula mamaria no se halla expuesta a antígenos, en contraste con el tracto digestivo. De hecho, los precursores de células plasmáticas IgA iniciados en el tracto digestivo, luego de una estimulación antigénica, se alojan no sólo en la lámina propia del intestino sino también de otros órganos secretores (De Buysscher, 1978), incluyendo glándula mamaria donde maduran para pasar a ser células secretoras de anticuerpos.

Con respecto a los tres componentes requeridos para montar la respuesta inmune específica, se sabe que en la GM bovina se hallan tanto células T antígeno-específicas como moléculas del complejo de compatibilidad tipo II y antígenos (Fitzpatrick, 1992).

Se sabe que la inmunidad pasiva adquirida por calostro es protectora para el recién nacido contra la infección con HVB-1 (Lemaire, 1999), y la misma no interferiría con el desarrollo de una respuesta inmune propia a partir de inmunizaciones vacunales (Bradshaw, 1996).

### **I.9. Estrategia viral para la evasión de la respuesta inmune del hospedador.**

A pesar de la fuerte respuesta inmune inducida durante la infección inicial, el organismo infectado no es capaz de eliminar completamente el herpesvirus. Los virus herpes han desarrollado estrategias que reducen la efectividad de la respuesta inmune, tales como la dispersión por puentes intercelulares y el transporte intra-axonal. Otro tipo de estrategia es la acción directa sobre elementos del sistema inmune, como el pegado del tercer componente del complemento (C3) por parte de la gC de HVB-1 (Huemer, 1993). De manera análoga, se ha detectado en VHS-1 que el complejo formado por gE y gI, actúa como receptor de la porción Fc de las inmunoglobulinas e interfiere con la acción normal de los anticuerpos (Jacobs, 1994). Sin embargo, este mecanismo no ha sido probado para el complejo gE/gI de HVB-1 (Whitbeck, 1996), ni para PRV (Zsak, 1992).

Es de especial interés la reducción de la expresión de CMH clase I detectable luego de la infección con HVB-1 (Hariharan, 1993). En particular, ha sido demostrado que ICP47 de VHS-1 actúa como inhibidor de la presentación de antígeno en células infectadas, a través de la inhibición del transporte de proteínas CMHI a la superficie celular (York, 1994), lo que ayudaría al virus a evadir la respuesta inmune citotóxica.

### **I.10. Vacunas contra Herpesvirus bovino**

Cuando se evalúa la relación costo-beneficio, la vacunación es la medida más efectiva para prevenir y limitar la infección. El principal propósito de las vacunas contra HVB-1 es el de reducir los signos de la enfermedad y, por lo tanto, el impacto económico de las infecciones con HVB-1. Las vacunas actualmente disponibles lejos de prevenir el establecimiento de la infección latente, disminuyen la sintomatología asociada a la infección, de manera que indirectamente aminoran la pérdida económica implicada en la disminución de la producción láctea, de carne, y embriones.

Las vacunas clásicas pertenecen a dos clases diferentes: vivas atenuadas e inactivadas. Las vacunas convencionales –a virus muerto– fueron las únicas vacunas disponibles hasta la década del 80 y no reducen la prevalencia de la infección por HVB-1. Los recientes avances en técnicas de ingeniería genética junto con el conocimiento acabado del genoma del HVB-1 y sus factores de virulencia, han permitido el desarrollo de una nueva generación de vacunas que se hallan actualmente disponibles. Se trata de

una variedad de vacunas desarrolladas en base a subunidades -porciones de la partícula viral-, moléculas sintéticas, péptidos, ADN, y vivas-atenuadas (Oirschot, 1996).

#### I.10.a. *Vacunas inactivadas convencionales*

En las vacunas inactivadas convencionales, el virus completo es inactivado por tratamiento químico –como los agentes alquilantes–, o físico –como el calor–, pero se caracterizan por su baja inmunogenicidad. Una estrategia frecuentemente utilizada para aumentar la inmunogenicidad del virus inactivado es la utilización de adyuvantes. Las vacunas a subunidades son otro tipo de vacunas inactivas que contienen sólo partes del virión, como las glicoproteínas de la envoltura (Brun, 1988).

Las vacunas inactivadas convencionales suelen disminuir las pérdidas económicas dado que previenen los signos clínicos severos luego de la infección con HVB-1. La mayoría de las vacunas convencionales contra HVB-1, sólo restringen la cantidad de virus excretado luego de la infección. Una desventaja de las vacunas a virus completo es la interferencia que generan a nivel de los anticuerpos inducidos dado que resultan indistinguibles de los producidos, en el hospedador, por el virus circulante en el campo.

Dado que la gran desventaja que presentan las vacunas inactivadas es su baja inmunogenicidad, se encuentra ampliamente estudiada el efecto que provoca en la respuesta inmune del bovino, la incorporación de diversos innumomoduladores (Romera, 2000; van Drunen, 1993).

#### I.10.b. *Vacunas atenuadas convencionales*

Las vacunas atenuadas convencionales, son aquellas que se basan en cepas con mutaciones que se han generado por sucesivos pasajes en cultivos de tejidos, o bien aislamientos naturales. Dado que se trata de mutaciones puntuales o de regiones cortas del genoma, estas cepas representan un alto riesgo en cuanto a la probabilidad de reversión. Con estas vacunas, se han observado efectos colaterales indeseables, como la enfermedad leve o hasta la muerte luego de la vacunación (Bryan, 1994), la reactivación de la cepa vacunal latente en el bovino, el aumento de la queratoconjuntivitis (Pastoret, 1980), abortos (George, 1988), y lesiones en los ovarios (Kelling, 1973; van der Maaten, 1985).

La vacunación contra HVB-1 induce la producción de anticuerpos específicos que no son distinguibles de los formados por exposición al virus en el campo. Si la

respuesta de anticuerpos inducida por la vacunación pudiera distinguirse de la generada por la infección, los animales infectados en un rebaño podrían ser identificados y extraídos. Con este tipo de vacunas será posible eliminar el virus HVB-1 de los rebaños, se facilitará la realización de censos epidemiológicos, y por lo tanto, la aplicación de un programa de erradicación.

#### I.10.c. *Vacunas marcadoras*

A través de la ingeniería genética se ha podido llegar a la obtención de cepas virales de genoma recombinante de las cuales se extrae parte del genoma viral y a las que se incorporan genes foráneos con la consiguiente atenuación del virus. La respuesta inmune inducida frente a las vacunas basadas en cepas de estas características resulta diferencial con respecto a la inducida por la infección viral con el virus HVB-1 salvaje, por lo que constituyen una muy buena herramienta al momento de implementar campañas de control y erradicación de la enfermedad.

Un número de genes de glicoproteínas de HVB-1, incluyendo gIII (gC), gE, gI, y gG, ha sido demostrado como no esenciales para la replicación viral *in vitro* (Furth, 1997). Actualmente, han sido caracterizadas las cepas deleteadas en gC (gIII) y se demostró claramente la atenuación que generan (Liang, 1992). La deleción natural de gE también ha sido reportada, así como su efecto en la virulencia (Kaashoek, 1994). Asimismo, se ha evaluado la efectividad frente al desafío viral, de vacunas formuladas con HVB-1gE- atenuada comparándola con la vacuna inactivada HVB-1gE- (Kaashoek, 1995).

#### I.10.d. *Vacunas vivas vs vacunas inactivadas*

Las vacunas vivas son más efectivas que las inactivadas debido a que simulan mejor una infección natural (Frerichs 1982). Las vacunas inactivadas, por otro lado, son más seguras que las atenuadas debido a su imposibilidad de replicar en el hospedador.

Así, las vacunas vivas atenuadas han sido desarrolladas para su aplicación por vía intramuscular, o vía intranasal, y generan una inmunidad fuerte y de larga duración. En el diseño de este tipo de vacunas resultan primordiales tres factores: la caracterización puntual de deleciones en el virus vacunal, la disponibilidad de métodos simples para diferenciar las cepas vacunales de las circulantes en el campo, y la disponibilidad de una técnica de diagnóstico que permita distinguir los animales vacunados de los infectados (Whetstone, 1986; 1989).



Las vacunas vivas implican un bajo costo de producción, confieren rápida protección y activan tanto componentes del sistema inmune humoral como del mediado por células. En un principio, la mayor desventaja con respecto a estas vacunas fue su tendencia a inducir abortos (Gibbs, 1977; Kahrs, 1977; Lupton, 1980). Se demostró también la capacidad del virus vacunal excretado de infectar animales por contacto (Wyler, 1989).

La búsqueda de vacunas vivas más seguras llevó al desarrollo de vacunas anti-HVB-1 termosensibles (*ts*) (Smith, 1978). La administración intranasal de vacunas *ts*-HVB-1 provoca una respuesta inmune rápida y no muestra el riesgo de abortos. Al mismo tiempo, ha sido descrito que la vacuna *ts*-HVB-1 ocasionalmente produce una enfermedad respiratoria moderada y disminución en la producción de leche (Wyler, 1989). Una ventaja que presentan este tipo de vacunas en cuanto a la respuesta inmune que generan es que la cepa viral al mantener su capacidad infecciosa, es presentada en contexto del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I. Como consecuencia de esta vía de presentación se desencadena la lisis de las células infectadas a través de diferentes caminos efectores (células NK, macrófagos, y polimorfonucleares). Estos caminos efectores también pueden actuar mediados por anticuerpos (ADCC).

A pesar de que las vacunas a virus inactivado son más seguras que las vacunas a virus atenuado, son también de más costosa producción. Requieren de múltiples administraciones, con altas masas de antígeno, y su efectividad depende del uso de adyuvantes adecuados (Lupton, 1979). Otro tipo de vacunas inactivadas son las vacunas a subunidades que muestran las mismas desventajas que las anteriores (Bosch, 1997).

#### I.10.e. *Vacunas vivas modificadas*

Recientes avances hechos en el campo de los genes de la virulencia, de HVB-1 y otros herpesvirus, han permitido realizar la delección específica de genes que posibilita arribar a la atenuación genética de una cepa viral (Young, 1995). Algunos genes estructurales como gE y gC y algunos genes involucrados en el metabolismo de ácidos nucleicos como el gen de la enzima herpética Timidina Kinasa (*tk*), pueden ser deleteados sin afectar significativamente la replicación viral *in vitro*. Este hecho abrió el camino al desarrollo de cepas de HVB-1 llevando delecciones específicas.

Las delecciones de *tk*, o de secuencias codificantes para glicoproteínas como gC y gE cambian dramáticamente la virulencia del HVB-1 *in vivo*. Esta aproximación también indujo el desarrollo de técnicas de diagnóstico que posibilitaran diferenciar

animales vacunados de infectados latentes. A través de esta estrategia, se desarrollaron las vacunas marcadoras donde una o varias deleciones de genes no esenciales hacen posible la diferenciación de animales vacunados e infectados a través de su respuesta de anticuerpos.

Los animales vacunados carecen de anticuerpos contra una proteína fuertemente inmunogénica pero no protectora que evoca la respuesta inmune siguiendo el patrón generado por la infección natural. Esa proteína marcadora no es expresada por el virus vacunal, por lo que la respuesta inmune diferencial que genera en el bovino resulta una herramienta sumamente práctica al momento de la selección de los animales infectados de un rodeo.

#### I.10.f. *Vacunas marcadoras. La clave para el control de la enfermedad.*

Una vacuna marcadora es de gran utilidad en rodeos de alta prevalencia. De esta manera la respuesta inmune no puede ser enmascarada por la respuesta a la infección natural y simultáneamente disminuye la probabilidad de transmisión. Dado que el uso de vacunas marcadoras no genera una respuesta inmune que interfiera con el diagnóstico, posibilitaría el seguimiento seroepidemiológico de la infección en una población vacunada y la evaluación de la eficacia de las vacunas en condiciones de campo.

Las vacunas vivas atenuadas racionalmente diseñadas por mutaciones irreversibles constituyen una herramienta segura y eficaz. En conjunto, con un ensayo de diagnóstico apropiado, constituyen una herramienta que permitiría a los veterinarios distinguir entre animales vacunados e infectados con la cepa de campo.

Desde fines de los años 80 se ha profundizado en el diseño de cepas atenuadas con el fin de ser utilizadas como vacunas vivas, pero para el caso de algunas cepas se han presentado algunas dificultades al momento de evaluar la posibilidad de utilizarlas en bovinos. Hasta el momento se han diseñado cepas *tk-* (Kaashoek, 1996) con las cuales se han descrito abortos, *gC* deleteadas (Flores, 1993). Bovinos inoculados con cepas *gG-*, o cepas deleteadas en *gE* protegieron mejor contra el desafío viral con el virus completo, que las deleteadas *gI* o en *gI/gE* (Belknap, 1999). A pesar de que la cepa *gE-* establece latencia en ganglio trigémino y los demás órganos descritos como blanco de la cepa parental, no se han registrado efectos adversos en bovinos (Van Engelenburg, 1995).

Otro tipo de vacunas vivas modificadas es el que se obtiene introduciendo el gen bacteriano de la enzima  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ gal) dentro de la secuencia de la *tk*. La cepa recombinante contiene tanto un gen reportero marcador, como la delección en el gen de la *tk*. Este virus atenuado es fácilmente distinguible de la cepa salvaje a través de un ensayo fenotípico/histoquímico. Por este camino, es posible producir vacunas polivalentes diseñando herpesvirus recombinantes que expresen antígenos foráneos al mismo tiempo que podrían corresponder a bacterias, parásitos u otros virus.

### **I.11. La glicoproteína E candidata para la delección en una cepa de HVB-1.**

El gen de la glicoproteína E está localizado en la región Us del genoma de HVB-1. Codifica para un péptido de 575 aminoácidos con una masa molecular de 65kD (Rebordosa, 1994; Leung-Tack, 1994), con dos potenciales sitios de N-glicosilación, y dos posibles sitios de O-glicosilación. Dichas modificaciones post-traduccionales aumentan el peso molecular a 92kD. Su secuencia es altamente ácida ( $pK_a = 4,5$ ). También contiene aminoácidos hidrofóbicos en el N-terminal (posible secuencia señal) y en el C-terminal (secuencia transmembrana), lo que es típico de las proteínas integrales de membrana (Rebordosa, 1994). Se ha comprobado que gE tiene dos secuencias de fosforilación en tirosina, y una de fosforilación por caseína kinasa que tienen su función en: i) el transporte de la glicoproteína a la membrana del trans-golgi (TG), ii) su ciclado entre compartimentos, endosomas, y la superficie celular, iii) su habilidad a promover la translocación de proteínas de ensamblaje específico al Golgi (AP-1) a la membrana del TG (Alconada, 1996). Sorprendentemente, la cepa que posee la gE deletada utiliza un camino de señalización alternativo al empleado por la cepa salvaje dado que la inhibición de la fosforilación no altera el ciclo de replicación viral (Shaw, 2000). Asimismo, se determinó –por mutaciones puntuales en PRV– que dos motivos basados en tirosinas (YxxL) de la cola citoplasmática de gE son responsables del agrupamiento (*capping*) de esta glicoproteína en la superficie celular, fenómeno inducido *in vitro* por la presencia de anticuerpos en el medio extracelular y que en respuesta genera cambios en el citoesqueleto celular (Favoreel, 1999).

Todos los alfa herpesvirus conocidos hasta el momento codifican para homólogos de gE, y a pesar de las diferencias detectadas a nivel de secuencia y de los nichos patogénicos que ocupan dichos virus, los homólogos parecen compartir motivos

y función biológica. Así, se han determinado dos dominios altamente conservados entre los aminoácidos 275 a 283, y también entre los aminoácidos 358 a 370 (Leung-Tack, 1994).

En forma semejante a otros herpesvirus VHS-1, PRV, VZV, la proteína gE de HVB-1 se asocia con gI luego de la síntesis, formando un complejo no covalente detectable tanto en células infectadas como en células transfectadas. Dicha asociación ha sido evaluada como necesaria para un eficiente procesamiento del precursor de gE que genera la forma madura de la glicoproteína (Whitbeck, 1996). Sin embargo, se ha observado que la delección de gE sólo provoca un defecto cinético en la maduración de gI, y no su defecto absoluto. Por otro lado, se observó que cuando se reemplaza el complejo gE-gI de PRV con la gE de HVB-5, se logra una complementación de la virulencia (Knap, 1997 b), lo que permite concluir que gE y gI son factores de virulencia intrínsecamente importantes.

Una funcionalidad atribuida al complejo gE-gI en una serie de herpesvirus como HSV y VSV, es la del pegado de fracción constante (Fc) de inmunoglobulinas (Johnson, 1988; Litwin, 1992). Este mecanismo ha sido planteado dentro de las estrategias de este tipo de virus para la evasión del sistema inmune del organismo hospedador. Sin embargo, no ha sido probado para el complejo gE/gI de HVB-1 (Whitbeck, 1996), ni para PRV (Zsak, 1992).

La delección del gen de la glicoproteína E reduce su virulencia en el hospedador natural de HVB-1 (Kaashoek, 1994; van Engelenburg, 1994; van Engelenburg, 1995). El virus es detectable en los mismos tejidos que la cepa salvaje, pero durante un menor período (van Engelenburg, 1995). La observación en células infectadas del fenotipo *in vitro* corresponde a tamaño reducido de placa y revela una relación de gE con la capacidad de dispersión célula-célula (Rebordosa, 1996; Zsak, 1992).

Al mismo tiempo, la glicoproteína gE no es crucial para el establecimiento de la infección latente. Así, es posible detectar ADN viral en el ganglio trigémino de animales inoculados con cepas de HVB-1 deleteadas en gE (van Engelenburg, 1995). Sin embargo, la reactivación de mutantes gE negativas de animales latentemente infectados es menos eficiente que la cepa salvaje, o casi nula (Kaashoek, 1996). Además, se ha descrito la baja probabilidad de transmisión horizontal del virus vacunal (Mars, 2000 b), lo que implica la baja virulencia de las cepas con delecciones en el gen codificante para la glicoproteína E.

Asimismo, se ha descrito el intercambio de genes codificantes para gE correspondientes a diferentes cepas con el objeto de elucidar la funcionalidad de la glicoproteína gE y de aclarar su rol en la neuroinvasividad. Así, en el caso de que el intercambio fuera entre HVB-1 y HVB-5, se ha determinado que la cepa HVB-5gE muestra disminuida su capacidad de replicación y dispersión. Cuando la gE original de HVB-1 es expresada en el contexto del genoma HVB-5, se anula la capacidad de transmisión neuronal típica del HVB-5 hasta sistema nervioso central (Chowdhury, 2000).

## **II. OBJETIVOS**

### **II.a. OBJETIVOS GENERALES**

1. Desarrollo y caracterización de una cepa viral HVB-1 $\Delta$ gE- $\beta$ gal con patrón antigénico diferencial al de la cepa actuante en el campo.
- .2. Evaluación del perfil de la respuesta inmune inducida en bovinos inmunizados con la vacuna marcadora en forma de antígeno inactivado o vivo HVB-1 $\Delta$ gE- $\beta$ gal. Evaluación de la seguridad de la vacuna atenuada a través de pruebas de transmisibilidad horizontal y vertical por diferentes vías de inoculación.
- .3. Estudio de la interferencia de anticuerpos maternos en la inducción de la respuesta inmune específica frente a las vacunas marcadoras HVB-1 $\Delta$ gE- $\beta$ gal en forma de inmunógeno inactivado, o vivo.

### **II.b. OBJETIVOS PARCIALES**

1. Diseño del vector de recombinación
  - 1.a. Diseño de cebadores o primers específicos para secuencias flanqueantes del gen a deletar de la cepa LA de Herpesvirus Bovino tipo 1 (HVB-1).
  - 1.b Amplificación por PCR de fragmentos flanqueantes (L y R) al gen de la glicoproteína E (gE) de HVB-1.
  - 1.c. Clonado individual de los productos de PCR en el plásmido PGemTEasy (Promega).
  - 1.d. Clonado secuencial y específico en extremos cohesivos, de los fragmentos obtenidos; en el plásmido Puc<sub>19</sub> (Biolabs Inc.) .
  - 1.e. Introducción del gen marcador de expresión, de la enzima  $\beta$ -galactosidasa entre los fragmentos clonados en Puc<sub>19</sub>.
2. Obtención de partículas virales recombinantes
  - 2.a. Puesta a punto de la técnica de transfección de células MDBK, con ADN viral.
  - 2.b. Puesta a punto de técnica de cotransfección de células MDBK, con ADN viral y ADN del vector de recombinación.
  - 2.c. Selección de clones virales recombinantes.
  - 2.d. Selección y purificación de clones de virus HVB-1 con fenotipo recombinante por medio del sistema de revelado ya puesto a punto. Esto es, que expresen el gen de la enzima marcadora  $\beta$ -galactosidasa.

2.e. Caracterización a diferentes niveles, a saber, genético, proteico y virológico, de modo de confirmar la identidad de la nueva cepa viral.

2.e.i. Caracterización genética por dos técnicas independientes:

2.e.i.-Hibridación con una sonda específica contra la secuencia de gE y otra contra la secuencia de la región flanqueante izquierda (L).

2.e.ii.-PCR con cebadores diseñados específicamente complementarios a regiones internas de la secuencia de la glicoproteína gE así como también dirigidos contra la secuencia de la enzima  $\beta$ -galactosidasa.

2.e.ii Caracterización proteica por Western blot comparativo de los productos de clonado viral y de la cepa salvaje, enfrentados con suero específico contra gE.

3.e.iii Caracterización virológica. Curvas de crecimiento comparativo de la cepa HVB-1 $\Delta$ gE- $\beta$ gal con respecto a la cepa salvaje.

3. Prueba de inmunogenicidad y aplicación de la vacuna marcadora desarrollada.

3.a. Caracterización inmunogénica de la partícula viral HVB-1 $\Delta$ gE- $\beta$ gal por exposición al sistema inmune del bovino en una formulación de vacunas a virus inactivado, y su comparación con la vacuna convencional (conteniendo el virus parental) en cuanto a inmunogenicidad y capacidad protectora frente al desafío viral.

3.b. Prueba de la capacidad inmunogénica y protección inducidas por la cepa HVB-1 $\Delta$ gE- $\beta$ gal cuando se la utiliza como vacuna atenuada.

3.c. Evaluación de la seguridad de la cepa vacunal atenuada en cuanto a capacidad abortigénica y de transmisibilidad horizontal y vertical.

3.d. Prueba de interferencia de anticuerpos colostrales en el desarrollo de la respuesta inmune de terneros jóvenes vacunados con HVB-1 $\Delta$ gE- $\beta$ gal.

### III. MATERIALES Y METODOS

#### III.a. DISEÑO DEL VECTOR DE RECOMBINACIÓN

Para la obtención del HVB-1 marcador, se seleccionó la glicoproteína E como blanco de delección. De manera de facilitar el proceso de selección, se optó por el reemplazo del ORF de gE por el gen de la enzima  $\beta$ galactosidasa. Para ello, se construyó un vector de recombinación PucLR $\beta$ gal portando secuencias flanqueantes a ambos lados del gen gE (L y R, a izquierda y derecha de gE, respectivamente), y entre ellas al gen expesor de la  $\beta$ gal.

III.a.1. *Cepas virales y líneas celulares* - Células MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney) libres para VDVB (Virus de la Diarrea Viral Bovina), controladas por inmunofluorescencia y PCR específica. Las células fueron mantenidas en medio MEM-E, suplementado con suero fetal bovino (SFB) libre de VDVB ( $\gamma$  irradiado).

El stock viral se produjo a partir del virus semilla HVB-1 cepa Los Angeles (Madin, 1956) obtenido de la American Tissue Culture Collection (ATCC, VR 188). Brevemente, a partir de la semilla original, se practicaron tres pasajes seriados en monocapas de la línea de células de riñón bovino MDBK. El producto, fue purificado por plaqueo en medio semisólido; y a partir de uno de los clones resultantes (clon #1), se procedió a amplificar para llegar al stock de trabajo.

III.a.2. *Titulación viral* - Se utilizó la técnica de Titulación por efecto citopático como fue descrito previamente (Rouse, 1974), y por UFP según lo descrito.

La titulación se realizó en placas de monocapas de células MDBK. Se efectuaron diluciones en base 10 del virus para calcular la dosis infectiva en cultivo de tejido 50% (DICT<sub>50</sub>). Las placas se incubaron durante 72 hs a 37°C.

III.a.3. *Purificación viral* - El stock viral para la obtención del ADN se logró por infecciones a baja m.o.i. (0,01) en monocapas con una confluencia del 80%. El virus fue cosechado del sobrenadante a las 48 horas; e inmediatamente clarificado y purificado a través de un colchón de sacarosa del 30% (Talens, 1976). Brevemente, el sobrenadante de cultivo se sembró sobre un colchón de 3ml de sacarosa 30% (en TE pH8). Se



centrifugó 3 horas a 25.000rpm, a 4°C. El pellet obtenido se resuspendió en 1800µl finales de buffer TE y fue almacenado a -80°C hasta su procesamiento para la obtención del ADN.

III.a.4. *Aislamiento de ADN viral* - El ADN viral se obtuvo a partir de virus purificado, tratado para su lisis según Chowdhury (1996). Brevemente, la suspensión viral se trató con 200µl de dodecil sulfato de sodio 10%, y 15µl de RNasa. Se incubó a 60°C durante 30 minutos. Se agregó 80µl proteinasa K (10mg/ml), y se incubó a 60°C durante 30 minutos. Se extrajo dos veces con fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1); y una vez con éter. Se precipitó con etanol 100%.

III.a.5. *Diseño de cebadores utilizados en el proceso de obtención de la cepa HVB-1ΔgEβgal.* - Se diseñaron cebadores (gE<sub>1</sub> y gE<sub>2</sub>) específicos contra la región izquierda a gE de modo que el producto de reacción de PCR esperado (L) fue de 780pb. Mientras que para la región derecha a gE se diseñaron los cebadores específicos (gE<sub>3</sub> y gE<sub>4</sub>) con los cuales el producto esperado (R) de la reacción de PCR fue de 630pb (**Figura 2**).

Se introdujeron sitios específicos para enzimas de restricción BamHI, en el fragmento L, cebador de vuelta; y los sitios para BamHI y EcoRI en el fragmento R, cebadores de ida y vuelta respectivamente.

El cebador gE<sub>1</sub> dirigido contra la región río arriba del gen de gE (gen de la glicoproteína I); gE<sub>2</sub> y gE<sub>3</sub> específicos contra la región del gen de gE; y gE<sub>4</sub> dirigido contra la región río abajo del gen de gE (marco abierto de lectura US9) (**Figura 1. c**).

Para la confirmación de pureza e identidad, se diseñaron cebadores específicos dirigidos a las regiones correspondientes al gen de la glicoproteína E (gE<sub>7</sub> y gE<sub>8</sub>). El protocolo de la reacción fue el mismo ya descrito, con variaciones introducidas para cada par de cebadores.

Cebador de ida para el fragmento L

**gE<sub>1</sub>**: 5' GCG AGC AGC GGG AGC GGG GCC 3' sitio Sall natural

Cebador de vuelta para el fragmento L

**gE<sub>2</sub>**: 5' GGG GCG GAT CCG TGG GTT GCA 3' sitio BamHI

Cebador de ida para el fragmento R

**gE<sub>3</sub>: 5' AGC TTG GAT CCC GGC CGC ACC 3'** sitio BamHI

Cebador de vuelta para el fragmento R

**gE<sub>4</sub>: 5' CCT CAG AAT TCG GGG TCT CGG 3'** sitio EcoRI

Cebador de ida para la región del gen gE

**gE<sub>7</sub>: 5' CGC CCG TCT TTC TCC CAG 3'**

Cebador de vuelta para la región del gen gE

**gE<sub>8</sub>: 5' GCG GGA CGA GGA GAG GGA 3'**

III.a.6. *Amplificación de las regiones de interés por reacción en cadena de la polimerasa* - Las condiciones de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en las que se obtuvieron los productos de amplificación específicos fueron protocolos modificados para cada par de cebadores, a partir de lo descrito (Yason, 1995).

En general, las condiciones en las que se obtuvieron los productos de amplificación específicos fueron:

ADN de HVB-1	5µl
Cebador de IDA dil. 0.1µg/µl	1µl
Cebador de VUELTA dil. 0.1µg/µl	1µl
Cl <sub>2</sub> Mg 2mM	3µl
Buffer 10x	5µl
dNTPs 25µM	4µl
Enzima Taq polimerasa	0.5µl
DMSO 6%	3µl
Glicerol 10%	5µl
H <sub>2</sub> O	26.5µl
<b>Volumen final</b>	<b>50µl</b>

#### CONDICIONES DE AMPLIFICACION

Número de ciclos	Temperatura	Duración	
1 ciclo	95°C	10min.	Desnaturalización
30 ciclos	95°C	30seg.	Desnaturalización
	50°C	1min.	Hibridación
	72°C	1min.	Elongación
1 ciclo	72°C	10min.	Elongación final

III.a.7. *Transformación de bacterias E.Coli DH5 competentes* La transformación de células de *E.Coli* DH5 $\alpha$  competentes se realizó por *shock* térmico (Sambrook, 1989). Se incubaron en hielo las células con el ADN de la construcción plasmídica de interés, agitando cada 10 minutos. Se transfirió el tubo conteniendo la mezcla a un baño de agua a 42°C, durante 90 segundos. Una vez cumplido el tiempo, se volvió a transferir al hielo el tubo conteniendo la mezcla, donde se mantuvo durante 2 minutos. Se agregó 1ml de medio de crecimiento LB 1x (medio Luria Bertami: bacto-triptona 1%, extracto de levadura 0,5%, ClNa 1%) sin antibiótico. Las células fueron incubadas, durante 1 hora, a 37°C, con agitación. Se concentraron las células por centrifugación a 2000rpm. Se sembraron en placas de medio LB-bacto-agar (15%), con ampicilina como antibiótico de selección. Se incubaron durante 16 horas, a 37°C. Con los clones obtenidos se prosiguió la selección primaria.

III.a.8. *Obtención del vector de recombinación* - Se procedió a la ligación de los productos de amplificación, con un plásmido de fácil ligado para productos de PCR, PGemTEasy (Promega). Las reacciones de ligación fueron llevadas a cabo según el protocolo sugerido por el fabricante. Brevemente, utilizando 1 $\mu$ l de ADN de amplificación, 1 $\mu$ l de ADN del plásmido PGemTEasy, enzima T4 Ligasa (Promega), Buffer ligasa 1 $\mu$ l, y H<sub>2</sub>O hasta un volumen de 10 $\mu$ l totales. La reacción se incubó 16 horas, a 4°C.

Los productos de ligación, en cada caso, se utilizaron para transformar bacterias *E.Coli* (DH5) competentes, en las condiciones descritas en la sección III.a.7 (Sambrook, 1989).

La selección de los clones positivos se realizó por digestión enzimática del ADN correspondiente, con la enzima EcoRI. Para confirmar la selección se realizó un mapeo por restricción. Así, para confirmar el correcto clonaje del fragmento Izquierdo en el PGemTEasy (pTAL<sub>5</sub>) se utilizaron las enzimas Sall, SacII, y Sall + BamHI; y para el fragmento Derecho (pTAR<sub>1</sub>), se utilizaron las enzimas SacI, SacII y EcoRI (**Figura 3.a**).

Una vez confirmados los clones positivos, se procedió a la extracción del inserto correspondiente para su posterior ligación en el plásmido Puc<sub>19</sub>. Para la primera selección de los clones positivos para el fragmento Izquierdo (PucL), se digirió con las

enzimas BamHI y Sall, y para su confirmación se realizó el mapeo con NotI + EcoRI, y BamHI + PstI (**Figura 4.a**).

Una vez confirmado la presencia del inserto L en Puc<sub>19</sub> (PucL), se procedió a la introducción del fragmento R. Para la primera selección de clones positivos se digirió con BamHI + EcoRI; y para el mapeo se utilizaron las enzimas BamHI, Sall + EcoRI, Sall BamHI, BamHI + EcoRI, HindIII + BamHI, HindIII + Sall, y HindIII + EcoRI (**Figura 4.a**).

Con el clon resultante (PucLR) se procedió a la introducción del gen marcador de expresión de la enzima  $\beta$ -galactosidasa procedente del plásmido pCMV $\beta$  (Clontech) digerido en PstI. Previamente a su ligación en el PucLR cortado en BamHI, fue necesario practicar el rellenado de los extremos cohesivos tanto del fragmento a insertar como del PucLR. Para ello se utilizó una reacción de rellenado con polimerasa T4 sobre el fragmento del gen de  $\beta$ -gal, según lo descrito (Sambrook, 1989); y los extremos del PucLR se rellenaron mediante una reacción con la fracción enzimática Klenow de la enzima ADN polimerasa I de *E.Coli*, según lo descrito (Sambrook, 1989). Para la selección de los clones positivos resultantes de la ligación, se digirió con SacI. El mapeo de la construcción se realizó con las enzimas Sall y NotI. La construcción final fue denominada PucLR $\beta$ gal, de 8547pb (**Figura 5.a**).

III.a.9. *Preparación de ADN para la selección primaria de clones recombinantes* -Se concentró 1ml de cultivo de bacterias, crecido durante 16 horas con selección de antibiótico, a 37°C, con agitación; por centrifugación durante 2min., a 14000rpm, a temperatura ambiente. Se lisó el *pellet* de células por adición de buffer STET-sacarosa (sacarosa 8gr, triton X-100 5ml, EDTA 0,5M10ml pH8, Tris 1MpH8 5ml, H<sub>2</sub>O hasta 100ml), liozima (1mg/ml), y ebullición durante un minuto. Se separaron los restos celulares y se precipitó el ADN por agregado de isopropanol y centrifugación durante 15 minutos, a temperatura ambiente. Los ADNs plasmídicos obtenidos fueron resuspendidos en buffer TE-RNasa y sometidos a digestiones con enzimas de restricción para su identificación.

III.a.10. *Preparación de ADN para su utilización en el clonado* - Se concentraron 500ml de cultivo de bacterias, crecidos durante 16 horas con selección de

antibiótico, a 37°C, con agitación; por centrifugación durante 15min., a 4000rpm, a 4°C. Se lisaron células por adición de 100ml buffer STE (0,1M NaCl, 10mM TrisHCl (pH8), 1mM EDTA pH8, H<sub>2</sub>O hasta 100ml), concentración por centrifugación durante 15min., a 4000rpm, a 4°C; agregado de 1ml de lisozima (10mg/ml) y 15ml de 0,2N NaOH/1%SDS agitando por inversión; y 15ml de 5M KAc, Acético glacial 11,5 %, y 28,5 % de H<sub>2</sub>O. Se centrifugó durante 15 minutos, a 4000rpm, a 4°C. Se filtró por gasa el sobrenadante y se precipitó el ADN por agregado de isopropanol y centrifugación durante 15 minutos, a 5000rpm, a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en buffer TE pH8.

Los ADNs plasmídicos obtenidos fueron sometidos a purificación por gradiente de polietilenglicol (Peg). Se separaron los restos de ARN por agregado de 1 volumen de LiCl 5M y centrifugación durante 10 minutos, a 10000rpm, a 4°C. Se precipitó el ADN por agregado de isopropanol y centrifugación a 10000rpm, durante 10 minutos, a temperatura ambiente. Se resuspendió el ADN en buffer TE RNasa (20µg/ml) y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se agregó 1 volumen de polietilenglicol- 8000 (Peg) (0,13 Peg, 320µl NaCl 5M, 680µl H<sub>2</sub>O ultrafiltrada), se centrifugó a 12000rpm, durante 5 minutos, a 4°C, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en buffer TE pH8. Se extrajo con fenol:cloroformo:isoamílico; y se precipitó el ADN en 2,5 volúmenes de etanol 100%, y 0,1 volumen de NaCl 5M y centrifugación a 12000rpm, a 4°C. Los ADNs obtenidos fueron analizados en cuanto a concentración y calidad por medición de absorbancia 260/280 nm.

III.a.11. *Preparación del ADN plasmídico para la cotransfección* - El ADN plasmídico se produjo en grandes volúmenes y fue purificado por gradiente de cloruro de cesio, según Sambrook (1989). A partir del ADN obtenido por lisis alcalina, se le agregó 1gramo de cloruro de cesio por cada mililitro de ADN y 2µl de BrEt (10mg/ml). Se centrifugó a 95000rpm, por 4 horas, a 20°C. Se extrajo la banda de ADN del gradiente, y se eliminó el BrEt mediante sucesivas extracciones con butanol saturado en agua (1:1). Se precipitó con tres volúmenes de etanol 100%. El ADN obtenido, se resuspendió en agua ultrafiltrada estéril y se analizó en cuanto a concentración y calidad por medición de absorbancia 260/280 nm.

Dado que las condiciones de transfección para recombinación del ADN del vector con el ADN viral requieren de un ADN lineal, el ADN de PucLR $\beta$ -gal fue digerido con ScaI. Una vez confirmada la digestión completa, se procedió a purificar el ADN por fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 24:24:1, y se resuspendió en agua.

III.a.12. *Secuenciación de las regiones flanqueantes al gen gE* - Se utilizó el kit de Fmol (Promega) según recomendaciones de su fabricante. Brevemente, se utilizaron las siguientes condiciones:

Mezcla de reacción:

ADN template	3 $\mu$ g
Buffer 5x	5 $\mu$ l
Primer (0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
<sup>35</sup> S-dATP	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	Hasta 16 $\mu$ l

Condiciones de amplificación:

30 ciclos	94°C	3 min.
	95°C	30 seg.
	51°C	30 seg.
	70°C	1 min.
	4°C	

El producto de reacción, fue corrido en gel 6% de poliacrilamida en TBE pH, a 60 watts contantes (fuente Power pac 3000, BIO RAD).

Se secuenciaron 200pb a partir de cada cebador utilizado anteriormente para la amplificación específica de L y R.

### III.b. OBTENCIÓN DE PARTÍCULAS VIRALES RECOMBINANTES

Mediante ensayos de lipofección donde se inoculó el ADN viral infeccioso junto con el ADN correspondiente al vector PucLR $\beta$ gal sobre células MDBK, se seleccionaron los clones virales expresores de la actividad de la enzima  $\beta$ gal. Se confirmaron las características diferenciales de la cepa HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal, que fueron la ausencia del gen gE por PCR y *Southern blot*, la ausencia de la proteína y la eficiencia de replicación similar a la de la cepa HVB-1 parental.

III.b.1. *Ensayo de transfección* - El ensayo de transfección fue practicado en diferentes condiciones en cuanto a las siguientes variables: número de células en la monocapa a ser transfectada, cantidad de Lipofectamina (GIBCO), cantidad de ADN viral, tiempo de incubación, número de lavados de la monocapa previo a la tripsinización y tiempo de incubación previo a la tripsinización.

Finalmente, las condiciones en que el ensayo resultó repetible y eficiente fueron las siguientes:

- I. En una placa de 6 pocillos con una monocapa de MDBK sembradas el día anterior, a una confluencia del 30% (450000 céls. por pocillo); se lavó la monocapa con medio sin suero (Optimem, GIBCO) y se incubó con el último lavado hasta su utilización, a 37°C, en estufa de CO<sub>2</sub>.
- II. Se mezclaron en un tubo limpio y estéril 100µl del medio Optimem con 12µl de Lipofectamina; y en otro tubo 100µl de Optimem con 5µg de ADN viral. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 40 minutos.
- III. Se agregaron 800µl de Optimem a la mezcla y se inoculan sobre la monocapa.
- IV. Se incubó durante 8 horas, a 37°C, en estufa de CO<sub>2</sub>.
- V. Se descartó la mezcla y se efectúan dos lavados con medio MEM (suplementado con 5% SFB).
- VI. Se incubó 16 horas, a 37°C, en estufa de CO<sub>2</sub>.
- VII. Se tripsinó la monocapa, transfiriendo las células a una botella T25 en medio MEM 10% SFB.
- VIII. Se incubó hasta visualizar efecto citopático (entre 24 y 48 horas) a 37°C, en estufa de CO<sub>2</sub>.

III.b.2. *Ensayo de cotransfección* - Se realizaron respetando las mismas condiciones que las indicadas para las transfecciones, con la adición del ADN correspondiente al vector de recombinación. Se realizaron pruebas del ensayo en diferentes condiciones. Las condiciones óptimas de cotransfección estuvieron dadas principalmente por una relación entre ADNviral:ADNPucLRβgal de 5µg:2µg, respectivamente.

III.b.3. *Selección de clones virales recombinantes* - Los productos de cotransfección fueron sometidos a selección por plaqueo, en condiciones de revelado del gen marcador de expresión beta galactosidasa ( $\beta$ -gal). Para realizar el primer ensayo de selección fue necesario realizar previamente la titulación de la suspensión viral a ensayar, por unidades formadoras de placa (UFP).

- I. Sobre monocapas de células MDBK sembradas en placas de Petri de 10cm de diámetro, a 100% de confluencia, se inocularon 200 unidades formadoras de placa, en 500 $\mu$ l de inóculo, completando a 2ml con medio normal MEM (GIBCO).
- II. Se incubó durante 1 hora para la adsorción, a 37°C, en estufa de CO<sub>2</sub>.
- III. Se descartó el inóculo y se sembró medio semisólido MEM:agarosa (1:1). Donde el medio MEM fue suplementado con 10% SFB, HEPES, Cloruro de magnesio (130mM), bicarbonato de sodio hasta pH7,4, y bluo-gal (sustrato para la enzima  $\beta$ -galactosidasa) (GIBCO) 350 $\mu$ g/ml disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma).
- IV. Se incubó durante 72 horas, o hasta la visualización de focos de infección coloreados.

III.b.4. *Purificación de los posibles clones recombinantes por plaqueo* - Los clones virales que mostraron coloración en el ensayo de selección fueron sometidos a plaques sucesivos con el objeto de obtener poblaciones virales completamente exentas de partículas virales de fenotipo salvaje.

III.b.5. *Marcación de la sonda*- (Prime-a-gen Labeling System) Se llevó la concentración del ADN a marcar, a 50ng/ $\mu$ l, con H<sub>2</sub>O. Se desnaturalizó calentando en Baño María por 2 min. Se colocó inmediatamente en hielo. La mezcla de reacción se realizó en un tubo *ependorf* en hielo, en el siguiente orden.

c nucleasa <i>free</i> hasta llegar a un vol de 50ul	
Buffer de marcación 5x	10ul
Mezcla de los dNTPs no marcados	2ul
ADN templado	(50ng) 1ul
BSA nucleasa <i>free</i>	2ul
[P*]dNTP50uci	2ul
ADN pol, Klenow fragment	(5unid) 1ul
	<hr/>
	50ul totales



Se mezcló bien e incubó a T° amb. en el cubículo de manipulación de radiactivos. Una vez finalizada la reacción, se utilizó todo el volumen producto marcado para la hibridación.

III.b.6. *Southern blot* - Los ADNs correspondientes a genoma viral salvaje y recombinante, fueron digeridos con HindIII (Mayfield, 1983). Los productos de digestión fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa 0,6%; transferidos durante 16 horas a una membrana Zprobe (Bio-Rad), por transferencia alcalina según recomendaciones del fabricante. La membrana fue bloqueada con SSC2x y fijada por calentamiento a 80°C. Se hibridizó con diferentes sondas específicas (L, R, y gE) previamente obtenidas por PCR y marcadas con <sup>32</sup>S con el kit Prime a Gene Labeling System (Promega). Las condiciones de incubación con la sonda, lavado, y temperatura de hibridización fueron las recomendadas por el fabricante. La membrana fue expuesta a la placa radiográfica para su visualización.

III.b.8. *Western blot* - El antígeno viral purificado, como se menciona más arriba, fue sometido a SDS-PAGE. Una vez transferido a la membrana Immunolon P (Millipore), fue ensayado para su identidad enfrentándolo a anticuerpos monoclonales específicos contra gE (Mab3)<sup>a</sup>, en una dilución 1/30000, y contra gD<sup>b</sup>, en una dilución 1/2000. Una vez realizada la transferencia, la membrana fue bloqueada con PBS-TL durante 16 horas, a 4°C. Se incubó durante 1 hora, a 37°C, con la dilución correspondiente del primer anticuerpo hecha en PBS-TL. Se lavó tres veces con PBS-T (PBS-Tween 20 0,05%), con agitación, a 37°C. Se incubó 1 hora con la dilución correspondiente del segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa, en una dilución 1/2000. Se lavó tres veces con PBS-T y una vez con PBS. Se reveló con el kit Renaissance (NEN Life Science), y se visualizó por exposición a placa radiográfica (Curix Orto ST-G2, AGFA) para su visualización.

<sup>a</sup>gentilmente cedido por Dr. Van Oirschot. Department of Virology. Central Veterinary Institute, Lelystad, Netherlands.

<sup>b</sup>gentilmente cedido por Dr. L.A. Babiuk. Veterinary Infectious Disease Organization, University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan, Canada.

III.b.9. *Ensayos de replicación viral*.- Se realizaron, en paralelo, infecciones con la cepa salvaje y con la cepa recombinante; de monocapas de células MDBK en botellas T25, en las que habían sido sembradas  $1 \times 10^6$  células totales, el día anterior. El inóculo (moi: 0,01) no fue descartado luego del período de adsorción. Los productos de infección fueron cosechados cada 6 horas, a lo largo de 60 horas. Los productos de multiplicación viral fueron guardados a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su titulación realizada por UFP.

III.b.10. *Software utilizado en este trabajo* - Para el diseño de cebadores y condiciones de reacción se utilizó el programa OLIGO TM (Primer Analysis Software).

Para la toma y análisis de fotografías de geles de agarosa y de poliacrilamida se utilizó el Programa LabWORKS.

El procesamiento de imágenes de cualquier tipo se realizó mediante Photo Paint y Corel Draw.

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó Statistix Analytical Software. Tallahassee, USA.

III.b.11. *Tratamiento estadístico de los datos*.- Las observaciones de niveles de anticuerpos, niveles de linfoproliferación, producción de  $\text{IFN}\gamma$ , excreción viral, y sintomatología clínica, fueron comparados en diferentes tiempos para cada variable mediante ANOVA. Una vez encontradas las diferencias, se realizó el análisis por LSD. Los niveles de significación en 5% para ambos análisis. Para tamaños de muestra chicos, se compararon los valores arrojados por las variables con el análisis de *t* Student.

III.c. CARACTERIZACIÓN INMUNOGÉNICA DE LA PARTÍCULA VIRAL HVB-1 $\Delta\text{gE}\beta\text{gal}$ .

***Evaluación de la vacuna inactivada HVB-1 $\Delta\text{gE}\beta\text{gal}$  en bovinos***

III.c.1 *Bovinos* -

Se seleccionaron 10 bovinos de raza Holando y Angus x Hereford (plantel de INTA) de 12 a 14 meses de edad, 9 de ellos seronegativos y un bovino seropositivo

natural utilizado como control positivo. El análisis serológico para HVB-1 se realizó por prueba de seroneutralización y test de ELISA.

III.c.2. *Inactivación viral* - El virus fue clarificado por centrifugación a 3000 g durante 30 minutos, para luego ser inactivado con BEI (Bahemann; 1975). 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 0,1M al 1%. El virus inactivado se dejó reposar por 48 horas a 4°C y luego se centrifugó a 6000 rpm por 30 minutos, a 4°C.

III.c.3. *Formulación de las vacunas inactivadas* - Se elaboraron en cada caso con el virus inactivado HVB-1 cepa salvaje, y o cepa HVB-1ΔgEβgal, y el adyuvante oleoso INTA (aceite mineral: Markol 52, emulsificador Arlacel C) preparación altamente purificada de manide mono-oleate y Tween 80, de acuerdo a la formulación INTA. Por lo que la vacuna resulta una emulsión agua en aceite (Romera, 2000). Se formularon las vacunas con una relación virus:adyuvante 1:1.

Las vacunas fueron controladas en cuanto a su inocuidad y esterilidad. Alícuotas de las formulaciones vacunales se inocularon sobre monocapas de células MDBK y se realizaron sucesivos pasajes ciegos. Se controló para la detección de efecto citopático. La esterilidad fue evaluada a través de cultivos en caldo tioglicolato (detección de anaerobios), triptosa-fosfato (detección de aerobios), Saboraud (detección de hongos).

III.c.4. *Diseño experimental de la prueba de protección de la vacuna inactivada HVB-1ΔgEβgal* - Dos bovinos fueron vacunados con la vacuna inactivada HVB-1ΔgEβgal (Vac. gE-) y dos bovinos con la vacuna inactivada HVB-1 convencional (Vac. WT) (5 ml/dosis, título de la vacuna  $10^{7.89}$  DICT<sub>50</sub>), por vía intramuscular. A los 21 días post-vacunación fueron revacunados con la misma dosis, y a los 83 días post-vacunación fueron desafiados por inoculación intranasal de 2ml de virus HVB-1 cepa LA salvaje (título  $10^7$  DICT<sub>50</sub>), utilizando nebulizador ultrasónico (ELECTROLAB AP 300). A los 3 días post-desafío, se introdujeron dos bovinos seronegativos como controles a la transmisión por contacto (grupo centinela) (**Tabla 1**).

**Tabla 1. Diseño experimental.**

Grupo	Nº bovinos	Tiempo de inoculación (días)
Vac. gE-	2	0, 21 (Vac.) <b>83 (desafío)</b>
Vac.. WT	2	0, 21 (Vac.) <b>83 (desafío)</b>
No vacunados	2	----- <b>83 (desafío)</b>
Centinela	2	-----

Una vez comprobada la finalización de la excreción viral en los bovinos desafiados, los animales fueron trasladados a un campo de aislamiento hasta los 40 días post-desafío.

III.c.5. *Toma de muestras* - Las secreciones nasales se obtuvieron insertando tampones en el *meatus* ventral de los pasajes nasales. Las muestras se tomaron a los 4, 6, 8, 11, 13, 15 y 18 dpd. , y se inocularon sobre monocapas de células MDBK.

Se tomaron muestras de sangre para serología (evaluados por ELISA y seroneutralización) a los 0, 7, 14, 21, 34 y 51 dpd; y para evaluar la respuesta inmune celular por TLP a los 7, 14, 34 y 51 dpd.

III.c.6. *Extracción de ADN de hisopados nasales* - Se realizó la extracción de muestras secuenciales de animales infectados experimentalmente con  $10^7$  DICT<sub>50</sub>/ml de la cepa LA de HVB-1, que resultaron negativas al aislamiento en cultivos celulares. Se analizaron muestras de los hisopados nasales correspondientes a los 6, 8, 11, 13, y 15 dpi.

Para la extracción de ADN de estas muestras se realizó según Alegre (2000). Se agregaron 250 µl de muestras con virus, a 250 µl de buffer de extracción (Tris10 mM, EDTA disódico 1mM, SDS 0.5%, Proteinasa K 1,6U/ml, pH 5,8).

Se utilizaron como controles positivos: sobrenadantes de cultivos de MDBK inoculados con LA (HVB-1). Luego se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente y

se agregaron 500µl de fenol:cloroformo:Isoamílico (25:24:1) pH 7,9 (Ambion). Se realizó una centrifugación a 15800rpm, durante 2 minutos. El ADN disuelto en la fase acuosa fue precipitado con 1 ml de etanol absoluto más 10 µL de NaAc 3M pH 5,8. Se centrifugó a 15800 rpm por 30 min. El *pellet* obtenido fue lavado con 1 ml de etanol 70%, secado en vacío a 40°C y resuspendido en 10 µl H<sub>2</sub>O dd, y se mantuvo a -20°C hasta su utilización.

### III.d. PRUEBA DE INMUNOGENICIDAD Y PROTECCIÓN INDUCIDAS POR LA VACUNA ATENUADA *HVB-1ΔgEβgal*.

III.d.1. *Bovinos y diseño experimental de la prueba de protección de la vacuna atenuada* - Se seleccionaron 20 bovinos de raza Holando y Angus x Hereford (plantel de INTA) de 12 a 14 meses de edad, seronegativos. El análisis serológico se realizó por seroneutralización y ELISA.

Los bovinos fueron separados en 4 grupos de 5 animales cada uno. Se inocularon 5 bovinos por vía intranasal (Vac. viva gE- IN), 5 bovinos por vía intramuscular (Vac. viva gE- IM), 5 bovinos centinela del período post-vacunal, y 5 bovinos no vacunados control del período post-desafío (**Tabla 2**).

La dosis fue de  $10^{8.6}$ DICT<sub>50</sub> para todos los animales: por la vía intranasal se administraron 2ml por nostril, en forma de aerosol, utilizando un nebulizador ultrasónico (ELECTROLAB AP 300), por la vía intramuscular se administraron los 4ml de suspensión viral. Los animales fueron controlados en cuanto a excreción viral, sintomatología clínica, y repuesta inmune durante 42 días a partir de la vacunación. A los 3 días post-vacunación se introdujeron dos bovinos seronegativos como controles a la transmisión por contacto (grupo centinela).

**Tabla 2. Diseño experimental vacuna atenuada.**

Grupo	Nºbovinos	Tiempo de inoculación (días)
Vac. atenuada gE-IN	5	0 (Vac.) 42 (desafío)
Vac.atenuada gE-IM	5	0 (Vac.) 42 (desafío)
No vacunados	5	----- 42 (desafío)
Centinelas	5	----- -----

III.d.2. *Prueba de seguridad de la vacuna atenuada en cuanto a transmisión vertical* - Se seleccionaron 4 vacas preñadas (cursando entre el tercer y sexto mes de gestación) de raza Holando y Angus x Hereford (plantel de INTA).

Las 4 hembras preñadas, fueron inoculadas por vía intravenosa. Las vacas fueron evaluadas clínicamente y en cuanto a su respuesta inmune durante un período de 42 días junto a los demás grupos experimentales. Durante la experiencia de desafío este grupo no fue expuesto al virus parental HVB-1, pero siguieron siendo evaluadas hasta sus correspondientes pariciones, y hasta los 370 días post-vacunación. Asimismo, se evaluó el estado clínico e inmunológico de los terneros, y la excreción viral en secreciones nasales.

III.e. *Toma de muestras* - Se extrajo sangre a los distintos tiempos post-vacunación y post-desafío. Se realizó el control clínico de los animales durante los 42 días posteriores a la vacunación y 18 días siguientes al desafío. El profesional a cargo del control desconocía el tratamiento realizado a cada individuo. Los parámetros incluyeron anorexia, temperatura rectal, conjuntivitis, rinitis y vulvovaginitis.

III.f. *Excreción viral*- Para las secreciones nasales, se utilizó como medio de transporte MEM-E con antibióticos (penicilina 5000 IU/ml, streptomina 2500 µg/ml, y anfotericina B10 µg/ml). Los tampones embebidos con la secreción nasal fueron centrifugados a 800rpm, durante 10 minutos, a 4°C. Parte del sobrenadante fue inmediatamente titulado en monocapas de MDBK, y el resto guardado a -80°C, hasta su procesamiento por PCR.

III. g. *Evaluación de la respuesta humoral específica contra HVB-1* - Se aplicó la técnica de Enzimo Inmuno Ensayo ya descripta (Bratanich, 1990). Se sensibilizaron placas Inmulon I (Dynatech) con antígeno control (células MDBK no infectadas) en las filas pares, y antígeno viral en las filas impares diluïdos en buffer carbonato-bicarbonato pH 9,6. Se incubaron durante 12 horas, a 4°C, se lavaron tres veces con PBS-Tween (0,5%) pH7,4 (PBST). El bloqueo se realizó con buffer PBST- ovoalbúmina 1% durante 30min, a 37°C, con agitación constante. Las diluciones de los sueros problema fueron realizadas en PBST-OVA. Se incubaron 1 hora a 37°C, se efectuaron tres lavados sucesivos y luego se incubó con el suero policlonal anti-Ig de bovino, producido en cabra y conjugado con la enzima peroxidasa (KPL).

III. h. *Evaluación de la respuesta humoral específica para la glicoproteína E de HVB-1* - Se utilizó la técnica de Enzimo Inmunoensayo según lo descripto por Oirschot (1994) ELISA Herdchek (IDEXX, Bélgica) según las recomendaciones del fabricante. Una vez diluïdos los sueros a evaluar en buffer de dilución, se incubaron durante 16 horas a temperatura ambiente sobre las microplacas que contienen el antígeno específico ya adsorbido. Una vez cumplida la incubación se lavó 6 veces con solución de lavado y se agregaron 100µl de anticuerpo monoclonal específico contra gE conjugado con peroxidasa. Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavó 6 veces con solución de lavado y se agregaron 100µl de solución de revelado. Luego de 15 minutos de incubación en la oscuridad, se frenó la reacción agregando 100µl de solución de frenado. Se realizó la lectura a 655nm.

III.i.1 *Respuesta celular específica. Preparación de linfocitos de sangre periférica* - Se centrifugó la sangre entera, para la obtención de una banda cuyo contenido mayoritario es de células mononucleares (*buffy coat*), se extrajeron los linfocitos por purificación a través de un gradiente Lymphoprep (densidad 1,077gr/ml) (Nycomed Pharma S.A.). Las células fueron resuspendidas en medio RPMI 1640 con 5% de suero fetal bovino y luego de dos lavados sucesivos, fueron contadas. La viabilidad de las células fue confirmada por la técnica de exclusión con azul tripán.

Los linfocitos fueron sembrados en placas de 96 pocillos de fondo chato a densidad aproximada de  $2 \times 10^5$  células por pocillo en 200  $\mu$ l de medio suplementado e incubado a 37°C en cámara de CO<sub>2</sub> 5%. Los bovinos no inmunizados fueron utilizados como control negativo para los estudios tanto de proliferación como para mediciones de niveles de anticuerpos. El control de viabilidad de células fue realizado incubando las células de cada individuo con Concanavalina A (Con A).

III.i.2 *Ensayo de proliferación de linfocitos (TLP)* - Los linfocitos preparados fueron cultivados en pocillos por triplicado con HVB-1 en un título de  $10^5$  DICT<sub>50</sub> inactivado por exposición a UV, o medio solo, incubados durante 4 días, a 37°C, en estufa de CO<sub>2</sub> (5%). A las 18 horas previas a la cosecha, se añadieron 0,4  $\mu$ ci [<sup>3</sup>H]timidina a cada pocillo (20  $\mu$ l). Los linfocitos marcados se cosecharon y se midió la radiactividad incorporada mediante contador de centelleo (LKB Wallac, 1219 Rackbeta). Se calculó la media de las mediciones realizadas por triplicado. Los resultados se obtuvieron en cuentas por minuto (cpm) y se expresaron como Índice de Estimulación (IE) = marca incorporada frente al antígeno HVB-1/ marca incorporada frente al antígeno control negativo MDBK.

III.i.3. *Cuantificación de niveles de IFN $\gamma$*  - Las células mononucleares fueron evaluadas en cuanto a su capacidad de secretar IFN $\gamma$  en respuesta específica a la estimulación *in vitro* con el antígeno viral. Se sembraron  $1.5 \times 10^6$  células, en 200 $\mu$ l de RPMI 10% SFB, por pocillo, en placas de 96 pocillos, fondo en “u”, estériles. Se estimularon con 20 $\mu$ l de antígeno concentrado (10x), durante 20 hs, a 37°C, en estufa de CO<sub>2</sub>. Se descartó el sobrenadante, y las células fueron resuspendidas en 100 $\mu$ l de RPMI 10% SFB. Se sembraron sobre una placa Inmulon II estéril, previamente sensibilizada con monoclonal anti IFN $\gamma$  bovino (1/1500), y bloqueada con RPMI 10% SFB. Para construir la curva de referencia, se sembró IFN $\gamma$  en concentraciones conocidas. Se incubaron durante 45 hs a 37°C en estufa de CO<sub>2</sub> (5%). Luego se lavó la placa con H<sub>2</sub>O (6 veces) y con PBS-T (4 veces), y se reveló con suero de conejo anti-IFN $\gamma$  bovino (1/200) diluido en PBST-BSA 1%. Todas las diluciones de los anticuerpos reveladores se realizaron en PBST-BSA 1%, y las incubaciones fueron en todos los casos de una



hora a temperatura ambiente). Luego se incubó con 100µl de la dilución 1/6000 de suero de rata anti-conejo biotinilado. Se lavó con y se incubó con 100µl de estreptavidina fosfatasa alcalina (1/500). Finalmente, se reveló con 100µl de p-nitrofenil fosfato disódico (PPN) (2 pastillas/10ml) diluías en buffer para fosfatasa alcalina (10% dietanolamina, 0,01% Cl<sub>2</sub>Mg 1M) pH 9,8. La lectura se realizó a 405nm a los 5, 25 y 35 minutos. Las densidades ópticas (D.O.) se refieren a las obtenidas con el IFN $\gamma$  de concentración conocida.

### III.j. Interferencia de anticuerpos maternos.

III.j.1. **Bovinos** - Fueron utilizados veintinueve bovinos de 2-3 meses de edad. Se evaluó la presencia o ausencia de anticuerpos por ELISA de anticuerpos totales según Romera (2000). En caso de positividad se titularon los niveles de anticuerpos específicos contra HVB-1 y se los dividió en dos categorías: aquellos que poseían valores de ELISA menores o iguales a 1,6 (ELISA  $\leq$  1,6) y los que poseían valores de ELISA mayores a 1,6 (ELISA >1,6).

### Diseño experimental

III.j.1.a. **Terneros de 3 meses de edad**- Los terneros fueron distribuidos al azar en cuatro grupos, según el tratamiento colocando 50% de animales con alto título de anticuerpos (ELISA > 1,6) y 50% de animales con bajo título de anticuerpos (ELISA  $\leq$  1,6): **Grupo I**, terneros vacunados con HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal vivo sin revacunación; **Grupo II**, animales vacunados con HVB-1 $\square$ gE $\beta$ gal vivo, con revacunación; **Grupo III**, terneros vacunados con HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal inactivado, con revacunación a los 60dpv ;y un grupo de animales no vacunados (**Tabla 3**).

**Tabla 3.** Esquema del diseño experimental

Grupo	Nºbovinos	ELISA		Vía de inoc.	Dosis (ml)	Fechas de inoculación (días)
		$\leq$ 1,6	> 1,6			
<b>Grupo I</b>	9	6	3	SC	2,5	0 (Vac.) -----
<b>Grupo II</b>	10	6	4	SC	2,5	0 (Vac.) 60 (revac.)
<b>Grupo III</b>	9	5	4	IM	3	0 (Vac.) 60 (revac.)
<b>No vacunados</b>	4	1	3	-	-	----- -----

II.j.1.b. *Terneros de 8 meses de edad*- Se vacunaron 3 bovinos de 8 meses de edad que habían presentado títulos de anticuerpos calostrales mayores a 1,6. A partir del grupo de animales vacunados a los 3 meses de edad se revacunaron 5 animales y se conservaron como control los 4 bovinos restantes (**Tabla 4**).

**Tabla 4.** Esquema del diseño experimental

Grupo	Nº bovinos	Fechas de inoculación	Edad al momento de ingresar al grupo
Vac.3 m	4	0 (Vac.)	3 meses
Vac. 3 m y 8 m	5	0 (Vac.) 160 (Revac.)	3 meses
Vac. 8 m	3	160 (Vac.)	8 meses

III.j.2. *Vía de inmunización e inóculo* - Las vías de inoculación utilizadas fueron: vía intramuscular (IM), para la vacuna inactivada; y subcutánea (SC), para la vacuna atenuada. Los volúmenes utilizados fueron 3 ml para la vacuna inactivada y 2,5 ml para la vacuna atenuada, en ambos casos la masa viral total fue de  $10^{7.5}$  DICT<sub>50</sub> (se probó una menor masa viral que la utilizada en la primer experiencia donde se probó la vacuna HVB-1ΔgEβgal atenuada en una dosis de  $10^{8.5}$  DICT<sub>50</sub>).

III.k. *Inmunogenicidad a largo plazo inducida por la vacuna atenuada*- La respuesta inmune humoral inducida por la vacuna atenuada administrada por vía intravenosa fue evaluada a lo largo de 330 días en tres de cuatro bovinos, uno de los bovinos murió a los 80 dpv por razones no relacionadas con el tratamiento. Estos bovinos habían recibido una dosis de  $10^{8.5}$  DICT<sub>50</sub> en el día 0 de la experiencia, y no fueron revacunados. La respuesta humoral de anticuerpos totales fue evaluada mediante los ensayos de seroneutralización y ELISA; para certificar la ausencia de anticuerpos contra la glicoproteína E de HVB-1, se utilizó el ELISA comercial Herdchek (IDEXX).

## IV. RESULTADOS

### IV.1. Construcción del vector de recombinación

Con el objeto de construir un plásmido de recombinación que contuviera secuencias homólogas flanqueantes al gen gE y también una secuencia del gen marcador de la  $\beta$ galactosida, se procedió a la generación de los fragmentos homólogos por amplificación por PCR y a clonados sucesivos en diferentes construcciones de manera tal que se arribó al vector PuLR $\beta$ gal.

Para ello, se amplificaron por PCR las regiones flanqueantes al gen codificante de la gE. Se obtuvieron fragmentos de pesos moleculares aproximados asimilables a los esperados para dichos productos. El producto correspondiente al fragmento Izquierdo (L), cuyo par de cebadores específicos fueron gE<sub>1</sub> y gE<sub>2</sub>, rindió un producto de 780 pb. Mientras que el producto correspondiente al fragmento Derecho (R), cuyo el par de cebadores específicos fueron gE<sub>3</sub> y gE<sub>4</sub>, rindió un producto de 630 pb (**Figura 1.d**).

Los productos de PCR fueron ligados al plásmido pGemTEasy, de 3000pb. En primer lugar, se obtuvo como producto la construcción de la ligación del fragmento L, la construcción pTAL de 3780pb (**Figura 3.b y c**). El clon pTAL<sub>5</sub> resultó correcto, por lo que se procedió a extraer el fragmento de ADN de origen viral Sall-BamHI, de 734pb. Por otro lado, se obtuvo como producto de la ligación del fragmento R, la construcción pTAR de 3630pb (**Figura 3.b y d**). El clon pTAR<sub>1</sub> resultó correcto, por lo que se procedió a extraer el fragmento de ADN de origen viral EcoRI-BamHI, de 623pb.

Los fragmentos correspondientes a las regiones flanqueantes al gen gE fueron clonados, en forma sucesiva, en el plásmido Puc19, de 2690pb. En primer lugar, de la ligación del fragmento Sall-BamHI proveniente del pTAL<sub>5</sub>, se obtuvo la construcción PucL, de 3424pb (**Figura 4.b y c**). El clon PucL<sub>9</sub> resultó correcto por lo que se continuó con la ligación del fragmento R, EcoRI-BamHI proveniente del pTAR<sub>1</sub>. La construcción resultante de esta ligación fue el PucLR, de 4047pb (**Figura 4.d y e**). El clon PucLR<sub>4</sub> resultó correcto por lo que se lo utilizó para la construcción del vector de recombinación definitivo.

Se introdujo el gen marcador de expresión de la enzima  $\beta$ -galactosidasa de *E.Coli*, en el vector de recombinación. Por un lado, a partir del plásmido comercial pCMV $\beta$  se

obtuvo un fragmento de 4,5kb correspondiente al gen marcador  $\beta$ -galactosidasa, por digestión con la enzima PstI. El producto de esta ligación fue el PucLR- $\beta$ gal, de 8547pb. En una primera selección por digestión con la enzima SacI se seleccionó el clon PucLR- $\beta$ gal<sub>6</sub> (**Figura 5.c**). La secuencia de los fragmentos flanqueantes a gE (L y R) en el vector de recombinación PucLR $\beta$ gal fue confirmada por secuenciación (**Figura 6**).

De esta manera, una vez confirmada la estructura del clon PucLR- $\beta$ gal<sub>6</sub> se utilizó en los ensayos de cotransfección.

#### IV.2. *Obtención de partículas virales recombinantes*

Inicialmente, fue necesaria la puesta a punto de la técnica de transfección, es decir, la obtención de partículas virales a partir del ADN viral. Las preparaciones de ADN a utilizar en ensayos de transfección requieren de un alto índice de pureza ( $DO_{260/280} \geq 1.80$ ) así como un alto porcentaje de integridad del ADN viral. Se produjeron 12 *stocks* virales independientes a partir de los cuales se purificó el ADN viral; y se probó la capacidad de cada uno de ellos de producir una descendencia virulenta a través del ensayo de transfección descrito en III.b.1.

Con el objeto de obtener clones virales recombinantes, se realizaron pruebas del ensayo en diferentes proporciones entre ADN viral y plasmídico. Las condiciones óptimas de cotransfección estuvieron dadas por una relación entre ADN viral:ADN vector de 5 $\mu$ g:2 $\mu$ g, respectivamente y las mismas temperaturas, tiempos de incubación y lavados que para la transfección arriba descrita.

A partir de 15 eventos de cotransfección, se obtuvieron 8 productos independientes de cotransfección que consistieron en poblaciones heterogéneas de virus parental y recombinante. Por lo que fue necesario realizar la purificación y la selección de los clones virales obtenidos.

La selección primaria de clones recombinantes se realizó macroscópicamente mediante un ensayo de revelado de la expresión de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, en monocapas de células inoculadas con el producto de la cotransfección. Con el objeto de obtener focos aislados que permitieran seleccionar clones virales individuales se estimó

la cantidad óptima de focos de infección que permanecían sin solaparse, a lo largo de las 72 horas de duración del ensayo. Dicha cantidad fue de 200-300 UFP por placa de Petri.

Para ello fue necesario titular el producto de cotransfección a los efectos de estimar la dilución del inóculo a utilizar en el ensayo. Una vez titulado el producto de cotransfección, se procedió a la inoculación de monocapas de MDBK sembradas en placas de Petri, al 100% de confluencia ( $5 \times 10^6$  células totales) en condiciones tales que el medio semisólido de mantenimiento contenía el sustrato para la enzima marcadora y permitió la visualización tanto macroscópica como microscópica de los focos de infección del virus recombinante a modo de focos azules, completamente asimilables a un control positivo (HVB-5  $\beta$ -gal+) (gentilmente cedido por el Dr. Chowdhury de la Universidad de Kansas, EEUU) (**Figura 7.b**).

Para la purificación del virus recombinante putativo, se sometió el clon a cinco pasajes sucesivos bajo medio semisólido, en condiciones de revelado de la enzima  $\beta$ -galactosidasa (**Figura 7.c, d, e**). Posteriormente, se infectaron monocapas de células MDBK, con el objeto de obtener un mínimo stock viral para su caracterización. De acuerdo con las propiedades de crecimiento en cultivo de células, y el título alcanzado en los primeros ciclos de replicación se seleccionó el **clon a** como putativo clon recombinante HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal, y se lo caracterizó a nivel genético, proteico e inmunológico.

#### IV.3. Identificación del ADN recombinante por amplificación específica (gE-PCR).

La selección definitiva de los clones recombinantes se realizó a través de su caracterización genética por amplificación específica de la región codificante para la gE.

Como control de la calidad del ADN en cuanto a su capacidad de ser amplificado, se utilizaron los cebadores específicos para la amplificación de la región izquierda (L). Utilizando como ADN molde el material genómico del **clon a**, no se detectó producto de amplificación específica con los cebadores gE<sub>7</sub> y gE<sub>8</sub> específicos para amplificar parte de la región codificante de gE, de 580pb; mientras que sí se detectó producto de PCR con los cebadores para L, de 780pb. Asimismo, se utilizaron como controles de PCR, ADN de virus parental, y ADN del vector de recombinación PucLR $\beta$ gal. Con el ADN del virus parental como templado, se detectaron ambos

productos de amplificación; mientras que con el ADN correspondiente al PucLR $\beta$ gal como templado sólo se detectó producto específico para la región L (**Figura 8. b**).

Estos resultados confirmaron la ausencia de secuencias codificantes para gE en el ADN del **clon a** de HVB-1, al mismo tiempo que permitieron verificar la pureza del mismo. Por lo que se decidió la selección de dicho clon para continuar con el análisis de su identidad a nivel genético, proteico, e inmunológico.

#### IV.4. Caracterización genética por Southern Blot.

Con el objeto de confirmar con una técnica de alta sensibilidad la ausencia de secuencias codificantes para gE y describir la estructura del genoma viral en la región de interés, se realizó la hibridación específica del ADN correspondiente al **clon a** digerido con la enzima HindIII, con tres sondas diferentes dirigidas contra las regiones gE, L, y R; en tres ensayos independientes, respectivamente. Las sondas utilizadas fueron obtenidas a partir de los productos de amplificación generados por PCR con el ADN parental y los cebadores ya descritos en la Figura 2, correspondientes a cada una de las regiones gE, L, y R. Los productos de PCR fueron marcados radiactivamente por extensión del cebador (*primer extension*). En primer lugar, la sonda L hibridizó el ADN de la cepa recombinante permitiendo visualizar una banda de 23kb, mientras que al hibridizar con el ADN parental la banda detectada es de alrededor de unos 8kb. En segundo lugar, la sonda R hibridizó el ADN de la cepa recombinante permitiendo visualizar nuevamente una banda de 23kb, mientras que al hibridizar con el ADN parental la banda detectada fue de alrededor de unos 12kb. En tercer lugar, la sonda gE no hibridizó el ADN de la cepa recombinante, mientras que al hibridizar con el ADN parental la banda detectada fue de alrededor de unos 8kb (**Figuras 8 y 9**).

De esta manera se confirmó en el **clon a** de HVB-1 la ausencia de secuencias codificantes para la gE, mientras que las secuencias flanqueantes L y R permanecieron intactas. Por otro lado, se verificó la delección del sitio de restricción correspondiente a la enzima HindIII presente dentro del marco abierto de lectura de la gE; e indirectamente se verificó la adición de  $\beta$ gal como un fragmento de 4500pb ubicado en la región deleteada.

#### IV.5. Caracterización proteica por Western Blot.

Con el objeto de analizar la presencia de la proteína gE en el **clon a** de HVB-1, se procedió a su detección en un ensayo de Western blot a través del uso de anticuerpos monoclonales. El virus concentrado y purificado fue sometido a PAGE, en condiciones desnaturalizantes, transferido y enfrentado a anticuerpos monoclonales específicos, uno contra gE y otro contra la glicoproteína estructural gD; en dos ensayos independientes. Por un lado, con el anticuerpo monoclonal específico para gE no reaccionó con las proteínas de cepa recombinante (**clon a**), mientras que sí lo hizo con la proteína en la cepa HVB-1 parental (**Figura 10.a**). Esto indica que la cepa recombinante no produce la gE, de manera que confirma lo observado a nivel genético.

Por otro lado, con el anticuerpo monoclonal específico para gD se visualizó una banda de un peso molecular aproximado de 40kD tanto en la calle correspondiente la cepa recombinante (**clon a**), como en la calle correspondiente a la cepa HVB-1 parental (**Figura 10.b**). Esto refleja que la expresión de gD no está afectada en la cepa HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal.

#### IV.6. Caracterización de la habilidad replicativa del clon HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal

A fines de conocer la viabilidad y la eficiencia replicativa de la cepa HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal, se realizaron dos ensayos independientes de cinética de crecimiento en monocapas de células MDBK, en donde se comparó el comportamiento replicativo en cultivos celulares del clon purificado HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal y la cepa HVB-1 parental. La  $moi$ . utilizada fue de 0,01. Los dos ensayos difirieron principalmente en las condiciones en las que transcurrió la multiplicación viral. Una versión del ensayo se realizó sin retirar el inóculo, condición de crecimiento que corresponde a la utilizada normalmente para la obtención de grandes volúmenes de virus para la elaboración de vacunas. La cosecha del producto de replicación, se realizó cada 6 horas a lo largo de un período de 60 horas totales. Los valores obtenidos para los títulos virales de la cepa recombinante tendieron a superponerse punto por punto con la cepa parental. En el segundo ensayo, el inóculo inicial fue retirado, de modo de evitar todo tipo de interferencia, el período de evaluación fue de 30 horas totales, y las cosechas se realizaron cada 3 horas. Nuevamente, los valores obtenidos para los títulos virales de la cepa recombinante

fueron similares a los observados para la cepa parental. Al analizar los resultados estadísticamente, no se registraron diferencias significativas en el título viral entre cepas para los distintos tiempos dentro de un mismo ensayo, ni tampoco se detectaron diferencias entre ambos ensayos descritos (*t* de Student,  $p < 0.05$ ). En ambos casos se detectaron títulos superiores a  $10^7$  DICT<sub>50</sub>/ml a partir de las 18 horas post-infección, que se mantuvieron hasta el final de la experiencia (**Figura 11**).

Asimismo, se observó un comportamiento similar de la cepa HVB-1ΔgEβgal cuando fue multiplicada en monocapas de células MDBK crecidas en botellas rotantes (*rollers*) de 4 litros, sistema rutinariamente utilizado en nuestro laboratorio para la producción de antígeno vacunal.

Los resultados obtenidos reflejaron un comportamiento de crecimiento en cultivo de tejidos de la cepa HVB-1ΔβgEβgal similar al descrito para la cepa HVB-1 parental. Por ello la cepa HVB-1ΔgEβgal resultó una buena candidata para su utilización en la formulación de una vacuna inactivada y también su utilización directa como vacuna viva.

#### *IV.7. Caracterización inmunogénica de la cepa viral HVB-1ΔgEβgal. Evaluación de la inmunogenicidad y eficacia protectora de una vacuna inactivada en bovinos*

Con el objeto de evaluar la integridad de la cepa HVB-1ΔgEβgal desde el punto de vista inmunogénico se formuló una vacuna inactivada que fue administrada a un número reducido de bovinos en un ensayo piloto para evaluar la respuesta inmune y grado de protección al desafío inducidos por esta cepa recombinante en comparación con su cepa parental.

##### *IV.7.a. Respuesta humoral específica contra HVB-1.*

###### *Respuesta de anticuerpos totales.*

Un total de dos bovinos por grupo fueron vacunados por vía IM con dos dosis de la vacuna inactivada HVB-1gE- (Vac. gE-) o la vacuna inactivada HVB-1 cepa salvaje (Vac. wt) con un intervalo de 21 días. Dos bovinos fueron incluidos como controles no vacunados. Con el objeto de evaluar la eficacia protectora de la vacuna inactivada formulada en base a la cepa de HVB-1ΔgEβgal, los bovinos vacunados fueron



desafiados bajo condiciones controladas con la cepa HVB-1 parental, a los 83dpv. Adicionalmente, al momento del desafío se incorporaron dos bovinos centinelas para evaluar la transmisión por contacto.

#### IV.7.a.i.1. *Período post-vacunación*

En los grupos de animales vacunados, los niveles de anticuerpos en suero comenzaron a detectarse a partir de los 14 días post-vacunación. Los valores fueron parejos para ambas vacunas, de 2,25 en ambos grupos en el día 14, tiempo a partir del cual comenzaron a diferenciarse las respuestas entre vacunas. El grupo vacunado con la Vac.gE- mostró valores que superaron a los detectados en los bovinos vacunados con la Vac.wt, en todos los tiempos evaluados, a partir del día 27 post-vacunación. La máxima diferencia se registró en el momento del desafío (83dpv) donde los títulos de anticuerpos para cada vacuna llegaron a valores de 4,3 y 2,68 respectivamente, ( $p=0.077$ ). Los animales no vacunados se mantuvieron seronegativos durante todo el periodo pre-desafío.

#### IV.7.a.i.2. *Período post-desafío*

Luego del desafío viral, los niveles de anticuerpos permanecieron en aumento pero no se mantuvieron las diferencias entre vacunas, la Vac.gE- mostró un título de anticuerpos promedio de 4,08 mientras que el valor alcanzado por la Vac.wt fue de 4,29, a los 97 dpv/14 dpd. Los bovinos no vacunados mostraron una respuesta específica con títulos superiores a 3, en el tiempo 14 dpd, y estos valores se mantuvieron hasta la finalización de la experiencia (**Figura 12**). No se detectó respuesta humoral específica en los bovinos del grupo centinela.

Por otro lado, los niveles de respuesta humoral neutralizante (no presentado) inducida en ambos períodos fueron coincidentes con los niveles detectados por ELISA.

Los datos obtenidos demostraron que la cepa HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal resultó altamente inmunogénica al ser administrada como vacuna inactivada, dado que indujo una respuesta inmune humoral similar a la detectada para la vacuna formulada en base a la cepa HVB-1 salvaje.

#### IV.7.b. Respuesta celular específica contra HVB-1

Con el objeto de confirmar la integridad y la capacidad inmunogénica de la vacuna inactivada formulada en base a la cepa HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal, se analizó la respuesta celular T en cuanto a la capacidad proliferativa de linfocitos de los animales vacunados y desafiados según lo descrito en la sección IV.7.

##### IV.7.b.i. Linfoproliferación

###### IV.7.b.i.1. Período post-vacunación

En todos los grupos de animales vacunados se detectó respuesta linfoproliferativa específica contra HVB-1 a partir del día 21 post-vacunación. Los dos animales vacunados con Vac.gE-, mostraron respuesta positiva (IE  $\leq$  3) a partir de los 21 y hasta los 66 días post-vacunación y hasta el final de la experiencia. Entre los animales vacunados con Vac. wt, se detectó un solo animal con una fuerte respuesta proliferativa positiva, el día 21 post-vacunación que se mantuvo positivo hasta el final de la experiencia, mientras que en otro animal se observaron valores de IE positivos recién en el día 66 post-vacunación. En el día 83pv todos los animales vacunados mostraron respuesta proliferativa detectable. No se detectó respuesta proliferativa en el grupo de bovinos centinela.

###### IV.7.b.i.2. Período post-desafío

Al inicio del desafío, a los 83dpv, se registró la disminución de la respuesta proliferativa en un animal vacunado con Vac.gE-, a niveles menores que el punto de corte establecido (IE  $\leq$  3). Paralelamente, el resto de los bovinos vacunados mostró una tendencia creciente en TLP hasta el final del período de estudio. En uno de los animales no vacunados, se detectó respuesta proliferativa positiva con un nivel de IE de 4,3 en el día 131pv (48dpd). No se detectó respuesta proliferativa en los bovinos no vacunados (**Figura 14**).

Los datos obtenidos demostraron que la cepa HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal resulta altamente inmunogénica cuando se administra en vacunas inactivadas, induciendo una respuesta inmune proliferativa similar a la detectada para la vacuna formulada en base a la cepa HVB-1 salvaje.

#### IV.7.b.ii. Respuesta de IFN $\gamma$

##### IV.7.b.ii.1. Período post-vacunación

Como dato complementario para analizar la respuesta celular inducida por la vacuna inactivada formulada en base a la cepa de HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal, se evaluó la producción de IFN $\gamma$  específica en linfocitos extraídos de los bovinos vacunados en los tiempos 0 y 21 de la experiencia, con la vacuna inactivada HVB-1gE- (Vac. gE-) o la vacuna inactivada HVB-1 cepa salvaje (Vac. wt).

Durante el período post-vacunal se registraron niveles detectables de IFN $\gamma$  en ambos grupos de animales vacunados. En el grupo de bovinos vacunados con Vac.gE-, el valor detectado en uno de los animales a partir de los 21dpv fue de 52,08pg/ $\mu$ l, y se mantuvo en aumento con el transcurso de la experiencia. En el grupo de animales vacunados con Vac.wt los niveles de IFN $\gamma$  detectados tendieron a ser mayores que los observados para el grupo Vac.gE-, en el tiempo 21pv dicha diferencia detectada entre vacunas fue significativa ( $p = 0,03$ ). En el grupo Vac.wt se registraron niveles de IFN $\gamma$  de 209,8pg/ $\mu$ l, el día 21pv, en uno de los bovinos; y de 174,11pg/ $\mu$ l el día 21pv y 435,61 pg/ $\mu$ l, en el día 27pv para el otro bovino (**Figura 15**).

##### IV.7.b.ii.2. Período post-desafío

En el período post-desafío los niveles de IFN $\gamma$  se mantuvieron en aumento en la mayoría los animales inmunizados. Entre los días 83 y 97pv (0 y 14dpd, respectivamente), la respuesta detectada para los bovinos del grupo Vac.wt fue más elevada que la detectada en el grupo Vac.gE- con niveles que oscilaron entre los 412,5pg/ $\mu$ l y 1336pg/ $\mu$ l para uno de los bovinos, y 174pg/ $\mu$ l y 435,6pg/ $\mu$ l para el otro bovino. En el grupo de bovinos vacunados con Vac.gE-, un animal mostró una respuesta de 287,5pg/ $\mu$ l, en el día 89pv (6dpd); pero luego no fue posible detectar IFN $\gamma$  producido por sus linfocitos, mientras que para el otro bovino no fue posible detectar niveles de IFN $\gamma$  hasta el día 114pv (31dpd). Se observaron niveles detectables de IFN $\gamma$  en uno de los animales no vacunados, con valores de 60,94pg/ $\mu$ l y 185,5pg/ $\mu$ l, en los días 97 (14dpd) y 114 pv (31dpd), respectivamente; y 655pg/ $\mu$ l en el día 114pv en otro bovino.

En el grupo de bovinos centinela no se observaron niveles detectables de IFN $\gamma$  en ningún momento evaluado durante el período de la experiencia.

Los resultados descriptos demostraron que la cepa HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal resulta altamente inmunogénica cuando se la administra en vacunas inactivadas, induciendo una respuesta de IFN $\gamma$  similar a la detectada para la vacuna formulada en base a la cepa HVB-1 salvaje.

#### IV.7.c. Excreción viral post-desafío.

Como medida de la capacidad protectora de la vacuna marcadora inactivada, se evaluó la presencia de partículas virales infectivas en secreciones nasales provenientes de los bovinos vacunados con la vacuna inactivada HVB-1gE- (Vac. gE-) o la vacuna inactivada HVB-1 cepa salvaje (Vac. wt); y desafiados en el tiempo 83 (0 dpd) de la experiencia, con virus HVB-1 cepa salvaje.

No se observó excreción viral post-desafío en ninguno de los animales vacunados con la Vac.gE-. Dentro del grupo de Vac.wt se observó excreción viral en uno de los animales, entre los días 4 y 10 pd con títulos de 2,5 a 4,5 DICT<sub>50</sub>/ml. En el grupo de los bovinos no vacunados, se detectaron altos niveles de excreción viral entre los días 4 y 12 pd, con títulos que oscilaron entre 1,75 y 6,5 DICT<sub>50</sub>/ml. Los animales del grupo centinela mostraron importantes niveles de excreción viral en secreciones nasales entre los días 8 y 14 pd, con títulos de que oscilaron entre 4 y 6,5 DICT<sub>50</sub>/ml, para un bovino, y 2,25 a 6,25 DICT<sub>50</sub>/ml para el otro bovino. Los grupos de bovinos no vacunados y centinelas se diferenciaron significativamente de los grupos de bovinos vacunados ( $p < 0,05$ ) (**Figura 15.a**).

También fue posible detectar excreción viral en secreciones oculares de animales del grupo centinela entre los días 13 y 14 post-desafío, con títulos de 5,5 a 3 DICT<sub>50</sub>/ml (**Figura 15.b**).

Estos datos revelaron una fuerte capacidad protectora frente a la infección viral inducida en bovinos con la vacuna inactivada formulada en base a la cepa de HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal.

#### IV.7.d. *Sintomatología clínica*

Con el objeto de evaluar la eficacia protectora de la vacuna inactivada formulada en base a la cepa de HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal, se estudiaron los parámetros de temperatura corporal, anorexia, depresión, y formación de nódulos en el sitio de inoculación en los bovinos vacunados con la vacuna inactivada HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal (Vac. gE-) o la vacuna inactivada HVB-1 cepa salvaje (Vac. wt); y desafiados en el tiempo 83 (0 dpd) de la experiencia con virus HVB-1 cepa salvaje (**Tabla 5**).

Independientemente de la vacuna recibida, todos los bovinos vacunados manifestaron menor severidad en sintomatología clínica que los controles sin vacunar, quienes manifestaron una rinitis sero-mucosa severa durante un período de 8 días. Los bovinos del grupo centinela desarrollaron una fuerte conjuntivitis entre los 10 y 14 dpd. No se detectó aumento de la temperatura corporal, anorexia, depresión, ni formación de nódulos en el sitio de inoculación; en ningunos de los grupos analizados, a lo largo de todo el período evaluado.

#### IV.7.e. *Detección de HVB-1 en secreciones nasales y oculares, por PCR*

No fue posible detectar producto de amplificación en aquellas secreciones provenientes de los bovinos vacunados con Vac. gE-, en ninguna de las muestras tomadas a lo largo de la experiencia. Asimismo, se detectó producto de amplificación en las secreciones de solo uno de los bovinos vacunado con Vac. wt. mientras que se detectó producto de amplificación en todos los bovinos no vacunados y centinelas (**Tabla 6**).

#### **IV.8. Prueba de inmunogenicidad y protección inducidas por la vacuna atenuada HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal.**

##### **IV.8.a. Respuesta humoral específica contra HVB-1**

###### **IV.8.a.i. Seguridad de la vacuna atenuada**

Con el propósito de conocer la seguridad de la cepa HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal al ser administrada como vacuna viva, en términos de transmisión vertical y riesgo abortigénico, se analizó la evolución de 4 vacas preñadas vacunadas por vía IV. La vía intravenosa es considerada una vía directa para la infección del feto mediante la cual se puede evaluar la inocuidad de vacunas vivas modificadas por ingeniería genética.

A partir de los 7 dpv, no se detectó respuesta humoral en las vacas vacunadas por vía intravenosa (Vac. viva gE- IV), excepto una que presentó un título de 1,6. A partir de los 19 dpv todos los animales fueron positivos, y se mantuvieron con un promedio cercano a 2 hasta los 72 dpv (**Figura 16**). Se detectaron niveles de anticuerpos específicos para HVB-1, en un ternero nacido de una madre vacunada, con un título promedio de 1,6 (no mostrado).

De esta manera se demostró la efectividad de la vacuna viva HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal administrada por la vía IV para inducir una respuesta humoral específica sostenida durante 72 días luego de la inmunización, con la así como también la adecuada transferencia de anticuerpos calostrales al ternero recién nacido durante la experiencia.

##### **IV.8.a.ii. Respuesta de anticuerpos totales evaluados por ELISA**

###### **IV.8.a.ii. Eficacia protectora de la vacuna atenuada**

Con el objeto de evaluar la capacidad inmunogénica y protectora de la cepa HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal cuando es utilizada en una vacuna viva, se estudió la respuesta inmune humoral de bovinos que fueron sometidos a la vacunación en el tiempo 0 de la experiencia, por diferentes vías de inoculación: intranasal (Vac. viva gE- IN), o por vía intramuscular (Vac. viva gE- IM) y posteriormente desafiados con la cepa HVB-1 LA parental a los 42 dpv .

#### IV.8.a.ii.1. *Período post-vacunación*

Los niveles de anticuerpos contra HVB-1 comenzaron a detectarse a partir de los 19 dpv en los bovinos vacunados por vía intramuscular (Vac. viva gE- IM) con un valor promedio de 2,92. Los animales vacunados por vía intranasal (Vac. viva gE- IN) mostraron una respuesta humoral detectable recién a los 34 dpv, con un valor promedio de 0,96 mientras que los bovinos del grupo Vac. viva gE- IM alcanzaron niveles promedio de 2,2. Estas diferencias entre las dos vías de vacunación IN e IM se mantuvieron significativas ( $p < 0.05$ ) entre los 19dpv y hasta los 42pdv. En el momento del desafío (42 dpv), los niveles promedio de anticuerpos fueron de 0,7 ( $\pm 1,2$ ) para el grupo Vac. gE- viva IN, y de 2,36 ( $\pm 1,2$ ) para el grupo Vac. gE- viva IM. En el grupo centinela, no se detectaron anticuerpos específicos contra HVB-1 en ningún momento durante el período post-vacunación.

#### IV.8.a.ii.2. *Período post-desafío*

Luego del desafío viral (42 dpv), se observó un incremento en los niveles de anticuerpos de ambos grupos evaluados, que llegó a ser significativo a los 56 dpv con valores de 3,7 ( $\pm 0,3$ ) para el grupo Vac.viva gE- IN, y de 3,88 ( $\pm 0,24$ ) para el grupo Vac.gE- viva IM., mientras que en el grupo de bovinos no vacunados sólo se detectó un animal con anticuerpos en el día 7 post-desafío. El grupo de bovinos no vacunados mostró títulos de anticuerpos, con un valor promedio de 3,04 ( $\pm 0,29$ ), a los 14dpd (**Figura 16**).

Adicionalmente, los niveles de respuesta humoral neutralizante inducida (no presentado) en ambos períodos fueron coincidentes con los niveles detectados por ELISA.

Los datos obtenidos demostraron que la cepa HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal resultó altamente inmunogénica cuando se la utiliza como vacuna viva, induciendo una respuesta inmune humoral similar a la descrita para la vacuna inactivada formulada en base a la cepa HVB-1 salvaje.

#### IV.8.b. *Respuesta inmune celular contra HVB-1*

##### IV.8.b.i. *Seguridad de la vacuna viva*

Se analizó la efectividad de la vacuna viva HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal administrada por vía intravenosa en la inducción de una la respuesta celular a nivel de la respuesta proliferativa de linfocitos de vacas preñadas.

A los 7 dpv, se detectaron bovinos con respuesta positiva al TLP en el grupo Vac. viva gE- IV donde sólo (1/4) de los animales fueron positivos. No se volvió a registrar IE  $\leq 3$  para este grupo, a lo largo del período de estudio (**Figura 17**).

##### IV.8.b.ii. *Eficacia protectora de la vacuna atenuada*

###### IV.8.b.ii.1. *Período post-vacunación*

A los 7 dpv, se detectaron distintos porcentajes de bovinos con respuesta positiva al TLP, dependiendo de la vía de inoculación. En el grupo Vac. viva gE- IN el 100% de los bovinos mostraron respuesta TLP positiva, mientras que en el grupo Vac. viva gE- IM el 60% fueron positivos en el ensayo de TLP.

###### IV.8.b.ii.2. *Período post-desafío*

A los 72 dpv (30dpd), se detectó respuesta positiva en el 75% de los bovinos del grupo Vac. viva gE- IN, y en el 40% de los Vac. viva gE- IM (**Figura 17**). En el grupo de animales no vacunados se detectó un 50% de bovinos positivos, a los 72dpv. Mientras que, en el grupo centinela. no se detectó respuesta TLP positiva a lo largo del período evaluado.

Los resultados obtenidos demostraron que la cepa HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal resulta una muy buena inductora de la respuesta proliferativa luego del desafío viral.

#### IV.8.c.i. *Respuesta de IFN $\gamma$*

##### IV.8.c.i. *Seguridad de la vacuna atenuada*

Se estudiaron los niveles de IFN $\gamma$  de las vacas preñadas y vacunadas con la vacuna atenuada, con el objeto de conocer la respuesta celular inducida a través de esta vía de inoculación.

No se observaron niveles detectables de IFN $\gamma$  en los bovinos vacunados por vía IV, durante el período de estudio. Sistemáticamente en los diferentes tiempos analizados



se presentaron dificultades al momento de aislar los linfocitos, por lo que se sospecha que las muestras no fueron sembradas en las condiciones óptimas necesarias para el ensayo.

#### IV.8.c.ii. *Eficacia protectora de la vacuna atenuada*

Como manera de complementar lo observado para la respuesta celular, se estudió la respuesta de producción IFN $\gamma$  en linfocitos de bovinos vacunados con la vacuna atenuada HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal.

##### IV.8.c.ii.1. *Período post-vacunación*

A los 7 dpv, los bovinos vacunados por vía intranasal mostraron niveles promedio mayores de IFN $\gamma$  (304pg/ $\mu$ l), que los vacunados por vía intramuscular (155,4pg/ $\mu$ l) ( $p \leq 0,1$ ). No se registraron niveles detectables de IFN $\gamma$ , en el día del desafío (42dpv).

##### IV.8.c.ii.2. *Período post-desafío*

A los 49 dpv (7dps), los niveles detectados para ambos grupos evaluados fueron significativamente menores a los del tiempo anterior, con valores de 51,3 pg/ $\mu$ l para el grupo Vac. viva gE- IN; y 68,77 pg/ $\mu$ l para el grupo Vac. viva gE- IM. Paralelamente, se detectó una baja respuesta de IFN $\gamma$  en el grupo de bovinos no vacunados el día 49 post-vacunación, mientras que no se registraron niveles detectables en el grupo de animales centinela, a largo del período de estudio (**Figura 18**).

Los resultados obtenidos complementan los detectados en los ensayos de linfoproliferación y demostraron que la cepa HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal resulta altamente inmunogénica como vacuna viva, induciendo una respuesta de IFN $\gamma$  secretado por los linfocitos, similar a la descrita para la vacuna inactivada formulada en base a la cepa HVB-1 salvaje.

#### IV.8.d. *Excreción viral en secreciones nasales*

##### IV.8.d.i. *Seguridad de la vacuna viva*

###### IV.8.d.i. 1. *Transmisión horizontal*

Con el objeto de analizar la capacidad de transmisión horizontal de la vacuna atenuada entre animales vacunados y no vacunados, se evaluó durante el período post-vacunal la presencia de virus infeccioso en secreciones correspondientes a bovinos

vacunados por diferentes vías, y en bovinos no vacunados (centinelas), que convivían en el mismo ambiente.

No se hallaron niveles detectables de HVB-1ΔgEβgal en las secreciones nasales de los bovinos vacunados a excepción de 2 bovinos pertenecientes al grupo **Vac.viva gE-IN** en los que se detectó un título viral de 1,5 DICT<sub>50</sub>/ml el día 3 post-vacunación, posiblemente debido a virus residual de la vacunación. Por su parte, no se observaron niveles detectables de HVB-1ΔgEβgal en secreciones nasales correspondientes a bovinos del grupo centinela.

Estos resultados reflejan la baja capacidad infectiva de la cepa HVB-1ΔgEβgal en el hospedador natural y la inexistencia de dispersión viral entre animales de la misma especie.

#### IV.8.d.i. *2.Transmisión vertical*

Con el objeto de analizar la capacidad de transmisión vertical de la cepa viral HVB-1ΔgEβgal, administrada como vacuna atenuada, de la madre al feto, se evaluó durante el período post-vacunal la presencia de virus infeccioso en secreciones correspondientes a vacas vacunadas por vía intravenosa, y la presencia de virus en secreciones correspondientes a los terneros nacidos de dichas madres.

No se detectó virus de la vacuna en secreciones correspondientes a bovinos vacunados por la vía IV durante el período post-vacunal, ni se detectaron títulos virales en secreciones correspondientes a los terneros nacidos de madres vacunadas con la vacuna viva HVB-1ΔgEβgal.

Estos datos reflejan la baja eficiencia de la cepa recombinante HVB-1ΔgEβgal administrada por vía intravenosa para ser excretado a través de la mucosa nasal, o bien la baja eficiencia en multiplicar en mucosa nasal de bovinos en los que fue inoculada por vía intravenosa.

#### IV.8.d.ii. *Eficacia protectora de la vacuna atenuada*

##### *Período post-desafío*

Durante todo el período post-desafío, los valores de excreción viral de los grupos de bovinos vacunados fueron significativamente menores que los detectados en el grupo

de bovinos no vacunados. En el día 3 post-desafío, se registraron títulos promedio de 1,72 DICT<sub>50</sub>/ml para el grupo Vac.viva gE- IN, y de 0,52 DICT<sub>50</sub>/ml para el grupo Vac.viva gE- IM; mientras que para los bovinos no vacunados el valor promedio fue de 3,22 DICT<sub>50</sub>/ml. Estas diferencias se sostuvieron hasta el día 8 post-desafío, momento a partir del cual ambos grupos vacunados dejaron de excretar virus. En el grupo de bovinos no vacunados, el día 8 pd se observó el pico de excreción viral con un título de 5 DICT<sub>50</sub>/ml y esta tendencia se mantuvo hasta el día 14 post-desafío momento en el que el título registrado descendió a 0,7 DICT<sub>50</sub>/ml (**Figura 19**).

Los niveles de excreción viral obtenidos para los diferentes grupos reflejaron la eficacia de la vacuna viva en cuanto a la protección y la disminución de la excreción viral en los bovinos vacunados.

#### IV.8. e. *Sintomatología clínica*

##### IV.8.e.i. *Seguridad de la vacuna viva*

Con el objeto de analizar la capacidad de transmisión vertical de la vacuna viva entre la madre y su correspondiente ternero, se evaluó durante el período post-vacunal la sintomatología en vacas vacunadas.

A pesar de que las madres (Vac. viva gE IV-) cursaron una sintomatología leve luego de la inoculación con la vacuna HVB-IgE-βgal, con rinitis serosa y conjuntivitis leve (**Tabla 7**), no se detectó pérdida de apetito, ni depresión, ni se registró temperatura corporal aumentada. No se observaron abortos en ninguna de las 4 hembras preñadas vacunadas con la vacuna viva. Todas las preñeces llegaron a término. Los terneros nacidos de estas madres fueron saludables y no evidenciaron sintomatología típica de infección por HVB-1.

Estos resultados revelaron la baja virulencia de la cepa HVB-1ΔgEβgal utilizada como vacuna atenuada y la seguridad de la misma tanto en lo relativo a su riesgo abortigénico, como de generación de malformaciones e infección de la cría.

#### IV.8.e.ii. *Eficacia protectora de la vacuna atenuada*

##### IV.8.e.ii.1. *Período post-vacunación*

Con el objeto de evaluar la eficacia protectora de la vacuna viva, se estudiaron los parámetros de rinitis, temperatura corporal, anorexia, depresión, y formación de nódulos en el sitio de inoculación en los bovinos vacunados con la cepa HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal.

Todos los bovinos vacunados con la vacuna viva manifestaron síntomas clínicos leves que consistieron en rinitis serosa y conjuntivitis. Sin embargo, no se registraron en ningún momento del período post-vacunal cambios en las manifestaciones clínicas, independientemente de la vía de inoculación utilizada.

##### IV.8.e.ii.2 *Período post-desafío*

En el período post-desafío, todos los animales vacunados presentaron síntomas de rinitis y conjuntivitis significativamente menores que los observados en los animales no vacunados ( $p < 0,06$ ). En cuanto a los cuadros de rinitis observados en esta experiencia, en el día 10 pd las diferencias entre los bovinos vacunados por vía IN o por vía IM resultaron significativas ( $p=0,37$ ) (**Tabla 7**). Sin embargo, en ningún animal se registraron otros síntomas comunes al cuadro generalmente descrito para IBR, como aumento de la temperatura corporal, anorexia, o depresión.

Estos datos revelaron una fuerte capacidad protectora frente a la infección viral con virus HVB-1 cepa salvaje, inducida en bovinos con la vacuna viva HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal inoculada por las vías de inmunización IN o IM.

#### IV.9. *Respuesta diferencial contra gE inducida por la cepa marcadora HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal*

Con el propósito de verificar el carácter marcador de la vacuna inactivada y viva basadas en la cepa HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal, se analizó la presencia de anticuerpos específicos contra gE inducida tanto por la vacunación como por la infección viral, mediante un ELISA comercial detector de anticuerpos específicos para gE.

En el período post-vacunal no se registraron anticuerpos contra gE, sin embargo fueron claramente detectados luego de la infección con el virus salvaje. Esto se observó tanto para la vacuna inactivada HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal, como para la vacuna viva inoculada

por las diferentes vías y en distintos tiempos de las correspondientes experiencias (**Tablas 8 y 9**).

Estos resultados confirmaron el carácter marcador de la cepa, su eficacia al momento de diferenciar animales vacunados de infectados, y la compatibilidad de la respuesta inmune inducida por las vacunas desarrolladas en el presente trabajo, con el ensayo comercial de diagnóstico diferencial actualmente disponible en el mercado.

#### IV.10. *Inmunogenicidad a largo plazo inducida por la vacuna viva*

Se analizó la respuesta humoral específica contra HVB-1 a lo largo de 330 días posteriores a la vacunación con la cepa viva HVB-1ΔgEβgal, administrada por vía intravenosa, con el objeto de conocer la duración de la respuesta inmune inducida en bovinos adultos por la vacuna viva, y al mismo tiempo caracterizarla a nivel de la respuesta inmune diferencial mencionada.

Se registraron títulos de anticuerpos totales y neutralizantes contra HVB-1 a partir del día 14 y hasta el día 330 post-vacunación, con valores de entre 1,6 y 2,8 por ELISA, y de entre 1,1 y 1,8 en el ensayo de neutralización. A través del ensayo de ELISA específico para gE se confirmó que los bovinos no tuvieron contacto con el virus salvaje durante el período analizado (**Tabla 10**).

Los datos obtenidos reflejaron la capacidad de la vacuna viva de inducir anticuerpos de manera sostenida en el tiempo, y a partir de una única inmunización por vía intravenosa y que dicha respuesta continúa siendo marcadora.

#### IV.11. *Interferencia de anticuerpos maternos*

A fines de conocer el efecto de interferencia de los anticuerpos maternos en el desarrollo de la respuesta inmune contra vacunas marcadoras inactivadas o vivas, se estudió la respuesta inmune frente a la vacunación en animales jóvenes de 3 meses y posteriormente revacunados a los 5 u 8 meses de edad.

##### IV.11. a. *Respuesta inmune específica en bovinos mayores a 3 meses de edad.*

Con el fin de conocer la evolución natural o vida media de los anticuerpos pasivos circulantes de terneros nacidos de madres vacunadas contra HVB-1, se estudió la cinética de los anticuerpos maternos adquiridos vía calostro en un grupo de terneros

no vacunados. Se observó que la caída de los títulos a lo largo del tiempo responde a la ecuación lineal teórica  $Y = - 0,0107 x + 2,3796$  ( $R^2 = 0.7028$ ) con una vida media de 111 días (**Figuras 20 y 21.d**).

Por otro lado, con el propósito de conocer el efecto de interferencia de los anticuerpos maternos frente al desarrollo de una respuesta inmune inducida por la vacuna marcadora en su forma inactivada o en su forma viva, se analizó la respuesta inmune inducida por la vacunación en bovinos jóvenes seropositivos (anticuerpos pasivos circulantes adquiridos a través del calostro). Para ello se definieron 4 grupos con diferentes tratamientos, el **Grupo I** vacunado con la vacuna gE- viva, sin revacunación; el **Grupo II** vacunado con la vacuna gE- viva, con revacunación a los 60dpv; y el **Grupo III** vacunado con la vacuna gE- inactivada con revacunación a los 60dpv. A su vez, los bovinos correspondientes a cada grupo fueron subagrupados según el rango de título de anticuerpos maternos iniciales, aquellos bovinos que inicialmente tenían bajos niveles anticuerpos por  $ELISA \leq 1,6$  y aquellos cuyo nivel de anticuerpos superó un título de 1,6.

Entre los bovinos que poseían bajos niveles de anticuerpos maternos ( $ELISA \leq 1,6$ ) al momento de la primovacunación se detectó un aumento significativo de anticuerpos totales contra HVB-1, a los 16 dpv tanto con la vacuna viva como con la vacuna inactivada (**Figuras 21.a, b, c**). En el día 60pv se detectó una diferencia significativa entre los grupos I y II con respecto al **Grupo III** ( $p < 0,024$ ).

En contraste, en los animales que inicialmente poseían títulos de anticuerpos pasivos circulantes contra HVB-1 ( $ELISA > 1,6$ ) se evidenció claramente la interferencia de los anticuerpos maternos dado que no se registraron aumentos detectables del título de anticuerpos totales séricos en respuesta a la vacunación, sino que se registró un descenso de los títulos de los anticuerpos iniciales ( $ELISA > 1,6$ ) a valores menores o iguales a 1,5 en el día 160 post-vacunación, de manera similar a la registrada dentro del grupo de bovinos no vacunados (**Figuras 21.a, b, c, y d**).

Cuando se analizaron los terneros revacunados en el día 60 post-vacunación, no se observaron diferencias significativas entre tipos de vacuna, inactivada o viva. Para los bovinos del **Grupo III**, en el día 81 pv se detectó un aumento del nivel de anticuerpos totales, tanto en los animales con anticuerpos pasivos iniciales altos como bajos con títulos que alcanzaron valores de 3,4 y 4, respectivamente. Por su parte, los bovinos del

**Grupo II** desarrollaron títulos menores de 2,5 y 2,7 (ELISA>1,6, y ELISA≤ 1,6, respectivamente) (**Figuras 21.b y c**).

En cuanto al **Grupo I**, se observó un comportamiento diferencial entre los dos subgrupos analizados, con títulos iniciales de anticuerpos pasivos bajos ( $\leq 1,6$ ), y los de niveles altos ( $> 1,6$ ). Dentro, del grupo de animales con niveles altos de anticuerpos se observó una disminución gradual de los títulos desde 2,2 a los 7 dpv, que llegaron a 1 el día 160pv. Opuestamente, dentro del grupo de bovinos con niveles de anticuerpos pasivos iniciales bajos se detectaron títulos crecientes de anticuerpos que el día 16pv llegaron a un valor promedio de 2,5, manteniéndose en ese perfil hasta el día 160pv (**Figura 21.a**).

Resumiendo, de manera independiente de que hubieran sido vacunados o no, se observó una tendencia similar en los niveles de anticuerpos específicos contra HVB-1 entre los bovinos de los diferentes grupos que poseían altos niveles (ELISA  $> 1,6$ ) de anticuerpos calostrales circulantes en el momento de la vacunación. De este modo, aún después de la revacunación (**Grupos II y III**), si bien los niveles de anticuerpos mostraron un aumento en respuesta a la revacunación muestran un descenso pronunciado en los niveles luego de 90 días de la revacunación (150dpv). Contrariamente, se observó un aumento marcado en los niveles de anticuerpos en los bovinos que al inicio de la experiencia tenían títulos de anticuerpos  $\leq 1,6$  en respuesta a las vacunaciones de los diversos

De esta manera, se evidenció el efecto de interferencia de los anticuerpos maternos específicos en la inducción de una respuesta contra la vacuna administrada, en bovinos jóvenes. Por otro lado, no fue posible detectar diferencias significativas entre las vacunas marcadoras inactivada y viva, ni tampoco fue posible registrar diferencias debidas a la revacunación aplicada en los grupos I y II, en cuanto a la interferencia observada. Asimismo, se identificó la vida media de los anticuerpos maternos en 111 días.

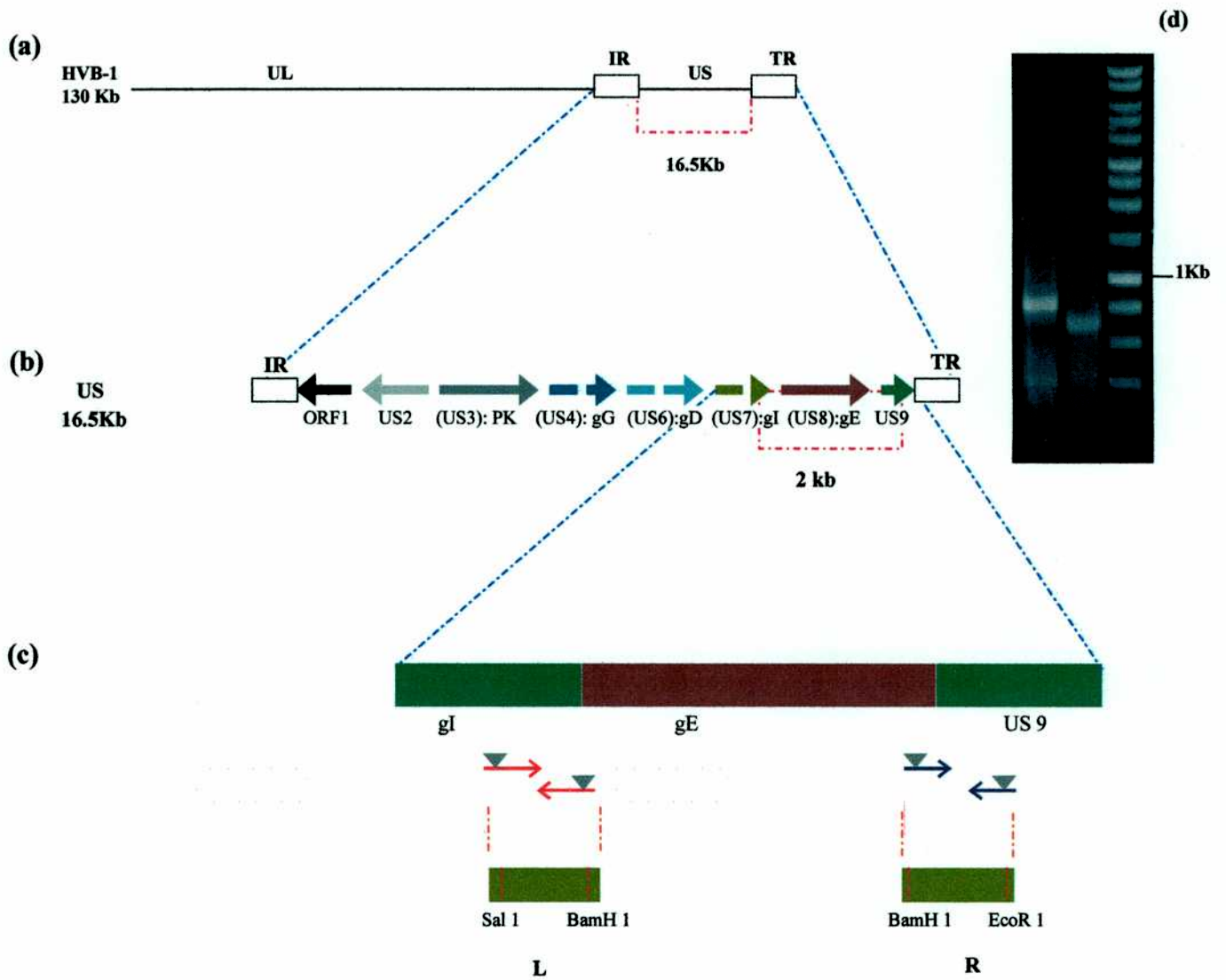
IV.11.b. *Respuesta inmune específica contra HVB-1 en animales mayores a 8 meses de edad.*

Para conocer el comportamiento de la respuesta inmune específica contra HVB-1 en animales jóvenes una vez que han perdido los anticuerpos maternos, se estudió dicha respuesta inducida por la vacuna viva en bovinos mayores a 8 meses de edad.

Cuando se analizó la respuesta inmune inducida por la vacuna HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal viva en el grupo de animales vacunados a los 8 meses de edad (en el tiempo 160 de la experiencia) los animales de los grupos Vac 3m, y Vac 3m y 8m, poseían niveles promedio de anticuerpos cercanos a 1, y se detectó un rápido aumento a un título de 1,98 en el grupo Vac. 8m, mientras que los grupos Vac 3m, y Vac 3m y 8m mostraron niveles de 1,2 y 2 respectivamente, a los 22 dpv. En segundo lugar, en los animales del grupo Vac 3m y 8m se observó un aumento del título de anticuerpos a un valor promedio de 3 en el día 39 pv y con niveles que oscilaron entre 3 y 2,5 hasta el final de la experiencia. Finalmente, en grupo Vac. 8m se observó un ascenso de los niveles de anticuerpos totales detectables en el día 7pv y que alcanzaron un pico de 2,5 en el día 70pv momento en el cual la diferencia comenzó a resultar significativa entre los grupos Vac 3m y 8m por un lado, y Vac 3m y Vac. 8m por el otro, y se sostuvo esta diferencia hasta los 100dpv( $p < 0,1$ ) (Figura 22.a).



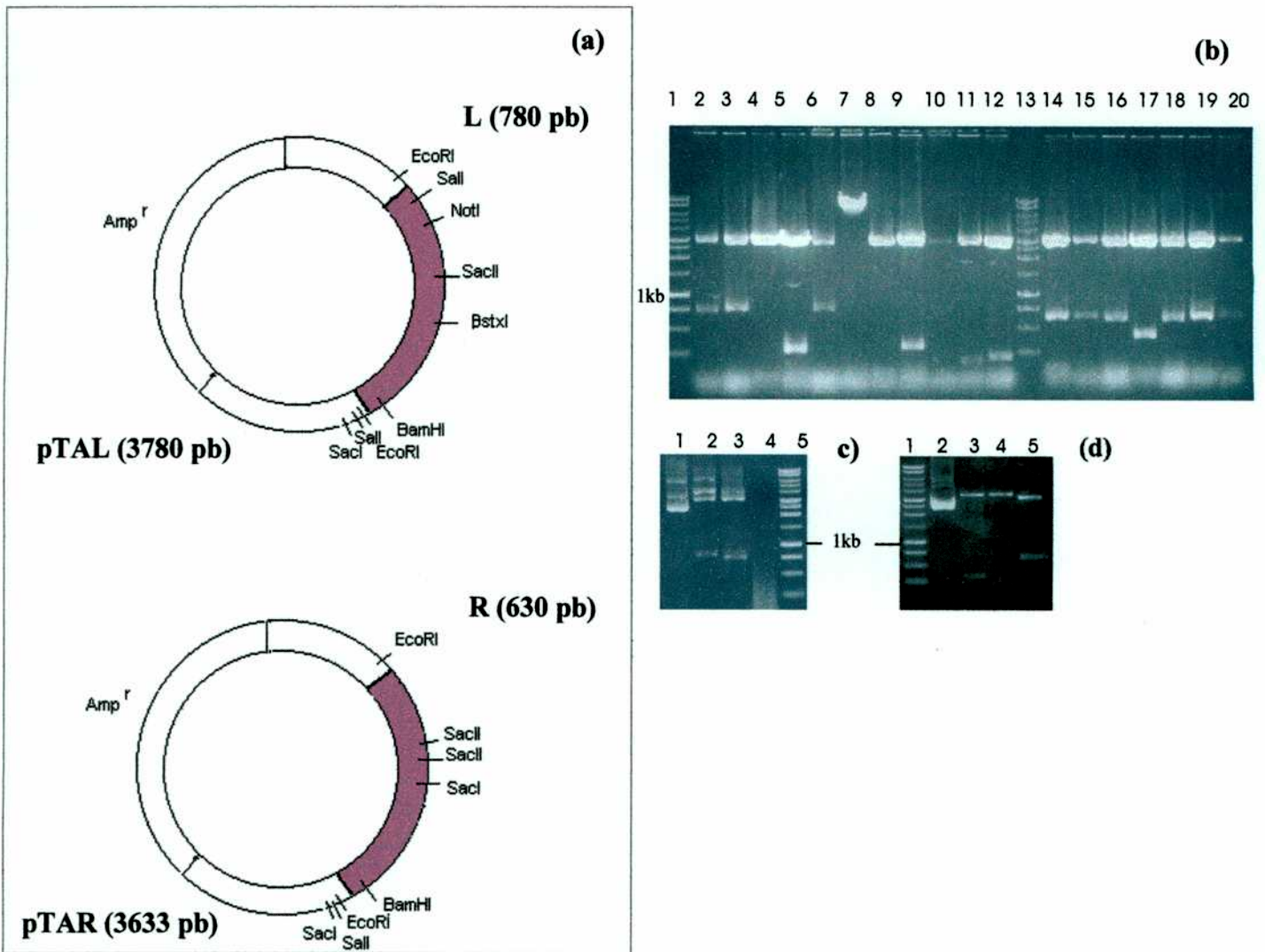
## **V. FIGURAS Y TABLAS**



**Figura 1. Amplificación por PCR de las regiones flanqueantes al gen gE de HVB-1 utilizada para el diseño del vector de recombinación -a) Genoma completo de HVB-1. -b) Genes contenidos en la región US del HVB-1 (según Leung-Tack, 1994). -c) Regiones flanqueantes al gen de la glicoproteína E (gE), localización aproximada de las regiones blanco para los cebadores utilizados en la estrategia de clonado, y sitios de restricción de principal interés. -d) Productos L (780 pb) y R (630 pb) de amplificación por PCR de las regiones flanqueantes al gen gE.**

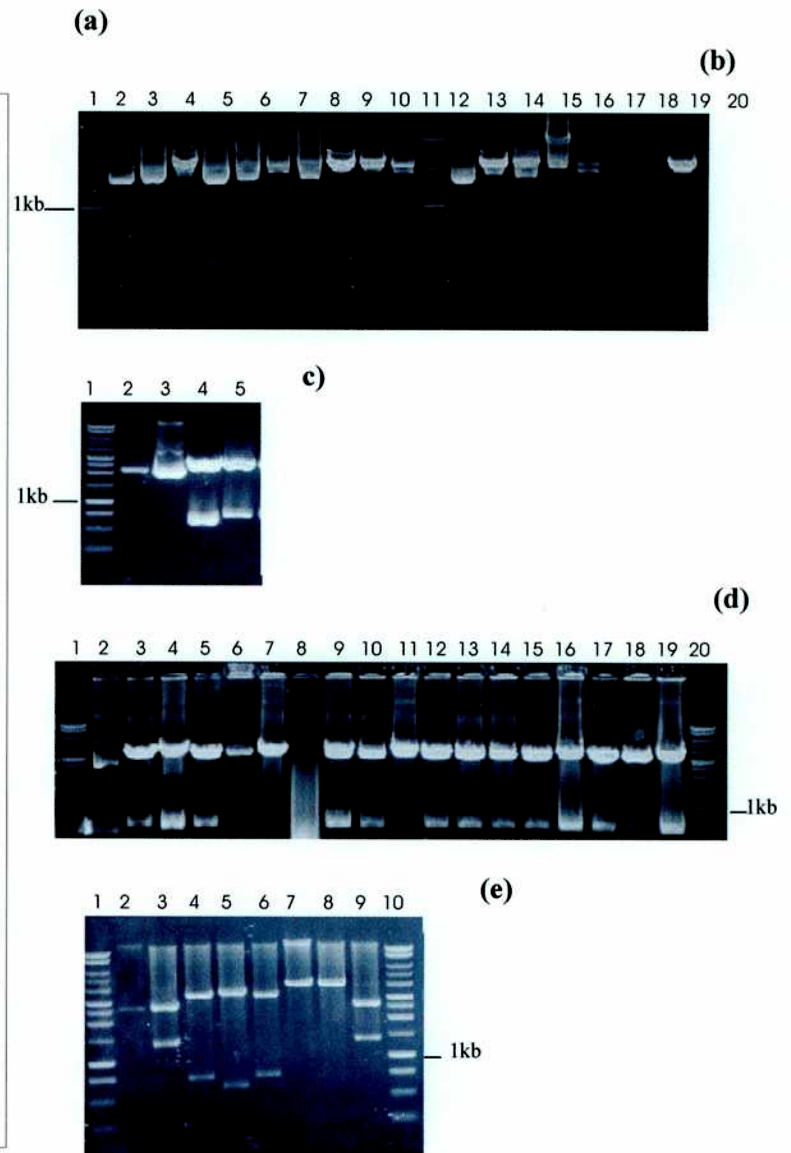
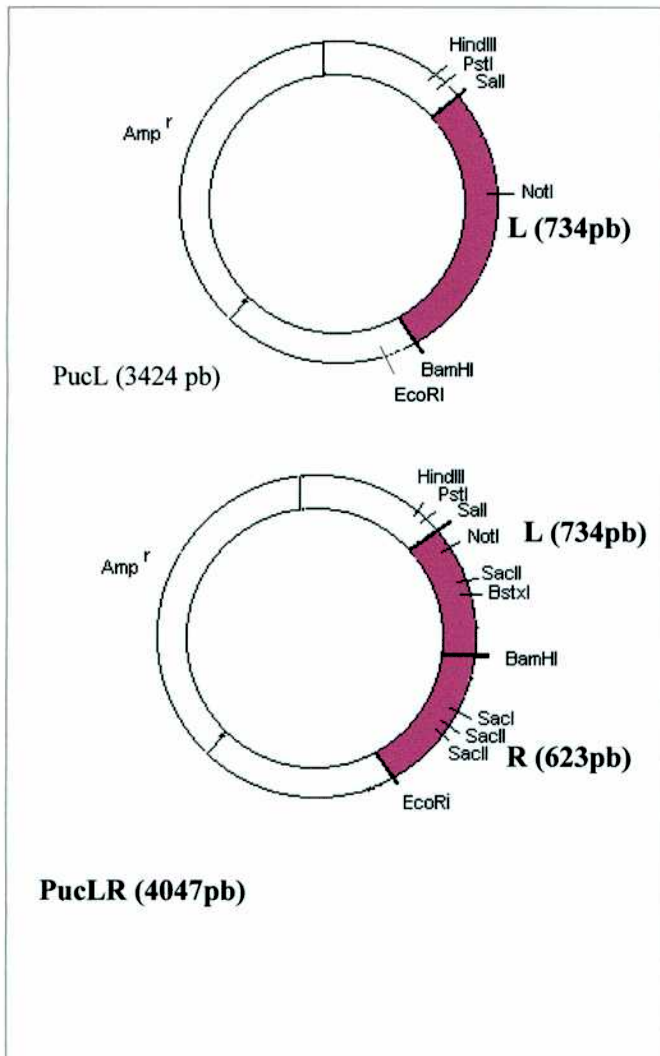
120901	cgaccgcgcg	ctggcggcgt	tccccgcagg	cgccgccacc	acgcccggcc	ccaccgogag
120961	<b>cagcgggagc</b>	<b>ggggccgcga</b>	cgccggagag	ggtcgacgag	acgacggaag	tcaaggccgc
121021	gacgagagcg	ggctcggcgt	ttgccctcac	cagcccccg	gccggcctga	ccgccagccc
121081	cgccgccagc	ccctcccgtg	cctttagcgc	ggccgccccg	gccgcccgtg	cgcagccggc
121141	cgagacacg	cccgtcgtct	tccggcgcca	actggcgtcg	atcctagtgc	ctctgtgcgt
121201	gctggtgctg	ctgctgcttg	cgctctgcmc	cgcgacggta	aactgcgcgc	tgcgccgccc
121261	cctgctgccg	tgctctcggc	gcgtttacia	gcccgggacg	tgcgcgacat	gcccggagcgg
121321	cacttgccgc	gggcggcccc	cctgcccggg	cgcgccaccg	agcgcgccag	ccaccgtcgt
121381	ggcactgggc	tcccggccaa	aggcgccccc	cctcgccacc	atcagcgaag	aataaacgcc
121441	gcgcgcggca	aacgatctcg	ctcgcgtgtg	tcttggtttc	tgcgccggcg	gcccgggtggg
121501	gagcgggcaa	ggcggaggaa	gaccgggggc	aggagctgcg	tggaggggcg	agccgttgag
121561	cgccccgacc	gccgcggggt	tgtaaatgg	gtctcgcgcg	gctcgtgggt	ccacaccgcg
121621	ccggagaacc	agcgcgagct	tcgctgcgtg	tgccccgca	gctgcgttcc	ggggaacggc
121681	gcacgcgaga	gggttcgaaa	aggcatttg	gcaa <b>tgcaac</b>	<b>ccaccggccc</b>	<b>gccccggcgg</b>
121741	cggttgctgc	cgctgctgct	gccgcagtta	ttgcttttcg	ggctgatggc	cgaggccaag
121801	cccgcgaccg	aaaccccggg	ctcggcttcg	gtcgacacgg	tcttcacggc	gcgcgctggc
121861	<b>gcccgcgtct</b>	<b>ttctcccag</b>	gcccgcggcg	cgcccggacg	tgcgcccgct	tcgcccgtgg
121921	agcgtcctcg	cgggcgccctg	ctcgcgcgcc	gtgcccggagc	ccgtctgctc	cgacgacccc
121981	gagtgttca	ccgacgtggc	cctggacgcg	gctgcctgc	gaaccgcccg	cgtggccccg
122041	ctggccatcg	cggagctcgc	cgagcggccc	gactcaacgg	gcgacaaaga	gattgttctc
122101	gcccgaaccg	acgtctcggc	gcagctgggt	cgcaacgcga	ccggggtgct	gctcgcggcc
122161	gcagccgag	aggacggcgg	cgtgtacttc	ctgtacgacc	ggctcatcgg	cgacgcgggc
122221	gacgaggaga	cgcagttggc	gctgacgctg	caggtcgcga	cggccggcgc	gcagggcgcc
122281	<b>gcgcgggacg</b>	<b>aggagagggg</b>	accagcgacc	gggcccacc	ccggcccgc	gccccaccgc
122341	acgacgacac	gcgcgcccc	gcggcggcac	ggcgcgcgct	tccgcgtgct	gccgtaccac
122401	tcccacgtat	acaccccggg	cgattccttt	ctgctatcgg	tgctgtgca	gtctgagttt
122461	ttcgacgagg	ctcccttctc	ggccagcatc	gactggtaact	tcctgcccag	ggcccggcag
122521	tgccgcgtca	tccgcatata	cgagacgtgc	atcttcacc	ccgaggcacc	ggcctgcctg
122581	caccccggcg	acgcgcagtg	cagcttcgcg	tcgccgtacc	gctccgagac	cgtgtacagc
122641	cggtgtacg	agcagtgccg	cccggaccct	gccggtcgtc	ggccgcacga	gtgcgagggc
122701	gcccgcgtacg	cgccgcccgt	tgccacactg	cgtcccgcga	ataacagcgt	agacctggtc
122761	tttgacgacg	cgccggctgc	ggcctccggg	ctttacgtct	ttgtgctgca	gtacaacggc
122821	cacgtggaag	cttgggacta	cagcctagtc	gttacttcgg	accgtttggg	gcgcgcggtc
122881	accgaccaca	cgcgccccga	ggccgcagcc	gccgacgctc	ccgagccagg	cccaccgctc
122941	accagcgagc	cggcggggcgc	gcccaccggg	cccgcgccct	ggcttgggtg	gctggtgggc
123001	gcgcttgagc	tcgcgggact	ggtgggcatc	gcagccctcg	ccgttcgggt	gtgcgcgcgc
123061	cgcgcaagcc	agaagcgcac	ctacgacatc	ctcaaccctc	tcgggcccgt	atacaccagc
123121	ttgccgacca	acgagccgct	cgacgtgggtg	gtgccagtta	gcgacgacga	atthtccctc
123181	gacgaagact	cttttgcgga	tgacgacagc	gacgatgacg	ggcccgctag	caacccccct
123241	gcggatgcct	acgacctcgc	cggcgccccca	gagccaacta	gcgggtttgc	gcgagcccc
123301	gccaacggca	cgcgctcag	tcgctctggg	ttcaaagttt	ggtttagggg	cccgttgaa
123361	gacgatgccg	cgcc <b>agcgcg</b>	<b>gacccccggc</b>	<b>gcaccagatt</b>	acaccgtggt	agcagcgcga
123421	ctcaagtcca	tctcgcgta	ggcgccccc	ccccgcgcg	ctgtgcctgc	tgacggaag
123481	cacccgcgtg	tagggctgca	tataaatgga	gcgctcacac	aaagcctcgt	gcggctgctt
123541	cgaagccatg	gagagtccac	gcagcgtcgt	caacgaaaac	tatcgaggcg	ctgatgaggc
123601	cgatgcagcg	cccccttcac	cgccgcccga	aggctccatc	gtgtccatcc	ccatcctcga
123661	gctcaccatc	gaggacgcgc	cggccagcgc	agaagcaacc	ggcaccgcg	cagccgcacc
123721	cgctgggcmc	actccagacg	cgaacgcagc	accggcggc	tacgtgccag	ttcccggcgc
123781	ggatgtggac	tgctattata	gcgaaagcga	cagcgagacg	gcagggcag	ttttgatagc
123841	catggggcgg	cagcagcggc	ggcggcatcg	gcggcggcgc	tgcatgatag	cagccggcct
123901	gacttgcat	ggcctcgggg	cctgcgcggc	ggcggcagcg	gcagggcgcg	tcttggcgtt
123961	ggaggtagtg	ccccggccct	gaggcc <b>ccga</b>	<b>gacccccggc</b>	<b>cctgaggccc</b>	tggggcgggg

**Figura 2. Ubicación relativa de los cebadores utilizados para la estrategia de clonaje y selección de clones virales recombinantes, en el genoma de HVB-1. Se indican las ubicaciones respectivas de los cebadores gE<sub>1</sub> y gE<sub>2</sub>, para el fragmento L, en rojo; los cebadores gE<sub>3</sub> y gE<sub>4</sub>, para el fragmento R, en verde; y los cebadores gE<sub>7</sub> y gE<sub>8</sub> específicos para a la región codificante de gE, en azul.**



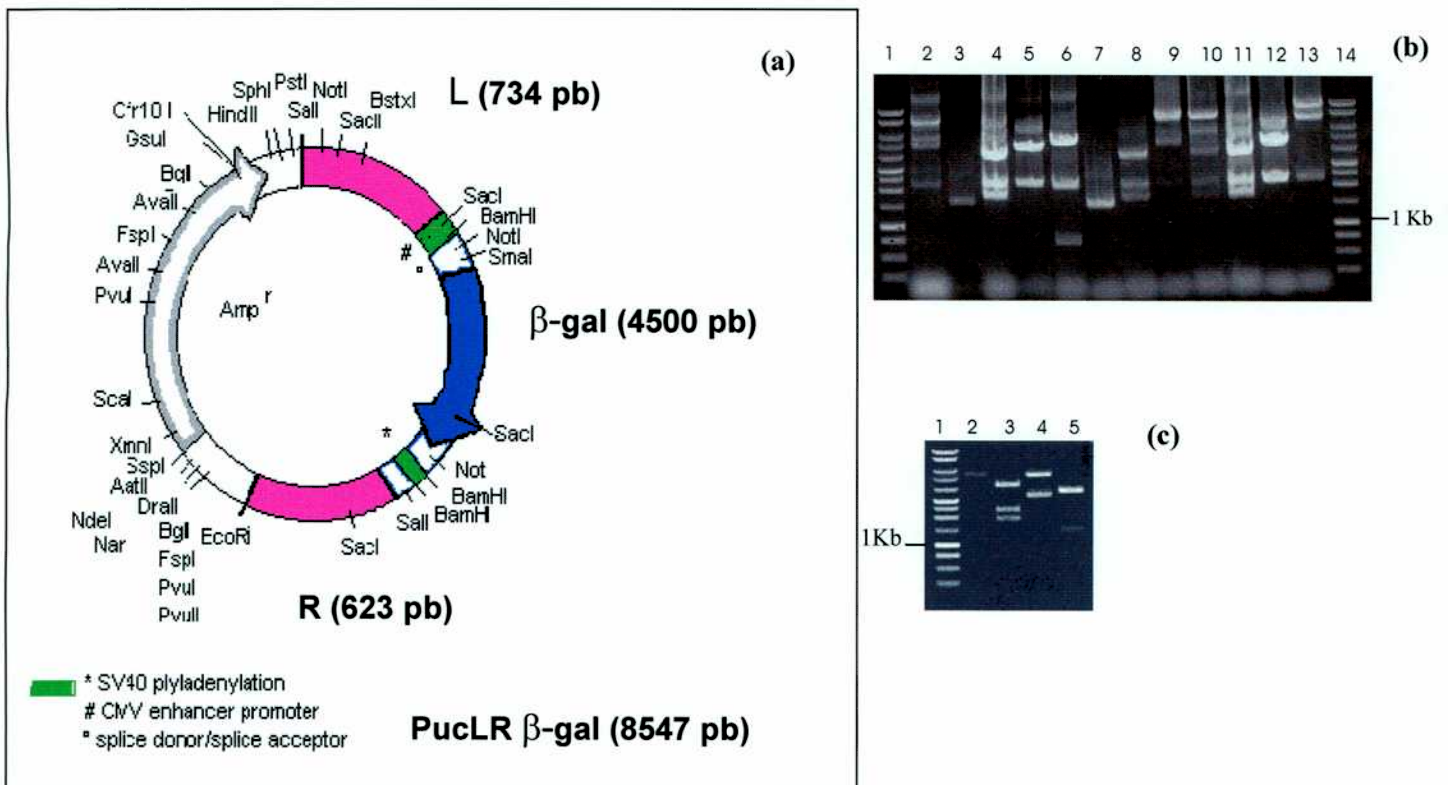
**Figura 3. Clonaje de los productos de PCR, L y R, en el plásmido PGemTEasy. a)** Esquema de clonaje; **b)** Selección de clones positivos por restricción con EcoRI, para el clonaje de: L (calles 2 -12); y del fragmento R (calles 14 -20); **c)** mapeo de restricción sobre ADN del plásmido pTAL: calle 1, pTAL sin digerir, calle 2 pTAL digerido con Sall, calle 3 pTAL digerido con SacII; **d)** mapeo de restricción sobre ADN del plásmido pTAR: calle 2, pTAR sin digerir, calle 3 pTAR digerido con SacI, calle 4 pTAR digerido con SacII, calle 5 pTAR digerido con SacII+ EcoRI

\* Los productos fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa 1%, buffer Tris Acético, EDTA (TAE) 1X. Condiciones de corrida 60Voltios, durante 1hora. MWM: marcador de peso molecular 1kb (Promega).



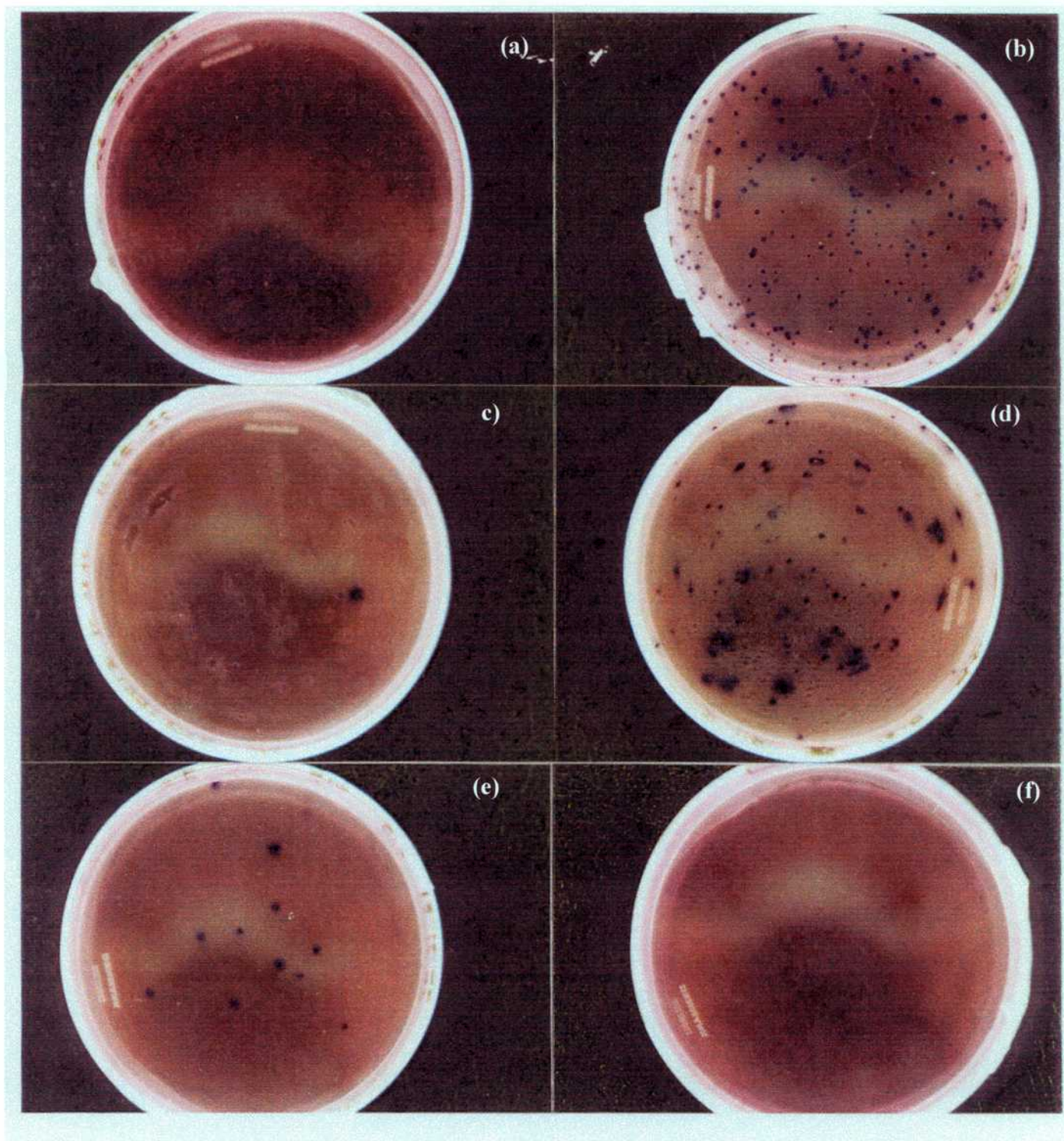
**Figura 4. Clonaje secuencial de los fragmentos L y R, provenientes de pTAL y pTAR, en el plásmido Puc<sub>195</sub>**  
**a)** Esquema de clonaje; **b)** Selección de clones positivos por restricción con BamHI+ Sall, para el clonaje de L en el plásmido Puc (carriles 2 -9 y 13 -19); **c)** mapeo de restricción sobre ADN del plásmido PucL: carril 2, PucL sin digerir, carril 3 PucL digerido con AluI, carril 4 PucL digerido con NotI+ EcoRI, carril 5 PucL digerido con BamHI+ PstI ; **d)** Selección de clones positivos por restricción con BamHI+ EcoRI, para el clonaje de R en el plásmido PucL (carriles 3 - 19); **e)** mapeo de restricción sobre ADN del plásmido PucLR: carril 2, PucLR sin digerir, carril 3 PucLR digerido con Sall+ EcoRI, carril 4 PucLR digerido con Sall+ BamHI, carril 5 PucLR digerido con BamHI+ EcoRI, carril 6 PucLR digerido con Hind III+ BamHI, carril 7 PucLR digerido con BamHI, carril 8 PucLR digerido con HindIII+ Sall, carril 9 PucLR digerido con HindIII+ EcoRI.

\* Los productos fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa 1%, buffer Tris Acético, EDTA (TAE) 1X. Condiciones de corrida 60Voltios, durante 1hora. MWM: marcador de peso molecular 1kb (Promega).



**Figura 5. Clonaje de la construcción del gen de la  $\beta$ -galactosidasa proveniente del plásmido pCMV en el plásmido PucLR .a)** Esquema de clonaje; **b)** Selección de clones positivos por restricción con SacI; **c)** Mapeo de restricción sobre ADN del plásmido PucLR $\beta$ -gal: calle 2, sin digerir, calle 3 digerido con SacI, calle 4 PucLR $\beta$ -gal digerido con Sall, calle 5 PucLR $\beta$ -gal digerido con NotI. **d)** Esquema teórico de recombinación esperada para la producción de clones recombinantes HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ -gal a durante los ensayos de cotransfección

\* Los productos fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa 1%, buffer Tris Acético, EDTA (TAE) 1X. Condiciones de corrida 60Voltios, durante 1hora  
MWM: marcador de peso molecular 1kb (Promega).



**Figura 6. Aspecto macroscópico de las monocapas de células MDBK:** **a)** infectadas con virus HVB-1 de fenotipo salvaje; **b)** infectadas con un herpesvirus de fenotipo recombinante control<sup>(a)</sup>; **c)** infectadas con el producto de transfección , primer pasaje en medio semisólido; **d)** infectadas con el producto de transfección , segundo pasaje en medio semisólido; **e)** infectadas con el producto de transfección , tercer pasaje en medio semisólido; **f)** control de células no infectadas.

<sup>(a)</sup> gentilmente cedido por Dr. S.I.Chowdhury. Department of Diagnostic Medicine/Pathobiology, College of Veterinary Medicine, Kansas State University, Manhattan, USA.

### Fragmento L (734pb)

GCGAGCAGCGGG AGCGGGGCCG CGACGCCGGA GAGGGTCGAC GAGACGACGG  
121001 AAGTCAAGGC CGCGACGAGA GCGGGCTCGG CGTTTGCCCT CACCACGCC  
121051 CCGGCCGGCC TGACCGCCAG CCCCGCCGCC AGCCCCTCCC GTGCCTTTAG  
121101 CGCGGCCGCC CCGGCCGCCG CTGCGCAGCC GGCCGGAGAC ACGCCCGCTC  
121151 GCTTCCGGCG CCAACTGGCG TCGATCCTAG TGCCTCTGTG CGTGCTGGTG  
121201 CTGCTGCTGC TTGCGCTCTG CGCCGCGACG GTAAACTGCG CGCTGCGCCG  
121251 CCGCCTGCTG CCGTGCTCTC GGCGCGTTTA CAAGCCGCGG ACGTGCGCGA  
121301 CATGCGGGAG CGGCACTTGC GCGGGGCGGC CCCCTGCCG CGGCGCGGCA  
121351 CCGAGCGCCC CAGCCACCGT CGTGGCACTG GGCTCCCAGC CAAAGGCGCC  
121401 CCCCCTCGCC ACCATCAGCG AAGAATAAAC GCCGCGCGCG GCAAACGATC  
121451 TCGCTCGCGT GTGTCTTGGT TTCTGCGCGG CGGGCGGGGT GGGGAGCGGG  
121501 CAAGGCGGAG GAAGACCGGG GGCAGGAGCT GCGTGGAGGG CGGAGCCGTT  
121551 GAGCGGCCCG ACCGCCGCCG GGTGTGTTAAA TGGGTCTCGC GCGGCTCGTG  
121601 GTTCCACACC GCGCCGAGA ACCAGCGCGA GCTTCGCTGC GTGTGTCCCG  
121651 CGAGCTGCGT TCCGGGGAAC GGCGCACGCG AGAGGGTTCG AAAAGGGCAT  
121701 TTGGCAATGC AACCCACGGA TCCGCCCC

### Fragmento R (618pb)

AGC TTGGATCCCG GCCGCACCAG ATTACACCGT  
123401 GGTAGCAGCG CGACTCAAGT CCATCCTCCG CTAGGCGCCC CCCCCCCCG  
123451 GCGCTGTGCC GTCTGACGGA AAGCACCCGC GTGTAGGGCT GCATATAAAT  
123501 GGAGCGCTCA CACAAAGCCT CGTGCGGCTG CTTCGAAGGC ATGGAGAGTC  
123551 CACGCAGCGT CGTCAACGAA AACTATCGAG GCGCTGATGA GGCCGATGCA  
123601 GCGCCCCCTT CACCGCCGCC GGAAGGCTCC ATCGTGTCCA TCCCCATCCT  
123651 CGAGCTCACC ATCGAGGACG CGCCGGCCAG CGCAGAAGCA ACCGGCACCG  
123701 CGGCAGCCGC ACCCGCTGGG CGCACTCCAG ACGCGAACGC AGCACCCGGC  
123751 GGCTACGTGC CAGTTCCCGC GGCGGATGTG GACTGCTATT ATAGCGAAAG  
123801 CGACAGCGAG ACGGCAGGCG AGTTTTTGAT ACGCATGGGG CGGCAGCAGC  
123851 GGCGGCGGCA TCGGCGGCGG CGCTGCATGA TAGCAGCGGC CCTGACTTGC  
123901 ATTGGCCTCG GGGCCTGCGC GGCGGCGGCA GCGGCAGGCG CCGTCCTGGC  
123951 GTTGGAGGTA GTGCCCCGGC CCTGAGGCC CGAGACCCCG AATCTGAGG



**Fragmento PstI del pCMV $\beta$  conteniendo el gen de  $\beta$ -galactosidasa <sup>c</sup> (4500pb).**

```

GGTCGTT ACATAACTTA CGGTAAATGG CCCGCCTGGC
61 TGACCGCCCA ACGACCCCGG CCCATTGACG TCAATAATGA CGTATGTTCC CATAGTAACG
121 CCAATAGGGA CTTTCCATTG ACGTCAATGG GTGGAGTATT TACGGTAAAC TGCCCACTTG
181 GCAGTACATC AAGTGTATCA TATGCCAAGT ACGCCCCCTA TTGACGTCAA TGACGGTAAA
241 TGGCCCGCCT GGCATTATGC CCAGTACATG ACCTTATGGG ACTTTCCTAC TTGGCAGTAC
301 ATCTACGTAT TAGTCATCGC TATTACCATG GTGATGCGGT TTTGGCAGTA CATCAATGGG
361 CGTGGATAGC GGTTTGACTC ACGGGGATTT CCAAGTCTCC ACCCCATTGA CGTCAATGGG
421 AGTTTGT TTT GGCACCAAAA TCAACGGGAC TTTCCAAAAT GTCGTAACAA CTCCGCCCCA
481 TTGACGCAAA TGGGCGGTAG GCGTGTACGG TGGGAGGTCT ATATAAGCAG AGCTCGTTTA
541 GTGAACCGTC AGATCGCCTG GAGACGCCAT CCACGCTGTT TTGACCTCCA TAGAAGACAC
601 CGGGACCGAT CCAGCCTCCG GACTCTAGAG GATCCGGTAC TCGAGGAACT GAAAAACCG
661 AAAGTTAACT GGTAAAGTTTA GTCTTTTTGT CTTTTATTTC AGGTCCCGGA TCCGGTGGTG
721 GTGCAATCA AAGAACTGCT CCTCAGTGA TGTTGCCTTT ACTTCTAGGC CTGTACGGAA
841 GTGTTACTTC TGCTCTAAAA GCTGCGGAAT TGTACCCGCG GCCGCAATTC CCGGGGATCG
901 AAAGAGCCTG CTAAAGCAAA AAAGAAGTCA CCATGTCGTT TACTTTGACC AACAAGAACG
961 TGATTTTCGT TGCCGGTCTG GGAGGCATTG GTCTGGACAC CAGCAAGGAG CTGCTCAAGC
1021 GCGATCCCGT CGTTTTACAA CGTCGTGACT GGGAAAACCC TGGCGTTACC CAACTTAATC
1081 GCCTTGACAG ACATCCCCCT TTCGCCAGCT GCGTAATAG CGAAGAGGCC CGCACCAGTC
1141 GCCCTTCCCA ACAGTTGCGC AGCCTGAATG GCGAATGGCG CTTTGCCTGG TTTCCGGCAC
1201 CAGAAGCGGT GCCCGAAAAGC TGGCTGGAGT GCGATCTTCC TGAGGCCGAT ACTGTCGTCTG
1261 TCCCCTCAAA CTGGCAGATG CACGGTTACG ATGCGCCCAT CTACACCAAC GTAACCTATC
1321 CCATTACGGT CAATCCGCCG TTTGTTCCCA CGGAGAATCC GACGGGTGT TACTCGCTCA
1381 CATTAAATGT TGATGAAAGC TGGCTACAGG AAGGCCAGAC GCGAATTATT TTTGATGGCG
1441 TTAACCTCGG GTTTCATCTG TGGTGCAACG GCGCTGGGT CCGTTACGGC CAGGACAGTC
1501 GTTTGCCGTC TGAATTTGAC CTGAGCGCAT TTTTACGCGC CGGAGAAAAC CGCCTCGCGG
1561 TGATGGTGCT GCGTTGGAGT GACGGCAGTT ATCTGGAAGA TCAGGATATG TGGCGGATGA
1621 GCGGCATTTT CCGTGACGTC TCGTTGCTGC ATAAACCGAC TACACAAATC AGCGATTTCC
1681 ATGTTGCCAC TCGCTTTAAT GATGATTTCA GCCGCGCTGT ACTGGAGGCT GAAGTTCAGA
1741 TGTGCGGCGA GTTGCCTGAC TACCTACGGG TAACAGTTT TTTATGGCAG GGTGAAACGC
1801 AGGTGCGCAG GCGCACCGCG CCTTTCGGCG GTGAAATTAT CGATGAGCGT GGTGGTTATG
1861 CCGATCGCGT CACACTACGT CTGAACGTCG AAAACCCGAA ACTGTGGAGC GCCGAAATCC
1921 CGAATCTCTA TCGTGCGGTG GTTGAACGTC ACACCGCCGA CGGCACGCTG ATTGAAGCAG
1981 AAGCCTGCGA TGTCGGTTTC CGCGAGGTGC GGATTGAAAA TGGTCTGCTG CTGCTGAACG
2041 GCAAGCCGTT GCTGATTCGA GGCGTTAACC GTCACGAGCA TCATCCTCTG CATGGTCAGG
2101 TCATGGATGA GCAGACGATG GTGCAGGATA TCCTGCTGAT GAAGCAGAAC AACTTTAACG
2161 CCGTGCGCTG TTCGCATTAT CCGAACCATC CGCTGTGGTA CACGCTGTGC GACCGCTACG
2221 GCCTGTATGT GGTGGATGAA GCCAATATTG AAACCCACGG CATGGTGCCA ATGAATCGTC
2281 TGACCGATGA TCCGCGCTGG CTACCGGCGA TGAGCGAACG CGTAACGCGA ATGGTGCAGC
2341 GCGATCGTAA TCACCCGAGT GTGATCATCT GGTGCTGGG GAATGAATCA GGCCACGGCG
2401 CTAATCACGA CGCGCTGTAT CGCTGGATCA AATCTGTCGA TCCTTCCC GC CCGGTGCAGT
2461 ATGAAGCGG CGGAGCCGAC ACCACGGCCA CCGATATTAT TTGCCCGATG TACGCGCGCG
2521 TGGATGAAGA CCAGCCCTTC CCGGCTGTGC CGAAATGGTC CATCAAAAAA TGGCTTTCGC
2581 TACCTGGAGA GACGCGCCCG CTGATCCTTT GCGAATACGC CCACGCGATG GGTAACAGTC
2641 TTGGCGGTTT CGCTAAATAC TGGCAGGCGT TTCGTCAGTA TCCCCGTTTA CAGGGCGGCT
2701 TCGTCTGGGA CTGGGTGGAT CAGTCGCTGA TTAAATATGA TGAACCGGC AACCCTGGT
2761 CCGCTTACGG CCGTGATTTT GGCGATACGC CGAACGATCG CCAGTCTGT ATGAACGGTC
2821 TGGTCTTTGC CGACCGCACG CCGCATCCAG CGCTGACGGA AGCAAAACAC CAGCAGCAGT
2881 TTTTCCAGTT CCGTTTATCC GGGCAAACCA TCGAAGTGAC CAGCGAATAC CTGTTCCGTC
2941 ATAGCGATAA CGAGCTCCTG CACTGGATGG TGGCGCTGGA TGGTAAGCCG CTGGCAACCG
3001 GTGAAGTGCC TCTGGATGTC GCTCCACAAG GTAACAGTT GATTGAACCT CCTGAACCTAC
3061 CGCAGCCGGA GAGCGCCGGG CAACTCTGGC TCACAGTACG CGTAGTGCAA CCGAACGCGA

```

```

3121 CCGCATGGTC AGAAGCCGGG CACATCAGCG CCTGGCAGCA GTGGCGTCTG GCGGAAAACC
3181 TCAGTGTGAC GCTCCCCGCC GCGTCCCACG CCATCCCGCA TCTGACCACC AGCGAAATGG
3241 ATTTTTGCAT CGAGCTGGGT AATAAGCGTT GGCAATTTAA CCGCCAGTCA GGCTTTCTTT
3301 CACAGATGTG GATTGGCGAT AAAAAACAAC TGCTGACGCC GCTGCGCGAT CAGTTCACCC
3361 GTGCACCGCT GGATAACGAC ATTGGCGTAA GTGAAGCGAC CCGCATTGAC CCTAACGCCT
3421 GGGTCGAACG CTGGAAGGCG GCGGGCCATT ACCAGGCCGA AGCAGCGTTG TTGCAGTGCA
3481 CGGCAGATAC ACTTGCTGAT GCGGTGCTGA TTACGACCGC TCACGCGTGG CAGCATCAGG
3541 GGAAAACCTT ATTTATCAGC CGGAAAACCT ACCGGATTGA TGGTAGTGGT CAAATGGCGA
3601 TTACCGTTGA TGTTGAAGTG GCGAGCGATA CACCGCATCC GGC GCGGATT GGCCTGAACT
3661 GCCAGCTGGC GCAGGTAGCA GAGCGGGTAA ACTGGCTCGG ATTAGGGCCG CAAGAAAACCT
3721 ATCCCAGCCG CCTTACTGCC GCCTGTTTTG ACCGCTGGGA TCTGCCATTG TCAGACATGT
3781 ATACCCCGTA CGTCTTCCCG AGCGAAAACG GTCTGCGCTG CGGGACGCGC GAATTGAATT
3841 ATGGCCCACA CCAGTGGCGC GCGGACTTCC AGTTCAACAT CAGCCGTAC AGTCAACAGC
3901 AACTGATGGA AACCAGCCAT CGCCATCTGC TGCACGCGGA AGAAGGCACA TGGCTGAATA
3961 TCGACGGTTT CCATATGGGG ATTGGTGGCG ACGACTCCTG GAGCCCGTCA GTATCGGCGG
4021 AATTACAGCT GAGCGCCGGT CGCTACCATT ACCAGTTGGT CTGGTGTCAA AAATAATAAT
4081 AACCAGGCGC GCCATGTCTG CCCGTATTTT CCGTAAGGAA ATCCATTATG TACTATTTAA
4141 AAAACACAAA CTTTTGGATG TTCGGTTTAT TCTTTTTCTT TTACTTTTTT ATCATGGGAG
4201 CCTACTTCCC GTTTTTCCCG ATTTGGCTAC ATGACATCAA CCATATCAGC AAAAGTGATA
4261 CGGGTATTAT TTTTGCCGCT ATTTCTCTGT TCTCGCTATT ATTCCAACCG CTGTTTGGTC
4321 TGCTTTCTGA CAAACTCGGC CTCGACTCTA GGCGGCCGCG GGGATCCAGA CATGATAAGA
4381 TACATTGATG AGTTTGGACA AACCACAACCT AGAATGCAGT GAAAAAATG CTTTATTTGT
4441 GAAATTTGTG ATGCTATTGC TTTATTTGTA ACCATTATAA GCTGCAATAA ACAAGTTAAC
4501 AACAACAATT GCATTCATTT TATGTTTCAG GTTCAGGGGG AGGTGTGGGA GGTTTTTTTCG
4561 GATCCTCTAG AGTCGACCTG CAG

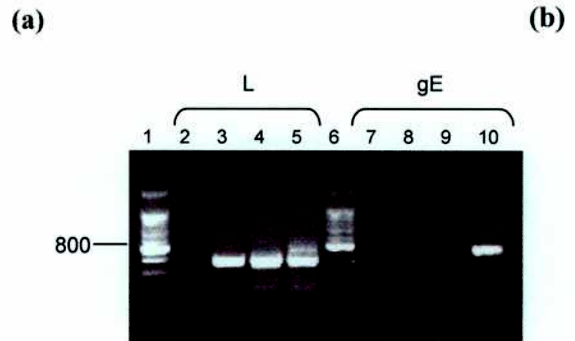
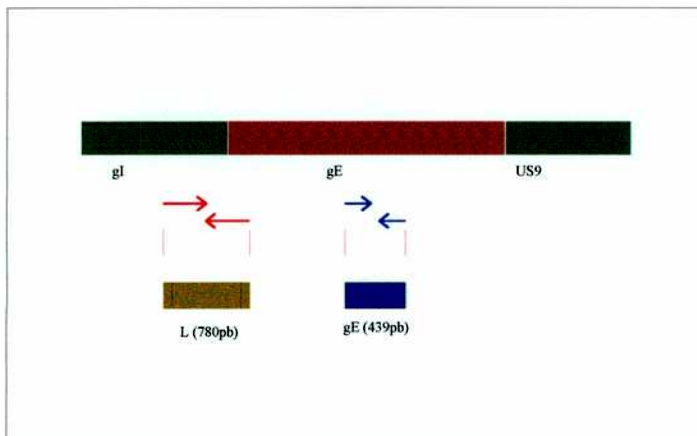
```

<sup>a</sup> Messing (1983) Norrander (1983)

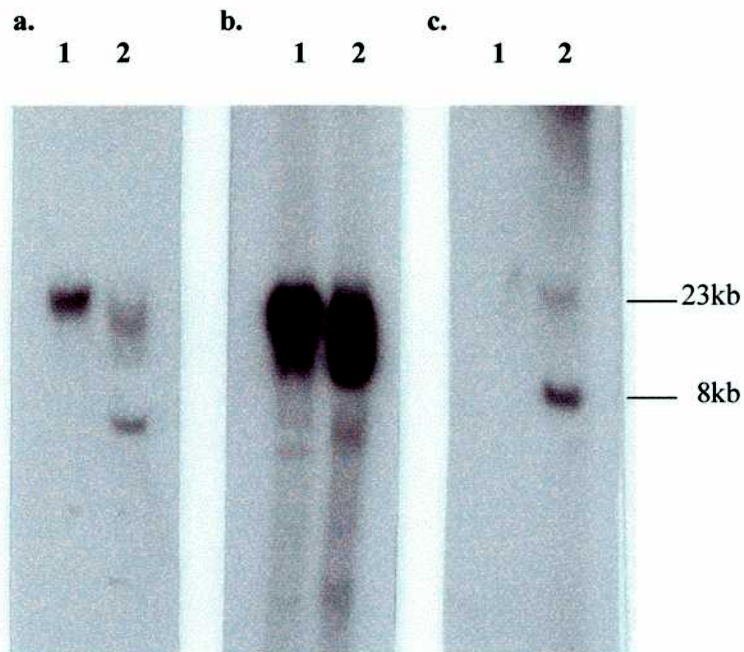
<sup>b</sup> de acuerdo a la secuencia publicada en GenBank, accession NC 001847

<sup>c</sup> de acuerdo a la secuencia publicada en GenBank, accession U13184

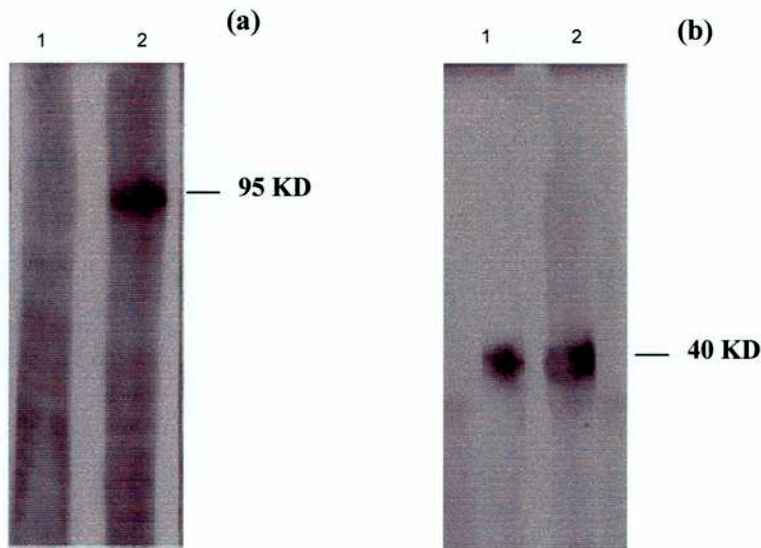
**Figura 7. Secuencias de ADN correspondientes los fragmento izquierdo (L, de 734pb), fragmento derecho (R, de 618pb), y el Fragmento PstI del pCMV $\beta$  (4500pb), conteniendo el gen de  $\beta$ -galactosidasa<sup>c</sup> resultantes en la construcción del vector de recombinación. Se señalan las secuencias finales con los cambios incorporados por el uso de cebadores degenerados (gE<sub>2</sub>, gE<sub>3</sub> gE<sub>4</sub>).**



**Figura 8. Verificación de pureza y estructura del clon HVB-1ΔgEβgal.** a) Ubicación aproximada de los cebadores utilizados y de los productos esperados; b) Productos de PCR obtenidos: con cebadores específicos para la región L (calles 2-5) y con cebadores específicos para la región del gen gE (calles 7-10). Se observa el producto amplificado a partir de una mezcla de reacción sin ADN, calles 2 y 7; de ADN de PucLRβ gal, calles 3 y 8; de ADN del clon HVB-1 ΔgEβgal , calles 4 y 9; de ADN del HVB-1 salvaje (calles 5 y 10).



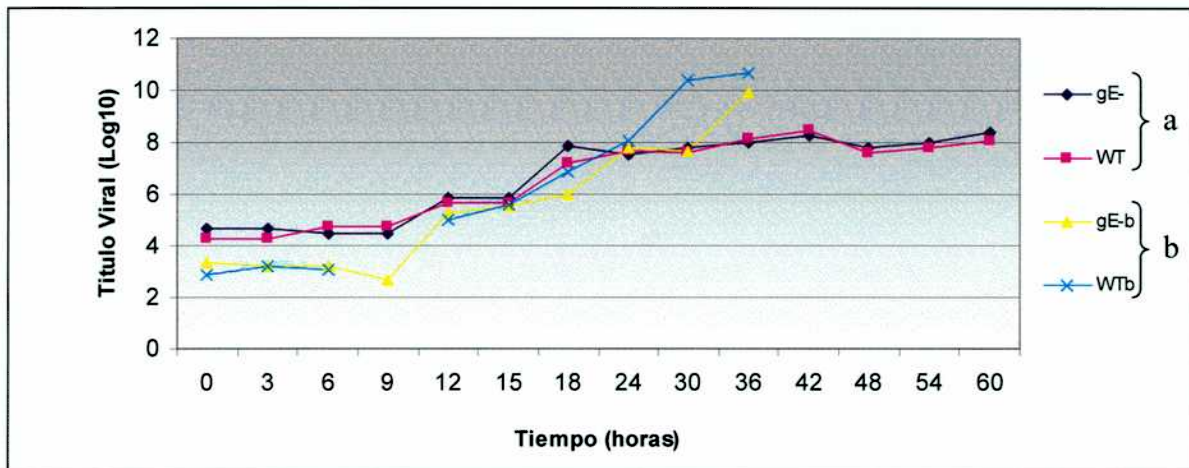
**Figura 9 . Análisis de la estructura del ADN genómico del virus HVB-1ΔgEβgal por Southern blot.** Hibridación específica de sondas dirigidas a las regiones: a) izquierda respecto del gen gE (L); b) derecha respecto del gen gE (R); c) respecto del gen de la glicoproteína E. Se observa en la calle 1: ADN de HVB-1ΔgEβgal digerido con la enzima HindIII; y en la calle 2, ADN de HVB-1 salvaje.



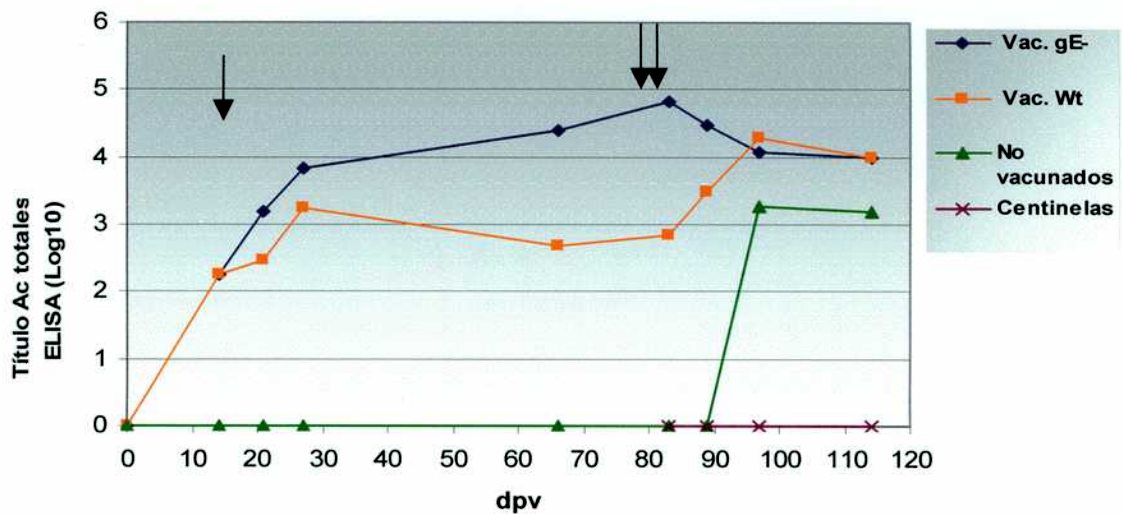
**Figura 10. Análisis fenotípico del clon HVB-1ΔgEβgal por Western blot.** Se detectaron gE y gD en extractos de virus purificado. Se observa: antígeno viral HVB-1ΔgEβgal, calle 1; antígeno HVB-1 salvaje, calle2; revelado con a) AcM anti-gE <sup>(a)</sup>, b) AcM anti-gD <sup>(b)</sup>.

<sup>(a)</sup> Gentilmente cedido por Dr. van Oirschot. Department of Virology. Central Veterinary Institute, Lelystad, Netherlands.

<sup>(b)</sup> Gentilmente cedido por Dr. S.L.A. Babiuk. Veterinary Infectious Disease Organization, University of Saskatchewan, Saskatoon Saskatchewan, Canada.

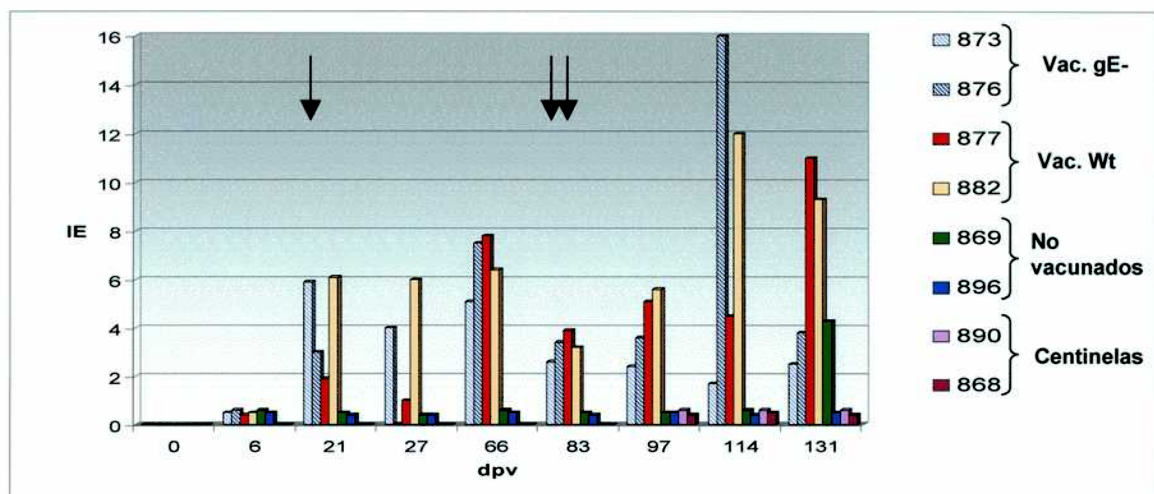


**Figura 11. Caracterización de la habilidad replicativa de la cepa HVB-1ΔgEβgal respecto de la cepa HVB-1LA parental, en cultivo celular.** Monocapas confluentes de MDBK fueron infectadas con una moi. de 0.01. a) La infección se realizó manteniendo el inóculo viral; b) Luego de un período de adsorción de 1h se retiró el inóculo viral, en ambos casos a los intervalos de tiempo indicados los cultivos fueron congelados a -70°C. Los títulos virales fueron determinados por titulación sobre células MDBK



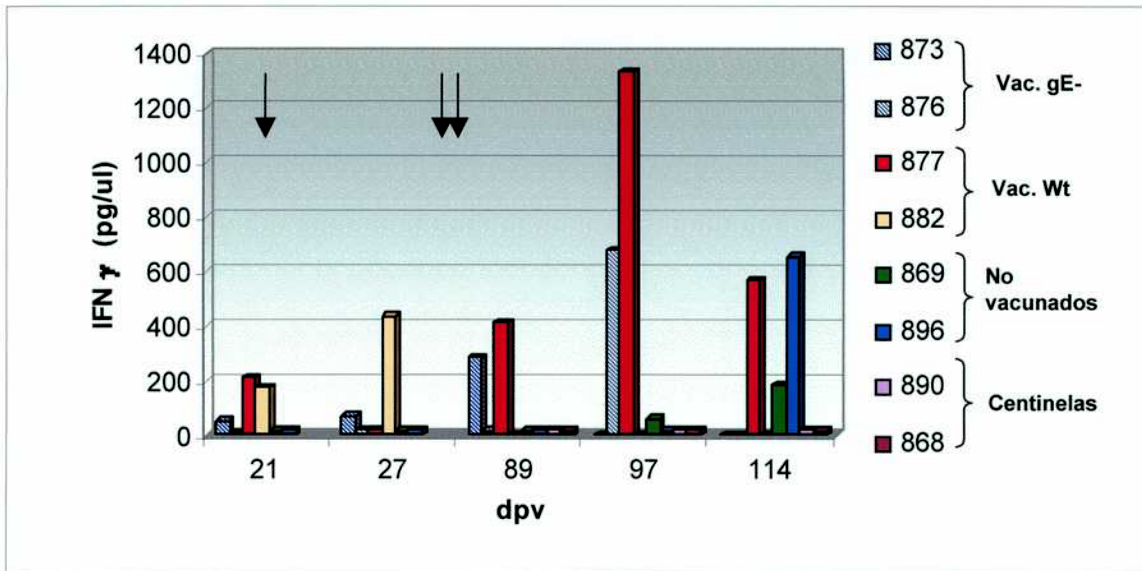
**Figura 12. Respuesta de anticuerpos totales específicos contra HVB-1 inducidos por la vacuna inactivada y el desafío.** Se evaluaron por ELISA los sueros de bovinos vacunados correspondientes a los diferentes grupos: bovinos vacunados con la vacuna inactivada HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal (**Vac. gE-**), bovinos vacunados con la vacuna inactivada HVB-1 cepa salvaje (**Vac. wt**), grupo de bovinos no vacunados, y grupo de bovinos centinela.

↓: revacunación  
 ↓↓: desafío



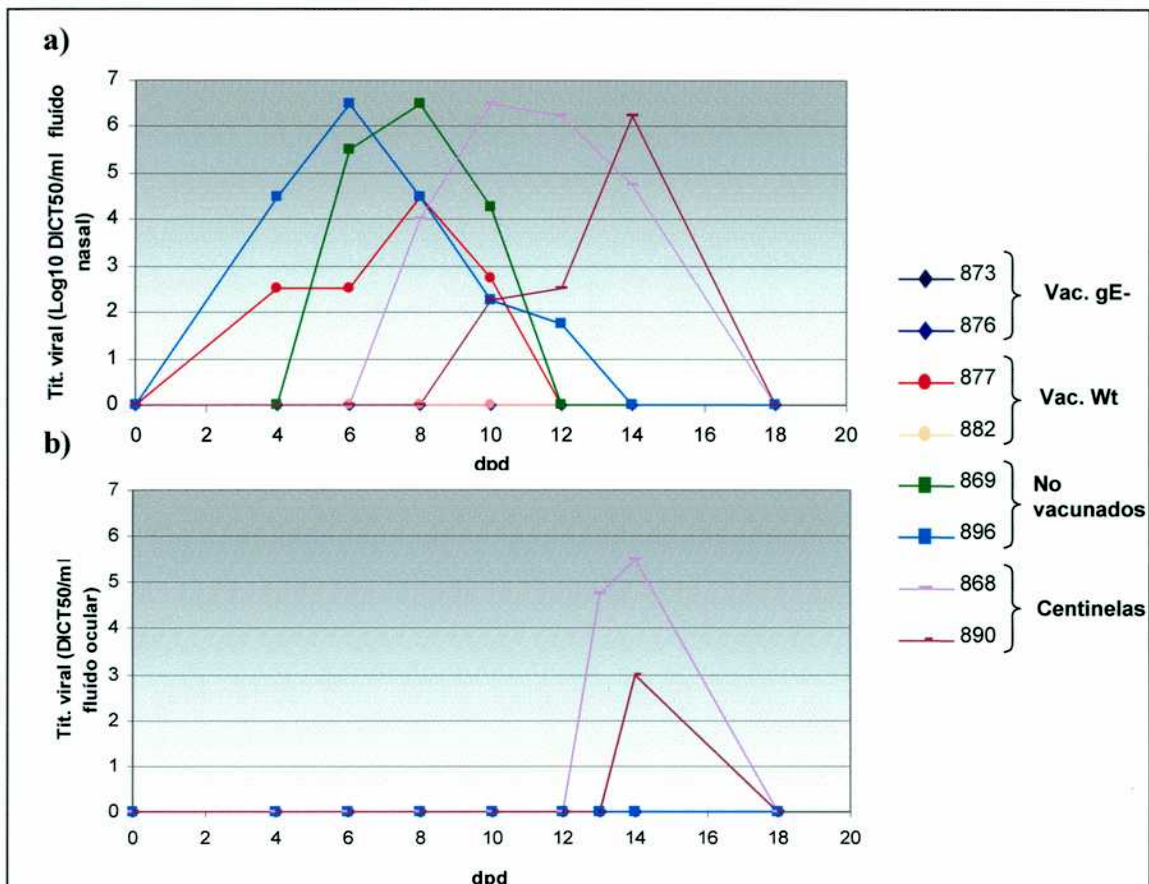
**Figura 13. Respuesta de linfoproliferación específica contra HVB-1 inducida por la vacuna inactivada y el desafío.** Se evaluaron bovinos vacunados correspondientes a los diferentes grupos: bovinos vacunados con la vacuna inactivada HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal (**Vac. gE-**) 873 y 876; bovinos vacunados con la vacuna inactivada HVB-1 cepa salvaje (**Vac. wt**) 877 y 882; grupo de bovinos no vacunados, 869 y 896; y grupo de bovinos centinela, 890 y 868.

↓: revacunación  
 ↓↓: desafío



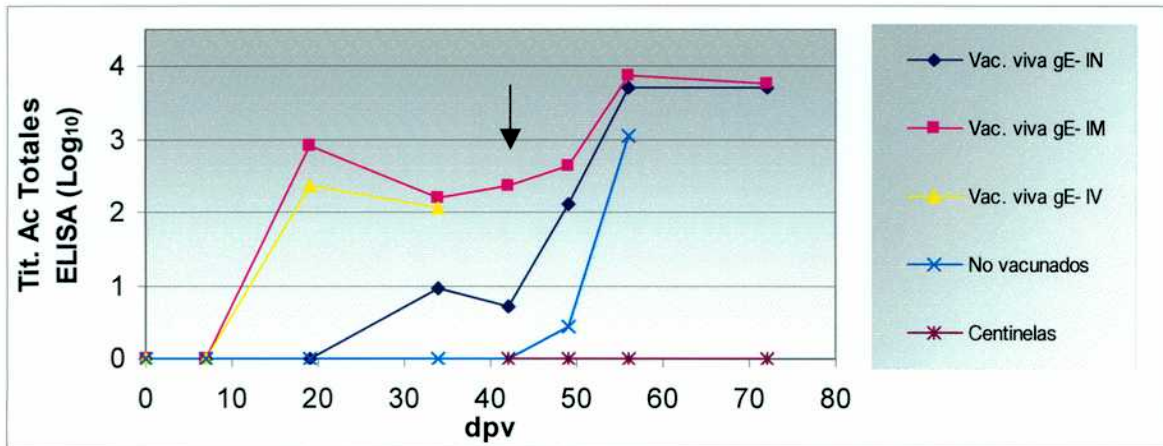
**Figura 14. Niveles de IFN gamma secretado por linfocitos de bovinos vacunados con la vacuna inactivada y desafiados.** Se evaluaron bovinos vacunados correspondientes a los diferentes grupos: bovinos vacunados con la vacuna inactivada HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal (**Vac. gE-**) 873 y 876; bovinos vacunados con la vacuna inactivada HVB-1 cepa salvaje (**Vac. wt**) 877 y 882; grupo de bovinos no vacunados, 869 y 896; y grupo de bovinos centinela, 890 y 868.

↓: revacunación  
 ↓↓: desafío

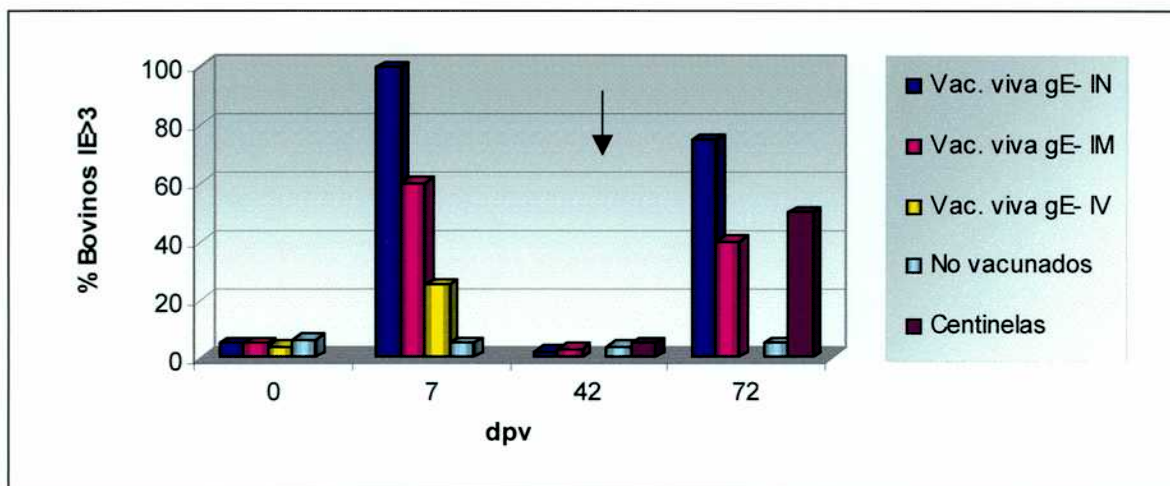


**Figura 15. Excreción viral detectada en bovinos vacunados con la vacuna inactivada y desafiados.** a) Secreciones nasales, b) Secreciones oculares. Se evaluaron bovinos vacunados con la vacuna inactivada HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal (**Vac. gE-**) 873 y 876; bovinos vacunados con la vacuna inactivada HVB-1 cepa salvaje (**Vac. wt**) 877 y 882; grupo de bovinos no vacunados, 869 y 896; y grupo de bovinos centinela, 890 y 868.

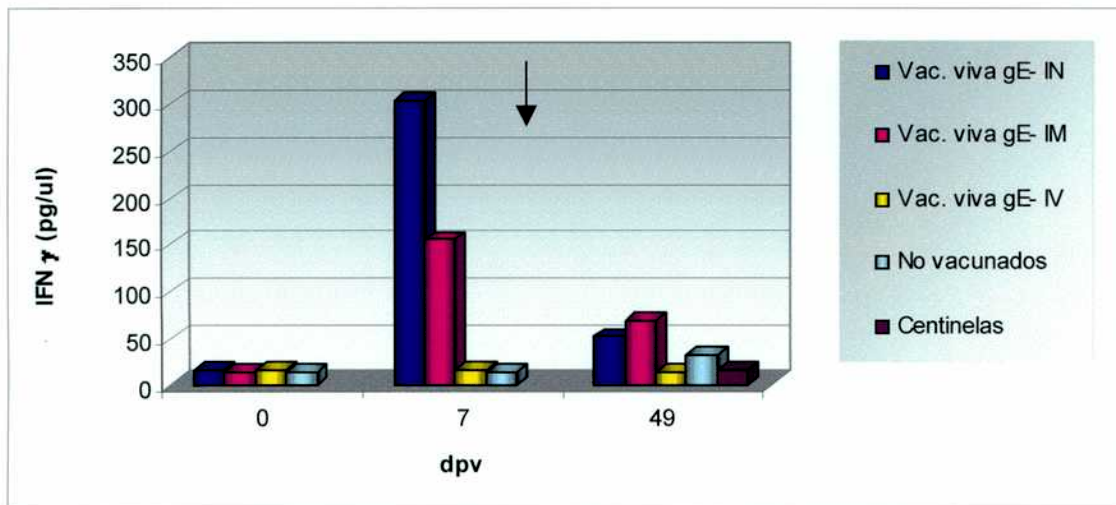
↓: revacunación  
 ↓↓: desafío.



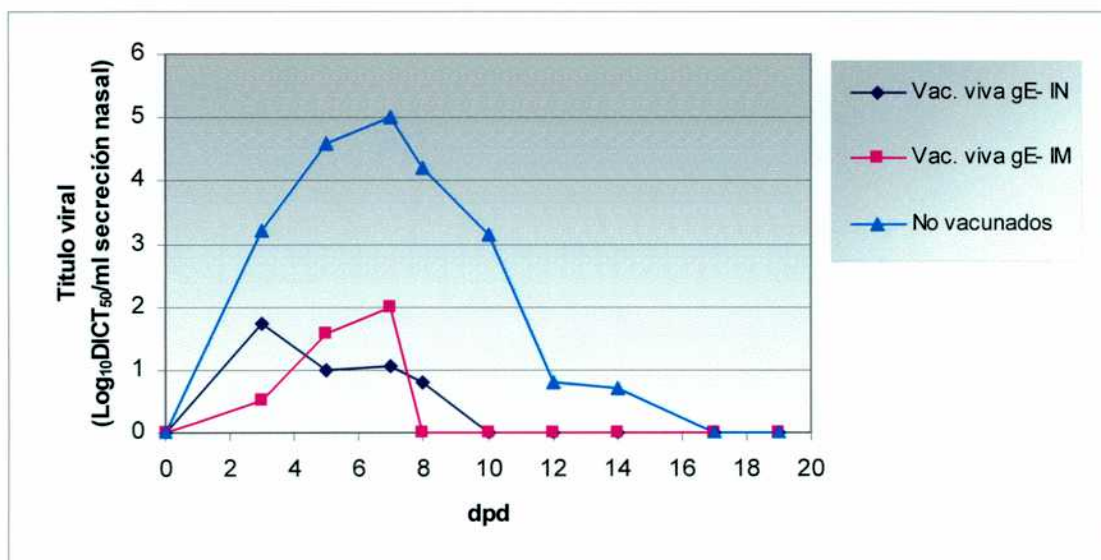
**Figura 16. Respuesta de anticuerpos totales específicos contra HBV-1 inducidos por la vacuna viva y el desafío.** Se evaluaron por ELISA los sueros de bovinos vacunados con la vacuna viva HBV-1ΔgEβgal, por diferentes vías; y desafiados a los 42 dpv, correspondientes a los diferentes grupos: vía intranasal (**Vac. viva gE- IN**), vía intramuscular (**Vac. viva gE- IM**), vía intravenosa (**Vac. viva gE- IV**); grupo control de bovinos no vacunados, y grupo de bovinos centinela. (n=5 bovinos por grupo)  
 ↓: desafío.



**Figura 17. Respuesta de linfoproliferación específica contra HBV-1 inducida por la vacuna viva y el desafío.** Se evaluaron las respuestas de bovinos vacunados con la vacuna viva HBV-1ΔgEβgal por diferentes vías, y desafiados a los 42dpv: vía intranasal (**Vac. Viva gE- IN**), vía intramuscular (**Vac. viva gE- IM**), vía intravenosa (**Vac. viva gE- IV**); grupo control de bovinos no vacunados, y grupo de bovinos centinela. (n=5 bovinos por grupo)  
 ↓: desafío.

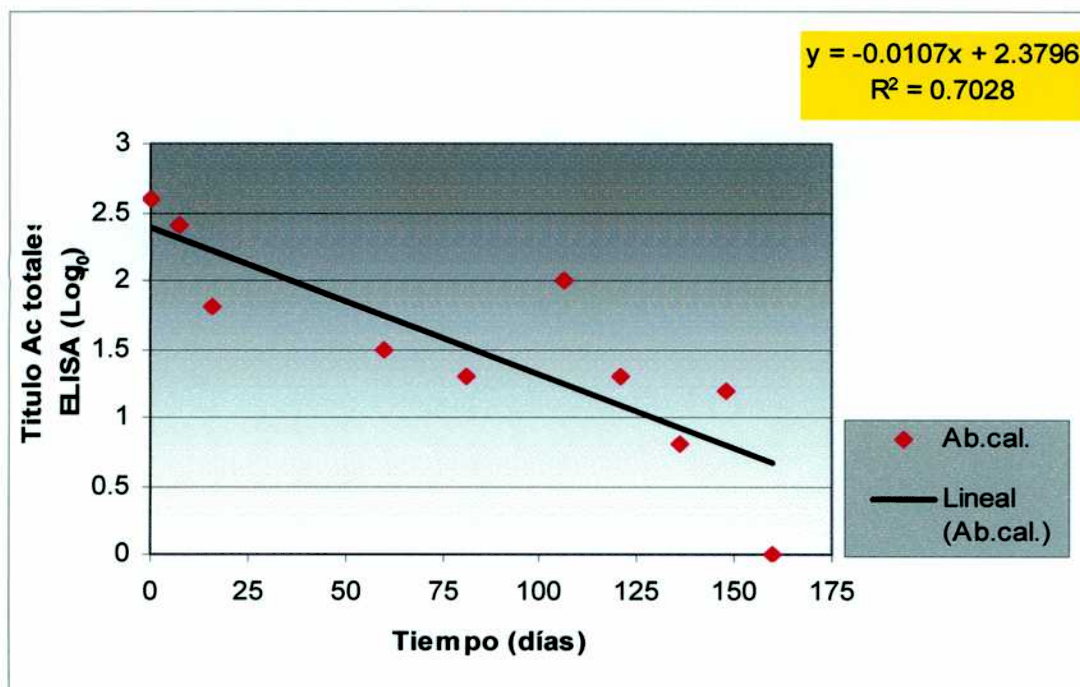


**Figura 18. Niveles promedio de IFN gamma secretado por linfocitos de bovinos vacunados con la vacuna viva por diferentes vías, y desafiados.** Se evaluaron las respuestas de linfocitos extraídos de bovinos vacunados con la vacuna viva HVB-1ΔgEβgal por diferentes vías, y desafiados a los 42dpv: vía intranasal (**Vac. viva gE- IN**), vía intramuscular (**Vac. viva gE- IM**), vía intravenosa (**Vac. viva gE- IV**); grupo control de bovinos no vacunados, y grupo de bovinos centinela. (n=5 bovinos por grupo)  
 ↓: desafío.

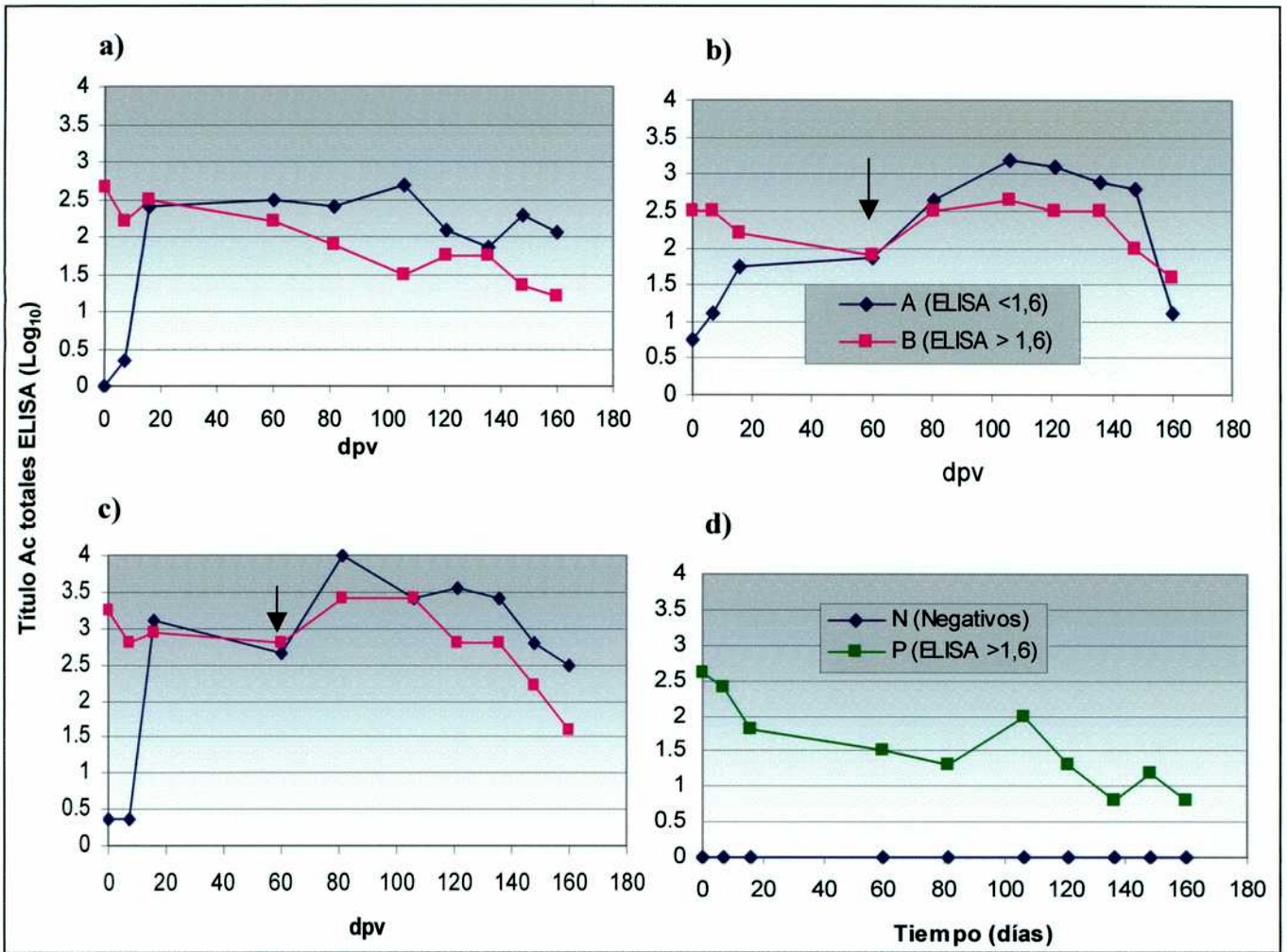


**Figura 19. Excreción viral detectada en secreciones nasales de bovinos vacunados con la vacuna viva y desafiados.** Se evaluaron bovinos vacunados con la vacuna viva HVB-1ΔgEβgal por diferentes vías, y desafiados a los 42dpv: vía intranasal (**Vac. viva gE- IN**), vía intramuscular (**Vac. viva gE- IM**), grupo control de bovinos no vacunados. (n= 5 bovinos por grupo)



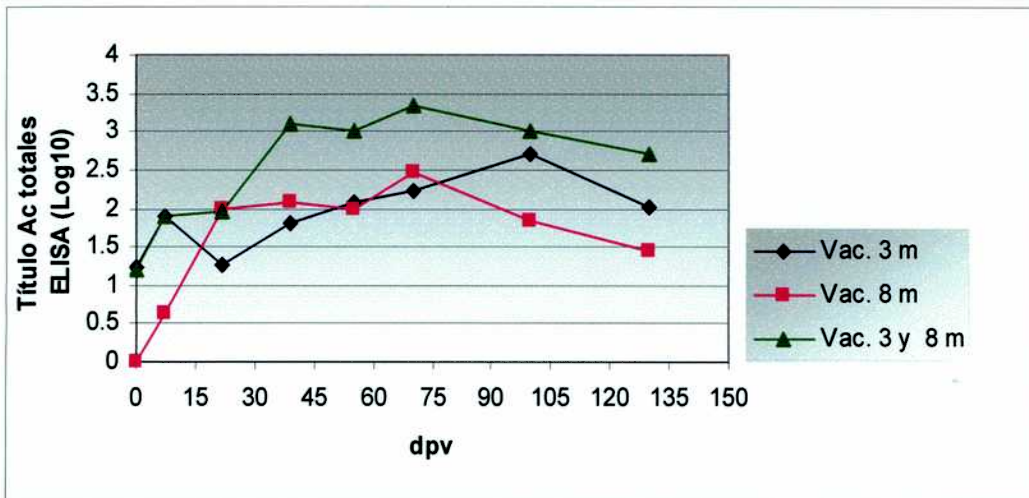


**Figura 20. Curva teórica del descenso de anticuerpos maternos contra HVB-1.** A partir de los títulos de anticuerpos maternos detectados en animales no vacunados hijos de madres vacunadas, se calculó la regresión lineal correspondiente que permitió definir la vida media de los anticuerpos pasivos en 111 días.



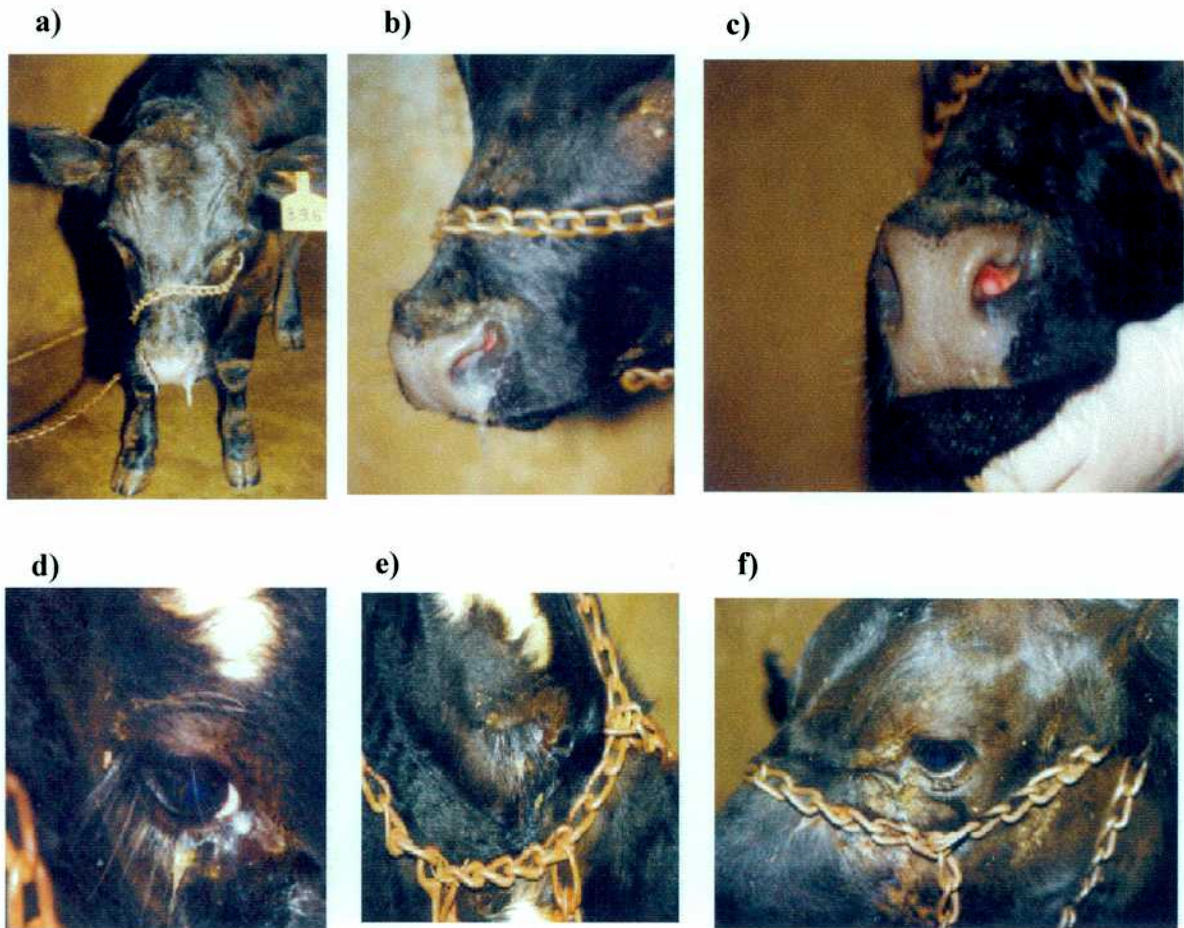
**Figura 21. Interferencia de anticuerpos maternos en el desarrollo de la respuesta específica de anticuerpos contra HVB-1 inducida por la vacuna HVB-1ΔgEβgal en terneros de 3 meses de edad. a) Grupo I:** Terneros vacunados en el tiempo 0 con la vacuna viva HVB-1ΔgEβgal, **b) Grupo II:** Terneros vacunados en el tiempo 0 y revacunados en el tiempo 60 con la vacuna viva HVB-1ΔgEβgal, **c) Grupo III:** Terneros vacunados en el tiempo 0 y revacunados en el tiempo 60 con la vacuna inactivada HVB-1ΔgEβgal, **d) Terneros no vacunados.**

↓: revacunación.



**Figura 22. Respuesta de anticuerpos totales específicos contra HVB-1 inducidos por la vacuna marcadora.** Se evaluaron por ELISA los sueros de bovinos vacunados correspondientes a los diferentes grupos: bovinos vacunados a los 3 meses de edad con la vacuna viva HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal (**Vac. 3m**), bovinos vacunados a los 6 meses de edad con la vacuna viva HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal (**Vac. 8m**), bovinos vacunados a los 3 y a los 6 meses de edad con la vacuna viva HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal (**Vac. 3 y 8m**).

↓: revacunación



**Figura 23. Sintomatología clínica observada en bovinos del grupo control no vacunado de la experiencia de desafío de la vacuna atenuada HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal. a) y b) Cuadros típicos de rinitis seromucosa severa; c) Irritación de la mucosa nasal; d), e), y f) conjuntivitis. Cinco bovinos seronegativos fueron introducidos a las instalaciones en el día 42 de la experiencia, y desafiados con HVB-1, en paralelo con los grupos de bovinos vacunadas con la cepa atenuada.**

Grupo	Bov. Nº	dpd									
		0	4	5	6	8	10	12	14	16	18
Vac. gE-	873	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1
	876	0	1	0	2	2	0	1	2	1	0
Vac. wt	882	0	0	0	1	5	5	3	0	0	7
	877	0	0	0	1	2	3	2	2	2	2
No vacunados	869	0	0	2	3	3	3	3	3	3	1
	896	0	1	2	6	6	5	7	8	3	1
Centinelas	890	0	0	0	6	3	5	7	5	1	3
	868	0	0	0	3	5	5	4	8	3	1

**Tabla 5. Sintomatología clínica registrada en bovinos vacunados con la vacuna inactivada, durante el período post-desafío.** Se evaluó la rinitis de bovinos vacunados correspondientes a los diferentes grupos: bovinos vacunados con la vacuna inactivada HVB-1ΔgEβgal (Vac. gE-), bovinos vacunados con la vacuna inactivada HVB-1 cepa salvaje (Vac. wt), grupo de bovinos no vacunados y grupo de bovinos centinela. El grado de severidad de la rinitis se registró la siguiente escala de valores arbitrarios: serosa + = 1, serosa ++ = 2, seromucosa = 3, mucosa ++ = 4, mucosa +++ = 5, purulenta = 6, purulenta ++ = 7, purulenta +++ = 8.

Grupo	bovino	días post- desafío								
		0	4	6	8	10	12	13	14	17
Vac. gE-	873	-	-	-	-	-	-	ND	-	-
	876	-	-	-	-	-	-	ND	-	-
Vac. Wt	877	-	+	+	+	+	+	ND	+	+
	882	-	-	-	-	-	-	ND	-	-
No Vacunados	896	-	+	+	+	+	+	ND	+	+
	869	-	-	-	+	+	-	ND	-	-
Contactos	890	-	-	-	-	-	+	ND	+oc./+n s	+
	868	-	ND	ND	+	+	+	+	+oc./+n s	-

**Tabla 6. Detección de ADN de HVB-1 en secreciones nasales y oculares por PCR.** Secreciones nasales y oculares de los bovinos vacunados con la vacuna HVB-1ΔgEβgal, y desafiados; fueron analizadas para la detección de genoma viral.

ND: no determinado

oc: muestra de mucosa ocular

Grupo	Bov. N°				dpd					
		0	3	6	8	11	12	14	16	18
Vac. gE- IN-	R11	0	0	1	2	1	1	1	1	2
	R2	0	1	1	0.5	0	0.5	1	1	0
	R4	0	1	1	1	1	0	0.5	0.5	0
	15	0	0	1	1	0.5	0.5	0.5	1	1
	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vac. gE- IM	7	0	3	0	1	3	0	0	0.5	0
	R8	0	0	1	1	0.5	0	1	1	0.5
	R10	0	0	1	1	2	0	1	1.5	0.5
	R9	0	0	1	0.5	0	0	0	1.5	0.5
	T1	0	0	0	0.5	0	0	0	1	1
No vacunados	4	0	0	1	2	3	3	3	3	3
	T3	0	0	3	3	4	2	4	3	1
	T4	0	3	1	3	3	3	4	3	3
	17	0	0	0	3	3	3	3	1	3
	19	0	0	0	0	0.5	0.5	0	3	1

**Tabla 7. Sintomatología clínica registrada en bovinos vacunados con la vacuna viva HVB-1ΔgEβgal, durante el período post-desafío.** Se evaluó la rinitis de bovinos vacunados con la vacuna viva HVB-1ΔgE, por diferentes vías; y desafiados, correspondientes a los diferentes grupos: vía intranasal (Vac. viva gE- IN), vía intramuscular (Vac. viva gE- IM), vía intravenosa (Vac. viva gE- IV); grupo control de bovinos no vacunados, y grupo de bovinos centinela. El grado de severidad de la rinitis se registró la siguiente escala de valores arbitrarios: serosa += 1, serosa ++ = 2, seromucosa = 3, mucosa ++ =4, mucosa +++ =5, purulenta = 6, purulenta ++ =7, purulenta +++ = 8.

Grupo	Bov. N°	21 dpv	131 dpv (48 dpd)
Vac. gE-	873	-	+
	876	-	+
Vac. wt	877	+	+
	882	+	+

**Tabla 8. Respuesta humoral específica contra gE de HVB-1 inducida por la vacuna inactivada.** De estudió la respuesta humoral detectada en suero de bovinos inmunizados con vacuna inactivada HVB-1 gE-administrada por vía IM (Bov. N°: 873 y 876), se analizaron como control los bovinos vacunados con la vacuna inactivada HVB-1 cepa salvaje (Bov. N° 877 y 882). Los anticuerpos específicos contra gE de HVB-1 fueron evaluados por el ELISA comercial Herdcheck (IDEXX). Se consideró negativa la respuesta cuya lectura de absorbancia fue mayor a 0,7. La lectura de absorbancia se realizó a 650nm.

Grupo	Bov.N°	14 dpv	72 dpv (30 dpd)
Vac. viva gE- IV	806	-	-
	D	-	-
	826	-	-
Vac. viva gE- IM	R8	-	+
	T1	-	+
	R10	-	+
	7	-	+
	R9	-	+
Vac. viva gE- IN	11	-	+
	R4	-	+
	15	-	+
	R11	-	+
	R2	-	+

**Tabla 9. Respuesta humoral específica contra la gE de HVB-1 detectados en suero de bovinos inmunizados con vacuna viva HVB-1ΔgEβgal administrada por diferentes vías. Vía intravenosa (IV), Bov. N° 806, D, 826; intramuscular (IM), Bov. N°: R10, T1, R9, R8 y 7, y por vía intranasal (IN), Bov. N°: 15, 11, R4, R11 y R2. Los anticuerpos específicos contra gE de HVB-1 fueron evaluados por el ELISA comercial Herdcheck (IDEXX). Se consideró negativa la respuesta cuya lectura de absorbancia fue mayor a 0,7. La lectura de absorbancia se realizó a 650nm.**

BovN°	0 dpv			7 dpv			14 dpv			19 dpv			34 dpv			72 dpv			330 dpv		
	ELISA totales	gE	SN	ELISA totales	gE	SN	ELISA totales	gE	SN	ELISA totales	gE	SN	ELISA totales	gE	SN	ELISA totales	gE	SN	ELISA totales	gE	SN
806	0	-	0	0	-	0	1.6	-	0	1.6	-	1.8	1.6	-	0	1.6	-	0	0	-	0
709	0	-	0	0	-	0	1.6	-	1.1	2.2	-	1.5	2.2	-	1.1	2.2	-	0	ND	-	ND
D	0	-	0	0	-	0	2.2	-	1.1	2.8	-	1.8	2.2	-	1.0	2.2	-	0	2.2	-	0.7
826	0	-	0	1.6	-	0	2.8	-	1.7	2.8	-	1.2	2.2	-	0	2.2	-	ND	2.2	-	1.3

**Tabla 10. Títulos de anticuerpos totales y neutralizantes específicos contra HVB-1 detectados en suero de bovinos inmunizados con vacuna viva HVB-1 gE- administrada por vía IV. Los anticuerpos totales contra HVB-1 fueron evaluados por ELISA y seroneutralización (SN), y los anticuerpos específicos contra gE de HVB-1 fueron evaluados por el ELISA comercial Herdcheck (IDEXX).**

## V. DISCUSIÓN

### *Una nueva cepa viral HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal*

Recientemente, ha sido demostrado que la delección de genes específicos de los virus herpes genera la atenuación de la virulencia, sin alterar las propiedades inmunogénicas de la cepa (Kaashoek, 1994; Chowdhury, 1996; Liang, 1997; Belknap, 1999). En particular, la delección de gE en cepas mutantes de PRV e IBR han generado gran interés por su utilidad como vacunas marcadoras diferenciales. El uso de vacunas marcadoras ha resultado efectivo en la erradicación de PRV en países de la Comunidad Europea (Moynagh, 1997; Vanniers, 1997) y en los Estados Unidos (Mengeling, 1997).

Actualmente, existe un creciente interés en la Comunidad Europea y en algunos países del Mercosur como Brasil y Argentina, para el desarrollo de nuevas vacunas efectivas contra HVB-1. En los países de la Comunidad Europea y en los Estados Unidos, para la importación de bovinos, se practica un exhaustivo programa de control que requiere de certificación del *status* sanitario. Al mismo tiempo, los centros de inseminación artificial ponen mucho énfasis en la obtención de rebaños completamente seronegativos (Van Donkersgoed, 1991). En particular, entre nuestro país y la comunidad Europea se encuentra restringida la comercialización de semen y embriones bovinos positivos a HVB-1 por disposición de la Unión Europea (64/432, 89/556). Esta situación ha motivado la toma de medidas de control y erradicación en los países miembros de la Comunidad Europea. Sin embargo, aún no se han implementado campañas de erradicación en nuestro continente (Chowdhury, 1999).

En países con baja prevalencia, se practica la extracción gradual de los bovinos infectados, de la población (Van Donkersgoed, 1991). Para ello, una alternativa práctica para la diferenciación de animales vacunados de infectados, es la vacunación de los bovinos con una vacuna marcadora. Se encuentran descritas en cuanto a su capacidad de inducir protección, las vacunas marcadoras vivas modificadas por metodologías clásicas como el pasaje en cultivo de tejidos, o la mutación de pequeñas regiones del genoma viral, que resultan de alto riesgo en cuanto a la probabilidad de reversión y en lo relativo a los niveles de excreción viral detectados durante el período post-vacunación (Flores, 1993; Kaashoek, 1994).

En el presente trabajo se describe el desarrollo de una vacuna marcadora atenuada contra HVB-1, generada a partir de una delección del marco abierto de lectura



completo de la proteína gE. Esta mutación constituye una característica diferencial y ventajosa de la nueva cepa con respecto a las cepas de Herpesvirus bovino deletadas en gE reportadas hasta el momento (Rebordosa, 1996; Kaashoek, 1996; Belknap, 1999; Chowdhury, 1999). Esta cepa atenuada administrada como vacuna inactivada o viva fue capaz de proteger bovinos contra el desafío viral con virus HVB-1 parental. Resultó segura en cuanto a los riesgos de abortogenicidad y transmisión a animales no vacunados, y completamente inocua en cuanto a la generación de efectos colaterales en el bovino.

La cepa de HVB-1 recombinante ( $\Delta$ gE/ $\beta$ gal+) contiene inserto el gen marcador,  $\beta$ gal funcional en reemplazo del gen codificante de la glicoproteína E. Para ello se construyó un vector de recombinación (pUCLR $\beta$ gal) en base al pUC<sub>19</sub> donde se colocaron fragmentos de secuencias flanqueantes al gen codificante para la gE de HVB-1; y entre los cuales se insertó una secuencia para la expresión de la enzima  $\beta$ galactosidasa, como gen marcador de expresión.

La amplificación por PCR destinada a generar los fragmentos de secuencias homólogas a las de las regiones flanqueantes al gen de gE, se realizó con cebadores degenerados con el propósito de introducir sitios de restricción para el posterior clonado en los vectores intermedios utilizados. De esta manera, se verificó la validez del diseño propuesto para la obtención del vector mediante el uso de la amplificación por PCR. Esta tecnología desarrollada para generar la delección de gE mediante recombinación homóloga, no había sido aplicada hasta el momento en Herpesvirus bovino para la obtención de cepas mutantes. Las publicaciones describen la utilización del clonado clásico (Rebordosa, 1994; Oirschot, 1994; Chowdhury, 1999; Belknap, 1999), por medio de digestiones con endonucleasas de restricción a partir de librerías genómicas (*libraries*) de la cepas de referencia, actualmente disponibles. Este tipo de proceso aplicado en el genoma de HVB-1 conlleva enormes limitaciones dada la alta repetitividad de sitios de restricción a lo largo del genoma viral. Así, la tecnología aplicada resultó de gran practicidad.

Mediante ensayos independientes de lipofección se obtuvieron 8 clones virales positivos para la selección por actividad de la enzima  $\beta$ galactosidasa. De acuerdo a las propiedades aparentes en cuanto a su crecimiento en cultivo de células (datos no mostrados) y el mayor número de focos por placa de Petri, con un título de  $5 \times 10^6$

UFP/ml, se seleccionó y caracterizó sólo un clon putativamente recombinante. A partir de la caracterización por PCR se confirmó la delección del gen gE, al mismo tiempo que la presencia de las secuencias flaqueantes (L y R) intactas. Por medio del ensayo de hibridización específica de ADN se confirmó con una alta sensibilidad la ausencia de secuencias codificantes de gE y la integridad de las secuencias flanqueantes. Se comprobó en el clon recombinante, la pérdida del sitio de restricción para la enzima HindIII descrito por Mayfield (1983) de manera tal que los fragmentos *i* y *e* (8231pb y 12473pb, respectivamente) normalmente utilizados en ensayos de caracterización genómica de cepas virales, se unen al fragmento codificante de la enzima  $\beta$ galactosidasa (4500pb) para originar un fragmento de 23544pb. Estos datos reflejaron la viabilidad funcional de las secuencias incorporadas a la construcción PucLR $\beta$ gal, en cuanto a su capacidad de recombinar con las secuencias de ADN homólogas virales. Al menos parte de la población de partículas virales originadas a partir del ADN viral infeccioso que recombinó con el ADN del vector PucLR $\beta$ gal, incorporó el gen  $\beta$ gal funcional que se expresó en los primeros ciclos de replicación viral y permitió así la selección de dichas poblaciones.

El gen reportero de la cepa viral recombinante HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal está compuesto por el promotor inmediato-temprano y las secuencias *enhancer* del Citomegalovirus humano (HCMV), unidas a las secuencias codificantes para la enzima  $\beta$ -galactosidasa de la bacteria *E.Coli* junto con secuencias de poliadenilación del virus de simio SV<sub>40</sub>. El gen  $\beta$ gal es regulado por un fuerte promotor inmediato temprano de HCMV y no por secuencias regulatorias derivadas de HVB-1, por lo que el gen es expresado tanto durante fases tempranas como tardías de la infección, y se independiza de la regulación temporal característica del contexto genómico en el que se lo insertó. El gen  $\beta$ gal insertado en el genoma viral fue útil como marcador fenotípico del virus recombinante  $\Delta$ gE $\beta$ gal+ en cuanto a tres efectos: por un lado, la coloración generada por la actividad enzimática de la  $\beta$ galactosidasa en la cepa recombinante; por el otro lado, el cambio del patrón de corte con la enzima HindIII, que provoca un cambio en perfil de bandas fácilmente identificables; y por último y como consecuencia del primer efecto mencionado, una disminución teórica de la probabilidad de reversión al fenotipo salvaje debido al reemplazo de la región deleteada con el fragmento de ADN codificante de la enzima  $\beta$ gal.

Por otro lado, la recombinación con el vector PucLR $\beta$ gal en el contexto del genoma de HVB-1 LA, generaría la incorporación de un sitio EcoRI que fue creado mediante la amplificación del fragmento homólogo R con el cebador degenerado gE<sub>4</sub>. Esta modificación altera el patrón de 7 bandas descrito por Mayfield (1983), agregando una banda de 12732pb ubicada entre los fragmentos *b* y *f*, de 22189 y 8353 pb, respectivamente; y eliminando a la banda *c* (5683pb). Sin embargo, para una caracterización más fina de la cepa HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal desarrollada, sería necesario confirmar mediante la secuenciación de la región Us, la pérdida del sitio HindIII así como los últimos datos teóricos. La pérdida del sitio HindIII demostrada por *Southern* junto con la adición del sitio EcoRI resultarían marcadores adicionales útiles para la identificación rápida de la cepa HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal en estudios epidemiológicos.

La selección de clones virales recombinantes por expresión de la enzima  $\beta$ gal es una herramienta frecuentemente utilizada. En el presente desarrollo el gen marcador puede ser utilizado como un elemento de verificación de pureza frente al riesgo de contaminaciones cruzadas con la cepa HVB-1 parental. Del mismo modo, la ausencia de amplificación por PCR de la región codificante para la gE es otro factor de selección que ha sido utilizado intensivamente en la caracterización de cada producción de virus para vacuna (no mostrado), y que debería ser aplicado sistemáticamente como control de pureza de las diferentes producciones de virus vacunal.

A partir de estudios realizados en base al diseño y al modelo de recombinación propuestos, se desprende que la cepa HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal conservaría los codones tanto de iniciación (AUG) como de terminación (UAG) de la transcripción de gE. La deleción en la cepa recombinante abarca 1640 pares de bases, y está comprendida en la región delimitada entre la base número 20 a partir del codón de inicio de transcripción y la base número 67 río arriba con respecto al codón de terminación de la transcripción.

A través de la identificación con anticuerpos monoclonales, se verificó que la cepa HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal carece de la gE al mismo tiempo que conserva intacta la gD, una de las glicoproteínas mayoritarias de la partícula viral. De esta manera se corroboraron, a nivel proteico, los resultados obtenidos a nivel genético y se verificó la integridad de la partícula viral a nivel de la proteína gD.

En los experimentos realizados de cinética de replicación y en los cultivos llevados a cabo para la producción del virus vacunal, se observó que la cepa HVB-

1ΔgEβgal mantuvo las mismas características de replicación que la cepa HVB-1 LA parental. De esta manera también se confirmó la viabilidad de la partícula viral y la correcta funcionalidad de la estructura genética del gen marcador βgal incorporado en reemplazo del marco de lectura de gE.

Asimismo, se comprobó la estabilidad de la cepa recombinante a través de sucesivos pasajes en cultivo de células. Como se mencionó anteriormente, con el objeto de verificar la identidad de la cepa multiplicada y la pureza de la misma, cada producción de virus fue controlada por PCR y mediante el ensayo de revelado de la actividad enzimática de βgal.

Paralelamente, acorde con lo descrito por Chowdhury (1999) se observó un tamaño menor en el foco de infección de la cepa HVB-1ΔgEβgal; sin embargo, en ensayos realizados en diferentes condiciones de crecimiento (Quattrocchi, 2001) no se detectó un cambio en la capacidad infectiva comparado con la cepa parental. Este cambio de tamaño de foco estaría relacionado en parte con la delección de gE. De acuerdo a lo descrito por Jacobs (1994) y Rebordosa (1996) la delección de gE en la partícula viral ocasiona una disminución drástica de la infección de células vecinas a través de puentes intercelulares, de esta forma la ruta extracelular se transformaría en la vía de infección mayoritaria. Es importante destacar que esta aparente disminución de las características replicativas no se reflejó en los títulos virales obtenidos para la cepa HVB-1ΔgEβgal que no difirieron de los detectados para la cepa HVB-1 parental. Este hecho constituye una ventaja fundamental al momento de la selección de esta cepa para su utilización en la formulación de vacunas. En este proceso de selección debe ser tenido en cuenta el rendimiento de la cepa en cultivos en masa, como los actualmente utilizados por la industria para la formulación de vacunas comerciales. Por lo tanto, desde el punto de vista de la producción del virus como materia prima, la cepa marcadora constituye una buena opción como antígeno vacunal. Sin embargo, sería necesario confirmar la capacidad replicativa a gran escala de la cepa BHV-1ΔgEβgal en las industrias productoras de vacunas.

*Eficacia de la cepa HVB-1ΔgE como vacuna inactivada marcadora en bovinos.*

La selección de una cepa mutante de delección para ser utilizada en vacunas debe considerar características que resultan claves para su posterior aplicación e ingreso al mercado. Es necesario que la cepa sea inductora de una inmunidad protectora contra el desafío viral con HVB-1 (Oirschot, 1996). La protección contra el desafío, inducida por una vacuna contra herpesvirus, se evalúa por su efecto en la reducción de la sintomatología clínica y en la reducción de la excreción del virus luego del desafío. Este último aspecto es importante cuando una vacuna es utilizada en un programa de erradicación de HVB-1.

Por este motivo, una vez comprobado que pese a la delección de gE en la cepa HVB-1ΔgEβgal, se conserva la funcionalidad de la partícula viral en cuanto a capacidad infectiva en cultivo de tejido y en cuanto a estructura proteica, se planteó la evaluación de su integridad inmunogénica. En una experiencia con reducido número de animales se estudió la respuesta inmune inducida y la protección frente al desafío viral en bovinos vacunados con la una vacuna marcadora inactivada de formulación oleosa basada en la cepa HVB-1ΔgEβgal.

Al igual que lo descripto por Kaashoek (1995), la vacuna inactivada HVB-1ΔgE indujo una respuesta inmune tanto celular como humoral temprana y de niveles altos. A pesar de que en el grupo de bovinos vacunados con la vacuna inactivada HVB-1ΔgEβgal se evidenció una tendencia transitoria de niveles mayores de anticuerpos con respecto a los bovinos vacunados con la vacuna inactivada HVB-1 entre los tiempos 66 y 89 dpv, esta diferencia desapareció a partir de los 97dpv (14dpd). Esta disparidad no se reflejó en la respuesta celular T *helper* medida en TLP, que resultó equivalente entre los grupos de bovinos vacunados a lo largo de toda la experiencia. Otra diferencia fue la detectada en el tiempo 21dpv entre los grupos vacunados, momento en el que el grupo de bovinos Vac. wt mostró niveles de IFN $\gamma$  significativamente mayores a los detectados para el grupo Vac. gE-. Sin embargo, en el resto de los tiempos estudiados los datos referentes a la respuesta celular de TLP e IFN $\gamma$  fueron parejos independientemente de la vacuna recibida, una vez enfrentados al virus HVB-1 desafío.

No se detectó excreción viral en los bovinos vacunados con la vacuna inactivada HVB-1ΔgE. Aún así, estos resultados indican que la inmunogenicidad de la cepa

recombinante inactivada no fue alterada por la delección del gen de gE y la simultánea incorporación del gen de la enzima  $\beta$ gal en el proceso de obtención de la cepa HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal.

Resulta llamativa la completa ausencia de excreción viral luego del desafío en secreciones nasales de los bovinos vacunados con la cepa recombinante, esto se debería al bajo número de bovinos empleados en la experiencia y no a una característica particular de esta vacuna. Típicamente, en experiencias similares realizadas con vacunas marcadoras inactivadas, se registran niveles de excreción viral menores en los bovinos vacunados, a los detectados en los bovinos no vacunados (Bosch, 1998; van Drunen Littel, 1993). Es importante mencionar que no se detectaron efectos adversos luego de la administración de la vacuna recombinante.

Acorde con lo descripto para este tipo de vacunas (Flores, 1993; Kaashoek, 1995; Oirschot, 1997), se comprobó el carácter marcador de la cepa HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal dado que los animales vacunados si bien presentaron una elevada respuesta inmune frente al virus HVB-1 tanto por seroneutralización como por ELISA, pero permanecieron seronegativos frente a gE. Sólo se detectó claramente la seroconversión de la respuesta de anticuerpos contra la gE luego del desafío con el HVB-1.

En su conjunto, estos resultados demostraron que la cepa HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal resulta altamente inmunogénica cuando se la administra en vacunas inactivadas, que induce una respuesta inmune similar a la detectada para la vacuna formulada en base a la cepa HVB-1 salvaje, y resulta protectora. Al mismo tiempo, se demostró la ausencia de efectos adversos provocados por la vacuna inactivada formulada en base a la cepa HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal. Resulta de fundamental importancia la ventaja de que la respuesta humoral inducida por la vacuna inactivada HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal es claramente marcadora de bovinos infectados, entre los bovinos vacunados.

Una de las características que posiblemente marcan la epidemiología de HVB-1 es su capacidad de establecer latencia en los bovinos infectados. Bosch (1997) demostró la reactivación del virus latente en el bovino, como consecuencia de la vacunación con vacunas vivas. Para evitar este fenómeno, se sugiere el empleo de la vacuna inactivada HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal en el caso de rodeos seropositivos. De todas maneras sería necesario ampliar estas observaciones con un mayor número de animales.

*La cepa HVB-1ΔgEβgal es inocua y segura para su utilización como vacuna viva en bovinos.*

Una vez caracterizada la cepa HVB-1ΔgEβgal *in vitro* y comprobada la viabilidad inmunogénica *in vivo* como antígeno viral inactivado, se procedió a evaluar su inmunogenicidad como antígeno vivo en el bovino, con el objetivo de utilizar la cepa viral recombinante como antígeno vacunal vivo. En una primera etapa se evaluó la seguridad de la vacuna viva HVB-1ΔgEβgal y en segundo lugar se estudió la inmunogenicidad de la cepa ΔgEβgal en bovinos utilizando como referencia el sistema de prueba de potencia desarrollado previamente para la vacuna convencional formulada en base a la cepa HVB-1 LA parental por Romera (2000). Con el objeto de estudiar la eficacia protectora de la vacuna viva, se analizaron dos vías diferentes de inoculación, y en tercer lugar, se estudió la interferencia de anticuerpos maternos en el desarrollo de la respuesta inmune específica.

En el análisis de la seguridad de una vacuna viva se consideran dos aspectos fundamentales que son la transmisión vertical y la transmisión horizontal del virus de la vacuna (Oirschot, 1996). Para analizar la seguridad de la cepa HVB-1ΔgEβgal en cuanto a la transmisión vertical de madre a hijo, y para evaluar el riesgo abortigénico durante la preñez, se seleccionó la vía intravenosa como ruta de administración de la cepa HVB-1ΔgEβgal. Esta ruta ya ha sido demostrada como efectiva para la inducción de abortos por HVB-1 (Cravens, 1996; Talens, 1989, Smith, 1978). De esta manera, se estudió la evolución de las preñeces de vacas vacunadas por vía intravenosa con el virus atenuado. Las vacas inoculadas entre el cuarto y sexto mes de gestación, cursaron normalmente su preñez, hasta la parición. Asimismo, los partos fueron normales, y los terneros saludables. Los mismos, fueron mantenidos junto a sus madres durante el período normal de amamantamiento (6 meses), de forma que la ganancia de peso de los terneros siguió su curso normal. De estos resultados se desprende que la cepa HVB-1ΔgEβgal no generó malformaciones en el feto, no alteró la duración del período de preñez, a la vez que indujo una alta respuesta humoral en las madres que fue transferida a los terneros de manera efectiva.

Asimismo, mediante el estudio realizado con el grupo de bovinos inmunizados por vía IV se demostró la efectividad de esta vía para inducir una respuesta humoral específica, así como también, la eficaz transferencia de anticuerpos calostrales al ternero

recién nacido durante la experiencia. La respuesta humoral inducida por la vacuna viva HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal se conservó a lo largo de 330 días luego de la inmunización, y se mantuvo negativa a gE.

Con el objeto de analizar la cepa HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal en cuanto a la transmisión horizontal, se estudió la capacidad de infección por contacto entre animales vacunados y no vacunados (centinelas) que convivían en el mismo recinto. No se detectó seroconversión en ningún bovino centinela, ni fue posible aislar virus a partir de las secreciones nasales correspondientes, durante el período post-vacunación con la cepa atenuada. Por lo tanto, la cepa HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal resultó una vacuna viva segura que no se excreta en niveles detectables en la mucosa nasal de los bovinos vacunados y además no se transmite entre bovinos vacunados y no vacunados. Este hecho la describe como altamente atenuada en comparación con otras cepas mutantes deleteadas de gE (Belknap, 1999; Chowdhury, 1999).

En cuanto a la excreción viral de los animales vacunados con la vacuna atenuada administrada por las diferentes vías (IV, IM e IN), sólo se detectó excreción viral en dos animales del grupo vacunado por vía intranasal, que en el día 3 post-vacunación mostraron bajos títulos en secreciones nasales. El virus detectado probablemente correspondió a restos del virus vacunal inoculado y posiblemente fue detectado debido al alto título viral aplicado ( $10^8$  DICT<sub>50</sub> totales) a los animales en esta primera prueba. Se encuentran en desarrollo las pruebas de vacunación de bovinos con menores títulos virales y la evaluación de la excreción viral en esas condiciones.

El estudio de la capacidad de transmisión horizontal de la cepa vacunal fue realizado con la introducción entre los bovinos vacunados, de un grupo de bovinos negativos no vacunados que fue denominado centinela. Dicho grupo de bovinos fue introducido a las instalaciones, una vez realizada la inmunización y permaneció en estrecho contacto con los grupos de bovinos vacunados. Los bovinos negativos fueron distribuidos al azar entre los vacunados, de modo de maximizar las probabilidades de contagio en el hipotético caso de que la cepa vacunal conservara la virulencia de la cepa parental. Opuestamente a lo descrito para una cepa recombinante HVB-1 deleteada en gC (Liang, 1992) los bovinos del grupo centinela no mostraron sintomatología típica de la infección por IBR, ni excreción viral durante el período post-vacunación.



Dado que este resultado se reprodujo en los tres grupos de bovinos vacunados, incluyendo los inoculados por la vía intramuscular, que es la más comúnmente utilizada; se descarta la posibilidad de todo tipo de transmisión horizontal del virus de la vacuna, lo que permite enfatizar la muy baja probabilidad de transmisión de virus vacunal entre animales vacunados por vía intramuscular y no vacunados.

Estos resultados son una contundente confirmación de la baja probabilidad de dispersión de HVB-1 recombinantes a otras especies domésticas. Por ejemplo, se ha comprobado la presencia de anticuerpos contra HVB-1 en esas especies, aunque no se ha aislado el agente (Rivera, 1987; Puntel, 2000), lo que respaldaría la selección de la cepa HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal para su utilización como vacuna viva, en bovinos.

La respuesta inducida por la vacuna viva HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal contra HVB-1 resultó estable a largo plazo dado que los títulos de anticuerpos alcanzados se mantuvieron a lo largo de un período de 330 días. Estos resultados están de acuerdo con los ya descritos para este tipo de vacunas (Oirschot, 1996). Asimismo, a largo plazo la respuesta inmune mantuvo sus características diferenciales en los animales vacunados con respecto a los animales infectados.

La cepa recombinante HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal mostró una fuerte atenuación en bovinos, dado que no fue posible detectar la replicación viral en tejido de mucosas nasales de bovinos inoculados con la vacuna viva. Al mismo tiempo, las secreciones nasales obtenidas a lo largo de las experiencias que resultaron sospechosas resultaron negativas cuando fueron sometidas a PCR para la amplificación de regiones L y gE, lo que marca una diferencia con las vacunas descritas hasta el momento.

Aparentemente, en el bovino la cepa atenuada muestra niveles muy bajos de replicación, la cinética de replicación es notablemente diferente de la observada para el virus parental, lo que reflejaría que el virus pierde la capacidad infectiva observada en cultivo de células una vez acabado el primer ciclo de replicación en tejido de mucosa nasal. De todos modos los niveles de replicación son los suficientes como para lograr la óptima inducción del sistema inmune del bovino. Un paso a seguir para caracterizar más íntimamente a la cepa desarrollada sería el estudio de su patogenia en el bovino, como los realizados por Engelenburg (1995), de manera de conocer los órganos que resultan infectados por la cepa HVB-1 $\Delta$ gE, y evaluar la atenuación generada en estos términos.

A pesar de la ausencia de excreción viral en los bovinos inoculados, los títulos detectados durante diferentes experiencias de crecimiento en cultivo de tejidos demostraron que en esas condiciones la cepa HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal tiene propiedades de crecimiento que concuerdan con las características conocidas para la cepa HVB-1 LA parental. Difiriendo con lo esperado, el tipo de deleción de gE redujo la virulencia de HVB-1 más fuertemente que lo reportado hasta el momento para las cepas mutantes de deleción de gE en otros alfa herpesvirus, y en otras cepas de HVB-1 diseñadas por ingeniería genética. La cepa mutante gE-negativa en SHV-1 es atenuada en cerdos pero aún queda una virulencia residual (Kimman, 1992<sup>a</sup>); una cepa mutante de deleción de VHS-1 también conserva alguna virulencia residual en conejos (Kudleková, 1991); y algunas cepas mutantes de deleción en gE de HVB-1 muestran su capacidad de multiplicar en mucosa nasal de los bovinos inoculados (Kaashoek, 1994; Rebordosa, 1995; Chowdhury, 1999). Se postula que la deleción del marco de lectura completo de gE del genoma de HVB-1 podría haber afectado la expresión de genes flanqueantes a gE, causando una atenuación adicional a la descrita hasta el momento en la bibliografía (Belknap, 1999).

Probablemente, no fue afectada la expresión de los genes localizados río arriba del gen de gE. La secuencia codificante para gE se encuentra flanqueada río arriba por el gen de gI. En los 470pb ubicados entre los marcos abiertos de lectura de gE y gI, se encuentra una señal de poliadenilación (Chowdhury, 2000). Debido a que el extremo 5' de la deleción de la cepa HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal se encuentra río abajo de dicha señal de poliadenilación, probablemente esta deleción no afectó las unidades transcripcionales localizadas río abajo del gen de gE.

Por otro lado, la expresión del gen homólogo de US9 de VHS-1, que está ubicado en la región de unos 700pb río abajo del gen de gE, podría estar afectada por la deleción de gE. En VHS-1 y SHV-1, los transcritos de gE son poliadenilados río abajo del gen US9, en el mismo sitio que el transcrito monocistrónico de US9 es poliadenilado (Davidson, 1986; Kost, 1989). Por lo tanto, la expresión de US9 fue posiblemente alterada por la deleción del marco abierto de lectura de gE. Sin embargo, recientes datos muestran que una cepa mutante de HVB-1, causada por una mutación que genera el cambio del marco de lectura (*frame shift*), fue avirulenta en bovinos

(Belknap, 1999) apoyando la teoría de que la reducción de la virulencia está generada por la inactivación del gen gE.

Como se describió más arriba, la incorporación de las regiones homólogas del vector de recombinación podría haber generado la inserción de un sitio EcoRI y el cambio del marco de lectura del gen ubicado en el TR. Este cambio podría estar generando directa o indirectamente la pérdida de expresión de alguna proteína o factor de transcripción necesarios para la replicación del virus en el hospedador. Por otro lado, a través del proceso de obtención del virus recombinante pudieron originarse otras deleciones espontáneas como fuera descrito por Belknap (1999).

Las propiedades *in vitro* de las cepas mutantes de deleción de gE alfa herpesvirus relacionados (VHS-1) y herpesvirus porcino (SHV-1) (Dingwell, 1994; Zsak, 1992); y del propio HVB-1 (Rebordosa, 1996) indican que gE está involucrada en la dispersión célula-célula del virus. *In vivo*, cepas las mutantes de deleción en gE de VHS-1 y SHV-1 son reducidas en virulencia (Kudleková, 1991; Kimman, 1992 a) y muestran una neuroinvasividad reducida (Rajcani, 1990 a, b; Kimman, 1992 b). Previamente, se había demostrado que la deleción del gen gE de HVB-1, reduce fuertemente su virulencia en bovinos (van Engelemburg, 1994, Belknap, 1999). Para ahondar en el conocimiento del comportamiento de la cepa deleteada HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal desarrollada, se evaluaron los parámetros de inmunogenicidad y virulencia en una experiencia de desafío viral, en condiciones de aislamiento.

*La vacuna viva HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal induce respuesta inmune protectora en bovinos.*

Coincidiendo con lo reportado para este tipo de vacunas (Belknap, 1999; van Drunen, 1997; Kaashoek, 1996, Mars, 2000), la vacuna viva HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal fue capaz de proteger contra el desafío viral con HVB-1 parental, independientemente de la vía de inoculación (IM/IN) utilizada. A pesar de que se observaron diferencias de niveles de anticuerpos inducidos por la vacuna cuando se la administró por las diferentes vías de inoculación, la cepa HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal resultó altamente inmunogénica cuando se la utilizó como vacuna viva, induciendo una respuesta inmune humoral similar a la descrita para la vacuna inactivada formulada en base a la cepa HVB-1 salvaje. Los

bovinos vacunados por la vía IM mostraron mayores títulos de anticuerpos en suero y con una diferencia temporal de 15 días (se detectó respuesta a partir de los 19 dpv), con respecto al grupo Vac. viva gE- IN. Sin embargo, estas diferencias no se continuaron en el tiempo. A los 49dpv el grupo Vac. viva gE- IN igualó los niveles alcanzados por el grupo Vac. viva gE- IM. Los resultados reflejaron la diferente ruta de inducción de la respuesta humoral dependiendo de la vía de inoculación. A pesar de que se detectó más tardíamente la respuesta inmune inducida por la vacunación IN que la IM, los bovinos se encontraban óptimamente inmunizados, de manera que alcanzaron los mismos títulos promedio de anticuerpos luego de enfrentarse con el virus salvaje al momento del desafío.

Opuestamente, la cepa HVB-1ΔgEβgal indujo una respuesta inmune linfoproliferativa mayor en el grupo Vac. viva gE- IN con respecto a la inducida en el grupo Vac. viva gE- IM, diferencia que se mantuvo luego del desafío viral. Esta diferencia en la respuesta celular fue confirmada por la secreción específica de IFN $\gamma$  detectada a los 7dpv, en linfocitos de los bovinos vacunados. De manera que la vacuna viva HVB-1ΔgEβgal resultó una eficiente inductora de la respuesta inmune celular cuando fue administrada por la vía IN.

A pesar de las diferencias detectadas en los niveles de respuesta inmune inducida por la vacuna administrada por diferentes vías (IN/IM), tanto los niveles como la duración de la excreción viral post-desafío fue similar para ambos grupos de bovinos vacunados y significativamente menor respecto de la excreción detectada en los controles. La protección lograda con la administración de la vacuna por vía IM fue tan buena como la obtenida con la vacunación IN, y resulta una opción conveniente en términos de practicidad en cuanto al manejo de este tipo de vacunas en el campo. Esta vacuna resulta altamente fluida y no genera nódulos en el sitio de inoculación.

Al evaluar el desarrollo de sintomatología clínica, los bovinos vacunados mostraron una reducción significativa en la severidad del cuadro clínico respecto de los controles. Con respecto a la diferencia entre vías, en el día 27 dpv, los bovinos del grupo Vac. viva gE- IN mostraron una menor sintomatología que la observada en los animales del grupo Vac. viva gE- IM., que coincide con lo descrito. Las diferencias detectadas entre las vías de inoculación son consistentes y reflejan la diferente ruta de

activación del sistema inmune del bovino en respuesta a la vacunación con HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal.

Sin embargo, la sintomatología clínica observada guardó diferencias entre las vías de inoculación. En el día 27 dpv, los bovinos del grupo Vac. viva gE- IN mostraron una menor sintomatología que la observada en los animales del grupo Vac. viva gE- IM. Las diferencias detectadas entre las vías de inoculación son consistentes y reflejan la diferente ruta de activación del sistema inmune del bovino en respuesta a la vacunación con HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal. Sin embargo, ambos grupos de bovinos vacunados resultaron fuertemente protegidos frente al desafío con HVB-1 salvaje. Por lo que se concluye que ambas rutas de inmunización son efectivas. La selección de la vía de inoculación deberá hacerse en base a otros parámetros como pueden ser la nula probabilidad de generar latencia en bovinos observada para las vacunas vivas  $\Delta$ gE administradas por vía IM (Mars, 1999), o la temprana respuesta inmune mucosal inducida por este tipo de vacunas cuando se las inocula por vía IN (Kaashoek, 1996).

El Herpesvirus bovino tipo 1 permanece latente en bovinos después de infecciones o de la inoculación de vacunas vivas (Netleton, 1980; Pastoret, 1980). Sin embargo, en trabajos donde se analizó la capacidad de reactivación de cepas de HVB-1 gE deleteadas no fue posible detectar excreción viral subsiguiente a la inmunosupresión con corticoides de diferentes calidades (Kaashoek, 1994; Bosch, 1997; Mars, 2000) lo que sugirió una muy baja probabilidad de dispersión de la cepa dentro de la población bovina. Posiblemente, exista una relación entre la capacidad invasiva de HVB-1 gE- y la edad del bovino inoculado. Strube (1996) describió excreción viral en terneros que habían sido inmunizados por vía intramuscular a las 2 semanas de vida; mientras que no se pudo detectar excreción viral en secreciones nasales de bovinos inmunizados por vía intramuscular, a la edad de 3 meses. Asimismo, debido a que las cepas gE negativas mayoritariamente se dispersan entrando a la célula hospedadora a través de la vía extracelular de infección, resultan vulnerables a las acciones del sistema inmune.

Considerando que la cepa desarrollada en nuestro laboratorio no fue excretada en secreciones nasales cuando se la administró como vacuna atenuada, se asume una fuerte reducción de su virulencia en el hospedador natural, aunque resta para el futuro realizar un estudio de la capacidad de establecer latencia en el bovino y compararla tanto con la cepa parental como con cepas de HVB-1 con diferentes deleciones.

Todos los animales vacunados con la cepa atenuada mostraron un menor período de excreción viral en el período post-desafío, y los títulos de virus en secreciones nasales fueron significativamente menores a los observados en los bovinos no vacunados.

Por otra parte, como se observó en los bovinos del grupo control, la infección generada por el virus de desafío, causó la enfermedad de grado severo y todos los bovinos excretaron altos títulos de virus durante 14 días. La cepa HVB-1 LA parental fue muy inmunogénica durante la infección de desafío.

La delección de la glicoproteína E en la cepa HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal permitió la diferenciación de animales vacunados de infectados. La carencia de gE en la partícula viral de la vacuna constituye una herramienta de gran utilidad en cuanto al diagnóstico. A través de esta diferencia con la cepa parental se analizó la presencia de anticuerpos específicos contra gE en sueros de animales vacunados con la vacuna marcadora y se verificó la seroconversión de los bovinos luego de la infección en el desafío viral.

En síntesis, las características descriptas para la cepa  $\Delta$ gE $\beta$ gal la convierten en una especial herramienta eficiente y segura que la instalan como una buena candidata para su utilización como vacuna marcadora atenuada.

La cepa recombinante HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal fue altamente inmunogénica, especialmente con respecto a la reducción de la excreción de virus de desafío. Asimismo, la cepa mutante de delección desarrollada no posee ningún grado de virulencia residual, como se evidenció a través del mantenimiento en valores normales del parámetro de la temperatura y la inexistencia de excreción de virus vacunal. Esto sugiere que por medio de la delección de la región codificante de gE completa, podrían haberse afectado otras funciones virales que redujeron la capacidad de multiplicación en el hospedador natural.

La remoción del gen completo de la gE, implica la desaparición de todos los epítopes que podrían inducir una respuesta de anticuerpos contra gE; junto con la delección del marco abierto de lectura completo de gE y la incorporación de un gen foráneo ( $\beta$ gal) hacen que el riesgo de reversión a un fenotipo gE-positivo que resultara en una reversión a la virulencia se encuentre disminuido al mínimo.

Según lo descripto por Knapp (1997 a) para una cepa de PRV recombinante y portadora de los genes gE y gI de HVB-1, el complejo formado por gE y gI tiene un

efecto directo sobre la dispersión entre células del virus. *In vivo*, gE y gI actúan en diferentes estadios del ciclo viral para promover la dispersión viral tanto a la superficie mucosal así como luego de la reactivación a partir de neuronas sensitivas de ganglios bipolares. A nivel de la superficie mucosal, la infección viral resulta en una dispersión localizada en células epiteliales y vecinas, promovidas en parte por gE y gI. A pesar de que la infección y el establecimiento de latencia en ganglios sensoriales son independientes de la expresión de gE y gI (Engelenburg, 1995), gE y gI podrían promover selectivamente la dispersión anterógrada de regreso a la superficie mucosal o bien una dispersión al sistema nervioso central, durante la reactivación (Whealy, 1993). De alguna manera, la delección realizada en gE generó un fenotipo con una fuerte atenuación detectable *in vivo*, en el bovino. Este grado de atenuación podría estar dado *per se* por la delección del marco de lectura de gE completo.

La vacuna viva fue eficaz en lo referente a inmunogenicidad, en las tres formas de aplicación probadas; y fue fuertemente protectora cuando las vías de administración fueron intranasal e intramuscular. Ya que la protección lograda con la administración por vía intramuscular fue tan buena como la lograda por vía intranasal, resulta la opción más conveniente en términos de practicidad en cuanto al manejo en el campo con este tipo de vacunas.

Es posible establecer una comparación entre las experiencias en las que se evaluó la capacidad inmunogénica de la cepa HVB-1 $\Delta$ gE inactivada y la vacuna viva. De ello se desprende que la cepa recombinante se comporta como buen inmunógeno marcador (Kaashoek, 1995). Este tipo de vacuna permite la diferenciación entre animales vacunados de infectados y constituye un buen inductor de la respuesta inmune específica y protectora frente a la infección con el virus HVB-1.

Al analizar la presencia de anticuerpos maternos en terneros hijos de madres vacunadas con la vacuna inactivada HVB-1, se verificó la presencia de niveles variables de anticuerpos maternos entre individuos, y se definió la vida media de los anticuerpos maternos en 111 días. Se observó que altos niveles de anticuerpos maternos ejercen una fuerte actividad interferente en el desarrollo de la respuesta inmune específica inducida por las vacunas viva e inactivada HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal en terneros vacunados a los 3 meses de edad. Contrariamente, no se observó dicho efecto en los bovinos negativos o con bajos niveles de anticuerpos al momento de la vacunación, que fueron capaces de

montar una respuesta humoral de niveles equivalentes a los detectados en bovinos adultos vacunados. Independientemente de la vacuna empleada, la revacunación a los 60dpv (5 meses de edad) (**Grupos II y III**) provocó un aumento de los niveles de anticuerpos que se registró en los bovinos independientemente de los niveles de anticuerpos que tuvieron al inicio de la experiencia, sin embargo esta respuesta no se sostuvo en el tiempo. Por otro lado, con la vacuna inactivada los niveles inducidos fueron notablemente mayores que con la vacuna viva, que a los 160dpv se igualaron a los detectados en el **Grupo I**, que no fue revacunado. Por lo que la revacunación a los 60dpv (5 meses de edad) no fue efectiva en cuanto al desarrollo de una respuesta inmune sostenida. Por lo que se concluye que a los 5 meses de edad el efecto interferente de los anticuerpos maternos disminuyó sensible pero no totalmente. Este efecto probablemente sea debido a que el ternero ya se encuentra secretando sus propias inmunoglobulinas. Esto podría ser corroborado mediante la evaluación del perfil de isotipos en el suero.

Cuando se analizó la respuesta humoral de los bovinos vacunados a los 8 meses de edad, momento en el que los niveles de anticuerpos maternos no se detectaban, ya no se observó el efecto de interferencia y la respuesta se mantuvo a lo largo de 130 días posteriores a la vacunación. Llamativamente, los bovinos que habían sido vacunados a los 3 meses de edad (**Vac. 3 m**) mostraron niveles sostenidos de anticuerpos a lo largo de casi 10 meses, efecto que sería de interés verificar con un número mayor de animales. En el caso de los bovinos revacunados a los 8 meses que habían sido vacunados a los 3 meses de edad (**grupo Vac. 3 y 8 m**), se detectó un aumento de los niveles de anticuerpos que se mantuvieron durante 130 días posteriores a la vacunación. Por lo que la revacunación a los 8 meses de edad resultó una efectiva herramienta para obtener una respuesta humoral alta y sostenida. Este efecto se debería a la ausencia de anticuerpos maternos circulantes y sería un fuerte indicio de la conveniencia de practicar la revacunación una vez que los anticuerpos calostrales circulantes alcanzan niveles bajos, en los bovinos jóvenes.

De manera similar a lo descrito para vacunas contra el virus de la Fiebre Aftosa (VFA), los anticuerpos maternos interfieren con el desarrollo de una respuesta inmune específica, y a pesar de esta interferencia, el sistema inmune de los bovinos jóvenes resulta primado por la vacunación (Sadir, 1988). Es importante destacar que la



vacunación a los 3 meses de vida actúa primando al sistema inmune del individuo pese al elevado nivel de anticuerpos pasivos, de manera tal que al recibir una segunda inmunización a los 5 meses o a los 8 meses de edad, ésta resulta en un aumento evidente de los niveles de anticuerpos. Evidentemente, los niveles de anticuerpos maternos al momento de la revacunación tienen un fuerte efecto modulador en el tipo de respuesta generada por medio de las revacunaciones mencionadas. En el caso de la revacunación a los 8 meses de edad la vacuna provocó un aumento de los niveles de anticuerpos que se mantuvieron durante 150 dpv, mientras que la revacunación a los 5 meses de edad provocó un aumento de los niveles que volvieron a descender transcurridos 160dpv. Así, se sugiere como tiempo de revacunación, los 160 días posteriores a la vacunación en terneros con altos niveles de anticuerpos pasivos al momento de la vacunación.

Contrariamente a lo descrito por Bradshaw (1996) se detectó una respuesta inmune activa en bovinos jóvenes infectados con Herpesvirus bovino. De esta manera se comprobó la inducción de la respuesta inmune humoral en bovinos jóvenes mediante la inmunización por la vía subcutánea con HVB-1ΔgEβgal y una dosis menor a la utilizada en el experimento de desafío. A pesar de que la respuesta humoral obtenida fue similar a la detectada en la primera experiencia, no es posible extrapolar este resultado a niveles de protección, por lo que se encuentra en marcha la prueba de protección de la vacuna administrada en estas condiciones. Asimismo, Lemaire (1995) demostró el establecimiento de latencia luego de una infección con HVB-1, en bovinos jóvenes, a pesar de la presencia de niveles detectables de anticuerpos maternos. Sería de interés el análisis de la capacidad de establecer latencia de la cepa HVB-1ΔgEβgal en bovinos jóvenes pasivamente inmunizados.

Cuando bovinos jóvenes fueron pasivamente inmunizados con anticuerpos monoclonales que poseían actividad neutralizante detectada *in vitro*, no fueron protegidos contra la infección ni contra la excreción viral (Marshall, 1988). Sin embargo, cuando los bovinos que poseían niveles de anticuerpos maternos detectables, fueron infectados con virus HVB-1 resultaron protegidos contra la infección viral (Belknap, 1994). Probablemente, esta característica protectora de los anticuerpos fue dada por otra actividad no neutralizante, que podría ser la mediadora de ADCC descrita por Babiuk (1996). Para probar el efecto que tiene la vacunación temprana frente a la capacidad protectora de los anticuerpos maternos observados en el presente

ensayo, sería necesario enfrentar animales jóvenes vacunados y no vacunados con el virus HVB-1 en una experiencia de desafío.

La utilidad de las vacunas atenuadas se basa en que el virus multiplica en el individuo vacunado pero en un nivel menor, por lo que se logra que la vía de inducción del sistema inmune sea la misma que la observada durante la infección con el virus salvaje, obteniendo así una respuesta inmune sostenida en el tiempo y capaz de reconocer con mayor precisión al microorganismo de interés. En el caso del HVB-1, durante el ciclo de infección viral en el hospedador natural, el virus hace un primer ciclo de multiplicación en epitelio mucosal y luego viaja por axones, a ganglio nervioso donde establecerá latencia. Sin embargo, la respuesta que se observa con la administración de la vacuna viva por las diferentes vías es sostenida en el tiempo y de una calidad asimilable a la vacuna inactivada que libera el antígeno lentamente. O sea que cabe pensar que, o bien el antígeno se presenta al sistema inmune de una manera más eficiente a partir de la primera etapa de la infección (Wigdorovitz, 1998), o bien se produce una multiplicación viral sostenida y de magnitudes suficientes como para mantener una respuesta inmune a largo plazo. Proponemos que la administración de virus vivo produce un procesamiento del antígeno a partir de células infectadas, que hace más sostenida la inducción de la respuesta. A través de los ensayos de patogenicidad viral que se encuentran en marcha, se identificarán los órganos donde el virus HVB-1 $\Delta$ gE infecta, y esos resultados ayudarán a esclarecer el análisis de la respuesta inmune a nivel de presentación.

Otra de las ventajas a destacar de la vacuna viva desarrollada en este trabajo es su fácil elaboración y manipulación, que implica la simple infección de monocapas de células MDBK, la clarificación del sobrenadante de cultivo una vez cumplidas las 16 horas de infección, y su envasado de manera de facilitar la manipulación en el campo. El transporte y almacenamiento de la vacuna sólo requiere de una heladera de 4°C o hielo. Debido a que la vacuna es el sobrenadante de cultivo, resulta una vacuna fluida y de fácil aplicación que no genera efectos adversos en el animal, como los frecuentemente descriptos para vacunas inactivadas de formulación oleosa.

Asimismo, la carencia de procesamiento de producto abarata los costos una vez obtenida la cepa viral recombinante, lo que permitiría una rápida recuperación de la inversión.

## VII. CONCLUSIONES

**La cepa HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal desarrollada no expresa la glicoproteína E de manera estable, y expresa la enzima  $\beta$ galactosidasa.**

**La nueva cepa se multiplica en condiciones de cultivo de tejido a niveles similares a los observados para HVB-1 parental.**

**La cepa HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal administrada en bovinos como vacuna inactivada o atenuada, induce una respuesta inmune marcadora y protectora.**

**La cepa HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal administrada en bovinos como vacuna atenuada, es un inmunógeno seguro que no se transmite por contacto, no genera abortos, ni se excreta a niveles detectables en mucosa nasal.**

**Si bien, los anticuerpos calostrales ejercen interferencia sobre el desarrollo de una respuesta inmune específica contra HVB-1, la vacuna atenuada HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal puede generar una alta respuesta inmune humoral cuando es administrada a terneros de 3 meses de edad, con anticuerpos calostrales circulantes, y se los revacuna a los 8 meses de edad.**

**Finalmente, la cepa HVB-1 $\Delta$ gE $\beta$ gal constituye una herramienta práctica y segura al momento de diseñar nuevas vacunas contra HVB-1, que resulta eficiente en la inducción de la respuesta inmune protectora en bovinos, tanto en la forma de antígeno inactivado, como atenuado.**



## VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Abdelmagid, O. Y., Mansour, M. M., Minocha, H. C., and van Drunen Littel-van den Hurk, S. *Evaluation of baculovirus-expressed bovine herpesvirus-1 (BHV-1) glycoproteins for detection and analysis of BHV-1-specific antibody responses.* Vet. Microbiol. (1998) 61(4), 249-59.
2. Ackerman M., Peterhans E., Wyler R.- *DNA of bovine herpes virus type I in the trigeminal ganglia of latently infected calves.* Am. J. Vet. Res.(1982) 43: 36-40.
3. Alconada A., Bauer U., Hoflack B.- *A tyrosine-based motif and a casein kinase II fosforilation site regulate the intracellular trafficking of the varicella-zoster virus glycoprotein I, a protein localized in the trans-Golgi network.* EMBO J. (1996) 15: 6096-6110.
4. Alegre, M., Nanni, M., and Fondevila, N.- *Development of a multiplex polymerase chain reaction for the differentiation of bovine herpesvirus-1 and -5.* J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health (2001). 48(8), 613-21.
5. Andino R.H., Torres H.N., Polacino P.S., Schudel A. A., Palma E.L.- *Detection of bovine herpesvirus-1 nucleic acid sequences using a dot-blot hybridization procedure.* Am. J. Vet. Res. (1987) 48: 984 -987.
6. Babiuk L.A., Bielefeldt Ohamnn H., Gifford H., Czarnieki H.W., Scialli V.T., and Hamilton E.B.- *Effect of bovine alpha 1 interferon on bovine herpesvirus type 1 induced respiratory disease.* J. Gen. Virol. (1985) 66:2383-2394.
7. Babiuk L.A., Italien J.L., van Drunen Littel-van den Hurk S., Zamb T., Lawman M.P.J., Hughes G., and Gifford G.A.- *Protection of cattle from bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) infection by immunization with individual glycoproteins.* Virology (1987) 159: 57-66.
8. Babiuk, L. A., van Drunen Littel-van den Hurk, S., and Tikoo, S. K. - *Immunology of bovine herpesvirus 1 infection.* Vet. Microbiol. (1996) 53(1-2), 31-42.
9. Bahnemann HG. - *Binary ethylenimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production.* Arch. Virol. (1975) 47(1):47-56.

10. Belknap E., Collins J.K., Ayers V.K., Schultheiss P.C.- *Experimental infection of neonatal calves with neurovirulent bovine herpesvirus type 1.3*. Vet. Pathol. (1994) 31: 358-365.
11. Belknap E., Walters L.M., Kelling C., Ayers V.K., Norris J., McMillen J., Hayhow C., Cochran M., Reddy D.N., Wright J., and Collins J.K.- *Immunogenicity and protective efficacy of a gE, gG, and US2 gene-deleted bovine herpesvirus-1 (BHV-1) vaccine*. Vaccine (1999) 17: 2297-2305.
12. Bielefeldt Ohamn H., Glichrist J.E., and Babiuk L.A. - *Effect of recombinant alpha 1 interferon (BoIFN-alpha1) on interaction between bovine alveolar macrophages and bovine herpesvirus -1*. J.Gen.Virol. (1984) 65:1487-1495.
13. Bosch J.C., Kaashoek M.J., van Oirschot J.T. - *Inactivated bovine herpesvirus 1 marker vaccines are more efficacious in reducing virus excretion after reactivation than a live marker vaccine*. Vaccine (1997) 15, 14: 1512-1517.
14. Bosch JC, De Jong MC, Franken P, Frankena K, Hage JJ, Kaashoek MJ, Maris-Veldhuis MA, Noordhuizen JP, Van der Poel WH, Verhoeff J, Weerdmeester K, Zimmer GM, Van Oirschot JT. *An inactivated gE-negative marker vaccine and an experimental gD-subunit vaccine reduce the incidence of bovine herpesvirus 1 infections in the field*. Vaccine (1998) Jan-Feb;16(2-3):265-71.
15. Bradshaw B.J. and Edwards S.- *Antibody isotype responses to experimental infection with bovine herpesvirus 1 in calves with colostrally derived antibody*. Vet. Microbiol. (1996) 53: 143-151.
16. Bradshaw B.J.F., Edwards S.- *Antibody isotype responses to experimental infection with bovine herpesvirus 1 in calves with colostrally derived antibody*. Vet. Microbiol. (1996) 53: 143-151.
17. Bratanich A.C., Jones C.J.-*Localization of the cis-acting sequences in the latency related promoter of bovine herpesvirus 1 which are regulated by memorial cell type factors and immediate -early gene*. J.Virol. (1992) 66: 6099-6106.
18. Bratanich A.C., Sardi S.I., Smitsaart E.N., Schudel A.A.- *Comparative studies of BHV-1 variants by in vivo-in vitro tests*- J. Vet. Med. B. (1991) 38:41-48.
19. Brun A., Dauvergne M., Languet B., Reynaud G.- *Studies of an inactivated vaccine prepared from viral subunits against infectious bovine rhinotracheitis virus*. Med. Vet (1988) 5: 583-586.

20. Bryan, L. A., Fenton, R. A., Misra, V., and Haines, D. M.- *Fatal, generalized bovine herpesvirus type-1 infection associated with a modified-live infectious bovine rhinotracheitis parainfluenza-3 vaccine administered to neonatal calves.* Can. Vet. J. (1994) 35(4), 223-8.
21. Butler J.E.- *Immunoglobulin diversity, B-cell and antibody repertoire development in large farm animals.* Rev. Sci. Tech. (1998) 17:43-70.
22. Butler, J. E. *Immunoglobulin diversity, B-cell and antibody repertoire development in large farm animals.* Rev. Sci. Tech. (1998) 17(1), 43-70.
23. Campos, M., Ohmann, H. B., Hutchings, D., Rapin, N., Babiuk, L. A., and Lawman, M. J. - *Role of interferon-gamma in inducing cytotoxicity of peripheral blood mononuclear leukocytes to bovine herpesvirus type 1 (BHV-1)-infected cells.* Cell Immunol. (1989) 120(1), 259-69.
24. Carrillo B.J., Ambrogi A., Schudel A.A., Vazquez M., Dahme E., and Pospichil A.- *Meningoencephalitis caused by IBR virus in calves in Argentina.* Vet. Med. B. (1983) 30:327-332.
25. Castrucci G., Frigeri F., Ranucci S – *Comparative studies of strains of infectious bovine rhinotracheitis virus isolated from latently infected calves.-* Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. (1984) 7:1-10.
26. Chase C.C.L.- *Resistance and susceptibility of bovine cells expressing herpesviral glycoprotein D homologs to herpesviral infections.* Virology (1993) 194 (1): 365-369.
27. Chowdhury S.I.- *Construction and characterization of an attenuated bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) recombinant virus.* Vet. Microbiol. 52 (1996) 13-23.
28. Chowdhury S.I., Lee B.J., Ozkul A., Weiss M.L.- *Bovine herpesvirus 5 glycoprotein E is important for neuroinvasiveness and neurovirulence in the olfactory pathway of the rabbit.* J.Virol. (2000) 74, 5: 2094-2106.
29. Chowdhury S.I., Ross C.S.D., Lee J.B., Hall V., and Chu H.J.- *Construction and characterization of a glycoprotein E gene-deleted bovine herpesvirus type 1 recombinant.* A.J.V.R. (1999) 60, 2: 227-232.

30. Christensen L.S., Madsen K.G., Nylin B., Ronsholt L.- *A contribution to the systematization on genomic mapping by restriction fragment pattern analysis.* Virus Research (1996), 46:177-182.
31. Collins R.A., Parsons K.R., Bland A.P.- *Antibody containing cells and specialised epithelial cells in the bovine teat.* Res. Vet. Sci. (1986) 41:50-55.
32. Conlon P.D., Ogunbiyi P.O., Perron R.J., Eyre P.- *Effects of infectious bovine rinotracheitis virus infection on bovine airway reactivity.* Can. J. Vet. Res. (1987) 51: 345-349.
33. Cravens R.L.J., Ellsworth M.A., Sorensen C.D., White A.K.- *Efficacy of a temperature- sensitive modified-live bovine herpesvirus type-1 vaccine against abortion and stillbirth in pregnant heifers.* Am. Vet. Med. Assoc.(1996) 208:2031-4
34. Davidson A. J. and Mc Geoch D.J.- *Evolutionary comparisons of the S segments in the genomes of herpes simplex virus type 1 and varicella zoster virus.* J.Gen. Virology (1986) 67:597-611.
35. De Buyscher E.V., Dubois P.R.- *Detection of IgA anti-Escherichia Coli plasma cells in the intestines\ and salivary gland of pigs orally and locally infected with E.Coli.* In: McGhee, J.R., Mestecky J., Babb J. (Eds.) Secretory Immunity and Infection. Adv. Exp. Med. Biol. (1978) 107:593- 600.
36. Del Médico P. - *Evaluación de la inmunidad de mucosas conferida por diferentes vacunas contra herpesvirus bovino 1 mediante un test de ELISA. Rol de IgA e IgG<sub>1</sub> en los mecanismos de protección frente a infecciones con este agente.* Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. (2001). p35.
37. Denis M., Kaashoek M.J., van Oirschot J.T., Pastoret P., and Thiry E. – *Quantitative assessment of the specific CD4<sup>+</sup> T lymphocyte proliferative response in bovine herpesvirus 1 immune herpesvirus cattle.* Vet. Immunol. Immunopathol. (1994) 42: 275-286.
38. Denis M., Saloui M., Keil G. et al - *Identification of different target glycoproteins for bovine herpesvirus 1 specific cytotoxic T lymphocytes depending on the method of in vitro stimulation.* Immunology (1993) 78: 7-13.

39. Derget D., Cho H.J., Kozub G.C.- *A comparative evaluation of two sensitive serum neutralizing tests for bovine herpesvirus -I antibodies.* Can. J. Vet. Res. (1993) 57: 56-59.
40. Dingwell KS, Brunetti CR, Hendricks RL, Tang Q, Tang M, Rainbow AJ, Johnson DC. - *Herpes simplex virus glycoproteins E and I facilitate cell-to-cell spread in vivo and across junctions of cultured cells.* J. Virol. (1994) 68(2):834-45.
41. Edwards S., Woods S.B., Westcott D.G., Emmerson M., Jones P.C., Phillips A.J.- *An evaluation of five serological tests for the detection of antibody to bovine herpesvirus I in vaccinated and experimentally infected cattle.* Res. Vet. Sci. (1986) 41:378-382.
42. Engels M., Ackerman M. – *Pathogenesis of ruminants herpesvirus infections.-* Vet. Microbiol. (1996); 53:3
43. Estes D.M., Closser N.M., and Allen G.K.- *IFN $\gamma$  simulates IgG2 production from bovine B cells costimulated with anti- $\mu$  and mitogen.* Cell Immunol. (1998) 154: 287- 295.
44. Favoreel H.W., Nauwynck H.J., and Pensaert M.B.- *Role of the cytoplasmic tail of gE in antibody-induced redistribution of viral glycoproteins expressed on Pseudorabies-virus infected cells.* Virology (1999) 259: 141-147.
45. Fehler F., Herrmann J.M., Saalmuller A., Mettenleiter T.C., and Keil G.M.- *Glycoprotein IV of bovine herpesvirus I-expressing cell line complements and rescues a conditionally lethal viral mutant.* J. Virol. (1992) 66: 831-839.
46. Fitzpatrick D.R., Babiuk L.A., Zamb T.J.- *Nucleotide sequence of Bovine herpesvirus type I mglycoprotein gIII as a new member of the immunoglobulin superfamily, and implications for the homologous glycoprotein of other herpesvirus.* Virology (1989) 173: 46-57.
47. Fitzpatrick D.R., Redmond M.J., Attah-Poku S.K., van Drunen Littel -van den Hurk S., and Babiuk L.A.- *Mapping of ten epitopes on bovine herpesvirus type-I glycoproteins gI and gIII.* Virology (1990) 176: 145-157.
48. Fitzpatrick J.L., Cripps P.J., Hill A.W., Bland P.W., and Stokes C.R.- *MHC class II expression in the mammary gland.* Vet. Immunol. Immunopathol. (1992) 32:13-23.



49. Florent G., De Marneffe C. - *Enzyme linked immunosorbent assay used to monitor serum antibodies to bovine respiratory disease viruses*. Vet Microbiol. (1986) 11:307-317.
50. Flores E.F., Osorio F.A., Zanella E.L., Kit S., and Kit M.- *Efficacy of a deletion mutant in bovine herpesvirus-1 (BHV-1) vaccine that allows serological differentiation from naturally infected animals*. J. Diagn. Invest. (1993) 5:534 – 540.
51. Fodevila N., Lager I., Sadir A., Carrillo B.J., Villar J., Venzano A., Zurbriggen M., Gonzalez D., Ivancovich J., and Schudel A.A- *Rinotraqueítis infecciosa bovina (HVB-1) III- Prevalencia de anticuerpos en rodeos bovinos del país. Revista de investigaciones agropecuarias*. INTA. Bs.As. Argentina. (1981) Vol XVI, nº 2: 285-289.
52. Frerichs G.N., Woods S.B., Lucas M.H., and Sands J-J.- *Safety and efficacy of live and inactivated infectious bovine rhinotracheitis vaccines*. Vet. Rec. (1982) 111:116-122.
53. Furth, J. J., Whitbeck, J. C., Lawrence, W. C., and Bello, L. J. (1997). *Construction of a viable BHV1 mutant lacking most of the short unique region*. Arch Virol 142(12), 2373-87.
54. George, L. W., Ardans, A., Mihalyi, J., and Guerra, M. R. (1988). *Enhancement of infectious bovine keratoconjunctivitis by modified-live infectious bovine rhinotracheitis virus vaccine*. Am J Vet Res 49(11), 1800-6.
55. Gibbs EPJ, and Rweyemamu M.M.- *Bovine herpesviruses part I*. Vet. Bull. (1977) 47:317-343.
56. Hanon E., Keil G., van Drunen Littel-van den Hurk, Griebel P., Vanderplasschen A., Rijzewijk F.A.M., Babiuk L.A., and Pastoret P.P.- *Bovine herpesvirus 1-induced apoptotic cells death: role of glycoprotein D*. Virology (1999) 257: 191-197.
57. Hanon E., Meyer G., Vanderplasschem A., Dessy-Doize C., Thiry E., Pastoret P.P.- *Attachment but not penetration of bovine herpesvirus 1 is necessary to induce apoptosis in target cells*. J. Virol. (1998) 72: 7638-7641.
58. Hanon, E., Vanderplasschen, A., Lyaku, S., Keil, G., Denis, M., and Pastoret, P. - *Inactivated bovine herpesvirus 1 induces apoptotic cell death of mitogen-*

- stimulated bovine peripheral blood mononuclear cells. J Virol* (1996) 70(6), 4116-20.
59. Hariharan M.J., Nataraj C, and Srikumaran S- *Down regulation of murine MHC class I by bovine herpesvirus 1. Viral Immunol.* (1993) 6: 273-284.
60. Hariharan M.J., Nataraj C., Srikumaran S.- *Down regulation of murine MHC class I expression by bovine herpesvirus 1. Viral Immunol.* (1993) 6:273-284.
61. Homan E.J., Easterdayn B.C.- *Isolation of bovine herpesvirus-1 from trigeminal ganglia of clinically normal cattle. Am. J.Vet. Res.*(1980) 41:1212-1213.
62. Huemer H.P., Larcher C., van Drunen Littel-van den Hurk, and Babiuk- *Species selective interaction of Alphaherpesvirinae with the 'unspecific' immune system of the host. Arch. Virol.* (1993) 130: 353-364.
63. Hughes G.,Babiuk L.A., and van Drunen Littel -van den Hurk S. - *Functional and topographical analysis of epitopes on bovine herpesvirus type 1 glycoprotein gIV. Arch. Virol.* (1988) 103:47-60.
64. Hughes, G., Babiuk, L. A., and van Drunen Littel-van den Hurk, S.- *Functional and topographical analyses of epitopes on bovine herpesvirus type 1 glycoprotein IV. Arch. Virol.* (1988) 103(1-2), 47-60.
65. Jacobs L. – *Glicoproteine E of pseudorabies virus and homologous proteins in other alphaherpesvirinae. Arch. Virol.* (1994) 137: 209-228.
66. Jensen J. and Schultz R.D.- *Bovine natural cell cytotoxicity (NCCM) activation by cytokines. Vet. Immunol. Immunopathol.* (1990) 24:113 129.
67. Johnson D.C., Frame M.C., Ligas M.W., Cross A.M., and Stow N.D. – *Herpes simplex virus immunoglobulin G Fc receptor activity depends on a complex of two viral glycoproteins gE and gI. J.Virol.* (1988) 62:1347-1354.
68. Jones C., Delhon G., Bratanich A., Kutish G., Rock D. – *Analysis of the transcriptional promoter which regulates the latency-related transcript of bovine herpesvirus 1. J.Virol.* (1990) 64:1164-1170.
69. Kaashoek M.J., Moerman A., Madic J., Weerdmeester K., Maris-Veldhuis M., Rijsewijk F.A.M., and van Oirschot J.T.- *An inactivated vaccine based on a glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus type 1 induces protective immunity and allows serological differentiation. Vaccine* (1995) 13:342-346.

70. Kaashoek M.J., Rijsewijk F.A.M., Ruuls R.C., Keil G.M., Thiry E., Pastoret P.P., and van Oirschot J.T.- *Virulence, immunogenicity and reactivation of bovine herpesvirus 1 mutants with a deletion in the g, gG, gI, or gE gene.* Vet. Microbiol. (1996) 139: 416-421.
71. Kaashoek, M. J., Moerman, A., Madic, J., Rijsewijk, F. A., Quak, J., Gielkens, A. L., and van Oirschot, J. T.- *A conventionally attenuated glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus type 1 is an efficacious and safe vaccine.* Vaccine (1994) 12(5), 439-444.
72. Kahrs RF.- *Infectious bovine rhinotracheitis: a review and update.* J. Am. Vet. Med. Assoc. (1977) Nov 15; 171(10):1055-64.
73. Kelling, C. L., Schipper, I. A., Strum, G. E., Carlson, R. B., and Tilton, J. E. (1973). *Infectious bovine rhinotracheitis (IBR) abortion observations on incidence in vaccinated and non-vaccinated and exposed cattle.* Cornell Vet 63(3), 383-9.
74. Kendrick J.W., York C.J., McKercher D.G.- *A control field trial of a vaccine for infectious bovine rhinotracheitis.* Proc.U.S.Livestock San. Assoc. (1956) 60:155-158.
75. Kimman T.G., de Wind N., Oei-Lie N., Pol J.M.A., Berns A.J.M., and Gielkens A.L.J.- *Contribution of single genes within the short unique region of Aujeszky's disease virus (suid herpesvirus type 1) to virulence, pathogenesis and immunogenicity.* J.Gen Virol. (1992) 73: 243-251.
76. Kimman T.G., Pol J.M., de Wind N., Oei-Lie N., Berns A.J., y Gielkens A.L.J.- *Role of different genes in the virulence and pathogenesis of Aujeszky's disease virus.* Vet. Microbiol. (1992) 33:45-52.
77. Knapp A.C., Husak P.J., Enquist L.W.- *The gE and gI from two alphaherpesviruses have conserved and divergent neuroinvasive properties.* J. Virol. (1997 a) 71: 5820-5827.
78. Knapp. A.C., and Enquist L.W.- *Pseudorabies virus recombinants expressing functional virulence determinants gE and gI from bovine herpesvirus 1.1.* J.Virol. (1997 b) 71: 2731-2739.
79. Kohl S., Pickerin L. K., Cleary T.G., Steimetz K.D., Loo L.S.- *Human colostrum cytotoxicity. II. Relative defects in colostrum leukocyte cytotoxicity and inhibition*

- of peripheral blood leucocyte cytotoxicity by colostrum. J. Infect. Dis. (1980) 142: 884-891.*
80. Kost T.A., Jones E.V., Smith K.M., Reed A.P., Brown A.L., and Miller T.J.- *Biological evaluation of glycoproteins mapping to two distinct mRNAs within the BanHI fragment 7 of pseudorabies virus: expression of the coding regions by vaccinia virus. Virology (1989) 171: 365-376.*
81. Kramps J.A., Quak S., Weer Dmeester K., van Oirschot- *Comparative study on sixteen enzyme- linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to bovine herpesvirus 1 in cattle. Vet. Microbiol. (1993) 35: 11-21.*
82. Kudleková M., Kostal M., Cervenakova L., Rajcani J., and Kaerner H.C.- *pathogenicity and latency competence for rabbits of the herpes simplex virus type 1 ANG path gC and gE defective mutants. Acta Virol. (1991)35:438-449.*
83. Kutish G., Mainprize T., Rock D.- *Characterization of the latency-related transcriptionally active region of the bovine herpesvirus 1 genome. J. Virol. (1990) 64: 5730-5737.*
84. Lager I., Fondevila N. Sadir A., Fernández F., and Schudel A.- *Rinotraqueítis infecciosa bovina (HVB-1): aislamiento y caracterización biológica del agente etiológico (L-114). Rev. Med. Vet. (1981) 62 (5): 404 - 410.*
85. Lawman M.J.P., Gifford G., Gyongyossy-Issa M., Dragan R., Heise J., and Babiuk L.A.- *Activity of polymorphonuclear (PMN) leucocytes diseases bovine herpesvirus- 1 induced respiratory disease: Effect of recombinant bovine interferon alpha 1. Antiviral Res. (1987) 8: 225-238.*
86. Lemaire M., Meyer G., Ernst E., Vanherreweghe V., Limbourg B., Pastoret P-P., Thiry E.- *Latent bovine herpesvirus infection in calves protected by colostrum immunity. Vet. Rec. (1995) 137: 70-71.*
87. Lemaire M., Schynts F., Meyer G., Thiry E.- *Antibody response to glycoprotein E after bovine herpesvirus type 1 infection in passively immunised, glycoprotein E-negative calves. Vet.Rec 144:172-176 (1999).*
88. Leung-Tack P, Audonnet JC, Riviere M.- *The complete DNA sequence and the genetic organization of the short unique region (US) of the bovine herpesvirus type 1 (ST strain). Virology. (1994) Mar;199(2):409-21.*

89. Liang X., Babiuk L.A van Drunen-Littel-van den Hurk S., Fitzpatrick D.R., and Zamb T.J.- *J.Virol.* (1991) 65:1124-1132.
90. Liang X., Babiuk L.A. Zamb T.J.- *Mapping of heparin-binding structures on bovine herpesvirus 1 and pseudorabies virus gIII glycoproteins.* (1993) *Virology* 194: 233-243.
91. Liang X., Chow B., and Babiuk L.A.- *Study of immunogenicity and virulence of bovine herpesvirus 1 mutants deficient in the UL49 homolog and dUPTase genes in cattle.* *Vaccine* (1997) 15: 1057.
92. Liang, X., Babiuk, L. A., and Zamb, T. J.- *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* (1992) 189(2), 629-39.
93. Litwin V., Jackson W., and Grose C.- *Receptor properties of two varicellazoster virus glycoproteins, gpI and gpIV, homologous to herpes simplex virus gE and gI.* *J.Virol.* (1992) 66: 3643-3651
94. Lupton HW, Smith MH, Frey ML. - *Identification and characterization of a bovine rhinovirus isolated from Iowa cattle with acute respiratory tract disease.* *Am J Vet Res.* (1980) Jul;41(7):1029-34.
95. Lupton, H. W., and Reed, D. E. (1979). *Experimental infection of eastern cottontail rabbits (*Sylvilagus floridanus*) with infectious bovine rhinotracheitis virus.* *Am J Vet Res* 40(9), 1329-31.
96. Madic J., Magdalena J., Quak J., Van Oirschot J.T.- *Isotype-specific antibody responses in sera and mucosal secretions of calves experimentally infected with bovine herpesvirus 1.* *Vet. Immunol. and Immunopathol.* (1995) 46: 267-283.
97. Madin S.H.- *Isolation of the Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus.* *Science* (1956) 124:721-722.
98. Mars, M. H., de Jong, M. C., and van Oirschot, J. T. - *A gE-negative bovine herpesvirus 1 vaccine strain is not re-excreted nor transmitted in an experimental cattle population after corticosteroid treatments.* *Vaccine* (2000b) 18(19), 1975-81.

99. Mars, M. H., de Jong, M. C., and van Oirschot, J. T. A gE-negative BHV-1 vaccine virus strain cannot perpetuate in cattle populations. *Vaccine* (2000 a) 18 (20), 2120-4.
100. Marshall R.L., and Letchworth G.J.- *Passively administered neutralizing monoclonal antibodies do not protect calves against bovine herpesvirus 1 infection*. *Vaccine* (1988) 6: 343-348.
101. Mauri D.N., Ebner R., Montgomery R.I., Kochel K.D., Cheung T.C., Yu G.L., Ruben S., Eisenberg R.J., Cohen G.H., Spear P.G., and Ware C.F.- *LIGHT a new member of the TNF superfamily, and lymphotoxin alpha are ligands for herpesvirus entry mediator*. *Immunology* (1998) 8: 21-30.
102. Mayfield J.E., Good P.J., Vanoort H.J., Campbell A.R., Reed D.E.- *Cloning and cleavage site mapping of DNA from bovine herpesvirus 1 (Cooper strain)*. *J.Virol.* (1983), 47: 259- 264
103. Mengeling W.L., Brockmeier S.L., Lager K.M.- *The role of biotechnologically engineered vaccines and diagnostics in pseudorabies (Aujeszky's disease) eradication strategies*. *Vet. Microbiol.* (1997) 55:49-60.
104. Mezler A.E., Matile H., Gassmann U., Engels M., Wyler E.- *European isolates of bovine herpesvirus 1: a comparison of restriction endonuclease sites, polipeptides and reactivity with monoclonal antibodies*. (1985) *Arch. Virol* 85:57-69.
105. Miller-Edge M., Splitter G. - *Patterns of bovine T-cell mediated immune response to bovine herpesvirus 1*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* (1986) 13:301-319.
106. Misra P.K., Mishra A.- *Infectious bovine rhinotracheitis infection and infertility in cows, heifers and bulls*. *Indian J. Anim. Sci.* (1987), 57:267-271.
107. Misra V., Babiuk L.A., Darcel C.Q.- *Analysis of bovine herpesvirus type 1 isolates by restriction endonuclease fingerprinting*. *Arch. Virol.* (1983) 76:341-354.
108. Misra V., Blumenthal R.M., Babiuk L.A. - *Proteins Specified by bovine herpesvirus 1 (infectious bovine rhinotracheitis virus)*. *J.Virol.* (1981) 40 (2): 367-378.

109. Moynagh J.- *Aujeszky's disease and European community*. Vet. Microbiol., (1997) 55:159-166.
110. Narita M., Inui S., Murakami Y., Nanba K., and Shimizu Y.- *Pathological changes in young and adult cattle after intranasal inoculation with infectious rhinotracheitis virus*. J. Comp. Path. (1982) 92:41-49.
111. Narita M., Inui S., Nanba K., and Shimizu Y.- *Recrudescence of infectious bovine rhinotracheitis virus and associated neural changes in calves treated with dexametasone*. Am. J. Vet. Res. (1981) 42:1192-1197.
112. Nettleton P.F., and Sharp J.M.- *Infectious bovine rhinotracheitis virus excretion after vaccination*. Vet. Rec. (1980) 107: 379
113. Ohman L, Magnusson KE, Stendahl O. - *Mannose-specific and hydrophobic interaction between Escherichia coli and polymorphonuclear leukocytes--influence of bacterial culture period*. Acta. Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. [B]. 1985 Apr;93(2):125-31.
114. Okazaki K., Honda E., Minetoma T., and Kumagai T. Arch. Virol. (1987) 97: 297-307.
115. Palmer L.D., Leary T.P., Wilson D.M., and Splitter G.A.- *Bovine natural killer-like cell responses against cell line expressing recombinant bovine herpesvirus type 1 glycoproteins*. J. Immunol. (1990) 145 (3): 1009-1014.
116. Parsonson I.M., Snowdon W.A. - *The effect to natural and artificial breeding using bulls infected with, or semen contaminated with, infectious bovine rhinotracheitis virus*. Aust. Vet. J. (1975) 51: 365-369.
117. Pastoret P.P., Babiuk L.A., Misra V., and Griebel P.- *Reactivation of temperature-sensitive and of temperature-sensitive infectious bovine rhinotracheitis vaccine virus with dexametasone*. Infect. Immunol. (1980) 483-488.
118. Porter P., Chidlow J.W. - *Response to E.Coli antigens via local and parenteral routes linking intestinal and mammary immune mechanisms in passive protection against neonatal Colibacillosis in the pig*. In: Ogra P.L., Dayton D. (Eds.) Immunology of Breast Milk. Raven Press, New York, (1979) pp. 73-80.

119. Puntel M., Fondevila N.A., Viera J.B., O'Donnell V.K., Marcovecchio J.F., Carrillo. B.J., Schudel A.A. - *Serological survey of viral antibodies in llamas (Lama glama) in Argentina*. Journal of Veterinary Medicine B (2000), 46 (3):157-61.
120. Quattrocchi V.- Estudio de la cinética de crecimiento de una cepa genéticamente modificada de Herpesvirus Bovino tipo 1. Comparación con la cinética del Herpesvirus Salvaje. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. (2001) p 25.
121. Rajcani J., Herget U., and Kaerner H.C.- *Spread of herpes simplex virus (HSV) strains SC16, ANG, ANG path and its GlyC minus and GlyE minus mutants in DBA-2 mice*. Acta Virol. (1990 a) 34: 305-320.
122. Rajcani J., Herget U., Kostal M., and Kaerner H.C.- *Latency competence of herpes simplex virus strains ANG, ANG path and its gC and gE minus mutants*. Acta Virol (1990 b) 34:477-486.
123. Rebordosa X., Piñol J., Pérez-Pons J.A., Lloberas J., Naval J, Espuña E., Querol E.- *Mapping cloning and sequencing of a glycoprotein encoding gene from Bovine Herpesvirus type 1 homologous to the gE from HSV-1*. Gene (1994) 149: 203-209.
124. Rebordosa X., Piñol J., Pérez-Pons J.A., Lloberas J., Naval J., Serra-Hartman X., Espuña E., Querol E.- *Glycoprotein E of bovine herpesvirus type 1 is involved in virus transmission by direct cell-to-cell spread*. Virus Res. (1996) 45: 59-68.
125. Rivera H., Madewell B.R., Ameghino E. - *Serologic survey of viral antibodies in the peruvian alpaca (Lama pacos)*. Am. J. Vet. Res., Vol. 48, No.2 (1987).
126. Roizman B.- *The family herpesviridae: update*. (1992) Arch. Virol. 23: 425-449.
127. Romera A.S., Hilgers L.A., Puntel M., Zamorano P.I., Alcon V., Dus Santos M.J., Blanco Viera J., Borca M.V., and Sadir A.M.- *Adjuvant effects of sulfolipo-cyclodextrin in a squalane-in-water and water-in-mineral oil emulsions for BHV-1 vaccines in cattle*. Vaccine (2001) 19:132-141.
128. Rook G.A.W., Hernandez-Pando R., Lightman S.L.- *Immunol. Today (1994) 15: 301*.



129. Rouse B.T. and Babiuk L.A.- *The direct antiviral cytotoxicity by bovine lymphocytes is not restricted by genetic incompatibility of lymphocytes and target cells.* J. Immunol. (1977) 118:618-624.
130. Rusvai M., Fodor L.- *Occurrence of some viruses and bacteria involved in respiratory diseases in Hungary.* Acta Vet. Hung. (1998) 46: 405-414.
131. Rutten V.P.G., Wentink G.H., de Jong W.A.C., van Exsel A.C.A., and Hensen E.J.- *Determination of HVB-1 specific immune reactivity in naturally infected and vaccinated animals by lymphocyte proliferation assays.* Vet. Immunol. Immunopathol. (1990) 25: 259-267.
132. Sadir AM, Schudel AA, Laporte O, Braun M, Margni RA. - *Response to foot-and-mouth disease vaccines in newborn calves. Influence of age, colostral antibodies and adjuvants.* Epidemiol Infect. 1988 Feb;100(1):135-44.
133. Salmon H.- *Immunity in the fetus and the newborn infant: a swine model.* Repr. Nutr. Dev. (1984) 24, 197-206.
134. Sambrook J., Fritsch E., and Maniatis T.-*Molecular cloning A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratories. Cold Spring Harbor. N Y. (1989).
135. Schudel A.A., Carrillo B.J., Wyler R, and Metzler A.E.- *Infections of calves with antigenic variants of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurological disease.* J. Vet. Med. B (1986) 33: 303-310.
136. Sharrock C.E.M., Kaminski E, and Mans S.- *Limiting dilution analysis of human T cells: a useful clinical tool.* Immunol. Today (1990) 11:281-286.
137. Shaw A.M., Braun L., Frew T., Hurley D.J., Rowland R., and Chase C. *A role for Bovine herpesvirus 1 (BHV-1) glycoprotein E (gE) tyrosine phosphorylation in replication of BHV-1 wild type virus but not BHV-1gE deletion mutant virus.* Virology (2000) 268: 159- 166.
138. Sheldrake R.F. and Husband A.J.- *Immune defences at mucosal surfaces in ruminants.* J. Dairy Res. (1985) 52: 599-613.
139. Smith, M. W., Miller, R. B., Svoboda, I., and Lawson, K. F. - *Efficacy of an intranasal infectious bovine rhinotracheitis vaccine for the prevention of abortion in cattle.* Can Vet J (1978) 19(3), 63-71.

140. Stegeman A, de Jong MC, van Nes A, Bouma A.- *Dynamics of pseudorabies virus infections in vaccinated pig populations: a review*. Vet Q. (1997) Sep;19(3):117-22.
141. Strube W., Auer S., Block W, and - *A gE deleted infectious bovine rhinotracheitis marker vaccine for use in improved bovine herpesvirus 1 control programs*. Vet. Microbiol. (1996) 53: 181-189.
142. Strudert M.J.- *Bovine herpesvirus*. Encyclopedia of virology. Edit by R.G. Webster and A. Granoff (Academic Press) Great Britain, (1994) Vol 1: 155-158.
143. Suarez Heinlein A., Metzler A.E., Weiblen R., Berrios P, Schudel A.A., Rodriguez M- *Molecular characterization of South American herpesvirus-1 isolates with monoclonal antibodies and SDS-PAGE*. J.Vet.Med.B (1993) 40:125-130.
144. Talens L.T. J.Beckenhauer W.H., Thuber E.T. - *Efficacy of viral components of a nonabortigenic combination vaccine for prevention of respiratory and reproductive system diseases in cattle*. Am. Vet. Med. Assoc (1989) 194: 1273-80.
145. Tanyi J, Varga J. *Guidelines for the eradication of infectious bovine rhinotracheitis in Hungary*. Acta Vet Hung. (1992) 40(3):165-9
146. Tanyi J., Varga J.- *Guidelines for the eradication of bovine rhinotracheitis in Hungary*. Acta Vet. Hung. (1992) 40: 165-169.
147. Thiry, E., Brochier, B., Saliki, J., Pirak, M., and Pastoret, P. P.- *Excretion and reexcretion of thermosensitive and wild-type strains of infectious bovine rhinotracheitis virus after co-infection or two successive infections*. Vet Microbiol (1985) 10(4), 371-80.
148. Tikoo SK, Campos M, Babiuk LA.- *Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): biology, pathogenesis, and control*. Adv Virus Res. 1995;45:191-223.
149. Turin L., Russo S., Poli G.- *BHV-1: new molecular approaches to control a common and widespread infection*. Molecular Medicine (1999) 5: 261-284.
150. van der Maaten, M. J., Miller, J. M., and Whetstone, C. A. *Ovarian lesions induced in heifers by intravenous inoculation with modified-live*

- infectious bovine rhinotracheitis virus on the day after breeding. *Am J Vet Res* (1985) 46(9), 1996-9.
151. van Donkersgoed J, and Babiuk L.A.- *Diagnosis and managing the respiratory form of infectious bovine rhinotracheitis*. *Vet, Med.* (1991) 86: 86
152. van Drunen Littel -van den Hurk S., van den Hurk J.V., and Babiuk L.A.- *Topographical analysis of bovine herpesvirus-1 glycoproteins: use of monoclonal antibodies to identify and characterize functional epitopes*. *Virology* (1985)144:216-227.
153. van Drunen Littel-van den Hurk S., Tikoo S.K., Liang X., and Babiuk L.A.- *Bovine herpesvirus-1 vaccines*. *Immunol. Cell. Biol.* (1993) 71(Pt5): 405-420.
154. van Engelenburg F.A.C., Kaashoek M.J., Rijsewijk F.A. M., van den Burg L., Moerman A., Gielkens A.L.J., and van Oirschot J.T.- *A glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus 1 is avirulent in calves*. *J. Gen. Virol.* (1994) 75: 2311- 2318.
155. van Engelenburg F.A.C., Kaashoek M.J., van Oirschot J.T., and Rijsewijk F.A.M.- *A glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus 1 infects the same limited number of tissues in calves as wild-type virus, but for a shorter period*. *J.Gen.Virol.* (1995) 76:2387-2392.
156. van Oirschot- *Bovine herpesvirus in semen of bulls and the risk of transmission: a brief review*. *Vet.Q.* (1995) 17: 29-33.
157. van Oirschot J. T. – *The BVH-1 situation in Europe*. Simposio Internacional sobre herpes virus bovino (tipo 1 y 5) e Virus da Diarrea Viral (BVDV).(1998) Santa Maria, R. S., Brasil.
158. van Oirschot J. T.- *Diva vaccines that reduce virus transmission*. *J Biotechnol* (1999) 73(2-3), 195-205.
159. van Oirschot J.T., Kaashoek M.J., Rijsewijk F.A.M.- *Advances in the development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines*. *Vet. Microbiol.* (1996) 53: 43-54.
160. Vannier P., Vedean F., and Allermeersch C.- *Eradication and control programmes against Aujeszky's disease (pseudorabies) in France*. *Vet. Microbiol.* (1997) 55:167-173.

161. Vilcek S., Nettleton P.F., Herring J. A., Herring A.J - *Rapid detection of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) using the polimerase chain reaction using primers in the thymidine kinase region*. Am. J. Vet. Res. (1993) 42: 53-64.
162. Watson D.L. - *Immunological functions of the mammary gland and its secretion: comparative review*. Aus. J. Bio. Sci. (1980) 33:403-422.
163. Weisz-Carrington P., Roux M.E., Mc Williams M., Philips-Quagliata J.M., Lamm M.E.- *Binding and uptake of immunoglobulins by mouse mammary gland epithelial cells in hormone-treated cultures*. J. Reprod. Immunol. (1979) 6:63-75.
164. Weisz-Carrington, P., Emancipator, S., and Lamm, M. E.- *Binding and uptake of immunoglobulins by mouse mammary gland epithelial cells in hormone-treated cultures*. J. Reprod. Immunol. (1984) 6(2), 63-75.
165. Wentink G.H., Rutten P., van Exsel A.C.A., de Jong W.A.C., Vleugel H., and Hensen E.J.- *Failure of an in vitro lymphoproliferative assay to detect immunized or latently infected animals*. Vet. Q. (1990) 12:175-182.
166. Whealy M.E., Card J.P., Robbins A.K., Dubin J.R., Rziha H., Enquist L.W.- *Specific pseudorabies virus infection of the rat visual system requires both gE and gp63 glycoproteins*. J. Virol. (1993) 67:3786-3797.
167. Whetstone C., Miller J., Bortner D., and van der Maaten M.J.- *Changes in the restriction endonuclease patterns of four modified-live onfectious bovine rhinotracheitis virus (IBRV) vaccines after one passage in host animal*. Vaccine (1989) 7: 527-532.
168. Whetstone C., Wheeler J.G., and Reed D.E.- *Investigation of possible vaccines induced epizootics of infectious rhinotracheitis, using restriction endonuclease analysis of viral DNA*. Am. J. Vet. Res. (1986) 47: 1789-1795.
169. Whitbeck J.C., Knapp A.C., Enquist L.W., Lawrence W.C., and Bello L.J.- *Synthesis, processing, and oligomerization of bovine herpesvirus 1 gE and gI membrane proteins*. (1996) 70:7878-7884.
170. Wigdorovitz A., Zamorano P., Borca V. Sadir A.- *Modulation of the antigen presentation activity in foot and mouth disease virus (FMDV) vaccines*

- by two adjuvants: avidine and a water soluble fraction of Mycobacterium sp. *Vaccine* (1998) 17: 1627-1632.
172. Winkler M.T.C., Doster A., and Jones C.- *Bovines herpesvirus 1 can infect CD4+ T lymphocytes and induce programmed cell death during acute infection of cattle*. *J.Virol.* (1999) 73 (10): 8657- 8668.
173. Wyler R., Engels M., Schwyzer M.- *Herpesvirus diseases of cattle, horses, and pigs*. Edited by Wittman G., and Kluwer. Boston pl. (1989)
174. Yason C.V., Harris L.M., McKenna P.K., Wadowska D., Kibenge F.S.B.- *Establishment of conditions for the detection of bovine herpesvirus-1 by polimerase chain reaction reaction using primers in the thymidine kinase region*. *Can. J. Vet. Res.*(1995) 59: 94-101.
175. Yates W.D.G. - *A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia, and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle*. *Can. J. Comp. Med.* (1982) 46: 225.
176. York I.A., Roop C., Andrews D.W., Riddell S.R., Graham F.L., and Johnson D.C - *A cytosolic herpes simplex virus protein inhibits antigen presentation to CD8+ T mlymphocytes*. *Cell* (1994) 77:525-535.
177. Young P.L. and Smith G.A.- *Genetically altered herpesviruses as vaccines*. *Vet. Microbiol.* (1995) 46: 175-179.
178. Yu Z., Manickan E., Rouse B.T.- *Role of interferon- $\gamma$  in immunity to herpes simplex virus*. *J. Leukoc. Biol.* (1996) 60:528- 532.
179. Zhai Y., Guo R., Hsu T.L., Yu G.L., Ni J., Kwon B.S., Jiang G.W., Lu J., Tan J. Ugustus M., Carter K., Rojas L., Zhu F., Lincoln C., Endress G, Xing L., Wang S., Oh K., Gentz R., Ruben S., Lippman M.E., Hsieh S.L., and Yang D.- *LIGHT, a novel ligand for lymphotoxin beta receptor and TR2/HVEM induces apoptosis and supresses in vivo tumor formation via gene transfer*. *J. Clin. Invest.* (1998) 102: 1142-1151.
180. Zhu, X., and Letchworth, G. J., 3<sup>rd</sup> - *Mucosal and systemic immunity to bovine herpesvirus-1 glycoprotein D confer resistance to viral replication and latency in cattle*. *Vaccine* (1996) 14(1), 61-9.
181. Zsak L., Zuckermann F., Sugg N., and Ben-Porat T.- *Glycoprotein gI of pseudorabies virus promotes cell fusion and virus spread via direct cell-to-cell transmission*. *J.Gen Virol.* (1992) 66: 2316-2325.

182. Zygraich, N., Lobmann, M., Vascoboinic, E., Berge, E., and Huygelen, C. *In vivo and in vitro properties of a temperature sensitive mutant of infectious bovine Rhinotracheitis virus*. Res. Vet. Sci. (1974) 16(3), 328-35.



**Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria**  
**Centro de Ciencias Veterinarias y Agronómicas**  
**Instituto de Virología**  
**CC 77. 1708 Morón. Buenos Aires**  
**Argentina**

Castelar, 20 de Febrero del 2002.

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Química Biológica  
Subcomisión de Doctorado

De mi mayor consideración.

Me dirijo a Uds. en referencia al Proyecto de Tesis: "Desarrollo de nuevas vacunas contra Herpesvirus bovinos tipo I: obtención de un virus con patrón antigénico diferencial con respecto al de las cepas circulantes en el campo" que lleva a cabo bajo mi dirección la Lic- Mariana Puntel, en el Instituto de Virología del CICV y A del INTA-Castelar.

El objeto de la presente es proponer a la subcomisión el cambio de título del trabajo de Tesis en cuestión. El título definitivo de dicho trabajo será "Vacunas contra Herpesvirus bovino tipo I: desarrollo de una cepa con patrón antigénico diferencial con respecto al de las cepas circulantes en el campo."

Dicho cambio se propone con el objeto de definir más claramente el trabajo discutido.  
Sin otro particular, saludo a Uds. atentamente.

Lic. M. Puntel

Tesista

Dra. Ana María Sadir

Directora de Tesis