

Los resultados de este trabajo de tesis fueron parcialmente publicados en el artículo:  
"BHV-1 vaccine induces cross-protection against BHV-5 disease in cattle".  
Del Medico Zajac MP, Puntel M, Zamorano PI, Sadir AM, Romera SA.  
Res Vet Sci. 2006 Dec; 81(3):327-34

## **Agradecimientos**

A Alejandra Romera, directora de esta tesis, por haberme dado un lugar y la oportunidad de hacer la tesis doctoral con ella, por dejarme crecer libremente, por valorarme tanto y confiar siempre en mí, por haberme permitido conocer gente y viajar, por pensar siempre en positivo y creer que siempre hay una alternativa y una solución a las cosas (uno a veces no lo logra ver), gracias por todo.

A la Dra. Gabriela Calamante, por tanta tanta tanta ayuda desinteresada y toda la buena onda que necesité en diversos momentos del desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Etienne Thiry y Benoit Muylkens de la Universidad de Liege, Bélgica, por haberme dado la oportunidad de trabajar con ellos, por las discusiones productivas y por haber confiado en mí.

A Fernando Fernández, director del Instituto de Virología, por haberme brindado un lugar en el Instituto de Virología y permitirme realizar esta tesis doctoral.

Al Dr. Andrés Wigdorovitz, coordinador de Área de Vacunas del Instituto de Virología, por haberse preocupado por la continuidad de mi trabajo.

A los Dres. Patricia Zamorano, M. José Dus Santos, Mónica Jacobsen y Norberto Fondevila, por preocuparse por mis avances y aconsejarme en todo este proceso.

A Osvaldo Zabal, Teresa Morán y Estela Fernández, por aguantar tantos pedidos enormes, y a veces de último momento, siempre con buena onda.

Al Dr. Javier Blanco Viera y Fernando Delgado por enseñarme como trabajar en las necropsias y por su invaluable trabajo en el análisis histopatológico de las muestras.

A Marta y Pamela, de la sala de lavado, por prepararme tanto material y ayudarme en lo que necesitara, sin ustedes no hubiese podido realizar un montón de experimentos.

A Ricardo, que me enseñó a trabajar con las vacas y junto a Jorge y Claudio me ayudaron con el trabajo en el campo.

A Horacio Huerta, por haber estado siempre disponible para solucionar los problemas de los boxes.

A Javier y Diego, por cuidar y atender tan bien a los animales dentro de los boxes, y por aguantarme durante las experiencias.

Al CONICET, por haberme brindado los medios para iniciar mis pasos en la investigación científica.

A Fátima (eFe), Fiorella (Fio) y Ana Laura (la Huerfi) por ser tan buenas compañeras, por ser mis amigas, por ayudarme tanto tanto tanto, por acompañarme y contenerme en las etapas difíciles.

A mis compañeros del Lab F y mis ex del Lab D: Mary, Darío, Analía, Vale Q, Seba P, Vero B, Mati, Vale O, Ceci, Seba D, Carlos y Nacho, por compartir tan buenos momentos juntos y bancarnos entre todos en los no tan buenos...brindo por las reuniones!!!

A todos los chicos del Instituto de Virología que hicieron de esta etapa una gran experiencia y un imborrable recuerdo: María, Selene, Liliana, Bessie, Mariana N, Mariana A, Mariana D, Lucas, Gustavo, Anabel, Gabriel P, Gabriel D, Marina L, Marina M, Diego G, Agustín, Seba Ch, Juan Pablo, Danilo, Myrian, Gisela, Sabrina, Diego F.

A Diego Compaired, por tu interminable paciencia y tu excelente predisposición para ayudarme.

A Andrea, Florencia y Flavia, del Instituto de Biotecnología, que aguantaron tantas preguntas!!!  
Gracias por la buena onda.

A mis amigas de toda la vida Liliana y Vanesa, que aún entendiendo poco (y nada) de mi trabajo me escucharon tantas veces y me contuvieron en toda esta etapa, las quiero mucho!!!

A Lula, Fer y Ale, por mantener nuestra amistad a pesar de la distancia y contenerme como en los viejos tiempos, los extraño un montón!!!

A mis hermanos Nadia y Mariano, y mis cuñados Guille y Katy, que me bancan "a su manera" y me alientan siempre.

A mis viejos y mi abuela, que siempre me apoyan, pase lo que pase.

A mis suegros y mis cuñados (los de acá y los de Suiza) que me aceptaron tal como soy, que me conocieron justo cuando comencé la tesis y tuvieron que vivir conmigo todo este proceso, no es fácil, no?

A Sebastián, por haberme acompañado en esta etapa de principio a fin.

A todos!!!!!!!!!!

**A Sebastián, por ser mi amor, mi  
compañero, por comprenderme y  
contenerme siempre**

**A mi mamá y mi papá, que  
siempre confiaron en mí**

## INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
ABREVIATURAS Y SIGLAS	3
INTRODUCCIÓN	5
HIPÓTESIS	39
OBJETIVOS	40
MATERIALES Y MÉTODOS. CAPÍTULO I	42
1. Virus y células	42
2. Animales	42
3. Toma de muestras	42
4. Ensayo de infección viral en bovinos	42
5. Evaluación de signos clínicos	43
6. Necropsias y análisis histopatológico	44
7. Titulación viral	44
8. Evaluación de la respuesta inmune humoral	45
8.1. Ensayos de ELISA	45
8.1.1. Producción de antígeno	45
8.1.2. Ensayo de ELISA para determinación de anticuerpos totales en suero	46
8.1.3. Ensayo de ELISA para determinación de los isotipos IgG <sub>1</sub> e IgG <sub>2</sub> en suero	46
8.1.4. Ensayo de ELISA para evaluación de IgA e IgG <sub>1</sub> en secreciones nasales	47
8.2. Ensayo de seroneutralización	47
9. Evaluación de respuestas inmune celular	48
9.1. Producción de antígeno	48
9.2. Ensayo de linfoproliferación	48
10. Diseño experimental I: Infección aguda con BHV-5	49
11. Diseño experimental II: Evaluación de inmunogenicidad y eficacia protectora de vacunas inactivadas frente a la enfermedad causada por BHV-5	50
11.1. Producción de vacunas	50
11.1.1. Producción de antígeno	50
11.1.2. Formulación de las vacunas	50
11.2. Inmunización de animales	50
11.3. Desafío viral	51
12. Análisis estadístico.	51
MATERIALES Y MÉTODOS. CAPÍTULO II	52
1. Virus y células	52
2. Animales	52
3. Estudio de virulencia <i>in vivo</i>	52
3.1. Diseño experimental	52
3.2. Infección viral y manejo de animales	53
3.3. Toma de muestras	53
3.4. Evaluación de signos clínicos	53
3.5. Necropsias y análisis histopatológico	53

3.6.	Evaluación de anticuerpos en suero y en secreciones nasales	54
3.7.	Titulación viral	54
3.8.	Identificación de virus excretado	54
3.8.1.	Purificación de ADN a partir de células infectadas	54
3.8.2.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	55
4.	Caracterización del <i>background</i> genético de los virus recombinantes BHV-1/5	56
4.1.	Purificación viral y preparación de ADN viral	56
4.2.	Elección de genes blanco	56
4.3.	Oligonucleótidos	56
4.4.	PCR	58
4.5.	Electroforesis en gel de agarosa	58
4.6.	Purificación de productos de PCR	58
4.7.	Secuenciación automática	59
4.8.	Herramientas de bioinformática	59
RESULTADOS. CAPÍTULO I		
1.	<b>Infección experimental de bovinos con BHV-5</b>	60
1.1.	Excreción viral y signos clínicos	60
1.2.	Evaluación de la respuesta inmune	61
1.2.1.	Respuesta inmune humoral	61
1.2.2.	Respuesta inmune celular	63
2.	<b>Evaluación de la inmunogenicidad y la eficacia protectora de vacunas inactivadas frente a la enfermedad causada por BHV-5</b>	64
2.1.	Evaluación de la inmunogenicidad de vacunas inactivadas basadas en BHV-1 o BHV-5	64
2.1.1.	Respuesta inmune humoral	64
2.1.2.	Respuesta inmune celular	66
2.2.	Estudio de la eficacia protectora frente a la infección con BHV-5	67
RESULTADOS. CAPÍTULO II		
1.	<b>Estudio de la virulencia <i>in vivo</i> de los virus recombinantes BHV-1/5</b>	69
1.1.	Evaluación de signología clínica y excreción viral	69
1.2.	Estudios <i>post mortem</i>	73
1.3.	Detección de anticuerpos anti BHV	74
2.	<b>Caracterización del <i>background</i> genético de los virus recombinantes BHV-1/5</b>	75
DISCUSIÓN		81
CONCLUSIONES		102
ANEXOS		
1.	Planilla para el registro de signos clínicos de animales infectados	104
2.	Regiones del SNC bovino	105
2.	Condiciones de reacción y ciclado de PCR	106
4.	Informe de análisis histopatológico	115
BIBLIOGRAFÍA		122

# HERPESVIRUS BOVINO 5: ESTUDIO DE LA INFECCIÓN, LA RESPUESTA INMUNE Y LOS RECOMBINANTES CON HERPESVIRUS BOVINO 1 EN EL HOSPEDADOR NATURAL

## RESUMEN

Los herpesvirus bovino 1 (BHV-1) y 5 (BHV-5) son dos alfa herpesvirus que infectan al ganado bovino y poseen la capacidad de establecer latencia. En nuestro país, la seroprevalencia de BHV-1 puede alcanzar el 60 %, mientras que la prevalencia de las infecciones con BHV-5 es desconocida debido a la ausencia de un ensayo serológico diferencial. Dado que BHV-1 y BHV-5 cocirculan y que la vacunación contra BHV-1 no es obligatoria ni totalmente protectora frente a la infección con este agente, existen altas probabilidades de que los animales sufran coinfecciones, y bajo estas condiciones ocurran fenómenos de recombinación genética entre estos virus. La recombinación, altamente frecuente entre los alfa herpesvirus, posee gran importancia en la epidemiología y patogenia de BHV-1 y BHV-5, ya que podría conducir a la restauración de la virulencia en cepas atenuadas o al aumento de la patogenicidad por adquisición de genes asociados a la virulencia.

En este contexto, resulta fundamental el desarrollo de vacunas que controlen las infecciones con BHV-1 y BHV-5 y que reduzcan el riesgo de ocurrencia de coinfecciones y recombinaciones naturales entre ambos virus.

En esta tesis se desarrolló un modelo de infección experimental de bovinos con el virus BHV-5 a fin de contar con una herramienta para la evaluación de la eficacia protectora de diversas vacunas frente a infecciones con este virus. Posteriormente, se evaluó la inmunogenicidad y la eficacia protectora de vacunas inactivadas basadas en BHV-1 o BHV-5 frente a la infección con BHV-5. Se demostró que la respuesta inmune inducida por ambas vacunas no difiere significativamente y que ambas protegen a los animales infectados frente a la signología clínica y la excreción viral asociada a BHV-5.

En segundo lugar, con el objetivo de contar con datos que permitan evaluar el impacto de la presencia de virus recombinantes BHV-1/5 en la población bovina de nuestro país, se evaluó la virulencia *in vivo*, en términos de excreción viral y signología clínica, de virus recombinantes BHV-1/5 obtenidos previamente *in vitro*. Bajo las condiciones de infección utilizadas en esta tesis, no se detectó excreción viral ni signos clínicos en los bovinos infectados con los virus recombinantes. Finalmente, la caracterización del *background* genético de los mismos permitió identificar las regiones genómicas homólogas a cada virus parental y el sitio de recombinación entre ellos.

Palabras clave: Herpesvirus bovino 1, herpesvirus bovino 5, vacunas inactivadas, infección viral, virus recombinantes BHV-1/5, virulencia *in vivo*, constitución genómica.

# **BOVINE HERPESVIRUS 5: STUDY OF INFECTION, IMMUNE RESPONSE AND RECOMBINANTS WITH BOVINE HERPESVIRUS 1 IN THE NATURAL HOST**

## **ABSTRACT**

Bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and bovine herpesvirus 5 (BHV-5) are two closely related alphaherpesviruses that infect cattle and are able to establish latency. In our country, BHV-1 seroprevalence can reach 60 %, whereas BHV-5 prevalence is unknown due to the absence of a differential serological test. Since BHV-1 and BHV-5 co-circulate, and vaccination against BHV-1 is not obligatory, the probability of animals being co-infected by them is high, and consequently genetic recombination between these two viruses could occur. Recombination is a highly frequent event among the alphaherpesvirus. Besides, it has a deep impact in BHV-1 and BHV-5 pathogenesis and epidemiology since it could lead to virulence restoration of attenuated strains or the increase of the pathogenicity by acquisition of virulence associated genes.

In this context, it is of particular interest the development of vaccines that control BHV-1 and BHV-5 infections and reduce co-infections risks and natural recombination events between these two viruses.

In this thesis, a bovine experimental infection model with BHV-5 was developed in order to obtain a tool for the evaluation of the protective efficacy of different vaccines against BHV-5 infection. Later, the immunogenicity and protective efficacy of inactivated vaccines based on BHV-1 or BHV-5 against BHV-5 was tested. We demonstrated that the immune response induced by these vaccines is not significantly different and that both of them can protect cattle from nervous signs and viral excretion associated with BHV-5 infections.

Secondly, in order to obtain information about the impact of natural BHV-1/5 recombinants in cattle, the *in vivo* virulence of these recombinants was tested in terms of viral excretion and clinical signs. Under the conditions used in this thesis, cattle infected with the recombinant viruses did not develop clinical signs nor excreted virus. Finally, the genetic background characterization of the recombinants allowed us to identify genomic regions homologous to each parental strain as well as the recombination site between them.

Key words: bovine herpesvirus 1, bovine herpesvirus 5, inactivated vaccines, viral infection, BHV-1/5 recombinants, *in vivo* virulence, genomic constitution.



## ABREVIATURAS Y SIGLAS

A	absorbancia
ABTS	ácido sulfónico 2-2'-azino-bis-3-etilbenceno-6-tiazolin
AcM	anticuerpo monoclonal
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNg	ADN genómico
ARN	ácido ribonucleico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHV-1-5	herpesvirus bovino 1 y 5
Cap	capítulo
cel.	células
CICVyA	Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas
CMH	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
CNIA	Centro Nacional de Investigaciones Agronómicas
°C	grados Celsius
D.O	densidad óptica
DICT <sub>50</sub>	dosis infecciosa en cultivo de tejidos 50%
dil	dilución
dNTPs	desoxirribonucleósidos trifosfato
dpi	días post infección
dprv	días post revacunación
dpv	días post vacunación
ECP	efecto citopático
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
EHV-1-2-4	herpesvirus equino 1, 2 y 4
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
g	glicoproteína
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
h	hora/s
H/E	hematoxilina/eosina
hpi	horas post infección
HSV-1-2	virus herpes simple 1 y 2
IE	índice de estimulación
IFN $\alpha/\beta$	interferon alfa/beta
Ig	inmunoglobulina
INF- $\gamma$	interferón gama
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

IR	repetición interna
kpb	kilo pares de bases
log <sub>10</sub>	logaritmo en base 10
m.o.i	multiplicidad de infección ( <i>multiplicity of infection</i> )
MF	microscopio de fluorescencia
min	minuto/s
ml	mililitros
mM	milimolar
MyM	Materiales y Métodos
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Nº	número/s
nt	nucleótido
ORF	marco de lectura abierto ( <i>open reading frame</i> )
pb	pares de bases
PBS	<i>buffer</i> fosfato salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa ( <i>polimerase chain reaction</i> )
pi	post infección
PrV	virus de la pseudorrabia
pv	post vacunación
RFLP	<i>Restriction Fragments Length Polymorphism</i>
RFP	<i>red fluorescent protein</i>
rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecil sulfato de sodio
seg	segundo/s
SFB	suero fetal bovino
SNC	sistema nervioso central
SNP	sistema nervioso periférico
Taq ADN pol	ADN polimerasa de <i>Thermophilus aquaticus</i>
TR	repetición terminal
UL	región única larga
US	región única corta
UV	ultravioleta
V	volts
vol	volumen
VZV	virus varicela zoster
µg	microgramos
µl	microlitros

**Familia *Herpesviridae*****1. Definición**

La inclusión de cierto virus en la familia *Herpesviridae* está basada en la arquitectura del virión. La misma consiste en un core compuesto por ADN lineal doble cadena, una cápside icosaédrica de aproximadamente 100-110nm de diámetro compuesta por 162 capsómeros (150 hexámeros y 12 pentámeros), un material amorfo que rodea la cápside denominado tegumento, y una envoltura que posee insertas glicoproteínas virales (Roizman y Pellet, 2001).

**2. Propiedades biológicas**

Los herpesvirus conocidos hasta el momento comparten cuatro propiedades biológicas significativas:

- 1- El genoma codifica para un gran número de enzimas involucradas en el metabolismo de los ácidos nucleicos (timidina kinasa, timidilato sintetasa, dUTPasa, ribonucleótido reductasa), en la síntesis de ADN (ADN polimerasa, helicasa, primasa) y en el procesamiento de proteínas (proteína kinasas).
- 2- La síntesis del ADN viral y el ensamble de la cápside ocurre en el núcleo. Las cápsides adquieren la envoltura durante el tránsito por la membrana nuclear.
- 3- La producción de la progenie viral está invariablemente acompañada por la destrucción de la célula infectada.
- 4- Poseen la capacidad de establecer un estado de latencia en su hospedador natural. En las células que contienen virus latente, el genoma viral se encuentra circularizado y solo se expresan un pequeño número de genes virales.

**3. Origen y evolución**

Los herpesvirus se encuentran altamente diseminados en la naturaleza, afectando a mamíferos, aves, reptiles, anfibios, peces óseos y moluscos (Davison *et al*, 2005). Actualmente, los herpesvirus de vertebrados están divididos en dos grupos filogenéticos: el primero incluye a los herpesvirus de mamíferos y aves; el segundo, a los herpesvirus que afectan a peces óseos y anfibios. El estudio de la estructura de la cápside (Booy *et al*, 1996) y los mecanismos de maduración de la misma (Davison y Davison, 1995) brindan fuertes evidencias a favor de un origen común entre ambos grupos de vertebrados. El primer grupo filogenético se clasifica en tres subfamilias (*Alfaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* y *Gamaherpesvirinae*). Los herpesvirus de reptiles probablemente pertenezcan a la subfamilia *Alfaherpesvirinae* (Nigro *et al.*, 2004; Quackenbush *et al.*, 1998; Une *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2001). Un trabajo reciente sobre la morfología y secuencia genómica de un herpesvirus aislado de una larva de molusco (ostra del pacífico, ostreid herpesvirus 1, OsHV-1) ha sugerido que este virus debería clasificarse en un tercer grupo filogenético, independiente de los de vertebrados (Davison *et al*, 2005).

Los herpesvirus han evolucionado por un período de 400 millones de años (McGeoch *et al*, 2000; Weir, 1995), y, en particular, la subfamilia *Alfaherpesvirinae*, que contiene gran cantidad de virus de mamíferos y aves, se separó de las otras ramas hace aproximadamente 180-210 millones de años (McGeoch *et al*, 1995) período en el cual aparecieron los primeros mamíferos. La distancia evolutiva entre herpesvirus cercanos que infectan especies diferentes, sugiere que la especiación viral ocurrió al mismo tiempo que ocurría la especiación de sus hospedadores (McGeoch *et al*, 1995; Moore *et al*, 1996). Diversos análisis filogenéticos sugieren que los virus de mamíferos y aves evolucionaron desde un ancestro común y que dicho hipotético ancestro contribuyó con 43 genes (denominados "genes del core") que se encuentran en los actuales herpesvirus (Davison *et al*, 2002a).

Considerando que los herpesvirus tuvieron un ancestro común y frente a los aproximadamente 130 herpesvirus diferentes actuales (Roizman y Pellet, 2001), es lógico pensar que estos virus debieron explotar todos los mecanismos existentes para la generación de diversidad (Davison, 2002b). Estos incluyen el efecto acumulativo de sustituciones, deleciones e inserciones de nucleótidos, generación de genes *de novo*, duplicación de genes por recombinación seguido de divergencia funcional, adquisición de genes del genoma del hospedador (usualmente vía intermediarios de ADN), y rearrreglos genéticos a gran escala (Davison *et al*, 2002a; Davison, 2001).

#### 4. Clasificación

Los miembros de la familia *Herpesviridae* fueron clasificados inicialmente por el Grupo de Estudio de Herpesvirus perteneciente al Comité Internacional de Taxonomía Viral (International Committee on the Taxonomy of Viruses –ICTV) en tres subfamilias (*Alfaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* y *Gamaherpesvirinae*) basándose en las propiedades biológicas de los miembros conocidos hasta ese momento (Roizman, 1979; Roizman *et al*, 1973). Asimismo, utilizando datos de homología de secuencias de ADN, similitud de organización genómica y estudios de proteínas virales mediante ensayos inmunológicos, se clasificaron dichos virus en diversos géneros.

A continuación se detallan las principales características de cada subfamilia y los géneros que las integran.

##### *Alfaherpesvirinae*

Los miembros de esta subfamilia se caracterizan por tener un rango variable de hospedador, un ciclo viral relativamente corto, una rápida diseminación en cultivo de tejidos, alta eficiencia en la destrucción de las células infectadas, y la capacidad de establecer latencia en ganglios sensoriales. Esta subfamilia contiene los géneros *Simplexvirus* (HSV-1), *Varicellovirus* (VZV), *Mardivirus* (previamente denominado Marek's disease-like virus), e *Iltovirus* (previamente denominado Infectious laryngotracheitis-like virus) (ICTV, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>).

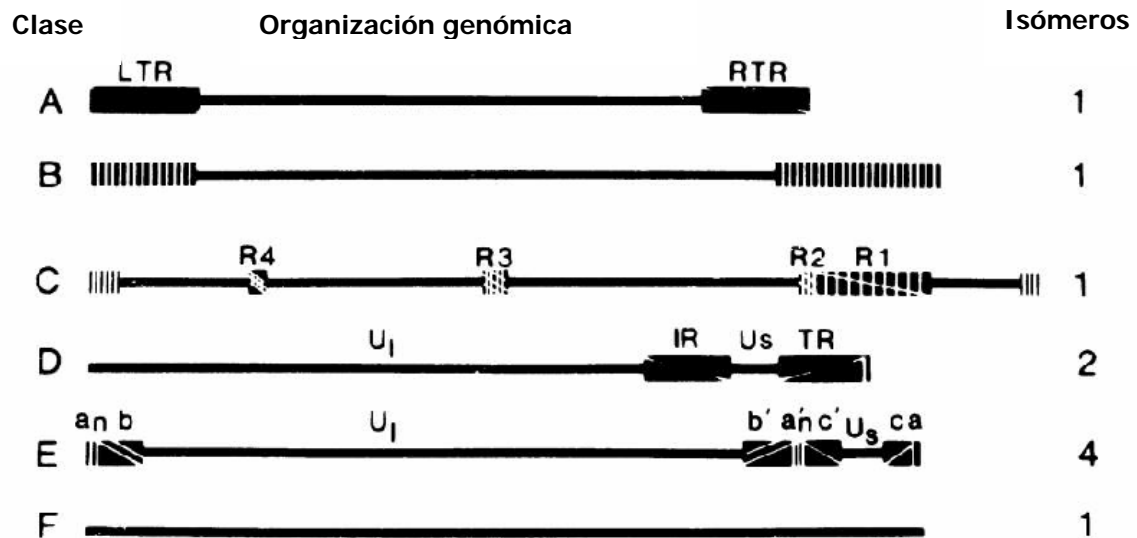
*Betaherpesvirinae*

Una característica de esta subfamilia, aunque no exclusiva, es poseer un rango restringido de hospedador. El ciclo viral es largo y el progreso de la infección en cultivo es lento. El virus puede mantenerse en estado de latencia en glándulas secretorias, células linforeticulares, riñones y otros tejidos. Esta subfamilia esta compuesta por los géneros *Cytomegalovirus* (HCMV), *Muromegalovirus* (citomegalovirus murino) y *Roseolovirus* (HHV-7).

*Gamaherpesvirinae*

El rango de hospedador experimental de los miembros de esta subfamilia esta limitado a la familia u orden a la cual pertenece el hospedador natural. *In vitro*, todos los miembros replican en células linfoblásticas, y algunos también causan infecciones líticas en células epitelioides y fibroblásticas. Los virus de este grupo son usualmente específicos de linfocitos T y B, y se ha demostrado virus latente en tejidos linfoides. Esta subfamilia contiene dos géneros: *Lymphocryptovirus* (EBV) y *Rhadinovirus* (AtHV-2 y SaHV-2)

El estudio de la organización del genoma viral otorga un criterio diferente de clasificación de los herpesvirus. El tamaño de la molécula de ADN varía de 120 a 250 kpb y su secuencias contienen una composición de G+C entre el 31% y el 75% del total. Los genomas poseen secuencias repetidas tanto internas como terminales que pueden variar en número de copias, llevando, de esta manera, a variaciones en el tamaño del genoma de hasta 10 kpb. La presencia y ubicación de estas secuencias repetidas permiten la división de los herpesvirus en 6 grupos, designados con las letras A a F (Figura 1) (Roizman y Pellet, 2001).



Copyright © 2001 by Lippincott Williams & Wilkins

**Figura 1.** Esquema de la organización genómica de las seis clases de genoma presentes en la Familia *Herpesviridae*. Los genomas A, B, C, D, E, y F están ejemplificados por herpesvirus de *channel catfish*, herpesvirus saimiri, virus Epstein-Barr, virus varicela zoster, virus herpes simple (HSV) y herpesvirus tupaia, respectivamente. En el esquema las líneas horizontales representan regiones únicas o casi únicas. Las regiones repetidas están dibujadas como rectángulos y designadas como repeticiones terminales izquierda y derecha (LTR y RTR) para el grupo A, repeticiones R1 a R4 para repeticiones internas del grupo C, e interna y terminal para grupo D. Los extremos del grupo E (HSV-1) consisten de dos elementos. Uno de los extremos contiene  $n$  copias de la secuencia "a" al lado de una secuencia más larga denominada "b". El otro extremo posee una secuencia "a" seguida de una secuencia denominada "c". Las secuencias terminales "ab" y "ca" están insertadas en orientaciones invertidas (marcadas con comillas) de modo de separar la región única en un dominio largo (UL) y uno corto (US). Las repeticiones terminales de los genomas de tipo F aún no han sido descritas. En el grupo B, las secuencias terminales están reiteradas muchas veces en ambos extremos. El número de repeticiones en cada extremo puede ser diferente. Los componentes de los genomas D y E pueden invertir su posición. En los de clase D, el componente corto (US) se invierte en relación al largo (UL). Aunque, con muy poca frecuencia, el segmento largo podría invertirse, la mayoría de las moléculas de ADN forman dos poblaciones que difieren en la orientación del componente corto. En los genomas E, tanto el componente largo como el corto pueden invertirse por lo que el ADN viral consiste de cuatro isómeros equimolares. Figura y leyenda extraída de Roizman y Pellet, 2001.

## Los Alfaherpesvirus

La subfamilia *Alfaherpesvirinae* agrupa numerosos agentes virales que poseen gran importancia médica y económica tanto en el hombre como en los animales (Tabla 1).

<b>Alfaherpesvirinae</b>				
Género	Especie	Abreviatura	Enfermedad	Hospedador natural
<i>Simplexvirus</i>				
	Virus herpes simple 1	HSV-1	Herpes labial	Hombre
	Virus herpes simple 2	HSV-2	Herpes genital	Hombre
<i>Varicellovirus</i>				
	Herpesvirus suid 1 (Virus de la pseudarrabia)	PrV	Enfermedad de Aujeszky	Cerdos
	Herpesvirus bovino 1	BHV-1	Rinotraqueitis infecciosa bovina	Bovinos
	Herpesvirus bovino 5	BHV-5	Meningoencefalitis	Bovinos
	Herpesvirus equino 1	EHV-1	Encefalitis y abortos	Caballo
	Herpesvirus equino 4	EHV-4	Rinoneumonía equina	Caballo
	Virus de varicela zoster	VZV	Varicela	Hombre
	Herpesvirus felino	FeHV-1	Rinotraqueitis viral felina	Gato
<i>Mardivirus</i>				
	Virus enfermedad de Marek 1	MDV-1	Enfermedad de Marek	Aves de corral
	Virus enfermedad de Marek 2	MDV-2	Infección asintomática	Aves de corral
	Herpesvirus de pavo	HTV	Infección asintomática	Pavo
<i>Iltovirus</i>				
	Herpesvirus gallid 1	GaHV-1	Laringotraqueitis infecciosa	Aves de corral

**Tabla 1.** Ejemplos de especies virales de importancia dentro de los *Alfaherpesvirinae*.

Las características biológicas que identifican esta subfamilia dentro de los herpesvirus fueron descritas anteriormente; sin embargo, dos características biológicas fundamentales influyen y determinan el tipo de enfermedades que desarrollan: la neurovirulencia y la latencia. La capacidad que poseen los alfaherpesvirus de infectar células nerviosas ocasiona el establecimiento de latencia (generando un reservorio del virus) e, incluso, el desarrollo de enfermedades neurológicas severas.

Asimismo, la patogenia de una cepa viral puede modificarse si el virus adquiriera propiedades nuevas mediante, por ejemplo, eventos de recombinación. Como se ha mencionado anteriormente, la recombinación genética es un evento frecuente en los

alfaherpesvirus, y la gran diversidad encontrada en esta subfamilia podría adjudicarse a la ocurrencia de tales eventos.

Los mecanismos que se describirán a continuación están basados en los conocimientos existentes sobre el alfaherpesvirus prototipo, el virus herpes simple 1 (HSV-1). Asimismo, se hará especial hincapié en los trabajos realizados con diversos alfaherpesvirus de importancia ganadera tales como el virus de la pseudorrabia (PrV), el herpesvirus bovino 1 (BHV-1), el herpesvirus bovino 5 (BHV-5) y el herpesvirus equino (EHV-1).

### 1. Ciclo de multiplicación viral

El modelo que se describe a continuación está basado en los eventos que ocurren en el ciclo de multiplicación de HSV-1, el cual está aceptado para todos los herpesvirus.

La fase de pegado y penetración ocurre en tres etapas. La primera involucra el pegado lábil entre las glicoproteínas virales (gB y gC) y los glicosaminoglicanos celulares (Shukla, *et al* 2000; Campadelli-Fiume *et al*, 2000). Luego, se produce la unión de la glicoproteína D (gD) a un receptor celular (*herpesvirus entry mediator A*, HveA, HveB, HveC, HveD y 3-O-sulfated heparan sulfate 3-O-S HS) (revisado por Spear *et al*, 2000, 2003). Finalmente, la fusión de las membranas (envoltura viral con membrana celular) lleva a la entrada definitiva del virión.

El mecanismo de transporte de la nucleocápside hacia el núcleo celular es un fenómeno poco conocido. La proteína del tegumento UL34, asociada a la cápside, se une a la dineína de los microtúbulos y cataliza el desplazamiento hacia el núcleo (Ye *et al*, 2000). La entrada del ADN viral al núcleo ocurre a nivel de los poros de la envoltura nuclear, donde las cápsides "eyectan" el ADN. En cuanto el ADN ingresa al núcleo, éste se circulariza sin necesidad de expresión de proteínas virales (Garber *et al*, 1993).

La transcripción del ADN viral comienza en el núcleo gracias a la enzima ARN polimerasa II de la célula hospedadora. La expresión de los 80 genes de HSV-1 está regulada de una manera estricta por un sistema de "encendido y apagado" (*on-off*) que activa e interrumpe la lectura secuencial de los genes. De este modo, se pueden distinguir tres grupos de genes dependiendo del momento de la infección en la cual se expresan: los genes  $\alpha$  o genes inmediato-tempranos (*immediate early*, IE), los genes  $\beta$  o genes tempranos (*early*, E) y los genes  $\gamma$  o genes tardíos (*late*, L).

Desde el momento en que el ADN viral entra al núcleo, ciertas proteínas del tegumento interactúan con componentes transcripcionales celulares de manera de estimular la transcripción de los genes  $\alpha$ . Una vez producidas en el citoplasma, las proteínas  $\alpha$  son importadas al núcleo donde inducirán la disminución de la expresión de los genes  $\alpha$  y activarán la expresión de los genes  $\beta$  y  $\gamma$ . Las proteínas codificadas por los genes  $\beta$  presentan su pico de expresión entre las 4 y 8 horas post infección. Las mismas están implicadas en el metabolismo de nucleótidos y en los eventos ligados a la replicación del ADN viral. En cuanto a los genes  $\gamma$ ,



existen dos grupos: los genes  $\gamma$  1 o tardíos precoces, que presentan una expresión aumentada por la síntesis del ADN viral; y los  $\gamma$  2, o tardíos propiamente dichos, en los cuales la expresión es totalmente dependiente de la síntesis de ADN viral. Las proteínas estructurales (cápside, tegumento, envoltura), codificadas por los genes  $\gamma$ , se producen en gran cantidad en el citoplasma o en el retículo endoplasmático. Algunas de ellas migran hacia el núcleo donde se ensamblarán para formar las nuevas cápsides. Estos genes codifican para 11 glicoproteínas virales: las glicoproteínas B (gB), gD, gH, gK y gL son esenciales para lograr una infección productiva en cultivo de tejidos y para la entrada de partículas virales extracelulares a las células; por otra parte, la gC, gE, gI, gG, gJ, gM y gN (UL49,5), son consideradas como no esenciales (revisado por Dingwell *et al*, 1995; Davison *et al*, 2002).

La replicación del ADN viral comienza con la intervención de los productos de los genes  $\beta$ . Determinadas proteínas se agrupan sobre la molécula de ADN parental formando estructuras denominadas "sitios replicativos" (Ishov and Maul, 1996). La replicación del ADN viral se desarrolla según el modelo de círculo rodante (ver mas adelante) por un mecanismo desconocido hasta el momento. Este proceso da origen a la formación de concatémoros, una gran molécula de ADN constituida por muchos genomas ligados covalentemente cabeza-cola (Hammerschmidt *et al*, 1990). Los concatémoros poseen una estructura altamente ramificada cuyo origen no puede explicarse por el modelo de replicación de círculo rodante (Bataille y Epstein, 1997). Se ha sugerido, que los eventos de recombinación, muy frecuentes dentro de los herpesvirus, participen en la formación de tal estructura (Severini *et al*, 1996).

El ensamblaje de las cápsides y el empaquetamiento del ADN ocurren en el núcleo de las células infectadas. Este proceso es muy complejo e involucra diversos pasos ordenados: el ensamblaje de los 162 capsómeros ocurre sobre un esqueleto de proteínas de "andamiaje" (*scaffold*) (Homa y Brown, 1997); luego, el ADN concatémérico es clivado en unidades genómicas por un complejo mecanismo y se empaqueta en la cápside simultáneamente con el desprendimiento de la misma de la estructura de "andamiaje" (Klupp *et al*, 2006; Schynts *et al*, 2002).

La maduración y la salida de los viriones del núcleo se producen luego de la encapsidación del genoma viral. Se han sugerido diversas hipótesis para explicar los mecanismos involucrados en el trayecto que realizan los viriones para atravesar la barrera nucleocitoplasmática así como la adquisición del tegumento y la envoltura. La primer hipótesis propone que los viriones conservan la envoltura adquirida en la membrana interna nuclear durante todo el trayecto a través del retículo endoplasmático y el aparato secretorio hasta el exterior celular (modelo luminal) (Campadelli-Fiume *et al*, 1991; Enquist *et al*, 1998). El segundo modelo es el de *envelopment-deenvelopment-reenvelopment* (revisado en Mettenleiter, 2006a,b). En este modelo, la envoltura primaria es adquirida cuando las cápsides conteniendo el DNA "brotan" por la membrana nuclear interna hacia el espacio periplásmico (*envelopment*). Luego, se fusiona la envoltura primaria con la membrana nuclear externa,

traslocando las cápsides desnudas al citoplasma (*de-envelopment*). Una vez en el citoplasma las cápsides adquieren el tegumento maduro y la envoltura final (con las glicoproteínas insertas) al ingresar por brotación a vesículas del trans Golgi (*reenvelopment*) (Mettenleiter, 2002, 2004, 2006; Granzow *et al*, 2001). Recientemente, se ha propuesto un nuevo mecanismo tanto para HSV-1 como para BHV-1 (Wild *et al*, 2005; Leuzinger *et al*, 2005). Estos trabajos sugieren que las cápsides desnudas salen del núcleo por poros "ensanchados" y adquieren la envoltura al ingresar a las cisternas del Golgi o vacuolas derivadas del Golgi (Wild *et al*, 2005; Leuzinger *et al*, 2005). En todos los casos, las vesículas del Golgi conteniendo viriones maduros son transportadas hacia la membrana plasmática y luego de fusionarse la membrana de la vesícula con la membrana celular, se liberan los viriones al medio extracelular.

## **2. Patogenia**

### **2.1. Mecanismo general**

Los alfa herpesvirus penetran al organismo hospedador generalmente por una superficie mucosa. Se multiplican activamente en las células epiteliales por varios días y como consecuencia de la lisis de las células infectadas, aparece la patología típica de la infección primaria y la excreción viral. Durante este período, las partículas virales nuevas invaden el sistema nervioso periférico a través de las terminaciones axonales de las neuronas sensitivas de la región infectada. Dependiendo de la especie viral en cuestión, de la virulencia de la cepa y de características del hospedador implicado (especie, edad, estado inmunológico), la infección podrá llegar (o no) al sistema nervioso central y, eventualmente, al organismo en su conjunto. Algunos virus de esta subfamilia, tales como PrV, BHV-1, EHV-1 y VZV, se diseminan, además, por viremia asociados a las células mononucleares sanguíneas. Asimismo, los alfa herpesvirus poseen la capacidad de establecer una infección latente en las neuronas sensitivas o en células linfoides. Bajo la acción de ciertos estímulos tales como rayos ultravioletas, modificaciones hormonales, parto o inmunodepresión, el genoma viral latente puede reactivarse, iniciándose así una nueva expresión de los genes líticos. Las nuevas partículas virales generadas podrán migrar nuevamente hacia el sitio inicial de entrada. A este nivel, el virus replicará dando lugar a excreción, y pudiendo ocasionar una lesión localizada que se denomina recurrencia herpética.

La vía de transmisión más común en los alfa herpesvirus es directa, es decir, por contacto directo entre un hospedador infectado con uno no infectado (contacto de mucosas infectadas) o por aerosol (frecuente entre animales) (Mars *et al*, 2000).

Los mecanismos moleculares y las funciones virales involucradas en cada paso de la interacción virus-hospedador durante la infección y el desarrollo de la enfermedad, son objeto de intensa investigación. Los factores virales que alteran la viabilidad de una célula o del

organismo hospedador, que ocasionan en definitiva una enfermedad, son considerados como factores de virulencia. Dichos factores incluyen genes que codifican para glicoproteínas de la envoltura viral, enzimas involucradas en el metabolismo de nucleótidos o reparación del ADN, e inclusive, productos de genes que afectan el proceso de apoptosis de las células del hospedador o las respuestas inmunológicas del mismo (Mettenleiter, 2003).

A continuación, se describirán aspectos de la infección con alfa herpesvirus y se detallarán algunos de los mecanismos desarrollados por éstos para diseminarse y mantenerse en el hospedador.

## **2.2. Entrada y diseminación**

La entrada de los alfa herpesvirus al organismo hospedador ocurre a través de la cavidad nasal, orofaringe, los ojos (mucosa conjuntival), el tracto genital y lesiones en la piel (Engels y Ackermann, 1996). Luego de un ciclo de multiplicación viral en las células epiteliales del portal de entrada, las partículas virales generadas *de novo* se diseminarán de tres maneras diferentes: local, por viremia y neuronal.

La replicación local y destrucción de las células infectadas darán origen a las lesiones típicas de la infección viral, como por ejemplo vesículas en la piel y úlceras en mucosas en infecciones con HSV en humanos, lesiones en tracto respiratorio superior y genitales en bovinos causada por BHV-1. La diseminación local se produce por dos vías diferentes: la propagación extracelular, donde las partículas virales producidas son liberadas al medio extracelular y se diseminan hasta encontrar una célula susceptible; y, la diseminación célula a célula, en la cual las partículas virales pueden pasar directamente de una célula infectada a una célula adyacente. El pasaje de célula a célula puede ocurrir por formación de sincicios debido a la fusión de la membrana plasmática de la célula infectada con la membrana plasmática de las células adyacentes no infectadas (Ku *et al*, 2005; Turner *et al*, 1998). Un trabajo reciente, ha demostrado que las glicoproteínas B, D, H y L de HSV-1 son necesarias y suficientes para la fusión de membranas (Turner *et al*, 1998). Otro mecanismo de pasaje del virus de una célula a otra es a través de las uniones celulares. En este caso, se requiere de la participación de un gran repertorio de proteínas virales: gE, gG, gI, gK, gM, UL20, UL24 y UL45 (Muytkens *et al*, 2003). Se ha demostrado para HSV-1, PrV y BHV-1 que las glicoproteínas E e I forman un complejo heterodimérico involucrado en el pasaje célula a célula (Dingwell *et al*, 1994; Zsak *et al*, 1992). La gG y la proteína US3 también parecen estar involucradas en este mecanismo (Demmin *et al*, 2001; Nakamichi *et al*, 2002).

La diseminación por viremia ocurre en infecciones con diversos alfa herpesvirus, aunque en algunos casos no se ha podido demostrar fehacientemente. Para lograr este tipo de diseminación el virus invadiría los nódulos y los vasos linfáticos, desarrollándose viremia asociada a células linfoides (Engels y Ackermann, 1996). Las infecciones con HSV raramente

son sistémicas pero se han reportado casos de diversos órganos afectados (Whitley, 2001). En EHV-1 (Allen y Breathnach, 2006; van der Meulen *et al*, 2006) y PrV (Nauwynck y Pensaer, 1992, 1995) la diseminación por viremia ha sido probada en infecciones naturales. En casos como BHV-1, las evidencias son controversiales porque si bien se ha detectado la presencia de ADN viral por PCR en linfocitos de sangre periférica, no se logró aislar el virus (Fuchs *et al*, 1999; Mweene *et al*, 1996).

La diseminación por vía neuronal es una característica de particular importancia en los alfa herpesvirus y será desarrollada en la sección siguiente.

### 2.3. Neuroinvasividad y neurovirulencia

La neuroinvasividad se define como la capacidad de un virus de invadir el sistema nervioso central (SNC) (médula espinal o cerebro) desde el sitio de infección primaria. La neurovirulencia se define como el nivel de patogenicidad que un virus puede ejercer a nivel del SNC (Enquist *et al*, 1998).

Diversos alfa herpesvirus tales como HSV-1, HSV-2, VZV, PrV y BHV-1 son neurotrópicos y establecen una infección latente en las neuronas del sistema nervioso periférico (SNP) de sus hospedadores naturales. Sin embargo, raramente son neuroinvasivos y/o neurovirulentos. Luego de la infección inicial de los tejidos periféricos, los viriones invaden las neuronas del SNP y establecen una infección latente de por vida, que, bajo ciertas condiciones, puede reactivarse y producir una reinfección del tejido periférico. Ocasionalmente, luego o durante la replicación viral en el SNP, la infección se disemina hacia el SNC causando infecciones letales (Enquist *et al*, 1998; Wozniak *et al*, 2005).

Los mecanismos moleculares que regulan este tipo de infección del sistema nervioso están poco caracterizados. Sin embargo, se cree que tanto factores del virus (ver mas adelante) como ciertas características del hospedador (edad, estado inmunológico) condicionarían el desarrollo (o no) de una enfermedad neurológica severa. En relación a factores del hospedador, se observó que niños con deficiencias homocigotas en STAT 1, un regulador proteico clave en el mecanismo antiviral inducido por IFN  $\alpha/\beta$ , eran muy susceptibles a infecciones letales del SNC por herpesvirus (Chapgier *et al*, 2006; Dupuis *et al*, 2003). Además, se ha reportado que el gen humano que codifica para la isoforma  $\epsilon 4$  de la apolipoproteína E (ApoE4) está asociado con el aumento en la cantidad de HSV-1 en cerebro (Burgos *et al*, 2003, 2006).

#### 2.3.1. Neuroinvasividad

El potencial neuroinvasivo de PrV recae en la intervención de al menos tres proteínas de membrana no esenciales que dirigen el transporte retrógrado del virus (trayecto hacia los ganglios sensoriales). Luego de la inoculación intranasal con PrV, las glicoproteínas E e I y la proteína Us9 permiten la progresión viral desde las neuronas olfativas presinápticas hacia las

neuronas postsinápticas (Kritas *et al*, 1995; Enquist *et al*, 2002; Brideau *et al*, 2000; Card *et al*, 1992; Tirabasi y Enquist, 2000). El complejo gE/gI también está involucrado en la progresión neurona a neurona en HSV-1 (Dingwell *et al*, 1995).

Para estudiar el rol de la gB en el neurotropismo de PrV, se desarrolló un virus recombinante donde el gen de gB de PrV fue reemplazado por el gen de gB de BHV-1 (Geerts *et al*, 2000). El reemplazo de gB produjo un aumento del neurotropismo de PrV, probablemente debido al cambio en la ruta de acceso al SNC (Mettenleiter, 2003).

En el herpesvirus bovino 5 (BHV-5), un virus neuroinvasivo y neurovirulento que infecta bovinos, estas características dependen notablemente tanto de la expresión de gE como de la proteína Us9, ambas involucradas en el transporte viral desde la neurona presináptica hacia la postsináptica (Chowdhury *et al*, 2000b, 2002).

### 2.3.2. Neurovirulencia

Los genes implicados en la neurovirulencia de los alfa herpesvirus se clasifican en tres grupos: las glicoproteínas virales, las enzimas que intervienen en el metabolismo de los ácidos nucleicos y los mecanismos moduladores de la respuesta inmune.

La delección de los genes no esenciales que codifican para gG (US4), gE o gI de HSV-1, generaron cepas de virulencia atenuada (Weber *et al*, 1987; Meignier *et al*, 1988). Asimismo, diversas mutaciones a nivel de la secuencia codificante de la glicoproteína esencial K (UL53) atenuaron la neurovirulencia de HSV-1 sin afectar la multiplicación viral en cultivo de tejidos (Moyal *et al*, 1992).

Los alfa herpesvirus que infectan células diferenciadas no replicativas tales como las neuronas, han evolucionado de manera de adquirir un arsenal enzimático necesario para la multiplicación viral dentro de las células en reposo (Muylkens *et al*, 2003). El gen UL23, codifica para el complejo heterodimérico de la timidina quinasa (TK). Esta enzima fosforila a la deoxitimidina generándose el producto necesario para la síntesis de DNA en las células quiescentes (Roizman y Pellet, 2001). Los inhibidores competitivos de la TK son la base de la creación de los compuestos antivirales de los herpesvirus (revisado en Field *et al*, 2006). Las cepas TK- de BHV-1 y PrV resultaron ser menos virulentas que las cepas salvajes (Ferrari *et al*, 2000; Kaashoek *et al*, 1996b), sin embargo, la cepa BHV-1 TK- conserva su capacidad neuroinvasiva, de modo que es capaz de establecer latencia y reactivarse (Whetstone *et al*, 1992). Las mutantes de delección de los genes UL39 y UL40 (codifican para la ribonucleótido reductasa) de PrV son avirulentas luego de la administración intranasal de cerdos (De Wind *et al*, 1993). Un estudio clínico realizado en bovinos con cepas mutantes de BHV-1, demostró la importancia de la dUTPasa en la patogenia de la rinotraqueitis infecciosa bovina (enfermedad ocasionada por la infección con BHV-1) (Liang *et al*, 1997).

Algunos de los productos de los genes de los alfa herpesvirus que interfieren con la respuesta inmune del hospedador están involucrados en la neurovirulencia. Estos serán descritos en la sección siguiente.

## **2.4. Evasión de la respuesta inmune**

La coexistencia de un virus y su hospedador inmunocompetente requiere, para la supervivencia de ambos, un balance entre el nivel de replicación viral y el *clearance* viral por medio del sistema inmune. El sistema inmune del hospedador emplea una gran variedad de estrategias para poder eliminar un virus, y éstos, a su vez, han desarrollado una serie de mecanismos de evasión de la respuesta inmune de su hospedador con el objetivo de extender el período “ventana” para la replicación viral y la diseminación de las partículas virales (Vossen *et al*, 2002). Finalmente, el conjunto de factores virales responsables de la evasión del sistema inmune del hospedador permiten al virus persistir en el mismo y establecer una infección latente, así como, también, producir los efectos deletéreos concomitantes a la inmunodepresión inducida por las diferentes funciones virales.

La respuesta inmune, tanto inespecífica como específica, desarrollada por el hospedador frente a un virus tiene como objetivo limitar la infección viral y eliminar las células infectadas. Los mecanismos principales del sistema inmune inespecífico son la inhibición de la infección por los interferones de tipo I (IFN  $\alpha/\beta$ ) y la eliminación de las células infectadas por las células *natural killer*. La respuesta específica está constituida por los anticuerpos que bloquean la unión del virus a la célula hospedadora y la entrada a ella, y por los linfocitos T citotóxicos, los cuales combaten la infección mediante la destrucción de las células infectadas.

### **2.4.1. Evasión del sistema inmune no específico**

La primera respuesta del hospedador frente a una infección viral consiste en la expresión y secreción de los interferones (IFNs), llevando a las células a un estado antiviral y contribuyendo a la inducción y regulación de la subsiguiente respuesta inmune antiviral. En particular los IFNs de tipo I ( $\alpha/\beta$ ), inducen rápidamente el estado antiviral dentro de las células, por lo que los virus han desarrollado diversos mecanismos para evadir esa respuesta (para revisar ver Biron y Sean, 2001; Goodbourn *et al*, 2000). Luego de la estimulación celular por IFN $\alpha/\beta$ , se sintetiza la proteína quinasa dependiente de ARN doble cadena (PKR). Luego de la infección viral, se produce la activación de la PKR, ésta fosforila la subunidad  $\alpha$  del factor de iniciación de la traducción eIF2 $\alpha$ , y de esta manera, se bloquea la traducción del ARN viral en proteínas dentro de la célula hospedadora. La proteína viral ICP34.5 de HSV-1, contrarresta el efecto de la PKR, ya que desfosforila el factor eIF2 $\alpha$  (Mossman *et al*, 2002). Asimismo, la proteína US11 es una proteína que se asocia al ARN, impidiendo la activación de la PKR

(Cassady *et al*, 1998). La proteína ICP0 previene la transcripción de los genes regulados por IFN tanto en HSV-1 (Eidson *et al*, 2002) como en BHV-1 (Henderson *et al*, 2005), a través de la inhibición de los factores regulatorios activados por IFN -3 (IRF-3) y IRF-7 (Lin *et al*, 2004).

Un segundo mecanismo del sistema inmune inespecífico, es el sistema del complemento. La vía alternativa del complemento consiste en una cascada regulada de reacciones que conducen a la destrucción de las células infectadas por la formación de un complejo de ataque a la membrana. La enzima clave para la activación de este sistema es la C3 convertasa. La glicoproteína C (gC) de diversos alfaherpesvirus, interfiere sobre esta enzima en dos niveles diferentes. El primer mecanismo, reportado en HSV-1, PrV, BHV-1 y EHV-1 (Fries *et al*, 1986; Huemer *et al*, 1992, 1993 y 1995), consiste en la asociación de la gC (a través de un dominio central) al fragmento C3b, el cual es un componente esencial de la C3 convertasa (Friedman *et al*, 1984). El segundo consiste en la interacción del dominio N-terminal de gC con una proteína sérica, la properdina, la cual interviene en la estabilización de la C3 convertasa. De esta manera, la gC acelera la degradación de la C3 convertasa al secuestrar la properdina (Hung *et al*, 1994).

Recientemente, se ha descrito un nuevo modo de inmunomodulación en los alfaherpesvirus, ya conocido entre los poxvirus, los beta- y gammaherpesvirus. Se trata de la interacción viral con el sistema de quemoquinas, las cuales juegan un rol crucial en la organización de las respuestas inmunitarias e inflamatorias antivirales. Los virus han desarrollado tres estrategias que les permiten modular la acción de las quemoquinas: la secreción de quemoquinas homólogas agonistas o antagonistas, la síntesis de receptores homólogos, y la secreción de proteínas solubles que se asocian a quemoquinas. La glicoproteína G (gG), de gran parte de los alfaherpesvirus, representa un ejemplo de la tercer estrategia. Esta glicoproteína, que está presente en la envoltura viral, tanto en su forma secretada como expresada a nivel de la membrana plasmática de las células infectadas, posee la capacidad de asociar diversas quemoquinas. De esta manera, bloquea la interacción con su receptor celular e inhibe la transducción de señales y la migración celular inducida por dicha quemoquina. Este mecanismo se ha demostrado *in vitro* en BHV-1, BHV-5, herpesvirus caprino 1 (CaHV-1), herpesvirus cervino 1 (CeHV-1), herpesvirus de reno 1 (RanHV-1), EHV-1, EHV-3 (Bryant *et al*, 2003) y herpesvirus felino 1 (FeHV-1) (Costes *et al*, 2005). Hasta el momento, este tipo de función no ha sido demostrada en alfaherpesvirus humanos.

#### **2.4.2. Evasión del sistema inmune específico**

Las estrategias descritas en esta sección son aquellas utilizadas por los alfaherpesvirus con el fin de disminuir el reconocimiento de las partículas virales por el sistema inmune específico, tanto de su componente celular como humoral. La propagación viral de célula a célula y el transporte axonal (retrógrado) permiten reducir al máximo la fase extracelular de los viriones y, de esta manera, se evade el reconocimiento por los efectores del sistema inmune.

El complejo gE-gI de HSV-1 puede actuar de receptor de la fracción Fc de los anticuerpos circulantes (Nagashunmugam *et al*, 1998). De esta manera, el virus captura los anticuerpos a nivel de la envoltura viral o de la membrana de la célula infectada, generando un "aglomerado" de gran tamaño que juega un rol protector frente a las células inmunes. Este mecanismo también se reportó en PrV (van de Walle *et al*, 2003), mientras que para BHV-1 y EHV-1 no existen resultados concluyentes sobre la implicancia de gE/gI en este fenómeno (Audonnet *et al*, 1990; Whitbeck *et al*, 1996). En PrV, se identificó otra estrategia de evasión del sistema inmune ligada a la respuesta de anticuerpos (Favoreel *et al*, 1999). Los anticuerpos dirigidos contra las glicoproteínas de PrV inducen la endocitosis de las glicoproteínas virales expresadas en la superficie de los monocitos. La gB y gD juegan un papel determinante en este mecanismo. De este modo, el virus puede quedar alojado dentro de los monocitos que expresan muy pocos antígenos virales, y utilizarlos como vehículo para una infección sistémica.

La proteína inmediata temprana ICP47 bloquea la presentación de antígenos por el CMH-I. Esta propiedad ha sido demostrada para HSV-1 (York *et al*, 1994; Hill *et al*, 1995; Tomazin *et al*, 1996), BHV-1 (Hinkley *et al*, 2000; Koppers-Lalic *et al*, 2001; Gopinath *et al*, 2002), PrV (Ambagala *et al*, 2000, 2003) y EHV-1 (Koppers-Lalic *et al*, 2005). Esta proteína viral interfiere con el transportador asociado a la presentación de antígenos (TAP) a nivel del retículo endoplasmático, e inhibe la ligación de los péptidos antigénicos al CMH-I. La actividad de la ICP47 es crucial para la neurovirulencia ya que inhibe la respuesta citotóxica de las células CD8+. En el hospedador infectado, las células CD8+ juegan un rol importante en el control de la multiplicación viral a nivel de los ganglios sensitivos e impiden la transmisión de la infección al sistema nervioso central (Goldsmith *et al*, 1998). En el caso de VZV, la proteína quinasa codificada por el ORF66 interfiere con el transporte de las moléculas de CMH-I hacia la superficie celular, y en particular de las células CD3+ (Abendroth *et al*, 2001). Esta capacidad del virus es fundamental para su patogenicidad ya que los linfocitos CD3+ infectados no son reconocidos por el sistema inmune y pueden ser utilizados como vehículo de diseminación de las partículas virales (Abendroth *et al*, 2001). Este mecanismo de inhibición de la expresión del CMH-I, también le permite al VZV persistir en estado de latencia en células no neuronales satélites, en el seno de los ganglios nerviosos. En el caso de EHV-1 una proteína temprana del virus induce un aumento en la endocitosis de las moléculas CMH-I de la membrana celular (Rappocciolo *et al*, 2003).

Finalmente, otro mecanismo para reducir la respuesta inmune celular es destruyendo las células del sistema inmune. En este sentido, se ha reportado la infección de células CD4+ por BHV-1 (Winkler *et al*, 1999).

## 2.5. Latencia y reactivación

Los alfa herpesvirus poseen la capacidad de establecer latencia en neuronas de ganglios sensoriales (ganglio trigémino y sacro) principalmente, aunque se ha demostrado la existencia de ADN viral en diversas regiones del SNC y tonsilas (revisado por Vogele *et al*, 2003). Durante la



latencia no se produce virus infeccioso, y solo bajo ciertos estímulos esta situación será revertida induciéndose la reactivación del virus y la re-excreción del mismo en el sitio inicial de infección. Los procesos de latencia y reactivación son de fundamental importancia a nivel de la virulencia y la patogenia de los alfa herpesvirus dado que el genoma viral latente no puede ser eliminado del hospedador infectado (Muytjens *et al*, 2003). Un hospedador latentemente infectado constituye un reservorio natural del virus. Se han reportado casos de latencia doble: neuronas humanas portando infección latente con HSV-1 y VZV (Theil *et al*, 2003) y bovinos con 2 cepas de BHV-1 (Whetstone y Miller, 1989).

Tomando como ejemplo a HSV-1, el ciclo de latencia-reactivación fue dividido en tres pasos principales: establecimiento, mantenimiento y reactivación (Jones, 2003).

El establecimiento de la latencia ocurre durante la infección aguda y se produce cuando el genoma viral entra a una neurona sensorial. Posteriormente, la expresión de los genes virales asociados al ciclo lítico es interrumpida, con excepción de una familia de ARNs denominados *transcripts asociados a la latencia* (LAT).

La etapa de mantenimiento de la latencia dura toda la vida del hospedador y se define como el período donde no se detectan partículas virales infecciosas (por aislamiento viral) (Jones, 2003). El genoma viral "en latencia" está presente en forma de episoma circular (Rock y Fraser, 1983, 1985) y está asociado a histonas celulares (Deshmane *et al*, 1989). Durante esta etapa, todos los alfa herpesvirus expresan solamente los LAT, con la única excepción de VZV, donde el estado de latencia está acompañado por la expresión a gran escala de la proteína inmediata temprana IE63 (Sadzot-Delvaux *et al*, 1998). Existen dos tipos de LAT: uno es de gran tamaño (aproximadamente 8.5 kpb) y poliadenilado (Dobson *et al*, 1989; Zwaagstra *et al*, 1990; Deatly *et al*, 1988; Rock *et al*, 1987); los otros, más abundantes, son productos de *splicing* del transcripto de mayor tamaño, no poseen *cap*, no son poliadenilados y su tamaño varía entre 1.5-2 kpb (Krummenacher *et al*, 1997; Farrel *et al*, 1991). Los LAT contienen varios ORFs pequeños y existe un reporte de un antígeno asociado a la latencia (Doerig *et al*, 1991).

En el caso de BHV-1, los bovinos infectados latentemente expresan un único gen denominado LR (gen asociado a la latencia), el cual es un transcripto antisentido al gen de la proteína inmediata temprana ICP0 (Jones *et al*, 2006). Hossain *et al* (Sawtell *et al*, 1997) identificaron una proteína producto de la traducción del gen LR. Asimismo, se ha sugerido que varios ARNs del gen LR poseen, *per se*, la capacidad de inhibir la expresión de bICP0 (Geiser *et al*, 2002) y prevenir el crecimiento celular (Geiser y Jones, 2005).

La etapa de reactivación se inicia luego de que ciertos estímulos externos (por ejemplo, estrés e inmunosupresión) estimulen la expresión de genes virales. Hasta el momento no se ha definido si la neurona que realiza la reactivación sobrevive y mantiene la latencia, o si muere como consecuencia de la infección productiva del virus (Jones, 2003). La reactivación de los alfa herpesvirus produce enfermedades recurrentes y transmisión del virus a hospedadores susceptibles.

Diversos trabajos han demostrado la importancia de los LAT (y el gen LR para BHV-1) en el ciclo de latencia –reactivación (revisado en Jones, 2003, 2006). En este sentido, se ha reportado que LAT aumenta el establecimiento de latencia en ratones (Sawtell y Thompson, 1992; Thompson y Sawtel, 1997) ya que al inocularlos con una cepa LAT- presentaron menores niveles de ADN viral en el ganglio trigémino (GT) (Devi-Rao *et al*, 1994; Maggioncalda *et al*, 1996). Asimismo, se observó que LAT reprime los genes virales productivos en GT de ratones durante la infección aguda (Chen *et al*, 1997; Garber *et al*, 1997). Utilizando modelos de infección de conejos (infección ocular), se ha demostrado la importancia de LAT en la reactivación ya que al inocularlos con la cepa mutante LAT- de HSV-1, se observó una gran inhibición de la reactivación (Perng *et al*, 1996, 1999). Por otro lado, se ha reportado que LAT interfiere con la apoptosis de células transientemente transfectadas (Ahmed *et al*, 2002; Imman *et al*, 2001; Perng *et al*, 2000), y que la interferencia con la apoptosis correlaciona con la habilidad de LAT para inducir reactivación (Imman *et al*, 2001). Estos datos sugieren que la actividad antiapoptótica de LAT es importante durante el ciclo de latencia-reactivación. Esta hipótesis está sustentada por la observación de que LAT promueve la supervivencia de neuronas del GT en conejos infectados (Perng *et al*, 2000).

### **3. La recombinación en los Alfaherpesvirus**

#### **3.1. Definición y generalidades**

La recombinación genética es un proceso molecular por el cual el intercambio de material genético genera nuevas combinaciones a partir de ácidos nucleicos parentales (Connelly, 1996). Los herpesvirus, constituidos por una única molécula de ácido nucleico (sistema monocromosómico), realizan recombinación intramolecular entre genomas de virus homólogos; mientras que, los virus con genoma segmentado (*Orthomyxoviridae*, *Reoviridae*) sufren la recombinación intermolecular. El proceso de recombinación actúa manteniendo la integridad cromosomal a través de la reparación (ligado a la replicación genómica) y generando diversidad genética (en relación a la evolución viral) (Umene, 1999).

Si el evento de recombinación ocurre entre cepas de una misma especie de alfaherpesvirus se denomina recombinación intraespecífica. Si este fenómeno ocurre entre distintas especies virales se denomina recombinación interespecífica.

Desde el punto de vista de la evolución viral, la recombinación puede ser considerada como una *driving force* esencial que aumentaría la probabilidad de “vehiculizar” las mutaciones raras, pero ventajosas, en el seno de una especie viral (Thiry *et al*, 2005).

Asimismo, la recombinación puede estar involucrada en la emergencia (repentina) de “nuevos” virus que combinan un fenotipo altamente virulento con otras características (Thiry *et*

*a/*, 2005). En efecto, se ha demostrado experimentalmente, que luego de la co-inoculación de dos cepas avirulentas de HSV-1 se observó un fenotipo virulento (Javier *et al*, 1986).

Las propiedades biológicas de los alfa herpesvirus actúan sinérgicamente para favorecer la recombinación: alta prevalencia de infecciones en la mayoría de los mamíferos y aves, superficies muco-cutáneas como sitios iniciales de replicación, alta probabilidad de co-infecciones, ciclo lítico corto, estado de persistencia o latencia interrumpidos por estímulos de reactivación y replicación viral en regiones periféricas (Thiry *et al*, 2005). Asimismo, la latencia constituye un mecanismo adicional que ayuda a mantener un genoma viral mutado o recombinante durante largos períodos de tiempo en una pequeña población.

### **3.2. Mecanismos de recombinación**

La recombinación opera de cuatro formas diferentes: la recombinación homóloga, la recombinación sitio específica, la transposición y la recombinación ilegítima. Los herpesvirus desarrollan el primer y el cuarto mecanismo de recombinación (Umene, 1999).

El modelo actualmente aceptado para explicar la recombinación homóloga es el basado en el modelo de "ruptura-reparación" del ADN doble cadena propuesto para *Escherichia coli* (Leach, 1996; Kowalczykowski *et al*, 1994; Szostak *et al*, 1983; Lushnikov *et al*, 2003). Este modelo se divide en cuatro etapas: la iniciación (procesamiento), el apareamiento homólogo e intercambio de ADN entre hebras, la extensión del heteroduplex de ADN (migración de hebras de ADN), y la resolución por clivado de la unión de Holiday (Kowalczykowski *et al*, 1994; Szostak *et al*, 1983).

El segundo mecanismo de recombinación presente en los herpesvirus es la recombinación ilegítima, la cual no se basa ni en la homología de secuencias ni en elementos genéticos definidos (tal como ocurre en la transposición). Este tipo de recombinación es la causa principal de rearrreglos genómicos en las moléculas de ADN en juego, obteniéndose duplicación de secuencias o deleción. Un caso de recombinación ilegítima se detectó en BHV-1, en el cual se produjo la deleción de los genes Us8 y Us9 y la duplicación e inversión de US1,5 (Rijsewijk *et al*, 1999b).

En los herpesvirus, la recombinación está íntimamente ligada a la replicación del ADN viral (Roizman y Pellet, 2001; Schynts *et al*, 2002). Un conjunto coordinado de factores celulares (Brown *et al*, 1992) y virales (Taylor y Knipe, 2004; Wilkinson *et al*, 2003) permiten que ocurran estos eventos interdependientes de replicación-recombinación. Si bien el modelo de HSV-1 de replicación-recombinación viral se encuentra ampliamente documentado, el mecanismo exacto sigue siendo un tema de discusión. El modelo propuesto se divide en tres etapas clave, y se describe a continuación (Lehman *et al*, 1999; Thiry *et al*, 2005).

### 3.2.1. Entrada del genoma viral al núcleo

El modelo de replicación de HSV-1 sugiere que la replicación comienza cuando el DNA viral lineal se circulariza dentro del núcleo (Garber *et al*, 1993; Poffenberger *et al*, 1985). Esta circularización resulta de la ligación de los extremos del genoma o de la recombinación entre las secuencias "a" presentes en los extremos de las secuencias repetidas que flanquean las regiones UL y US del genoma viral. Este fenómeno de circularización se observó en ciertos alfa herpesvirus tales como VZV (Kinchington *et al*, 1985) y PrV (Jean y Ben-Porat, 1976) y otros herpesvirus tales como el citomegalovirus humano (HCM) (McVoy y Adler, 1994). Un trabajo reciente ha puesto en duda la necesidad de que el ADN viral circularizado sea un prerequisite para la replicación (Jackson y DeLuca, 2003; Sandri-Goldin, 2003).

### 3.2.2. Replicación del ADN viral partiendo de un templado inicial y obtención de ADN concatémico

El modelo de replicación de ADN de HSV-1 postula que el ADN viral circularizado sirve como templado para una primer ronda de replicación *tita*, comenzando por secuencias conocidas como orígenes de replicación (*ori*) (Stow y McMonagle, 1983; Weller *et al*, 1985). Si bien no existen pruebas fehacientes de la existencia de intermediarios de replicación *tita*, recientemente se ha reportado la presencia de dos *ori* dentro de las secuencias repetidas que rodean la región US de BHV-1 (Chew *et al*, 2005).

Luego de este paso de replicación bidireccional, se produce un cambio hacia una replicación unidireccional por medio de un mecanismo aún desconocido. El modelo del círculo rodante ha sido clásicamente aceptado para explicar la replicación unidireccional de los herpesvirus (Gilbert y Dressler, 1968). En este modelo la replicación avanza a lo largo del genoma circular y produce intermediarios de gran tamaño llamados concatémeros, en los cuáles las nuevas moléculas de ADN sintetizadas se unen cabeza a cola (Thiry *et al*, 2005). Sin embargo, se ha observado que la estructura resultante de la replicación del ADN viral no es una molécula lineal sino que está altamente ramificada (Bataille y Epstein, 1994, 1997; Martinez *et al*, 1996; Zhang *et al*, 1994). Es probable que los eventos de recombinación que ocurren durante la replicación sean los responsables de originar esta estructura ramificada (Schynts *et al*, 2003a; Severini *et al*, 1994, 1996; Thiry *et al*, 2005).

En HSV-1, la recombinación ocurre desde el momento en que se detecta la presencia de ADN concatémico (Zhang *et al*, 1994); en BHV-1 se ha demostrado la presencia de concatémeros mixtos producto de la recombinación (Meurens *et al*, 2004b). En definitiva, la recombinación es probablemente inherente al mecanismo de replicación de ADN viral por su contribución significativa en la síntesis del concatémero maduro y en la estabilización del genoma reparando las rupturas de la doble cadena (Nimonkar y Boehmer, 2003).

El paso final de la replicación de ADN de los alfa herpesvirus ocurre cuando los concatémeros son clivados para producir genomas de molécula única, que serán luego

empaquetados en las cápsides recién formadas (Chowdhury *et al*, 1990; Deiss y Frenkel, 1986; Hammerschmidt *et al*, 1988; Varmuza y Smiley, 1985).

### 3.2.3. Generación de isómeros genómicos por recombinación entre secuencias repetidas invertidas

En el caso de HSV-1, un *Simplexvirus* que posee un genoma de tipo E, pueden encontrarse 4 isómeros genómicos (definidos por la orientación de los segmentos L –largo- y S –corto- del genoma) en cantidad equimolar en los viriones producidos durante una infección. Las inversiones en la orientación de los segmentos L y S son consecuencia de eventos de recombinación entre las secuencias “a” presentes en las secuencias repetidas invertidas (Jenkins y Roizman, 1986; Mocarski, 1980; Poffenberger y Roizman, 1985; Smiley *et al*, 1981).

En los *Varicellovirus* BHV-1 y EHV-1 que poseen genomas de tipo D, el segmento L está fijado predominantemente en una orientación (orientación prototipo), por lo tanto, son detectados solo dos isómeros en la progenie viral debido a la inversión del segmento S (Roizman, 2001). Sin embargo, se han reportado inversiones del fragmento L a nivel de DNA concatémico tanto en BHV-1 (Schyns *et al*, 2003a) como EHV-1 (Slobedman y Simmons, 1997). Estos resultados permiten hipotetizar que a partir de una orientación genómica prototipo, pueden obtenerse concatémeros con los dos tipos de orientación de los fragmentos L y S, debido a la ocurrencia de recombinación en la unión de los mismos (Schyns *et al*, 2003a). Sin embargo, dado que en la progenie viral no se encuentra una proporción equimolar de las 4 orientaciones posibles, se ha sugerido la existencia de un mecanismo de selección de los isómeros a nivel de los procesos de clivado y encapsidación del ADN viral (Schyns *et al*, 2003a).

### **3.3. Factores que influyen en la recombinación**

La recombinación entre dos genomas exige que las dos moléculas participantes en el evento de recombinación estén presentes simultáneamente en el seno de la célula infectada. Todos los factores que influyan sobre la probabilidad de coinfección celular por dos virus poseen un impacto sobre la recombinación. En este contexto, el hospedador, la célula y el virus son reconocidos como factores involucrados de manera preponderante en la recombinación (Meurens *et al*, 2004).

Los factores del hospedador a considerar pueden ser la vía de entrada o de inoculación de los agentes infecciosos, o la respuesta inmune innata y específica. Asimismo, la distancia entre los sitios de inoculación influye fuertemente sobre la recombinación. Se ha demostrado para PrV y BHV-1 que la recombinación ocurre cuando se administran ambas cepas en altas dosis y en el mismo lugar (Schyns *et al*, 2003b; Glazenburg *et al*, 1994).

La presencia de interferon y otras quemoquinas, la susceptibilidad y el ciclo celular, son factores celulares que probablemente actúen sobre la tasa de recombinación, aunque han sido poco estudiados. Un ejemplo de la importancia que los factores celulares poseen en promover

eventos de recombinación fue observado para HSV-1, donde la frecuencia de recombinación observada en células BHK21/C13 difería significativamente de la detectada en células *Vero* (Brown *et al*, 1992).

Los factores virales que actúan sobre la recombinación, han sido estudiados con mayor detalle, y varios de ellos están muy ligados a los factores celulares. Se han reportado efectos sobre la tasa de recombinación en los siguientes casos:

- i) Dosis de virus inoculado: la recombinación entre dos cepas de PrV es dosis dependiente (Glazenburg *et al*, 1994). Una infección con una alta multiplicidad de infección (moi) aumenta la tasa de recombinación entre dos cepas de PrV, sin embargo, aun con una moi baja se ha reportado recombinación (Dangler *et al*, 1994). Realizar la inoculación con dosis similares de cada virus evita la dominancia de una de las cepas parentales (Thiry *et al*, 2005).
- ii) Intervalo de tiempo que separa la inoculación de las cepas virales en situaciones de coinfección: se ha demostrado para BHV-1 y PrV, *in vitro*, que una diferencia de 4 horas entre la inoculación de las cepas virales, es el máximo intervalo de tiempo que permite una coinfección productiva y la detección de cepas recombinantes (Meurens *et al*, 2004b, Banfield *et al*, 2003). *In vivo*, se han observado cepas recombinantes de PrV luego de inoculaciones separadas por 2 horas (Glazenburg *et al*, 1994). Asimismo, el freno que constituye la inhibición temporal de la superinfección sobre la recombinación puede ser evitada por los herpesvirus que pueden realizar infecciones latentes (Muylkens, 2006a). Es decir, dos virus que no produjeron una coinfección debido a la separación temporal de la infección primaria, pueden establecer latencia en el seno del mismo ganglio nervioso sensitivo. En respuesta a un estímulo de reactivación, los dos genomas pueden ser reexcretados de manera simultánea y, entonces, producir una coinfección que pueda dar lugar a eventos de recombinación. En este sentido, se ha reportado una infección latente con dos cepas virales de BHV-1 en un animal infectado con la segunda cepa luego de 5 meses (Whetstone y Miller, 1989). Asimismo, se han detectado neuronas humanas infectadas con dos alfa herpesvirus, HSV-1 y VZV (Theil *et al*, 2003).
- iii) Distancia que separa los marcadores de recombinación: diversos estudios realizados con HSV-1, han demostrado que la probabilidad de que ocurran eventos de recombinación es proporcional a la distancia que separa los sitios marcadores investigados (Brown *et al*, 1992; Umene, 1985, 1999). Sin embargo, según las observaciones obtenidas en un estudio con PrV que comparaba las frecuencias de recombinación intra (dentro del gen de TK) e intergénica (entre el gen de TK y de gE, separados 60kpb), la distancia no influye sobre la frecuencia de recombinación entre los genes analizados (Glazenburg *et al*, 1994).

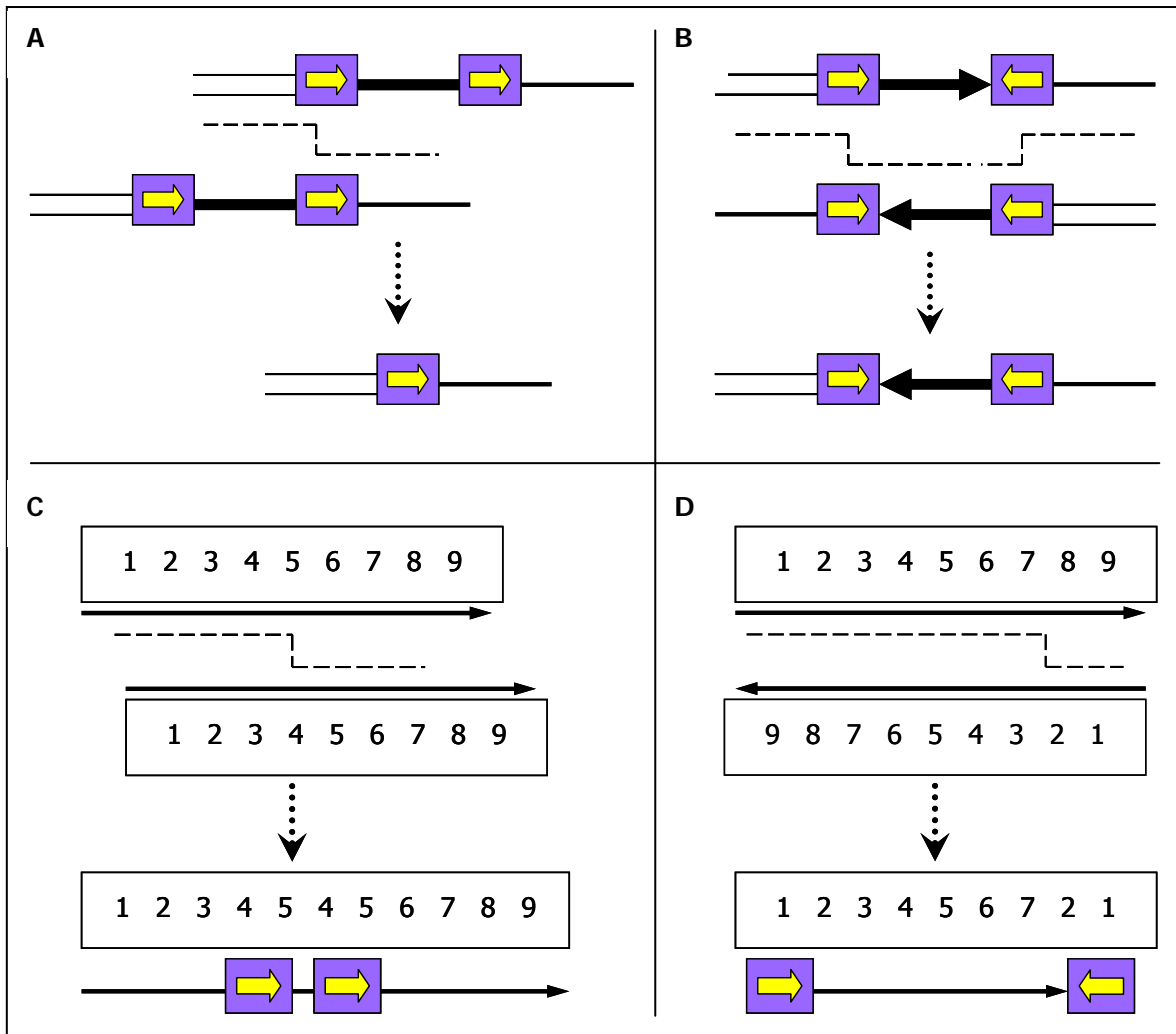
- iv) Grado de similitud genética: la recombinación homóloga se basa en una alta homología de secuencia. Sin embargo, incluso el grado de homología como el que poseen BHV-1 y BHV-5 (85 % homología promedio), o HSV-1 y HSV-2 (75 %), han permitido, bajo condiciones experimentales, la producción de recombinantes interespecíficos BHV-1/5 (Meurens *et al*, 2004a) y HSV-1/2 (Halliburton *et al*, 1977, 1980). Al realizarse coinfecciones entre virus filogenéticamente mas diversos (HSV-1 con BHV-2 o PrV; BHV-1 con CpHV-1, CvHV-1 o CvHV-2) no se logró aislar virus recombinantes (Halliburton *et al*, 1977; Meurens *et al*, 2004a).
- v) Competitividad de las cepas utilizadas: una diferencia en la infecciosidad o en la capacidad de multiplicación entre las cepas virales utilizadas en la coinfección, o entre los virus recombinantes y sus cepas parentales, favorece, tanto *in vitro* como *in vivo*, a la cepa más competitiva (Muykens, 2006a). Por ejemplo, en experimentos de coinfección de neuronas con cepas recombinantes de PrV, la cepa más virulenta tendía a suprimir la replicación y diseminación de la menos virulenta, independientemente de la dosis utilizada (Kim *et al*, 1999).

### 3.4. Consecuencias moleculares y biológicas de la recombinación

La recombinación puede producir rearrreglos intramoleculares tales como inversiones, duplicaciones y deleciones de secuencias únicas (Maurens *et al*, 2001; Umene, 1999).

La recombinación homóloga entre un par de secuencias repetidas directas puede ocasionar la deleción de la región situada entre las repeticiones (Umene, 1999, figura 2a). Este tipo de evento fue descrito en CMV humano para explicar una deleción de 929 pb ubicada entre dos repeticiones de 4 pb cada una (Dargan *et al*, 1997). En el caso de recombinación homóloga entre secuencias repetidas invertidas, la región rodeada por las secuencias invertidas cambiará de orientación (Figura 2b). Este tipo de inversión de secuencias, por ejemplo, ocurre en el genoma de HSV-1 y BHV-1, donde la inversión en la orientación de las regiones UL y US es el resultado de un episodio de recombinación homóloga entre secuencias repetidas invertidas de un mismo concatémero o de dos concatémeros diferentes (Bataille *et al*, 1997; Martin *et al*, 1997; McVoy *et al*, 1994).

Las repeticiones directas e invertidas son dos típicas duplicaciones genómicas encontradas en los herpesvirus que pueden haberse originado por fenómenos de recombinación ilegítima entre dos moléculas con la misma secuencia (Figura 2 c, d) (Umene, 1999). Si ocurriera un episodio de recombinación ilegítima tal como se muestra en la figura 1d, puede producirse la deleción de una secuencia interna de las dos moléculas implicadas en ese proceso. En este sentido, Rijsewijk *et al* (1999b), aislaron una cepa de BHV-1 que contenía una deleción interna de 2.7 kpb en la región US y una duplicación de la secuencia inicial de US, probablemente debido a un evento de recombinación ilegítima.



**Figura 2.** Rearreglos moleculares observados como consecuencia de la recombinación en los Herpesvirus (adaptado de Umene, 1999; Meurens *et al*, 2001). A: La recombinación entre un par de secuencias repetidas directas pertenecientes a dos genomas diferentes, lleva a la delección de la región situada entre las repeticiones. B: La recombinación entre un par de secuencias repetidas invertidas lleva a la inversión de la orientación de la secuencia contenida entre las repeticiones. C: La recombinación ilegítima entre dos moléculas incorrectamente alineadas pero posicionadas en la misma orientación, produce las secuencias repetidas directas. D: La recombinación ilegítima entre dos moléculas en orientación invertida produce las secuencias repetidas invertidas, y una delección interna.

### 3.4.1. Detección de virus recombinantes en condiciones experimentales

Diversos estudios han demostrado que la recombinación de los alfa herpesvirus es un proceso biológico que permite la generación de nuevas combinaciones y conduce, eventualmente, a la restauración de la virulencia de cepas atenuadas.

En HSV-1, Javier *et al* (1986) reportaron que la inoculación de ratones con dos cepas avirulentas indujo la muerte del 62% de los animales, mientras que los ratones inoculados con cada una de las cepas por separado sobrevivían. De esta forma, se mostró que dos cepas de HSV-1 podían interactuar entre ellas y producir recombinantes letales (Javier, 1986). Asimismo,



otros autores observaron que la infección concomitante de dos cepas atenuadas de HSV-1 conducen a una afección ocular y del sistema nervioso más severa, debido a la generación de virus recombinantes (Brandt y Grau, 1990; Brandt *et al*, 2003; Kintner *et al*, 1995; Nishiyama *et al*, 1991). Por otro lado, la recombinación no genera siempre combinaciones virales de mayor virulencia. En efecto, los recombinantes interespecíficos obtenidos a partir de cepas virulentas de HSV-1 y HSV-2, presentaban una virulencia menor a la de las cepas parentales utilizadas (Halliburton *et al*, 1987).

En PrV, la recombinación entre cepas atenuadas se evidenció tanto *in vitro* como *in vivo* (Henderson *et al*, 1990). Una experiencia realizada en cerdos, el hospedador natural del virus, demostró que dos cepas de PrV inoculadas por dos vías diferentes (intranasal e intramuscular) son capaces de generar virus recombinantes (Henderson *et al*, 1991). Asimismo, Dangler *et al* (1993) detectaron, en cerdos, la aparición de cepas virales recombinantes luego de co-infectar con dos cepas virales vacunales de PrV.

Un trabajo realizado *in vitro* con tres cepas de herpesvirus felino 1 (FeHV-1) confirmó la aparición frecuente de virus recombinantes en condiciones experimentales (entre 10,1 y 21,5 %) (Fujita *et al*, 1998).

En el caso de BHV-1, la frecuencia de aparición y la supervivencia de los virus recombinantes generados a partir de dos cepas deleteadas, ha sido investigada en el curso de una infección primaria y reactivación en el hospedador natural (Schynts *et al*, 2003b). En ese trabajo, los animales co-infectados presentaron una alta frecuencia de virus recombinantes. Además, las cepas recombinantes fueron capaces de establecer una infección latente y fueron excretadas luego de inducir la reactivación (Schynts *et al*, 2003b). Asimismo, se encontraron cepas recombinantes entre BHV-1 y BHV-5 (recombinantes interespecíficos) en un experimento de coinfección *in vitro* (Meurens *et al*, 2004).

#### 3.4.2. Detección de virus recombinantes “naturales”

Recientemente, varios estudios han confirmado que la recombinación no es solo un evento frecuente en condiciones experimentales.

En primer lugar, se puede citar el trabajo de Pagamjav *et al* (2005), en el que analizaron diversos aislamientos de EHV-1 subtipo P y B y encontraron un virus recombinante EHV-1 tipo P que contenía el gen BICP4 de EHV-4. Por otro lado, el análisis genético de un aislamiento virulento coreano del virus de la laringotraqueitis infecciosa aviar (ILTV) evidenció la existencia de un evento de recombinación “natural” (Han *et al*, 2001). Si bien en este trabajo los autores no pudieron identificar el lugar exacto donde ocurrió el evento de recombinación, encontraron que la cepa recombinante poseía la secuencia del gen que codifica para TK (gen *TK*) similar a la codificada por las cepas altamente virulentas de ITLV y la secuencia del gen que codifica para la glicoproteína G (gen *gG*) era idéntica a la de las cepas vacunales de Corea.

En tanto, en el área de medicina humana, un estudio ha demostrado una alta tasa de recombinantes de HSV-1 en Gran Bretaña y Corea (Bowden *et al*, 2004). Asimismo, el análisis

de aislamientos clínicos de HSV-1 y VZV, mediante amplificación por PCR y secuenciación, permitió la detección de recombinantes intergénicos e intragénicos (Norberg *et al*, 2004, 2006).

La alta frecuencia de obtención de virus recombinantes en condiciones experimentales sumada a los recientes hallazgos de recombinantes de naturales de diversos alfaherpesvirus, son dos razones que justifican la atención y el interés que debe darse al fenómeno de recombinación.

## **Herpesvirus bovino 1 y herpesvirus bovino 5**

### **1. Descripción**

El herpesvirus bovino 1 (BHV-1) y el herpesvirus bovino 5 (BHV-5) pertenecen a la subfamilia *Alfaherpesvirinae*, género *Varicellovirus*. Ambos virus poseen un genoma de ADN doble cadena, organizado en una región única larga (UL) y una región única corta (US) la cual se encuentra flanqueada por las repeticiones invertidas interna (IR) y terminal (TR) (genoma tipo D) (Roizman y Pellet, 2001). La secuencia US (junto con los fragmentos IR y TR) pueden invertir su orientación en relación a la región UL, por lo que el ADN extraído de la progenie viral de células infectadas posee una cantidad equimolar de dos poblaciones que difieren solo en la orientación de la región US respecto de la UL.

El tamaño total del genoma de BHV-1 es de 135.3 kpb y posee 73 marcos abiertos de lectura (ORF) (acceso a GenBank AJ004801). El genoma de BHV-5 contiene 138.4 kpb (2518pb más que BHV-1) y codifica para 72 ORFs (Delhon *et al*, 2003, acceso GenBank AY261359). Los genes codificados por ambos virus son homólogos a los de HSV-1 (alfa herpesvirus prototipo) con la única excepción del gen UL0.5 que está presente solo en el genoma de BHV-1 (Delhon *et al*, 2003). El genoma de dichos virus codifica para diez glicoproteínas; seis de ellas están en la región UL, gK (UL53), gC (UL44), gB (UL27), gH (UL22), gM (UL10), gL (UL1) y las cuatro restantes en la región US, gG (US4), gD (US6), gI (US7) y gE (US8). La proteína codificada por el gen UL49.5 (gN) es considerada como una falsa glicoproteína ya que no está glicosilada (Liang *et al*, 1996). BHV-1 y BHV-5 poseen una similitud genética del 85% (Engels *et al*, 1986) y una identidad aminoacídica del 82% en promedio (Delhon *et al*, 2003)

El BHV-1 es el agente causal de la rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR), la vulvovaginitis pustular infecciosa (IPV) y la balanopostitis pustular infecciosa (IPB) (Wyler *et al*, 1989). Diversos estudios basados en análisis de restricción (Engels *et al*, 1986; Metzler *et al*, 1986) y en la utilización de anticuerpos monoclonales (Rijsewijk, 1999a, Spilki *et al*, 2005) permitieron la descripción de tres subtipos de BHV-1. El subtipo BHV-1.1 agrupa las cepas

asociadas a los casos respiratorios; los subtipos BHV-1.2a y BHV-1.2b, comprenden las cepas aisladas de casos de infección genital.

El virus BHV-5 fue aislado de casos de meningoencefalitis fatal en bovinos (French, 1962; Bagust, 1972b), y fue considerado como el subtipo encefalítico de BHV-1 (denominado BHV-1.3). En el año 1992, el Comité Internacional de Taxonomía Viral (ICTV) reconoció al BHV-1.3 como un virus diferente (Roizman *et al*, 1992) basados en las evidencias de los ensayos de mapeo con enzimas de restricción (Brake y Studert, 1985; Engels *et al*, 1986), neutralización cruzada (Bagust *et al*, 1972a; Metzler *et al*, 1986) y reactividad con anticuerpos monoclonales (Friedli y Metzler, 1987; Metzler *et al*, 1986), reclasificándolo como BHV-5. Existen dos subtipos de este virus, BHV-5a y BHV-5b, donde las cepas prototipos son N569 (Australiana) y A663 (Argentina) respectivamente (Metzler *et al*, 1986). Recientemente, se ha demostrado por reactividad de anticuerpos monoclonales, la existencia de cepas no-a no-b en aislamientos de Brasil (D'Arce *et al*, 2002).

## **2. Patogenia**

Luego de ingresar por la nariz, BHV-1 y BHV-5 replican extensamente en las mucosas respiratorias y en las tonsilas durante aproximadamente cinco días. En este período es donde se produce la mayor excreción viral, que luego desciende hasta los 10-12 días aproximadamente. Subsecuentemente se disemina a las conjuntivas y por transporte axonal llega al ganglio trigémino. A veces se detecta una leve viremia. Si el ingreso del virus fue por vía genital, este replica en las mucosas vaginal y prepucial, estableciendo latencia en los ganglios sacros. El ADN viral se mantiene en las neuronas probablemente durante todo el transcurso de la vida del animal. El stress ocasionado por transporte o parto, o la administración de glucocorticoides, pueden inducir la reactivación de la infección latente con la consecuente signología y excreción viral.

La infección induce una respuesta humoral y celular a los 10 dpi aproximadamente. Se presume que esta inmunidad persiste de por vida aunque no de manera protectora, ya que los animales infectados pueden reinfectarse. Los anticuerpos maternos se transfieren al ternero por el calostro y lo protegen de la enfermedad. Estos tienen una vida media de tres semanas aunque pueden seguir detectándose hasta los seis meses de vida.

## **3. Enfermedad y cuadro clínico**

La infección con BHV-1 puede producir conjuntivitis, neumonía, desórdenes genitales, abortos, y una infección en el tracto respiratorio superior denominada complejo respiratorio

bovino o fiebre del transporte (*shipping fever*) (Tikoo *et al*, 1995). Debido a la inmunosupresión ocasionada por el virus, los animales pueden sufrir infecciones secundarias bacterianas, por ejemplo con *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida* y *Haemophilus somnus*, y en consecuencia desarrollar neumonía. El aumento en la susceptibilidad a infecciones secundarias esta correlacionada con la disminución de la inmunidad mediada por células luego de la infección con BHV-1 (Carter *et al*, 1989; Griebel *et al*, 1987a,b). La severidad de la enfermedad causada por este virus está influenciada por factores tales como la virulencia de la cepa (Kaashoek *et al*, 1996a), factores del hospedador que le confieran resistencia (especialmente la edad) y potenciales infecciones bacterianas concomitantes.

Las infecciones subclínicas con BHV-1 son bastante frecuentes. Diversas cepas de BHV-1 poseen una baja capacidad de inducir signos clínicos y se han clasificado como cepas de baja virulencia (Kaashoek *et al*, 1996a). Asimismo, este cuadro de signos leves puede ser atribuido a la inmunidad pasiva adquirida por los animales sobretodo en áreas endémicas. En efecto, se ha demostrado que los anticuerpos calostrales son eficientes en la protección contra los signos clínicos de BHV-1 (Lemaire *et al*, 2000b).

Luego de inocular BHV-1 por la vía intranasal, los animales desarrollan pirexia por 4 o 5 días (temperatura máxima de 41°C), acompañada de apatía y anorexia. Las vacas lecheras presentan disminución en su producción durante esos días (Hage *et al*, 1998; van Schaik *et al*, 1999). Luego de 2-3 días de incubación, comienzan a observarse signos respiratorios tales como apariencia rojiza de la mucosa nasal, descarga nasal serosa a mucopurulenta y, en casos severos, estridor traqueal y tos. Una examinación endoscópica reveló el epitelio mucoso de traquea y faringe con apariencia rojiza y con numerosos focos necróticos embebidos en exudados fibrinosos (Muylkens *et al*, 2007). Asimismo, la infección con BHV-1 induce signos oculares tales como conjuntivitis y secreción mucopurulenta.

Se han encontrado casos naturales de abortos por BHV-1 en vacas gestantes en el 4 a 8vo mes, aunque la inoculación experimental de BHV-1 a vacas gestantes en los primeros tres meses también indujo abortos (Chow *et al*, 1964; Miller *et al*, 1986). A través del sistema de diseminación por viremia, BHV-1 atravesaría la barrera materno-fetal y causaría la infección letal del feto (Chow *et al*, 1964; Owen *et al*, 1964). Hasta el momento, solo los subtipos BHV-1.1 y BHV-1.2a han sido asociados con abortos (Miller *et al*, 1991).

Los bovinos neonatos sufren una infección multisistémica luego de la infección congénita antes del parto o temprana post-natal (Mechor *et al*, 1987; Kaashoek *et al*, 1996a; Higgins y Edwards, 1986; Bryan *et al*, 1994). Los animales presentan salivación excesiva y diarrea y mueren en 4-5 días. Las lesiones encontradas en el tracto digestivo constan de gliosis, esofagitis y rumenitis aguda necrotizante.

El subtipo genital de BHV-1 se transmite generalmente durante el apareamiento. La enfermedad ocasionada en la vaca se denomina vulvovaginitis pustular infecciosa, y en el toro, balanopostitis infecciosa. Si bien la infección está restringida a los órganos genitales, se han

repotado casos de infecciones más severas que conducen a orquitis en el toro y endometriosis en la vaca (Gibbs y Rweyemamu, 1977).

La infección de bovinos con BHV-5 puede ocasionar enfermedad neurológica denominada meningoencefalitis. Dependiendo de la cepa viral en cuestión y de la edad y estado inmunológico del animal infectado, el curso de la enfermedad puede ser subclínico, leve o fatal. Los primeros signos detectados consisten en depresión, anorexia y debilidad general; luego, se observan signos nerviosos tales como incoordinación, ceguera, temblores musculares, marcha en círculo, cabeza apoyada contra bebederos o alambrados, convulsiones, pedaleo y muerte, luego de 5 días de haber detectado los primeros signos (Barenfus *et al*, 1963; Bartha *et al*, 1969; Gardiner y Nairn, 1964; Carrillo *et al*, 1983a,b; Riet-Correa *et al*, 1989). En algunos brotes de meningoencefalitis asociada a BHV-5, se observó secreción nasal y ocular previo a la aparición de signos nerviosos (Bartha *et al*, 1969; Carrillo *et al*, 1983b; Schudel *et al*, 1986), y temperatura elevada (entre 40°C y 42°C) (Carrillo *et al*, 1983a,b; Schudel *et al*, 1986). Además, se aisló BHV-5 de un feto abortado (Schudel *et al*, 1986). La tasa de mortalidad de la infección con BHV-5 puede alcanzar el 10%, mientras que la tasa de letalidad frecuentemente supera el 90% (Giraud, 1989). La examinación histopatológica de muestras de SNC de los animales infectados con BHV-5 reveló una ecefalitis con áreas de malacia y leptomeningitis no-purulenta. Asimismo, se observaron manguitos perivasculares, gliosis nodular y difusa, necrosis y cuerpos de inclusión intranucleares en neuronas y astrositos (Carrillo *et al*, 1983a).

Existen varios reportes de inoculaciones experimentales de BHV-5 (Bagust, 1972a,b; Belknap *et al*, 1994; Ashbaugh *et al*, 1997; Cascio *et al*, 1999; Meyer *et al*, 2001; Perez *et al*, 2002; Vogelet *et al*, 2003), sin embargo, no en todos los casos se ha logrado reproducir la enfermedad. Luego de la inoculación intranasal del virus (vía natural de entrada del virus), se detectaron signos respiratorios leves (descarga nasal y ocular) antes de la aparición de signos nerviosos (Bagust, 1972a,b; Belknap *et al*, 1994; Meyer *et al*, 2001; Perez *et al*, 2002). Solo se reportó un caso de hipertermia ( $T^{\circ}$  rectal  $\geq 40^{\circ}\text{C}$ ) (Belknap *et al*, 1994). Luego de 8 a 13 días post infección, los animales presentaron signos nerviosos similares a los descritos en las infecciones naturales (Bagust, 1972a,b; Belknap *et al*, 1994; Meyer *et al*, 2001; Perez *et al*, 2002). Los animales que sobreviven a la enfermedad establecen una infección latente en el ganglio trigémino y en diversas regiones del SNC (Vogelet *et al*, 2003).

Por otro lado, la inoculación intravaginal, epidural e intracerebral indujeron enfermedad neurológica y muerte en los bovinos inoculados (French, 1962; Bagust, 1972a,b). La infección por vía intravenosa no indujo signos nerviosos, por lo tanto, se sugirió que la diseminación por viremia no estaría involucrada en la neuropatogenia de BHV-5 (Bagust, 1972b). Finalmente, luego de una inoculación intraconjuntival (Bagust, 1972a) se observó un aumento en la temperatura corporal y replicación viral pero no se observaron signos nerviosos.

#### 4. Epidemiología

Las infecciones con BHV-1 están distribuidas mundialmente aunque existen diferencias en la prevalencia y la incidencia de las mismas (Ackermann y Engels, 2006).

Un reporte de Algeria indica una seroprevalencia del 20% (Achour y Moussa, 1996). En Estados Unidos (EEUU), Canadá, Australia y Nueva Zelanda, se realiza vacunación contra BHV-1 de forma individual, lo cual puede ayudar en la disminución de pérdidas económicas debido a los signos clínicos de la infección pero contribuye con la alta seroprevalencia (van Drunen Littelvan der Hurk *et al*, 1997). En relación a países del Este solo algunos de ellos, como Filipinas, Singapur, Sri Lanka y Vietnam, reportaron no haber tenido casos de IBR (Ackermann y Engels, 2006).

Los primeros brotes de IBR en Europa se presentaron en los 70s (Edwards, 1988; Metzler *et al*, 1985). Desde ese momento, diversos países comenzaron a desarrollar programas oficiales de control de BHV-1. Dado que la Unión Europea (UE) permitió a los países libres de IBR exigir condiciones de importación de animales, semen y embriones, aumentaron los esfuerzos para controlar y erradicar al BHV-1 de la UE (Ackermann y Engels, 2006). En la actualidad existen distintos estatus de erradicación de IBR en esa región (tabla 2).

Países libre de IBR Vacunación prohibida	Países con IBR			
	Con vacunación	Plan para inicio de vacunación	Sin planes de vacunación	Vacunación prohibida
Austria	Holanda	Italia	Grecia	Polonia
Dinamarca	Reino Unido		Irlanda	
Finlandia	Belgica		Lituania	
Noruega	Francia		Escocia	
Suecia	Alemania			
Suiza	Hungría			
	Luxemburgo			
	Portugal			
	España			

**Tabla 2.** Estatus de erradicación en países europeos (Ackermann y Engels, 2006).

En América Latina de seroprevalencia de BHV-1 es muy elevada, con niveles de entre 19-84 % en México (Magaña Urbiña *et al*, 2005), 25-55 % en Uruguay (Gil *et al*, 2003), 22-67 % en Perú (Zacarías *et al*, 2002), en Colombia entre 20 a 53 % (Góngora *et al*, 1995) y hasta de 74,7 % en algunos casos (Betancur *et al*, 2006). En Argentina, los índices de seroprevalencia promedian el 60 % del ganado bovino (entre 24,8 y 84,1 % según la región y la edad de los

animales) (Odeón *et al*, 2001), y en Brasil el porcentaje es de entre el 19 y 85 % (Cerqueira *et al*, 2000; Gularte Quincozes, 2005).

En relación a infecciones con BHV-5 en la UE, los únicos casos reportados se presentaron en Hungría (Bartha *et al*, 1969) e Italia (Moretti *et al*, 1964).

A pesar de que existen varias cepas aisladas en EEUU (Tx88, Tx74, Barenfus *et al*, 1963; Eugster *et al*, 1974; Reed *et al*, 1973), una de Australia (N569, Johnston *et al*, 1962; French, 1962) y una de Canadá (Gough y James, 1975), no se cuenta con reportes de casos actuales.

Los países en donde se han reportado casos en los últimos años son Brasil y Argentina. A pesar de que los brotes no son muy frecuentes y que en general las infecciones se presentan como casos aislados, en Brasil se han presentado casos en las regiones Norte (Riet-Correa *et al*, 2006), Centro-Oeste (Colodel *et al*, 2002; Salvador *et al*, 1998) Sud-Este (Salvador *et al*, 1998; Gomez, 2002) y Sur (Elias *et al*, 2004; Rissi *et al*, 2006; Halfen *et al*, 2000). En cuanto a la Argentina, los datos disponibles son escasos. En este sentido, en trabajo más reciente pertenece a Perez *et al* (2003), en el cual analizaron muestras con diagnóstico de necrosis cerebrocortical (1970-1999) y encontraron que el 47,4 % de los casos eran positivos a BHV-5. Asimismo, la seroprevalencia real de BHV-5 de ambos países es desconocida dada la alta prevalencia de anticuerpos anti BHV-1 y la falta de un ensayo serológico que permita diferenciar los animales positivos a BHV-1 de BHV-5.

Como se mencionó previamente, BHV-1 es un patógeno que se encuentra diseminado por todo el mundo (Ackermann y Engels, 2006). Sin embargo, existen diferencias en la prevalencia e incidencia debido a la ubicación geográfica de la región en cuestión y a las condiciones de crianza de los animales (tipo de producción) (Ackermann y Engels, 2006).

Diversos trabajos han estudiado los factores que constituyen un riesgo para la infección con BHV-1. Algunos de ellos, tales como la edad, el sexo (las hembras son más susceptibles que los machos) y el tamaño del rebaño, fueron caracterizados exhaustivamente (Boelaert *et al*, 2005; Solis-Calderon *et al*, 2003). Otro factor como la carga animal del rodeo, aumentarían el riesgo de introducción de BHV-1 (Vonk Noordegraaf *et al*, 2004). Recientemente, se reportaron como factores importantes para el contacto directo de animales (y consecuentemente el contagio de BHV-1), la adquisición o compra de animales y la participación de los mismos en eventos especiales (van Schaik *et al*, 2001, 2002).

La capacidad de establecer latencia y reactivación de BHV-1 posee un gran impacto epidemiológico, ya que ocasiona el mantenimiento del virus en la población bovina. Los animales latentemente infectados (*carriers*) pueden reactivar el virus y re excretarlo bajo la acción de ciertos estímulos tales como parto (Thiry *et al*, 1985, 1987), apareamiento, transporte

(Thiry *et al*, 1987) y por la introducción de vaquillonas en un grupo de vacas lecheras, y consecuentemente infectar animales negativos. Por lo tanto, los animales *carriers* deben ser identificados en el marco de un programa de control de la infección. La detección de los mismos se realiza mediante la detección de anticuerpos anti BHV-1; sin embargo, los anticuerpos adquiridos pasivamente (por el calostro) pueden interferir en la respuesta de anticuerpos luego de la infección (Lemaire *et al*, 2000b; Bradshaw *et al*, 1996). Por lo tanto, es necesario desarrollar otras técnicas que permitan detectar a los animales latentemente infectados.

Otro tema de importancia en la epidemiología de BHV-1 es la capacidad de BHV-1 de traspasar la barrera de especies. Existen evidencias de campo y experimentales que sugieren la infección de diversas especies de rumiantes con BHV-1; sin embargo, no hay indicios claros de que estas especies actúen como reservorios del virus. En situaciones "naturales", se han detectado ovejas con infecciones agudas y latentes, pero no tendrían un rol importante en la transmisión del virus a los bovinos (Hage *et al*, 1997). Se han reportado infecciones experimentales de ovejas y cabras con BHV-1, mientras que los ciervos colorados presentaron una susceptibilidad limitada (Thiry J *et al*, 2006). En cuanto a especies que puedan ser utilizadas como modelo de infección, los conejos pueden ser infectados por vía intranasal e intraconjuntival (Meyer *et al*, 1996), mientras que los ratones no son susceptibles a la infección. Recientemente, se desarrollaron ratones genéticamente modificados que son altamente susceptibles a la infección con BHV-1, ya que no producen los receptores de INF- $\alpha/\beta$  o de INF- $\gamma$  así como tampoco generan linfocitos B y T maduros (Abril *et al*, 2004).

El primer caso de meningoencefalitis asociado a BHV-5 fue reportado en Australia en 1962 (Johnston *et al*, 1962; French, 1962). Posteriormente se observaron casos Hungría (Bartha *et al*, 1969), Canadá (Gough *et al*, 1975), Estados Unidos (Barenfus *et al*, 1963; Eugster, 1974; Reed, 1973), Italia (Moretti *et al*, 1964), Brasil (Riet-Correa *et al*, 1989) y Argentina (Carrillo *et al*, 1983). En la actualidad, solo se reportan brotes en Brasil (Sanches *et al*, 2000; Salvador *et al*, 1998; Colodel *et al*, 2002; Gomes *et al*, 2003) y Argentina (Combessies *et al*, 1996; Blanco Viera *et al*, 1998; Perez *et al*, 2003). Los brotes son aislados y esporádicos, y están restringidos a una distribución geográfica determinada. A pesar de que aún no se ha podido determinar la razón de esta particular distribución, se ha sugerido que los animales con anticuerpos inducidos por la vacunación contra BHV-1 podrían estar protegidos frente a la infección con BHV-5 (d'Offay *et al*, 1995). Sin embargo, en países como Brasil y Argentina que poseen una alta prevalencia de anticuerpos anti BHV-1 (Odeón *et al*, 2001), se reportan casos de infección con BHV-5. Asimismo, es probable que la cantidad de animales positivos a BHV-5 este subestimada ya que no se cuenta con ensayos serológicos que permitan diferenciar anticuerpos anti BHV-1 de BHV-5.

Hasta el momento no existen estudios sobre los factores que influyen el contagio o la incidencia de las infecciones con BHV-5. El curso de la enfermedad asociada a BHV-5



dependerá tanto de factores intrínsecos de la cepa viral implicada como de ciertas características del hospedador tales como edad, raza y estado inmunológico. Los bovinos son susceptibles desde el nacimiento hasta aproximadamente los 18 meses (Schudel *et al*, 1986), pero la mayoría de los casos fatales se observaron en animales de 5-7 meses (Carrillo *et al*, 1983a; Barenfus *et al*, 1963). Las infecciones de animales menores de 6 meses pueden alcanzar una letalidad del 100% (Carrillo *et al*, 1983a; Schudel *et al*, 1986; Meyer *et al*, 2001), mientras que los animales adultos pueden desarrollar signos leves o una infección subclínica (Ashbaugh *et al*, 1997; Cascio *et al*, 1999; Vogel *et al*, 2003) estableciendo una infección latente en los ganglios sensoriales (Cascio *et al*, 1999; Perez *et al*, 2002). Los animales latentemente infectados constituyen el reservorio natural del virus, ya que bajo ciertas condiciones este puede reactivarse y diseminarse a animales susceptibles.

Los bovinos son los hospedadores naturales de BHV-5, sin embargo, se ha sugerido que tanto las ovejas como las cabras podrían actuar como potenciales reservorios de BHV-5 (Lindner *et al*, 1993a,b; Silva *et al*, 1999; Diel *et al*, 2007). Esta afirmación se basa en el hecho de haber detectado anticuerpos anti BHV-5 en ovejas (Lindner *et al*, 1993a,b) y en la reproducción experimental de infección aguda, latencia y reactivación en ovejas y cabras (Silva *et al*, 1999; Diel *et al*, 2007). Si bien no se ha estudiado la capacidad de estas especies de transmitir el virus a los bovinos, no puede descartarse este fenómeno en áreas donde ellas coexisten.

Finalmente, el único modelo de laboratorio disponible para estudiar la patogenia de BHV-5 es el conejo. Luego de la inoculación nasal, el virus invade el SNC, induce signos neurológicos comparables con los observados en el bovino y en ciertos casos la muerte (Meyer *et al*, 1996; Chowdhury *et al*, 1997; Lee *et al*, 1999). Hasta el momento se considera que los ratones no son susceptibles a las infecciones con BHV-5, sin embargo, ratones transgénicos deficientes en el sistema inmune adaptativo y en los sistemas de IFN  $\alpha/\beta$  e IFN  $\gamma$ , al ser infectados con BHV-5 desarrollan los signos asociados a la infección con este agente y mueren (Abril *et al*, 2004).

## 5. Respuesta inmune

Una vez que se produce la infección primaria, la primera respuesta del hospedador está constituida por reacciones inflamatorias y celulares no específicas (Babiuk *et al*, 1996). Algunos de los mecanismos no específicos son constitutivos, tal como el sistema de complemento. Los interferones ( $\alpha/\beta$ ), inducidos por la replicación del virus dentro de las células, y otros cambios celulares producidos por la infección, modulan el tráfico y el reclutamiento de varios tipos de células efectoras, tales como macrófagos, neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) y células NK (*natural killer*), al sitio de infección (Bielefeldt Ohman *et al*, 1991; Griebel *et al*, 1987, 1989). Estas células inducen la secreción de "citoquinas tempranas", las cuales inician la respuesta

inflamatoria, reclutan y activan las células inflamatorias, e inician y regulan la respuesta inmune específica (Campos *et al*, 1994).

La respuesta inmune celular específica es detectada desde el quinto día post infección (pi) y alcanza la actividad máxima a los 7-10 dpi. Esta respuesta correlaciona con la recuperación de la infección y es previa a la aparición de niveles significativos de anticuerpos (Babiuk *et al*, 1996; Romera *et al*, 2001). Los linfocitos T colaboradores median la lisis de las células infectadas a través de la secreción de IFN  $\gamma$  e IL-2 que activan a macrófagos y células NK, y reclutando e induciendo la proliferación de linfocitos T citotóxicos.

La respuesta inmune humoral puede ser detectada desde el décimo día pi aproximadamente (Romera *et al*, 2001). La respuesta de anticuerpos anti BHV-1 es considerada más importante en prevenir una infección que en la recuperación de la misma (Babiuk *et al*, 1996). Los anticuerpos pueden neutralizar partículas virales extracelulares e inhibir su dispersión (por ejemplo en las superficies de mucosas), y, por otro lado, participan en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (Rouse y Babiuk, 1976). Asimismo, la inmunidad pasiva otorgada por los anticuerpos colostrales de vacas inmunes a BHV-1, son altamente eficaces en la protección de los neonatos frente a la enfermedad (Mechor *et al*, 1991).

Debido a la amplia similitud antigénica entre BHV-1 y BHV-5, y dado que hasta el momento no existen trabajos específicos sobre la respuesta inmune del hospedador asociada a la infección con BHV-5, se asume que estarían involucrados los mismos mecanismos. Sin embargo, es de particular importancia conocer los parámetros de la respuesta inmune frente a una infección con este agente para poder evaluar las mejores estrategias que permitan inducir respuesta protectora frente a la infección con este virus. Algunos trabajos que reproducen la infección experimentalmente (Perez *et al*, 2002; Vogel *et al*, 2003), evaluaron los niveles de anticuerpos neutralizantes, mostrando que comenzarían a detectarse a los 14 días post infección.

## **6. Diagnóstico y Control**

El diagnóstico de las enfermedades causadas por BHV-1 y BHV-5 puede presumirse sobre la base de los signos clínicos, histopatológicos y epidemiológicos. Sin embargo, el diagnóstico definitivo requiere la identificación del agente (o sus componentes) y/o la detección de los anticuerpos específicos que induce. En la práctica veterinaria de nuestro país, no se realiza la diferenciación entre BHV-5 y 1, y entre subtipos de este último.

En casos de abortos, cuadros nerviosos y eventualmente casos respiratorios, las muestras (cotiledón placentario, feto, encéfalo, hisopados genitales o nasales) remitidas al laboratorio de referencia pueden ser procesadas por aislamiento viral en cultivos celulares.

También se puede realizar el diagnóstico etiológico usando técnicas complementarias como la inmunofluorescencia o la inmunoperoxidasa.

El aislamiento de BHV-1 o BHV-5 a partir de muestras de un animal no confirma que el cuadro observado sea consecuencia de la acción de estos agentes. Por lo tanto, la serología, en especial la seroconversión, permitirá completar el diagnóstico ya que las pruebas disponibles no discriminan entre anticuerpos vacunales y los producidos durante la infección. Las técnicas utilizadas son seroneutralización y ELISA.

Debido a que el estado de latencia es una consecuencia de la infección con estos agentes, cualquier animal con anticuerpos debe considerarse como un portador y potencial fuente de infección por la posible excreción intermitente del virus al ambiente.

En regiones donde se registra un alto número de animales infectados con BHV-1, la estrategia elegida para el control de las infecciones es la vacunación. La vacunación debe lograr diferentes niveles de protección desde reducción de la patogenia y la transmisión del virus, hasta la prevención y la erradicación (van Drunen Littel-van der Hurk, 2006).

Las vacunas para BHV-1 se clasifican en cuatro tipos: vivas modificadas, inertes (virus completo inactivado o subunidades), ADN y basadas en vectores. Asimismo, si se plantea como objetivo la erradicación del virus, es necesario contar con vacunas que sean protectivas y que permitan diferenciar animales vacunados de infectados. Para ello, se desarrollaron vacunas marcadoras o DIVA (*differentiating infected from vaccinated animals*), basadas en subunidades virales (proteínas virales inmunogénicas) o cepas deleteadas (por ejemplo las cepas BHV-1gE-) (van Drunen Littel-van der Hurk, 2006). Existen numerosos trabajos donde se han probado los niveles de protección de diversos tipos de vacunas vivas modificadas frente a la infección con BHV-1 (van Drunen Littel-van der Hurk *et al*, 1997; Belknap *et al*, 1999; Castrucci *et al*, 2002). Estas vacunas lograron reducir la replicación viral, la transmisión y la severidad de la enfermedad, pero no son capaces de prevenir la infección (Ackermann y Engels, 2006), e incluso las cepas vacunales pueden establecer latencia y re-excretarse (Dispas *et al*, 2003).

En la actualidad, en EEUU y países de Latinoamérica, se utilizan las vacunas convencionales de BHV-1, tanto inactivadas como vivas modificadas, mientras que en la mayoría de los países de la UE, se utilizan vacunas marcadoras (van Drunen Littel-van der Hurk, 2006). Las vacunas vivas inducen una rápida respuesta inmune, sin embargo, presentan desventajas tales como la inducción de abortos (Miller *et al*, 1991; Mitchell, 1974) y el establecimiento de latencia de la cepa vacunal (Nettleton *et al*, 1984; William *et al*, 1993). Además, existe la posibilidad de recombinación entre la cepa vacunal y el virus salvaje, lo cual ha sido probado bajo condiciones experimentales (Schyns *et al*, 2003b; Muylkens *et al*, 2006b). En este contexto, las vacunas inactivadas resultan ser mucho mas seguras, aunque es necesario administrarlas con adyuvantes que aumenten la inducción de la respuesta inmune (Romera *et al*, 2001). Se ha demostrado que en general las vacunas vivas son las más

eficientes en relación a la protección clínica y reducción de la replicación viral (Bosch *et al*, 1998); sin embargo, al trabajar con animales latentemente infectados, una vacuna inactivada resultó más eficiente que una viva (Bosch, 1997). Kerkhofs *et al* (2003) mostraron que el protocolo más eficiente para reducir la excreción viral luego de un desafío viral es realizar la primer vacunación con una formulación viva y luego una revacunación con una vacuna inactivada.

En cuanto a las vacunas DIVA que se utilizan en Europa, se ha demostrado que la vacunación con la cepa BHV-1gE- tanto viva como inactivada es efectiva en la reducción de la incidencia de seroconversión (Dispas *et al*, 2004). Asimismo, este estudio remarca el aumento en la eficacia protectora al realizar vacunaciones cada 6 meses (Dispas *et al*, 2004). El mayor problema en el uso de estas vacunas como estrategia de identificación de animales vacunados e infectados, es que el ensayo diagnóstico utilizado posee una sensibilidad tan solo del 70% (Kramps *et al*, 2004; Perrin *et al*, 1996).

Tal como se comentó anteriormente, el estatus inmunológico de los animales portadores es un factor clave para controlar la re excreción luego de un estímulo de reactivación. Por lo tanto, la estricta vacunación de los mismos cada 6 meses podría reducir los riesgos de re excreción viral (Dispas *et al*, 2004).

Dado que los casos de infecciones con BHV-5 están acotados geográficamente y no se presentan muy frecuentemente, no existen estudios focalizados en el desarrollo de vacunas contra este virus. Por otro lado, debido a que los países donde se presentan brotes de BHV-5 son aquellos donde existe una alta prevalencia de BHV-1, es fundamental evaluar si la inmunidad conferida por las infecciones o la vacunación con este agente confiere protección frente a BHV-5.

El mayor inconveniente a la hora de estudiar la eficacia de diversas formulaciones frente a la infección con BHV-5 es la reproducción experimental de la misma. Se han realizado experiencias de protección cruzada entre BHV-1 y BHV-5 (Bratanich *et al*, 1991; Cascio *et al*, 1999) pero en tales casos no han logrado reproducir el cuadro clínico de encefalitis en los animales control infectados con BHV-5, impidiendo una correcta interpretación de los resultados. Recientemente, se ha evaluado la eficacia protectora frente a BHV-5 de dos vacunas recombinantes de BHV-1 (Silva *et al*, 2006; Spilki *et al*, 2004). Los autores sugirieron que dichas vacunas protegían parcialmente ya que no lograban reducir la excreción viral luego de la infección.

- ❖ Las vacunas inactivadas basadas en BHV-1 o BHV-5 inducen una respuesta inmune similar y el mismo grado de protección frente a la enfermedad causada por BHV-5.
  
- ❖ Los virus recombinantes BHV-1/5 son menos virulentos en el hospedador natural que la cepa parental BHV-5 N569.

Los herpesvirus bovino 1 y 5 son dos alfa herpesvirus presentes en la población bovina de la República Argentina. La seroprevalencia de BHV-1 alcanza el 60% en ciertas regiones del país, mientras que la prevalencia de las infecciones con BHV-5 es desconocida debido a la ausencia de un ensayo serológico diferencial. Asimismo, dado que BHV-1 y BHV-5 cocirculan y que la vacunación contra BHV-1 no es obligatoria ni totalmente protectora contra este virus, existen altas probabilidades de que los animales sufran coinfecciones con establecimiento de latencia de ambos virus. Las infecciones con BHV-1 producen casos de rinitis, abortos e infecciones bacterianas concomitantes que reducen la producción lechera. En tanto, las infecciones con BHV-5 pueden conducir al desarrollo de una meningoencefalitis fatal. Estos dos herpesvirus son neurotrópicos y establecen latencia en ganglios sensoriales. Estos animales constituyen el reservorio natural del virus y bajo ciertos estímulos estresantes, y/o en períodos de inmunosupresión, el virus puede ser reactivado y excretado, siendo la fuente de infección de animales susceptibles.

En este contexto y dado que en nuestro país la vacunación es la estrategia utilizada para el control de las infecciones con BHV-1, es interesante conocer el grado de protección que confieren diversas vacunas frente a las infecciones con BHV-5. A pesar de que existen reportes sobre la evaluación de protección cruzada entre BHV-1 y BHV-5 (Bratanich *et al*, 1991; Cascio *et al*, 1999) en ninguno de los casos se pudo reproducir el cuadro clínico de encefalitis en los animales control infectados con BHV-5, impidiendo una correcta interpretación de los resultados. Teniendo en cuenta la dificultad que presenta la realización de experiencias de desafío viral con BHV-5 surge **como primer objetivo de esta Tesis reproducir experimentalmente el cuadro clínico y la respuesta inmune asociada a las infecciones con BHV-5 en bovinos, como herramienta para la evaluación de la eficacia protectora de diversas vacunas frente a infecciones con este virus. Posteriormente, se evaluará la inmunogenicidad y la eficacia protectora de vacunas inactivadas basadas en BHV-1 o BHV-5 frente a la enfermedad causada por la infección con BHV-5.**

Por otro lado, la alta probabilidad de ocurrencia de coinfecciones con BHV-1 y BHV-5 en el ganado bovino de nuestro país, lleva a considerar la recombinación genética como un fenómeno de gran importancia en la epidemiología y patogenia de estos virus. La recombinación es un mecanismo altamente frecuente en los alfa herpesvirus que permite la generación de nuevas combinaciones genéticas, conduciendo, por ejemplo, a la restauración de la virulencia en cepas atenuadas o al aumento de patogenicidad por adquisición de genes asociados a la virulencia. Recientemente, se han obtenido cepas recombinantes BHV-1/5 producto de recombinaciones *in vitro*. Asimismo, se han reportado diversos casos de prevalencia de virus recombinantes en poblaciones naturales. Frente a estos antecedentes, y **con el objetivo de contar con datos que permitan evaluar el impacto de la presencia**

de virus recombinantes BHV-1/5 en la población bovina de nuestro país, se propone para este trabajo de tesis evaluar experimentalmente la virulencia *in vivo* de los virus recombinantes BHV-1/5 obtenidos previamente *in vitro* y caracterizar su *background* genético.

Por lo expresado previamente, es importante el uso de vacunas eficaces para controlar las infecciones con BHV-1 y BHV-5 y reducir el riesgo de ocurrencia de coinfecciones y recombinaciones naturales entre ambos virus.

### OBJETIVO PRINCIPAL

Estudiar diversos aspectos de la virulencia de virus recombinantes BHV-1/5 que podrían existir en el ganado bovino y evaluar vacunas para controlar las infecciones con BHV-5 de modo de disminuir su circulación y los riesgos de aparición de recombinantes *in vivo*.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- 1- Conocer el cuadro clínico inducido por una infección experimental de bovinos con BHV-5 y la respuesta inmune asociada.
- 2- Evaluar la inmunogenicidad y la eficacia protectora de vacunas inactivadas basadas en BHV-1 o BHV-5 frente a la enfermedad causada por BHV-5.
- 3- Evaluar la virulencia de los virus recombinantes BHV-1/5 en el hospedador natural.
- 4- Caracterizar el *background* genético de los virus recombinantes BHV-1/5.

### **1. Virus y células**

Las cepas virales utilizadas en los diversos ensayos son las siguientes: BHV-1 Los Angeles (LA) (ATCC), BHV-5 A663 (aislamiento argentino; Carrillo *et al*, 1983). Estas cepas fueron propagadas en la línea celular de riñón bovino Mardin Darby (MDBK) a 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>. La línea celular fue provista por la Sección de Cultivos de Tejidos del Instituto de Virología, INTA Castelar, y se utilizó como medio de mantenimiento medio de cultivo mínimo esencial de Eagle (MEM-E, Gibco), suplementado con 2 % de suero fetal bovino (SFB) (Gibco) y antibiótico/antimicótico [100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 0,25 µg/ml de anfotericina B, (Gibco)].

### **2. Animales**

Se utilizaron bovinos serológicamente negativos a BHV-1 y BHV-5, raza Aberdeen Angus de 2 a 6 meses de edad. Los animales fueron provistos por el Campo Experimental del CICVyA de INTA Castelar. El manejo de los animales se realizó bajo las normas descriptas en el Código de Bienestar Animal de EEUU (Guide for the Care and use of laboratory animals, Natural Research Council. National Academy Press, 1996. Washington USA).

### **3. Toma de muestras**

Durante los períodos post infección (pi), post vacunación (pv) y post desafío (pd) se tomaron muestras de secreciones nasales, sangre completa y suero según los esquemas de cada diseño experimental.

Las secreciones nasales fueron tomadas insertando tampones en el meatus ventral de la cavidad nasal durante 5 min, e inmediatamente colocados en un tubo cónico de 50 ml conteniendo MEM-E suplementado con penicilina 5000 UI/ml, estreptomicina 2500 mg/ml y anfotericina B 10 mg/ml. Para recuperar la muestra que quedó embebida en el tampón, los tubos se centrifugaron durante 10 min a 1000 x g, en esterilidad se realizaron alícuotas de 1 ml cada una y luego se guardaron a -70°C hasta su utilización.

Las muestras de sangre fueron obtenidas de vena yugular utilizando agujas 18G x 1 ½ " y jeringas de 10 o 20 ml. Las muestras de sangre heparinizada se procesaron en el día para obtener células mononucleares de sangre periférica (CMSP) (sección 9.2).

Las muestras de suero fueron conservadas a -20°C.

### **4. Ensayo de infección viral de bovinos**

Los grupos de bovinos que serían infectados fueron alojados en Boxes de Bioseguridad grado II a CICVyA, INTA Castelar. Estas instalaciones cuentan con cinco salas de aislamiento de las cuales una es doble. Las salas se encuentran unidas a través de un pasillo central. Cada sala simple



cuenta con 4 comederos y 2 bebederos independientes y una puerta cepo, mesada y pileta, iluminación general, boca de gas con conector para manguera y argollas para sujeción de animales. Para el ingreso de personal cuenta con un vestuario en zona limpia, ducha (no enclavada), vestuario en zona sucia, sala de preparación de materiales, baño en zona sucia, comunicación telefónica. Además, el box cuenta con un sistema de ventilación forzado con renovación del 100% del aire, con sistema de depresión para asegurar que no haya escape de agentes infecciosos al exterior.

La sala de necropsia está equipada con una mesa para realizar las necropsias, digestor para la eliminación de los animales, puente grúa para el manejo de los mismos, pileta, vapor y manguera de alta presión para la higiene del lugar, personal y materiales utilizados en la sala. La sala tiene comunicación con 3 boxes a través de *airlock* equipados con luz U.V y puertas enclavadas. Además, posee ingreso y egreso independiente de la sala y disponibilidad de duchas en caso de que el personal se retire por la sala y no por los boxes.

Previamente al ingreso de los animales a los boxes, los mismos recibieron una dieta especial para adaptarlos a la alimentación a base de pellet de alfalfa y evitar que sufran de timpanismo. Durante 5 días, los animales se alimentaron con cantidades crecientes de pellet de alfalfa y decreciente de fardos de alfalfa, hasta alimentarlos completamente con pellet.

Para realizar la infección, los animales fueron colocados en un cepo y se utilizó un lazo en forma de bozal para inmovilizar la cabeza. La infección se realizó administrando la suspensión viral por vía intranasal utilizando un nebulizador ultrasónico (Micrón, Modelo 3058, San-Up). El volumen total del inóculo administrado es de 3 ml y se nebulizan 1,5 ml en cada nostril. Los animales control recibieron 3 ml de medio de cultivo (MEM-E).

## **5. Evaluación de signos clínicos**

Luego de la infección viral, los animales fueron examinados diariamente por un veterinario que desconocía el tratamiento recibido por cada grupo. El día de la infección se tomó la temperatura rectal y se observó el estado general de los animales a fin de establecer los valores basales. Los días subsiguientes a la infección, y hasta el final de la experiencia, se registraron en una planilla individual la temperatura rectal, presencia de moco (seroso, seromucoso o mucopurulento), lesiones en la superficie mucosa y conjuntivitis, el estado general y la presencia de signos nerviosos (rechinar de dientes, embotamiento, propiocepción negativa, ataxia, temblores musculares y frente apoyada contra la pared). Para registrar estos datos y evitar interpretaciones subjetivas, se desarrolló una planilla donde se describen detalladamente todas las características a observar, indicando presencia/ausencia y grado de severidad (Anexo I).

## **6. Necropsias y análisis histopatológico**

Los animales fueron sedados con acepromacina (Asedan, Laboratorio Holliday) por vía intramuscular y luego sacrificados mediante inyección intravenosa de Euthanyle (pentobarbital sódico y difenilhidantoína sódica; Laboratorios Browser) con dosis variable según el peso corporal. La necropsia se realizó inmediatamente después del sacrificio.

Medio encéfalo y una fracción del ganglio trigémino fueron fijados y mantenidos en solución salina de formaldehído al 10 % hasta el momento de preparación de los tacos de parafina para su procesamiento en el Laboratorio de Histopatología, Instituto de Patobiología, CICVyA.

De cada muestra se realizó inspección macro y microscópica, observándose cortes de 4  $\mu$ m de espesor de las siguientes regiones:

1. Nervio/ Corteza Olfatoria
2. Corteza Frontal
3. Corteza Parietal
4. Corteza Occipital
5. Tálamo y Mesencéfalo (B) (colículos rostrales)
6. Pedúnculos cerebelosos y área caudal del puente (C)
7. Obex (D)
8. Cerebelo
9. Ganglio trigémino

La ubicación anatómica de cada región se observa en el Anexo II.

## **7. Titulación viral**

La cuantificación del virus presente en las secreciones nasales se realizó por titulación a punto final el mismo día de extracción de la muestra. Se realizaron diluciones seriadas en base 10 de las secreciones nasales en MEM-E (comenzando por 1/10) y luego se inocularon sobre monocapas de células MDBK. Las células fueron observadas luego de 48, 72 y 96 horas para detectar la presencia de efecto citopático (ECP). El título viral fue calculado por el método de Reed y Muench (Reed y Muench, 1938).

Las muestras que resultaron negativas fueron sometidas a pasajes ciegos por células. Brevemente, se inoculó una monocapa de células MDBK con las secreciones nasales sin diluir, luego de 5 días la placa de células fue congelada a -70°C y descongelada para liberar las partículas virales de las células. El sobrenadante fue colocado sobre una monocapa nueva y se observó la misma a las 48, 72 y 96 horas (segundo pasaje ciego). Este procedimiento fue repetido una vez más (tercer pasaje ciego).

## 8. Evaluación de la respuesta inmune humoral

### 8.1. Ensayos de ELISA

A fin de medir los niveles de anticuerpos en suero y secreciones nasales, se realizaron diversos ensayos de ELISA indirecto que se describen a continuación. Los valores de corte establecidos para cada uno de los ensayos de ELISA se determinó en base al método de distribución de frecuencias de los resultados obtenidos utilizando muestras de animales de referencia (con historia conocida) infectados (positivos) o no infectados (negativos) con BHV-1 (OIE, 2004). Brevemente, se realizó el ensayo con un suero o secreción nasal hiperinmune y las muestras de los animales infectados o no infectados colocándolos en una única dilución. Al valor de absorbancia (A) detectado en la muestra hiperinmune se le otorgó el valor arbitrario del 100% y los valores de las muestras fueron normalizadas en relación al mismo. Se realizaron gráficos de frecuencia (% de A respecto del control positivo *vs* número de animales con ese valor) para cada ensayo y se consideró como punto de corte aquel valor de porcentaje a partir del cual no se detectaban animales de referencia negativos. Los valores establecidos para cada técnica serán detallados más adelante.

Debido a la similitud antigénica entre BHV-1 y BHV-5 los ensayos para medir anticuerpos anti BHV-1 reconocen a los anticuerpos anti BHV-5; por lo tanto, todos los ensayos realizados en esta tesis están basados en el uso de BHV-1 como antígeno.

#### 8.1.1. Producción de antígeno

En los ELISAs que se describen a continuación se utilizó como antígeno el virus BHV-1 cepa LA semipurificado. Se infectaron botellas de cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup> de superficie (T75) conteniendo una monocapa de células MDBK con el virus a una *moi* de 0,1. Cuando el efecto citopático fue extensivo, las botellas fueron congeladas a -70°C; luego se descongelaron y congelaron 2 veces para liberar las partículas virales intracelulares. Esta suspensión se trasvasó a los tubos correspondientes y se centrifugó durante 30 min a 3000 x g para clarificar las producciones virales y reducir la presencia de detritos celulares. El sobrenadante fue transferido a tubos de ultracentrifuga y se centrifugó a 12000 x g por 2 horas a 4°C. A continuación, se descartó el sobrenadante y el *pellet* conteniendo el virus fue resuspendido vigorosamente en 500 µl de buffer NET pH 7,5 (Tris base 20 M, NaCl 0,12 M, EDTA 0,01 M) y transferido a criotubos de 1,5 ml. Se agregó un volumen de glicerol 100 % y se guardó a -20°C hasta su utilización. Este mismo procedimiento se realizó con cultivos celulares no infectados de modo de producir el antígeno negativo (restos celulares).

La dilución óptima de uso de antígeno positivo (virus) y negativo (restos celulares) se determinó para cada ensayo en particular realizando el ELISA con varias diluciones de los antígenos y un suero patrón positivo y negativo.

### 8.1.2. Ensayo de ELISA para determinación de anticuerpos totales en suero

Este ensayo fue puesto a punto previamente (Romera, 2001) y se describe brevemente a continuación.

Las producciones de antígeno positivo y negativo fueron diluidas en buffer carbonato bicarbonato pH 9.6 ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,015 M,  $\text{NaHCO}_3$  0,035 M) y sembradas en placas de 96 pocillos (Immulon IB, Dynatech Laboratories) en columnas alternadas. Se incubaron durante la noche (12-16 hs) a 4°C (paso de sensibilización) y al día siguiente fueron lavadas 3 veces con buffer fosfato salino (PBS) 1 X conteniendo Tween 20 al 0,05 % v/v (Promega) (PBS-T). Como primer paso se realizó un bloqueo con el buffer PBS-T ovoalbúmina 1% p/v (PBS-T-OVA) durante 30 min a 37°C con agitación, este *buffer* fue utilizado para todas las diluciones subsiguientes. Luego de la etapa de bloqueo se colocaron los sueros bovinos diluidos en forma seriada (1:4) comenzando en 1/40 para los sueros incógnita y control negativo y 1/2560 para el control positivo. Las placas se incubaron por 30 min a 37°C en agitación y luego de 3 lavados con PBS-T-OVA, se agregó el anticuerpo anti bovino conjugado con la enzima peroxidasa (peroxidasa de rábano, HRP, *horse radish peroxidase* -Kirkegaard & Perry Laboratories, KPL) diluido 1:2000. Luego de una incubación de 30 min a 37°C en agitación, se realizaron 3 lavados con PBS-T y se agregó la solución de revelado compuesta por ácido sulfónico 2-2'-azino-bis-3-etilbenceno-6-tiazolin 1 mM (ABTS) (SIGMA) y 3% p/v peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) en buffer citrato pH 5 (ácido cítrico 0.457 M). Las densidades ópticas fueron medidas en un lector de ELISA (Multiskan EX, Termo Labsystems) a una longitud de onda de 405nm ( $A_{405}$ ). La reacción se dejó progresar hasta que el valor de  $A_{405}$  del suero control positivo alcanzara valores entre 0,6-1,2 (entre 10 y 20 minutos). El título de cada muestra se calculó como el logaritmo de la inversa de la máxima dilución de la muestra que alcanzara una  $A_{405}$  corregida ( $A_{405}$  antígeno positivo –  $A_{405}$  antígeno negativo) mayor o igual al 40% de la  $A_{405}$  ajustada del suero control positivo.

### 8.1.3. Ensayo de ELISA para determinación de los isotipos IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2</sub> en suero

Este ensayo fue descrito previamente (Romera, 2001), sin embargo, se introdujeron algunas modificaciones en la presente tesis referentes al punto de corte de la técnica. Brevemente, la sensibilización de las placas (Immulon IB, Dynatech Laboratories) se realizó solo con antígeno positivo producido en células de testículo fetal bovino (TFB). Los pasos de bloqueo y agregado de los sueros bovinos se realizaron tal como se describe en la sección 8.1.2., excepto por el suero control positivo que se utilizó en la dilución 1/160 y por la incubación de las placas que, como

para el resto del ensayo, se realizó por 45 min a 37°C en agitación. Para detectar los isotipos de las IgG específicas para el virus, las placas fueron incubadas con los anticuerpos monoclonales (AcM) producidos en ratón contra la IgG<sub>1</sub> (DAS 17) e IgG<sub>2</sub> (DAS 2) bovinas (cedidos por el Dr. S. Srikumaran -University of Nebraska, USA). A continuación, las placas fueron lavadas 3 veces con PBS-T y se agregó el anticuerpo anti IgG de ratón conjugado con la enzima peroxidasa (Kirkegaard & Perry Laboratories, KPL) diluido 1:2000 en PBS-T-OVA. Luego de la incubación se realizaron 3 nuevos lavados con PBS-T y se agregó la solución de revelado compuesta por 3 % p/v H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / orto-fenildiamina 0,06 mg/ml (OPD -Sigma) diluida en buffer citrato fosfato pH 5 (ácido cítrico 0,035 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,067 M). Luego de 10 min, la reacción fue frenada por el agregado de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,5 M y la absorbancia se midió a 490 nm de longitud de onda (A<sub>490</sub>). El título de cada muestra testeada se calculó como en logaritmo de la inversa de la máxima dilución de la muestra que alcanzara una A<sub>490</sub> mayor o igual al 35 % (IgG<sub>1</sub>) o 15 % (IgG<sub>2</sub>) de la A<sub>490</sub> del suero control positivo. Estos valores de corte fueron obtenidos del gráfico de distribución de frecuencias que surge al realizar el ensayo con sueros positivos y negativos.

#### **8.1.4. Ensayo de ELISA para evaluación de IgA e IgG<sub>1</sub> en secreciones nasales**

El ensayo de ELISA utilizado para detección de IgA e IgG<sub>1</sub> en secreciones nasales fue desarrollado previamente en nuestro laboratorio (Del Médico Zajac, 2001). Brevemente, se sensibilizaron placas de 96 pocillos (Immulon IB, Dynatech Laboratories) con antígeno positivo y negativo en columnas alternadas. Luego del paso de bloqueo de las placas, se agregaron las muestras de secreciones nasales incógnita en diluciones seriadas de orden 4, comenzando en 1/8; las secreciones control positivas y negativas se utilizaron en una dilución 1/8. Luego de una incubación de 45 min a 37°C en agitación, se volcó el sobrenadante, se lavaron las placas tres veces con PBS-T y se agregó el AcM anti IgG<sub>1</sub> de bovino (DAS17) o anti IgA de bovino conjugado con peroxidasa (Bethyl Lab, Inc). Luego de incubación y lavados, a la placa para detección de IgG<sub>1</sub> se le agregó el anticuerpo anti ratón conjugado con peroxidasa, tal lo descrito en la sección anterior. Finalizada dicha incubación, se agregó a ambas placas la solución de revelado conteniendo 3 % p/v H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y OPD en buffer citrato fosfato. Luego de 10 min la reacción fue frenada agregando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,5 M y la absorbancia se midió a 490 nm (A<sub>490</sub>). El título de cada muestra testeada se calculó como en logaritmo de la inversa de la máxima dilución de la muestra que alcanza una A<sub>490</sub> corregida mayor o igual al 30 % (IgA) o 10 % (IgG<sub>1</sub>) de la A<sub>490</sub> corregida de la secreción control positiva.

#### **8.2. Ensayo de seroneutralización**

El ensayo de seroneutralización (SN) realizado fue basado en el método virus fijo-suero variable. Los sueros incógnita, control positivo y negativo fueron inactivados durante 30 min a 56°C, se

realizaron las diluciones en MEM-E y se incubaron por cuadruplicado con 200 dosis infecciosas en cultivo de tejidos (DICT) de BHV-1 o BHV-5 en una placa de cultivo sin células. Luego de una incubación de 1 hora a 37°C, la mezcla suero-virus fue transferida a una placa de cultivo celular de 96 pocillos fondo plano (Costar, Corning Incorporated) conteniendo células MDBK. Luego de 72 horas de incubación a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub>, las placas fueron observadas para evaluar la presencia de ECP. El título de anticuerpos neutralizantes fue calculado como el logaritmo de la inversa de la máxima dilución a la cual no se observa ECP. En cada ensayo se incluyó una titulación viral para confirmar la cantidad de DICT utilizadas y un control de viabilidad celular.

## 9. Evaluación de respuesta inmune celular

### 9.1. Producción de antígeno

El antígeno viral utilizado fue BHV-1 para todos los casos. Todos los pasos del protocolo se desarrollaron en esterilidad. Se realizó el protocolo descrito en la sección 8.1.1 y luego de la ultracentrifugación se resuspendió el *pellet* en 3 ml de MEM-E. Esta suspensión fue colocada en un tubo nuevo sobre 1 ml de sacarosa 30 % p/v y se centrifugó 2 hs a 90000 x *g*. La resuspensión final del antígeno positivo y negativo se realizó con MEM-E, se alicuotaron y guardaron a -70°C hasta el momento de usarlas. Una alícuota de la suspensión viral (antígeno positivo) fue titulada con el método descrito en la sección 7 para conocer el número de partículas infectivas presentes.

### 9.2. Ensayo de linfoproliferación

Para realizar este ensayo se siguió el protocolo previamente descrito por Romera *et al* (Romera, 2001). Las muestras de sangre de los bovinos fueron extraídas con anticoagulante (heparina sódica 10000 UI, Northia) y condiciones de esterilidad. Las muestras fueron centrifugadas a 1200 rpm por 20 min (centrífuga Sorvall RTG000B) para extraer las células mononucleares de sangre periférica que se ubican en la interfase entre los eritrocitos y el suero (*buffy coat*). Esta fracción fue aislada con pipeta Pasteur y transferida a un tubo conteniendo Lymphoprep (densidad 1,077 g/ml; Nycomed Pharma A.S.). Luego de una centrifugación a 2200 rpm por 30 min (centrífuga Sorvall RTG000B), se extrajo la banda de células blancas, se las lavó dos veces con medio RPMI-1640 (Sigma) 5 % de SFB y, finalmente, se resuspendieron en 1 ml de RPMI 1640 completo (10 % SFB, 0,1 M Hepes, 2 mM glutamina, 1 mM piruvato, 50 µM β-mercaptoetanol). Para realizar la estimulación de las células extraídas, el antígeno viral fue diluido en RPMI completo para llegar a un título de 10<sup>5</sup> DICT<sub>50</sub> e inactivado por irradiación con luz ultravioleta. El mismo procedimiento se realizó con el antígeno negativo (restos celulares). Luego, se colocaron 100 µl del antígeno positivo o negativo por triplicado en placas de 96 pocillos fondo U (Greiner Bio-one) conteniendo

$2 \times 10^6$  linfocitos/ml. Las células obtenidas de cada animal también fueron incubadas con medio de cultivo solamente o con  $1 \mu\text{g}$  del mitógeno concanavalina A (ConA) (Sigma). Las placas conteniendo los linfocitos se incubaron por 4 días a  $37^\circ\text{C}$   $5\%$   $\text{CO}_2$ . Veinte horas antes de la cosecha de las células, se agregó  $0,4 \mu\text{Ci}$  [ $^3\text{H}$ ] timidina por pocillo. La captación de timidina se midió en un contador de centelleo (LKB, Wallac, 1219 Rackbeta) y se obtuvieron cuentas por minuto (CPM) para cada pocillo. Se realizó el promedio de las CPM obtenidas para los triplicados y se calculó el índice de estimulación (IE) como el promedio de CPM obtenidas al estimular con el antígeno positivo / el promedio de CPM obtenidas al estimular con antígeno negativo. Se consideraron como muestras positivas aquellas que poseían un  $\text{IE} \geq 3$ .

### **10. Diseño experimental I: Infección aguda con BHV-5**

Se utilizaron 5 bovinos serológicamente negativos a BHV-1 y BHV-5 determinados por ELISA y seroneutralización (SN) (ver secciones 8.1.2. y 8.2.) de 2-4 meses de edad. La infección se realizó con la cepa viral A-663 de BHV-5 con una dosis total de  $10^7 \text{DICT}_{50}$  por vía intranasal utilizando un nebulizador ultrasónico (Micrón, Modelo 3058, San-Up) en boxes de bioseguridad tipo II (ver especificaciones en sección 4).

Se tomaron muestras de secreciones nasales, sangre heparinizada y suero al día cero para establecer los valores basales. Asimismo, se registró la temperatura rectal y el estado general de los animales.

Luego de realizada la infección, se recolectaron muestras de secreciones nasales día por medio para la evaluación de niveles y período de excreción viral y anticuerpos en secreciones nasales; sangre heparinizada los días 7 y 14 pi para llevar a cabo el ensayo de linfoproliferación, y suero los días 7, 14, 21 pi y el día de sacrificio para detectar niveles de anticuerpos.

Se registró la temperatura rectal y la signología clínica de los animales diariamente. Dado que las experiencias estuvieron regidas por las normas del Código de Bienestar Animal de EEUU (Guide for the Care and use of laboratory animals. Natural Research Council. National Academy Press, 1996. Washington USA), la gravedad de los signos presentados por algunos animales requirió el sacrificio de los mismos. Se realizó la necropsia y se recolectaron muestras para el análisis histopatológico (ver sección 4).

## **11. Diseño experimental II: Evaluación de inmunogenicidad y eficacia protectora de vacunas inactivadas frente a la enfermedad causada por BHV-5**

### **11.1. Producción de vacunas**

#### **11.1.1. Producción de antígeno**

Se infectaron botellas de cultivo celular (T75) conteniendo una monocapa de células MDBK con el virus BHV-5 A663 o BHV-1 LA a una moi de 0,1. Luego de una adsorción de 1 hora a 37°C 5 % CO<sub>2</sub>, se agregaron 30 ml de MEM-E 2 % SFB. Cuando el efecto citopático fue extensivo (24-48 hs), las botellas fueron congeladas a -70°C; luego se descongelaron y el medio se trasvasó a los tubos correspondientes para centrifugar durante 30 minutos a 3000 x g. El sobrenadante se trasvasó a un tubo nuevo, se tomaron alícuotas de 0,5 ml (para realizar una titulación de la producción viral) y se guardó a -70°C hasta su uso.

#### **11.1.2. Formulación de las vacunas**

Para formular las vacunas se seleccionaron suspensiones de BHV-1 y 5 con un título viral de 10<sup>7</sup> DICT<sub>50</sub>/ml. Para la inactivación de las suspensiones se agregó 1 % de una solución de bromoetilimina binaria (BEI) 0,1 M en NaOH 0,2 M y se incubó durante 25 h con agitación continua a 37°C. A fin de inactivar el BEI se agregó 1 % de tiosulfato de sodio 1 M y se agitó 15 min a 37°C (Smitsaart *et al*, 1989).

Las vacunas fueron formuladas como una emulsión agua en aceite de iguales volúmenes de la suspensión viral inactivada y adyuvante oleoso mineral formulado con Arlacel C, Markol 52 y 0,1 % Tween 80.

### **11.2. Inmunización de animales**

Se utilizaron diecisiete bovinos de 6 meses de edad serológicamente negativos a BHV-1 y BHV-5, determinados por seroneutralización y ELISA. Los animales fueron separados al azar y se armaron 3 grupos:

- Grupo 1: vacuna BHV-1 (5 animales)
- Grupo 2: vacuna BHV-5 (5 animales)
- Grupo 3: controles sin vacunar (7 animales)

Los animales se vacunaron por vía subcutánea con 3 ml de las vacunas inactivadas. A los 21 dpv, los grupos 1 y 2 recibieron una revacunación (*booster*) con la misma vacuna utilizada el día cero. Los tres grupos de animales se mantuvieron en instalaciones apropiadas para controlar las condiciones de alimentación y sanidad. Se tomaron muestras de secreciones nasales, suero y



sangre heparinizada periódicamente para realizar los ensayos inmunológicos descritos anteriormente.

### **11.3. Desafío viral**

Cinco días antes del inicio de la experiencia de desafío, los animales fueron trasladados a los boxes de bioseguridad tipo II. A los 71 dpv, los tres grupos de animales fueron inoculados con una suspensión viral de BHV-5 A663 con un título de  $10^7$  DICT<sub>50</sub>/ml. Tanto el muestreo como el seguimiento de los animales fueron realizados acorde a lo descrito en la sección 10, desde el día de inicio hasta el día 24 pi.

## **12. Análisis estadístico.**

La comparación entre los perfiles de respuesta humoral inducidos por las vacunas durante el período de estudio (tanto post vacunación como post desafío) y los niveles de excreción viral, fue realizada usando el análisis de varianza (ANOVA) para medidas repetidas en el tiempo con la corrección de Greenhouse y Geisser en los niveles de significancia (fijados en 1 %). Las comparaciones post ANOVA fueron realizadas usando el test de Bonferroni con el mismo nivel de significancia.

Todos los cálculos estadísticos se realizaron con el programa SAS (versión 6.04), siguiendo los procedimientos G.M.L. (SAS User's guide, 1988).

En el ensayo de linfoproliferación, la proporción de animales positivos se comparó usando el test exacto de Fisher, con un nivel de significancia de 5 %.

## 1. Virus y células

Las cepas virales utilizadas en esta parte del trabajo fueron provistas por el Dr. Thiry del Departamento de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Virología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Liege, Bélgica.

Cepas virales:

- BHV-5 cepa N569: cepa Australiana aislada en 1962 (French *et al*, 1962).
- BHV-1.2 cepa Aus12  $\Delta$ gC GFP+  $\Delta$ gI RFP+: cepa modificada por Meurens *et al* (2004) partiendo del virus salvaje BHV-1.2 Aus 12 (Fehler *et al*, 1992). Una región del gen que codifica para la glicoproteína C (gen *gC*) fue reemplazada por un *cassette* para la expresión de la proteína fluorescente verde (*green fluorescent protein*, GFP - pEGFP-N1, Clontech), y el gen que codifica para la glicoproteína I (gen *gI*) fue reemplazado por el gen que codifica para la proteína fluorescente roja (*red fluorescent protein*, RFP - pDsRed-1, Clontech).
- Recombinante 1 (R1): virus obtenido por coinfección *in vitro* de las cepas BHV-5 N569 y BHV-1.2 Aus12  $\Delta$ gC-GFP+ $\Delta$ gI-RFP+ (Meurens *et al*, 2004). Posee un patrón de restricción con la enzima Hind III similar a BHV-5. Posee el gen *gI* y carece del gen *gC*. Para las proteínas marcadoras, este virus contiene el gen que codifica para la proteína GFP (gen *gfp*) y carece del gen que codifica para la proteína RFP (gen *gfp*). En este trabajo el virus R1 se denominó R1  $\Delta$ gC(GFP+).
- Recombinante 2 (R2): este virus fue obtenido por coinfección *in vitro* de las cepas BHV-5 N569 y BHV-1.2 Aus12  $\Delta$ gC-GFP+ $\Delta$ gI-RFP+ (Meurens *et al*, 2004). Su patrón de restricción con la enzima Hind III es similar a BHV-1. Posee el gen *gC* y carece del gen *gI*. En cuanto a las proteínas marcadoras, este virus contiene el gen *rfp* y carece del gen *gfp*. En este trabajo el virus R2 se denominó R2  $\Delta$ gI(RFP+).

Todas las cepas fueron propagadas en la línea celular de riñón bovino Mardin Darby (MDBK) bajo las condiciones detalladas en la sección 1 de MyM Cap I.

## 2. Animales

Se utilizaron bovinos serológicamente negativos a BHV-1 y BHV-5, raza Aberdeen Angus de 3-4 meses de edad. Los animales fueron provistos por el Campo Experimental del CNIA de INTA Castelar. El manejo de los mismos se realizó bajo las normas del Código de Bienestar Animal de EEUU (Guide for the Care and use of laboratory animals, Natural Research Council. National Academy Press, 1996. Washington USA).

## 3. Estudio de virulencia *in vivo*

### 3.1. Diseño experimental

Se utilizaron 18 bovinos separados en grupos de la siguiente manera:

- Grupo parental BHV-5: inoculación con BHV-5 cepa N569; 4 animales
- Grupo parental BHV-1: inoculados con BHV-1.2 cepa Aus12  $\Delta$ gC GFP+  $\Delta$ gI RFP+; 4 animales
- Grupo R1: inoculados con virus recombinante 1; 4 animales
- Grupo R2: inoculados con virus recombinante 2; 4 animales
- Grupo control: inoculados con medio de cultivo; 2 animales

### **3.2. Infección viral y manejo de animales**

Los animales fueron alojados en boxes de bioseguridad tipo II e infectados por vía intranasal con 3 ml (1,5 ml en cada nostril) de  $1 \times 10^{6.5}$  DICT<sub>50</sub>/ml del virus correspondiente o medio de transporte (MEM-E) para los animales control.

Las instalaciones utilizadas para este ensayo poseen las características descritas en la sección 4 de MyM Cap I. Sin embargo, dado que cada grupo recibió un virus diferente, se extremaron los cuidados para evitar la contaminación de las salas y de los animales con las distintas cepas virales. Para ello, se implementó el cambio de ropa del personal al ingresar a cada sala, utilizando ambos, barbijo, cofia, guantes y cubrebota descartables. Además, cada sala contaba con los materiales necesarios para el muestreo y registro de los signos clínicos.

### **3.3. Toma de muestras**

Se tomaron muestras de secreciones nasales y de suero al día cero para establecer los valores basales. Asimismo, se registró la temperatura rectal y el estado general de los animales. La metodología utilizada se describe en la sección 3 de MyM Cap I.

Desde el día 0 al 18 pi, se tomaron diariamente muestras de secreciones nasales, y luego cada 3-4 días hasta el final de la experiencia. Las muestras de suero se recolectaron los días 7, 14 y 21 pi y el día de necropsia (35-37 dpi).

### **3.4. Evaluación de signos clínicos**

A partir del día de infección, los animales fueron examinados diariamente por un veterinario que desconocía el tratamiento recibido por cada grupo. Los datos registrados y el criterio utilizado se detalla en la sección 5 de MyM Cap I y en el Anexo I.

### **3.5. Necropsias y análisis histopatológico**

Entre los días 35 y 37 pi, todos los animales fueron sacrificados de acuerdo a las normas del Código de Bienestar Animal de EEUU (Guide for the Care and use of laboratory animals. Natural Research Council. National Academy Press, 1996. Washington USA), como se describe en la sección 6 de MyM Cap I. Para evitar la contaminación de las muestras, se utilizaron equipos de material estéril diferentes para realizar las necropsias de cada grupo de animales infectados. Las muestras de SNC fueron fijadas en solución salina de formaldehído al 10 % y remitidas al

Laboratorio de Histopatología, Instituto de Patobiología, CICVyA, para su análisis histopatológico (sección 6 MyM Cap I).

### 3.6. Evaluación de anticuerpos en suero y secreciones nasales

Se determinó la presencia de anticuerpos anti BHV-1 en suero realizando los ensayos de ELISA para anticuerpos totales en suero (sección 8.1.2) y seroneutralización (sección 8.2) descriptos en MyM Cap I. La presencia de IgA e IgG<sub>1</sub> en secreciones nasales se realizó tal como se detalla en la sección 8.1.4. de MyM Cap I.

### 3.7. Titulación viral

El virus presente en las secreciones recolectadas se analizó mediante el ensayo de titulación a punto final (sección 7 de MyM Cap I). Las muestras negativas fueron sometidas a tres pasajes ciegos por células siguiendo el protocolo detallado en la sección 7 de MyM Cap I.

### 3.8. Identificación de virus excretado

La identificación de las cepas virales se realizó mediante reacciones de amplificación por PCR utilizando ADN total obtenido de células infectadas. La expresión del gen marcador *gfp* en las cepas portadoras fue identificada por visualización en microscopio de fluorescencia.

#### 3.8.1. Purificación de ADN a partir de células infectadas

Se infectaron células MDBK en placas de cultivo de 60 mm de diámetro (p60) con muestras provenientes de secreciones nasales que presentaron efecto citopático luego de la titulación viral o los pasajes ciegos. Al observarse efecto citopático (ECP) extensivo, se descartó el medio de cultivo, se lavó la monocapa dos veces con PBS 1 X, se levantaron las células en 1 ml de PBS 1 X (extracto celular) y se congelaron a -70°C. El extracto se congeló y descongeló 3 veces y se realizó el siguiente protocolo de extracción de ADN total.

Se tomaron 350 µl del extracto celular, se agregó un volumen de *buffer* de extracción 2X (Tris 200 mM pH 8, EDTA 20 mM pH 8, NaCl 200 mM, SDS 2 %, β-mercaptoetanol 20 mM), se agitó vigorosamente y se incubó durante 10 min a 65°C. Luego, se agregaron 250 µl de acetato de potasio (5 M), se mezcló por inversión 20 veces y se incubó en hielo 20 min. Posteriormente, se centrifugó 30 min a 10000 rpm a 4°C, se trasvasó el sobrenadante a un tubo nuevo y se agregaron 700 µl de isopropanol absoluto. Se centrifugó 15-20 min a 12000 rpm a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante. El *pellet* se lavó dos veces con 500 µl de etanol 70 % (centrifugando 15 min a 10000 rpm y descartando el sobrenadante con pipeta), se secó a 37°C y se resuspendió con 50 µl de agua ultrafiltrada.

### 3.8.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los oligonucleótidos utilizados para las reacciones de amplificación por PCR que permiten diferenciar las cepas excretadas se detallan en la tabla 1.

Tabla 1. Oligonucleótidos para diferenciación de cepas virales excretadas.

Oligonucleótido	Secuencia (5´ a 3´)	Tamaño de producto	Virus	Fuente
RFP-F	CAGTTCCAGTACGGCTC	300 pb	---	Este trabajo
RFP-R	ATCTCGCCCTTCAGCAC			
1-gE-F	TCTAGAAGCGAAGAATAAACG	300 pb	BHV-1	Kotsias, tesis doctoral
1-gE-R	GGATCCTGCCAATGCCCTTT			
5-FI-gE-F	<u>TAAGCTT</u> TGCTGCTGCTCGCGCTCT *	500 pb	BHV-5	Este trabajo
5-FI-gE-R	TT <u>CTGCAGG</u> CCAGACGCTTCTCTCAG **			

Los oligonucleótidos \* y \*\* poseen una secuencia adicional (subrayada) que corresponde al sitio de reconocimiento para las enzimas HindIII y PstI respectivamente.

Las reacciones se realizaron bajo las siguientes condiciones: para reacciones de 12,5 µl finales se utilizaron 5 ng de ADN total (viral y celular), *buffer* de la enzima Taq ADN polimerasa 1 X, MgCl<sub>2</sub> 1,5-4 mM, dNTPs 200 µM (cada uno), 100 ng de oligonucleótidos sentido y antisentido y 1-2 U de la enzima Taq ADN polimerasa (Invitrogen). Siempre se incluyó como control negativo una reacción de PCR con todos los reactivos excepto el ADN.

Las condiciones finales de ciclado para cada amplificación se detallan en el Anexo 2. La temperatura de fusión (T<sub>f</sub>) estimada para el paso de hibridación de ácidos nucleicos se calculó según la siguiente fórmula:

$$T_f = 4^{\circ}\text{C} \times n^{\circ}(\text{G+C}) + 2^{\circ}\text{C} \times n^{\circ}(\text{A+T})$$

Dado el alto contenido de GC del genoma de los herpesvirus (72 % en BHV-1, 74 % en BHV-5), debieron evaluarse diversas variables para establecer las condiciones óptimas de cada reacción de amplificación por PCR. Las variables analizadas fueron: *buffer* de reacción (*buffer* estándar, Invitrogen; *ThermoPol buffer*, *New England Biolabs* (NEB); *High Fidelity*, Invitrogen; *Green GoTaq*, Promega; *PrimeSTAR*, Takara Bio Inc), características y marca de la enzima ADN Polimerasa (Taq ADN polimerasa recombinante de Invitrogen-Brasil; Taq ADN polimerasa, NEB; *Platinum Taq ADN Polimerasa High Fidelity*, Invitrogen; *PrimeSTAR HS ADN polimerasa*, Takara Bio Inc), agregado de agentes desnaturizantes (glicerol, DMSO, NP 40, tritón X-100), temperatura de hibridación, ciclado (*hot start*, *touch down*).

#### 4. Caracterización del *background* genético de los virus recombinantes BHV-1/5

##### 4.1. Purificación viral y preparación de ADN viral

Se infectaron botellas de cultivo celular de 150 cm<sup>2</sup> de superficie (T150) con cada cepa viral, las cuales fueron congeladas a -80°C cuando el ECP fue extensivo. Las células se congelaron y descongelaron 3 veces y el sobrenadante (sb) se centrifugó 30 min a 3000 rpm a 4°C. El sobrenadante fue ultracentrifugado a 100000 g por 1 h 4°C. Se volcó el sb y se secó el interior del tubo con papel. El *pellet* se resuspendió en 1 ml de TE (Tris 200 mM pH 8, EDTA 20 mM) NP40 0,1 % v/v, se colocó el tubo en un baño de 37°C por 20 min para disolver los grumos grandes y luego en baño de 56°C con agitación durante no menos de 40 min hasta que las partículas estuvieron totalmente disueltas. Posteriormente, se unificaron las alícuotas del mismo virus (sin superar los 3 ml) y se completó con TE hasta un volumen final de 30 ml. Se agregó 5 ml de sacarosa 30 % p/v con pipeta pasteur de vidrio (apoyada en el fondo del tubo). Se realizó una ultracentrifugación a 100000 g durante 2 h a 4°C, se volcó el sb y se secó el tubo. Se resuspendió el *pellet* en 500 µl de *buffer* de extracción (TE pH 8, SDS 1 %, Proteinasa K 0,5 mg/ml). Se colocó el tubo en baño de 56°C por 2 h controlando la disolución del *pellet*. Una vez disuelto completamente, se trasvasó a un tubo de 1,5 ml y se agregó un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (Invitrogen). Se mezcló por inversión 10 veces, se centrifugó 10 min a 13000 rpm a 4°C y se recuperó la fase acuosa. Se repitió este procedimiento una vez más. Luego, se agregó 1/10 AcNa 3 M y 2 volúmenes de etanol absoluto (volumen final 450-500 µl) y se colocó 1 h a -80°C o durante toda la noche a -20°C. Luego se centrifugó 10 min a 13000 rpm a 4°C, se descartó el sb y se lavó el *pellet* con 600 µl de etanol 70 % (2 veces). Se secó el *pellet* y se resuspendió en 50 µl de agua ultrafiltrada. Para lograr una buena resuspensión del *pellet*, se dejó el tubo toda la noche a 4°C en agitación.

##### 4.2. Elección de genes blanco

Para analizar la identidad genómica de los virus recombinantes BHV-1/5 y el putativo sitio de recombinación entre las cepas parentales se eligió la estrategia de amplificación por PCR de fragmentos de aproximadamente 150-340 pb en genes separados por 8-15 kpb y secuenciación de los mismos. Los oligonucleótidos fueron diseñados en base a las secuencias disponibles en GenBank (código de acceso de BHV-1: NC\_001847, código de acceso de BHV-5: AY261359) y se eligieron las regiones más divergentes entre BHV-1 y BHV-5.

##### 4.3. Oligonucleótidos

En la siguiente tabla se detallan los oligonucleótidos utilizados para el análisis del *background* genético de los virus recombinantes.

Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados.

Oligonucleótido	Secuencia blanco	Secuencia del oligonucleótido (5´ a 3´)	Virus	Tamaño del producto *	Posición en genoma**
1-UL11-F 1-UL11-R	UL11	ATGGGACAGGCGGCGTCGTGC CAAATCGTGAATTCTTTGCGTGT	BHV-1	329	84191-84520
1-UL27-F 1-UL27-R	UL27	TGGGCATGGGCGAGATCA GAGTAGCTGGTGTGCTCGC	BHV-1	369	56001-56370
1-UL2-F 1-UL2-R	UL2	GCCTGCACTTGCCTTTGGCAT TGGCGCCGCAGCCAGGCGGTC	BHV-1	363	100392-100755
1-UL42-F 1-UL42-R	UL42	ATCGTCGGCGGAGGCGGT CCATGAGGGCGGCGAGTCC	BHV-1	339	19816-20155
1-UL43-42-F 1-UL43-42-R	UL43-42	CCCCGACGCAGAAGCACAG ACCGCCTCCGCCGACGAT	BHV-1	1420	18414-19833
1-UL43-F 1-UL43-R	UL43	AGGTCTCGGGCTGGCGGTCT CTGTGCTTCTGCGTCGGGG	BHV-1	207	18225-18432
1-UL52-F 1-UL52-R	UL52	GAAGGAAACCAAGTCGGG GGCTTTACTCCAACAGCG	BHV-1	223	6413-6636
1-UL7-F 1-UL7-R	UL7	GGTGTGGTAGATCGCCGT TTTGCCCTCTGCGTCGTG	BHV-1	287	90967-91254
1-US8-F 1-US8-R	US8	ACGGCGCACGCGAGAGGGTTC CGTCGAGGCAGACGGGCTCCG	BHV-1	299	121676-121975
5-UL11-F 5-UL11-R	UL11	ATGGGACAGGCGGCGTCGTGC TGCAGGTCGTCGAGGCTAAA	BHV-5	115	85822-85937
5-UL27-F 5-UL27-R	UL27	CCGATGCTCAGCAACG(A/C)G AGTGGTCGTAGGTGAAGTGC	BHV-5	267	58074-58341
5-UL2-F 5-UL2-R	UL2	GCCTGCCCCTGGCTGTGGTAG TTCGTCCCCAAGCCCTCGG	BHV-5	365	100284-100646
5-UL42-F 5-UL42-R	UL42	TTATTGGTTTCACCCAGGGG TGCCGACGATGACGACGA	BHV-5	224	20446-20670
5-UL43-42-F 5-UL43-42-R	UL43-42	GGCGTGCAGGACCTTGGC CCCCTGGGTGAAACCAATAA	BHV-5	1178	19288-20465
5-UL43-F 5-UL43-R	UL43	GCGGTAGACTCTCGGTCC GCCAAGGTCCTGCACGCC	BHV-5	244	19061-19305
5-UL52-F 5-UL52-R	UL52	AAAAGAGACCAGGTCGGG AAGACGGTCGCCGCTTAC	BHV-5	246	7104-7350
5-UL7-F 5-UL7-R	UL7	GGTGTGGTAGATCGCCGT GATGTTCTTGAGGGGCTG	BHV-5	267	92729-92996
5-US8-F 5-US8-R	US8	CGAGCCGAGTTCGTGAGACA CGTCGAGGCAGACGGGCGTCG	BHV-5	344	123928-124272
UL22-F UL22-R	UL22	GACTACGACCTGGTGCCG AGACGCTCAGGAAGCCGA	BHV-1 y BHV-5	327 348	64893-65220 66230-66578
UL28-F1 UL28-R1	UL28-1	CGCACCACGTCTTCCGCC CAGTCCACGCCGTCCAGC	BHV-1 y BHV-5	258 258	54034-54292 55328-55586
UL28-F2 UL28-R2	UL28-2	ACCTCAAGGAGGAGCTGG GACTCC/ATCGTAGGTCAGG	BHV-1 y BHV-5	286 286	55108-55128 55376-55393
UL29-F UL29-R	UL29	GGGCTTCGTGTACGTCTG CAGCCACTACCACCCGAA	BHV-1 y BHV-5	224 224	49227-49501 50539-50763

UL34-F	UL34	AAGGCGCAGTATCGCGAGA	BHV-1 y	346	41199-41545
UL34-R		AGCTGCTTCGTGCGCATGCC	BHV-5	344	42414-42758
UL36-F	UL36	CGTTTCTGCGGCTGGCCTTC	BHV-1 y	317	31173-31490
UL36-R		TCACCAGCGCCAGCGACGT	BHV-5	317	32266-32583
UL40-F	UL40	GCCAAACAGAGGAGGCAG	BHV-1 y	348	22677-23025
UL40-R		CATGATTCTATTCGAGGGC	BHV-5	351	23530-23881
UL41-F	UL41	GGGGCTCTTCAAGCT(A/G)CTGC	BHV-1 y	236	21070-21306
UL41-R		AAGATCGGGTAGTAGGAGCG	BHV-5	236	21929-22165
UL43-42-int-F	UL43-42	GCCGTCAC(G/A)AAGTGCG	BHV-1 y		19127-19142 <sup>a</sup>
UL43-42-int-R		CGCACTT(C/T)GTGACGGC	BHV-5		19979-19994 <sup>a</sup>
US2-F	US2	CGAGTTCAGCAAGTTGTAGCC	BHV-1 y	315	115340-115655
US2-R		CATAGTCACGTGTGCGGATAG	BHV-5	318	117649-117967

\* Tamaño del fragmento amplificado utilizando los oligonucleótidos indicados

\*\* Posición del fragmento amplificado en el genoma de BHV-1 o BHV-5 según corresponda, basados en las secuencias disponibles en GenBank (acceso BHV-1: NC\_001847; acceso BHV-5: AY261359).

<sup>a</sup> Posición de los oligonucleótidos en el genoma de BHV-1 y BHV-5 respectivamente.

#### 4.4. PCR

Las reacciones de amplificación por PCR para cada gen blanco se realizaron con el ADN purificado de las dos cepas parentales (BHV-5 N569, BHV-1.2 Aus12  $\Delta$ gC GFP+  $\Delta$ gI RFP+) y los dos recombinantes (R1  $\Delta$ gC GFP+ y R2  $\Delta$ gI RFP+) de manera similar a lo descrito en la sección 3.8.2. de este capítulo.

Las condiciones finales de ciclado para amplificar por PCR los fragmentos que corresponden a cada gen blanco se detallan en el Anexo IV.

#### 4.5. Electroforesis en gel de agarosa

Las muestras de ADN se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa de concentraciones entre 0,8 % y 1,5 % en *buffer* TAE 1 X (Tris-acetato 10 mM, EDTA 1 mM) a 5-10 V/cm<sup>2</sup>. Para visualizar las bandas de ADN se utilizó bromuro de etidio a una concentración de 0,5  $\mu$ g/ml de gel y un transiluminador de luz UV. Las muestras se sembraron con *buffer* de siembra de concentración 10 X (glicerol 50 %, TAE 5 X, azul de bromofenol 1%).

#### 4.6. Purificación de productos de PCR

Los productos de PCR fueron purificados de la solución de reacción utilizando el *kit* comercial Illustra GFX™ PCR, *DNA and gel band purification kit* (GE Healthcare). En el caso de observarse más de un producto de amplificación, se realizó una purificación del producto del tamaño esperado a partir de geles de agarosa. Para ello, se realizó una electroforesis en gel de agarosa según lo descrito en la sección 5.5., la banda correspondiente al producto del tamaño esperado se escindió del gel utilizando bisturí y se purificó con el *kit* comercial Qiaex II (QiaGen). En ambos casos, el ADN obtenido fue resuspendido en 20  $\mu$ l de Tris 10 mM pH 8.



#### 4.7. Secuenciación automática

La secuenciación de los productos de amplificación por PCR obtenidos en Bélgica se realizó con el sistema BigDye Terminator v3.0 (Applied Biosystems) y con el analizador ABI Prism 3730 DNA analyser (Applied Biosystems). La secuenciación de los productos de amplificación por PCR obtenidos en Argentina se realizó utilizando el [Servicio Interno de Genotipificación y Secuenciación- Ibiotec](#) (Instituto de Biotecnología, CICVyA). En este lugar se trabaja con el *kit* Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) y con el secuenciador 3130 xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Todas las secuencias se realizaron en ambas cadenas.

#### 4.8. Herramientas de bioinformática

El acceso a las secuencias genómicas de BHV-1 y BHV-5 se realizó utilizando el sitio *web* de NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

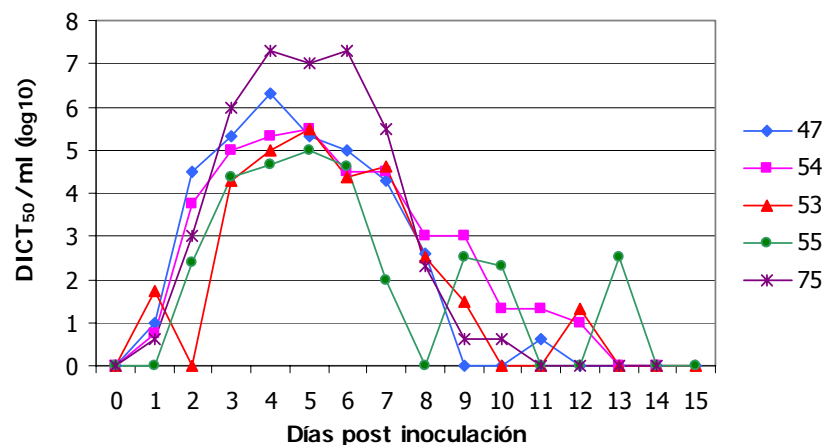
La edición y análisis de las secuencias nucleótídicas se realizó con los programa BioEdit versión 7.0.5.3 (Hall, 1999). Para la comparación y alineamiento de las secuencias también se utilizó el programa BioEdit versión 7.0.5.3 (Hall, 1999), el programa Vector NTI Suite versión 8.0 (InforMax, Inc, 1994-2002) y las herramientas del sitio *web* JustBio.com de acceso libre a través de internet ([www.justbio.com](http://www.justbio.com)).

## 1. INFECCIÓN EXPERIMENTAL DE BOVINOS CON BHV-5

Con el objetivo de contar con los parámetros de respuesta inmune, excreción viral y signos clínicos asociados a la infección con BHV-5 como una herramienta para posteriores experiencias, se realizó una infección de 5 bovinos por vía intranasal con una cepa Argentina de BHV-5 (A663).

### 1.1. Excreción viral y signos clínicos

Luego de realizar la infección por vía intranasal (aerolización), los animales comenzaron a excretar partículas virales infectivas desde el día 1 hasta el día 10/13 post infección (pi) (Figura 1). Los niveles máximos de excreción viral se detectaron entre los días 4 y 6 pi alcanzando valores de 5 a 7,3 DICT<sub>50</sub>/ml.

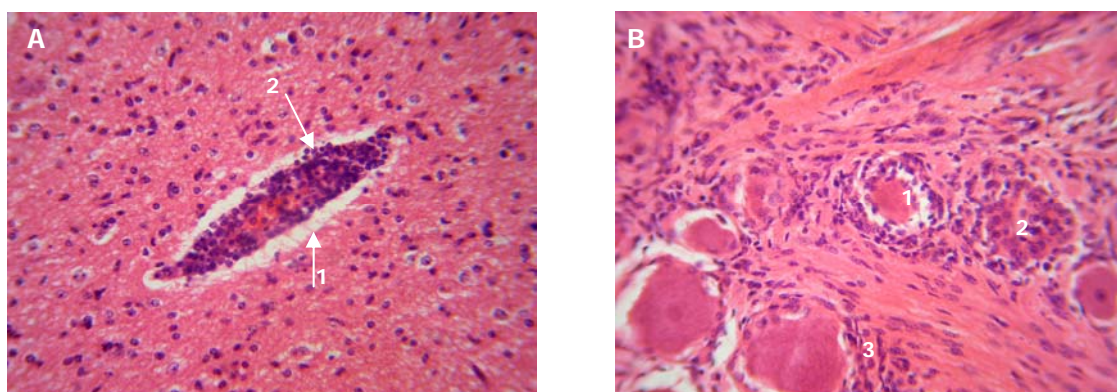


**Figura 1.** Curvas de excreción viral de los animales infectados con BHV-5 A663.

A partir del séptimo día pi, todos los animales presentaron secreción nasal seromucosa, que luego se transformó en mucopurulenta. Los animales N° 47 y 55 presentaron temperatura corporal superior a los 40°C (40,5°C) los días 13 y 12-14 pi, respectivamente.

En cuanto al desarrollo de signos nerviosos, todos los animales presentaron un cuadro de anorexia, decaimiento y bruxismo desde el día 10/12 pi. Posteriormente, los signos se agravaron observándose embotamiento, propiocepción negativa, ataxia, temblores musculares, frente apoyada contra la pared o bebederos, marcha en círculo y convulsiones. Los animales N° 55 y 54 murieron a las 24 horas de aparecidos los signos severos (14 y 15 dpi respectivamente), mientras que el animal N° 75 fue sacrificado el día 15 pi debido al agravamiento de tales signos. Los animales N° 47 y 53 se recuperaron a los 20/22 dpi.

Al realizar la necropsia del animal 75 se halló un área más pálida en la región cortical frontal del encéfalo, resultando difícil la diferenciación de las sustancias blanca y gris. A nivel microscópico, se observó en diversas secciones del encéfalo -corteza frontal, parietal y occipital, tálamo, cerebro medio, puente, medula oblonga (obex), ganglio trigémino y cerebelo- meningoencefalitis no supurativa, representada por acúmulos de células mononucleares en la pared de diversos vasos sanguíneos, neuronofagia, gliosis multifocal, edema severo, diversos grados de degeneración neuronal (cromatolisis) y cuerpos de inclusión intranucleares en astrocitos. Las lesiones más severas se observaron en la corteza frontal. En cuanto a las meninges, se encontraron algunas células de gitter, lo que indicaría un proceso de malacia incipiente. Las alteraciones descritas son compatibles con una infección por BHV-5.



**Figura 2.** Lesiones encontradas en corteza frontal y ganglio trigémino del animal Nº 75. Tinciones con hematoxilina eosina, 400X. A) Corteza frontal: 1- edema vasogénico; 2- células mononucleares en vasos sanguíneos y manguitos perivasculares. B) Ganglio trigémino: 1- degeneración neuronal; 2- neuronofagia; 3- infiltrado mononuclear.

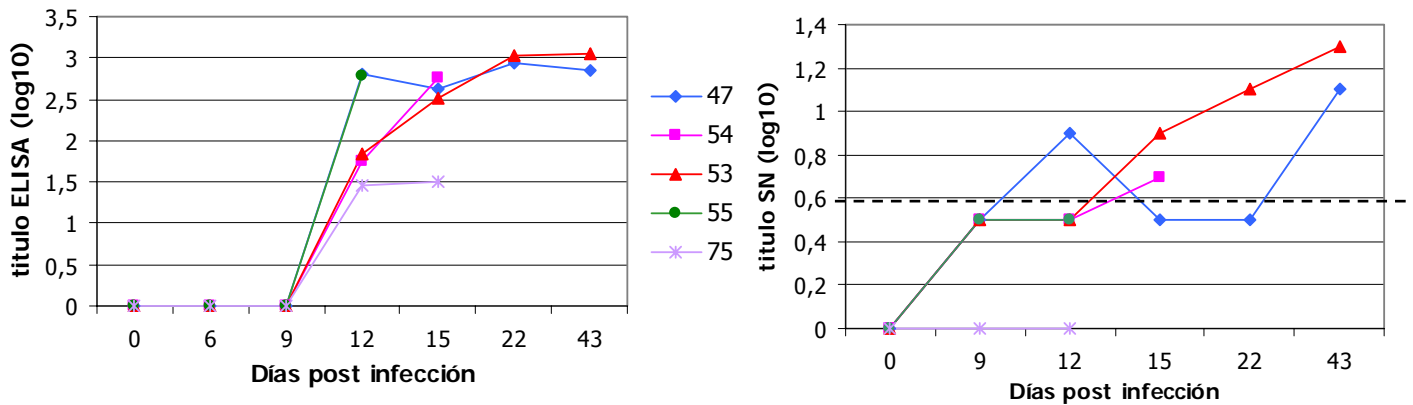
Los resultados de excreción viral, signología clínica y hallazgos histopatológicos presentados en esta sección permiten concluir que se logró reproducir experimentalmente el cuadro clínico asociado a infecciones con BHV-5. A pesar de observarse diferencias en los niveles de excreción viral y severidad del cuadro clínico entre los animales, este fenómeno ha sido ampliamente reportado. Se ha sugerido que factores del hospedador como la edad y estado inmunológico serían los responsables de dichas diferencias.

## 1.2. Evaluación de la respuesta inmune

### Respuesta inmune humoral

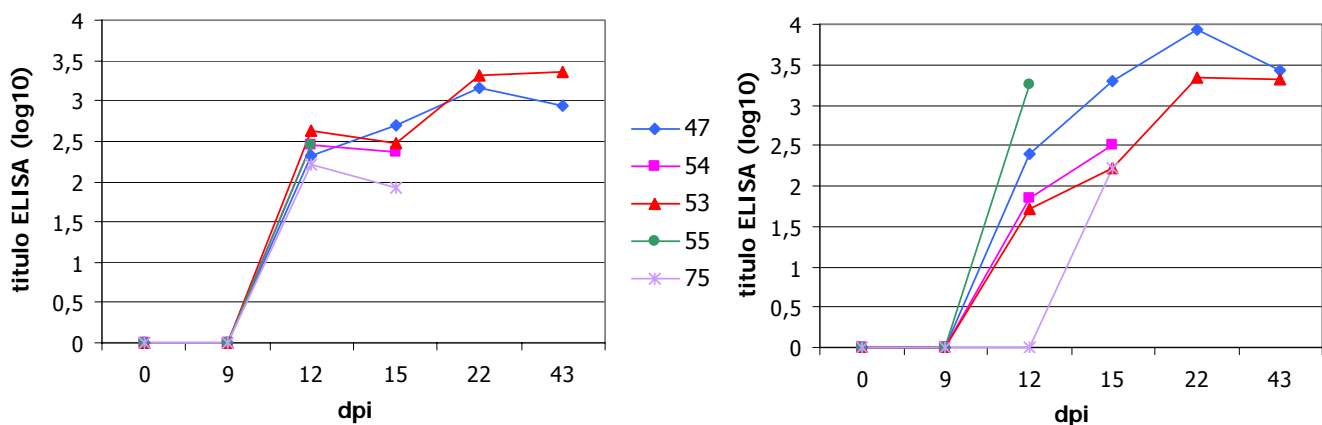
La respuesta inmune humoral en suero fue evaluada por ELISA para anticuerpos totales y por seroneutralización (Figura 3). Todos los animales presentaron anticuerpos totales al día 12 pi, alcanzando títulos máximos de 2,7-3 ( $\log_{10}$ ). Los bovinos que sobrevivieron, mantuvieron

niveles elevados de anticuerpos hasta el último día de muestreo (43 pi). En cuanto a los anticuerpos neutralizantes, los animales N° 53 y 54 desarrollan niveles detectables a los 15 dpi. El animal 47 presentó anticuerpos neutralizantes el día 12 y 43 pi, mientras que los días 15 y 22 pi los sueros fueron negativos probablemente debido a toxicidad celular de los mismos.



**Figura 3.** Niveles de anticuerpos totales (izquierda) y neutralizantes (derecha) en suero de los bovinos infectados. La línea punteada indica el punto de corte de los niveles de anticuerpos neutralizantes por sobre el cual se considera como respuesta positiva.

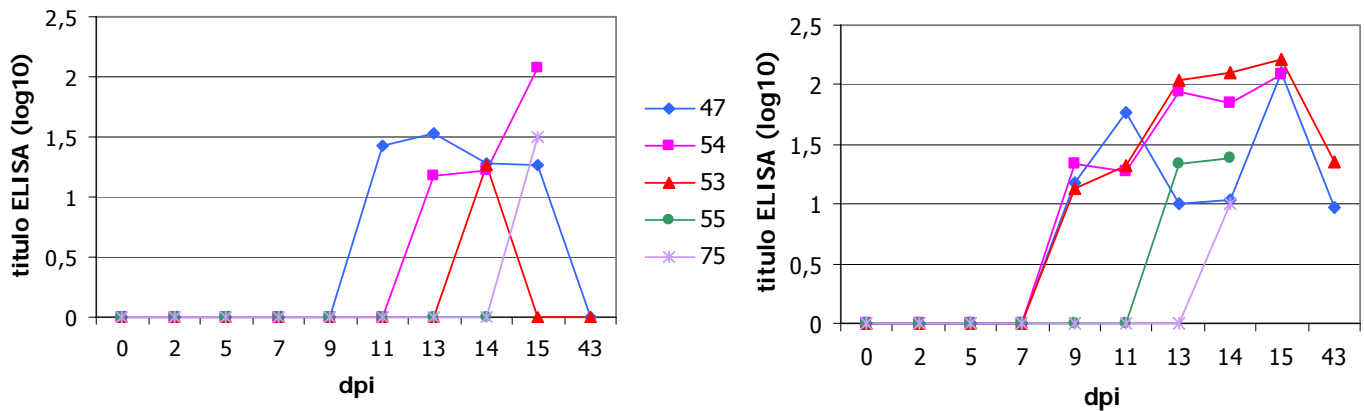
Al evaluar los niveles de IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2</sub> todos los animales desarrollaron niveles detectables de estos isotipos a partir del día 12 pi, excepto en el caso del animal N° 75 que presentó IgG<sub>2</sub> al día 15 pi. Los perfiles de ambos isotipos fueron similares en todos los animales infectados durante todo el período de estudio (Figura 4).



**Figura 4.** Perfiles de IgG<sub>1</sub> (izquierda) e IgG<sub>2</sub> (derecha) en suero de los bovinos infectados.

Por otro lado, las muestras de secreciones nasales tomadas durante el período post infección fueron analizadas mediante un ensayo de ELISA para evaluar niveles de IgA e IgG<sub>1</sub>. Los niveles de IgA comenzaron a detectarse a los 11/13 días pi, alcanzando valores máximos de 1,5/2,1 (log<sub>10</sub>). En el caso de IgG<sub>1</sub>, los animales presentaron este isotipo a partir de los días

9/13 pi, permaneciendo detectables hasta el final del muestreo. Los valores máximos se observaron el día 15 pi con títulos de aproximadamente 2 ( $\log_{10}$ ).



**Figura 5.** Niveles de IgA (izquierda) e IgG<sub>1</sub> (derecha) en secreciones nasales de animales infectados.

### 1.2.2. Respuesta inmune celular

La respuesta inmune celular fue evaluada mediante un ensayo de linfoproliferación, considerando como animales positivos aquellos que presentaron un índice de estimulación (IE) mayor o igual a 3 (ver sección 9.2 de MyM cap I). El ensayo se realizó el día 0 pi (para establecer valores basales) y a los 7 y 14 dpi. En solo dos animales (Nºs 47 y 55) se detectó estimulación del sistema inmune celular a los 7 y 14 dpi.

Los resultados presentados en esta sección muestran que la respuesta inmune humoral en suero de los bovinos infectados comienza a los 12 dpi (excepto el animal 75) y se mantiene con niveles elevados hasta el final de la experiencia, con perfiles similares para todos los animales. En cuanto a la respuesta en secreciones nasales, los niveles de IgA e IgG<sub>1</sub> no fueron homogéneos entre todos los bovinos. A pesar de haber obtenido respuesta inmune celular positiva solo en dos animales, se podría sugerir que hubo inducción de la misma luego de la infección.

## 2. EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD Y LA EFICACIA PROTECTIVA DE VACUNAS INACTIVADAS FRENTE A LA ENFERMEDAD CAUSADA POR BHV-5

Con el objetivo de evaluar la eficacia de vacunas inactivadas frente a la enfermedad causada por BHV-5, se llevó a cabo una experiencia de inmunización de bovinos con vacunas inactivadas basadas en BHV-1 o BHV-5 y luego se realizó un desafío viral con BHV-5.

### 2.1. Evaluación de la inmunogenicidad de vacunas inactivadas basadas en BHV-1 o BHV-5

De acuerdo al diseño experimental descrito en la sección 11.2 de MyM Cap I, dos grupos de bovinos fueron inoculados con vacunas experimentales inactivadas basadas en BHV-1 (n=5) o BHV-5 (n=5). También se incluyó un grupo control sin vacunar (n=7). Durante 70 días post vacunación (dpv), se evaluó tanto la respuesta inmune humoral como celular desarrollada por los animales.

#### 2.1.1. Respuesta inmune humoral

Los niveles de anticuerpos totales en suero fueron medidos por un ensayo de ELISA indirecto (Figura 6). Ambas vacunas inactivadas indujeron perfiles similares de IgG total durante el período estudiado, no detectándose diferencias significativas entre ellas ( $p < 0.01$ ). La respuesta máxima se alcanzó a los 28 dpv (7 días post revacunación, dprv), con un título de anticuerpos de alrededor de 4 ( $\log_{10}$ ). Al momento de realizar el desafío viral, el título de anticuerpos era de 3 ( $\log_{10}$ ) en ambos grupos. Luego de la descarga viral, se observó una respuesta secundaria típica, con aumento en el título de anticuerpos en ambos grupos.

Los animales control sin vacunar no desarrollaron anticuerpos durante el período post vacunación; sin embargo, seroconvirtieron a los 14 días post desafío (dpd).

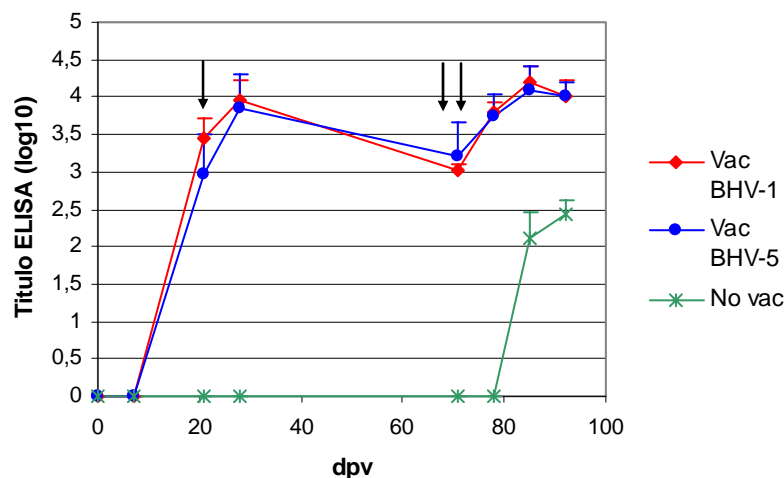
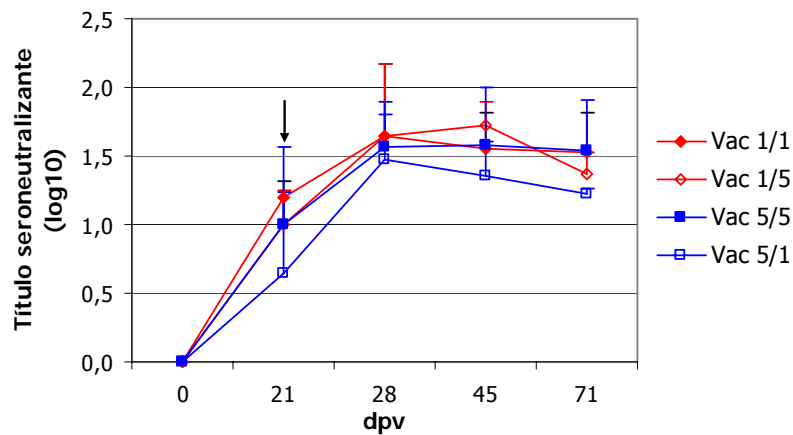


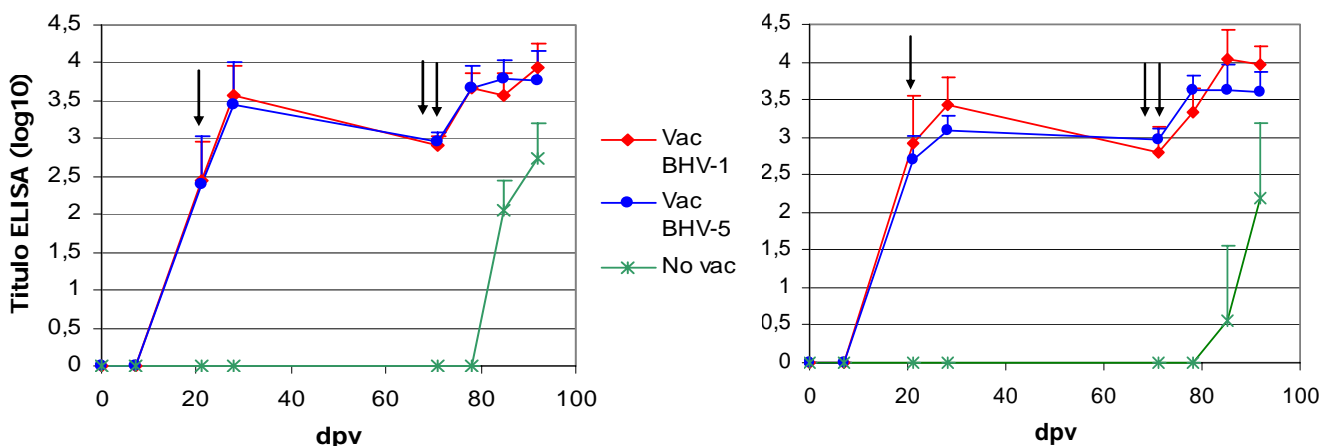
Figura 6. Niveles de anticuerpos totales en suero de bovinos vacunados y no vacunados. Una flecha indica revacunación, dos flechas indican desafío viral.

Los perfiles de anticuerpos neutralizantes obtenidos para los grupos vacunados con BHV-1 y BHV-5 fueron similares (Figura 7). El título máximo se detectó a los 28 dpv con un valor de 1,7 ( $\log_{10}$ ) manteniéndose hasta el momento del desafío viral. Al realizar el ensayo de neutralización cruzada no se observaron diferencias significativas en los títulos de anticuerpos neutralizantes al evaluar las muestras con el virus homólogo y heterólogo ( $p < 0,01$ ). Solo se observó una diferencia significativa el día 21 pv entre el grupo vacunado con BHV-5 neutralizado con BHV-1 (Vac 5/1) y el grupo vacunado con BHV-1 neutralizado con BHV-1 (Vac 1/1).



**Figura 7.** Niveles de anticuerpos neutralizantes en suero de bovinos vacunados enfrentados al con el virus homólogo y heterólogo. Vac 1/1: sueros de animales vacunados con BHV-1 y neutralizados con BHV-1; Vac 1/5: sueros de animales vacunados con BHV-1 y neutralizados con BHV-5; Vac 5/5: sueros de animales vacunados con BHV-5 y neutralizados con BHV-5; Vac 5/1: sueros de animales vacunados con BHV-5 y neutralizados con BHV-1. La flecha indica revacunación.

En cuanto a los isotipos séricos, en la Figura 8 se muestran los perfiles de IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2</sub>. No se observaron diferencias significativas en los títulos obtenidos de ambos isotipos entre los grupos vacunados con BHV-1 y BHV-5 tanto para el período post vacunación como post desafío ( $p < 0,01$ ).



**Figura 8.** Perfiles de isotipos IgG<sub>1</sub> (izquierda) e IgG<sub>2</sub> (derecha) en suero de bovinos vacunados y no vacunados. Una flecha indica revacunación, dos flechas indican desafío viral.

Los grupos de animales vacunados con BHV-1 y BHV-5 desarrollaron perfiles similares de IgG<sub>1</sub> en secreciones nasales (Figura 9). Los anticuerpos IgG<sub>1</sub> fueron detectados solo en un animal al día 21 pv mientras que todos los animales fueron positivos a los 28 dpv con un título promedio de 2 (log<sub>10</sub>). Este isotipo fue detectado hasta el momento del desafío viral y solo en esa fecha se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos de vacunados ( $p<0,01$ ).

En cuanto a la inmunoglobulina A (IgA), no fue detectada luego de la vacunación y revacunación. Sin embargo, se observó este isotipo a los 7 y 14 dpd en ambos grupos de vacunados (Figura 9).

Los animales control no desarrollaron anticuerpos durante todo el período pv; mientras que, luego del desafío viral, se detectó IgG<sub>1</sub> desde el día 14 pd.

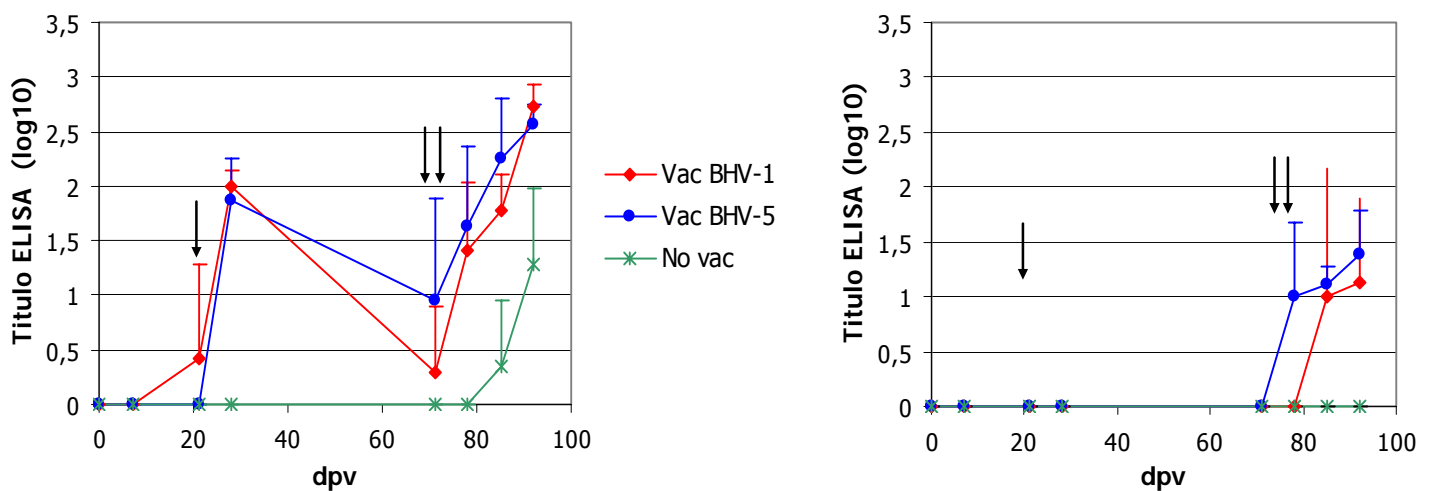


Figura 9. Perfiles de isotipos IgG<sub>1</sub> (izquierda) e IgA (derecha) en secreciones nasales de bovinos vacunados y no vacunados. Una flecha indica revacunación, dos flechas indican desafío viral.

### 2.1.2. Respuesta inmune celular

La respuesta inmune celular fue evaluada mediante el ensayo de linfoproliferación. Solo un animal perteneciente a cada grupo de vacunados presentó un  $IE \geq 3$ . En el grupo vacunado con BHV-1, la respuesta positiva fue detectada los días 7, 28 (7 dprv) y 71 pv; en tanto, en el grupo vacunado con BHV-5 se observó  $IE \geq 3$  a los 28 y 71 dpv. Si bien existe una diferencia entre los grupos al día 7 pv, esta diferencia no es significativa debido al pequeño número de animales ( $p<0,01$ ).

Los resultados presentados en esta sección muestran que la respuesta inmune tanto humoral como celular inducida por las vacunas basadas en BHV-1 o BHV-5, no difieren significativamente tanto en el período post vacunación como post desafío.



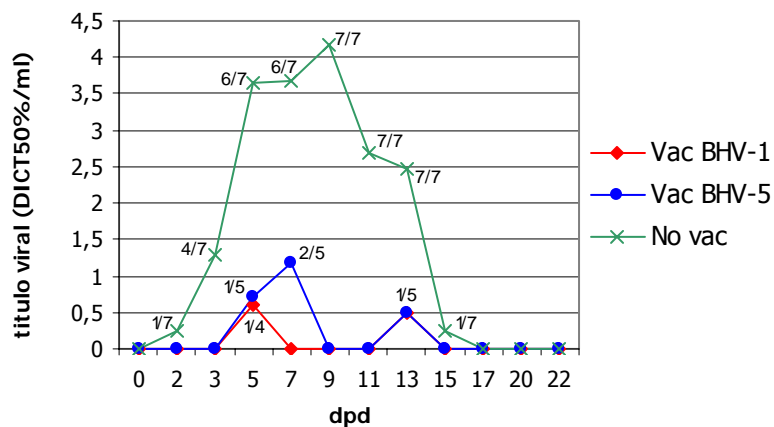
## 2.2. Estudio de la eficacia protectora frente a la enfermedad causada por BHV-5

Para evaluar la posible protección contra BHV-5 otorgada por las vacunas inactivadas basadas en BHV-1 o BHV-5, los animales vacunados y los controles sin vacunar fueron inoculados con la cepa A663 de BHV-5 (desafío viral) a los 71 dpv. Se realizó un seguimiento de los animales a fin de determinar los niveles y período de excreción viral y la signología clínica desarrollada.

Luego del desafío viral todos los animales control desarrollaron altos niveles de excreción viral, confirmando la capacidad infectiva de la cepa viral utilizada. El período de excreción duró entre 4 y 12 días y el pico de excreción se detectó el día 9 pd con un título promedio de  $10^{4,23}$  DICT<sub>50</sub>/ml (Figura 10).

En cuanto a los animales vacunados, solo un animal vacunado con BHV-1 excretó virus los días 5 y 13 pd con títulos de 2,3 y 2 respectivamente. Dentro del grupo vacunado con BHV-5, 3 animales presentaron excreción viral, dos de ellos excretaron solo un día y el tercero presentó excreción viral intermitente (títulos de  $10^{2,5}$  DICT<sub>50</sub>/ml los días 5 y 13 pd).

Como se observa en la Figura 10, la cinética de excreción viral de los animales control (no vacunados) desafiados fue significativamente diferente a la de los grupos de animales vacunados ( $p < 0.01$ ), mientras que no hubo diferencias significativas entre los grupos de vacunados.



**Figura 10.** Niveles de excreción viral de los bovinos vacunados y no vacunados luego de la infección con la cepa A663 de BHV-5. Los números indicados corresponden a n° de animales excretando/n° total de animales por grupo.

Tanto los animales vacunados como los no vacunados presentaron rinitis seromucosa y, en algunos casos, mucopurulenta, entre los días 7 y 20 pd. Asimismo, se observó conjuntivitis en todos los grupos. Sin embargo, los signos respiratorios detectados en los animales vacunados fueron más leves que los observados en los animales no vacunados, y se presentaron por un período de tiempo menor. No se detectó variación de la temperatura corporal en todo el período estudiado.

Todos los animales control sin vacunar desarrollaron signos nerviosos y se recuperaron hacia el final de la experiencia (24 dpd). Los primeros signos se observaron a los 11 dpd con dos animales que movían su cabeza (Nº 133 y 188). Seis animales tuvieron bruxismo desde el día 13 al 20/22 pd (Nº 88, 133, 162, 176, 187, 188). Los animales Nº 161, 162, 187 y 188 presentaron temblor muscular al día 20 pd y el animal Nº 161 también estuvo con anorexia a los 22 dpd. Dos animales, Nº 88 y 187, mostraron apoyo de cabeza contra objetos a los 17 dpd y el Nº 133 a los 20 dpd. Los signos nerviosos más severos se observaron a los 20 dpd.

Por su parte, los animales vacunados tanto con BHV-1 como BHV-5 no presentaron signos nerviosos severos. Solo un animal vacunado con BHV-1 mostró depresión al día 11 pd y bruxismo por 5 días consecutivos; dos animales vacunados con BHV-5 presentaron bruxismo por 2/7 días. Los signos nerviosos detectados en los animales vacunados fueron más leves que los desarrollados por los animales no vacunados.

Los animales vacunados con las formulaciones inactivadas basadas en BHV-1 o BHV-5 presentaron niveles reducidos de excreción viral (uno o dos animales durante días no consecutivos) y disminución de la severidad de los signos clínicos respecto a lo observado en los animales infectados. Estos resultados sugieren que tanto la vacuna de BHV-1 como la de BHV-5 son protectivas frente a infección con BHV-5.

Asimismo, la respuesta inmune humoral y celular inducida por ambas vacunas fue similar en todo el período estudiado.

## 1. ESTUDIO DE LA VIRULENCIA *IN VIVO* DE LOS VIRUS RECOMBINANTES BHV-1/5

Los virus recombinantes BHV-1/5 se obtuvieron luego de un ensayo de coinfección *in vitro* utilizando un virus salvaje de BHV-5 (cepa N569) y un virus doble deletado de BHV-1.2 (cepa Aus12  $\Delta$ gC GFP+  $\Delta$ gI RFP+). Dichos recombinantes contienen regiones genómicas homólogas a cada virus parental y, basándose en análisis con anticuerpos monoclonales y RFLP, se sugirió como sitio de recombinación la zona cercana al gen que codifica para la glicoproteína C (gen *gC*) (Meurens *et al*, 2004).

El virus Recombinante 1 (R1) presenta un patrón de restricción con la enzima HindIII similar a BHV-5. Posee el gen que codifica para la glicoproteína I (gen *gI*) y carece del gen que codifica para la glicoproteína C (gen *gC*). Para las proteínas marcadoras, este virus contiene el gen que codifica para la proteína fluorescente verde (*green fluorescent protein*, gen *gfp* - pEGFP-N1, Clontech) y carece del gen que codifica para la proteína fluorescente roja (*red fluorescent protein*, gen *rfp* - DsRed-1, Clontech). En el caso del virus Recombinante 2 (R2), su patrón de restricción con la enzima HindIII es similar a BHV-1. Posee el gen *gC* y carece del gen *gI*. En cuanto a las proteínas marcadoras, este virus contiene el gen *rfp* y carece del gen *gfp*. Para este trabajo el virus R1 y R2 se denominaron R1  $\Delta$ gC(GFP+) y R2  $\Delta$ gI(RFP+) respectivamente.

Como se mencionó previamente, a pesar de que BHV-1 y BHV-5 poseen una alta similitud tanto genética como antigénica, producen una patogenia diferente en el hospedador natural. Las infecciones con BHV-5 inducen generalmente signos nerviosos y respiratorios, en contraposición, las infecciones con BHV-1 inducen signos respiratorios, reproductivos y genitales. Para evaluar la virulencia *in vivo* de los virus recombinantes BHV-1/5, entendiéndose por ésta la excreción viral y la signología clínica, se diseñó una experiencia de infección viral de bovinos (sección 3.2 MyM Cap II) con los virus recombinantes y los parentales.

### 1.1. Evaluación de signología clínica y excreción viral

Los animales fueron inoculados por aerolización intranasal con cada una de las cepas detalladas a continuación:

- Grupo parental BHV-5: inoculación con BHV-5 cepa N569; 4 animales
- Grupo parental BHV-1: inoculación con BHV-1.2 cepa Aus12  $\Delta$ gC(GFP+) $\Delta$ gI(RFP+); 4 animales
- Grupo R1: inoculación con virus R1  $\Delta$ gC(GFP+); 4 animales
- Grupo R2: inoculación con virus R2  $\Delta$ gI(RFP+); 4 animales
- Grupo control: inoculación con medio de cultivo; 2 animales

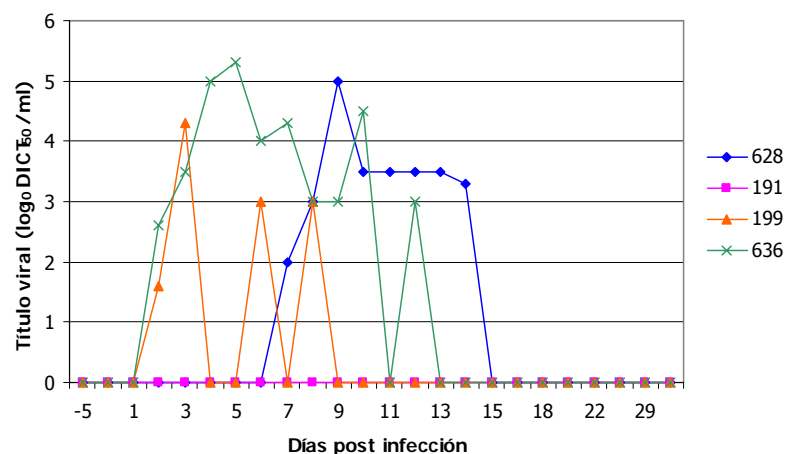
Los animales fueron infectados con 3 ml de  $10^{6,5}$  DICT<sub>50</sub>/ml del virus correspondiente. Una vez finalizada la inoculación, el virus sobrante fue retitulado para confirmar la dosis administrada (Tabla 1).

Virus	Título viral post infección (DICT <sub>50</sub> /ml)
BHV-5 N569	$10^{5,3}$
BHV-1.2 $\Delta$ gC(GFP+) $\Delta$ gI(RFP+)	$10^{5,6}$
R1 $\Delta$ gC(GFP+)	$10^6$
R2 $\Delta$ gI(RFP+)	$10^{6,5}$

**Tabla 1.** Título viral de las suspensiones virales utilizadas para la infección de los bovinos luego de culminada la inoculación.

Los animales fueron examinados diariamente bajo estrictos cuidados para evitar la contaminación entre los grupos y se registraron los datos detallados en la sección 5 de MyM Cap I y Anexo I. Independientemente del virus inoculado, ninguno de los animales presentó hipertermia (temperatura rectal  $\geq 40^\circ\text{C}$ ) o signos respiratorios y/o nerviosos. Estos datos constituyen el primer estudio de la signología clínica inducida por las cepas BHV-1.2 cepa Aus12  $\Delta$ gC(GFP+)  $\Delta$ gI (RFP+), R1  $\Delta$ gC(GFP+) y R2  $\Delta$ gI(RFP+) en bovinos.

En cuanto a la excreción viral, dos animales correspondientes al grupo de bovinos infectados con la cepa parental BHV-5 N569 presentaron excreción viral durante 8-10 días (animales número 636 y 628), mientras que el animal 199 mostró excreción intermitente. Los títulos máximos alcanzados fueron de 4,3-5,3 ( $\log_{10}$  DICT<sub>50</sub>/ml) y se observaron en los días 3, 5 y 9 pi (Figura 1). En las secreciones nasales del animal 191, no se detectaron partículas virales durante todo el período estudiado.



**Figura 1.** Niveles de excreción viral de los animales infectados con BHV-5.

En los animales pertenecientes a los grupos del virus parental BHV-1.2  $\Delta$ gC(GFP+)  $\Delta$ gI(RFP+) y los grupos R1  $\Delta$ gC(GFP+) y R2  $\Delta$ gI(RFP+), se detectaron muestras de secreciones nasales con partículas virales infectivas en un solo día y luego de realizar pasajes ciegos (Tabla 2). Estos resultados reflejan un bajo nivel de replicación *in vivo*, o una baja excreción en secreciones nasales, de las tres cepas virales.

Grupo	Nº de animal	Presencia de partículas infectivas	
		dpi *	nº PC **
<b>BHV-1.2</b> <b><math>\Delta</math>gC(GFP+)</b> <b><math>\Delta</math>gI(RFP+)</b>	175	5	3
	172	--	--
	638	--	--
	635	--	--
<b>R1 <math>\Delta</math>gC(GFP+)</b>	165	--	--
	623	3 (2,5)	--
	177	2 (2,3)	--
	186	--	--
<b>R2 <math>\Delta</math>gI(RFP+)</b>	621	1	1
	622	--	--
	625	--	--
	627	--	--

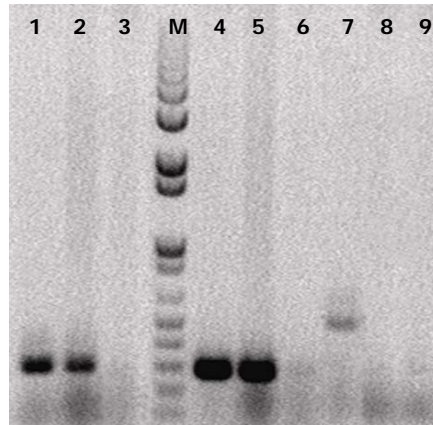
**Tabla 2.** Presencia de virus infectivo en secreciones nasales. \*dpi: días post infección, entre paréntesis se indica el título viral obtenido por titulación a punto final; \*\*nº PC: número de pasaje ciego al cual la muestra fue positiva.

A continuación se realizó la identificación de la cepa viral excretada mediante ensayos de amplificación por PCR y observación de las células infectadas en microscopio de fluorescencia (sección 3.8 MyM Cap II). En la tabla 3 se detallan los resultados esperados para cada cepa viral.

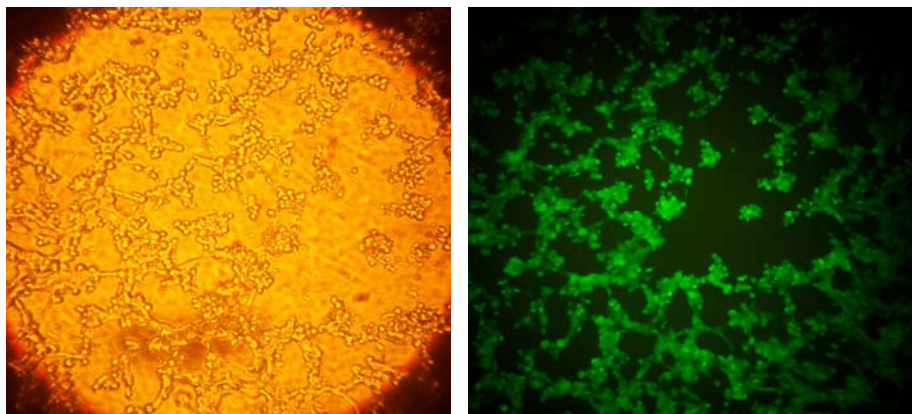
	<b>BHV-1gE*</b>	<b>BHV-5gE*</b>	<b>RFP*</b>	<b>GFP**</b>
<b>R1 <math>\Delta</math>gC(GFP+)</b>	(-)	(+)	(-)	(+)
<b>R2 <math>\Delta</math>gI(RFP+)</b>	(+)	(-)	(+)	(-)
<b>BHV-5 N569</b>	(-)	(+)	(-)	(-)
<b>BHV-1.2</b> <b><math>\Delta</math>gC(GFP+)</b> <b><math>\Delta</math>gI(RFP+)</b>	(+)	(-)	(+)	(+)

**Tabla 3.** Resultados esperados para los ensayos de identificación de las cepas virales excretadas. \*Reacciones de amplificación por PCR; \*\*Detección al microscopio de fluorescencia; (-) resultado negativo; (+) resultado positivo.

El ADN obtenido de células infectadas con las secreciones nasales del animal 175, infectado con el virus BHV-1.2  $\Delta$ gC(GFP+)  $\Delta$ gI(RFP+), fue analizado por amplificación por PCR obteniéndose resultados positivos para las reacciones de amplificación BHV-1gE y RFP (Figura 2). Asimismo, las células infectadas fueron observadas en microscopio de fluorescencia observándose coloración verde intensa (Figura 3). Estos resultados confirman la identidad del virus excretado.



**Figura 2.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación por PCR. Calles 1: control positivo BHV-1 gE; calle 2: muestra animal 175 BHV-1 gE; calle 3: control negativo BHV-1 gE; calle 4: control positivo RFP; calle 5: muestra animal 175 RFP; calle 6: control negativo RFP; calle 7: control positivo BHV-5 gE; calle 8: muestra animal 175 BHV-5 gE; calle 9: control negativo BHV-5 gE. M: marcador de peso molecular (1 kpb Plus, Gibco SRL).



**Figura 3.** Observación al microscopio óptico de células infectadas con secreción nasal del animal 175 (5 dpi). A- con luz blanca; B- con luz ultravioleta. Aumento 400 X

Los ensayos de identificación del virus excretado fueron realizados con todas las muestras que presentaron virus infectivo (Tabla 2) y con muestras del día 8 pi de los animales infectados con el virus BHV-5 N569. Los resultados obtenidos permitieron identificar, en todos los casos, al virus presente en las secreciones nasales como el virus utilizado en la inoculación experimental.

Por su parte, los animales control sin infectar no excretaron virus en todo el período estudiado.

### 1.2. Estudios *post mortem*

A los 35 dpi los animales pertenecientes al grupo parental BHV-5 N569 fueron sacrificados y se realizó la necropsia de cada uno de ellos. La examinación histopatológica de distintas secciones del SNC de estos animales reveló la presencia de lesiones asociadas a la infección con este agente en dos de ellos (nº 636 y 628). Estos animales presentaron meningoencefalitis no supurativa en corteza olfatoria, corteza frontal, parietal y occipital, tálamo, mesencéfalo y cerebelo, evidenciándose a su vez gliosis focal (Figura 4). En cuanto al ganglio trigémino, estos animales presentaron signos de inflamación muy leve (células mononucleares aisladas entre neuronas) (ver Anexo III: Informe histopatológico).

Los animales infectados con el virus parental BHV-1.2  $\Delta$ gC(GFP+) $\Delta$ gI(RFP+), sacrificados el día 36 pi, presentaron lesiones muy leves en las secciones examinadas. La denominación de severidad asignada se basa en la presencia de escasos mononucleares en corteza olfatoria, corteza frontal, parietal y/o occipital, y focos de gliosis aislados en la región olfatoria y/o tálamo. Estas alteraciones podrían atribuirse a una infección viral, aunque podrían deberse a trastornos celulares inespecíficos.

Por otra parte, dos animales infectados con el virus R1  $\Delta$ gC(GFP+) fueron eutanasiados el día 36 pi. Uno de ellos no presentó lesiones y el otro presentó alteraciones muy leves en el ganglio trigémino. Los animales infectados con el virus R2  $\Delta$ gI(RFP+), sacrificados a los 37 dpi, presentaron lesiones muy leves caracterizadas por la presencia de escasos mononucleares en corteza olfatoria, occipital y/o parietal, aislados mononucleares en ganglio trigémino, y gliosis focal leve en corteza parietal. Las alteraciones observadas en los animales de ambos grupos podrían ser compatibles con infección viral aunque, tal como se comentó anteriormente, podrían también deberse a trastornos celulares inespecíficos.

La examinación histopatológica del SNC de los animales infectados con el virus BHV-5 N569 sugiere la infección de los mismos dado que se observaron alteraciones asociadas a este virus (meningoencefalitis no supurativa). Por su parte, las alteraciones encontradas en los animales infectados con BHV-1.2  $\Delta$ gC(GFP+) $\Delta$ gI(RFP+), R1  $\Delta$ gC(GFP+) y R2  $\Delta$ gI(RFP+) podrían estar asociadas a una infección viral pero, dado que fueron muy leves, también podrían atribuirse a factores inespecíficos.

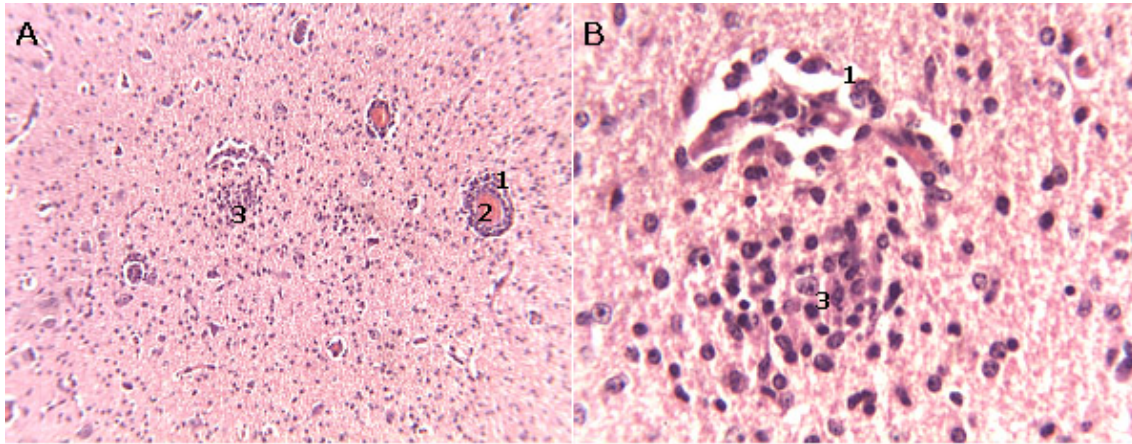


Figura 4. Lesiones encontradas en la corteza olfatoria del animal 636. A: Se observa: 1- Células mononucleares en espacio de Virchow Robin (manguito perivascular) (H/E, 100X); 2: Congestión vascular; 3: Foco de gliosis. B: Detalle de A. Se observa 1 y 3 con mayor aumento. H/E, 400X.

### 1.1. Detección de anticuerpos anti BHV

Para determinar la presencia de anticuerpos anti BHV en suero y secreciones nasales se realizaron los ensayos de ELISA y seroneutralización detallados en la sección 3.6 de MyM Cap II.

Los animales infectados con el virus parental BHV-5 N569, comenzaron a presentar anticuerpos en suero al día 14 pi (animal 199). Al día 35 pi, tres animales de dicho grupo fueron seropositivos para BHV (Tabla 4a).

Animal	0	7	14	21	35
628	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
191	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
199	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
636	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)

Tabla 4a. Presencia de anticuerpos totales en suero de animales infectados con BHV-5 a distintos dpi. (-) ausencia de anticuerpos; (+) presencia de anticuerpos.

En cuanto a los grupos de animales infectados con los virus R1  $\Delta$ gC(GFP+), R2  $\Delta$ gI(RFP+) y parental BHV-1.2  $\Delta$ gC(GFP+) $\Delta$ gI(RFP+), todos permanecieron seronegativos durante el período de estudio excepto por el animal 177 perteneciente al grupo R1  $\Delta$ gC(GFP+), que presentó anticuerpos el día 35 pi.

Los animales control sin infectar no seroconvirtieron.

Los animales que presentaron anticuerpos IgA en secreciones nasales se detallan en la Tabla 4b. En el grupo BHV-5 N569, se detectó este isotipo en los animales 199 y 636 desde el



día 15 y 9 pi respectivamente. Tres animales pertenecientes al grupo R1  $\Delta$ gC(GFP+) (N° 165, 177 y 186), uno del grupo R2  $\Delta$ gI(RFP+) (N° 622) y tres del grupo BHV-1.2  $\Delta$ gC(GFP+)  $\Delta$ gI(RFP+) (N° 175, 172 y 635) presentaron IgA en diversos días del período estudiado. Estos resultados sugieren que dichos animales sufrieron una estimulación del sistema inmune debido a la presencia del virus.

		0	5	7	9	11	15	0	5	7	9	11	15		
BHV-5 N569	628	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	165	R1 $\Delta$ gC(GFP+)
	191	-	-	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	623	
	199	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	177	
	636	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	186	
BHV-1.2 $\Delta$ gC(GFP+) $\Delta$ gI(RFP+)	175	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	621	R2 $\Delta$ gI(RFP+)
	172	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	622	
	638	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	625	
	635	-	-	-	nd	-	+	-	-	-	-	-	-	627	

Tabla 4b. Presencia de anticuerpos IgA en secreciones nasales de los animales infectados a distintos dpi. (-) ausencia de anticuerpos; (+) presencia de anticuerpos; nd: no determinado

Sólo los animales 199 y 636 del grupo BHV-5 N569 y el animal 177 del grupo R1  $\Delta$ gC(GFP+) presentaron IgG<sub>1</sub> en las secreciones nasales desde el día 7, 15 y 5 pi respectivamente, manteniéndose la respuesta hasta el final del período estudiado.

La presencia de anticuerpos anti BHV en el suero y las secreciones nasales de los animales detallados en las Tablas 4a y 4b confirma la infección de los mismos. A pesar que de algunos animales no presentaron excreción viral, ni anticuerpos, deberían analizarse las muestras recolectadas en las necropsias (ganglio trigémino y regiones del SNC) por diversas técnicas, para investigar la presencia de antígenos virales y/o ADN viral y confirmar si efectivamente estuvieron o no infectados.

## 1. CARACTERIZACIÓN DEL *BACKGROUND* GENÉTICO DE LOS VIRUS RECOMBINANTES BHV-1/5

Como se mencionó anteriormente, basándose en el patrón de restricción con la enzima HindIII se sugirió que el virus R1  $\Delta$ gC(GFP+) es similar a BHV-5, mientras que el virus R2  $\Delta$ gI(RFP+) es similar a BHV-1. Sin embargo, estos datos no permiten identificar las regiones genómicas de los virus recombinantes que son homólogas a cada virus parental y el posible sitio donde ocurrió la recombinación. Para ello se eligió la estrategia de amplificación por PCR de pequeños fragmentos de genes definidos, separados por aproximadamente 8-15 kpb, y la

secuenciación de los mismos. De este modo, se realizó un mapeo exploratorio del genoma de cada virus recombinante y se identificó la región donde se produjo la recombinación entre los genomas de los virus parentales.

La reacción de amplificación por PCR con los oligonucleótidos 1-UL2-F y 1-UL2-R, dio como producto un fragmento de aproximadamente 360 pb solo cuando los templados fueron BHV-1.2  $\Delta$ gC(GFP+)  $\Delta$ gI(RFP+) y R2  $\Delta$ gI(RFP+). En cambio, al utilizar los oligonucleótidos 5-UL2-F y 5-UL2-R, se observó un producto de amplificación del mismo tamaño cuando los templados fueron ADN de BHV-5 N569 y R1  $\Delta$ gC(GFP+). Si bien todos los productos poseen el mismo número de nucleótidos, los fragmentos amplificados poseen una gran divergencia nucleotídica entre BHV-1 y BHV-5, de esta manera, la secuenciación de los mismos permitió analizar la identidad de los fragmentos amplificados con el ADN de los virus recombinantes. En la figura 5, se muestra una sección de la comparación de secuencias de los fragmentos de amplificación obtenidos a partir del ADN genómico de los 4 virus. De esta figura puede concluirse que en dicha región el virus R1  $\Delta$ gC(GFP+) es homólogo a BHV-5 y el virus R2  $\Delta$ gI(RFP+) es homólogo a BHV-1.

								Section 9
		(417)	417	430	440	450	468	
BHV-1 (F)	(28)	AAAA	GCCAGATAATTACAAAGTATTTGTTT	TTATTGATTGCGCATGCGCGA				
BHV-1 (R)	(397)	AAAA	GCCAGATAATTACAAAGTATTTGTTT	TTATTGATTGCGCATGCGCGA				
R2 (F)	(28)	AAAA	GCCAGATAATTACAAAGTATTTGTTT	TTATTGATTGCGCATGCGCGA				
R2 (R)	(408)	AAAA	GCCAGATAATTACAAAGTATTTGTTT	TTATTGATTGCGCATGCGCGA				
BHV-5 (F)	(38)	GCGT	AGCGCGTCCACGCGAAGACGTCCGACTTTCGGGGGGCAGCACCCGCTCGA					
BHV-5 (R)	(381)	GCGT	AGCGCGTCCACGCGAAGACGTCCGACTTTCGGGGGGCAGCACCCGCTCGA					
R1 (F)	(66)	GCGT	AGCGCGTCCACGCGAAGACGTCCGACTTTCGGGGGGCAGCACCCGCTCGA					
R1 (R)	(161)	GCGT	AGCGCGTCCACGCGAAGACGTCCGACTTTCGGGGGGCAGCACCCGCTCGA					
								Section 10
		(469)	469	480	490	500	510	520
BHV-1 (F)	(79)	CCTGGG	CCATAAAAGCCCGCGCATGCGCGAGCAGTTACTTTTCGGTTTGGGG					
BHV-1 (R)	(449)	CCTGGG	CCATAAAAGCCCGCGCATGCGCGAGCAGTTACTTTTCGGTTTGGGG					
R2 (F)	(79)	CCTGGG	CCATAAAAGCCCGCGCATGCGCGAGCAGTTACTTTTCGGTTTGGGG					
R2 (R)	(460)	CCTGGG	CCATAAAAGCCCGCGCATGCGCGAGCAGTTACTTTTCGGTTTGGGG					
BHV-5 (F)	(90)	CGCGGCTC	-----CGGCGCTCGTACTCGCGCAGCGCGTGGCGC---	CGGT				
BHV-5 (R)	(433)	CGCGGCTC	-----CGGCGCTCGTACTCGCGCAGCGCGTGGCGC---	CGGT				
R1 (F)	(118)	CGCGGCTC	-----CGGCGCTCGTACTCGCGCAGCGCGTGGCGC---	CGGT				
R1 (R)	(213)	CGCGGCTC	-----CGGCGCTCGTACTCGCGCAGCGCGTGGCGC---	CGGT				
								Section 11
		(521)	521	530	540	550	560	572
BHV-1 (F)	(131)	ATGACAGCGGCGACTGCGGCTCGAAAGTTAAGTATGCAGGCTG-	GGGGTCGC					
BHV-1 (R)	(501)	ATGACAGCGGCGACTGCGGCTCGAAAGTTAAGTATGCAGGCTG-	GGGGTCGC					
R2 (F)	(131)	ATGACAGCGGCGACTGCGGCTCGAAAGTTAAGTATGCAGGCTG-	GGGGTCGC					
R2 (R)	(512)	ATGACAGCGGCGACTGCGGCTCGAAAGTTAAGTATGCAGGCTG-	GGGGTCGC					
BHV-5 (F)	(132)	AGGGCATGGCCAGCTCGGGCTCCAGCACGC-	GCCGCAGGCTTCGGGGACGC					
BHV-5 (R)	(475)	AGGGCATGGCCAGCTCGGGCTCCAGCACGC-	GCCGCAGGCTTCGGGGACGC					
R1 (F)	(160)	AGGGCATGGCCAGCTCGGGCTCCAGCACGC-	GCCGCAGGCTTCGGGGACGC					
R1 (R)	(255)	AGGGCATGGCCAGCTCGGGCTCCAGCACGC-	GCCGCAGGCTTCGGGGACGC					

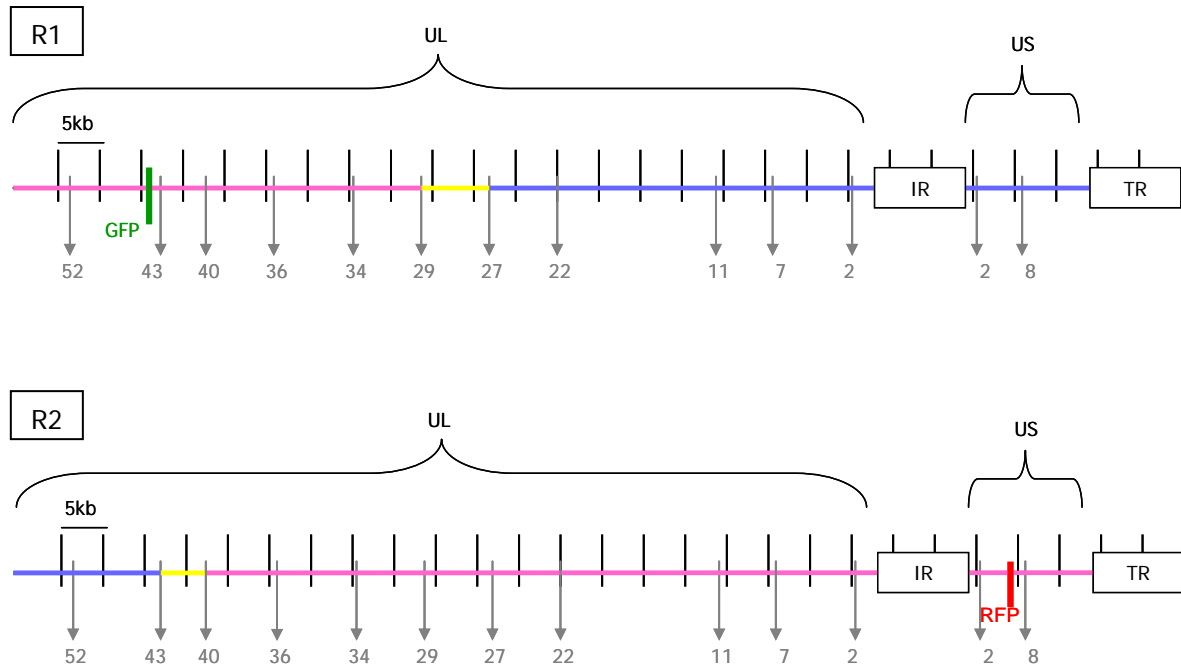
**Figura 5.** Comparación de la secuencia nucleotídica de un fragmento del gen UL2 obtenida en los virus BHV-1.2  $\Delta$ gC(GFP+)  $\Delta$ gI(RFP+), BHV-5 N569, R1  $\Delta$ gC(GFP+) y R2  $\Delta$ gI(RFP+). La secuencia se obtuvo en ambas cadenas identificadas como (F) y (R).

De manera similar a lo descrito para el gen UL2 se analizaron los productos de amplificación y las secuencias de los genes UL52, 43, 40, 36, 34, 29, 27, 22, 11, 7, US2 y 8. La tabla 5 detalla la constitución genómica de los virus recombinantes y la zona putativa donde ocurrió la recombinación entre los virus parentales en base a los resultados obtenidos con las reacciones de amplificación especificadas.

Gen blanco	Genoma R1*	Genoma R2*
UL52	BHV-1	BHV-5
UL43	BHV-1	<b>BHV-5</b>
UL40	BHV-1	<b>BHV-1</b>
UL36	BHV-1	BHV-1
UL34	BHV-1	BHV-1
UL29	<b>BHV-1</b>	BHV-1
UL27	<b>BHV-5</b>	BHV-1
UL22	BHV-5	BHV-1
UL11	BHV-5	BHV-1
UL7	BHV-5	BHV-1
UL2	BHV-5	BHV-1
US2	BHV-5	BHV-1
US8	BHV-5	BHV-1

Tabla 5. Constitución genómica de los virus R1 y R2. \*virus con el cual las secuencias analizadas son homólogas. En color se indica la zona involucrada en la recombinación genómica.

Estos resultados muestran que aproximadamente el 63 % del genoma del virus R1  $\Delta$ gC(GFP+) se corresponde con BHV-5, es decir, desde el nt 58000 al 140000, conteniendo parte del gen UL27 hasta el UL0.5 ("final" de la región UL), las terminaciones interna y terminal (IR y TR) y la región US completa. El 37 % restante es homólogo a BHV-1, y se corresponde con los nt 0 a 50700, es decir, desde el "comienzo" de la región UL hasta aproximadamente la mitad del gen UL29. En el caso de R2  $\Delta$ gI(RFP+), alrededor del 86 % del genoma es homólogo a BHV-1, desde el nt 22600 al 140000, los cuales se corresponden con la mayoría de los genes de la región UL (desde el gen UL40 inclusive hasta el UL0.5), las IR y TR y la región US completa. El restante 14 % es homólogo a BHV-5, abarcando los nt 0 al 18200 (desde el comienzo hasta el gen UL43 -no incluido- de la región UL). A continuación, se esquematiza la constitución genómica de los virus recombinantes.



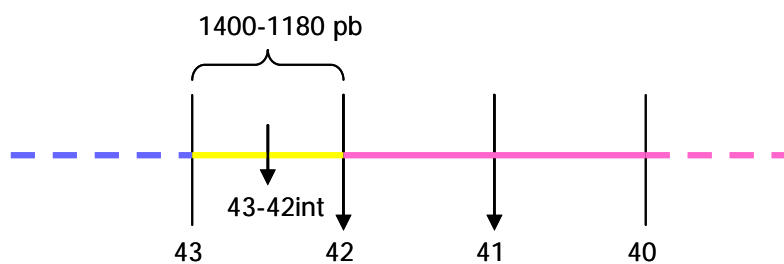
**Figura 6.** Esquema de la constitución genómica de los virus recombinantes R1  $\Delta$ gC(GFP+) y R2  $\Delta$ gI(RFP+). Las flechas y los números indican los genes analizados. La región rosa corresponde a secuencias homólogas a BHV-1, la región en color azul es homóloga a BHV-5, y la zona en amarillo se corresponde con la región del genoma donde ocurrió la recombinación. UL: región única larga; US: región única corta; IR y TR: repetición interna y terminal respectivamente.

Asimismo, de estos resultados puede inferirse en qué región del genoma se produjo la recombinación para originar los virus R1  $\Delta$ gC(GFP+) y R2  $\Delta$ gI(RFP+). En el caso de R1, los genomas de los virus parentales sufrieron un evento de recombinación en la región flanqueada por los marcadores (fragmentos amplificados) de los genes UL29 y UL27. En tanto, el evento de recombinación que originó a R2 debió ocurrir entre los marcadores de los genes UL43 y UL40.

Para conocer con exactitud el lugar donde se produjo el evento de recombinación, fue necesario analizar una región de 6,5-7,3 kpb en R1 $\Delta$ gC(GFP+) (de acuerdo a las secuencias publicadas de BHV-1 y BHV-5 respectivamente) y de 4,3 kpb en R2  $\Delta$ gI(RFP+) (para BHV-1 y BHV-5). Para ello, se diseñaron secuencialmente varios pares de oligonucleótidos que amplificaron fragmentos dentro de las regiones incógnitas.

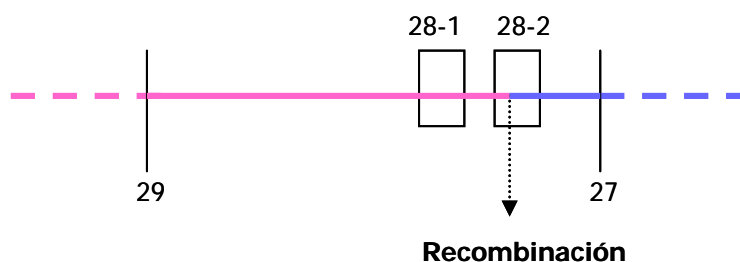
En el caso de R2  $\Delta$ gI(RFP+), dado que la región donde pudo haber ocurrido la recombinación está comprendida por los genes UL43, 42, 41 y 100 nt del gen UL40, se diseñaron dos pares de oligonucleótidos que amplificaban fragmentos correspondientes a los genes UL42 y UL41 (Figura 7). Al comparar la secuencia de dichos fragmentos con la de las cepas parentales se determinó que dichos fragmentos eran homólogos a BHV-1. Por lo tanto, de acuerdo a las secuencias genómicas reportadas para BHV-1 y BHV-5, la zona de recombinación quedó reducida a una región de 1400-1180 pb, respectivamente, comprendida entre los fragmentos marcadores de los genes UL43 y UL42 (región UL43-42, Figura 7). Para

conocer la secuencia de dicha región, se rediseñaron los oligonucleótidos UL43R y UL42F para utilizarlos en la amplificación del fragmento UL43-42. Si bien se realizaron numerosas reacciones de amplificación por PCR modificando variables y condiciones de reacción (sección 3.8.2 MyM Cap II), debido al alto contenido de GC de esa zona (77 % en BHV-1, 81 % en BHV-5), no se logró obtener producto de amplificación. Por ello, se diseñaron un par de oligonucleótidos internos (UL43-42int-F y UL43-42int-R) que permitieran amplificar la región en dos fragmentos. Nuevamente, no fue posible obtener producto de amplificación de esta región. Por lo tanto, la zona de recombinación entre los virus parentales BHV-5 N569 y BHV-1.2  $\Delta$ gC(GFP+)  $\Delta$ gI(RFP+) que originó al virus R2  $\Delta$ gI(RFP+), se corresponde con los nucleótidos 18414 a 19833 sobre BHV-1 y 19288 a 20465 sobre BHV-5.



**Figura 7.** Esquema de la región incógnita en el genoma del virus R2  $\Delta$ gI(RFP+). Las flechas y los números indican los genes analizados. La región rosa corresponde a secuencias homólogas a BHV-1, en color azul, la región homóloga a BHV-5, y en amarillo, la zona del genoma donde ocurrió la recombinación.

En el virus R1  $\Delta$ gC(GFP+), la región donde ocurrió la recombinación está comprendida por parte del gen UL29, el gen UL28 completo y parte de UL27 (este último solo en base a BHV-5). Los oligonucleótidos UL28-F1 y UL28-R1 permitieron reducir la zona incógnita de 6,5-7,3 kpb a 2-2,6 kpb (basados en las secuencias de BHV-1 y BHV-5 respectivamente). A continuación, se diseñó un nuevo par de oligonucleótidos (UL28-F2 y UL28-R2) que amplificaban un fragmento en la región media entre UL27 y UL28-1 (Figura 8).



**Figura 8.** Esquema de la región incógnita en el genoma del virus R1. Los recuadros 28-1 y 28-2 corresponden a los fragmentos amplificados con los oligonucleótidos UL28-F1/UL28-R1 y UL28-F2/UL28-R2, respectivamente. La región señalada con una flecha se corresponde a la posición donde ocurre la recombinación entre las cepas parentales. La región en color rosa corresponde a secuencias homólogas a BHV-1 y en color azul homólogas a BHV-5.

La amplificación del fragmento UL28-2, la secuenciación del mismo y la comparación de las secuencias obtenidas en los virus parentales y los recombinantes, permitieron detectar el sitio exacto donde se produjo el evento de recombinación entre las cepas parentales dando origen al virus R1  $\Delta$ gC(GFP+) (Figura 9). La región donde se produjo la recombinación posee un 100 % de homología nucleotídica entre las cepas parentales y se corresponde con los nt 55182 a 55226 para BHV-1 y 56449 a 56493 para BHV-5.

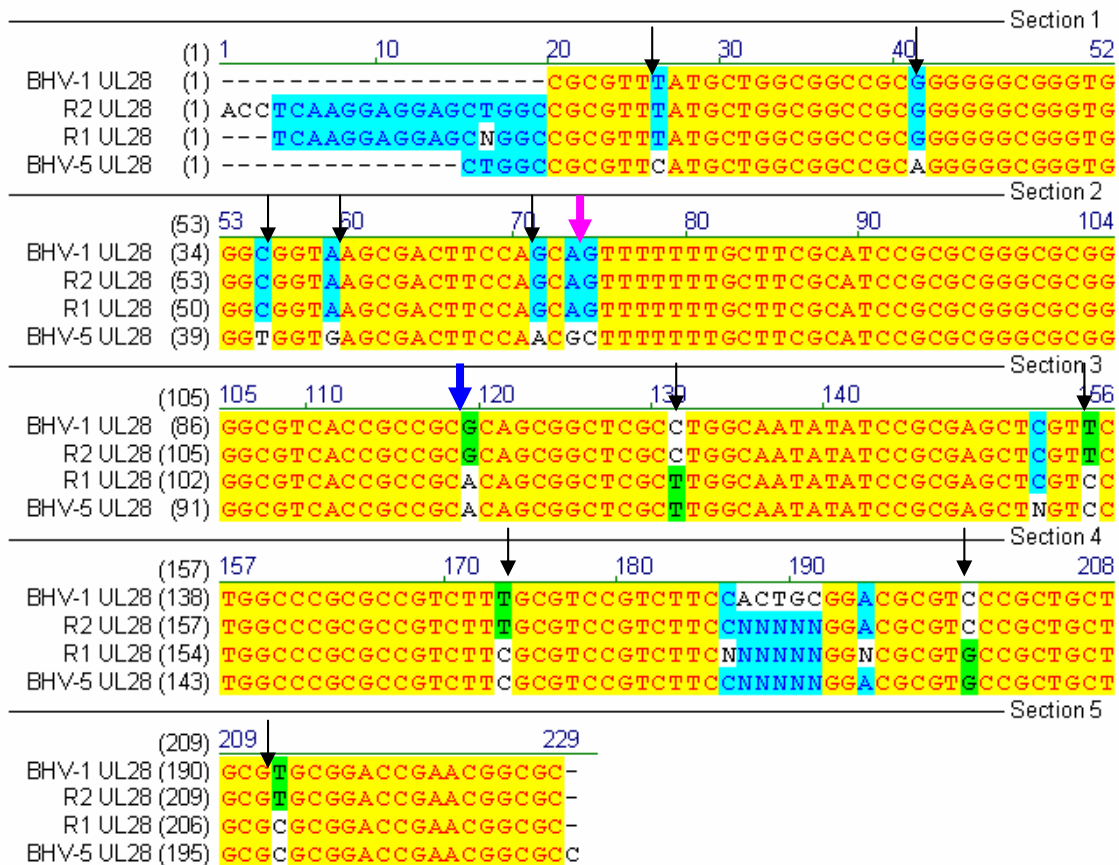


Figura 9. Comparación de la secuencia nucleotídica del fragmento UL28-2. Las flechas indican los nucleótidos diferentes entre BHV-1 y BHV-5. La región contenida entre las flechas rosa y azul se corresponde con el sitio de recombinación entre las cepas parentales que dio origen al virus R1  $\Delta$ gC(GFP+).

Los herpesvirus bovino 1 y 5 son dos alfa herpesvirus que infectan al ganado bovino. Ambos virus son neurotrópicos, por lo que establecen latencia en ganglios sensoriales, pero inducen enfermedades de severidad diferente. El BHV-1 induce un cuadro de infecciones respiratorias, genitales y/o reproductivas (IBR, IPV/IPB) de variada severidad debido a la virulencia de la cepa (Kaashoek *et al*, 1996a), factores del hospedador que le confieran resistencia (especialmente la edad) y potenciales infecciones bacterianas concomitantes. Por su parte, el BHV-5 induce como cuadro más severo una meningoencefalitis que desencadena la muerte del animal infectado, aunque, con mayor frecuencia, se presentan casos de infección subclínica o signos nerviosos leves, dependiendo de factores tales como la cepa viral, la edad y el estado inmunológico de los animales.

Las infecciones con BHV-1 presentan una distribución mundial (Ackermann y Engels, 2006), mientras que los casos de infección con BHV-5 están acotados geográficamente. Debido a que estos virus poseen una alta similitud antigénica, se ha sugerido que los anticuerpos anti BHV-1 inducidos tanto por una infección natural como por la vacunación podrían otorgar protección frente a las infecciones con BHV-5 (protección cruzada) (d'Offay *et al*, 1995). Sin embargo, a pesar de que Brasil y Argentina poseen una alta seroprevalencia de BHV-1 (Odeón *et al*, 2001; Guiarte Quincozes, 2005), en ambos países se reportan casos de infecciones con BHV-5 (Elias *et al*, 2004; Rissi *et al*, 2006; Perez *et al*, 2003).

En Argentina los índices de seroprevalencia de BHV-1 promedian el 60 % del ganado bovino (entre 24,8 y 84,1 % según la región, la edad de los animales y el tipo de cría que se realiza) (Odeón *et al*, 2001), mientras que no existen datos certeros sobre BHV-5 ya que no se cuenta con ensayos serológicos diferenciales. Frente a estos niveles de prevalencia de BHV-1 la vacunación es la estrategia utilizada para el control de las infecciones con BHV-1. En este marco, es interesante conocer si la respuesta inmune inducida por vacunas contra BHV-1 confiere protección frente a la enfermedad causada por BHV-5.

Si bien existen trabajos donde se evaluó la protección cruzada entre BHV-1 y BHV-5 (Bratanich *et al*, 1991; Cascio *et al*, 1999) en ninguno de los casos se pudo reproducir el cuadro clínico asociado a BHV-5 en los animales control infectados, impidiendo una correcta interpretación de los resultados. Teniendo en cuenta la dificultad que presenta la realización de experiencias de desafío viral con BHV-5 surgió como primer objetivo de esta Tesis reproducir experimentalmente el cuadro clínico y la respuesta inmune asociada a las infecciones con este agente en bovinos. El desarrollo de una experiencia de infección viral con BHV-5 que reproduzca el cuadro neurológico asociado a este virus, constituye una valiosa herramienta para la evaluación de la eficacia protectora de diversas vacunas frente a infecciones con este virus.

## Infección experimental de bovinos con BHV-5

Los animales infectados con BHV-5 presentaron un periodo de excreción viral similar excepto el animal 75 que alcanzó títulos mayores al resto de los animales en los días 5, 6 y 7 pi. Estos resultados son similares a los obtenidos en inoculaciones experimentales con distintas cepas de BHV-5 (Belknap *et al*, 1994; Ashbaugh *et al*, 1997; Cascio *et al*, 1999; Meyer *et al*, 2001).

La infección con BHV-5 produce signos nerviosos con diferentes grados de severidad presentándose casos letales (Bagust, 1972a,b; Belknap *et al*, 1994; Meyer *et al*, 2001; Perez *et al*, 2002), moderados (Silva *et al*, 2006) y subclínicos (Ashbaugh *et al*, 1997; Cascio *et al*, 1999; Vogel *et al*, 2003). En este sentido, se ha sugerido que todos los aislamientos de BHV-5 son neuroinvasivos pero no siempre neurovirulentos, ocasionando diversos fenotipos *in vivo* dependiendo de factores virales y del hospedador (Ashbaugh *et al*, 1997). En este trabajo de tesis, los signos nerviosos comenzaron a registrarse a los 10/12 dpi en coincidencia con lo reportado previamente (Bagust *et al*, 1972; d'Offay *et al*, 1993; Flores *et al*, 1998). Posteriormente, tres animales murieron a los 14/15 dpi debido a la severidad de los signos nerviosos desarrollados (N°s 55, 54 y 75), mientras que los dos restantes (N°s 47 y 53), presentaron signos más leves y se recuperaron a los 20/22 dpi.

La diferencia en la severidad de los signos puede deberse a factores inherentes al hospedador tales como la edad y el estado inmunológico. Nuestros resultados sugieren que la edad no es el único factor que influye en el grado de severidad de la enfermedad ya que a pesar de que el animal 75 tenía 2 meses, los otros animales que murieron tenían 5/6 meses. Diversos trabajos han reportado infecciones experimentales con BHV-5 presentando diferentes resultados en relación a la reproducción de la enfermedad. Meyer *et al* (2001) realizaron una infección de bovinos de 3 meses de edad con la cepa N569 (Australiana) de BHV-5, los animales desarrollaron signos nerviosos severos y debieron ser sacrificados. Por otro lado, Ashbaugh *et al* (1997), Cascio *et al* (1999) y Vogel *et al* (2003) realizaron infecciones experimentales de animales de 4-6 meses de edad con aislamientos de campo de BHV-5 (cepas de Estados Unidos y Brasil respectivamente) y observaron que los animales no desarrollaban signos nerviosos asociados a BHV-5, sin embargo la examinación histopatológica reveló lesiones típicas de meningoencefalitis.

Las lesiones encontradas en el SNC del animal 75 permitieron diagnosticar un cuadro de meningoencefalitis no supurativa. Esta observación es compatible con una infección por BHV-5 tal como se describió previamente (Meyer *et al*, 2001; Perez *et al*, 2002; Vogel *et al*, 2003). La necropsia de los animales N° 55 y 54 no pudo realizarse debido al tiempo transcurrido entre la muerte y el hallazgo de los mismos. Sin embargo, dado que estos animales murieron



presentando signos nerviosos asociados a BHV-5, se podría sugerir que éstos presentarían lesiones en el SNC de características similares a las observadas en el animal 75.

Los resultados de excreción viral y signología clínica presentados en la sección 1.1 de Resultados Cap I y discutidos aquí, permiten concluir que se logró reproducir experimentalmente el cuadro clínico asociado a las infecciones con BHV-5.

La respuesta inmune humoral en suero comenzó a detectarse a los 12 dpi y se mantuvo con niveles elevados hasta el final de la experiencia, con perfiles similares para todos los animales. El día post infección donde se detectó seroconversión y los niveles de anticuerpos neutralizantes detectados, fueron similares a los reportados en diversos trabajos (Cascio *et al*, 1999; Meyer *et al*, 2001; Perez *et al*, 2002; Vogel *et al*, 2003). Todos los animales infectados presentaron IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2</sub> en suero a los 12 dpi, excepto el animal 75 que presentó IgG<sub>2</sub> el día 15 pi. Los animales que sobrevivieron (47 y 53) aumentaron los niveles de ambos isotipos al día 22 pi manteniéndolos hasta el final del muestreo.

En cuanto a la respuesta inmune humoral en secreciones nasales, la inducción de IgA e IgG<sub>1</sub> no fue homogénea en todos los bovinos. En efecto, algunos animales presentaron IgA por varios días (N°s 47 y 54), mientras que en otros se detectó este isotipo un solo día (N°s 75 y 53) o ningún día (N° 55). Estos resultados se contraponen con los publicados por Madic *et al* (1995), en el cual todos los animales infectados con BHV-1 desarrollaron IgA desde el día 10/13 pi hasta 100 dpi. Los anticuerpos IgG<sub>1</sub> se detectaron a los 9 dpi en los animales 47, 54 y 55 manteniéndose hasta el final del muestreo, en tanto que los otros dos animales (N°s 53 y 75) fueron positivos a partir de los 13 y 15 dpi respectivamente.

La respuesta inmune celular ha sido reportada como fundamental frente a las infecciones con BHV-1 (Rouse *et al*, 1974; Gerber *et al*, 1978; Babiuk *et al*, 1996; Romera *et al*, 2001). En este trabajo de tesis este tipo de respuesta fue evaluada mediante un ensayo de linfoproliferación. A pesar de haber obtenido sólo dos animales con índice de estimulación positivo, los días a los que se detectó la respuesta (7 y 14 pi) coinciden con lo reportado en infecciones con BHV-1, en las cuales se observan los niveles máximos de inducción de respuesta celular a los 7-10 dpi (Babiuk *et al*, 1996; Romera *et al*, 2001).

Los resultados presentados en la sección 1.2 de Resultados Cap I constituyen el primer reporte de niveles de anticuerpos totales e isotipos en suero, isotipos en secreciones nasales y linfoproliferación de bovinos infectados con BHV-5. El conjunto de resultados presentado en esta sección sugieren que los mecanismos inmunes involucrados en la protección de bovinos frente a las infecciones con BHV-1 podrían estar implicados en la protección frente a BHV-5. Asimismo, los parámetros de respuesta inmune y cuadro clínico asociados con la infección con

BHV-5 determinados en esta sección resultan fundamentales para contar con los parámetros clave a evaluar en el siguiente objetivo.

### **Evaluación de la inmunogenicidad y la eficacia protectora de vacunas inactivadas frente a la enfermedad causada por BHV-5.**

Dado que en nuestro país las vacunas disponibles contra BHV-1 son a virus completo inactivado y no existen vacunas basadas en BHV-5, en esta tesis se formularon vacunas inactivadas basadas en BHV-1 o BHV-5, se evaluó la inmunogenicidad de las mismas y la eficacia protectora frente a la enfermedad causada por BHV-5.

Como se mencionó previamente, existen sólo cuatro trabajos donde se analizó la protección inducida por vacunas contra BHV-1 frente a infecciones con BHV-5. Sin embargo, en dos de ellos (Bratanich *et al*, 1991; Cascio *et al*, 1999) los animales control no desarrollaron los signos nerviosos característicos de las infecciones con BHV-5, por lo que los resultados obtenidos no permiten una correcta interpretación. En los dos restantes, se evaluó la eficacia protectora de una vacuna BHV-1  $\Delta$ gE. En este caso, 4 de 8 animales vacunados desarrollaron signos nerviosos leves luego de la infección con BHV-5 (similares a los animales infectados), mientras que todos presentaron excreción viral continua durante 13 días con un título máximo promedio de  $10^4$  DICT<sub>50</sub>/ml. Los autores concluyeron que los animales vacunados estuvieron parcialmente protegidos (Spilki *et al*, 2004; Silva *et al*, 2006) por lo que dicha vacuna no es eficiente para controlar la enfermedad asociada a BHV-5.

Los anticuerpos séricos anti BHV-1 aparecen tardíamente en una infección (alrededor del día 10 pi), por lo que son considerados de mayor importancia en las infecciones secundarias previniendo la reinfección y participando en el *clearance* viral por diversos mecanismos (Babiuk *et al*, 1996).

En este trabajo de tesis, la respuesta inmune humoral en suero desarrollada por los animales inmunizados con las vacunas inactivadas basadas en BHV-1 o BHV-5, fue similar tanto para los niveles de anticuerpos totales, isotipos IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2</sub> como para los anticuerpos neutralizantes, manteniendo niveles elevados hasta el momento del desafío viral. En contraste con nuestros resultados, un estudio previo realizado con vacunas inactivadas reportó que la respuesta de anticuerpos totales inducida por la vacuna de BHV-5 se detectaba después de una revacunación y 30 días más tarde que la vacuna de BHV-1 (Bratanich *et al*, 1991). Las diferencias entre ambos trabajos pueden deberse a variaciones dentro del diseño experimental y/o las características de las vacunas utilizadas. Podría sugerirse que la vacuna utilizada en esta Tesis es más inmunogénica que la descrita por Bratanich *et al*. Recientemente, se publicó un

trabajo donde se evalúa la respuesta de anticuerpos neutralizantes inducida por vacunas basadas en BHV-5 inactivado que poseen propóleo como adyuvante (Fischer *et al*, 2007). Los animales vacunados con la formulación control (sin propóleo), similar a la utilizada en esta tesis, presentaron títulos de 1,5 ( $\log_{10}$ ) a los 30 dpv tal como se observó en nuestro trabajo.

En numerosas ocasiones se ha reportado que los anticuerpos IgA presentes en la mucosa nasal son efectivos en la protección frente a infecciones virales respiratorias (Haan *et al*, 2001; Israel *et al*, 1992; Nedrud *et al*, 1987; Renegar *et al*, 1991a,b), y previenen la diseminación viral a hospedadores susceptibles. La inducción de IgA depende del inmunógeno, la ruta de inmunización y el adyuvante utilizado (Gao *et al*, 1995). Si bien no existe información sobre la presencia de anticuerpos en secreciones nasales de animales vacunados o infectados con BHV-5, varios trabajos han reportado la presencia de IgA en bovinos inmunizados con diversas vacunas de BHV-1 (Gao *et al*, 1994; Gao *et al*, 1995; Israel *et al*, 1992; Zhu *et al*, 1996). En esta tesis, no se detectó IgA en las secreciones nasales de ambos grupos de animales vacunados durante todo el período post vacunación. Estos resultados coinciden con el trabajo de Mars *et al* (2000) en el cual todos los animales inmunizados con una vacuna marcadora de BHV-1 por vía intramuscular, no desarrollaron IgA en secreciones nasales. Nuestros resultados suman evidencias al hecho de que la inmunización parenteral no siempre induce inmunidad de mucosas (Israel *et al*, 1992; Papp *et al*, 1998, 1999; Haan *et al*, 2001). Luego de realizar la infección con BHV-5 (desafío viral) se observó una rápida respuesta en los animales vacunados indicando la existencia de respuesta de memoria en las mucosas. Por otra parte, no se detectó IgA en los animales infectados (controles sin vacunar) durante el período estudiado. A pesar de que nuestros resultados se contraponen con los reportados por Madic *et al* (1995a), las diferencias pueden deberse a la sensibilidad de los ensayos utilizados y que en ese trabajo evalúan IgA luego de una infección experimental con BHV-1.

La inmunoglobulina G<sub>1</sub> presente en secreciones nasales también podría colaborar en los mecanismos involucrados en la protección frente a infecciones virales secundarias neutralizando las partículas virales presentes en la mucosa nasal (Madic *et al*, 1995a,b; Haan *et al*, 2001). Dado que hasta el momento no existen reportes sobre la presencia de células productoras de IgG<sub>1</sub> en la mucosa nasal de bovinos, se ha sugerido que este anticuerpo es transportado selectivamente desde el suero a la superficie mucosa (Madic *et al*, 1995a,b). Recientemente, se ha reportado la presencia del receptor neonatal heterodimérico de Fc (*heterodimeric neonatal Fc receptor*, FcRn) en las células epiteliales de las vías respiratorias inferiores y en los alvéolos pulmonares, el cual mediaría el transporte de los anticuerpos IgG a través de la barrera mucosa (Mayer *et al*, 2004). En esta tesis, las vacunas inactivadas indujeron IgG<sub>1</sub> en el período post vacunación, y se detectó una rápida y elevada respuesta secundaria luego del desafío viral. Asimismo, la respuesta de IgG<sub>1</sub> no difirió significativamente entre vacunas en todo el período estudiado ( $p < 0,01$ ). Los animales control desafiados con BHV-5 presentaron IgG<sub>1</sub> desde el día

14 pi, consistentemente con los resultados presentados en la sección de infección aguda de esta tesis.

Como se mencionó previamente, la respuesta inmune celular fue evaluada mediante un ensayo de linfoproliferación. Los resultados de este objetivo muestran que solo un animal por grupo de vacunados fue positivo para este ensayo. Debido al bajo número de animales positivos no puede concluirse acerca de la inducción de esta respuesta por las vacunas utilizadas ni tampoco sobre la importancia de este mecanismo en la protección frente a BHV-5.

La eficacia protectora de una vacuna se evalúa mediante experiencias controladas de desafío viral. El grupo de trabajo donde se desarrolló esta tesis posee amplia trayectoria en la evaluación de la protección frente a infecciones con BHV-1 (Romera *et al*, 2001; Puntel, 2004). En esta tesis, se desarrolló el modelo de infección de bovinos con BHV-5 para evaluar, entonces, la eficacia protectora de vacunas contra BHV-5. La protección es comúnmente evaluada en términos de niveles y período de excreción viral luego de la infección, sumado al análisis de los signos clínicos desarrollados en comparación con los animales control.

En este trabajo de tesis se observó que luego del desafío con BHV-5 todos los animales control sin vacunar presentaron excreción viral, confirmando la infecciosidad del virus utilizado. El período de excreción viral fue de 8 días promedio y los títulos virales máximos promedio alcanzaron valores de  $10^{4.3}$  DICT<sub>50</sub>/ml. Estos datos son similares a los observados en otras experiencias de desafío viral con BHV-5 (Ashbaugh *et al*, 1997; Cascio *et al*, 1999). Sin embargo, los títulos máximos de excreción viral fueron menores a los detectados en nuestra experiencia previa (sección 1.1 Resultados Cap I). Como se explicó anteriormente, las diferencias en los niveles de excreción viral y en la severidad de los signos nerviosos pueden deberse a factores del hospedador como la edad y el estado inmunológico. En este sentido, cabe destacar que en la experiencia de eficacia protectora los animales control tenían alrededor de 8 meses mientras que en la experiencia de infección los bovinos tenían 2 y 5/6 meses. En relación al estado inmunológico, los ensayos realizados en esta tesis no nos permiten identificar características de los bovinos que difieran en ambas experiencias.

En cuanto a los signos clínicos, los animales control presentaron descarga ocular y nasal previa a la aparición de signos nerviosos, tal como se ha reportado en diversos estudios (Belknap *et al*, 1994; Meyer *et al*, 2001; Perez *et al*, 2002). Los primeros signos nerviosos se registraron entre los días 11 y 13 pd, presentando la mayor severidad a los 20 dpd. Todos los animales se recuperaron al día 24 pd. El grado de severidad de los signos observados suma evidencias a la existencia de casos de encefalitis moderada ocasionada por BHV-5.

En los grupos de animales vacunados, se detectó excreción viral en un sólo animal vacunado con BHV-1 (dos días no consecutivos) y en 3 animales vacunados con BHV-5 (uno o dos días). En cuanto a los signos clínicos, los animales de ambos grupos presentaron descarga nasal y ocular más leve que la observada en los animales control. Sólo un animal del grupo vacunado con BHV-1 y dos del grupo vacunado con BHV-5 desarrollaron signos nerviosos leves y por pocos días. Estos resultados contrastan fuertemente con los obtenidos por Silva *et al* (2006) y Spilki *et al* (2004), ya que dichos autores reportaron que todos los animales vacunados no diferían de los animales control en los niveles y período de excreción viral luego del desafío con BHV-5. Además, el 50 % de los animales vacunados desarrollaron signos nerviosos de la misma severidad que los animales control.

En base a los resultados obtenidos puede sugerirse que todos los animales vacunados estuvieron protegidos frente a la enfermedad asociada a la infección con BHV-5 ya que se observó una reducción significativa de la excreción viral y la signología clínica.

Los resultados presentados evidencian la inmunogenicidad de las vacunas inactivadas utilizadas y que la respuesta inmune inducida por la vacuna basada en BHV-5 no difiere significativamente de la inducida por la vacuna basada en BHV-1. Asimismo, puede sugerirse que ambas vacunas son igualmente eficaces en la protección de bovinos frente a la excreción viral y la enfermedad neurológica asociada con la infección por BHV-5.

El uso de vacunas que disminuyan el nivel de replicación viral *in vivo* tanto de BHV-1 como BHV-5, permitirán disminuir la circulación de ambos virus. En base a estos resultados podría sugerirse que el uso de una vacuna inactivada basada en BHV-1, similar a la utilizada en esta tesis, permitiría controlar la enfermedad asociada a BHV-5 y, por lo tanto, no sería necesario incluir este virus en las vacunas utilizadas para el control de BHV-1 y BHV-5.

## Estudio de la virulencia *in vivo* de los virus recombinantes BHV-1/5

En los herpesvirus la recombinación es un fenómeno muy frecuente que contribuye a la evolución de los mismos tanto por el intercambio de genes entre cepas virales como por la adquisición de genes de la célula hospedadora (Holzerlandt *et al*, 2002). En la subfamilia *Alfaherpesvirinae*, la recombinación puede ser tanto homóloga como ilegítima (Thiry *et al*, 2005), generando gran diversidad entre cepas, cepas de mayor virulencia (Muylkens *et al*, 2006a,b) o intercambio de genes virales determinantes de la neuropatogenia.

Numerosos trabajos han demostrado que bajo condiciones experimentales, diversos alfa herpesvirus tales como HSV-1 (Umene, 1985; Javier *et al*, 1986; Kintner *et al*, 1995), VZV (Dohner *et al*, 1988), PrV (Henderson *et al*, 1990, 1991; Glazenburg *et al*, 1994), BHV-1 (Schyns *et al*, 2003; Meurens *et al*, 2004) y FeHV-1 (Fujita *et al*, 1998) sufren eventos de recombinación intraespecífica tanto *in vitro* como *in vivo*. Asimismo, se han detectado recombinantes interespecíficos entre HSV-1 y HSV-2 *in vitro* (Timbury *et al*, 1973; Halliburton *et al*, 1977) e *in vivo* (Yirrel *et al*, 1992) y, entre BHV-1 y BHV-5 *in vitro* (Meurens *et al*, 2004).

La recombinación genética no está restringida a situaciones experimentales ya que recientemente se han reportado cepas recombinantes naturales. El análisis de muestras de casos clínicos de infecciones con HSV-1 (Norberg *et al*, 2004; Bowden *et al*, 2004) y VZV (Norberg *et al*, 2006) revelaron la presencia de cepas recombinantes intraespecíficas en poblaciones naturales. Asimismo, luego de estudiar diversos aislamientos de campo de EHV-1, se identificó un virus recombinante interespecífico, el cual contenía el gen ICP4 de EHV-4 en el contexto genómico de EHV-1 (Pagamjav *et al*, 2005).

Para que ocurran eventos de recombinación es necesario que las moléculas de ADN se encuentren en el seno de una misma célula. En condiciones naturales, para que dos o más moléculas de ADN viral coexistan en una célula es necesario que ocurran infecciones simultáneas (coinfecciones), reactivación de un virus latente acoplada a una infección o reactivación de dos virus latentes.

En el caso particular de BHV-1 y BHV-5, estos virus son endémicos en nuestro país. Dado que estos virus se estima coinciden en su distribución geográfica, la vacunación contra BHV-1 no es obligatoria y no existen vacunas contra BHV-5, los animales son altamente susceptibles a sufrir coinfecciones con ambos agentes. Este escenario permitiría la generación de virus recombinantes BHV-1/5.

Para evaluar el impacto que podría producir la generación de virus recombinantes BHV-1/5 en el hospedador natural, en este trabajo de tesis se propuso evaluar la virulencia *in vivo*,

en términos de signología clínica y excreción viral, de dos virus recombinantes BHV-1/5 obtenidos previamente *in vitro*. Asimismo, identificar y analizar la constitución genética y la zona de recombinación de los mismos nos permitiría relacionar el *background* genético con la patogenia desarrollada en el hospedador natural.

El estudio de la virulencia de los virus recombinantes BHV-1/5, obtenidos previamente *in vitro*, se llevó a cabo realizando una infección experimental de bovinos con los virus recombinantes BHV-1/5, denominados R1  $\Delta$ gC(GFP+) y R2  $\Delta$ gI(RFP+), y con los virus parentales BHV-5 N569 y BHV-1.2  $\Delta$ gC(GFP+)  $\Delta$ gI(RFP+). La virulencia fue evaluada en términos de signología clínica y excreción viral.

Los bovinos inoculados con la cepa N569 de BHV-5 presentaron excreción viral durante 8-10 días (animales 628 y 636, respectivamente) o intermitentemente (animal 199), sin embargo, no desarrollaron signos nerviosos. La examinación histopatológica mostró que los animales 628 y 636 presentaron lesiones en el SNC y en ganglio trigémino compatibles con infecciones por BHV-5, mientras que el animal con excreción intermitente no presentó lesiones. La detección de anticuerpos anti BHV en suero en los animales 628, 636 y 199, en conjunto con los niveles de excreción viral y las lesiones presentes en el SNC, demuestran que dichos animales sufrieron una infección productiva. Asimismo, si bien los animales no desarrollaron signos nerviosos, los niveles de replicación viral fueron suficientes para alcanzar diversas regiones del SNC e inducir lesiones correspondientes a un cuadro de meningoencefalitis no supurativa. Por otra parte, el animal 191 no presentó excreción viral, ni lesiones histopatológicas ni anticuerpos específicos contra BHV.

En base a los resultados descriptos podría sugerirse una asociación entre los niveles de excreción viral y el grado de severidad de las lesiones encontradas en el SNC. En este sentido, en el animal 636, que presentó un período de excreción de 10 días con picos de 5.5 ( $\log_{10}$ DICT<sub>50</sub>), se observó el cuadro de lesiones más severas. El animal 628 excretó virus por menos días y con niveles promedio más bajos, y desarrolló lesiones más leves que el animal 636. Finalmente, en el animal 199 la excreción viral fue intermitente y no presentó lesiones asociadas a BHV-5.

Los resultados obtenidos en este grupo difieren de los reportados previamente por Meyer *et al* (2001) ya que en dicha oportunidad todos los animales presentaron excreción viral y signos nerviosos luego de la infección con la cepa N569 de BHV-5. Estas diferencias podrían deberse al estado inmunológico general de los animales ya que tanto la edad de los animales como la dosis de virus utilizada fueron similares en dicho trabajo y esta tesis.

El virus BHV-1.2  $\Delta gC(GFP+)\Delta gI(RFP+)$  fue generado a partir del virus BHV-1.2 cepa Aus 12 (Meurens *et al*, 2004). La dosis y la vía de inoculación utilizadas en la infección con el virus BHV-1.2  $\Delta gC(GFP+)\Delta gI(RFP+)$  fueron elegidas en base a datos bibliográficos y la experiencia previa del grupo de trabajo en infecciones experimentales de bovinos con BHV-1 (Romera *et al*, 2001), debido a que no existen estudios previos de infección con la cepa salvaje y doble deleteada. Luego de la infección, los animales no presentaron signos respiratorios o genitales y solo se detectó excreción viral en un animal luego de realizar pasajes ciegos de las muestras (a los 5 dpi). Asimismo, no se detectaron anticuerpos específicos anti BHV en suero, sin embargo, los animales 175, 172 y 635 presentaron IgA en secreciones nasales. Estos datos en su conjunto sugieren que el virus BHV-1.2  $\Delta gC(GFP+)$   $\Delta gI(RFP+)$  posee una baja tasa de replicación *in vivo*. A pesar de que se detectaron alteraciones muy leves en algunas secciones del SNC de posible etiología viral, es probable que su origen sea inespecífico y no por la infección realizada ya que, tal como ocurre con otras cepas de BHV-1, este virus no posee la capacidad de invadir el SNC sino de establecer infecciones latentes en ganglios periféricos.

La baja virulencia de la cepa BHV-1.2  $\Delta gC(GFP+)$   $\Delta gI(RFP+)$ , podría deberse a la delección de los genes *gC* y *gI*. Ambas glicoproteínas son no esenciales tanto *in vitro* como *in vivo*. La glicoproteína C (*gC*) está involucrada en la unión del virus a las células (Liang *et al*, 1991; revisado por Spear *et al*, 2000) y la glicoproteína I (*gI*) participa, junto con la glicoproteína E (*gE*), en el pasaje célula a célula y en la diseminación del virus (Whitbeck *et al*, 1996). En el trabajo de Meurens *et al* (2004), la cinética de crecimiento del virus BHV-1.2  $\Delta gC(GFP+)$   $\Delta gI(RFP+)$  estuvo reducida en todos los tiempos analizados respecto de la cinética observada en la cepa salvaje, por lo que podría pensarse que esto afectaría su comportamiento *in vivo*. En este sentido, Liang *et al* (1991) desarrollaron un virus BHV-1.1  $\Delta gC$  (cepa Cooper) que presentaba, en la fracción extracelular, títulos virales significativamente menores que la cepa salvaje. Posteriormente, la inoculación de bovinos con el virus Cooper  $\Delta gC$  no indujo signos clínicos y se observó excreción viral por uno o dos días con títulos significativamente menores a los desarrollados por los animales inoculados con el virus salvaje (Liang *et al*, 1992). Por el contrario, en dos trabajos donde se utiliza el virus BHV-1.1  $\Delta gC$  cepa Lam (Lam  $\Delta gC$ ), se reportan niveles similares de excreción viral en los animales infectados con el virus Lam  $\Delta gC$  y el virus salvaje (Kaashoek *et al*, 1998; Schyns *et al*, 2003). Por otra parte, la infección de bovinos con una cepa deleteada en el gen *gI* (Lam  $\Delta gI$ ) indujo un cuadro clínico significativamente mas leve al observado en los animales control (infectados con la cepa Lam salvaje): no se registró fiebre, la descarga nasal fue siempre serosa y los niveles de excreción viral fueron cuatro veces más bajos (Kaashoek *et al*, 1998).

En base a los resultados observados con las cepas  $\Delta gC$  y  $\Delta gI$  de BHV-1, podría postularse que la falta de ambas glicoproteínas en el virus parental BHV-1.2  $\Delta gC(GFP+)$   $\Delta gI(RFP+)$  generaría un fenotipo muy atenuado *in vivo*. Por otro lado, podría sugerirse que la baja tasa de replicación *in vivo* de este virus y la ausencia de signos clínicos característicos de



las infecciones con BHV-1, podrían deberse a una atenuación de la cepa parental *per se* o a modificaciones introducidas en el genoma como consecuencia de las deleciones realizadas. En este sentido, se ha reportado que diversas cepas salvajes de BHV-1.1 inducen excreción viral y signos clínicos de variada intensidad luego de una infección o reactivación (Kaashoek *et al*, 1996a,b).

Los resultados obtenidos con la cepa BHV-1.2  $\Delta$ gC(GFP+)  $\Delta$ gI(RFP+) coinciden con lo reportado previamente para el virus BHV-1  $\Delta$ gE (cepa Los Angeles). Los bovinos inoculados con dicha cepa por vía intranasal no presentaron excreción viral ni signos clínicos, y no se detectaron anticuerpos en el suero de los mismos. Sin embargo, estos animales sufrieron una infección y el primado de la respuesta inmune ya que resultaron protegidos frente a la infección con el virus salvaje (Puntel, 2003).

En cuanto a los virus R1  $\Delta$ gC(GFP+) y R2  $\Delta$ gI(RFP+), los resultados muestran que ninguno de ellos induce signos clínicos en el hospedador natural. Además, tanto el nivel de replicación viral *in vivo* como la capacidad de excreción fueron muy bajos, lo cual se vio reflejado en la necesidad de realizar pasajes ciegos de las muestras tomadas para detectar virus infectivo. La examinación histopatológica evidenció la presencia de lesiones muy leves, similares a las observadas en el grupo de animales infectados con el virus parental BHV-1.2  $\Delta$ gC(GFP+)  $\Delta$ gI(RFP+). Por otro lado, a pesar de que se detectaron anticuerpos anti BHV sólo en un animal en todo el período estudiado (Nº 177, grupo R1  $\Delta$ gC(GFP+)), tres animales del grupo R1  $\Delta$ gC(GFP+) (Nº 177, 165 y 186) y uno del grupo R2  $\Delta$ gI(RFP+) presentaron IgA en secreciones nasales, confirmando la infección de los mismos.

Teniendo en cuenta que los virus recombinantes poseen regiones homólogas a ambos virus parentales (Meurens *et al*, 2004), se hipotetizó que el fenotipo *in vivo* de estos virus podría ser mas leve que el observado en la cepa parental BHV-5 N569. Bajo las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo de tesis los resultados presentados permiten afirmar que ambos virus recombinantes poseen una baja virulencia *in vivo*. Estas observaciones no descartan que los virus recombinantes posean características *in vivo* diferentes a las inducidas por los virus parentales que no han sido estudiadas en este trabajo, tales como presencia de antígenos virales y carga viral en distintos órganos y/o tejidos.

Este trabajo presenta la primer experiencia realizada con los virus R1  $\Delta$ gC(GFP+) y R2  $\Delta$ gI(RFP+) en el hospedador natural, y constituye la base sobre la cual diseñar futuros ensayos. En este sentido, sería muy interesante realizar otra experiencia utilizando una dosis mayor, o modificando la vía de inoculación para identificar las condiciones en las cuales estos virus serían capaces de inducir signos clínicos y excreción viral.

## Caracterización del *background* genético de los virus recombinantes BHV-1/5

La caracterización del *background* genético de los virus recombinantes BHV-1/5 permite conocer la constitución genómica de los mismos, identificar el o los sitios de recombinación entre las cepas parentales y analizar la existencia de puntos o regiones preferenciales (*hot spots*) de recombinación en el genoma de BHV-1 y BHV-5.

Una de las estrategias utilizadas para caracterizar la constitución genómica de virus recombinantes es el uso de enzimas de restricción que generen patrones diferentes en las cepas parentales utilizadas (Brown *et al*, 1992; Umene, 1985; Meurens *et al*, 2004). Sin embargo, la información que puede obtenerse al realizar este tipo de ensayos no permite identificar las regiones del genoma del virus recombinante que pertenecen a cada virus parental. Por otro lado, gracias a la gran disponibilidad de secuencias nucleotídicas disponibles en bases de datos, se ha comenzado a trabajar con una estrategia basada en la identificación de regiones con polimorfismo de nucleótidos individuales (*single nucleotide polymorphisms*, SNP). La utilización de cepas virales que poseen regiones con SNPs para realizar los ensayos de coinfección, permite analizar la identidad de la progenie viral obtenida (parentales y recombinantes) realizando reacciones de amplificación por PCR en dichas regiones y comparando luego la secuencia nucleotídica. Este tipo de estrategia se ha utilizado en ensayos de coinfecciones *in vitro* con distintas cepas de BHV-1 (Muylkens, 2006a) y en el análisis de cepas circulantes de HSV-1 (Bowden *et al*, 2004; Norberg *et al*, 2004) y VZV (Norberg *et al*, 2006).

En esta tesis se realizó el mapeo exploratorio del genoma de los virus recombinantes utilizando un conjunto de oligonucleótidos que amplificaban fragmentos pequeños en regiones con secuencias nucleotídicas diferentes entre BHV-1 y BHV-5. El diseño de los oligonucleótidos se realizó basándose en las secuencias genómicas publicadas de BHV-1 (cepa Cooper) y BHV-5 (aislamiento brasileiro SV-507). Sin embargo, dado que no se poseen datos de secuencia nucleotídica de los virus utilizados en este trabajo, las reacciones de amplificación por PCR debieron realizarse con el ADN de los dos virus recombinantes y de ambas cepas parentales.

Tal como se describe en la sección 2 de Resultados Cap II, los resultados de 13 reacciones de amplificación por PCR permitieron confeccionar un mapa de la constitución genómica de cada virus recombinante (Figura 6 Resultados Cap II). En el virus R1  $\Delta$ gC(GFP+), aproximadamente el 65 % de su genoma es homólogo a BHV-5, conteniendo la región US, las IR y TR y desde el gen UL27 hasta el UL0,5. El virus R2  $\Delta$ gI(RFP+), posee alrededor del 86 % de su genoma homólogo a BHV-1, correspondiéndose con la mayoría de los genes de la región

UL (desde el gen UL42 inclusive hasta el UL0,5), las IR y TR y la región US completa. Asimismo, este mapeo permitió identificar las regiones donde se produjo la recombinación entre las cepas parentales: entre los marcadores de UL29 y UL27 para R1  $\Delta$ gC(GFP+), y entre los marcadores de UL43 y UL40 para R2  $\Delta$ gI(RFP+).

Para conocer con mayor exactitud el punto donde se produjo la recombinación entre los genomas de los virus parentales BHV-5 N569 y BHV-1.2  $\Delta$ gC(GFP+) $\Delta$ gI(RFP+), se diseñaron nuevos pares de oligonucleótidos que amplificaban fragmentos dentro de las zonas incógnita. Un análisis mas exhaustivo permitió definir la zona de recombinación entre las cepas parentales que dio origen al virus R2  $\Delta$ gI(RFP+). Dicha zona posee un tamaño de 1400-1180 pb y se encuentra entre los marcadores UL43 y UL42 (nucleótidos 18414 a 19833 sobre BHV-1 y 19288 a 20465 sobre BHV-5).

En cuanto al virus R1  $\Delta$ g(GFP+), se logró identificar el lugar donde se produjo el evento de recombinación entre las dos cepas parentales: entre los nucleótidos 55182-55226 y 56449-56493 según BHV-1 y BHV-5 respectivamente. Esa zona se corresponde con la región 5' del gen UL28 y presenta una homología nucleotídica del 100% entre las cepas parentales.

Los resultados obtenidos muestran que los eventos de recombinación que dieron origen a los virus R1  $\Delta$ gC(GFP+) y R2  $\Delta$ gI(RFP+) ocurrieron en diferentes sitios del genoma. Asimismo, la recombinación ocurrió en ambos casos en la región UL y en cada recombinante los fragmentos homólogos a cada virus parental son diferentes. A pesar de que sólo se cuenta con dos virus recombinantes, podría sugerirse que no habría un único punto o región preferencial (*hot spot*) de recombinación *in vitro* entre BHV-1 y BHV-5.

Las reacciones de amplificación por PCR desarrolladas en esta tesis constituyen una herramienta muy valiosa para analizar la constitución genómica de diversas cepas de BHV-1 y BHV-5 ya que amplifican regiones con secuencias nucleotídicas diferentes entre ambos virus.

Este conjunto de reacciones permitirá estudiar la identidad tanto de la progenie viral obtenida luego de realizar ensayos de coinfección *in vitro* e *in vivo* con distintas cepas de BHV-1 y BHV-5 como de cepas virales aisladas de casos de campo donde estos virus coexisten.

En los ensayos de coinfección donde se utilizan cepas con marcadores de delección se obtienen virus recombinantes denominados "invisibles", los cuales poseen el fenotipo de las cepas parentales pero sufrieron varios eventos de recombinación entre los genes marcadores o por fuera de ellos. Por lo tanto, utilizando para tales ensayos cepas salvajes de BHV-1 y BHV-5 y el conjunto de reacciones de amplificación por PCR desarrolladas en esta tesis, se lograría disminuir el problema en la identificación de recombinantes "invisibles". Esta metodología ha

sido utilizada previamente en un trabajo donde se analizó la progenie viral obtenida luego de coinfectar cultivos celulares con cepas salvajes de BHV-1.1 y BHV-1.2 (Muylkens, 2006a).

Asimismo, los oligonucleótidos diseñados podrían utilizarse en reacciones de PCR en tiempo real, logrando agilizar la metodología y analizar un número mayor de muestras. Para ello, deberían diseñarse sondas específicas para las zonas de mayor divergencia entre ambos virus en cada fragmento blanco.

Los virus recombinantes BHV-1/5 estudiados en esta tesis fueron obtenidos en ensayos de coinfección *in vitro* utilizando el virus salvaje BHV-5 N569 y el virus doble deleteado BHV-1.2  $\Delta$ gC(GFP+)  $\Delta$ gI(RFP+) (Meurens *et al*, 2004). En base a lo discutido previamente, es probable que en dicho ensayo se hayan obtenido recombinantes “invisibles” generados por dos eventos de recombinación entre los genes marcadores o eventos simples por fuera de ellos. Por lo tanto, es válido preguntarnos si el hecho de haber encontrado una baja proporción de recombinantes BHV-1/5 en dicho ensayo es un reflejo fiel de la tasa de recombinación entre cepas salvajes de BHV-1 y BHV-5. En este contexto sería de particular importancia realizar ensayos de coinfección *in vitro* e *in vivo* con cepas salvajes de BHV-1 y BHV-5, y determinar la presencia de recombinantes utilizando los oligonucleótidos diseñados en esta tesis, solucionando parcialmente los inconvenientes de detección de recombinantes “invisibles”. Asimismo, esta metodología reduciría la competitividad entre las cepas parentales utilizadas (salvajes y recombinantes). La competitividad afecta la tasa de replicación de los virus utilizados y, por ende, la obtención y detección de virus recombinantes. Este fenómeno fue observado en experimentos de coinfección de neuronas con cepas recombinantes de PrV, donde la cepa más virulenta tendía a suprimir la replicación y diseminación de la menos virulenta, independientemente de la dosis utilizada (Kim *et al*, 1999).

Finalmente, la metodología desarrollada en este trabajo aplicada al análisis de muestras provenientes de ensayos de coinfección o aislamientos naturales nos brindará información más certera sobre la frecuencia de ocurrencia de recombinación entre BHV-1 y BHV-5.

### **Relación entre *background* genético y virulencia en el hospedador natural**

El BHV-1 y el BHV-5 poseen aproximadamente un 85 % de homología de secuencia nucleotídica (Engels *et al*, 1986, Delhon *et al*, 2003). Sin embargo, estos virus poseen una patogenia diferente en el hospedador natural. En particular, el BHV-5 es neuroinvasivo (accede al SNC) y neurovirulento (induce degeneración y muerte neuronal), mientras que el BHV-1 es neurotrópico (accede a neuronas de SNP) y en muy raras ocasiones neuroinvasivo y/o neurovirulento.

Con el objetivo de identificar los genes (y sus productos proteicos) involucrados en la patogenia diferencial *in vivo* de estos virus, algunos autores han trabajado con mutantes de delección de BHV-1 y BHV-5 en el modelo conejo. Los resultados obtenidos en dichos trabajos sugieren que la glicoproteína C regularía la neuroinvasividad de BHV-5 por la vía olfatoria (Chowdhury *et al*, 2000a), y que las glicoproteínas E (gE), I (gI) y la proteína US9 jugarían un rol importante tanto en la neuroinvasividad como en la neurovirulencia de BHV-5 (Chowdhury *et al*, 2000b, 2002, 2006; Al-Mubarak *et al*, 2004). Recientemente, se reportó la inoculación de bovinos con una cepa de BHV-5 deleteada en los genes que codifican para gE, gI y US9 (Hübner *et al*, 2005). Los animales no desarrollaron signos nerviosos durante la infección aguda, no reactivaron luego de la administración de dexametasona, y se logró aislar virus solo de las porciones basales del SNC. Estos resultados fortalecen el rol asignado a gE, gI y US9 en la neuroinvasividad de BHV-5 previamente sugerido en el modelo conejo.

La virulencia de una cepa viral resulta del efecto de un conjunto de genes, y la aparición y el curso de una enfermedad es consecuencia de la interacción coordinada de las proteínas codificadas por el virus en cuestión y la célula hospedadora (Muyllkens *et al*, 2003).

Teniendo en cuenta que uno de los mecanismos por los cuales los alfa herpesvirus adquieren variabilidad genética es la recombinación, es evidente que las nuevas combinaciones genéticas generadas por este mecanismo puedan otorgar nuevas propiedades. En diversos ensayos de coinfección *in vitro* e *in vivo* se han identificado cepas virales recombinantes de mayor virulencia que las cepas parentales (Javier *et al*, 1986; Henderson *et al*, 1990, 1991; Katz *et al*, 1990). En otro caso, se obtuvieron virus recombinantes intraespecíficos de HSV-1 no neuroinvasivos, tal como la cepa parental, pero que resultaron neurovirulentos (Sedarati *et al*, 1988). Los virus recombinantes interespecíficos obtenidos a partir de cepas virulentas de HSV-1 y HSV-2, presentaron una virulencia menor a la de las cepas parentales utilizadas (Halliburton *et al*, 1987). Estos datos evidencian que la recombinación no siempre genera combinaciones virales de mayor virulencia.

Los recombinantes R1  $\Delta$ gC(GFP+) y R2  $\Delta$ gI(RFP+) estudiados en esta tesis constituyen una herramienta de gran utilidad a fin de evaluar la posible relación entre *background* genético y virulencia en el hospedador natural ya que poseen regiones homólogas a BHV-1 y BHV-5 simultáneamente.

El virus R1  $\Delta$ gC(GFP+) posee aproximadamente el 65 % de su genoma homólogo a BHV-5 (región US completa, IR y TR, genes UL27 a UL0,5) y el 35 % restante a BHV-1. La región homóloga a BHV-5 incluye los genes cuyas proteínas han sido, hasta el momento,

asociadas con la neuroinvasividad y la neurovirulencia de BHV-5: gE, gI y la proteína US9. La inoculación de bovinos con el virus R1  $\Delta$ gC(GFP+) no indujo excreción viral en secreciones nasales, ni signos nerviosos, ni lesiones en el SNC compatibles con las infecciones con BHV-5. En base a estos resultados no es posible definir si efectivamente este virus logró o no acceder al SNC. El análisis futuro de las muestras obtenidas en las necropsias (ganglio trigémino y regiones del SNC), mediante inmunohistoquímica para detectar antígenos virales o reacciones de amplificación por PCR para evidenciar la presencia de ADN viral, nos brindará datos que nos permitan discernir si este virus es neuroinvasivo y/o neurovirulento o no. Los resultados presentados sugieren que, bajo las condiciones de infección utilizadas en esta tesis, la región genómica homóloga a BHV-5 que posee este virus recombinante no sería suficiente para inducir el cuadro clínico asociado a BHV-5.

Por otra parte, el virus R2  $\Delta$ gI(RFP+) posee el 86 % de su genoma homólogo a BHV-1 (genes UL42 a UL0.5, IR y TR, US completa) y el 14 % restante a BHV-5 (no incluyendo los genes asociados a la neurovirulencia de este virus). Este virus recombinante no indujo excreción viral, ni signos, ni lesiones histopatológicas en los animales infectados. Dado que la constitución genómica del recombinante R2  $\Delta$ gI(RFP+) es mayoritariamente homóloga a BHV-1, la ausencia de signos nerviosos y lesiones en el SNC eran resultados esperados. Sin embargo, tal como se mencionó anteriormente, sería necesario analizar las muestras de ganglio trigémino y SNC por diversos ensayos para confirmar la presencia/ausencia de virus.

Asimismo, sería muy interesante realizar una infección de bovinos con los virus recombinantes R1  $\Delta$ gC(GFP+) y R2  $\Delta$ gI(RFP+) utilizando dosis mayores o modificando la vía de inoculación del virus para evaluar las condiciones en las cuales estos virus son capaces de inducir signos clínicos y excreción viral. De esta manera se contará con mayores evidencias sobre su comportamiento *in vivo* y la posible relación del contexto genómico con el fenotipo en el hospedador natural.

En base a nuestros resultados podemos sugerir que en el contexto genómico de los recombinantes BHV-1/5 obtenidos *in vitro*, las regiones aportadas por la cepa parental BHV-5 N569 no logran modificar el fenotipo atenuado *in vivo* de la cepa parental BHV-1.2  $\Delta$ gC(GFP+)  $\Delta$ gI(RFP+).

## Consideraciones finales y perspectivas futuras

En este trabajo de tesis se trabajó con dos alfa herpesvirus, pertenecientes al género *varicellovirus*, que afectan al ganado bovino de Argentina. Las infecciones con BHV-1 causan la rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR), la vulvovaginitis pustular infecciosa (IPV) y la balanopostitis pustular infecciosa (IPB) (Wyler *et al*, 1989). Las infecciones con BHV-5 causan principalmente meningoencefalitis fatal en bovinos (French, 1962; Bagust, 1972a,b). En los animales infectados se establece un estado de infección viral latente de por vida en los ganglios sensoriales, y bajo estímulos estresantes como el transporte, hacinamiento, parto o tratamiento con inmunosupresores, puede provocarse la reactivación y re-excreción de los mismos.

Las infecciones con BHV-1 poseen una distribución mundial aunque existen diferencias en la prevalencia y la incidencia de las mismas debido a la ubicación geográfica de la región en cuestión y a las condiciones de cría de los animales (tipo de producción) (Ackermann y Engels, 2006). La vacunación contra un agente infeccioso debe lograr diferentes niveles de protección, desde la reducción de la virulencia y la transmisión del virus, hasta la prevención y erradicación de la infección (van Drunen Littel-van der Hurk, 2006). Existen numerosos trabajos donde se han probado los niveles de protección inducidos por distintas vacunas frente a la infección con BHV-1, y a pesar de que dichas vacunas lograron reducir la replicación viral, la transmisión y la severidad de la enfermedad, no fueron capaces de prevenir la infección ni el establecimiento de latencia (revisado en Ackermann y Engels, 2006). Los animales latentemente infectados constituyen un reservorio del virus y una fuente de contaminación de animales susceptibles, por lo que el estatus inmunológico de los mismos es un factor clave para controlar la transmisión del virus. Se ha reportado que una estricta vacunación de los animales cada 6 meses podría reducir los riesgos de re-excreción viral (Dispas *et al*, 2004).

En lo que respecta a BHV-5, los casos de infección con este agente se encuentran acotados geográficamente y, hasta el momento, no se han desarrollado vacunas para controlar las infecciones con este agente BHV-5. Asimismo, dado que los casos se presentan en regiones con alta seroprevalencia de BHV-1 los esfuerzos se han centrado en analizar si la inmunidad conferida por las infecciones o la vacunación con BHV-1 protege frente a la enfermedad causada por la infección con BHV-5.

En Argentina, el 60 % del ganado bovino es seropositivo a BHV-1 (entre 24,8 y 84,1%) (Odeón *et al*, 2001), en tanto que para BHV-5 no se poseen datos certeros debido a la ausencia de un ensayo serológico diferencial.

La recombinación es un fenómeno altamente frecuente en los alfa herpesvirus y las propiedades biológicas de los mismos (alta prevalencia de infecciones en la mayoría de los

mamíferos y aves, superficies muco-cutáneas como sitios iniciales de replicación, alta probabilidad de coinfecciones, ciclo lítico corto, estado de persistencia o latencia interrumpidos por estímulos de reactivación y replicación viral en regiones periféricas) actúan sinérgicamente para favorecer la recombinación (Thiry *et al*, 2005).

Tal como se explicó en la Introducción de esta tesis, la recombinación tiene lugar cuando se encuentran dos moléculas de ADN en la misma célula. *In vivo*, dos o más moléculas de ADN viral pueden coexistir en una misma célula cuando ocurre la replicación viral en el sitio de entrada (superficie mucosa) de un solo virus (dando origen a recombinación intraespecífica) o de varios virus (recombinación interespecífica). El primer caso puede presentarse luego de una infección primaria o reactivación de una infección latente; mientras que el segundo caso, puede observarse durante coinfecciones, o en la reactivación y re-excreción de virus latente acoplada a una infección primaria con otro virus, o en la reactivación de dos virus que establecieron latencia en momentos diferentes. Se ha reportado, que una misma neurona puede estar doblemente infectada con HSV-1 y VZV (Theil *et al*, 2003). Asimismo, un animal infectado con dos cepas virales con una separación de 5 meses, presentó una infección latente de ambos virus (Whetstone *et al*, 1989). Asimismo, la latencia constituye un mecanismo adicional que ayuda a mantener un genoma viral mutado o recombinante durante largos periodos de tiempo en una pequeña población (Thiry *et al*, 2005).

En la Unión Europea, se utilizan vacunas vivas basadas en BHV-1 para inducir una rápida respuesta inmune en los animales y de esta forma controlar un brote de infección con este agente (Muylkens, 2006). Esta situación aumenta las probabilidades de que los animales infectados sufran coinfecciones con la cepa circulante y la vacunal y por lo tanto, puedan ocurrir fenómenos de recombinación entre las mismas. En Argentina, no está permitido el uso de vacunas vivas basadas en BHV-1, por lo que dicha situación no se presentaría. Además, la vacunación contra BHV-1 no es obligatoria y la distribución geográfica de las infecciones con BHV-1 y BHV-5 son coincidentes, por lo tanto, podría ocurrir que un animal se infectara con ambos agentes en el curso de su vida (tanto en forma simultánea como separados temporalmente) ocasionando el establecimiento de latencia de ambos virus. En estas situación y bajo ciertas condiciones se favorecería la ocurrencia de eventos de recombinación entre el genoma de los mismos.

Las consecuencias de la recombinación genética en los alfaherpesvirus tienen importancia evolutiva, en tanto que aumenta la probabilidad de “vehiculizar” mutaciones raras pero ventajosas en el seno de una especie viral, así como estar involucrada en la emergencia de “nuevos” virus que combinan un fenotipo altamente virulento con otras características (Thiry *et al*, 2005). En este sentido, se han reportado casos de recombinación intraespecífica en HSV-1, HSV-2, VZV, PrV, BHV-1 y FeHV-1 (Javier *et al*, 1986; Nishiyama *et al*, 1991; Umene, 1985;



Schynts *et al*, 2003; Dohner *et al*, 1988; Fujita *et al*, 1998; Henderson *et al*, 1990), así como también se han detectado recombinantes interespecíficos entre HSV-1 y HSV-2 (Timbury *et al*, 1973; Yirrel *et al*, 1992) y, BHV-1 y BHV-5 (Meurens *et al*, 2004).

Recientemente se han reportado casos de detección de cepas recombinantes en poblaciones naturales, sugiriendo la importancia de la recombinación en condiciones naturales de infección. El análisis de muestras de casos clínicos de HSV-1 y VZV sugieren que las variantes circulantes de estos virus se habrían originado por eventos de recombinación (Norberg *et al*, 2004, 2006; Bowden *et al*, 2004). Asimismo, luego de realizar un análisis genómico de diversos aislamientos de EHV-1 se identificó un virus recombinante entre EHV-1 y EHV-4 (Pagamjav *et al*, 2005).

Por lo expuesto anteriormente, surgió como objetivo de esta tesis evaluar vacunas inactivadas como estrategia para el control de la enfermedad asociada a la infección con BHV-5 en bovinos y consecuentemente como medio para reducir las probabilidades de ocurrencia de coinfecciones con BHV-1 y BHV-5 que podrían conducir en la aparición de virus recombinantes BHV-1/5. Asimismo, la evaluación de la virulencia en el hospedador natural de recombinantes BHV-1/5 obtenidos previamente *in vitro*, constituye una herramienta para analizar el impacto de aparición de este tipo de recombinantes en condiciones naturales.

Los resultados presentados en esta tesis nos permiten concluir que las vacunas inactivadas basadas en BHV-1 o BHV-5 desarrolladas en este trabajo fueron inmunogénicas e inducen una respuesta inmune que no difiere significativamente entre ellas en todo el período estudiado. Además, ambas vacunas resultaron protectivas frente a la enfermedad asociada a BHV-5, ya que los niveles y período de excreción y los signos clínicos estuvieron reducidos en comparación con los observados en los animales control.

Estos resultados sumados a evidencias obtenidas con vacunas inactivadas experimentales basadas en BHV-1 (Romera *et al*, 2001; Puntel, 2003) permiten sugerir que la vacunación sistemática de bovinos con una vacuna inactivada basada en BHV-1, formulada de manera similar a lo descrito en este trabajo, reduciría significativamente los niveles de replicación viral en la mucosa nasal y la duración del período de excreción. De esta manera, disminuirían las probabilidades de que dichas células sufran coinfecciones con BHV-1 y BHV-5 (por infecciones simultáneas o separadas temporalmente) y que ocurra recombinación genética entre ambos virus. Para corroborar esta hipótesis sería necesario estudiar el nivel de excreción viral y la identidad del virus excretado en animales vacunados e infectados con ambos virus o e infectados con uno de ellos y luego de un tiempo con el otro.

Por otro lado, dado que todas las vacunas probadas hasta el momento contra BHV-1 y BHV-5 no impiden que los animales se infecten y establezcan latencia, también sería importante

evaluar a futuro si la inmunidad inducida por las vacunas estudiadas en esta tesis permiten que animales vacunados y posteriormente infectados presenten una reducción en la re-excreción del virus latente (luego de inducir inmunosupresión y reactivación). De esta forma, también se disminuiría el riesgo de coinfecciones de células de la mucosa al reducir la cantidad de virus re-excretado y la replicación del virus de la segunda infección.

En relación a la caracterización de la virulencia de los virus recombinantes BHV-1/5, R1  $\Delta gC(GFP+)$  y R2  $\Delta gI(RFP+)$  en el hospedador natural, se detectaron partículas virales en las secreciones nasales de los animales infectados solo por uno o dos días y en muy baja cantidad. Asimismo, no se observó signología clínica ni lesiones histopatológicas relevantes en el SNC. Por otra parte, la caracterización genómica de los mismos permitió establecer la región donde ocurrió el evento de recombinación que los originó y las regiones del genoma homólogas a cada virus parental.

Bajo las condiciones utilizadas en la infección experimental, los virus recombinantes fueron menos virulentos *in vivo* que la cepa parental BHV-5 N569. Asimismo, se podría sugerir que en el contexto genómico de los recombinantes BHV-1/5 estudiados, las regiones aportadas por la cepa parental BHV-5 N569 no logran modificar el fenotipo atenuado *in vivo* de la cepa parental BHV1.2  $\Delta gC(GFP+)$   $\Delta gI(RFP+)$ . Sin embargo, sería necesario realizar un análisis mas exhaustivo de las muestras de SNC para detectar la presencia de antígenos virales o DNA viral, para poder evaluar la neurovirulencia de cada recombinante y la relevancia del aporte genético de cada cepa parental en el fenotipo *in vivo*.

A pesar de que los virus recombinantes BHV-1/5 estudiados no son virulentos en el hospedador natural, no puede excluirse la posibilidad de que diversas combinaciones genéticas entre estas u otras cepas de BHV-1 y BHV-5 puedan generar recombinantes con características diferentes respecto de las cepas parentales.

Para obtener mayor información acerca del impacto de aparición de virus recombinantes BHV-1/5 en la naturaleza, sería necesario realizar una infección experimental de bovinos con las cepas R1  $\Delta gC(GFP+)$  y R2  $\Delta gI(RFP+)$  con una dosis mayor y/o distintas vías de inoculación, de modo de determinar las condiciones bajo las cuales estos virus podrían inducir altos niveles de replicación y/o signos clínicos *in vivo*.

En este sentido, es necesario estudiar otras situaciones tales como la posibilidad de ocurrencia de eventos de recombinación *in vivo*, las condiciones bajo las cuales ocurrirían eventos de recombinación *in vivo* y la existencia de recombinantes naturales BHV-1/5.

Hasta el momento, el estudio de la recombinación en los alfaherpesvirus se basó principalmente en observaciones experimentales obtenidas por la coinfección de cepas virales portadoras de marcadores de recombinación, los cuales permitían la selección (marcadores

termosensibles, marcadores de atenuación) o la detección (marcadores de delección) de las cepas recombinantes (Muykens, 2006a). En efecto, el aislamiento de los virus R1  $\Delta$ gC(GFP+) y R2  $\Delta$ gI(RFP+) se efectuó basándose en la detección de las proteínas marcadoras GFP y RFP. El trabajo con este tipo de metodología no permite la detección de los virus recombinantes “invisibles”. Como se explicó previamente, este tipo de recombinantes se generan cuando ocurren dos eventos de recombinación entre los marcadores, o por eventos ocurridos por fuera de los mismos, por lo que el fenotipo “visible” será idéntico al de las cepas parentales pero poseyendo una fracción genómica heteróloga. En tales circunstancias, el número de recombinantes reportados será menor al obtenido realmente.

La puesta a punto de herramientas moleculares como las reacciones de amplificación por PCR y la secuenciación permiten analizar un espectro mayor de marcadores en el genoma de los virus estudiados.

En este trabajo de tesis, se desarrollaron 20 reacciones de amplificación por PCR para identificar el background genético de los virus R1  $\Delta$ gC(GFP+) y R2  $\Delta$ gI(RFP+). Estas reacciones amplifican fragmentos, a lo largo de todo el genoma viral, que poseen diferencias de secuencia nucleotídica entre los virus parentales BHV-1 y BHV-5, por lo que pueden ser considerados como marcadores de identidad de los mismos. La implementación de esta tecnología permite la utilización de cepas parentales salvajes en ensayos de coinfección *in vitro* e *in vivo*, reduciéndose la competencia entre las cepas parentales y la presencia de recombinantes “invisibles”. Asimismo, utilizando esta metodología se podrán identificar cepas aisladas de casos de infecciones naturales. Esta información en su conjunto permitirá estudiar y estimar la frecuencia de aparición de recombinantes interespecíficos entre BHV-1 y BHV-5.

Esta tesis presenta un conjunto de resultados que permiten sugerir que el uso sistemático de vacunas inactivadas basadas en BHV-1 reduciría los niveles y período de excreción viral y los signos clínicos asociados con las infecciones con BHV-5. De esta forma, se disminuiría el riesgo de ocurrencia de coinfecciones con BHV-1 y BHV-5 y, consecuentemente, de aparición de cepas recombinantes BHV-1/5. Asimismo, el desarrollo de las reacciones de amplificación por PCR sobre diversas regiones del genoma de BHV-1 y BHV-5 constituye una valiosa herramienta para la detección de virus recombinantes en condiciones naturales.

- ❖ Se logró reproducir el cuadro clínico asociado a infecciones con BHV-5 en terneros.
- ❖ Las vacunas inactivadas basadas en BHV-1 o BHV-5 protegen a los bovinos frente a la enfermedad asociada a las infecciones con BHV-5.
- ❖ Los virus R1  $\Delta$ gC(GFP+) y R2  $\Delta$ gI(RFP+) poseen un fenotipo atenuado en el hospedador natural respecto de la cepa parental BHV-5 N569.
- ❖ Al caracterizar el *background* genético de los virus recombinantes no se encontró relación entre el sitio de recombinación, el porcentaje de homología con las cepas parentales y el fenotipo observado *in vivo*.
- ❖ La cepa parental BHV-1.2  $\Delta$ gC(GFP+)  $\Delta$ gI(RFP+) está atenuada en el hospedador natural.
- ❖ El uso de vacunas inactivadas basadas en BHV-1 podría controlar el nivel de replicación de BHV-1 y BHV-5 en bovinos, reducir las probabilidades de coinfecciones con ambos virus y la ocurrencia de recombinación entre los mismos.

Lic. María Paula Del Médico Zajac  
Doctoranda

Dra. Sonia Alejandra Romera  
Directora de tesis

**ANEXO I. PLANILLA DE SEGUIMIENTO DE ANIMALES INFECTADOS**

N° y sexo	Fecha y dpi	Signos respiratorios						Secreción ocular				Genitales		
		Secreción nasal		Tos	Lesión en mucosa		Estridor traqueo bronquial							
		Caract	Intens		Caract	Intens		A	U	B	Caract	Secreción	Lesión	

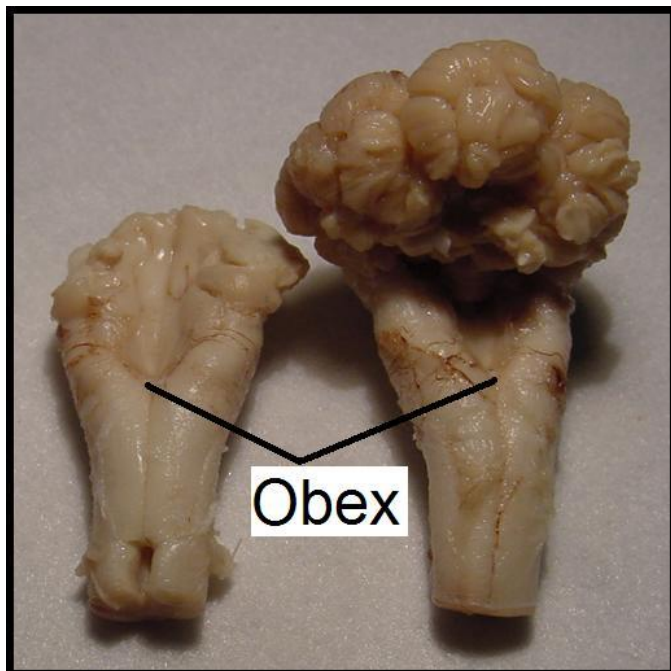
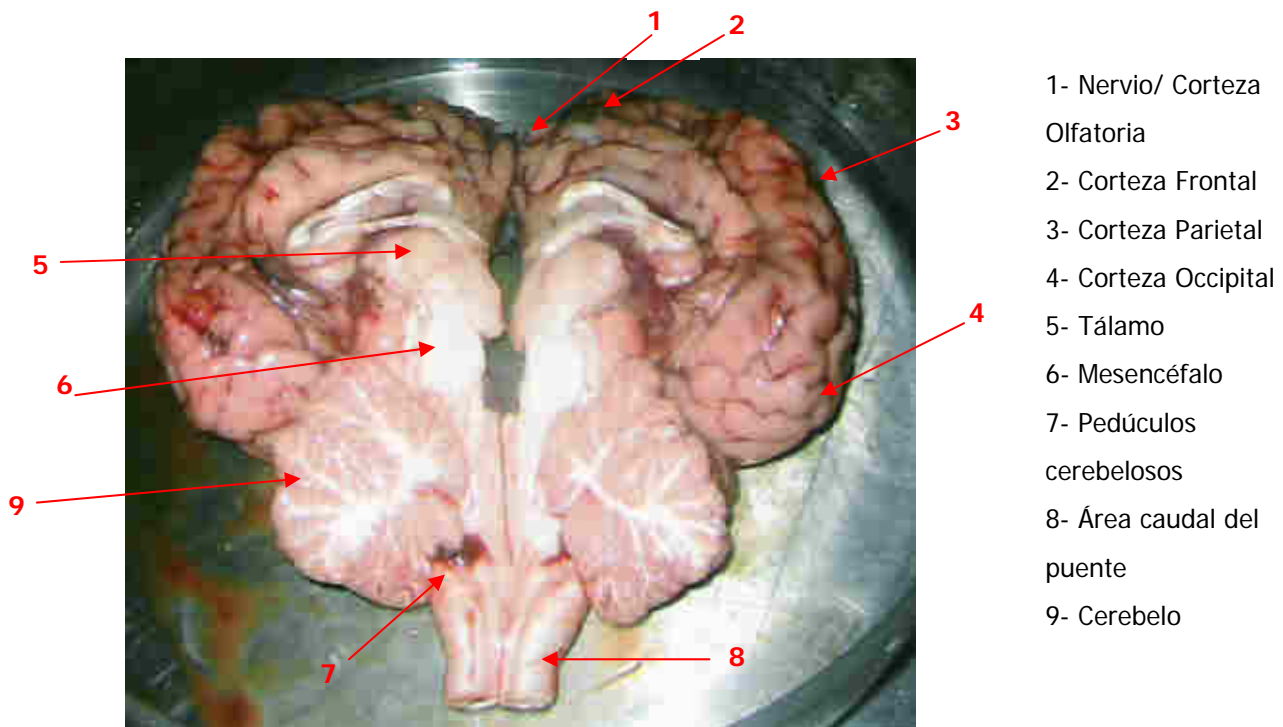
N° y sexo	Fecha y dpi	Tª rectal	Signos nerviosos									Maniobras realizadas
			Bx	TM	MC	At	CO	MCir	Dp	Ax	Pt	

N° y sexo	Fecha y dpi	Observaciones

Severidad de los signos	
Leve	+
Moderada	++
Severa	+++

ABREVIATURAS	
<b>A</b>	Ausente
<b>S</b>	Serosa
<b>M</b>	Seromucosa
<b>P</b>	Mucopurulenta
<b>R</b>	Red
<b>U</b>	Red y úlceras
<b>N</b>	Lesiones necróticas
<b>U</b>	Unilateral
<b>B</b>	Bilateral
<b>Carac</b>	Características
<b>Bx</b>	Bruxismo
<b>TM</b>	Temblor muscular
<b>MC</b>	Movimiento de cabeza
<b>At</b>	Ataxia
<b>Co</b>	Cabeza contra objetos
<b>MCir</b>	Marcha en círculos
<b>Dp</b>	Depresión
<b>Ax</b>	Anorexia
<b>Pt</b>	Ptialismo

**ANEXO II. Regiones del SNC bovino**



## ANEXO III. Condiciones de reacción y ciclados de PCR

Amplificación de un fragmento flanqueante izquierdo del gen gE de BHV-1**			
Templado ADN total de células infectadas	Ciclado		
	Desnaturalización inicial		95°C, 5 min.
Oligonucleótidos 1-FI-gE-F y 1-FI-gE-R	5 ciclos	Desnaturalización	95°C, 1.5 min
		Hibridación	60°C, 1 min
		Elongación	70°C, 1 min.
Taq ADN polimerasa (Invitrogen) <b>Buffer Green GoTaq</b> (Promega)	35 ciclos	Desnaturalización	95°C, 1 min
		Hibridación	60°C, 1 min
		Elongación	72°C, 1 min.
Pares de bases amplificadas 300	Elongación final		72°C, 10 min.

Amplificación de un fragmento flanqueante izquierdo del gen gE de BHV-5**			
Templado ADN total de células infectadas	Ciclado		
	Desnaturalización inicial		95°C, 10 min.
Oligonucleótidos 5-FI-gE-F y 5-FI-gE-R	11 ciclos (* -1°C por ciclo)	Desnaturalización	95°C, 1 min
		Hibridación	66°C, 1 min *
		Elongación	72°C, 1 min.
Taq ADN polimerasa (Invitrogen) <b>Buffer 3</b> (Boehringer)	40 ciclos	Desnaturalización	95°C, 1 min
		Hibridación	60°C, 1 min
		Elongación	72°C, 1 min.
Pares de bases amplificadas 500	Elongación final		72°C, 10 min.

Amplificación de un fragmento del gen RFP**			
Templado ADN total de células infectadas	Ciclado		
	Desnaturalización inicial		95°C, 5 min.
Oligonucleótidos RFP-F y RFP-R	30 ciclos	Desnaturalización	95°C, 30 seg
Taq ADN polimerasa (Invitrogen)		Hibridación	65°C, 1 min
Buffer Green GoTaq (Promega)		Elongación	72°C, 1 min.
Pares de bases amplificadas 300	Elongación final		72°C, 5 min.

Amplificación de un fragmento del gen UL52*			
Templado ADNg de BHV-1 y R1	Ciclado		
	Desnaturalización inicial		95°C, 5 min.
Oligonucleótidos 1-UL52-F y 1-UL52-R	40 ciclos	Desnaturalización	95°C, 30 seg
Taq ADN polimerasa con <i>Buffer</i> ThermoPol (cat.M0267S, NEB)		Hibridación	55°C, 1 min
		Elongación	72°C, 1 min.
DMSO 6%	Elongación final  72°C, 5 min.		
Pares de bases amplificadas 223			

Amplificación de un fragmento del gen UL52*			
Templado ADNg de BHV-5 y R2	Ciclado		
	Desnaturalización inicial		95°C, 5 min.
Oligonucleótidos 5-UL52-F y 5-UL52-R	40 ciclos	Desnaturalización	95°C, 30 seg
Taq ADN polimerasa con <i>Buffer</i> ThermoPol (cat.M0267S, NEB)		Hibridación	55°C, 1 min
		Elongación	72°C, 1 min.
DMSO 6%	Elongación final  72°C, 5 min.		
Pares de bases amplificadas 246			

Amplificación de un fragmento del gen UL43*			
Templado ADNg de BHV-1 y R1	Ciclado		
	Desnaturalización inicial		95°C, 5 min.
Oligonucleótidos 1-UL43-F y 1-UL43-R	40 ciclos	Desnaturalización	95°C, 30 seg
Taq ADN polimerasa con <i>Buffer</i> ThermoPol (cat.M0267S, NEB)		Hibridación	55°C, 1 min
		Elongación	72°C, 1 min.
DMSO 6%	Elongación final  72°C, 5 min.		
Pares de bases amplificadas 207			



Amplificación de un fragmento del gen UL43*			
Templado ADNg de BHV-5 y R2	Ciclado		
	Desnaturalización inicial		95°C, 5 min.
Oligonucleótidos 5-UL43-F y 5-UL43-R	30 ciclos	Desnaturalización	95°C, 30 seg
Taq ADN polimerasa con <i>Buffer</i> ThermoPol (cat.M0267S, NEB)		Hibridación	58°C, 30 seg
		Elongación	72°C, 30 seg
DMSO 6%	Elongación final  72°C, 5 min.		
Pares de bases amplificadas 244			

Amplificación de un fragmento del gen UL42*			
Templado ADNg de BHV-1, R1 y R2	Ciclado		
	Desnaturalización inicial		95°C, 5 min.
Oligonucleótidos 1-UL42-F y 1-UL42-R	45 ciclos	Desnaturalización	95°C, 30 seg
Taq ADN polimerasa con <i>Buffer</i> ThermoPol (cat.M0267S, NEB)		Hibridación	66°C, 30 seg.
		Elongación	72°C, 1 min.
DMSO 6%	Elongación final  72°C, 5 min.		
Pares de bases amplificadas 339			

Amplificación de un fragmento del gen UL42*			
Templado ADNg de BHV-5	Ciclado		
	Desnaturalización inicial		95°C, 5 min.
Oligonucleótidos 5-UL42-F y 5-UL42-R	45 ciclos	Desnaturalización	95°C, 30 seg
Taq ADN polimerasa con <i>Buffer</i> ThermoPol (cat.M0267S, NEB)		Hibridación	52°C, 1 min
		Elongación	72°C, 1 min.
DMSO 6%	Elongación final  72°C, 5 min.		
Pares de bases amplificadas 224			

Amplificación de un fragmento del gen UL41 *			
Templado ADNg de BHV-1, BHV-5, R1 y R2	Ciclado		
	Desnaturalización inicial		95°C, 5 min.
Oligonucleótidos UL41-F y UL41-R	45 ciclos	Desnaturalización	95°C, 30 seg
Taq ADN polimerasa con <i>Buffer</i> ThermoPol (cat.M0267S, NEB)		Hibridación	61°C, 30 seg.
		Elongación	72°C, 1 min.
DMSO 6%	Elongación final  72°C, 5 min.		
Pares de bases amplificadas 236			

Amplificación de un fragmento del gen UL29*			
Templado ADNg de BHV-1, BHV-5, R1 y R2	Ciclado		
	Desnaturalización inicial		95°C, 5 min.
Oligonucleótidos UL29-F y UL29-R	40 ciclos	Desnaturalización	95°C, 30 seg
Taq ADN polimerasa con <i>Buffer</i> ThermoPol (cat.M0267S, NEB)		Hibridación	55°C, 1 min
		Elongación	72°C, 1 min.
DMSO 6%	Elongación final  72°C, 5 min.		
Pares de bases amplificadas 224			

Amplificación de fragmento I del gen UL28 **			
Templado ADNg de BHV-1, BHV-5, R1 y R2	Ciclado		
	Desnaturalización inicial		95°C, 5 min.
Oligonucleótidos  UL28-F1 y UL28-R1	11 ciclos (* -1°C por ciclo)	Desnaturalización	95°C, 30 seg
		Hibridación	58°C, 1 min *
		Elongación	72°C, 1 min.
Taq ADN polimerasa (Invitrogen) <i>Buffer</i> Green GoTaq (Promega)	40 ciclos	Desnaturalización	95°C, 30 seg
		Hibridación	52°C, 1 min
		Elongación	72°C, 1 min.
Pares de bases amplificadas 258	Elongación final		72°C, 5 min.

Amplificación de fragmento II del gen UL28**			
Templado ADNg de BHV-1, BHV-5, R1 y R2	Ciclado		
	Desnaturalización inicial		95°C, 5 min.
Oligonucleótidos  UL28-F2 y UL28-R2	11 ciclos (* -1°C por ciclo)	Desnaturalización	95°C, 30 seg
		Hibridación	58°C, 1 min *
		Elongación	72°C, 1 min.
Taq ADN polimerasa (Invitrogen) <b>Buffer Green GoTaq</b> (Promega)	40 ciclos	Desnaturalización	95°C, 30 seg
		Hibridación	52°C, 1 min
		Elongación	72°C, 1 min.
Pares de bases amplificadas 286	Elongación final		72°C, 5 min.

Amplificación de un fragmento del gen UL27*			
Templado ADNg de BHV-1 y R2	Ciclado		
	Desnaturalización inicial		95°C, 5 min.
Oligonucleótidos 1-UL27-F y 1-UL27-R	40 ciclos	Desnaturalización	95°C, 30 seg
Taq ADN polimerasa con <i>Buffer ThermoPol</i> (cat.M0267S, NEB)		Hibridación	55°C, 1 min
		Elongación	72°C, 1 min.
DMSO 6%	Elongación final  72°C, 5 min.		
Pares de bases amplificadas 369			

Amplificación de un fragmento del gen UL27*			
Templado ADNg de BHV-5 y R1	Ciclado		
	Desnaturalización inicial		95°C, 5 min.
Oligonucleótidos 5-UL27-F y 5-UL27-R	45 ciclos	Desnaturalización	95°C, 30 seg
Taq ADN polimerasa con <i>Buffer</i> ThermoPol (cat.M0267S, NEB)		Hibridación	61°C, 30 seg.
		Elongación	72°C, 1 min.
DMSO 6%	Elongación final  72°C, 5 min.		
Pares de bases amplificadas 267			

Amplificación de un fragmento del gen UL22**			
Templado ADNg de BHV-5 y R2	Ciclado		
	Desnaturalización inicial		95°C, 5 min.
Oligonucleótidos UL22-F y UL22-R	11 ciclos (* -1°C por ciclo)	Desnaturalización	95°C, 30 seg
		Hibridación	50°C, 1 min *
		Elongación	72°C, 1 min.
Taq ADN polimerasa (Invitrogen) <b>Buffer Green GoTaq</b> (Promega)	40 ciclos	Desnaturalización	95°C, 30 seg
		Hibridación	48°C, 1 min
		Elongación	72°C, 1 min.
Pares de bases amplificadas 348	Elongación final		72°C, 5 min.

Amplificación de un fragmento del gen UL11 *			
Templado ADNg de BHV-1 y R2	Ciclado		
	Desnaturalización inicial		95°C, 5 min.
Oligonucleótidos 1-UL11-F y 1-UL11-R	45 ciclos	Desnaturalización	95°C, 30 seg
Taq ADN polimerasa con <i>Buffer</i> ThermoPol (cat.M0267S, NEB)		Hibridación	61°C, 30 seg.
		Elongación	72°C, 1 min.
DMSO 6%	Elongación final  72°C, 5 min.		
Pares de bases amplificadas 329			

Amplificación de un fragmento del gen UL11 *			
Templado ADNg de BHV-5 y R1	Ciclado		
	Desnaturalización inicial		95°C, 5 min.
Oligonucleótidos 5-ULL11-F y 5-UL11-R	45 ciclos	Desnaturalización	95°C, 30 seg
Taq ADN polimerasa con <i>Buffer ThermoPol</i> (cat.M0267S, NEB)		Hibridación	61°C, 30 seg.
		Elongación	72°C, 1 min.
DMSO 6%	Elongación final  72°C, 5 min.		
Pares de bases amplificadas 115			

Amplificación de un fragmento del gen UL7**			
Templado ADNg de BHV-1, BHV-5, R1 y R2	Ciclado		
	Desnaturalización inicial		95°C, 5 min.
<b>Oligonucleótidos</b> 1-UL7-F y 1-UL7-R (BHV-1 y R2) 5-UL7-F y 5-UL7-R (BHV-5 y R1)	11 ciclos (* -1°C por ciclo)	Desnaturalización	95°C, 30 seg
		Hibridación	58°C, 1 min *
		Elongación	72°C, 1 min.
<b>Taq ADN polimerasa</b> (Invitrogen) <b>Buffer Green GoTaq</b> (Promega)	40 ciclos	Desnaturalización	95°C, 30 seg
		Hibridación	52°C, 1 min
		Elongación	72°C, 1 min.
<b>Pares de bases amplificadas</b> 287 (BHV-1 y R2) 267 (BHV-5 y R1)	Elongación final		72°C, 5 min.

Amplificación de un fragmento del gen UL2*			
Templado ADNg de BHV-1 y R2	Ciclado		
	Desnaturalización inicial		95°C, 5 min.
Oligonucleótidos 1-UL2-F y 1-UL2-R	45 ciclos	Desnaturalización	95°C, 30 seg
Taq ADN polimerasa con <i>Buffer</i> ThermoPol (cat.M0267S, NEB)		Hibridación	61°C, 30 seg.
		Elongación	72°C, 1 min.
DMSO 6%	Elongación final  72°C, 5 min.		
Pares de bases amplificadas 363			

Amplificación de un fragmento del gen UL2*			
Templado ADNg de BHV-5 y R1	Ciclado		
	Desnaturalización inicial		95°C, 5 min.
Oligonucleótidos 5-UL2-F y 5-UL2-R	45 ciclos	Desnaturalización	95°C, 30 seg
Taq ADN polimerasa con <i>Buffer</i> ThermoPol (cat.M0267S, NEB)		Hibridación	61°C, 30 seg.
		Elongación	72°C, 1 min.
DMSO 6%	Elongación final  72°C, 5 min.		
Pares de bases amplificadas 365			

Amplificación de un fragmento del gen US2*			
Templado ADNg de BHV-1 y R2	Ciclado		
	Desnaturalización inicial		95°C, 5 min.
Oligonucleótidos US2-F y US2-R	45 ciclos	Desnaturalización	95°C, 30 seg
Taq ADN polimerasa con <i>Buffer</i> ThermoPol (cat.M0267S, NEB)		Hibridación	59°C, 30 seg.
		Elongación	72°C, 1 min.
DMSO 6%	Elongación final  72°C, 5 min.		
Pares de bases amplificadas 315			

Amplificación de un fragmento del gen US2*			
Templado ADNg de BHV-5 y R1	Ciclado		
	Desnaturalización inicial		95°C, 5 min.
Oligonucleótidos US2-F y US2-R	45 ciclos	Desnaturalización	95°C, 30 seg
Taq ADN polimerasa con <i>Buffer</i> ThermoPol (cat.M0267S, NEB)		Hibridación	61°C, 30 seg.
		Elongación	72°C, 1 min.
DMSO 6%	Elongación final  72°C, 5 min.		
Pares de bases amplificadas 318			

Amplificación de un fragmento del gen US8*			
Templado ADNg de BHV-1 y R2	Ciclado		
	Desnaturalización inicial		95°C, 5 min.
Oligonucleótidos 1-US8-F y 1-US8-R	45 ciclos	Desnaturalización	95°C, 30 seg
Taq ADN polimerasa con <i>Buffer</i> ThermoPol (cat.M0267S, NEB)		Hibridación	61°C, 30 seg.
		Elongación	72°C, 1 min.
DMSO 6%	Elongación final  72°C, 5 min.		
Pares de bases amplificadas 299			

Amplificación de un fragmento del gen US8*			
Templado ADNg de BHV-5 y R1	Ciclado		
	Desnaturalización inicial		95°C, 5 min.
Oligonucleótidos 5-US8-F y 5-US8-R	45 ciclos	Desnaturalización	95°C, 30 seg
Taq ADN polimerasa con <i>Buffer</i> ThermoPol (cat.M0267S, NEB)		Hibridación	61°C, 30 seg.
		Elongación	72°C, 1 min.
DMSO 6%	Elongación final  72°C, 5 min.		
Pares de bases amplificadas 344			

\* Realizadas en el Departamento de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Virología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Liege, Bélgica.

\*\*Realizadas En el Instituto de Virología, CICVyA, INTA Castelar.

#### **ANEXO IV. Análisis histopatológico**

Las muestras analizadas en el informe pertenecen a los siguientes grupos:

- Grupo virus BHV-5 N569: animales 636, 628, 199 y 191
- Grupo virus BHV-1.2  $\Delta$ gC(GFP+) $\Delta$ gI(RFP+): animales 635 y 172
- Grupo virus R1  $\Delta$ gC(GFP+): animales 165 y 177
- Grupo virus R2  $\Delta$ gI(RFP+): animales 622 y 625



- Abendroth, A., Lin, I., Slobedman, B., Ploegh, H., yArvin, A. M. (2001). Varicella-zoster virus retains major histocompatibility complex class I proteins in the Golgi compartment of infected cells. *J Virol* **75**(10), 4878-88.
- Abril, C., Engels, M., Liman, A., Hilbe, M., Albin, S., Franchini, M., Suter, M., yAckermann, M. (2004). Both viral and host factors contribute to neurovirulence of bovine herpesviruses 1 and 5 in interferon receptor-deficient mice. *J Virol* **78**(7), 3644-53.
- Achour, H. A., yMoussa, A. (1996). Serological and virological studies on the infectious bovine rhinotracheitis in Algeria. *Zentralbl Veterinarmed B* **43**(4), 251-6.
- Ackermann, M., yEngels, M. (2006). Pro and contra IBR-eradication. *Vet Microbiol* **113**(3-4), 293-302.
- Ahmed, M., Lock, M., Miller, C.G. y Fraser, N.W. (2002). Regions of the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript that protect cells from apoptosis in vitro and protect neuronal cells in vivo. *J. Virol.* **76**, 717-729
- Allen, G. P. y Breathnach, C. C. (2006) Quantification by real-time PCR of the magnitude and duration of leucocyte-associated viraemia in horses infected with neuropathogenic vs. non-neuropathogenic strains of EHV-1. *Equine Vet. J.* **38**, 252-257.
- Al-Mubarak, A., y Chowdhury, S. I. (2004). In the absence of glycoprotein I (gI), gE determines bovine herpesvirus type 5 neuroinvasiveness and neurovirulence. *J Neurovirol* **10**(4), 233-43.
- Al-Mubarak, A., Simon, J., Coats, C., Okemba, J. D., Burton, M. D., yChowdhury, S. I. (2007). Glycoprotein E (gE) specified by bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) enables trans-neuronal virus spread and neurovirulence without being a structural component of enveloped virions. *Virology*.
- Ambagala, A. P., Gopinath, R. S., y Srikumaran, S. (2003). Inhibition of TAP by pseudorabies virus is independent of its vhs activity. *Virus Res* **96**(1-2), 37-48.
- Ambagala, A. P., Hinkley, S., y Srikumaran, S. (2000). An early pseudorabies virus protein down-regulates porcine MHC class I expression by inhibition of transporter associated with antigen processing (TAP). *J Immunol* **164**(1), 93-9.
- Ashbaugh, S.E., Thompson, K.E., Belknap, E.B., Schultheiss, P.C., Chowdhury, S., Collins, J.K., (1997). Specific detection of shedding and latency of bovine herpesvirus 1 and 5 using a nested polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.* **9**, 387-394
- Audonnet, J. C., Winslow, J., Allen, G., y Paoletti, E. (1990). Equine herpesvirus type 1 unique short fragment encodes glycoproteins with homology to herpes simplex virus type 1 gD, gI and gE. *J Gen Virol* **71** (Pt 12), 2969-78.
- Babiuk, L. A., van Drunen Littel-van den Hurk, S., y Tikoo, S. K. (1996). Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. *Vet Microbiol* **53**(1-2), 31-42.
- Bagust, T. J. (1972). Comparison of the biological, biophysical and antigenic properties of four strains of infectious bovine rhinotracheitis herpesvirus. *J Comp Pathol* **82**(4), 365-74.
- Bagust, T. J., y Clark, L. (1972). Pathogenesis of meningo-encephalitis produced in calves by infectious bovine rhinotracheitis herpesvirus. *J Comp Pathol* **82**(4), 375-83.
- Banfield, B. W., Kaufman, J. D., Randall, J. A., y Pickard, G. E. (2003). Development of pseudorabies virus strains expressing red fluorescent proteins: new tools for multisynaptic labeling applications. *J Virol* **77**(18), 10106-12.

- Barenfus, M., Delli Quadri, C.A., McIntyre, R.W. y Schoeder, R.J. (1963). Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from calves with meningoencephalitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **143**, 725-728.
- Bartha, A., Hajdu, G., Aldasy, P. y Paczolay, G. (1969). Occurrence of encephalomyelitis caused by infectious bovine rinotracheitis virus in calves in Hungary. *Acta Vet. Acad. Scient. Hung* **19**, 145-151.
- Bataille, D., y Epstein, A. (1994). Herpes simplex virus replicative concatemers contain L components in inverted orientation. *Virology* **203**(2), 384-8.
- Bataille, D., y Epstein, A. L. (1997). Equimolar generation of the four possible arrangements of adjacent L components in herpes simplex virus type 1 replicative intermediates. *J Virol* **71**(10), 7736-43.
- Belknap, E. B., Collins, J. K., Ayers, V. K., y Schultheiss, P. C. (1994). Experimental infection of neonatal calves with neurovirulent bovine herpesvirus type 1.3. *Vet Pathol* **31**(3), 358-65.
- Belknap, E. B., Walters, L. M., Kelling, C., Ayers, V. K., Norris, J., McMillen, J., Hayhow, C., Cochran, M., Reddy, D. N., Wright, J., y Collins, J. K. (1999). Immunogenicity and protective efficacy of a gE, gG and US2 gene-deleted bovine herpesvirus-1 (BHV-1) vaccine. *Vaccine* **17**(18), 2297-305.
- Betancur, C.H., Gonzalez M.T., y Lázaro Reza, T.G. (2006) Seroepidemiología de la rinotracheitis infecciosa bovina en el municipio de Montería, Colombia. *Rev MDZ Cordob.* **11**(2), 830-836.
- Bielefeldt Ohmann, H., Babiuk, L.A., y Harland, R. (1991) Cytokine synergy with viral cytopathic effects and bacterial products during the patogénesis of respiratory tract infection. *Clin Immunol Immunopathol* **60**, 153-157
- Biron, C. A. y Sen, G. C. (2001). Interferons and other cytokines. In Fields Virology, 4th edn, pp. 321-349. Edited by D. Knipe & P. Howley. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Blanco Viera, F.J., Carrillo, B.J., Weber, E.L., Bardon, J.C., Combessies, G.M., Cordeviola, J.M., Nosedá, R., Soni, C.A. y Schudel A.A. (1998). Casuística neuropatológica. Estudio micrscópico de los casos clínicos remitidos al programa de vigilancia de BSE en Argentina, durante el periodo comprendido entre 1994-1996. *Rev Med Vet* **79**(3), 226-230.
- Boelaert, F., Speybroeck, N., de Kruif, A., Aerts, M., Burzykowski, T., Molenberghs, G. y Berkvens, D. L. (2005) Risk factors for bovine herpesvirus-1 seropositivity. *Prev. Vet. Med.* **69**, 285-295.
- Booy, F. P., Trus, B. L., Davison, A. J., y Steven, A. C. (1996). The capsid architecture of channel catfish virus, an evolutionarily distant herpesvirus, is largely conserved in the absence of discernible sequence homology with herpes simplex virus. *Virology* **215**(2), 134-41.
- Bosch, J. C., De Jong, M. C., Franken, P., Frankena, K., Hage, J. J., Kaashoek, M. J., Maris-Veldhuis, M. A., Noordhuizen, J. P., Van der Poel, W. H., Verhoeff, J., Weerdmeester, K., Zimmer, G. M., y Van Oirschot, J. T. (1998). An inactivated gE-negative marker vaccine and an experimental gD-subunit vaccine reduce the incidence of bovine herpesvirus 1 infections in the field. *Vaccine* **16**(2-3), 265-71.
- Bosch, J. C., Kaashoek, M. J., y van Oirschot, J. T. (1997). Inactivated bovine herpesvirus 1 marker vaccines are more efficacious in reducing virus excretion after reactivation than a live marker vaccine. *Vaccine* **15**(14), 1512-7.

Bowden, R., Sakaoka, H., Donnelly, P., y Ward, R. (2004). High recombination rate in herpes simplex virus type 1 natural populations suggests significant co-infection. *Infect Genet Evol* **4**(2), 115-23.

Bradshaw, B. J. y Edwards, S. (1996) Antibody isotype responses to experimental infection with bovine herpesvirus 1 in calves with colostrally derived antibody. *Vet. Microbiol.* **53**,43-151.

Brake, F. y Studert, M.J. (1985). Molecular epidemiology and pathogenesis of ruminant herpesviruses including bovine, buffalo and caprine herpesvirus 1 and bovine encephalitis herpesvirus. *Aust. Vet. J.* **62**,331-334.

Brandt, C. R., y Grau, D. R. (1990). Mixed infection with herpes simplex virus type 1 generates recombinants with increased ocular and neurovirulence. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **31**(11), 2214-23.

Brandt, C. R., Kolb, A. W., Shah, D. D., Pumfery, A. M., Kintner, R. L., Jaehnig, E., y Van Gompel, J. J. (2003). Multiple determinants contribute to the virulence of HSV ocular and CNS infection and identification of serine 34 of the US1 gene as an ocular disease determinant. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**(6), 2657-68.

Bratanich, A. C., Sardi, S. I., Smitsaart, E. N., y Schudel, A. A. (1991). Comparative studies of BHV-1 variants by in vivo--in vitro tests. *Zentralbl Veterinarmed B* **38**(1), 41-8.

Brideau, A. D., Card, J. P., y Enquist, L. W. (2000). Role of pseudorabies virus Us9, a type II membrane protein, in infection of tissue culture cells and the rat nervous system. *J Virol* **74**(2), 834-45.

Brown, S. M., Subak-Sharpe, J. H., Harland, J., y MacLean, A. R. (1992). Analysis of intrastrain recombination in herpes simplex virus type 1 strain 17 and herpes simplex virus type 2 strain HG52 using restriction endonuclease sites as unselected markers and temperature-sensitive lesions as selected markers. *J Gen Virol* **73** ( Pt 2), 293-301.

Bryan, L. A., Fenton, R. A., Misra, V., y Haines, D. M. (1994). 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* **35**(4), 223-8.

Bryant, N. A., Davis-Poynter, N., Vanderplasschen, A., y Alcamí, A. (2003). Glycoprotein G isoforms from some alphaherpesviruses function as broad-spectrum chemokine binding proteins. *Embo J* **22**(4), 833-46.

Burgos, J. S., Ramirez, C., Sastre, I., y Valdivieso, F. (2006). Effect of apolipoprotein E on the cerebral load of latent herpes simplex virus type 1 DNA. *J Virol* **80**(11), 5383-7.

Burgos, J. S., Ramirez, C., Sastre, I., Bullido, M. J. y Valdivieso F. (2003) ApoE4 is more efficient than E3 in brain access by herpes simplex virus type 1. *Neuroreport*. **14**,1825-1827.

Campadelli-Fiume, G., Farabegoli, F., Di Gaeta, S., y Roizman, B. (1991). Origin of unenveloped capsids in the cytoplasm of cells infected with herpes simplex virus 1. *J Virol* **65**(3), 1589-95.

Campadelli-Fiume, G., Gocchi, F., Menotti, L. y Lopez, M. (2000a) The novel receptors that mediate the entry of herpes simplex viruses and animal alphaherpesviruses into cells. *Rev Med Virol*. **10**, 305-19

Campos, M., Godson, D.L., Hughes, H.P.A. y Babiuk, L.A. (1994). Cytokine applications in infectious diseases. In: ed. B. Goddeeris y I. Morrisons. Cell-mediated immunity in ruminants. CRC Press. Boca Raton. Pp, 229-240.

- Card, J. P., Whealy, M. E., Robbins, A. K., y Enquist, L. W. (1992). Pseudorabies virus envelope glycoprotein gI influences both neurotropism and virulence during infection of the rat visual system. *J Virol* **66**(5), 3032-41.
- Carrillo, B.J., Ambrogí, A., Schudel, A.A., Vazquez, M., Dahme, E. y Pospischil, A., (1983)b. Meningoencefalitis caused by IBR virus in calves in Argentina. *J. Vet. Med. B* **30**,327–332.
- Carrillo, B.J., Pospischil, A. y Dahme, E. (1983a). Pathology of a bovine viral necrotizing encephalitis in Argentina. *J. Vet. Med. B* **30**,61-168
- Carter, J. J., Weinberg, A. D., Pollard, A., Reeves, R., Magnuson, J. A., y Magnuson, N. S. (1989). Inhibition of T-lymphocyte mitogenic responses and effects on cell functions by bovine herpesvirus 1. *J Virol* **63**(4), 1525-30.
- Carter, J. J., Weinberg, A. D., Pollard, A., Reeves, R., Magnuson, J. A., y Magnuson, N. S. (1989). Inhibition of T-lymphocyte mitogenic responses and effects on cell functions by bovine herpesvirus 1. *J Virol* **63**(4), 1525-30.
- Cascio, K. E., Belknap, E. B., Schultheiss, P. C., Ames, A. D., y Collins, J. K. (1999). Encephalitis induced by bovine herpesvirus 5 and protection by prior vaccination or infection with bovine herpesvirus 1. *J Vet Diagn Invest* **11**(2), 134-9.
- Cassady, K. A., Gross, M., y Roizman, B. (1998). The herpes simplex virus US11 protein effectively compensates for the gamma1(34.5) gene if present before activation of protein kinase R by precluding its phosphorylation and that of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. *J Virol* **72**(11), 8620-6.
- Castrucci, G., Frigeri, F., Salvatori, D., Ferrari, M., Sardonini, Q., Cassai, E., Lo, D. M., Rotola, A., y Angelini, R. (2002). Vaccination of calves against bovine herpesvirus-1: assessment of the protective value of eight vaccines. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **25**(1), 29-41.
- Cerqueira, R.B., Carminati, R., Silva, J.M., Campos, S.G., Meyer, R. y Sardi S. (2000). Serological survey for bovine herpesvirus 1 in cattle from different regions in the state of Bahia, Brazil. *Braz J Vet Res Anim Sci* **37**(6)online
- Chapgier, A., Wynn, R. F., Jouanguy, E., Filipe-Santos, O., Zhang, S., Feinberg, J., Hawkins, K., Casanova, J. L., y Arkwright, P. D. (2006). Human complete Stat-1 deficiency is associated with defective type I and II IFN responses in vitro but immunity to some low virulence viruses in vivo. *J Immunol* **176**(8), 5078-83.
- Chen, S. H., Kramer, M. F., Schaffer, P. A., y Coen, D. M. (1997). A viral function represses accumulation of transcripts from productive-cycle genes in mouse ganglia latently infected with herpes simplex virus. *J Virol* **71**(8), 5878-84.
- Chew, D. S., Choi, K. P. y Leung M. Y. (2005) Scoring schemes of palindrome clusters for more sensitive prediction of replication origins in herpesviruses. *Nucleic Acids Res.* **33** e134.
- Chow, T. L., Molello, J. A., y Owen, N. V. (1964). Abortion Experimentally Induced in Cattle by Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus. *J Am Vet Med Assoc* **144**, 1005-7.
- Chow, T. L., Molello, J. A., Owen, N. V. (1964). Abortion Experimentally Induced in Cattle by Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **144**,1005-1007.
- Chowdhury, S. I., Buhk, H. J., Ludwig, H., y Hammerschmidt, W. (1990). Genomic termini of equine herpesvirus 1. *J Virol* **64**(2), 873-80.

- Chowdhury, S. I., Lee, B. J., Mosier, D., Sur, J. H., Osorio, F. A., Kennedy, G., y Weiss, M. L. (1997). Neuropathology of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) meningo-encephalitis in a rabbit seizure model. *J Comp Pathol* **117**(4), 295-310.
- Chowdhury, S. I., Lee, B. J., Mosier, D., Sur, J. H., Osorio, F. A., Kennedy, G., y Weiss, M. L. (1997). Neuropathology of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) meningo-encephalitis in a rabbit seizure model. *J Comp Pathol* **117**(4), 295-310.
- Chowdhury, S. I., Lee, B. J., Onderci, M., Weiss, M. L., y Mosier, D. (2000). Neurovirulence of glycoprotein C(gC)-deleted bovine herpesvirus type-5 (BHV-5) and BHV-5 expressing BHV-1 gC in a rabbit seizure model. *J Neurovirol* **6**(4), 284-95.
- Chowdhury, S. I., Lee, B. J., Ozkul, A., y Weiss, M. L. (2000). Bovine herpesvirus 5 glycoprotein E is important for neuroinvasiveness and neurovirulence in the olfactory pathway of the rabbit. *J Virol* **74**(5), 2094-106.
- Chowdhury, S. I., Mahmood, S., Simon, J., Al-Mubarak, A., y Zhou, Y. (2006). The Us9 gene of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) effectively complements a Us9-null strain of BHV-5 for anterograde transport, neurovirulence, and neuroinvasiveness in a rabbit model. *J Virol* **80**(9), 4396-405.
- Chowdhury, S. I., Onderci, M., Bhattacharjee, P. S., Al-Mubarak, A., Weiss, M. L., y Zhou, Y. (2002). Bovine herpesvirus 5 (BHV-5) Us9 is essential for BHV-5 neuropathogenesis. *J Virol* **76**(8), 3839-51.
- Colodel, E.M., Nakazato, L., Weiblen, R., Mello, R.M., Pinheiro da Silva, R.R., de Almeida Souza, M., Aguiar de Oliveira Filho, J y Caron, L. (2002). Meningoencefalite necrosante em bovinos causada por herpesvirus bovino no estado de Mato Grosso, Brasil. *Ciencia Rural, Santa Maria* **32**(2), 293-298.
- Combessies, G.M., Bardon, J.C., Nosedá, R.P., Afranchino, L., Falzoni, E., Lager, I., Bratanich, A., Blanco Viera, J., y Schudel A.A. (1996) Encefalitis bovina por herpes. *V Congreso Argentino de Virología, II Encuentro de Virólogos Latinoamericanos*. Tandil, Buenos Aires, 24-27 Abril.
- Costes, B., Thirion, M., Dewals, B., Mast, J., Ackermann, M., Markine-Goriaynoff, N., Gillet, L., y Vanderplasschen, A. (2006). Felid herpesvirus 1 glycoprotein G is a structural protein that mediates the binding of chemokines on the viral envelope. *Microbes Infect* **8**(11), 2657-67.
- Dangler, C. A., Deaver, R. E., y Kolodziej, C. M. (1994). Measurement of Aujeszky's disease virus recombination in vitro under conditions of low multiplicity of infection. *Acta Vet Hung* **42**(2-3), 205-8.
- Dangler, C. A., Deaver, R. E., y Kolodziej, C. M. (1994). Genetic recombination between two strains of Aujeszky's disease virus at reduced multiplicity of infection. *J Gen Virol* **75** (Pt 2), 295-9.
- Dangler, C. A., Henderson, L. M., Bowman, L. A., y Deaver, R. E. (1993). Direct isolation and identification of recombinant pseudorabies virus strains from tissues of experimentally co-infected swine. *Am J Vet Res* **54**(4), 540-5.
- D'Arce, R. C., Almeida, R. S., Silva, T. C., Franco, A. C., Spilki, F., Roehe, P. M., y Arns, C. W. (2002). Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5. *Vet Microbiol* **88**(4), 315-24.
- Dargan, D. J., Jamieson, F. E., MacLean, J., Dolan, A., Addison, C., y McGeoch, D. J. (1997). The published DNA sequence of human cytomegalovirus strain AD169 lacks 929 base pairs affecting genes UL42 and UL43. *J Virol* **71**(12), 9833-6.

- Davison, A. J. (2002). Evolution of the herpesviruses. *Vet Microbiol* **86**(1-2), 69-88.
- Davison, A. J., y Davison, M. D. (1995). Identification of structural proteins of channel catfish virus by mass spectrometry. *Virology* **206**(2), 1035-43.
- Davison, A. J., Dargan, D. J., y Stow, N. D. (2002). Fundamental and accessory systems in herpesviruses. *Antiviral Res* **56**(1), 1-11.
- Davison, A. J., Trus, B. L., Cheng, N., Steven, A. C., Watson, M. S., Cunningham, C., Le Deuff, R. M., y Renault, T. (2005). A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *J Gen Virol* **86**(Pt 1), 41-53.
- de Wind, N., Berns, A., Gielkens, A., y Kimman, T. (1993). Ribonucleotide reductase-deficient mutants of pseudorabies virus are avirulent for pigs and induce partial protective immunity. *J Gen Virol* **74** ( Pt 3), 351-9.
- Deatly, A. M., Spivack, J. G., Lavi, E., O'Boyle, D. R., 2nd, y Fraser, N. W. (1988). Latent herpes simplex virus type 1 transcripts in peripheral and central nervous system tissues of mice map to similar regions of the viral genome. *J Virol* **62**(3), 749-56.
- Deiss, L. P., y Frenkel, N. (1986). Herpes simplex virus amplicon: cleavage of concatemeric DNA is linked to packaging and involves amplification of the terminally reiterated a sequence. *J Virol* **57**(3), 933-41.
- Del Médico Zajac, M.P. (2001). Evaluación de la inmunidad de mucosas conferida por diferentes vacunas contra herpesvirus bovino 1 mediante un test de ELISA. Rol de la IgA e IgG<sub>1</sub> en los mecanismos de protección frente a infecciones con este agente. Tesis de Licenciatura, FCEN, UBA.
- Delhon, G., Moraes, M. P., Lu, Z., Afonso, C. L., Flores, E. F., Weiblen, R., Kutish, G. F., y Rock, D. L. (2003). Genome of bovine herpesvirus 5. *J Virol* **77**(19), 10339-47.
- Demmin, G. L., Clase, A. C., Randall, J. A., Enquist, L. W., y Banfield, B. W. (2001). Insertions in the gG gene of pseudorabies virus reduce expression of the upstream Us3 protein and inhibit cell-to-cell spread of virus infection. *J Virol* **75**(22), 10856-69.
- Deshmane, S. L., y Fraser, N. W. (1989=). During latency, herpes simplex virus type 1 DNA is associated with nucleosomes in a chromatin structure. *J. Virol.* **63**,943-947.
- Devi-Rao, G. B., Bloom, D. C., Stevens, J. G., y Wagner, E. K. (1994). Herpes simplex virus type 1 DNA replication and gene expression during explant-induced reactivation of latently infected murine sensory ganglia. *J Virol* **68**(3), 1271-82.
- Diel, D. G., Almeida, S. R., Brum, M. C., Dezengrini, R., Weiblen, R., y Flores, E. F. (2007). Acute and latent infection by bovine herpesvirus type 5 in experimentally infected goats. *Vet Microbiol* **121**(3-4), 257-67.
- Dingwell, K. S., Brunetti, C. R., Hendricks, R. L., Tang, Q., Tang, M., Rainbow, A. J., y Johnson, D. C. (1994). Herpes simplex virus glycoproteins E and I facilitate cell-to-cell spread in vivo and across junctions of cultured cells. *J Virol* **68**(2), 834-45.
- Dingwell, K. S., Doering, L. C., y Johnson, D. C. (1995). Glycoproteins E and I facilitate neuron-to-neuron spread of herpes simplex virus. *J Virol* **69**(11), 7087-98.
- Dingwell, K. S., Doering, L. C., y Johnson, D. C. (1995). Glycoproteins E and I facilitate neuron-to-neuron spread of herpes simplex virus. *J Virol* **69**(11), 7087-98.

- Dispas, M., Lemaire, M., Speybroeck, N., Berkvens, D., Dupont, A., Boelart, F., Dramaix, M., Vanopdenbosch, E., Kerkhofs, P. y Thiry E. (2004) Deux protocoles d'hyperimmunisation au moyen de vaccins marqués réduisent l'incidence de séroconversion envers l'herpèsvirus bovin 1 en cheptels laitiers: résultats d'une étude sur le terrain. *Ann. Med. Vet.* **148**,47-61.
- Dispas, M., Schynts, F., Lemaire, M., Letellier, C., Vanopdenbosch, E., Thiry, E., y Kerkhofs, P. (2003). Isolation of a glycoprotein E-deleted bovine herpesvirus type 1 strain in the field. *Vet Rec* **153**(7), 209-12.
- Doerig, C., Pizer, L. I., y Wilcox, C. L. (1991). An antigen encoded by the latency-associated transcript in neuronal cell cultures latently infected with herpes simplex virus type 1. *J Virol* **65**(5), 2724-7.
- d'Offay, J. M., Ely, R. W., Baldwin, C. A., Whitenack, D. L., Stair, E. L., y Collins, J. K. (1995). Diagnosis of encephalitic bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) infection in cattle: virus isolation and immunohistochemical detection of antigen in formalin-fixed bovine brain tissues. *J Vet Diagn Invest* **7**(2), 247-51.
- Dohner, D. E., Adams, S. G., y Gelb, L. D. (1988). Recombination in tissue culture between varicella-zoster virus strains. *J Med Virol* **24**(3), 329-41.
- Dupuis, S., Jouanguy, E., Al-Hajjar, S., Fieschi, C., Al-Mohsen, I. Z., Al-Jumaah, S., Yang, K., Chapgier, A., Eidenschenk, C., Eid, P., Al Ghonaium, A., Tufenkeji, H., Frayha, H., Al-Gazlan, S., Al-Rayes, H., Schreiber, R. D., Gresser, I., y Casanova, J. L. (2003). Impaired response to interferon-alpha/beta and lethal viral disease in human STAT1 deficiency. *Nat Genet* **33**(3), 388-91.
- Edwards, S. (1988). Changing trends in infectious bovine rhinotracheitis in Great Britain. *Vet Rec* **123**(24), 614-8.
- Eidson, K. M., Hobbs, W. E., Manning, B. J., Carlson, P., y DeLuca, N. A. (2002). Expression of herpes simplex virus ICP0 inhibits the induction of interferon-stimulated genes by viral infection. *J Virol* **76**(5), 2180-91.
- Elias, F., Schild, AnL. Y Riet-Correa, F. (2004) Menbingoencefalite e encefalomalacia por herpesvirus bovino-5: distribucao das lesoes no sistema nervoso central de bovinos naturalmente infectados. *Pesq Vet Brasil* **24**(3),123-131.
- Engels, M., y Ackermann, M. (1996). Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. *Vet Microbiol* **53**(1-2), 3-15.
- Engels, M., Giuliani, C., Wild, P., Beck, T. M., Loepfe, E., y Wyler, R. (1986). The genome of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) strains exhibiting a neuropathogenic potential compared to known BHV-1 strains by restriction site mapping and cross-hybridization. *Virus Res* **6**(1), 57-73.
- Enquist, L. W., Husak, P. J., Banfield, B. W., y Smith, G. A. (1998). Infection and spread of alphaherpesviruses in the nervous system. *Adv Virus Res* **51**, 237-347.
- Enquist, L. W., Tomishima, M. J., Gross, S., y Smith, G. A. (2002). Directional spread of an alpha-herpesvirus in the nervous system. *Vet Microbiol* **86**(1-2), 5-16.
- Eugster, A.K., Angulo, A.A. y Jones, L.P. (1974). Herpesvirus encephalitis in range calves. *Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn* **17**,267-281.
- Farrell, M. J., Dobson, A. T., y Feldman, L. T. (1991). Herpes simplex virus latency-associated transcript is a stable intron. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(3), 790-4.

- Favoreel, H. W., Nauwynck, H. J., Halewyck, H. M., Van Oostveldt, P., Mettenleiter, T. C., y Pensaert, M. B. (1999). Antibody-induced endocytosis of viral glycoproteins and major histocompatibility complex class I on pseudorabies virus-infected monocytes. *J Gen Virol* **80** (Pt 5), 1283-91.
- Fehler, F., Herrmann, J. M., Saalmuller, A., Mettenleiter, T. C., y Keil, G. M. (1992). Glycoprotein IV of bovine herpesvirus 1-expressing cell line complements and rescues a conditionally lethal viral mutant. *J Virol* **66**(2), 831-9.
- Ferrari, M., Mettenleiter, T. C., Romanelli, M. G., Cabassi, E., Corradi, A., Dal Mas, N., y Silini, R. (2000). A comparative study of pseudorabies virus (PRV) strains with defects in thymidine kinase and glycoprotein genes. *J Comp Pathol* **123**(2-3), 152-63.
- Field, H. J., Biswas, S., y Mohammad, I. T. (2006). Herpesvirus latency and therapy--from a veterinary perspective. *Antiviral Res* **71**(2-3), 127-33.
- Fischer, G., Cleff, M. B., Dummer, L. A., Paulino, N., Paulino, A. S., de Oliveira Vilela, C., Campos, F. S., Storch, T., D'Avila Vargas, G., de Oliveira Hubner, S., y Vidor, T. (2007). Adjuvant effect of green propolis on humoral immune response of bovines immunized with bovine herpesvirus type 5. *Vet Immunol Immunopathol* **116**(1-2), 79-84.
- French, A.L. (1962) A specific virus encephalitis in calves: isolation and characterization of the casual agent. *Aus Vet J.* 216-221
- Friedli, K., y Metzler, A. E. (1987). Reactivity of monoclonal antibodies to proteins of a neurotropic bovine herpesvirus 1 (BHV-1) strain and to proteins of representative BHV-1 strains. *Arch Virol* **94**(1-2), 109-22.
- Friedman, H. M., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J., Seidel, C. A., y Cines, D. B. (1984). Glycoprotein C of herpes simplex virus 1 acts as a receptor for the C3b complement component on infected cells. *Nature* **309**(5969), 633-5.
- Fries, L. F., Friedman, H. M., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J., Hammer, C. H., y Frank, M. M. (1986). Glycoprotein C of herpes simplex virus 1 is an inhibitor of the complement cascade. *J Immunol* **137**(5), 1636-41.
- Fuchs, M., Hubert, P., Detterer, J., y Rziha, H. J. (1999). Detection of bovine herpesvirus type 1 in blood from naturally infected cattle by using a sensitive PCR that discriminates between wild-type virus and virus lacking glycoprotein E. *J Clin Microbiol* **37**(8), 2498-507.
- Fujita, K., Maeda, K., Yokoyama, N., Miyazawa, T., Kai, C., y Mikami, T. (1998). In vitro recombination of feline herpesvirus type 1. *Arch Virol* **143**(1), 25-34.
- Gao, Y., Daley, M. J., y Splitter, G. A. (1995). BHV-1 glycoprotein 1 and recombinant interleukin 1 beta efficiently elicit mucosal IgA response. *Vaccine* **13**(9), 871-7.
- Gao, Y., Leary, T. P., Eskra, L., y Splitter, G. A. (1994). Truncated bovine herpesvirus-1 glycoprotein I (gPI) initiates a protective local immune response in its natural host. *Vaccine* **12**(2), 145-52.
- Garber, D. A., Beverley, S. M., y Coen, D. M. (1993). Demonstration of circularization of herpes simplex virus DNA following infection using pulsed field gel electrophoresis. *Virology* **197**(1), 459-62.
- Garber, D. A., Schaffer, P. A., y Knipe, D. M. (1997). A LAT-associated function reduces productive-cycle gene expression during acute infection of murine sensory neurons with herpes simplex virus type 1. *J Virol* **71**(8), 5885-93.



Gardiner, M.R. y Nairn, M.E. (1964). Viral meningoencephalitis in calves in Western Australia. *Aust. Vet. J.* **40**,225–228.

Geiser, V., y Jones, C. (2005). Localization of sequences within the latency-related gene of bovine herpesvirus 1 that inhibit mammalian cell growth. *J Neurovirol* **11**(6), 563-70.

Geiser, V., Inman, M., Zhang, Y., y Jones, C. (2002). The latency-related gene of bovine herpesvirus-1 can inhibit the ability of bICP0 to activate productive infection. *J Gen Virol* **83**(Pt 12), 2965-71.

Gerber, J.D., Marron, A.E., Kucera, C.J. (1978). Local and systemic cellular and antibody immune responses of cattle to infectious bovine rhinotracheitis virus vaccines administered intranasally or intramuscularly. *Am. J. Vet. Res.* **39**(5),753–760.

Gerdts, V., Beyer, J., Lomniczi, B., y Mettenleiter, T. C. (2000). Pseudorabies virus expressing bovine herpesvirus 1 glycoprotein B exhibits altered neurotropism and increased neurovirulence. *J Virol* **74**(2), 817-27.

Gibbs, E. P. y Rweyemamu, M. M. (1977) Bovine herpesviruses. Part I. Bovine herpesvirus 1, *The veterinary bulletin.* **47**,317-343.

Gil, A., Cernicchiaro, N., Nuñez, A., Piaggio, J., Zaffaroni, R., Huertas, S. y Scarsi, R. (2003) Serological prevalence of infectious rinotracheitis and bovine diarrhea in holstein calves in the principal uruguayan dairy region. *ISAH*, México

Gilbert, W. y Dressler, D. (1968). DNA Replication: the roller circle model. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **33**, 115-126

Gilliam, S.E., Thackray, A.M., Brown, G.A. y Field, H.J. (1993) The pathogenesis of wild type and drug resistant mutant strains of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) in the natural host. *Arch Virol* **128**,43-54.

Giraud, J. (1989). Descripción clínico-epidemiológica de casos de meningoencefalitis producidos por herpesvirus bovino en el período (1974-1988). *Therios.* **13**, 287-293.

Glazenburg, K. L., Moormann, R. J., Kimman, T. G., Gielkens, A. L., y Peeters, B. P. (1994). In vivo recombination of pseudorabies virus strains in mice. *Virus Res* **34**(2), 115-26.

Glazenburg, K. L., Moormann, R. J., Kimman, T. G., Gielkens, A. L., y Peeters, B. P. (1995). Genetic recombination of pseudorabies virus: evidence that homologous recombination between insert sequences is less frequent than between autologous sequences. *Arch Virol* **140**(4), 671-85.

Goldsmith, K., Chen, W., Johnson, D. C., y Hendricks, R. L. (1998). Infected cell protein (ICP)47 enhances herpes simplex virus neurovirulence by blocking the CD8+ T cell response. *J Exp Med* **187**(3), 341-8.

Gomes, L.I., Rocha, M.A., Costa, E.A., Lobato, I.P., Mendes, L.C.N., Borges, A.S., Leite, R.C. y Barbosa-Stancioli, E.F. (2002) Deteccao de herpesvirus bovino 5 (BHV-5) em bovinos do sudoeste brasileiro. *Arq Bras Med Vet Zootec.* **54**(2),217-220.

Góngora, A., Villamil, L.C., Ver, V., Ramirez, G. y Parra, J. (1995) Diagnóstico de las principales enfermedades reproductivas en toros de la Sabana de Bogotá. Énfasis en RIB. *Rev Med Vet Zoot.* **43**, 37-41.

Goodbourn, S., Didcock, L., y Randall, R. E. (2000). Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J Gen Virol* **81**(Pt 10), 2341-64.

- Gopinath, R. S., Ambagala, A. P., Hinkley, S., y Srikumaran, S. (2002). Effects of virion host shut-off activity of bovine herpesvirus 1 on MHC class I expression. *Viral Immunol* **15**(4), 595-608.
- Gough, A. y James, D. (1975). Isolation of IBR virus from a heifer with meningoencefalitis. *Can. Vet. J.* **16**, 313-314.
- Granzow, H., Klupp, B. G., Fuchs, W., Veits, J., Osterrieder, N., y Mettenleiter, T. C. (2001). Egress of alphaherpesviruses: comparative ultrastructural study. *J Virol* **75**(8), 3675-84.
- Griebel, P. J., Gee, A. P., Qualtiere, L., Lawman, M. J., y Babiuk, L. A. (1989). Negative enrichment of bovine T lymphocytes with monoclonal antibodies and magnetic microspheres. *Vet Immunol Immunopathol* **22**(2), 161-73.
- Griebel, P. J., Qualtiere, L., Davis, W. C., Gee, A., Bielefeldt Ohmann, H., Lawman, M. J., y Babiuk, L. A. (1987). T lymphocyte population dynamics and function following a primary bovine herpesvirus type-1 infection. *Viral Immunol* **1**(4), 287-304.
- Griebel, P. J., Qualtiere, L., Davis, W. C., Lawman, M. J., y Babiuk, L. A. (1987). Bovine peripheral blood leukocyte subpopulation dynamics following a primary bovine herpesvirus-1 infection. *Viral Immunol* **1**(4), 267-86.
- Gu, B., Rivera-Gonzalez, R., Smith, C. A., y DeLuca, N. A. (1993). Herpes simplex virus infected cell polypeptide 4 preferentially represses Sp1-activated over basal transcription from its own promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(20), 9528-32.
- Guiarte Quincozes, C. (2005). Prevalencia e fatores de risco associados as infeccoes pelos herpesvirus bovino tipo 1 e 5 (BHV-1 e 5) e pelo virus da diarreia viral bovina (BVDV) nos rebanhos dos municipios de Santa Vitoria do Palmar e Chui. *Tesis Doctoral*. Rio Grande do Sul, Brasil.
- Haan, L., Verweij, W.R., Holtrop, M., Brands, R., van Scharrenburg, G.J., Palache, A.M. (2001). Nasal or intramuscular immunization of mice with influenza subunit antigen and the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile toxin induces IgA- or IgG-mediated protective mucosal immunity. *Vaccine* **19**(20-22), 2098-2907.
- Hage, J. J., Schukken, Y. H., Dijkstra, T., Barkema, H. W., van Valkengoed, P. H. y Wentink, G. H. (1998) Milk production and reproduction during a subclinical bovine herpesvirus 1 infection on a dairy farm. *Prev. Vet. Med.* **34**, 97-106.
- Hage, J. J., Vellema, P., Schukken, Y. H., Barkema, H. W., Rijsewijk, F. A., van Oirschot, J. T. y Wentink, G. H. (1997) Sheep do not have a major role in bovine herpesvirus 1 transmission, *Vet. Microbiol.* **57**, 41-54.
- Hagglund, R., Munger, J., Poon, A. P., y Roizman, B. (2002). U(S)3 protein kinase of herpes simplex virus 1 blocks caspase 3 activation induced by the products of U(S)1.5 and U(L)13 genes and modulates expression of transduced U(S)1.5 open reading frame in a cell type-specific manner. *J Virol* **76**(2), 743-54.
- Halfen, D.C. y Vidor, T. (2000). Meningoencefalite por herpevirus bovino tipo 5. p97-108. En: Riet-Correa, F, Schild, A.L., Mendez, M.C. y Lemos, R.A.A. (ed.) Doencas de ruminantes e equinos Vol 1 2ª ed. Editora Varela, Sao Paulo, SP.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **41**, 95-98.
- Halliburton, I. W. (1980). Intertypic recombinants of herpes simplex viruses. *J Gen Virol* **48**(1), 1-23.

- Halliburton, I. W., Honess, R. W., y Killington, R. A. (1987). Virulence is not conserved in recombinants between herpes simplex virus types 1 and 2. *J Gen Virol* **68** (Pt 5), 1435-40.
- Halliburton, I. W., Randall, R. E., Killington, R. A., y Watson, D. H. (1977). Some properties of recombinants between type 1 and type 2 herpes simplex viruses. *J Gen Virol* **36**(3), 471-84.
- Hammerschmidt, W., Ludwig, H., y Buhk, H. J. (1988). Specificity of cleavage in replicative-form DNA of bovine herpesvirus 1. *J Virol* **62**(4), 1355-63.
- Han, M. G., y Kim, S. J. (2001). Analysis of Korean strains of infectious laryngotracheitis virus by nucleotide sequences and restriction fragment length polymorphism. *Vet Microbiol* **83**(4), 321-31.
- Henderson, G., Zhang, Y., y Jones, C. (2005). The Bovine herpesvirus 1 gene encoding infected cell protein 0 (bICP0) can inhibit interferon-dependent transcription in the absence of other viral genes. *J Gen Virol* **86**(Pt 10), 2697-702.
- Henderson, L. M., Katz, J. B., Erickson, G. A., y Mayfield, J. E. (1990). In vivo and in vitro genetic recombination between conventional and gene-deleted vaccine strains of pseudorabies virus. *Am J Vet Res* **51**(10), 1656-62.
- Henderson, L. M., Levings, R. L., Davis, A. J., y Sturtz, D. R. (1991). Recombination of pseudorabies virus vaccine strains in swine. *Am J Vet Res* **52**(6), 820-5.
- Higgins, R. J., y Edwards, S. (1986). Systemic neonatal infectious bovine rhinotracheitis virus infection in suckler calves. *Vet Rec* **119**(8), 177-8.
- Hill, A., Jugovic, P., York, I., Russ, G., Bennink, J., Yewdell, J., Ploegh, H., y Johnson, D. (1995). Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity. *Nature* **375**(6530), 411-5.
- Hinkley, S., Ambagala, A. P., Jones, C. J., y Srikumaran, S. (2000). A vhs-like activity of bovine herpesvirus-1. *Arch Virol* **145**(10), 2027-46.
- Holzerlandt, R., Orengo, C., Kellam, P., y Alba, M. M. (2002). Identification of new herpesvirus gene homologs in the human genome. *Genome Res* **12**(11), 1739-48.
- Homa, F. L., y Brown, J. C. (1997). Capsid assembly and DNA packaging in herpes simplex virus. *Rev Med Virol* **7**(2), 107-122.
- Hubner, S. O., Oliveira, A. P., Franco, A. C., Esteves, P. A., Silva, A. D., Spilki, F. R., Rijsewijk, F. A., y Roehe, P. M. (2005). Experimental infection of calves with a gI, gE, US9 negative bovine herpesvirus type 5. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **28**(3), 187-96.
- Huemer, H. P., Larcher, C., y Coe, N. E. (1992). Pseudorabies virus glycoprotein III derived from virions and infected cells binds to the third component of complement. *Virus Res* **23**(3), 271-80.
- Huemer, H. P., Larcher, C., van Drunen Littel-van den Hurk, S., y Babiuk, L. A. (1993). Species selective interaction of Alphaherpesvirinae with the "unspecific" immune system of the host. *Arch Virol* **130**(3-4), 353-64.
- Huemer, H. P., Nowotny, N., Crabb, B. S., Meyer, H., y Hubert, P. H. (1995). gp13 (EHV-gC): a complement receptor induced by equine herpesviruses. *Virus Res* **37**(2), 113-26.

- Hung, S. L., Peng, C., Kostavasili, I., Friedman, H. M., Lambris, J. D., Eisenberg, R. J., y Cohen, G. H. (1994). The interaction of glycoprotein C of herpes simplex virus types 1 and 2 with the alternative complement pathway. *Virology* **203**(2), 299-312.
- Inman, M., Perng, G. C., Henderson, G., Ghiasi, H., Nesburn, A. B., Wechsler, S. L., y Jones, C. (2001). Region of herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript sufficient for wild-type spontaneous reactivation promotes cell survival in tissue culture. *J Virol* **75**(8), 3636-46.
- Ishov, A. M., y Maul, G. G. (1996). The periphery of nuclear domain 10 (ND10) as site of DNA virus deposition. *J Cell Biol* **134**(4), 815-26.
- Israel, B.A., Herber, R., Gao, Y. y Letchworth, G. (1992). Induction of a mucosal barrier to bovine herpesvirus-1 replication in cattle. *Virology* **188**, 256-264.
- Jackson, S. A., y DeLuca, N. A. (2003). Relationship of herpes simplex virus genome configuration to productive and persistent infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(13), 7871-6.
- Javier, R. T., Sedarati, F., y Stevens, J. G. (1986). Two avirulent herpes simplex viruses generate lethal recombinants in vivo. *Science* **234**(4777), 746-8.
- Jean, J.H. y Ben-Porat, T. (1976) Appearance *in vivo* of single stranded complementary ends on parental herpesvirus DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **73**, 2674-2678
- Jenkins, F. J., y Roizman, B. (1986). Herpes simplex virus 1 recombinants with noninverting genomes frozen in different isomeric arrangements are capable of independent replication. *J Virol* **59**(2), 494-9.
- Johnston, L.A.Y., Simmons, G.C. y McGavin, M.D. (1962). A viral meningoencephalitis in calves. *Aust. Vet. J.* **38**, 207-215.
- Jones, C. (2003). Herpes Simplex Virus Type 1 and Bovine Herpesvirus 1 Latency. *Clin Microbiol Rev.* **76**(1), 79-95.
- Jones, C., Geiser, V., Henderson, G., Jiang, Y., Meyer, F., Perez, S., y Zhang, Y. (2006). Functional analysis of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) genes expressed during latency. *Vet Microbiol* **113**(3-4), 199-210.
- Kaashoek, M. J., Rijsewijk, F. A., Ruuls, R. C., Keil, G. M., Thiry, E., Pastoret, P. P., y Van Oirschot, J. T. (1998). Virulence, immunogenicity and reactivation of bovine herpesvirus 1 mutants with a deletion in the gC, gG, gI, gE, or in both the gI and gE gene. *Vaccine* **16**(8), 802-9.
- Kaashoek, M. J., Straver, P. H., Van Rooij, E. M., Quak, J., y Van Oirschot, J. T. (1996). Virulence, immunogenicity and reactivation of seven bovine herpesvirus 1.1 strains: clinical and virological aspects. *Vet Rec* **139**(17), 416-21.
- Kaashoek, M. J., van Engelenburg, F. A., Moerman, A., Gielkens, A. L., Rijsewijk, F. A., y van Oirschot, J. T. (1996). Virulence and immunogenicity in calves of thymidine kinase- and glycoprotein E-negative bovine herpesvirus 1 mutants. *Vet Microbiol* **48**(1-2), 143-53.
- Kerkhofs, P., Renjifo, X., Toussaint, J. F., Letellier, C., Vanopdenbosch, E., y Wellemans, G. (2003). Enhancement of the immune response and virological protection of calves against bovine herpesvirus type 1 with an inactivated gE-deleted vaccine. *Vet Rec* **152**(22), 681-6.
- Kim, J. S., Enquist, L. W., y Card, J. P. (1999). Circuit-specific coinfection of neurons in the rat central nervous system with two pseudorabies virus recombinants. *J Virol* **73**(11), 9521-31.

- Kinchington, P. R., Reinhold, W. C., Casey, T. A., Straus, S. E., Hay, J., y Ruyechan, W. T. (1985). Inversion and circularization of the varicella-zoster virus genome. *J Virol* **56**(1), 194-200.
- Kintner, R. L., Allan, R. W., y Brandt, C. R. (1995). Recombinants are isolated at high frequency following in vivo mixed ocular infection with two avirulent herpes simplex virus type 1 strains. *Arch Virol* **140**(2), 231-44.
- Klopfleisch, R., Klupp, B. G., Fuchs, W., Kopp, M., Teifke, J. P., y Mettenleiter, T. C. (2006). Influence of pseudorabies virus proteins on neuroinvasion and neurovirulence in mice. *J Virol* **80**(11), 5571-6.
- Klupp, B. G., Granzow, H., Keil, G. M., y Mettenleiter, T. C. (2006). The capsid-associated UL25 protein of the alphaherpesvirus pseudorabies virus is nonessential for cleavage and encapsidation of genomic DNA but is required for nuclear egress of capsids. *J Virol* **80**(13), 6235-46.
- Koppers-Lalic, D., Reits, E. A., Rensing, M. E., Lipinska, A. D., Abele, R., Koch, J., Marcondes Rezende, M., Admiraal, P., van Leeuwen, D., Bienkowska-Szewczyk, K., Mettenleiter, T. C., Rijsewijk, F. A., Tampe, R., Neefjes, J., y Wiertz, E. J. (2005). Varicelloviruses avoid T cell recognition by UL49.5-mediated inactivation of the transporter associated with antigen processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(14), 5144-9.
- Koppers-Lalic, D., Rijsewijk, F. A., Verschuren, S. B., van Gaans-Van den Brink, J. A., Neisig, A., Rensing, M. E., Neefjes, J., y Wiertz, E. J. (2001). The UL41-encoded virion host shutoff (vhs) protein and vhs-independent mechanisms are responsible for down-regulation of MHC class I molecules by bovine herpesvirus 1. *J Gen Virol* **82**(Pt 9), 2071-81.
- Kowalczykowski, S.C., Dixon, D.A., Eggleston, A.K., Lauder, S.D. y Rehauer, W.M. (1994). Biochemistry of homologous recombination in Escherichia coli. *Microbiol Rev* **58**, 401-465.
- Kramps, J. A., Banks, M., Beer, M., Kerkhofs, P., Perrin, M., Wellenberg, G. J. y van Oirschot J. T. (2004) Evaluation of tests for antibodies against bovine herpesvirus 1 performed in national reference laboratories in Europe. *Vet. Microbiol.* **102**,169-181.
- Kritas, S. K., Nauwynck, H. J., y Pensaert, M. B. (1995). Dissemination of wild-type and gC-, gE- and gI-deleted mutants of Aujeszky's disease virus in the maxillary nerve and trigeminal ganglion of pigs after intranasal inoculation. *J Gen Virol* **76** ( Pt 8), 2063-6.
- Krummenacher, C., Zabolotny, J. M. y Fraser, N. W. (1997). Selection of a nonconsensus branch point is influenced by an RNA stem-loop structure and is important to confer stability to the herpes simplex virus 2-kilobase latency-associated transcript. *J. Virol.* **71**,5849-5860.
- Leach, D.R.F. (1996). Genetic Recombination. Blackwell Science, Oxford
- Lee, B. J., Weiss, M. L., Mosier, D., y Chowdhury, S. I. (1999). Spread of bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) in the rabbit brain after intranasal inoculation. *J Neurovirol* **5**(5), 474-84.
- Lehman, I. R., y Boehmer, P. E. (1999). Replication of herpes simplex virus DNA. *J Biol Chem* **274**(40), 28059-62.
- Lemaire, M., Meyer, G., Baranowski, E., Schynts, F., Wellemans, G., Kerkhofs, P., y Thiry, E. (2000). Production of bovine herpesvirus type 1-seronegative latent carriers by administration of a live-attenuated vaccine in passively immunized calves. *J Clin Microbiol* **38**(11), 4233-8.
- Lemaire, M., Weynants, V., Godfroid, J., Schynts, F., Meyer, G., Letesson, J. J., y Thiry, E. (2000). Effects of bovine herpesvirus type 1 infection in calves with maternal antibodies on immune response and virus latency. *J Clin Microbiol* **38**(5), 1885-94.

- Leuzinger, H., Ziegler, U., Schraner, E. M., Fraefel, C., Glauser, D. L., Heid, I., Ackermann, M., Mueller, M., y Wild, P. (2005). Herpes simplex virus 1 envelopment follows two diverse pathways. *J Virol* **79**(20), 13047-59.
- Liang, X. P., Babiuk, L. A., van Drunen Littel-van den Hurk, S., Fitzpatrick, D. R., y Zamb, T. J. (1991). Bovine herpesvirus 1 attachment to permissive cells is mediated by its major glycoproteins gI, gIII, and gIV. *J Virol* **65**(3), 1124-32.
- Liang, X., Babiuk, L. , y Zamb, T. (1992). An in vivo study of a glycoprotein gIII-negative bovine herpesvirus 1 (BHV-1) mutant expressing beta-galactosidase: evaluation of the role of gIII in virus infectivity and its use as a vector for mucosal immunization. *Virology* **189**(2), 629-39.
- Liang, X., Chow, B., Raggo, C., and Babiuk, L. A. (1996). Bovine herpesvirus 1 UL49.5 homolog gene encodes a novel viral envelope protein that forms a disulfide-linked complex with a second virion structural protein. *J Virol* **70**(3), 1448-54.
- Liang, X., Chow, B., y Babiuk, L. A. (1997). Study of immunogenicity and virulence of bovine herpesvirus 1 mutants deficient in the UL49 homolog, UL49.5 homolog and dUTPase genes in cattle. *Vaccine* **15**(10), 1057-64.
- Lin, R., Noyce, R. S., Collins, S. E., Everett, R. D., y Mossman, K. L. (2004). The herpes simplex virus ICP0 RING finger domain inhibits IRF3- and IRF7-mediated activation of interferon-stimulated genes. *J Virol* **78**(4), 1675-84.
- Lindner, A., Ambrosius, H., y Liebermann, H. (1993). [Comparative studies of the detection of antibodies against BHV-5 using the enzyme-linked immunosorbent assay, serum neutralization test, cell assay and immunofluorescence test]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* **100**(11), 440-2.
- Lindner, A., Liebermann, H., y Ambrosius, H. (1993). [Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) in sheep sera]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* **100**(10), 390-5.
- Lushnikov, A. Y., Bogdanov, A., y Lyubchenko, Y. L. (2003). DNA recombination: holliday junctions dynamics and branch migration. *J Biol Chem* **278**(44), 43130-4.
- Madic, J., Magdalena, J., Quak, J., y van Oirschot, J. T. (1995). Isotype-specific antibody responses in sera and mucosal secretions of calves experimentally infected with bovine herpesvirus 1. *Vet Immunol Immunopathol* **46**(3-4), 267-83.
- Madic, J., Magdalena, J., Quak, J., y van Oirschot, J. T. (1995). Isotype-specific antibody responses to bovine herpesvirus 1 in sera and mucosal secretions of calves after experimental reinfection and after reactivation. *Vet Immunol Immunopathol* **47**(1-2), 81-92.
- Magaña Urbiña, A., Solorio Rivera, J.L., y Segura Correa, J.C. (2005). Rinotraqueitis infecciosa bovina en hatos lecheros de la región Cotzio-Téjaro, Michoacán, México. *Tec Pecu Mex* **43**(1), 27-37.
- Maggioncalda, J., Mehta, A., Su, Y. H., Fraser, N. W. y Block, M. (1996). Correlation between herpes simplex virus type 1 rate of reactivation from latent infection and the number of infected neurons in trigeminal ganglia. *Virology* **225**, 72-81.
- Mars, M. H., de Jong, M. C., van Maanen, C., Hage, J. J. y van Oirschot, J. T. (2000) Airborne transmission of bovine herpesvirus 1 infections in calves under field conditions. *Vet. Microbiol.* **76**, 1-13.
- Mars, M.H., de Jong, M.C.M. y van Oirschot, J.T., (2000). A gE-negative bovine herpesvirus 1 vaccine strain is not re-excreted nor transmitted in an experimental cattle population after corticosteroid treatments. *Vaccine* **1**(18), 1975-1981.

- Martin, D. W., y Weber, P. C. (1997). DNA replication promotes high-frequency homologous recombination during *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus infection. *Virology* **232**(2), 300-9.
- Martinez, R., Sarisky, R. T., Weber, P. C., y Weller, S. K. (1996). Herpes simplex virus type 1 alkaline nuclease is required for efficient processing of viral DNA replication intermediates. *J Virol* **70**(4), 2075-85.
- Mayer, B., Kis, Z., Kaján, G., Hammarstrom, L. and Kacskovics, I. (2004). The neonatal Fc receptor (FcRn) is expressed in the bovine lung. *Vet Immunol Immunopathol* **98**, 85-89.
- McGeoch, D. J., Cook, S., Dolan, A., Jamieson, F. E., y Telford, E. A. (1995). Molecular phylogeny and evolutionary timescale for the family of mammalian herpesviruses. *J Mol Biol* **247**(3), 443-58.
- McGeoch, D. J., Dolan, A., y Ralph, A. C. (2000). Toward a comprehensive phylogeny for mammalian and avian herpesviruses. *J Virol* **74**(22), 10401-6.
- McVoy, M. A., y Adler, S. P. (1994). Human cytomegalovirus DNA replicates after early circularization by concatemer formation, and inversion occurs within the concatemer. *J Virol* **68**(2), 1040-51.
- Mechor, G. D., Rousseaux, C. G., Radostits, O. M., Babiuk, L. A., y Petrie, L. (1987). Protection of newborn calves against fatal multisystemic infectious bovine rhinotracheitis by feeding colostrum from vaccinated cows. *Can J Vet Res* **51**(4), 452-9.
- Meignier, B., Longnecker, R., Mavromara-Nazos, P., Sears, A. E., y Roizman, B. (1988). Virulence of and establishment of latency by genetically engineered deletion mutants of herpes simplex virus 1. *Virology* **162**(1), 251-4.
- Mettenleiter, T. C. (2002). Herpesvirus assembly and egress. *J Virol* **76**(4), 1537-47.
- Mettenleiter, T. C. (2004). Budding events in herpesvirus morphogenesis. *Virus Res* **106**(2), 167-80.
- Mettenleiter, T. C. (2006). Intriguing interplay between viral proteins during herpesvirus assembly or: the herpesvirus assembly puzzle. *Vet Microbiol* **113**(3-4), 163-9.
- Mettenleiter, T. C., y Minson, T. (2006). Egress of alphaherpesviruses. *J Virol* **80**(3), 1610-1; author reply 1611-2.
- Mettenleiter, T.C. (2003). Pathogenesis of neurotropic herpesviruses: role of viral glycoproteins in neuroinvasion and transneuronal spread. *Virus Res.* **92**,197-206
- Metzler, A. E., Matile, H., Gassmann, U., Engels, M., y Wyler, R. (1985). European isolates of bovine herpesvirus 1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides, and reactivity with monoclonal antibodies. *Arch Virol* **85**(1-2), 57-69.
- Metzler, A. E., Schudel, A. A., y Engels, M. (1986). Bovine herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. *Arch Virol* **87**(3-4), 205-17.
- Meurens, F., Keil, G. M., Muylkens, B., Gogev, S., Schynts, F., Negro, S., Wiggers, L., y Thiry, E. (2004). Interspecific recombination between two ruminant alphaherpesviruses, bovine herpesviruses 1 and 5. *J Virol* **78**(18), 9828-36.
- Meurens, F., Schynts, F., Keil, G. M., Muylkens, B., Vanderplasschen, A., Gallego, P., y Thiry, E. (2004). Superinfection prevents recombination of the alphaherpesvirus bovine herpesvirus 1. *J Virol* **78**(8), 3872-9.

- Meyer, G., Lemaire, M., Lyaku, J., Pastoret, P. P. y Thiry E. (1996) Establishment of a rabbit model for bovine herpesvirus type 5 neurological acute infection *Vet. Microbiol.* **51**,27-40.
- Meyer, G., Lemaire, M., Ros, C., Belak, K., Gabriel, A., Cassart, D., Coignoul, F., Belak, S., y Thiry, E. (2001). Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5. *Arch Virol* **146**(4), 633-52.
- Miller, J. M., y Van der Maaten, M. J. (1986). Experimentally induced infectious bovine rhinotracheitis virus infection during early pregnancy: effect on the bovine corpus luteum and conceptus. *Am J Vet Res* **47**(2), 223-8.
- Miller, J. M., Whetstone, C. A. y Van der Maaten, M. J. (1991) Abortifacient property of bovine herpesvirus type 1 isolates that represent three subtypes determined by restriction endonuclease analysis of viral DNA. *Am. J. Vet. Res.* **52**,458-461.
- Miller, J.M., Whetstone, C.A., Bello, L.J. y Lawrence, W.C. (1991) Determination of ability of a thymidine kinase-negative deletion mutant of bovine herpesvirus-1 to cause abortion in cattle. *Am J Vet Res* **52**(7),1038±43.
- Mitchell D. (1974) An outbreak of abortion in a dairy herd following inoculation with an intramuscular infectious bovine rhinotracheitis vaccine. *Can Vet J* **15**,148.
- Mocarski, E. S., Post, L. E., y Roizman, B. (1980). Molecular engineering of the herpes simplex virus genome: insertion of a second L-S junction into the genome causes additional genome inversions. *Cell* **22**(1 Pt 1), 243-55.
- Moore, P. S., Gao, S. J., Dominguez, G., Cesarman, E., Lungu, O., Knowles, D. M., Garber, R., Pellett, P. E., McGeoch, D. J., y Chang, Y. (1996). Primary characterization of a herpesvirus agent associated with Kaposi's sarcomae. *J Virol* **70**(1), 549-58.
- Moretti, B., Orfei, Z., Mondino, G. y Persechino, A., (1964). Infectious bovine rinotracheitis, clinical observations and isolation of virus. *Vet. Ital.* **15**,676
- Mossman, K. L., y Smiley, J. R. (2002). Herpes simplex virus ICP0 and ICP34.5 counteract distinct interferon-induced barriers to virus replication. *J Virol* **76**(4), 1995-8.
- Moyal, M., Berkowitz, C., Rosen-Wolff, A., Darai, G., y Becker, Y. (1992). Mutations in the UL53 gene of HSV-1 abolish virus neurovirulence to mice by the intracerebral route of infection. *Virus Res* **26**(2), 99-112.
- Muylkens, B. (2006). Etude de la recombinaison chez l'herpesvirus bovin 1: virulence des virus recombinants délétés dans le gène de la glicoprotéine E et localisation génomique des événements de recombinaison. *Tesis Doctoral*, Universidad de Liege, Liege, Bélgica.
- Muylkens, B., Meurens, F., Schynts, F. y Thiry, E. (2003) Les facteurs de virulence des alphaherpèsvirus. *Virologie* **7**, 401-15
- Muylkens, B., Meurens, F., Schynts, F., de Fays, K., Pourchet, A., Thiry, J., Vanderplasschen, A., Antoine, N., y Thiry, E. (2006). Biological characterization of bovine herpesvirus 1 recombinants possessing the vaccine glycoprotein E negative phenotype. *Vet Microbiol* **113**(3-4), 283-91.
- Muylkens, B., Meurens, F., Schynts, F., Farnir, F., Pourchet, A., Bardiau, M., Gogev, S., Thiry, J., Cuisenaire, A., Vanderplasschen, A., y Thiry, E. (2006). Intraspecific bovine herpesvirus 1 recombinants carrying glycoprotein E deletion as a vaccine marker are virulent in cattle. *J Gen Virol* **87**(Pt 8), 2149-54.
- Muylkens, B., Thiry, J., Kirten, P., Schynts, F., y Thiry, E. (2007). Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Vet Res* **38**(2), 181-209.



- Mweene, A. S., Okazaki, K., y Kida, H. (1996). Detection of viral genome in non-neural tissues of cattle experimentally infected with bovine herpesvirus 1. *Jpn J Vet Res* **44**(3), 165-74.
- Nagashunmugam, T., Lubinski, J., Wang, L., Goldstein, L. T., Weeks, B. S., Sundaresan, P., Kang, E. H., Dubin, G., y Friedman, H. M. (1998). In vivo immune evasion mediated by the herpes simplex virus type 1 immunoglobulin G Fc receptor. *J Virol* **72**(7), 5351-9.
- Nakamichi, K., Matsumoto, Y., y Otsuka, H. (2002). Bovine herpesvirus 1 glycoprotein G is necessary for maintaining cell-to-cell junctional adherence among infected cells. *Virology* **294**(1), 22-30.
- Nauwynck, H. J., y Pensaert, M. B. (1992). Abortion induced by cell-associated pseudorabies virus in vaccinated sows. *Am J Vet Res* **53**(4), 489-93.
- Nauwynck, H. J., y Pensaert, M. B. (1995). Effect of specific antibodies on the cell-associated spread of pseudorabies virus in monolayers of different cell types. *Arch Virol* **140**(6), 1137-46.
- Nedrud, J.G., Liang, X., Hague, N. y Lamm, M.E. (1987). Combined oral/nasal immunization protects mice from Sendai virus infection. *J. Immunol.* **139**, 3484-3492.
- Nettleton, P.F., Sharp, J.M. y Herring, J.A. (1984) Infectious bovine rhinotracheitis virus excretion after vaccination, challenge and immunosuppression. In: Wittman G, Gaskill RM, Rhiza HJ, editors. Latent Herpes Virus Infections in Veterinary Medicine. Boston:Martinus Nijho, p. 191-209
- Nigro, O., Yu, G., Aguirre, A. A., y Lu, Y. (2004). Sequencing and characterization of the full-length gene encoding the single-stranded DNA binding protein of a novel Chelonian herpesvirus. *Arch Virol* **149**(2), 337-47.
- Nimonkar, A. V., y Boehmer, P. E. (2003). Reconstitution of recombination-dependent DNA synthesis in herpes simplex virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(18), 10201-6.
- Nishiyama, Y., Kimura, H., y Daikoku, T. (1991). Complementary lethal invasion of the central nervous system by nonneuroinvasive herpes simplex virus types 1 and 2. *J Virol* **65**(8), 4520-4.
- Norberg, P., Bergstrom, T., y Liljeqvist, J. A. (2006). Genotyping of clinical herpes simplex virus type 1 isolates by use of restriction enzymes. *J Clin Microbiol* **44**(12), 4511-4.
- Norberg, P., Bergstrom, T., Rekabdar, E., Lindh, M., y Liljeqvist, J. A. (2004). Phylogenetic analysis of clinical herpes simplex virus type 1 isolates identified three genetic groups and recombinant viruses. *J Virol* **78**(19), 10755-64.
- Norberg, P., Liljeqvist, J. A., Bergstrom, T., Sammons, S., Schmid, D. S., y Loparev, V. N. (2006). Complete-genome phylogenetic approach to varicella-zoster virus evolution: genetic divergence and evidence for recombination. *J Virol* **80**(19), 9569-76.
- Odeón, A.C., Spath, E.J.A., Paloma, E.J., Leunda, M.R., Fernandez Sainz, I.J., Perez, S.E., Kaiser, G.G., Draghi, M.G., Cetrá, B.M. y Cano, A. (2001). Seroprevalencia de la diarrea viral bovina, herpesvirus bovino y virus sincicial respiratorio en Argentina. *Rev Med Vet (Argentina)*. **82**(4), 216-220.
- OIE. (2004). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Part I. On-line edition, Section I.1, Chapter I.1.3, Stage 3, Item 2.
- Owen, N. V., Chow, T. L., y Molello, J. A. (1964). Bovine Fetal Lesions Experimentally Produced by Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus. *Am J Vet Res* **25**, 1617-26.

- Pagamjav, O., Sakata, T., Matsumura, T., Yamaguchi, T., y Fukushi, H. (2005). Natural recombinant between equine herpesviruses 1 and 4 in the ICP4 gene. *Microbiol Immunol* **49**(2), 167-79.
- Papp, Z., Babiuk, L. A., y Baca-Estrada, M. E. (1998). Induction of immunity in the respiratory tract and protection from bovine herpesvirus type 1 infection by different routes of immunization with recombinant adenovirus. *Viral Immunol* **11**(2), 79-91.
- Papp, Z., Middleton, D. M., Mittal, S. K., Babiuk, L. A., y Baca-Estrada, M. E. (1997). Mucosal immunization with recombinant adenoviruses: induction of immunity and protection of cotton rats against respiratory bovine herpesvirus type 1 infection. *J Gen Virol* **78** (Pt 11), 2933-43.
- Perez, S. E., Bretschneider, G., Leunda, M. R., Osorio, E. A., Flores, E. F., y Odeon, A. C. (2002). Primary infection, latency, and reactivation of bovine herpesvirus type 5 in the bovine nervous system. *Vet Pathol* **39**(4), 437-44.
- Perez, S.E., Vagnozzi, A., Sur, J.H., Odriozola, E., Campero, C.M. y Odeón, A.C. (2003). Análisis retrospectivo de casos con diagnóstico de necrosis cerebrocortical y su relación con herpesvirus bovino tipo 5. *Rev Arg Microbiol* **35**, 69-73.
- Perng, G. C., Chokephaibulkit, K., Thompson, R. L., Sawtell, N. M., Slanina, S. M., Ghiasi, H., Nesburn, A. B., y Wechsler, S. L. (1996). The region of the herpes simplex virus type 1 LAT gene that is colinear with the ICP34.5 gene is not involved in spontaneous reactivation. *J Virol* **70**(1), 282-91.
- Perng, G. C., Slanina, S. M., Yukht, A., Drolet, B. S., Keleher, W., Jr., Ghiasi, H., Nesburn, A. B., y Wechsler, S. L. (1999). A herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript mutant with increased virulence and reduced spontaneous reactivation. *J Virol* **73**(2), 920-9.
- Perng, G.C., Jones, C., Ciacci-Zanella, J., Stone, M., Henderson, G., Yukht, A., Slanina, S.M., Hoffman, F.M., Ghiasi, H., Nesburn, A.B. y Wechsler, S.. (2000). Virus-induced neuronal apoptosis blocked by the herpes simplex virus latency-associated transcript (LAT). *Science* **287**,1500–1503.
- Perrin, B., Perrin, M., Moussa, A., y Coudert, M. (1996). Evaluation of a commercial gE blocking ELISA test for detection of antibodies to infectious bovine rhinotracheitis virus. *Vet Rec* **138**(21), 520.
- Poffenberger, K. L., y Roizman, B. (1985). A noninverting genome of a viable herpes simplex virus 1: presence of head-to-tail linkages in packaged genomes and requirements for circularization after infection. *J Virol* **53**(2), 587-95.
- Poffenberger, K. L., y Roizman, B. (1985). A noninverting genome of a viable herpes simplex virus 1: presence of head-to-tail linkages in packaged genomes and requirements for circularization after infection. *J Virol* **53**(2), 587-95.
- Puntel, M. (2003). Desarrollo de una cepa recombinante de BHV-1 deleteada en el gen de gE. Evaluación de la misma como vacuna inactivada y viva. *Tesis doctoral*, FCEN, UBA.
- Quackenbush, S. L., Work, T. M., Balazs, G. H., Casey, R. N., Rovnak, J., Chaves, A., duToit, L., Baines, J. D., Parrish, C. R., Bowser, P. R., y Casey, J. W. (1998). Three closely related herpesviruses are associated with fibropapillomatosis in marine turtles. *Virology* **246**(2), 392-9.
- Rappocciolo, G., Birch, J., y Ellis, S. A. (2003). Down-regulation of MHC class I expression by equine herpesvirus-1. *J Gen Virol* **84**(Pt 2), 293-300.
- Reed, C.J. y Muench, H.A. (1938). A simple method of estimating fifty per cent end points. *Am. J. Hyg.* **27**,493.

- Reed, D.E., Bicknell, E.J. y Bury, R.J. (1973). Systemic form of infectious bovine rhinotracheitis in young calves. *J. Am. Vet. Med. Ass.* **163**,753–755.
- Renegar, K.B. y Small Jr., P.A. (1991)b. Passive transfer of local immunity to influenza virus infection by IgA antibody. *J. Immunol.* **146**,1972-1978.
- Renegar, K.B. y Small Jr., P.A., (1991)a. Immunoglobulin A mediation of murine nasal anti-influenza virus immunity. *J. Immunol.* **65**, 2146-2148.
- Riet-Correa, F., Vidor, T., Schild, A.L. y Mendez, M.C. (1989). Meningoencefalite e necrose do cortex cerebral em bovinos causadas por herpes virus bovino-1. *Pesq. Bras.* **9**, 13–16
- Riet-Correa, G., Dutra Duarte, M., Barbosa, J.D., Chaves Oliveira, C.M., Duarte Cerqueira, V., de Farias Brito, M. y Riet-Correa, F. (2006). Meningoencefalite e poliencefalomalacia causda por herpesvirus bovino-5 no Estado do Pará. *Pesq Vet Brasil* **26**(1), 44-46.
- Rijsewijk, F. A., Kaashoek, M. J., Langeveld, J. P., Meloen, R., Judek, J., Bienkowska-Szewczyk, K., Maris-Veldhuis, M. A., y van Oirschot, J. T. (1999). Epitopes on glycoprotein C of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) that allow differentiation between BHV-1.1 and BHV-1.2 strains. *J Gen Virol* **80 (Pt 6)**, 1477-83.
- Rijsewijk, F. A., Verschuren, S. B., Madic, J., Ruuls, R. C., Renaud, P., y van Oirschot, J. T. (1999). Spontaneous BHV1 recombinants in which the gI/gE/US9 region is replaced by a duplication/inversion of the US1.5/US2 region. *Arch Virol* **144**(8), 1527-37.
- Rissi, D.R., Oliveira, F.N., Rech, R.R., Pierezan, F., Lemas, R.A.A. y Barros, C.S.L. (2006). Epidemiologia, sinais clinicos e distribuicao das lesoes encefalicas em bovinos afectados por meningoencefalite por herpesvirus bovino-5. *Pesq Vet Brasil* **26**(2), 123-132.
- Rock, D. L., y Fraser, N. W. (1983). Detection of HSV-1 genome in central nervous system of latently infected mice. *Nature* **302**(5908), 523-5.
- Rock, D. L., y Fraser, N. W. (1985). Latent herpes simplex virus type 1 DNA contains two copies of the virion DNA joint region. *J Virol* **55**(3), 849-52.
- Rock, D. L., Nesburn, A. B., Ghiasi, H., Ong, J., Lewis, T. L., Lokensgard, J. R., y Wechsler, S. L. (1987). Detection of latency-related viral RNAs in trigeminal ganglia of rabbits latently infected with herpes simplex virus type 1. *J Virol* **61**(12), 3820-6.
- Roizman B y Pellet P E. (2001) The family herpesviridae: a brief introduction. De: Fields. Virology 4ta edición. Lippincott, Williams & Wilkins.
- Roizman, B., Desrosiers, R.C., Fleckenstein, B., Lopez, C., Minson, A.C. Y Studdert, M.J. (1992) The family *Herpesviridae*: an update. *Arch Virol.* **123**, 425-449.
- Romera, S. A., Hilgers, L. A., Puntel, M., Zamorano, P. I., Alcon, V. L., Dus Santos, M. J., Blanco Viera, J., Borca, M. V., y Sadir, A. M. (2000). Adjuvant effects of sulfolipo-cyclodextrin in a squalane-in-water and water-in-mineral oil emulsions for BHV-1 vaccines in cattle. *Vaccine* **19**(1), 132-41.
- Rouse, B.T. y Babiuk, L.A. (1974). Host defense mechanism against infectious bovine rhinotracheitis virus: in vitro stimulation of sensitized lymphocytes by virus antigen. *Infect. Immunity* **10**,681–687
- Salvador, J.C., Lemos, R.A.A., Riet-Correa, F., Roehe, P.M. y Osorio, A.R. (1998). Meningoencefalite em bovinos causada por herpesvirus bovino-5 no Mato Grosso do Sul e Sao Paula. *Pesq Vet Brasil* **18**(2), 75-82.

- Sandri-Goldin, R. M. (2003). Replication of the herpes simplex virus genome: does it really go around in circles? *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(13), 7428-9.
- Sawtell, N. M., y Thompson, R. L. (1992). Herpes simplex virus type 1 latency-associated transcription unit promotes anatomical site-dependent establishment and reactivation from latency. *J Virol* **66**(4), 2157-69.
- Schudel, A.A., Carrillo, B.J., Wyler, R. y Metzler, A.E. (1986). Infections of calves with antigenic variants of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) and neurological disease. *J. Vet. Med. B.* **33**,303-310.
- Schynts, F., McVoy, M. A., Meurens, F., Detry, B., Epstein, A. L., y Thiry, E. (2003). The structures of bovine herpesvirus 1 virion and concatemeric DNA: implications for cleavage and packaging of herpesvirus genomes. *Virology* **314**(1), 326-35.
- Schynts, F., Meurens, F., Detry, B., Vanderplasschen, A., y Thiry, E. (2003). Rise and survival of bovine herpesvirus 1 recombinants after primary infection and reactivation from latency. *J Virol* **77**(23), 12535-42.
- Schynts, F., Meurens, F., Muylkens, B., Epstein, A., McVoy, M. y Thiry E. (2002) Réplication, clivage-encapsidation et recombinaison de l'ADN des herpèsvirus. *Virologie*. 6,343-352.
- Severini, A., Morgan, A. R., Tovell, D. R., y Tyrrell, D. L. (1994). Study of the structure of replicative intermediates of HSV-1 DNA by pulsed-field gel electrophoresis. *Virology* **200**(2), 428-35.
- Severini, A., Scraba, D. G., y Tyrrell, D. L. (1996). Branched structures in the intracellular DNA of herpes simplex virus type 1. *J Virol* **70**(5), 3169-75.
- Shukla, D., Dal Canto, M. C., Rowe, C. L., y Spear, P. G. (2000). Striking similarity of murine nectin-1alpha to human nectin-1alpha (HveC) in sequence and activity as a glycoprotein D receptor for alphaherpesvirus entry. *J Virol* **74**(24), 11773-81.
- Silva, A. D., Spilki, F. R., Franco, A. C., Esteves, P. A., Hubner, S. O., Driemeier, D., Oliveira, A. P., Rijsewijk, F., y Roehe, P. M. (2006). Vaccination with a gE-negative bovine herpesvirus type 1 vaccine confers insufficient protection to a bovine herpesvirus type 5 challenge. *Vaccine* **24**(16), 3313-20.
- Silva, A. M., Weiblen, R., Irigoyen, L. F., Roehe, P. M., Sur, H. J., Osorio, F. A., y Flores, E. F. (1999). Experimental infection of sheep with bovine herpesvirus type-5 (BHV-5): acute and latent infection. *Vet Microbiol* **66**(2), 89-99.
- Slobedman, B., y Simmons, A. (1997). Concatemeric intermediates of equine herpesvirus type 1 DNA replication contain frequent inversions of adjacent long segments of the viral genome. *Virology* **229**(2), 415-20.
- Smiley, J. R., Fong, B. S., y Leung, W. C. (1981). Construction of a double-jointed herpes simplex viral DNA molecule: inverted repeats are required for segment inversion, and direct repeats promote deletions. *Virology* **113**(1), 345-62.
- Smitsaart, E.N., Bratanich, A.C., Ruiz, M., Sardi, M., Blanco Viera, F.J., León, E., González, O., Pugliese, M. y Schudel, A.A., (1989). Comportamiento inmunogénico de vacunas inactivadas polivalentes para Herpesvirus Bovino 1. *Rev. Med. Vet.* (Bs As) **68** (3), 148-154.
- Solis-Calderon, J.J., Segura-Correa, V.M., Segura-Correa, J.C. y Alvarado-Islas, A. (2003) Seroprevalence of and risk factors for infectious bovine rhinotracheitis in beef cattle herds of Yucatan, Mexico. *Prev. Vet. Med.* 57, 199-208.
- Spear, P. G., y Longnecker, R. (2003). Herpesvirus entry: an update. *J Virol* **77**(19), 10179-85.

- Spear, P. G., Eisenberg, R. J., and Cohen, G. H. (2000). Three classes of cell surface receptors for alphaherpesvirus entry. *Virology* **275**(1), 1-8.
- Spilki, F. R., Esteves, P. A., da Silva, A. D., Franco, A. C., Rijsewijk, F. A., y Roehe, P. M. (2005). A monoclonal antibody-based ELISA allows discrimination between responses induced by bovine herpesvirus subtypes 1 (BoHV-1.1) and 2 (BoHV-1.2). *J Virol Methods* **129**(2), 191-3.
- Spilki, F. R., Silva, A. D., Hubner, S., Esteves, P. A., Franco, A. C., Driemeier, D., y Roehe, P. M. (2004). Partial protection induced by a BHV-1 recombinant vaccine against challenge with BHV-5. *Ann N Y Acad Sci* **1026**, 247-50.
- STAT User's guide (1988). SAS Institute Inc., SAS/STAT User's guide, Release 6.04. Cary, NC 27512, USA: SAS Institute.
- Stow, N. D., y McMonagle, E. C. (1983). Characterization of the TRS/IRS origin of DNA replication of herpes simplex virus type 1. *Virology* **130**(2), 427-38.
- Szostak, J.W., Orr-Weaver, T.L., Rothstein, R.J. y Griffith, J. (1993). The double-stranded-break repair model for recombination. *Cell* **33**, 25-35
- Taylor, T. J., y Knipe, D. M. (2004). Proteomics of herpes simplex virus replication compartments: association of cellular DNA replication, repair, recombination, and chromatin remodeling proteins with ICP8. *J Virol* **78**(11), 5856-66.
- Theil, D., Paripovic, I., Derfuss, T., Herberger, S., Strupp, M., Arbusow, V., y Brandt, T. (2003). Dually infected (HSV-1/VZV) single neurons in human trigeminal ganglia. *Ann Neurol* **54**(5), 678-82.
- Thiry E., Saliki J., Bublot M. and Pastoret P. P. (1987). Reactivation of infectious bovine rhinotracheitis virus by transport, Comp. Immunol. Microbiol. *Infect. Dis.* **10**, 59-63.
- Thiry, E., Meurens, F., Muylkens, B., McVoy, M., Gogev, S., Thiry, J., Vanderplasschen, A., Epstein, A., Keil, G., y Schynts, F. (2005). Recombination in alphaherpesviruses. *Rev Med Virol* **15**(2), 89-103.
- Thiry, J., Keuser, V., Muylkens, B., Meurens, F., Gogev, S., Vanderplasschen, A., y Thiry, E. (2006). Ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1. *Vet Res* **37**(2), 169-90.
- Thompson, R. L., y Sawtell, N. M. (1997). The herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript gene regulates the establishment of latency. *J Virol* **71**(7), 5432-40.
- Tikoo, S. K., Campos, M., y Babiuk, L. A. (1995). Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): biology, pathogenesis, and control. *Adv Virus Res* **45**, 191-223.
- Timbury, M. C., y J. H. Subak-Sharpe. (1973). Genetic interactions between temperature-sensitive mutants of types 1 and 2 herpes simplex viruses. *J. Gen. Virol.* **18**, 347-357.
- Tirabassi, R. S., y Enquist, L. W. (2000). Role of the pseudorabies virus gI cytoplasmic domain in neuroinvasion, virulence, and posttranslational N-linked glycosylation. *J Virol* **74**(8), 3505-16.
- Tomazin, R., Hill, A. B., Jugovic, P., York, I., van Endert, P., Ploegh, H. L., Andrews, D. W., y Johnson, D. C. (1996). Stable binding of the herpes simplex virus ICP47 protein to the peptide binding site of TAP. *Embo J* **15**(13), 3256-66.
- Turner, A., Bruun, B., Minson, T., y Browne, H. (1998). Glycoproteins gB, gD, and gHgL of herpes simplex virus type 1 are necessary and sufficient to mediate membrane fusion in a Cos cell transfection system. *J Virol* **72**(1), 873-5.

- Umene, K. (1985). Intermolecular recombination of the herpes simplex virus type 1 genome analysed using two strains differing in restriction enzyme cleavage sites. *J Gen Virol* **66** ( Pt **12**), 2659-70.
- Umene, K. (1999). Mechanism and application of genetic recombination in herpesviruses. *Rev Med Virol* **9**(3), 171-82.
- Une, Y., Murakami, M., Uemura, K., Fujitani, H., Ishibashi, T., y Nomura, Y. (2000). Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of herpesvirus in tortoises. *J Vet Med Sci* **62**(8), 905-7.
- Van de Walle, G. R., Favoreel, H. W., Nauwynck, H. J., y Pensaert, M. B. (2003). Antibody-induced internalization of viral glycoproteins and gE-gI Fc receptor activity protect pseudorabies virus-infected monocytes from efficient complement-mediated lysis. *J Gen Virol* **84**(Pt 4), 939-48.
- van der Meulen, K., Caij, B., Pensaert, M., y Nauwynck, H. (2006). Absence of viral envelope proteins in equine herpesvirus 1-infected blood mononuclear cells during cell-associated viremia. *Vet Microbiol* **113**(3-4), 265-73.
- van Drunen Littel-van den Hurk, S. (2006). Rationale and perspectives on the success of vaccination against bovine herpesvirus-1. *Vet Microbiol* **113**(3-4), 275-82.
- van Drunen Littel-van den Hurk, S., Tikoo, S. K., van den Hurk, J. V., Babiuk, L. A., y Van Donkersgoed, J. (1997). Protective immunity in cattle following vaccination with conventional and marker bovine herpesvirus-1 (BHV1) vaccines. *Vaccine* **15**(1), 36-44.
- van Schaik, G., Schukken, Y. H., Nielen, M., Dijkhuizen, A. A. y Benedictus, G. (2003) Risk factors for introduction of BHV1 into BHV1-free Dutch dairy farms: a case-control study. *Vet. Q.* **23**, 71-76.
- van Schaik, G., Schukken, Y. H., Nielen, M., Dijkhuizen, A. A., Barkema, H. W. y Benedictus G. (2002) Probability of and risk factors for introduction of infectious diseases into Dutch SPF dairy farms: a cohort study. *Prev. Vet. Med.* **54**,279-289.
- van Schaik, G., Shoukri, M., Martin, S. W., Schukken, Y. H., Nielen, M., Hage J. J. y Dijkhuizen A. A. (1999) Modeling the effect of an outbreak of bovine herpesvirus type 1 on herd-level milk production of Dutch dairy farms. *J. Dairy Sci.* **82**,944-952.
- Varmuza, S. L., y Smiley, J. R. (1985). Signals for site-specific cleavage of HSV DNA: maturation involves two separate cleavage events at sites distal to the recognition sequences. *Cell* **41**(3), 793-802.
- Vogel, F. S., Caron, L., Flores, E. F., Weiblen, R., Winkelmann, E. R., Mayer, S. V., y Bastos, R. G. (2003). Distribution of bovine herpesvirus type 5 DNA in the central nervous systems of latently, experimentally infected calves. *J Clin Microbiol* **41**(10), 4512-20.
- Vonk Noordegraaf, A., Labrovic, A., Frankena, K., Pfeiffer, D. U. y Nielen M. (2004) Simulated hazards of loosing infection-free status in a Dutch BHV1 model. *Prev. Vet. Med.* **62**,51-58.
- Vossen, M. T., Westerhout, E. M., Soderberg-Naucler, C., y Wiertz, E. J. (2002). Viral immune evasion: a masterpiece of evolution. *Immunogenetics* **54**(8), 527-42.
- Weber, P. C., Levine, M., y Glorioso, J. C. (1987). Rapid identification of nonessential genes of herpes simplex virus type 1 by Tn5 mutagenesis. *Science* **236**(4801), 576-9.
- Weir, J. P. (1998). Genomic organization and evolution of the human herpesviruses. *Virus Genes* **16**(1), 85-93.

Weller, S. K., Spadaro, A., Schaffer, J. E., Murray, A. W., Maxam, A. M., y Schaffer, P. A. (1985). Cloning, sequencing, and functional analysis of oriL, a herpes simplex virus type 1 origin of DNA synthesis. *Mol Cell Biol* **5**(5), 930-42.

Whetstone, C. A., y Miller, J. M. (1989). Two different strains of an alphaherpesvirus can establish latency in the same tissue of the host animal: evidence from bovine herpesvirus 1. *Arch Virol* **107**(1-2), 27-34.

Whetstone, C. A., Miller, J. M., Seal, B. S., Bello, L. J., y Lawrence, W. C. (1992). Latency and reactivation of a thymidine kinase-negative bovine herpesvirus 1 deletion mutant. *Arch Virol* **122**(1-2), 207-14.

Whitbeck, J. C., Knapp, A. C., Enquist, L. W., Lawrence, W. C., y Bello, L. J. (1996). Synthesis, processing, and oligomerization of bovine herpesvirus 1 gE and gI membrane proteins. *J Virol* **70**(11), 7878-84.

Whitley, R.J. (2001). Herpes simplex viruses. De: Fields. Virology 4ta edición. Lippincott, Williams & Wilkins.

Wild, P., Engels, M., Senn, C., Tobler, K., Ziegler, U., Schraner, E. M., Loepfe, E., Ackermann, M., Mueller, M., y Walther, P. (2005). Impairment of nuclear pores in bovine herpesvirus 1-infected MDBK cells. *J Virol* **79**(2), 1071-83.

Wilkinson, D. E., y Weller, S. K. (2003). The role of DNA recombination in herpes simplex virus DNA replication. *IUBMB Life* **55**(8), 451-8.

Winkler, M. T., Doster, A., y Jones, C. (1999). Bovine herpesvirus 1 can infect CD4(+) T lymphocytes and induce programmed cell death during acute infection of cattle. *J Virol* **73**(10), 8657-68.

Wozniak, M. A., Shipley, S. J., Combrinck, M., Wilcock, G. K., y Itzhaki, R. F. (2005). Productive herpes simplex virus in brain of elderly normal subjects and Alzheimer's disease patients. *J Med Virol* **75**(2), 300-6.

Wyler, R., Engels, M. y Schwyzer, M. (1989) Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis BHV-1. In: Wytman G, Becker I, editors. Herpesvirus diseases of cattle, horses and pigs. Developments in veterinary virology. Boston: Kluwer. p. 1±72.

Ye, G. J., Vaughan, K. T., Vallee, R. B., y Roizman, B. (2000). The herpes simplex virus 1 U(L)34 protein interacts with a cytoplasmic dynein intermediate chain and targets nuclear membrane. *J Virol* **74**(3), 1355-63.

Yirrell, D. L., Rogers, C. E., Blyth, W. A., y Hill, T. J. (1992). Experimental in vivo generation of intertypic recombinant strains of HSV in the mouse. *Arch Virol* **125**(1-4), 227-38.

York, I. A., Roop, C., Andrews, D. W., Riddell, S. R., Graham, F. L., y Johnson, D. C. (1994). A cytosolic herpes simplex virus protein inhibits antigen presentation to CD8+ T lymphocytes. *Cell* **77**(4), 525-35.

Yu, Q., Hu, N., Lu, Y., Nerurkar, V. R., y Yanagihara, R. (2001). Rapid acquisition of entire DNA polymerase gene of a novel herpesvirus from green turtle fibropapilloma by a genomic walking technique. *J Virol Methods* **91**(2), 183-95.

Zacarias, E.R., Benito, A.Z. y Rivera H.G. (2002) Seroprevalencia del virus de la rinotraqueitis infecciosa en bovinos criollos de Parani-cochas, Ayacucho. *Rev Inv Vet Perú*. **13**(2), 61-65.

Zhang, X., Efstathiou, S., y Simmons, A. (1994). Identification of novel herpes simplex virus replicative intermediates by field inversion gel electrophoresis: implications for viral DNA amplification strategies. *Virology* **202**(2), 530-9.

Zhu, X. y Letchworth, G.J. (1996). Mucosal ysystemic immunity to bovine herpesvirus-1 glycoprotein D confer resistance to viral replication and latency in cattle. *Vaccine* **14**(1),61–69.

Zsak, L., Zuckermann, F., Sugg, N., yBen-Porat, T. (1992). Glycoprotein gI of pseudorabies virus promotes cell fusion and virus spread via direct cell-to-cell transmission. *J Virol* **66**(4), 2316-25.

Zwaagstra, J. C., Ghiasi, H., Slanina, S.M., Nesburn, A. B., Wheatley, S. C., Lillycrop, K., Wood, J., Latchman, D. S., Patel, K., y Wechsler, S. L. (1990). Activity of herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript (LAT) promoter in neuron-derived cells: evidence for neuron specificity and for a large LAT transcript. *J. Virol.* **64**,5019–5028