



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

“Los virus fowlpox como vectores virales para el desarrollo de vacunas de nueva generación”

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica

Lic. Carlos Rodolfo Federico

Directora: Dra. Gabriela Calamante

Directora Asistente: Dra. Flavia Adriana Zanetti

Consejero de estudios: Dr. Luis Alberto Scolaro

Lugar de trabajo: Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA Castelar

Buenos Aires, 2018

“Los virus fowlpox como vectores virales para el desarrollo de vacunas de nueva generación”

RESUMEN

La enfermedad de Gumboro, causada por el virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa (IBDV), es una enfermedad aguda, altamente contagiosa y de distribución mundial que afecta a pollos jóvenes. IBDV produce depleción de los linfocitos B que maduran en la bolsa de Fabricio (BF) por lo cual ocasiona atrofia de dicho órgano e inmunosupresión; y, de acuerdo a la cepa viral, una alta mortalidad en pollos jóvenes.

En este trabajo de tesis se implementó la metodología de obtención de virus fowlpox recombinantes (FWPVr) y se obtuvo un inmunógeno basado en FWPVr que expresa como antígeno de interés la proteína VP2 de IBDV, principal antígeno viral inductor de respuestas inmunes protectoras.

En primer lugar, se diseñó y construyó un vector de transferencia que permite obtener FWPVr por intercambio alélico con el gen *fp9.030*, como sitio blanco de inserción. Con este vector se obtuvieron los virus recombinantes FW-VP2 que portan y expresan la secuencia codificante de la proteína VP2. Mediante la evaluación de curvas de crecimiento viral *in vitro* se demostró que la inserción de genes foráneos interrumpiendo el gen *fp9.030* no afecta la capacidad replicativa del virus recombinante.

Posteriormente, se evaluó la protección conferida por una única inmunización con FW-VP2 por vía subcutánea o por vía intramuscular en pollos SPF (certificados como libres de patógenos específicos). Se observó que la aplicación de una dosis de FW-VP2 por vía subcutánea fue suficiente para reducir significativamente la atrofia de la BF detectándose sólo daños histopatológicos leves. Por otro lado, una única dosis de FW-VP2 aplicada por vía intramuscular indujo protección frente al desafío con IBDV ya que se observó una reducción significativa del título del virus de desafío presente en las BF y un daño histopatológico leve a moderado en dicho órgano. Luego, el candidato vacunal FW-VP2 se evaluó en esquemas de inmunización de dosis múltiples. El esquema de vacunación de dos dosis con FW-VP2 redujo significativamente la atrofia de la BF (evaluada por el índice bursal y el daño histopatológico) y el título de IBDV en la BF. La aplicación de una tercera inmunización aumentó significativamente la

cantidad de anticuerpos anti-VP2 circulantes pero no mejoró los parámetros de protección inducidos con dos inmunizaciones.

Finalmente, se confirmó que las inmunizaciones con FW-VP2 inducen una potente respuesta anti-vector que impiden la formación de las lesiones nodulares características de las vacunas de FWPV (“toma de la vacuna”) y, subsecuentemente, el efecto de aplicación de las dosis de refuerzo (*booster*).

En conjunto, los resultados demuestran que se implementó exitosamente la metodología de obtención de FWPV recombinantes y se confirmó que los virus FW-VP2 inducen protección frente al desafío con una cepa de virulencia intermedia de IBDV. A futuro, se evaluará la protección inducida por el candidato vacunal FW-VP2 frente a aislamientos de campo de IBDV y FWPV, con el propósito de desarrollar una vacuna bivalente para el sector avícola.

Palabras claves: Vector viral; poxvirus; fowlpox; vacuna veterinaria; IBDV; enfermedad de Gumboro.

“Fowlpox viruses as viral vectors for the development of next generation vaccines”

ABSTRACT

Gumboro’s disease, caused by infectious bursal disease virus (IBDV), is an acute, highly contagious disease with worldwide distribution that affects young chickens. IBDV produces depletion of B lymphocytes that mature in the bursa of Fabricius (BF), causing atrophy of this organ and immunosuppression; and, according to the viral strain, a high mortality in young chickens.

In this thesis, the methodology for obtaining recombinant fowlpox virus (FWPVr) was implemented and an immunogen based on FWPVr expressing VP2 protein of IBDV, the main viral antigen that induces protective immune responses, was obtained.

First, a transfer vector to obtain FWPVr by allelic exchange with the *fp9.030* gene (target insertion site) was designed and constructed. With this vector, the recombinant FW-VP2 viruses carrying and expressing the coding sequence of VP2 protein were obtained. Through the evaluation of viral growth curves *in vitro*, it was demonstrated that the insertion of foreign genes interrupting the *fp9.030* gene does not affect the replicative capacity of the recombinant virus.

Subsequently, the protection conferred by a single immunization with FW-VP2 was evaluated by subcutaneous or intramuscular injection in specific pathogen-free chickens. It was observed that the application of a subcutaneous dose of FW-VP2 was enough to significantly reduce the atrophy of the BF because only mild histopathological lesions were detected. On the other hand, a single intramuscular dose of FW-VP2 induced protection against the challenge with IBDV since it was observed both a significant reduction of the challenge virus titer in BF and mild to moderate histopathological lesions in this organ. Then, the vaccine candidate FW-VP2 was evaluated in multiple dose immunization schemes. The two-dose vaccination scheme with FW-VP2 significantly reduced BF atrophy (assessed by bursal index and histopathological lesions) and the IBDV titer in BF. The application of a third immunization significantly increased the amount of circulating anti-VP2 antibodies but did not improve the protection parameters induced with two immunizations.

Finally, it was confirmed that immunizations with FW-VP2 induce a potent anti-vector response that prevents the formation of the nodular lesions characteristic of the FWPV vaccines ("vaccine takes") and, subsequently, the effect of application of the booster dose.

Overall, the results show that the methodology for obtaining recombinant FWPVs was successfully implemented and it was confirmed that FW-VP2 viruses induce protection against challenge with a strain of IBDV with intermediate virulence. In the future, the protection induced by the vaccine candidate FW-VP2 will be evaluated against IBDV and FWPV field strains, with the purpose of developing a bivalent vaccine for the poultry industry.

Keywords: Viral vector; poxvirus; fowlpox; veterinary vaccine; IBDV; Gumboro's disease.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y al Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA Castelar por proporcionar los medios apropiados para el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

A la Dra. Gabriela Calamante por permitirme trabajar en su laboratorio y dirigir este trabajo de tesis en todas sus etapas.

A la Dra. Flavia Zanetti por codirigirme, por guiarme en el trabajo de mesada, por su aliento y contención.

A mis compañeras y compañeros del grupo de virus y de todo el IB- INTA por ayudarme, escucharme, contenerme, aconsejarme y por compartir conmigo tantos momentos durante 5 años.

A mi consejero de estudios el Dr. Luis Alberto Scolaro porque siempre que lo necesite estuvo para ayudarme y guiarme.

A Silvio Diaz por ayudarme de forma incondicional en todos mis ensayos con animales.

Al Dr. Fernando Delgado y su equipo por haber realizado el análisis histopatológico de todas las bolsas de Fabricio.

A todo el equipo de Cultivo de Tejidos del Instituto de Virología por preparar cada semana los cultivos de FEP y siempre recibirme con buena onda. En especial al Dr. Osvaldo Zabal por las risas compartidas y su ayuda incondicional

A cada uno de los animales que dieron su vida para poder llevar a cabo este trabajo de tesis.

A Marian, mi compañera de vida, por aconsejarme, guiarme, bancarme y ayudarme de forma incondicional. Siempre vas a ser una persona importante en mi vida. Te amo!!!!

A mi fiel compañera Urki, porque aunque ya no está siento que me sigue cuidando y a las “si mama” con quienes comparto y disfruto cada día.

A mis abuelos José Federico, Adelina Barciela, Antonio Wikarczuk y Hada Denisiuk que aunque ya no están conmigo fueron personas muy importantes en mi vida que me ayudan y me guían hasta el día de hoy.

A mis hermanas Veroniki y Paolita por todas las cosas que vivimos y vamos a seguir viviendo juntos, porque siempre van a ser mis hermanas las quiero muchísimo.

A mi tío Ale por su ayuda en todas las etapas académicas de mi vida y por tantas locuras compartidas.

Por último, quiero agradecerles muy especialmente a mis viejos Anita y Rodo porque simplemente sin ellos yo no sería nadie. Gracias por todo lo que me dieron y me siguen dando en la vida, aunque no existen palabras que puedan expresar todo lo que los quiero.

Gracias a todas las personas que me ayudaron a ser quien soy.

**“Con la rodilla en el suelo no se puede ser libre,
levantando una copa vacía pido en silencio
que todos mis destinos acepten al que hay en mi,
y así pueda respirar”**

Eddie Vedder

ABREVIATURAS Y SIGLAS

aa: aminoácidos
ADN: ácido desoxirribonucleico
ADNc: ADN copia
AIV: virus de influenza aviar (*Avian influenza virus*)
APS: persulfato de amonio
APV: avipoxvirus
ARN: ácido ribonucleico
ARNm: ARN mensajero
ATP: adenosintrifosfato
BF: bolsa de Fabricio
CICUAE: Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación
CICVyA: Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas
CNPV: virus canarypox
DICT₅₀: dosis infectiva en cultivo de tejidos 50%
DIVA: diferenciación de animales infectados de vacunados (*differentiation of infected from vaccinated animals*)
dpi: días post infección
EDTA: ácido etilendiaminotetracético
EEV: virión extracelular envuelto (*extracellular enveloped virion*)
F: proteína de fusión
FEP: fibroblastos de embrión de pollo
FWPV: virus fowlpox
FWPvR: virus fowlpox recombinante
gB: glicoproteína B
GUS: enzima marcadora β -glucuronidasa bacteriana
H: hora/s
HA: hemaglutinina
HN: hemaglutinina-neuraminidasa
HVT: virus herpes de pavo (*herpesvirus of turkeys*)
i.m.: intramuscular
IBD: enfermedad infecciosa de la bolsa (*Infectious bursal disease*)
IBDV: virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa (*Infectious bursal disease virus*)
ICTV: Comité Internacional de Taxonomía de Virus (*International Committee on Taxonomy of Viruses*)
IEV: virión intracelular envuelto (*intracellular enveloped virion*)
ILTV: virus de la laringotraqueitis infecciosa (*infectious laryngotracheitis virus*)
IMV: virión intracelular maduro (*intracellular mature virion*)
INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
IPTG: isopropil-1-tio- β -D-galactósido
ITR: región terminal invertida (*inverted terminal repeat*)
kDa: kilo Daltons
kpb: kilo pares de bases

LTRs: repeticiones terminales largas (*long terminal repeats*)
MDV: virus de la enfermedad de Marek (*Marek's disease virus*)
min: minutos
mL: mililitro
MOI: multiplicidad de infección
MVA: virus vaccinia Ankara modificado (*modified vaccinia virus Ankara*)
NA: neuraminidasa
NDV: virus de la enfermedad de Newcastle (*Newcastle disease virus*)
ng: nanógramo/s
nm: nanómetro/s
NP: nucleoproteína
NYVAC: virus vaccinia atenuado por deleción dirigida de 18 ORFs
ORF: marco de lectura abierto (*open reading frame*)
pb: pares de bases
PBS: *buffer* fosfato salino
PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*polimerase chain reaction*)
RdRp: ARN polimerasa-ARN dependiente
REV: virus de la retículoendoteliosis (*reticuloendotheliosis virus*)
rpm: revoluciones por minuto
s.c.: subcutánea
SAP: fosfatasa alcalina de camarón
SCM: sitio de clonado múltiple
SDS: dodecil sulfato de sodio
SENASA: Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria
SFB: suero fetal bovino
SPF: libres de patógenos específicos
T: secuencias terminadoras de la transcripción de poxvirus.
Tf: temperatura de fusión
TK: timidina quinasa
UFP: unidades formadoras de placas de lisis
uid A: gen que codifica para la enzima β -glucuronidasa bacteriana
VP2: proteína de cápside VP2 madura de IBDV
VP2-VP4-VP3: poliproteína de IBDV
VT: vector de transferencia
VV: virus vaccinia
vvIBDV: cepa hipervirulenta del virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa
X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido
X-Gluc: ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónico
 μ g: microgramos
 μ L: microlitros

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
AGRADECIMIENTOS	5
ABREVIATURAS Y SIGLAS	7
INTRODUCCIÓN	12
1. Los poxvirus.....	13
2. El género avipoxvirus.....	14
2.1 Clasificación, genoma y estructura	14
2.2 Ciclo de replicación.....	15
2.3 Enfermedad causada por APV	18
3. Vacunas vectorizadas por poxvirus recombinantes.....	20
4. El virus fowlpox y su uso como vacuna vectorizada	24
5. El virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa.....	29
6. La enfermedad infecciosa de la bolsa	31
7. Control y prevención de la enfermedad causada por IBDV	33
7.1 Vacunas convencionales	34
7.2 Vacunas de nueva generación	36
7.2.1 Vacunas de complejos inmunes.....	36
7.2.2 Vacunas a subunidad.....	37
7.2.3 Vacunas génicas	37
7.2.4 Vacunas basadas en vectores virales	38
HIPÓTESIS	40
OBJETIVO GENERAL	40
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
MATERIALES Y MÉTODOS	41
1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	42
2. Cultivos primarios de fibroblastos de embrión de pollo	42
3. Animales	42
4. Virus.....	43
5. Plásmidos	43
6. Oligonucleótidos iniciadores o <i>primers</i>	43

7. Metodología de ADN recombinante	44
7.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	44
7.2 Electroforesis en geles para separar fragmentos de ADN	45
7.2.1 Electroforesis en geles de agarosa	45
7.2.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes	45
7.3 Purificación de ADN a partir de geles.....	46
7.4 Digestión con enzimas de restricción	46
7.5 Ligación molecular.....	46
7.6 Transformación de bacterias	46
7.7 Purificación de ADN plasmídico	47
7.7.1 Purificación rápida para el análisis de clones recombinantes	47
7.7.2 Preparación de ADN plasmídico de alta calidad	47
8. Secuenciación de ADN	48
9. Técnicas para la obtención de FWPV recombinantes	48
9.1 Amplificación de los <i>stocks</i> de FWPV.....	49
9.2 Titulación de los <i>stocks</i> de FWPV	49
9.3 Transfección transitoria de FEP infectados con FWPV	49
9.4 Transfección estable de FEP infectados con FWPV	50
9.5 Aislamiento de los FWPVr por clonado de partículas infectivas bajo agar	51
10. Técnicas para la caracterización molecular de los FWPVr	51
10.1 Obtención de ADN viral	51
10.2 Obtención de ADN copia (ADNc) por transcripción reversa	52
10.3 Detección de la proteína VP2 mediante <i>Western blot</i>	53
10.3.1 Obtención y preparación de las muestras	53
10.3.2 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida	54
10.3.3 Electrotransferencia.....	54
10.3.4 Detección inmunológica de las proteínas por <i>Western blot</i>	55
10.4 Curva de crecimiento de múltiples pasos	55
11. Evaluación de las lesiones nodulares (“toma de la vacuna”) generadas por la vacunación con FWPV en la membrana del ala.....	56
12. Metodologías utilizadas para los ensayos de eficacia de los vectores virales que expresan la proteína VP2 de IBDV	56
12.1 Inmunógenos	56
12.2 Diseños experimentales.....	57
12.2.1 Esquema de vacunación con una sola dosis de FW-VP2 por vía s.c. en el ala	57

12.2.2 Esquema de vacunación con una sola dosis de FW-VP2 por vía i.m.....	57
12.2.3 Esquema de vacunación con dosis múltiples de FW-VP2	57
12.3 Evaluación de la respuesta inmune humoral anti-IBDV por ELISA	57
12.4 Infección experimental con IBDV	58
12.5 Determinación del índice bursal.....	58
12.6 Toma de muestras de BF, titulación de IBDV y análisis histopatológico.....	58
12.6.1 Titulación de IBDV presente en las bolsas de Fabricio de las aves desafiadas	59
12.6.2 Análisis histopatológico de BF.....	59
13. Evaluación del efecto de la respuesta inmune anti-FWPV sobre la “toma de la vacuna” de viruela aviar.....	60
14. Análisis estadístico.....	61
RESULTADOS	62
1. Diseño y construcción del vector de transferencia VT-F030-VP2.....	63
2. Obtención y caracterización del virus recombinante FW-VP2	71
3. Evaluación de la capacidad inmunogénica de FW-VP2.....	77
3.1 Evaluación de la protección conferida por la administración de una única dosis de FW-VP2 por vía subcutánea.....	78
3.2 Evaluación de la protección conferida por la administración de una única dosis de FW-VP2 por vía intramuscular.....	80
3.3 Evaluación de la protección conferida por FW-VP2 aplicado en esquema de dosis múltiples.....	81
DISCUSIÓN	82
CONCLUSIONES	82
BIBLIOGRAFÍA	82
ANEXO 1	82

Introducción



INTRODUCCIÓN

1. Los poxvirus

Los poxvirus pertenecen a la familia *Poxviridae*, que comprende a un grupo de virus que replican en el citoplasma de las células eucariotas infectadas. Son virus envueltos y poseen la capacidad de producir viriones complejos, de gran tamaño, que contienen en su interior enzimas involucradas en la síntesis de los ARN mensajeros (ARNm) virales tempranos. El genoma de los poxvirus está formado por una molécula de ADN de doble cadena lineal cuyo tamaño varía de 130 a 300 kpb (Fenner, 1996).

El Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) divide a la familia *Poxviridae*, en dos subfamilias denominadas *Chordopoxvirinae* y *Entomopoxvirinae* según su capacidad de infectar vertebrados o invertebrados, respectivamente. A su vez, la subfamilia *Chordopoxvirinae* está formada por diez géneros denominados *Avipoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Cervidpoxvirus*, *Crocodylidpoxvirus*, *Leporipoxvirus*, *Molluscipoxvirus*, *Orthopoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Suipoxvirus* y *Yatapoxvirus*; mientras que la subfamilia *Entomopoxvirinae* se encuentra dividida en 3 géneros *Alphaentomopoxvirus*, *Betaentomopoxvirus* y *Gammaentomopoxvirus* (Figura 1). Los miembros de cada género poseen una morfología similar y se encuentran relacionados genética y antigénicamente (Moss, 1996 b).

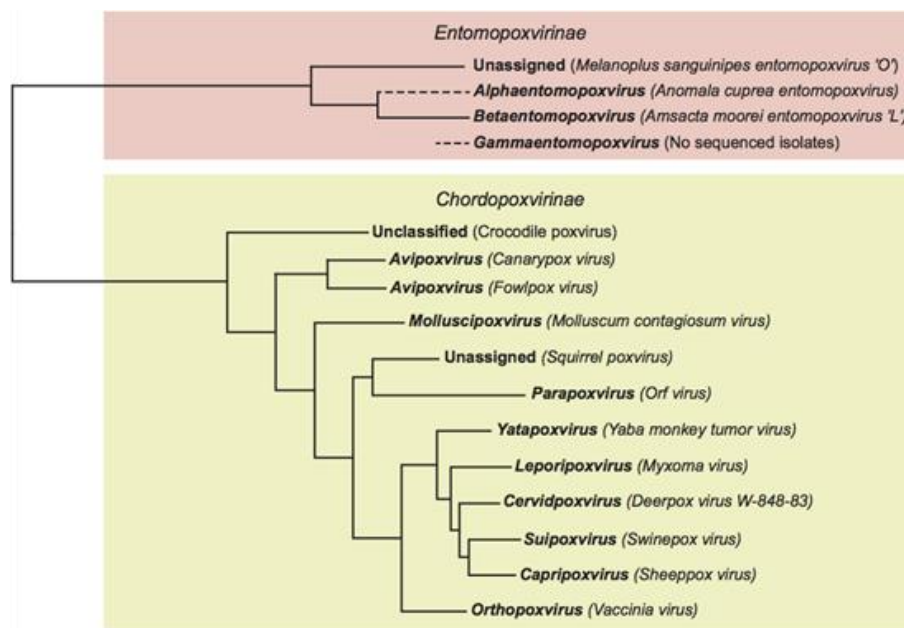


Figura 1. Árbol taxonómico de la familia *Poxviridae*. Extraído de: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna_viruses/75/poxviridae-figures.

2. El género avipoxvirus

2.1 Clasificación, genoma y estructura

Los avipoxvirus (APV) son patógenos que infectan productivamente a las aves. El rango de hospedadores de los APV parecería ser amplio, aunque la información detallada es limitada y complicada debido a la existencia de numerosas especies de aves que potencialmente pueden ser infectadas. Los APV se nombran según la especie de aves de la cual fueron aislados y caracterizados (Tripathy y col., 2000). Las infecciones por APV se reportaron en más de 232 especies, en 23 órdenes de aves (Bolte y col., 1999). Sin embargo, según el ICTV actualmente sólo diez especies pertenecen a dicho género (Tabla 1).

Especie	Hospedador
<i>Canarypox</i>	Canario (<i>Serinus canarius</i>)
★ <i>Fowlpox</i>	Gallina (<i>Gallus gallus</i>)
<i>Juncopox</i>	Junco ojioscuro (<i>Junco hyemalis</i>)
<i>Mynahpox</i>	Miná sagrado (<i>Gracula religiosa</i>)
<i>Pigeonpox</i>	Paloma (<i>Palumbus palumbus</i>)
<i>Psittacinepox</i>	Loro (<i>Amazona finschi</i>)
<i>Quailpox</i>	Codorniz (<i>Callipepla squamata</i>)
<i>Sparrowpox</i>	Gorriones (<i>Passer domesticus</i>)
<i>Starlingpox</i>	Estornino (<i>Cosmopsarus regius</i>)
<i>Turkeypox</i>	Pavo (<i>Meleagris gallopavo</i>)

Tabla 1. Miembros del género avipoxvirus y sus respectivos hospedadores.

★ Miembro prototipo del género.

El tamaño del genoma de los AVP varía entre 260-365 kpb, con un bajo contenido de C+G (30 a 40%). En particular, los genomas de los virus fowlpox (FWPV; cepa patogénica Iowa y cepa atenuada FP9) y canarypox (CNPV; cepa patogénica Wheatley C93) están completamente secuenciados y poseen 289, 266 y 360 kpb respectivamente (Afonso y col., 2000; Laidlaw y Skinner, 2004; Tulman y col., 2004).

La región central del genoma se encuentra flanqueada por dos repeticiones terminales invertidas (*inverted terminal repeat*, ITR) que son idénticas pero orientadas en forma opuesta y, además, están unidas covalentemente formando una horquilla (Figura 2) (Afonso y col., 2000; Tulman y col., 2004). La región central contiene aproximadamente 90-106 genes conservados entre todos los poxvirus que están implicados en mecanismos básicos de replicación del ADN viral, la transcripción viral y

la modificación del ARN, la expresión de proteínas responsables de la estructura y el ensamblaje de viriones (Tulman y col., 2004). En cambio, los extremos terminales del genoma son más divergentes entre los distintos miembros del género, especie o cepas de virus. Estos genes son en su mayoría no esenciales para la replicación viral *in vitro* y codifican para proteínas relacionadas con el rango de hospedadores, la virulencia o la interacción con el sistema inmune del hospedador (Afonso y col., 2000; Tulman y col., 2004; Gubser y col., 2004).

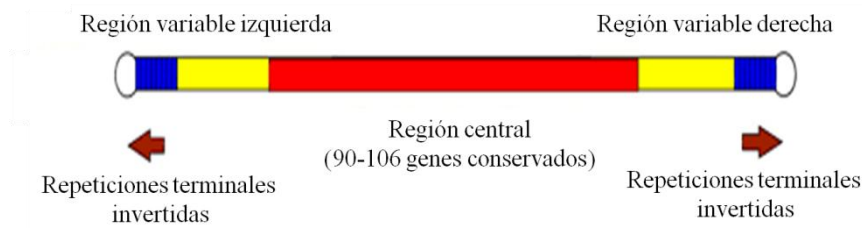


Figura 2. Representación esquemática del genoma de los poxvirus.

Las partículas poxvirales poseen forma oval y presentan un tamaño aproximado de 330 x 280 x 200 nm. La capa externa está compuesta por túbulos que se disponen de forma aleatoria (Figura 3A). El virión consiste en un *core* o nucleoide bicóncavo centrado y dos cuerpos laterales (Figura 3B y C) (Tripathy y Reed, 2013).

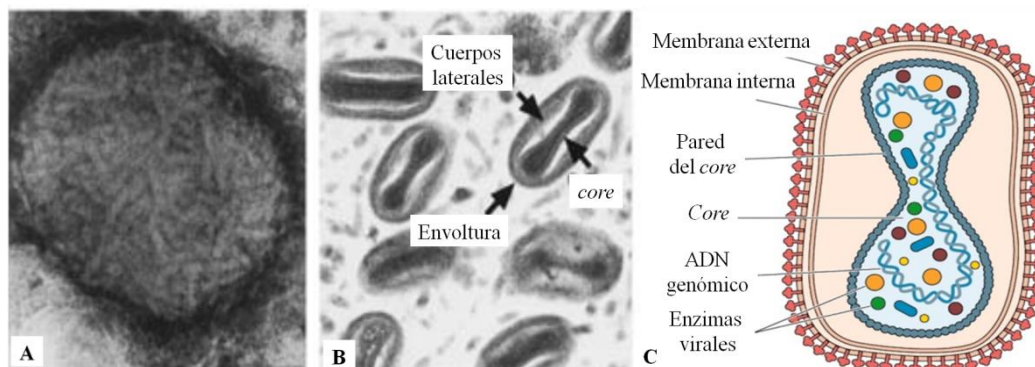


Figura 3. Poxvirus: partícula viral. A) Tinción negativa de FWPV. **B)** Corte ultrafino de una lesión cutánea causada de forma natural por un poxvirus, donde se observa la morfología típica de los mismos y sus principales estructuras (Tripathy y Reed, 2013). **C)** Representación esquemática del virión de poxvirus (Harrison y col., 2004).

2.2 Ciclo de replicación

La entrada y la salida celular de los APV es compleja debido a la existencia de al menos dos formas de virus que pueden infectar productivamente las células: los viriones intracelulares maduros (*intracellular mature virions*, IMV) y los viriones extracelulares

envueltos (*extracellular enveloped virion*, EEV) (Figura 4). Estas dos formas están rodeadas por diferentes membranas lipídicas y proteínas de superficie que aún no han sido completamente caracterizadas (Weli y Tryland, 2011).

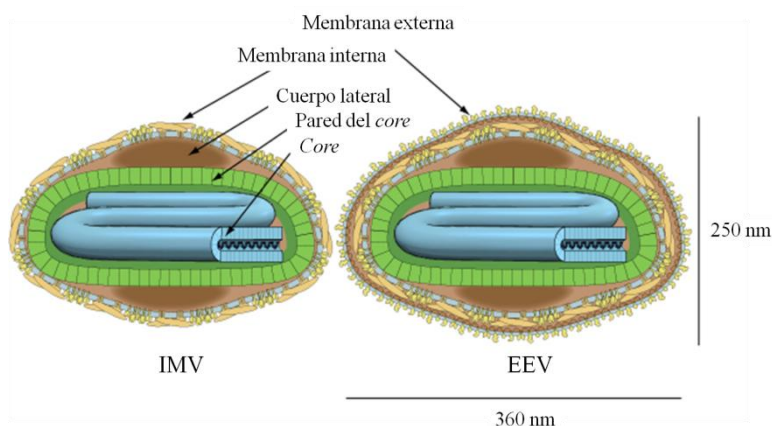


Figura 4. Representación esquemática de los viriones IMV y EEV.

Extraído de: https://viralzone.expasy.org/149?outline=all_by_species

Brevemente, la expresión genética viral se divide en 3 etapas: temprana, intermedia y tardía. En la etapa temprana, el aparato transcripcional empaquetado dentro del *core* de las partículas permite la síntesis de ARNm virales (Kates y McAuslan 1967; Munyon y col., 1967; Kates y Beeson 1970; Wei y Moss 1975). La transcripción de los genes intermedios y tardíos ocurre en el citoplasma de la célula sólo después de la replicación del ADN viral.

El ciclo de replicación (Figura 5) comienza con la unión del virus a la membrana celular (etapa de fusión) y da como resultado la liberación del *core* del virión en el citoplasma de la célula infectada (Boulanger y col., 2000). El *core* liberado, contiene la ARN polimerasa viral y los factores de transcripción necesarios para iniciar las primeras rondas de transcripción de genes virales bajo el control de promotores tempranos. En el *core* se transcriben y traducen los genes tempranos los cuales codifican para una amplia variedad de proteínas, incluyendo factores de crecimiento, moléculas involucradas en la evasión de la respuesta inmune, enzimas y factores para la replicación del ADN y para la transcripción intermedia y tardía (Flint y col., 2003). Luego de su síntesis son extruidos, a través de los poros presentes en la superficie del *core*, hacia el citoplasma de la célula infectada (Kates y McAuslan 1967; Munyon y col., 1967). Posteriormente ocurre la etapa de desnudamiento del *core*, en la cual se libera el ADN viral en el citoplasma, donde sirve como precursor de la replicación y molde para la transcripción

de los genes virales intermedios. Estos factores desencadenan la transcripción y posterior traducción de los genes tardíos los cuales codifican principalmente para proteínas estructurales, enzimas y factores tempranos de la transcripción (Flint y col., 2003). A medida que se acumula un producto génico viral tardío, el virus experimenta ensamblaje y morfogénesis de partículas virales infecciosas. Durante la morfogénesis, los APV inducen la formación de cuerpos de inclusión en el citoplasma de células infectadas. Estos cuerpos de inclusión, también pueden ser denominados fábricas virales, viroplasmos, o complejos de replicación virales, son sitios de replicación viral activa y de ensamblado de partículas dentro de las células infectadas (Sadasiv y col., 1985).

En estas fábricas virales comienza la formación de las primeras estructuras detectables por microscopía electrónica que dan origen a virus inmaduros no infectivos. Luego de una serie de etapas de maduración se originan los IMV, los cuales representan la mayoría de la progenie infecciosa de cada célula infectada (Boulanger y col., 2000; Sadasiv y col., 1985). Existen tres mecanismos posibles por los cuales los poxvirus son liberados de las células hospedadoras dependiendo de la cepa del virus, el tipo celular y el tiempo posterior a la infección (Weli y col., 2005; Hatano y col., 2001; Weli y col., 2004). Pueden liberarse mediante citólisis, en cuyo caso se libera IMV cuando la célula experimenta lisis como resultado del efecto citopático característico de la etapa avanzada de la infección. Por otro lado, cuando los IMV adquieren una capa de membrana extra al pasar por el *trans* Golgi, pueden luego ser liberados tanto por exocitosis inducida por el virus como por brotación. Al ser liberados por estos dos últimos mecanismos adquieren una capa extra de membrana y forman los EEV. En particular, en los APV se observa principalmente esta última forma de salida (Boulanger y col., 2000; Hatano y col., 2001).

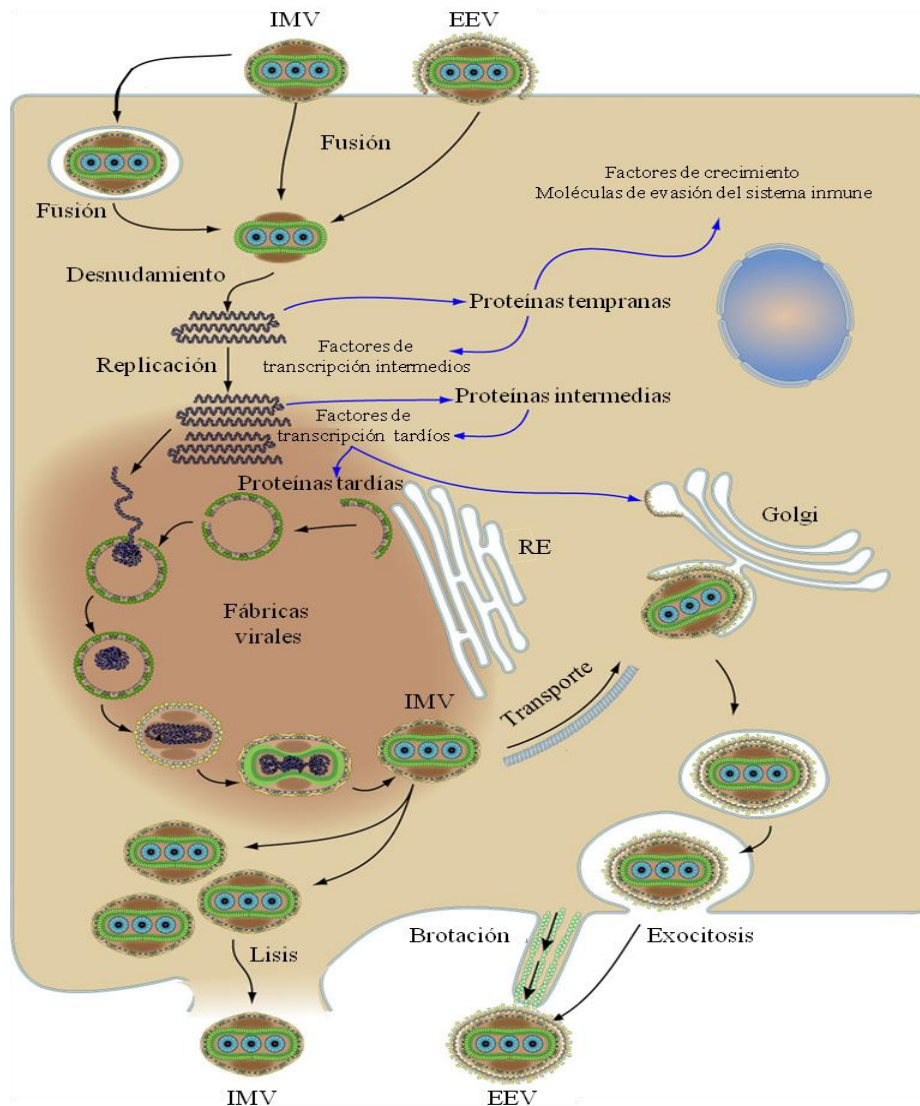


Figura 5. Ciclo de replicación poxviral. Los viriones se adsorben a la célula y se fusionan a la membrana plasmática, liberando los *core* dentro del citoplasma. En los mismos se transcriben y traducen los genes tempranos. Posteriormente, ocurre el desnudamiento y replicación del ADN, al mismo tiempo que se transcriben y traducen los genes intermedios y tardíos. A continuación comienza la formación de los viriones los cuales maduran y se convierten en IMV, los mismos pueden ser liberados mediante lisis celular o pueden adquirir una envoltura en su paso por las membranas del Golgi y la fusión de estos viriones con la membrana plasmática resulta en la liberación de los EEV. Extraído de <https://viralzone.expasy.org/4399>.

2.3 Enfermedad causada por APV

Los APV son los agentes causales de enfermedad en una gran variedad de especies aviares salvajes y domésticas asociadas con niveles significativos de morbilidad y mortalidad. La enfermedad natural causada por los APV va desde una leve lesión cutánea en áreas sin plumaje, hasta una enfermedad severa y de alta mortalidad asociada con la enfermedad cutánea y diftérica. En particular, una alta tasa de mortalidad (80-100%) se registra en los brotes que afectan a palomas, codornices y canarios.

La transmisión de los APV puede ser de manera mecánica mediante la picadura de insectos como los ácaros (*D. gallinae*) (Shirinov y col., 1972) o mosquitos (Boyle, 2007), a través de aerosoles generados a partir de aves infectadas o por la ingestión de agua o alimentos contaminados (Tripathy y Reed, 2013).

El FWPV es el agente causal de la viruela aviar, una enfermedad de distribución mundial cuya incidencia es variable en diferentes áreas debido a las variaciones climáticas, de manejo e higiene, o a la práctica de vacunación regular. La enfermedad puede originar una disminución de la puesta de huevos o un retraso en el crecimiento de los pollos más jóvenes (Manual OIE, 2016). Es una enfermedad de dispersión lenta, posee un período de incubación que varía de 4 a 10 días, y el cuadro clínico puede presentarse de forma cutánea o seca y/o de forma diftérica o húmeda (Tripathy y Reed, 2013).



Figura 6. Lesiones causadas por FWPV en pollos de campo. A) Lesión cutánea en la cresta del pollo. **B)** Lesión diftérica en la boca del ave (Tripathy y Reed, 2013).

La forma cutánea se caracteriza por la aparición de lesiones proliferativas, que varían de pequeños nódulos a alteraciones rugosas (como verrugas) sobre la piel de la cresta, párpados y otras áreas sin plumas (Figura 6A). La forma diftérica, se caracteriza por la aparición de nódulos blancos opacos, ligeramente elevados, cuyo tamaño aumenta con rapidez hasta formar una membrana diftérica amarillenta (Figura 6B). Estos nódulos se desarrollan en las mucosas de la boca, esófago, laringe y/o tráquea. La tasa de mortalidad es mayor en la forma diftérica que en la cutánea, sobre todo en las aves jóvenes (Manual OIE, 2016).

A pesar de la variedad de hospedadores y cepas de virus, la patología asociada sigue siendo la misma, aunque los signos clínicos varían dependiendo de la virulencia del virus, la susceptibilidad del hospedador, la distribución y el tipo de lesiones (Tripathy y Reed 2013). Las cepas atenuadas producen lesiones localizadas leves. En cambio, las

cepas patógenas producen, además, lesiones secundarias que pueden persistir durante varias semanas (Tripathy y col., 1974).

La mayoría de los aislamientos de FWPV contienen secuencias idénticas o prácticamente idénticas al virus de la retículoendoteliosis (REV), un retrovirus aviar (Hertig y col., 1997). Sin embargo, existe una gran variación en cuanto a la longitud de la inserción del retrovirus, desde casi completa (800 pb) hasta ausente. Las cepas vacunales sólo conservan las regiones repetidas terminales largas (*long terminal repeats*, LTRs) de aproximadamente 200 pb, (Laidlaw y Skinner 2004). La presencia del provirus REV en las cepas de FWPV aumenta la inmunosupresión en las aves infectadas, causando un cuadro clínico más severo (Hertig y col., 1997; Singh y col., 2005; Davidson y col., 2008).

Como en la mayoría de las infecciones virales, no hay un tratamiento específico para la enfermedad causadas por APV en las aves. Los tratamientos disponibles incluyen la aplicación de iodo-glicerina en las lesiones proliferantes de la piel y la administración de vitamina A para ayudar a la curación, como así también el uso de antibióticos para controlar las infecciones bacterianas secundarias (Weli y Tryland, 2011).

En la industria avícola, el desafío para el control de la viruela aviar es encontrar estrategias eficaces a bajo costo. En este contexto, la profilaxis mediante vacunación es la forma más eficiente para controlar esta enfermedad. Desde 1920 se utilizan vacunas vivas de cepas atenuadas de FWPV o de otros APV similares antigénicamente, como los pigeonpox. Muchas de estas vacunas de FWPV son comercializadas aunque no se conoce públicamente su origen ni el grado de atenuación que poseen (Limbach y Paoletti, 1996). La eficacia de la vacuna dependerá de la cepa utilizada, la presencia de secuencias de REV en su genoma y de la exposición previa del animal a cepas de campo (que pueden interferir con la vacuna). La vacuna contra la viruela aviar se aplica comúnmente mediante punción alar (utilizando una lanceta bifurcada) en pollos de 4 semanas de edad y en aves reproductoras 1 a 2 meses antes que comience la producción de huevos (Tripathy y Reed, 2013).

3. Vacunas vectorizadas por poxvirus recombinantes

La vacunación juega un rol esencial en la medicina veterinaria, proveyendo un abordaje profiláctico para el control de las enfermedades infecciosas. El concepto básico para el diseño de una vacuna es simular en el hospedador la infección con el patógeno o, al

menos, aquellos aspectos de la infección natural importantes para desencadenar los mecanismos destinados a su eliminación, activando la memoria inmunológica.

La mayoría de las vacunas utilizadas en la medicina veterinaria se producen por inactivación mediante tratamientos físicos o químicos del agente patógeno o por atenuación mediante pasajes *in vitro* o *in vivo*. Sin embargo, presentan numerosas desventajas: composición indefinida del antígeno, riesgos de reintroducción de la enfermedad por inactivación incompleta o reversión al fenotipo virulento, reacciones adversas locales ocasionadas por los adyuvantes de la formulación, manipulación de grandes cantidades del patógeno que causa la enfermedad en las plantas de producción, elevados costos debido a la necesidad de cadena de frío y la posibilidad de transmisión de patógenos no detectados (virus, bacterias, priones). A pesar de la extensa cantidad de vacunas veterinarias disponibles, existe la necesidad de disponer de aquellas que mantengan tanto las mejores características de las vacunas a virus muerto o a subunidad (por ej. la seguridad) como las ventajas de las vacunas convencionales a virus vivo (por ej. la eficacia). En este contexto, el diseño racional de nuevas vacunas es fundamental para el control de las enfermedades infecciosas. Los conocimientos derivados de la biología molecular, la ingeniería genética y la inmunología permiten diseñar estrategias para el desarrollo de nuevas vacunas de composición definida, que combinan seguridad y eficacia.

En particular, las vacunas vectorizadas se basan en utilizar un microorganismo vivo no patógeno (a menudo un virus o una bacteria) que tiene la capacidad de transportar y expresar el/los genes que codifican los principales antígenos protectores del patógeno, sin causar enfermedad. La expresión del antígeno “transportado” por el vector induce una respuesta inmune protectora específica contra el patógeno contra el cual está dirigida la vacuna.

Los vectores virales son virus modificados que llevan genes foráneos o secuencias integradas en posiciones que no son esenciales para la replicación viral ni para la infectividad.

El éxito de las vacunas vectorizadas por virus se informó por primera vez en 1984, cuando Wiktor y col. evaluaron al virus vaccinia (Orthopoxvirus) como vector de expresión para la glicoproteína del virus de la rabia. El virus recombinante indujo una inmunidad efectiva y duradera contra la rabia en conejos y ratones (Wiktor y col., 1984). Desde entonces, diversos virus, como por ejemplo los adenovirus, poxvirus,

herpesvirus, alfavirus, virus adeno-asociados, virus del sarampión y el virus de la estomatitis vesicular, han sido utilizados para el desarrollo de vacunas vectorizadas tanto profilácticas como terapéuticas (Robert-Guroff, 2007; Humpreys y Sebastian, 2018).

En la producción de vacunas de nueva generación basadas en poxvirus, inicialmente la mayor atención se enfocó en el virus vaccinia (VV) ya que presenta un amplio rango de hospedadores y su biología molecular fue ampliamente estudiada (Broyles, 2003; Moss, 1996 a, 1996 b, 2006). Sin embargo, ciertos efectos secundarios asociados con la inoculación, sumados al amplio rango de hospedadores, desalentaron la utilización del VV como sistema de expresión para vacunas a virus vivo. Entonces, se desarrollaron cepas del VV altamente atenuadas que poseían un rango de hospedadores más restringido pero que como vectores retenían la capacidad de inducir respuestas inmunes potentes contra antígenos foráneos. Entre ellas, se obtuvo el virus vaccinia Ankara modificado (MVA) como vacuna segura para la viruela, previo a la erradicación de esta enfermedad. Esta cepa, atenuada por más de 500 pasajes en fibroblastos de embrión de pollo (FEP), no puede replicar o replica muy ineficientemente en una variedad de líneas celulares de mamíferos (Carroll y Moss, 1997 a). El fenotipo atenuado de MVA es el resultado de numerosas mutaciones que particularmente afectaron a las proteínas que interactúan con el hospedador (Antoine y col., 1998; Blanchard y col., 1998). Por otro lado, mediante delección dirigida de 18 marcos de lectura abiertos (*open reading frame*, ORF) del genoma viral de la cepa Copenhagen del VV, se desarrolló la cepa NYVAC que resultó ser altamente atenuada cuando se la evaluó en animales de experimentación (Tartaglia y col., 1992).

Los APV no replican productivamente en especies no aviares pero pueden ingresar en las células, expresar antígenos foráneos e inducir una inmunidad protectora (Taylor y col., 1988 b y 1991). Es por este motivo que son considerados como vectores seguros para el desarrollo de vacunas de nueva generación en mamíferos (Limbach y Paoletti, 1996). Sin embargo, cuando se utilizan los FWPV para el desarrollo de vacunas aviares, se recomienda el uso de una cepa atenuada (vacunal) para que no cause enfermedad y, así, reducir el riesgo de la propagación hacia otras aves no vacunadas o hacia el ambiente.

Algunas de las ventajas de la utilización de los poxvirus recombinantes como inmunógenos consisten en (Pastoret y Vanderplasschen, 2003):

- la vacuna obtenida es extremadamente estable y no requiere de una estricta cadena de frío para su transporte, lo cual podría disminuir los costos de campañas de vacunación masivas (Collier, 1955)
- la capacidad para incorporar y expresar eficazmente grandes fragmentos de ADN foráneo o múltiples genes que codifican diversos antígenos o proteínas inmunomoduladoras (Paoletti, 1996).
- la posibilidad de utilización de los promotores identificados y caracterizados derivados del VV que permiten una expresión temprana del antígeno de interés.
- la inducción de respuestas inmunes protectoras de tipo celular debido a la síntesis *de novo* del antígeno de interés y/o humoral de acuerdo al compartimento de destino final (membrana, espacio extracelular) del antígeno foráneo (Hutchings y col., 2005).
- la vacuna es efectiva al ser administrada por diferentes vías.
- la vacuna recombinante expresa un determinado conjunto de antígenos del patógeno permitiendo el diagnóstico diferencial entre animales naturalmente infectados y animales vacunados (vacuna DIVA, del inglés *differentiation of infected from vaccinated animals*).

La principal desventaja de las vacunas vectorizadas por virus es la interferencia originada por la existencia de inmunidad previa contra el vector, que alteraría la *performance* de las vacunaciones. Esta inmunidad pre-existente puede estar originada por el traspaso pasivo de anticuerpos maternos o por vacunaciones previas.

En el caso particular de CNPV, se observó que la inmunidad anti-canarypox no altera la *performance* de las subsecuentes dosis refuerzo (Poulet y col., 2007; Zanetti y col., 2014). Para MVA, se demostró que la aplicación de la dosis de refuerzo aumenta la respuesta inmune específica contra el antígeno foráneo (Cottingham y Carroll, 2013; Ferrer y col., 2011; Zanetti y col., 2012). En cambio, la utilización de las vacunas vectorizadas por FWPV, comercializadas por Ceva, que expresan antígenos para la prevención de la laringotraqueitis infecciosa aviar o para *Mycoplasma gallisepticum*, están recomendadas sólo si las aves no estuvieron expuestas previamente a FWPV.

4. El virus fowlpox y su uso como vacuna vectorizada

A finales de la década de 1980 comenzaron a publicarse los resultados alentadores del uso de VV como vacunas vectorizadas.

La metodología empleada para la obtención de los poxvirus recombinantes se basa en el reemplazo alélico de un gen viral, no esencial para la replicación *in vitro*, por uno o varios genes de interés (Figura 7). El gen de interés se encuentra clonado en un vector de transferencia (VT), río abajo de un promotor poxviral, flanqueado por secuencias genómicas virales que serán el sitio blanco de recombinación con el genoma viral. Dicha construcción plasmídica se transfecta en un cultivo celular previamente infectados con el poxvirus (por ej. FWPV). Dentro de la célula ocurre la recombinación homóloga entre el VT y el genoma viral, produciendo la progenie viral recombinante. Como la recombinación homóloga ocurre en una baja frecuencia (menor al 0,1%) y el genoma viral salvaje (no recombinante) replica eficientemente, se utilizan diferentes estrategias para seleccionar o identificar a la progenie recombinante. Estas estrategias se basan en el uso de genes de resistencia a compuestos químicos (como el gen bacteriano *gpt*) o de genes codificantes para enzimas marcadoras (como los genes bacterianos *lac Z* y *uid A*).

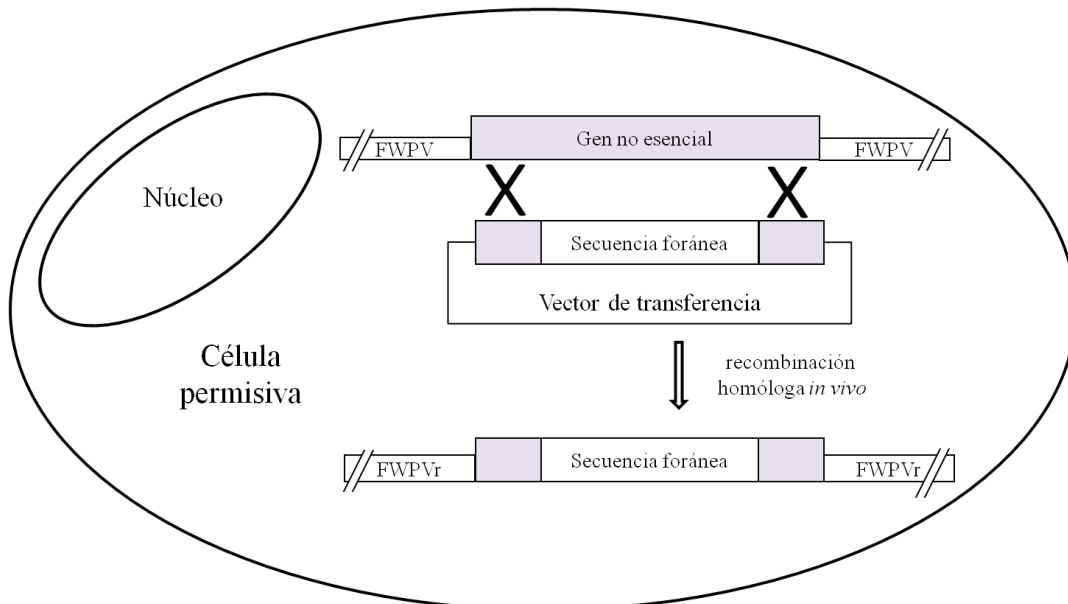


Figura 7. Obtención de FWPV recombinantes. El proceso de recombinación homóloga *in vivo* ocurre en una célula susceptible entre el genoma de FWPV y un vector de transferencia que porta el gen de interés flanqueado por secuencias génicas poxvirales no esenciales para la replicación *in vitro* (gen blanco de inserción). Se origina el FWPV recombinante que porta el gen foráneo integrado establemente en su genoma.

En base a los resultados obtenidos con las vacunas basadas en VV, rápidamente comenzó el desarrollo de FWPV recombinantes (FWPVr) con el propósito de generar nuevas vacunas para la industria avícola. Los FWPVr se diseñaban como vacunas bivalentes: contra la viruela aviar (vector vacunal) y contra otra enfermedad (debido al antígeno foráneo que expresa el FWPVr).

La utilidad de los vectores virales basados en FWPVr como vacunas para aves y mamíferos fue demostrada por primera vez por Taylor y col. en 1988. Este grupo demostró que los FWPVr que expresan la proteína hemaglutinina de una cepa altamente virulenta del virus de influenza aviar (AIV) indujeron protección frente a un desafío letal de AIV en pollos y pavos (Taylor y col., 1988 a). En cuanto al uso de FWPVr como vacuna para mamíferos, el mismo grupo demostró la correcta expresión del gen foráneo (codificante de la glicoproteína del virus de la rabia) tanto en cultivos celulares derivados de especies aviares (permisivas) como no aviares (no permisivas) y observó que la vacunación de ratones, gatos y perros con dicho FWPVr protegió contra el desafío con el virus rábico (Taylor y col., 1988 b).

Desde entonces, algunos de los patógenos virales más importantes que afectan a la industria avícola se convirtieron en los principales blancos para el desarrollo de vacunas basadas en FWPVr. En particular los primeros estudios se dirigieron contra enfermedades causadas por agentes virales como las enfermedades de Newcastle, Marek, Gumboro, Lanrigotraqueitis e Influenza aviar (Tabla 2).

Patógeno blanco	Antígeno	Vía de inoculación	Protección	Referencias
NDV	HN	Intravenosa	100%	Bournsnell y col., 1990.
		Subcutánea	90%	
NDV	F	Ocular	50%	Taylor y col., 1990.
		Oral	90%	
		Intramuscular	100%	
		Subcutánea	100%	
NDV	F y HN	<i>in ovo</i>	100%	Karaca y col., 1998.
ILTV	gB	Subcutánea	100%	Tong y col., 2001.
NDV + ILTV	F y HN (NDV) + gB (ILTV)	Subcutánea	70% (frente a NDV) 100% (frente ILTV)	Sun y col., 2008.
AIV	HA	Subcutánea	100%	Swayne y col., 2000 a.
AIV	HA y NA.	Subcutánea	100%	Qiao y col., 2009.
		Intramuscular	100%	
		Intranasal	0%	
		Ocular	0%	
IBDV	VP2	Subcutánea	95%	Bayliss y col., 1991.
IBDV	VP2-VP4-VP3	Subcutánea	80%	Heine y Boyle, 1993.
MDV	gB	Subcutánea	80 %	Heine y col., 1997.
MDV	Glicoproteínas B, E, I y UL32	Subcutánea	70 %	Lee y col., 2003.

Tabla 2. Vacunas basadas en FWPVr contra enfermedades aviares causadas por agentes virales. Para los ensayos resumidos en esta tabla se utilizaron pollos libres de patógenos específicos (SPF). Las inmunizaciones subcutáneas se realizaron en la membrana de ala mientras que las inmunizaciones intramusculares se realizaron en la pata de los animales. NDV: *Newcastle disease virus*; ILTV: *Infectious laryngotracheitis virus*; AIV: *Avian influenza virus*; IBDV: *Infectious bursal disease virus*; MDV: *Marek's disease virus*; F: proteína de fusión; HN: hemaglutinina-neuraminidasa; gB: glicoproteína B; HA: hemaglutinina; NA: neuraminidasa; VP2: proteína de cápside VP2 madura; VP2-VP4-VP3: poliproteína vial.

Son varios los factores que pueden afectar la efectividad de una vacuna basada en FWPVr. Entre ellos podemos mencionar: el promotor utilizado para expresar el antígenos de interés, el sitio de inserción en el genoma viral, la cepa parental de FWPV, el esquema de inmunización (vía y cantidad de dosis) y el genotipo de los animales de experimentación.

Como se mencionó previamente, los poxvirus replican en el citoplasma de las células infectadas y tienen su propio sistema de transcripción, motivo por el cual se requiere de

la utilización de promotores poxvirales para dirigir la expresión del gen de interés. Estos promotores pueden ser de expresión temprana, intermedia y/o tardía. Los promotores tempranos se expresan antes de la replicación del ADN viral, mientras que los promotores intermedios y tardíos se expresan después de la replicación del ADN (Moss, 1996 b). Con el fin de obtener una alta y prolongada expresión del antígeno de interés, en general se utilizan promotores naturales, modificados o sintéticos de expresión temprana/tardía (Chakrabarti y col., 1997), como los denominados p7.5 y pE/L (Skinner y col., 2005).

En cuanto al sitio de inserción, el gen que codifica para la enzima timidina quinasa (TK) se utilizó para la obtención de VV y MVA recombinantes. Sin embargo, los virus FWPV y CNPV recombinantes obtenidos por inserción de las secuencias de interés interrumpiendo el gen codificante de TK eran inestables, lo cual indica que este gen es requerido para una eficiente replicación de los avipoxvirus *in vitro* y no puede ser utilizado como sitio blanco de inserción (Scheiflinger y col., 1997; Amano y col., 1999). En general, los FWPV recombinantes se obtuvieron por inserción en otras regiones genómicas: río abajo del gen *FPV086* (Heine y Boyle, 1993) y en las regiones terminales del genoma (Boursnell y col., 1990; Taylor y col., 1990; Cottingham y col., 2006). Estudios de caracterización de FWPV indicaron que los genes *FPV030*, *FPV032* y *FPV033* (Laidlaw y col., 1998), *FPV054* y *FPV055* (Binns y col., 1990) y *FPV158* (Srinivasan y col., 2001) no son esenciales para la replicación viral *in vitro* y serían genes candidatos como sitios blanco de inserción para el desarrollo de FWPVr.

Respecto a las cepas parentales utilizadas para la obtención de vacunas aviares basadas en FWPVr se destacan las cepas atenuadas TROVAC y FP9. La cepa TROVAC se obtuvo a partir de sucesivos pasajes en fibroblastos de embrión de pollo de la cepa vacunal FP-1 y se depositó en la *American Type Culture Collection* (ATCC; Número de acceso: VR-2553). Por otro lado, la cepa FP9 se obtuvo a partir de 438 pasajes seriados en células FEP de la cepa salvaje HP-1 de FWPV (Mayr y Malicki, 1966). El genoma completo de la cepa FP9 fue secuenciado y caracterizado por Laidlaw y Skinner (2004). Los autores demostraron que el genoma de FP9, en comparación con el genoma de las cepas patogénicas HP-1 y FPVUS, presenta un menor tamaño, menor cantidad de ORFs, cambios en la secuencia nucleotídica y numerosas inserciones/deleciones, las cuales representan aproximadamente el 8,5% del genoma total, aproximadamente 25 kpb (Afonso y col., 2000; Laidlaw y Skinner, 2004). Asimismo, esta cepa presenta la

ventaja de poseer en su genoma sólo un remanente de secuencias del REV, a diferencia de otras cepas de FWPV que poseen la secuencia de este virus integrada en el genoma, lo cual está asociado a brotes de la enfermedad causada por dicho retrovirus (Hertig y col., 1997).

Otros factores a considerar en la utilización de FWPVr como vacunas aviares son: la vía de inmunización (Qiao y col., 2009), dosis (Boyle y Heine, 1994; Qiao y col., 2006), edad y genética de las aves (Shaw y Davison, 2000; Lee y col., 2004) así como también el estado inmunológico de las mismas. La vacuna convencional de FWPV (cepa viva atenuada) se aplica mediante punción alar o escarificación en la membrana del ala. Con respecto a la vía de inmunización de los FWPVr, varios estudios demostraron que los mejores resultados se obtuvieron por vía subcutánea (tanto en la base del cuello como en la membrana del ala) o por vía intramuscular, mientras que las inmunizaciones por vía ocular u oral resultaron ser poco efectivas (Beard y col., 1992; Boyle y Heine, 1994; Qiao y col., 2009).

En la actualidad existe una gran cantidad de trabajos que demuestran la efectividad de los FWPVr como vacunas vectorizadas (revisado en Sánchez-Sampedro y col., 2015). Actualmente existen FWPVr que se comercializan como vacunas aviares: contra la enfermedad de Newcastle, la laringotraqueitis, la influenza aviar y la enfermedad causada por *Mycoplasma gallisepticum* (Tabla 3).

Patógeno blanco	Nombre comercial	Antígenos	Distribuidor
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	VECTORMUNE® FP MG	Proteínas codificadas por los genes <i>40 k</i> y <i>mgc</i>	Ceva Biomune
ILTV	VECTORMUNE® FP LT	gB y UL-32.	Ceva Biomune
AIV	TROVAC ®AIV H5	HA (subtipo H5)	Merial-Boehringer Ingelheim
NDV	Trovac-NDV®	F y HN	Merial-Boehringer Ingelheim

Tabla 3. Vacunas comerciales basadas en virus FWPVr para la prevención de enfermedades aviares.

5. El virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa

El virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa (IBDV) es el miembro prototipo del género *Avibirnavirus*, dentro de la familia *Birnaviridae* (Leong y col., 2000; Delmas y col., 2004). Como se esquematiza en la figura 8, su genoma está formado por dos segmentos de ARN doble cadena de diferente tamaño (Dobos y col., 1979; Müller y col., 1979 a). El segmento A (3,2 kpb) contiene dos marcos de lectura abiertos parcialmente superpuestos. El primer ORF codifica para la proteína VP5 (145 aa, 17 kDa) (Mundt y col., 1995), mientras que el segundo ORF codifica para una poliproteína de 110 kDa cuya secuencia aminoacídica, desde el extremo amino al carboxilo terminal, contiene al precursor de la proteína viral 2 y a las proteínas 4 y 3 (NH₂-pVP2-VP4-VP3-COOH; Figura 8). La proteína VP4 es una serin-proteasa que mediante su actividad autocatalítica cliva a la poliproteína liberando las proteínas VP3 (32 kDa) y VP4 (28 kDa) y al precursor pVP2 (48 kDa). Este polipéptido es posteriormente procesado en su región carboxi-terminal para formar la proteína VP2 madura, de 441 aminoácidos (37 kDa) (Irigoyen y col., 2009; Lejal y col., 2000).

El segmento B (2,8 kpb) contiene un único ORF que codifica para la proteína VP1 (879 aa, 97 kDa) que es la replicasa viral, con actividad de ARN polimerasa-ARN dependiente (RdRp). Esta enzima, que participa de los procesos de transcripción y replicación del genoma viral (von Einem y col., 2004), está presente en la partícula viral en forma libre o asociada al genoma (VPg).

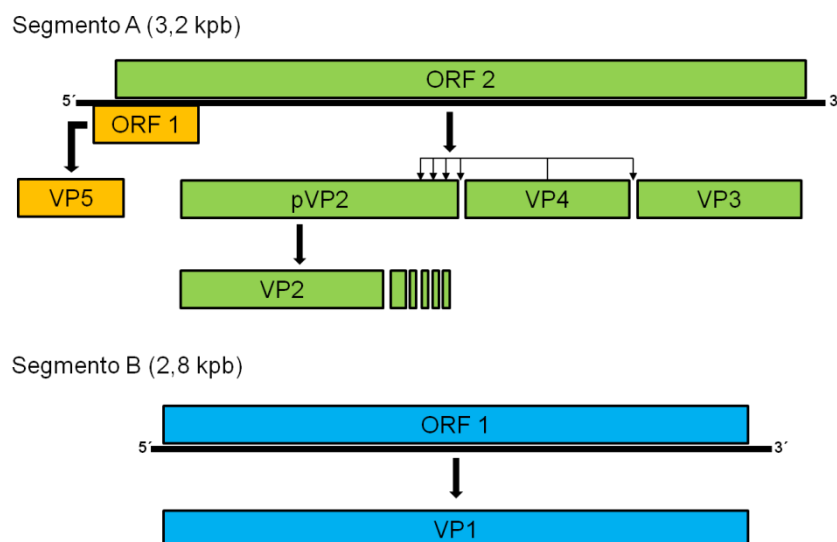


Figura 8. Esquema de la organización del genoma de IBDV. Se muestra el proceso que origina las proteínas virales codificadas en los segmentos genómicos A y B.

Los viriones de IBDV carecen de envoltura lipídica y poseen una cápside proteica de 65-70 nm de diámetro, formada por 260 trímeros de la proteína VP2 dispuestos en una estructura icosaédrica con número de triangulación $T=13$ (Böttcher y col., 1997; Caston y col., 2001; Coulibaly y col., 2005; Saugar y col., 2005) (Figura 9).

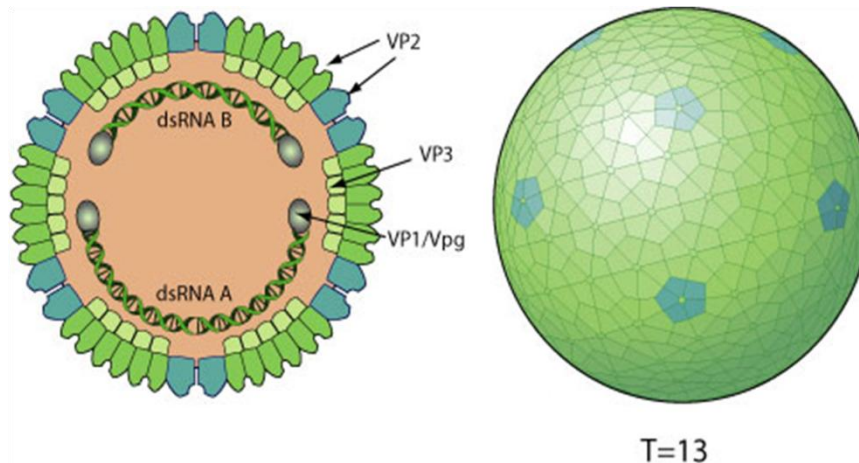


Figura 9. Estructura de IBDV (adaptada de www.expasy.org)

El componente mayoritario de la cápside viral es la proteína VP2. Además, esta proteína contiene los sitios antigénicos responsables contra los cuales está dirigida la producción de anticuerpos neutralizantes en el hospedador (Fahey y col., 1989). Su estructura atómica fue resuelta por cristalografía de rayos X revelando que está organizada en tres dominios claramente diferenciados denominados proyección (*projection*, P), armazón (*shell*, S) y base (*base*, B) (Coulibaly y col., 2005; Garriga y col., 2006; Lee y col., 2006). Los dominios B y S están formados por los extremos conservados N-terminal y C-terminal de VP2. En cambio, el dominio P está formado por la región hipervariable (206 a 350 aa), en la cual se identificaron dos regiones hidrofílicas: la región A (212 a 224 aa) y la región B (314 a 325 aa) (Azad y col., 1987). Estas regiones constituyen dos bucles, P_{BC} y P_{HI} , en la parte más externa del dominio P y fueron descritos como dominios de unión de anticuerpos neutralizantes. Además, se demostró que el patrón antigénico está controlado por unos pocos aminoácidos ubicados en estos bucles (Letzel y col., 2007; Mahgoub 2012). En el dominio P existen otros dos bucles adicionales denominados P_{DE} y P_{FG} , dentro de los cuales los residuos aminoacídicos: glutamina en la posición 253, ácido aspártico en la posición 279 y alanina en la posición 284, están implicados en la virulencia y el tropismo celular (Brandt y col., 2001; van Loon y col., 2002; Letzel y col., 2007).

Existen dos serotipos distintos de IBDV, designados como serotipos 1 y 2 (Etteradossi y Saif, 2013). Los virus pertenecientes al primer serotipo son los únicos que ocasionan signos clínicos, mientras que los del serotipo 2, aislados de pavos y patos, no son virulentos para pollos (McFerran y col., 1980). En la década de 1980 en los Estados Unidos se describió la aparición de nuevas cepas de serotipo 1, las cuales tenían la capacidad de eludir la protección otorgada por las vacunas. Las mismas fueron denominadas “cepas variantes” para diferenciarlas de las “cepas clásicas”, que se habían utilizado como vacunas hasta ese momento (Jackwood y Saif, 1987; van den Berg y col., 2004).

En base a su patogenicidad, el virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa del serotipo 1 se clasifica en tres patotipos: cepas clásicas, cepas variantes y cepas hipervirulentas (Etteradossi y Saif, 2013). Las cepas variantes inducen pocos signos clínicos (aunque pueden causar lesiones severas en la bolsa de Fabricio) y baja mortalidad (menor al 20%), las cepas clásicas pueden causar entre 10 y 50% de mortalidad, mientras que las cepas hipervirulentas (vvIBDV) pueden inducir desde 50% hasta 100% de mortalidad (Manual OIE, 2012).

6. La enfermedad infecciosa de la bolsa

La enfermedad infecciosa de la bolsa (*Infectious bursal disease*, IBD), también conocida como enfermedad de Gumboro, fue descubierta en 1962 por Albert Crosgrove, el cual la llamó “nefrosis aviar” debido al daño extremo que presentaban los riñones de las aves que sucumbieron a la enfermedad (Cosgrove, 1962). El mismo año, Winterfield y Hitchner reconocieron que la nefrosis aviar e IBD eran dos enfermedades diferentes e identificaron al agente causal de la nefrosis aviar como un aislamiento del virus de la bronquitis infecciosa con tendencias nefrotóxicas y al agente causal de IBD lo definieron "agente infeccioso de la bolsa", actualmente conocido como IBDV (Winterfield y Hitchner, 1962; Winterfield y col., 1962).

IBD es una enfermedad aguda, altamente contagiosa y de distribución mundial que afecta a pollos jóvenes. Se transmite de forma horizontal por vía oral, ya sea por contacto directo o a través del virus eliminado en las heces de las aves infectadas. Debido a la gran resistencia que posee IBDV tanto a agentes físicos como químicos, este puede persistir en los ambientes de crianza, incluso después de la limpieza y desinfección, infectando las parvadas subsiguientes (Etteradossi y Saif, 2013). IBDV

tiene tropismo por diferentes células del sistema inmune, en particular por los linfocitos B que expresan IgM en su membrana, es por esto que replica mayoritariamente en la bolsa de Fabricio (BF). Si bien los linfocitos B constituyen el principal blanco del virus, los macrófagos poseen un rol fundamental en la patogénesis viral dado que el virus replica en este tipo celular y se postula que a través de ellos llega al órgano blanco: la bolsa de Fabricio (Müller y col., 1979 b).

La severidad del cuadro clínico de IBD está directamente relacionada con el número de células susceptibles presentes en la BF. Entre la tercera y sexta semana de vida la BF se encuentra en su máximo desarrollo siendo este período el de mayor susceptibilidad a IBDV (van der Berg, 2000).

Mientras que los mecanismos inmunes innatos son completamente funcionales en pollos recién nacidos, las respuestas inmunes adaptativas sólo se desarrollan después de las primeras semanas de vida. Por lo tanto, la transferencia de anticuerpos maternos a través de la yema (inmunidad pasiva) ayuda a proteger a la descendencia hasta que la respuesta inmune adaptativa sea completamente efectiva (Davison y col., 2008). Es así que los anticuerpos maternos específicos anti-IBDV presentan una disminución gradual con un tiempo de vida media de 6 a 7 días (Fahey y col., 1987), pero se estima que la vida media de los anticuerpos maternos en las líneas de pollo de engorde es mucho más corta, aproximadamente 3 días. Esta cifra es utilizada en el diseño de programas de vacunación contra IBD para pollos de engorde (Block y col., 2007).

Sin embargo, bajo condiciones de campo, el patrón de descomposición de anticuerpos maternos específicos anti-IBDV resulta ser complejo de determinar ya que depende en gran medida de los niveles iniciales de estos anticuerpos, los cuales varían entre los distintos establecimientos avícolas e incluso dentro de un mismo establecimiento, motivo por el cual, resulta difícil predecir el momento óptimo para la vacunación (De Wit, 1998; Besseboua y col., 2015; Śmialek y col., 2016). Es por eso, que se realizan evaluaciones de los niveles de anticuerpos de la parvada mediante la técnica de ELISA para estimar el momento óptimo de vacunación. Skeeles y col., 1979 informaron que los títulos deben estar por debajo de 1:64 antes de que los pollos puedan ser vacunados efectivamente con una cepa atenuada de IBDV. En el mismo año Lucio y Hitchner (1979) demostraron que las aves con títulos de anticuerpos maternos por debajo de 1:100 son 100% susceptibles a la infección, y que títulos de 1:100 a 1:600 proporcionan aproximadamente un 40% de protección. Baxendale y Lutticken (1981) indicaron que

las vacunas inactivadas contra IBD en emulsión oleosa pueden estimular la inmunidad materna y proteger a los polluelos durante 4-5 semanas, y que la progenie de los reproductores vacunados con vacunas vivas está protegida solo 1-3 semanas.

Dependiendo de la virulencia del virus, de la edad del ave y del grado de inmunidad que presenta la misma al momento de la infección, la enfermedad de Gumboro puede manifestarse de forma clínica o subclínica. Si el pollo es infectado cuando tiene menos de tres semanas de vida, se produce la atrofia de la BF acompañado de un gran efecto inmunodepresor sin signos clínicos que es conocido como “forma subclínica”, en la cual el ave queda indefensa ante otros agentes patógenos. Sin embargo, si el pollo es infectado después de las tres semanas de vida, generalmente aparece la enfermedad con manifestación de signos clínicos o “forma clínica” (Eterradossi y Saif, 2013).

En esta última forma se diferencian dos fases: la fase aguda la cual puede durar entre 24 h y 4 días post infección (dpi), donde las lesiones observadas son de tipo inflamatorio, y la fase crónica (de los cinco a los diez dpi) caracterizada por lesiones degenerativas. La fase aguda se caracteriza por el rápido desarrollo de la enfermedad, surgimiento súbito de depresión, los animales se muestran anoréxicos, postrados y sin movimiento, con erizamiento de las plumas, diarrea frecuentemente acuosa y blanquecina y en muchos casos, la muerte (Sharma y col., 2000).

La importancia económica de IBD se manifiesta tanto por la mortalidad (diferentes tasas según la cepa viral de IBDV) como por la morbilidad, asociada principalmente a una severa inmunosupresión. Así, las aves infectadas se vuelven muy susceptibles a patógenos oportunistas y, por otro lado, a causa de la enfermedad se ocasionan fallas en la respuesta inmune a otras vacunas (Muller y col., 2003).

7. Control y prevención de la enfermedad causada por IBDV

Desde que se reportó en 1962, la enfermedad de Gumboro constituye un grave problema para la avicultura comercial. Debido a que no existe un tratamiento contra esta enfermedad, las estrictas medidas de bioseguridad y principalmente los programas de vacunación son la base para el control y la prevención de la misma.

Para el diseño de un programa de vacunación efectivo contra la enfermedad de Gumboro se deben tener en cuenta algunos factores tales como: cantidad de virus en el medio ambiente, diversidad antigénica del virus, nivel de inmunidad materna, edad de

las aves, tipo de vacuna y vía de vacunación (Eterradossi y Saif, 2013). Además, en un programa de vacunación efectivo contra la enfermedad de Gumboro se debe procurar:

- Asegurar la protección continua de las aves contra la infección por IBDV desde el nacimiento hasta su destino final.
- Si la prevención de la infección no es posible, entonces los pollos deberían al menos estar protegidos contra las consecuencias clínicas de la infección.
- Prevenir o reducir significativamente la cantidad de excreción viral de las aves infectadas.
- Prevenir la evolución del IBDV hacia un virus que pueda escapar al programa de protección. (Gardín y col., 2014)

En la actualidad existen distintos tipos de vacunas contra IBDV, las convencionales basadas en virus vivo atenuado o inactivado y las vacunas de nueva generación. Dentro de las vacunas de nueva generación, se encuentran las denominadas vacunas de complejo inmune y las obtenidas por técnicas de ingeniería genética (vacunas a subunidad, génicas y vectorizadas). En el último caso, la proteína VP2 madura y/o la poliproteína VP4-2-3 fueron los antígenos de IBDV seleccionados para su expresión en los diferentes sistemas recombinantes.

7.1 Vacunas convencionales

Las vacunas basadas en **virus vivo atenuado** son cepas capaces de inducir una respuesta inmune adecuada sin generar signos clínicos significativos. En general, estas cepas vacunales se obtienen mediante pasajes seriados en huevos SPF o cultivos celulares. La inmunidad inducida por estas vacunas comienza a desarrollarse pocas horas después de que el virus atenuado alcanzó la BF y se establece de 2 a 3 días después de la vacunación.

El virus vacunal es totalmente susceptible a la neutralización por anticuerpos maternos, con lo cual la administración debe ser realizada cuando el nivel de los mismos sea moderado. Por esta razón, el tiempo óptimo de vacunación y la calidad de la administración son extremadamente críticos. Generalmente son aplicadas a partir de la segunda semana de vida, una edad en la cual la maduración del sistema inmune de las aves es avanzada y la migración de los linfocitos B a los órganos linfoides secundarios se encuentra completa.

Las ventajas del uso de estas vacunas es que imitan la infección en el hospedador, son capaces de replicar de manera controlada e inducir tanto una respuesta inmune celular como humoral. Además, no producen reacciones inflamatorias locales porque no requieren del uso de adyuvantes y se pueden administrar por vías de inmunización masivas tales como la administración en el agua de bebida o la aplicación por aspersión.

La mayoría de las vacunas vivas convencionales de IBDV disponibles comercialmente se basan en cepas clásicas virulentas y se las clasifican como: vacunas “suaves”, las cuales presentan poca eficacia en presencia de anticuerpos maternos y frente a vvIBDV; e “intermedias” o “intermedias plus”, las cuales sobrepasan niveles moderados de anticuerpos maternos e inducen protección pero ocasionan lesiones moderadas a graves en la bolsa y, por lo tanto, causan distintos grados de inmunosupresión (Mazariegos y col., 1990; Tsukamoto y col., 1995; Kumar y col., 2000; Rautenschlein y col., 2005). Además, las vacunas vivas atenuadas presentan efectos indeseados tales como la posible reversión de la virulencia que pueden provocar enfermedad o pérdidas en la producción (Müller y col., 2012). Este tipo de vacunas se usan principalmente para la prevención de IBD en pollos de engorde.

Con respecto a las **vacunas inactivadas** contra la enfermedad de Gumboro, las mismas pueden ser producidas en huevos embrionados, cultivos celulares o pollos, utilizando el virus vivo. Los IBDV cosechados se inactivan y luego se formulan con un adyuvante oleoso. La calidad de las vacunas inactivadas varía según su contenido de antígeno, el proceso de inactivación y la formulación de los adyuvantes (Gardin y col., 2014). Las vacunas inactivadas contra IBD pueden contener solo una cepa de IBDV (monovalente) o varias cepas de IBDV (polivalentes) y producirse de forma industrial.

Luego de la inmunización con vacunas inactivadas contra IBD, la respuesta de anticuerpos aumenta y alcanza un pico alrededor de 3 a 5 semanas post inmunización. Además, si las aves estuvieron previamente en contacto con IBDV la respuesta inmune es más rápida, más alta y de mayor duración en comparación con aquellas aves que nunca estuvieron en contacto con el virus. En la actualidad estas vacunas son utilizadas en casi todos los países para hiperinmunizar a las aves reproductoras y asegurar la transmisión de una alta y homogénea inmunidad pasiva a su prole. Este proceso de "hiperinmunización" se logra utilizando un programa de inmunización del tipo *prime-boost* en el cual las reproductoras son inmunizadas con vacunas vivas durante la fase de recría entre las 4 y 10 semanas de edad (*priming* o cebado), seguido por la

administración de una vacuna inactivada entre las 16 – 20 semanas de edad "*booster* o refuerzo". Esto resulta en la producción de altos niveles de anticuerpos neutralizantes en las reproductoras, los cuales se transmiten pasivamente a la progenie a través de la yema (inmunidad pasiva o maternal). Esta estrategia se utiliza para proteger a la descendencia durante el período crítico de la primera a la segunda semana de vida (Etteradossi y Saif, 2013).

Si bien estas vacunas poseen un alto nivel de bioseguridad, requieren del agregado de adyuvantes y dosis repetidas para estimular correctamente al sistema inmune ya que son vacunas no replicativas. Por lo tanto, requieren un estricto control en el proceso de inmunización de las aves reproductoras, ya que una reproductora incorrectamente inmunizada, nunca producirá una cantidad alta de anticuerpos y consecuentemente nunca protegerá de manera apropiada a su progenie contra un desafío temprano. Por otro lado, como la inmunidad inducida es casi exclusivamente del tipo humoral, en la cual los anticuerpos son específicos contra el antígeno que indujo su producción, la protección correspondiente tiene un espectro acotado. Es decir, si el virus de campo cambia significativamente, entonces la única forma de mantener un alto nivel de protección y prevenir una infección temprana, es incluir este nuevo IBDV en la vacuna inactivada. Esta es la razón por la cual algunas vacunas comerciales contienen más de una cepa de IBDV o se producen vacunas de acuerdo a las cepas circulantes a nivel local o regional (Gardin y col., 2014).

7.2 Vacunas de nueva generación

7.2.1 Vacunas de complejos inmunes

Se trata de vacunas en las cuales una suspensión de IBDV (cepa intermedia plus) se mezcla con una concentración adecuada de anticuerpos específicos anti-IBDV provenientes de aves SPF hiperinmunizadas (Whitfill y col., 1995). El proceso resulta en una vacuna de un complejo virus-anticuerpo (complejo inmune).

Además, en reemplazo de los sueros policlonales pueden utilizarse anticuerpos recombinantes neutralizantes de IBDV (Sapats y col., 2006; Ignjatovic y col., 2006).

La cantidad de anticuerpos en el complejo es tan pequeña que no incrementa la inmunidad maternal pero es suficiente para retrasar por varios días el curso normal de replicación del virus vacunal (Jeurissen y col., 1998). Esto permite la administración

segura de cepas vacunales del tipo intermedio *plus in ovo* a los 18 días (Negash y col., 2004) o por inyección subcutánea al día de edad (Iván y col., 2005).

Las vacunas de complejos inmunes son eficaces en presencia de anticuerpos maternos anti-IBDV (Haddad y col., 1997; Giambrone y col., 2001) y los niveles de protección contra IBDV son idénticos o mejores que los inducidos por vacunas convencionales vivas (Müller y col., 2012).

Sin embargo, tal como se describió anteriormente, las vacunas que utilizan cepas de IBDV de virulencia intermedia *plus* pueden ocasionar lesiones en la BF, con consecuencias en el sistema inmunológico de las aves.

En nuestro país, CEVA comercializa una vacuna de complejo inmune, denominada CEVAC® TRANSMUNE IBD, la cual puede ser aplicada *in ovo* en embriones de 18 días de incubación o de forma subcutánea bajo la piel laxa del cuello al día de vida de las aves.

7.2.2 Vacunas a subunidad

Estas vacunas se basan en la producción *in vitro* de uno o varios polipéptidos del agente infeccioso utilizando diferentes vectores de expresión. En particular, este tipo de vacunas contra IBD se evaluó en forma experimental en diferentes sistemas de expresión tales como: *Escherichia coli* (Rong y col., 2007), *Lactococcus lactis* (Liu y col., 2018), *Pichia pastoris* (Pitcovski y col., 2003; Taghavian y col., 2013), baculovirus (Vakharia y col., 1993; Ge y col., 2015), e incluso sistemas de expresión de plantas como: *Arabidopsis thaliana* (Wu y col., 2004) y *Nicotiana benthamiana* (Gómez y col., 2013).

En varios estudios experimentales de vacunación en los cuales se utilizó como antígeno la proteína VP2 madura se observaron resultados muy variables, desde protección parcial hasta protección total (100% de animales protegidos) (Müller y col., 2012). Sin embargo, al igual que con las vacunas inactivadas, las vacunas subunidad requieren de administración parenteral e inmunizaciones refuerzo, siendo estos factores limitantes para su uso en forma masiva. (Müller y col., 2012).

7.2.3 Vacunas génicas

Las vacunas de ADN, también conocidas como vacunas génicas, se basan en la utilización de vectores plasmídico que codifican uno o varios antígenos de interés, la

expresión intracelular *de novo* de las proteínas antigénicas es capaz de inducir en el hospedador respuestas inmunes celulares y humorales. (Hsieh y col., 2010). Como se describió anteriormente, los antígenos de IBDV seleccionados para el desarrollo de vacunas recombinantes contra la enfermedad de Gumboro fueron las secuencias codificantes de la proteína VP2 madura o de la poliproteína pVP2-VP4-VP3 (Chang y col., 2001; Fodor y col., 1999; Li y col., 2003; Kim y col., 2004). Si bien el nivel de protección alcanzado con las vacunas ADN contra IBD es variable (desde protección parcial hasta completa) se determinó que aquellas que codifican solo la proteína VP2 son menos efectivas que las que codifican la poliproteína (Fodor y col., 1999; Li y col., 2003).

Por otra parte, se demostró que también pueden ser efectivas utilizando solo un fragmento de la VP2 (Chang y col., 2003; Pradhan y col., 2014).

Además, la co-expresión de proteínas inmunomoduladoras como interleuquina-2 (Li y col., 2004), interleuquina-6 (Sun y col., 2005), interleuquina-7 (Huo y col., 2016) e interleuquina-18 (Li y col., 2013) aumentan significativamente la eficacia de las vacunas génicas que expresan VP2.

Utilizando una vacuna ADN que codifica la poliproteína se evaluaron diversas rutas de administración: intramuscular, intraperitoneal y oral. Se demostró que la ruta intramuscular fue la única que proporcionó protección y producción de anticuerpos neutralizantes, sin embargo fueron requeridas al menos 3 inmunizaciones para lograr una protección parcial del 80% (Chang y col., 2001).

7.2.4 Vacunas basadas en vectores virales

Como se describió previamente, se trata de vacunas genéticamente modificadas en las que un gen o secuencia determinada de un organismo “donante” se inserta en el genoma de un virus vivo no patógeno que funciona como “vector”, con el fin de provocar una respuesta inmune protectora contra ambos (Müller y col., 2012). La característica clave de este enfoque es imitar la infección natural mediante la presentación del antígeno patogénico al sistema inmune del hospedador sin la existencia del patógeno infeccioso. El uso de un vector a virus vivo representa una forma atractiva para administrar y presentar antígenos ofreciendo ventajas sobre plataformas tradicionales, por ejemplo, mejorando la calidad y la fuerza de la respuesta inmunológica (Weli y Tryland, 2011). Además se demostró que las vacunas vectorizadas son una buena forma de obtener

respuestas inmunes protectoras, tanto celulares como humorales (Draper y Heeney, 2010).

En la tabla N° 4 se muestran algunos ejemplos de vacunas vectorizadas reportadas, que expresan el principal antígeno de IBDV, basadas en virus tales como: NDV (Huang y col., 2004; Dey y col., 2017), HVT (Darteil y col., 1995; Tsukamoto y col., 2002; Prandini y col., 2016), FWPV (Bayliss y col., 1991; Heine y Boyle, 1993), CNPV (Zanetti y col., 2016.), MVA (Zanetti y col., 2012.), el virus de la enfermedad de Marek (Tsukamoto y col., 1999; Li y col., 2017), adenovirus aviar (Francois y col., 2004) y el bacteriófago T4 (Cao y col., 2005).

Vector Viral	Resultados	Virulencia de la cepa desafío	Referencias
Virus de la enfermedad de <i>Newcastle</i>	<ul style="list-style-type: none"> • 100 % de protección. • Inducción de respuesta inmune humoral y celular. 	Hipervirulenta	Dey y col., 2017.
Virus de la enfermedad de Marek	<ul style="list-style-type: none"> • Ausencia de signos clínicos • 100% de protección. 	Hipervirulenta	Li y col., 2017.
Herpes virus de pavo	<ul style="list-style-type: none"> • Ausencia de signos clínicos y mortalidad. • 58 a 100 % de protección de lesiones histopatológicas en BF. (dependiendo del promotor utilizado para expresar VP2) 	Hipervirulenta	Tsukamoto y col., 2002.
Virus Vaccinia Ankara Modificado	<ul style="list-style-type: none"> • Inducción de anticuerpos neutralizantes de IBDV 	-----	Zanetti y col., 2012.
Virus Fowlpox	<ul style="list-style-type: none"> • Ausencia signos clínicos y 95% de protección • Protección parcial de lesiones histopatológicas en BF. 	Virulencia alta	Bayliss y col., 1991
Adenovirus aviar	<ul style="list-style-type: none"> • 80% de protección • Inducción de Anticuerpos neutralizantes de IBDV 	Hipervirulenta	Francois y col., 2004.
Bacteriófago T4	<ul style="list-style-type: none"> • Ausencia de signos clínicos y mortalidad • Ab-anti VP2 	Hipervirulenta	Cao y col., 2005.
Virus Canarypox	<ul style="list-style-type: none"> • Ausencia de signos clínicos • 100% de protección • Ausencia de lesiones histopatológicas en BF. 	Virulencia intermedia	Zanetti y col., 2016.

Tabla 4. Vacunas basadas en vectores virales contra la enfermedad de Gumboro.

Actualmente, tres vacunas vectorizadas son comercializadas en Argentina para la prevención de la enfermedad de Gumboro: VAXXITEK HVT+IBD (Merial-Boehringer Ingelheim), VECTORMUNE HVT-IBD (CEVA) y R-VAC-INMUNER IBD (Laboratorios Inmuner S.A.). Esta última, es la primera vacuna recombinante

desarrollada en Argentina, basada en el vector viral canarypox, y en el año 2017 fue su lanzamiento comercial en el mercado local. Es un desarrollo público-privado entre nuestro laboratorio de INTA y Laboratorios Inmuner (una PyME de Concepción del Uruguay).

Estas vacunas vectorizadas expresan la proteína VP2 como inmunógeno. Las basadas en vectores de HVT se administran *in ovo* o al día de edad, mientras que la basada en el vector de canarypox está aprobada para su aplicación al día de edad.

HIPÓTESIS

La respuesta inmune inducida por una única dosis del vector viral FW-VP2 obtenido, es suficiente para generar protección frente al desafío con una cepa de virulencia intermedia IBDV.

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar FWPV recombinantes capaces de actuar *in vivo* como vectores de expresión de genes foráneos insertados en regiones genómicas no esenciales para la replicación viral.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Diseño y construcción de vectores de transferencia que permitan la obtención de virus FWPV recombinantes.
2. Obtención y caracterización de los FWPV recombinantes que porten y expresen la región codificante de la proteína VP2 del virus de la bursitis infecciosa.
3. Análisis de la protección inducida por los virus FW-VP2 frente al desafío con IBDV, en pollos SPF.

Materiales y Métodos



MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Se utilizaron bacterias *Escherichia coli*, cepa DH5 α , las cuales fueron crecidas en medio LB (triptona 5 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L), con agitación constante en el caso de ser líquido, o con agregado de bacto agar 1,5 % para el caso de medio semisólido. En ambos casos el crecimiento de las bacterias se realizó a 37°C. Las cepas bacterianas transformadas con un vector plasmídico que portaba el gen de resistencia a ampicilina, se crecieron de forma similar, pero al medio de cultivo se le adicionaron 100 μ g/mL de ampicilina.

Para la conservación de las bacterias, un volumen de cultivo bacteriano en fase estacionaria de crecimiento se mezcló con un volumen de glicerol 50% y se almacenó a -70°C.

2. Cultivos primarios de fibroblastos de embrión de pollo

Se utilizaron cultivos primarios de fibroblastos de embrión de pollo (FEP) preparados a partir de huevos embrionados de 10-11 días, provistos por la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Pergamino del INTA, de acuerdo al protocolo descrito por Staib y colaboradores (Staib y col., 2004). Como medio de crecimiento se utilizó MEM-D (Thermo Fischer Scientific, EEUU) suplementado con 10 % de Suero Fetal Bovino (SFB) (Internegocios, Pcia. de Bs. As., Argentina), penicilina 100.000 U/mL, estreptomycin 67 μ g/mL y gentamicina 50 μ g/mL (todos los antibióticos de Droguería Libertad) y L-glutamina 100 mM (Sigma – Aldrich, EEUU). Todos los cultivos celulares se incubaron en estufa a 37°C con 5 % de CO₂.

3. Animales

En todos los experimentos con animales se utilizaron pollos SPF de la raza *White Leghorn*, que nacieron en el bioterio del Instituto de Biotecnología del INTA, Castelar, a partir de la incubación (incubadora Yonar SA, CABA, Argentina) de huevos SPF embrionados (de 10 días) adquiridos a la firma Rosenbusch SA (CABA, Argentina). Una vez nacidos, los animales se alojaron en jaulas con las condiciones ambientales adecuadas respecto a la edad de los mismos. Todos los procedimientos que involucraron la manipulación de animales de experimentación se realizaron cumpliendo con las normas de bienestar animal, y fueron aprobados por el Comité Institucional para el

Cuidado y Uso de Animales de Experimentación del Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas del INTA (CICUAE INTA-CICVyA).

4. Virus

En este trabajo se utilizó el virus fowlpox (FWPV) cepa FP9 (acceso GenBank: AJ581527.1). La multiplicación del virus FWPV y del virus FWPV-VP2 recombinante se realizó en cultivos primarios de FEP. Además, en los ensayos de infección de animales se utilizó la cepa LZD de IBDV (Laboratorios Inmuner, Concepción del Uruguay, Entre Ríos, Argentina). Esta cepa pertenece al serotipo I del virus y posee virulencia intermedia.

5. Plásmidos

Para el clonado de los productos de amplificación por PCR se utilizó el vector comercial *pCR2.1-TOPO-TA* (Thermo Fischer Scientific), el cual permite la inserción directa de productos de PCR amplificados con Taq polimerasa.

Por otro lado, para la obtención de los vectores de transferencia se utilizó el vector comercial *pBluescript SK* (Stratagene).

Además, se utilizaron los siguientes plásmidos, obtenidos previamente en nuestro laboratorio (Conte Grand, 2006):

- pE/L: porta como inserto el promotor sintético fuerte *early/late* (E/L) de poxvirus (Blasco y Moss, 1995).
- pH6-GUS: posee el gen *uid A* (codifica para la enzima β -glucuronidasa bacteriana, GUS) río abajo del promotor temprano del gen H6 del virus vaccinia (Rosel y col., 1986).
- VT-CN-VP2-GUS: vector de transferencia para la obtención de virus canarypox recombinantes que, entre otras secuencias, porta la región codificante de la proteína VP2 madura de IBDV, aislamiento argentino LD-847-04, serotipo I (Nº acceso a NCBI JF965438).

6. Oligonucleótidos iniciadores o primers

En la tabla Nº 5 se indican las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en esta tesis.

Oligonucleótido	Secuencia nucleotídicas	Sitios de restricción	Fuente
F30i-fw	<u>GAGCTCGGATCTGATAATAGTTTC</u>	<i>Sac</i> I	Este trabajo
F30i-rv	<u>GCGGCCGCCTGTCTATGTTCTTACA</u>	<i>Not</i> I	Este trabajo
F30d-fw	<u>CTCGAGTATATAATCTACCGTTTG</u>	<i>Xho</i> I	Este trabajo
F30d-rv	<u>GGTACCTCCAATAGGCTTTGAAAG</u>	<i>Kpn</i> I	Este trabajo
F016-fw	ATGAAAATGAACTATATGGTTATAG	-	Este trabajo
F016-rv	CTACCATCTTCCGTA AAC	-	Este trabajo
VP2-fw	<u>GAATTCGCCGCCCATGACAAACCTGCAAG</u>	<i>Eco</i> RI	Este trabajo
VP2-rv	<u>AAGCTTCTAGATCTGCCCTGCAATCTTC</u>	<i>Hind</i> III	Este trabajo
VP2i1-rv	TCCCCACAGTCAAATTTGT	-	Del Laboratorio
VP2i1-fw	GTGAGTCGGAGTCTCAGACT	-	Del Laboratorio
VP21276-fw	TCACGCTAGTGGCCTACG	-	Del Laboratorio
284-1-rv	GGTCCGTCAAGCCCATTGTT	-	Del Laboratorio

Tabla N° 5. Oligonucleótidos utilizados. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados, en orientación 5'→3'. En letra subrayada se señalan los sitios de restricción incorporados a la secuencia de los oligonucleótidos.

7. Metodología de ADN recombinante

Todas las técnicas de ADN recombinante se realizaron de acuerdo a las ya descritas (Maniatis y col., 1982). Se utilizaron enzimas de restricción, enzimas modificantes, enzima y *buffer* T4 ADN ligasa (New England Biolabs), enzima Taq ADN polimerasa (Thermo Fischer Scientific) y dNTPs (Promega). Todos los reactivos se utilizaron según las especificaciones de sus fabricantes.

7.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El análisis de los clones recombinantes mediante amplificación por PCR se realizó en un volumen final de 12,5 µL conteniendo aproximadamente 100 ng de templado, ya sea ADN plasmídico, ADN genómico (viral o celular) o ADN copia (ADNc). La mezcla de reacción final contenía *buffer* de la enzima Taq ADN polimerasa 1 X, MgCl₂ 2,5 mM, dNTPs 100 µM, 100 ng de oligonucleótidos sentido y antisentido y 2 U de la enzima Taq ADN polimerasa.

Como control negativo se realizó una amplificación por PCR con todos los reactivos excepto el ADN para asegurar la ausencia de contaminantes.

En el caso de la amplificación de genes para su posterior clonado, las reacciones de PCR se realizaron de manera similar pero en volúmenes finales de 50-100 μ L. La temperatura de fusión (Tf) para la hibridación de ácidos nucleicos se estimó según la siguiente fórmula:

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

Los perfiles de ciclado para cada amplificación se detallan en el Anexo 1.

7.2 Electroforesis en geles para separar fragmentos de ADN

7.2.1 Electroforesis en geles de agarosa

Se utilizaron geles de agarosa de concentración 0,8 -2 %, de acuerdo al tamaño esperado de los fragmentos de ADN a analizar. Todas las electroforesis se realizaron utilizando *buffer* TAE (Tris-acetato 10 mM pH = 8, EDTA 1 mM) y una fuente de poder *Bio-Rad* a un voltaje constante de 5-10 V/cm a temperatura ambiente. En todos los casos las muestras se sembraron utilizando un *buffer* de siembra de concentración 10X (glicerol 50 %, TAE 5 X, azul de bromofenol 1 %).

Para la visualización de los fragmentos de ADN se adicionó bromuro de etidio (0,5 μ g/mL) a la preparación de agarosa. Los geles se expusieron en un transiluminador de luz ultravioleta y se digitalizaron utilizando el equipo *GelDoc (BioRad)* y el software *Quantity One 1-D Analysis Software* (versión 4.6.3) provisto por el fabricante.

7.2.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes

Los fragmentos de ADN menores a 250 pb se resolvieron en minigeles de poliacrilamida no desnaturalizantes al 12%. Para 5 mL de gel se colocaron:

	Acrilamida 30%	H ₂ O	APS* 3%	TBE 10X*	TEMED
Gel 12%	2,31 mL	2,1 mL	105 μ L	0,5 mL	1,5 μ L

*APS: persulfato de amonio, TBE 10X: Tris base 890 mM, ácido bórico 890 mM, EDTA 20 mM, pH= 8.

Las muestras a sembrar se resuspendieron en *buffer* de siembra de concentración 10X. El gel se resolvió a 30mA en *buffer* TBE 1X y posteriormente se tiñó con bromuro de etidio a una concentración de 0,5 μ g/mL durante 10 min a temperatura ambiente. Las imágenes se digitalizaron como se describió en el punto anterior.

7.3 Purificación de ADN a partir de geles

Los fragmentos de ADN resueltos mediante electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida fueron escindidos del gel con bisturí y purificados utilizando el *kit Qiaex II purification system* (Qiagen) según el protocolo recomendado por el fabricante. El ADN obtenido se resuspendió en una solución de Tris-HCl 10 mM pH=8.

7.4 Digestión con enzimas de restricción

Para las digestiones de diferentes plásmidos se utilizaron 1-10 µg del ADN plasmídico, 5 U de enzima, *buffer* de restricción apropiado y un volumen final de 20-50 µL. Las reacciones se incubaron de 1 a 3 h a 37°C.

7.5 Ligación molecular

Previo a las ligaciones se procedió a la remoción de los grupos fosfato de los extremos 5' de los plásmidos digeridos, tratando el ADN plasmídico purificado a partir de geles de agarosa con 5 U de la enzima fosfatasa alcalina de camarón (SAP, Promega) por 15 min a 37°C, seguido de la inactivación de la misma por 15 min a 65°C.

Para el ligado molecular del inserto y el plásmido correspondiente, se utilizaron entre 50 y 100 ng de vector y diferentes cantidades de inserto según las relaciones molares de vector:inserto 1:1 y/o 1:3. Las reacciones de ligación se llevaron a cabo en un volumen final de 15 µL, en presencia de *buffer* de ligación específico (conteniendo ATP) y 0,1 U de la enzima T4 ADN ligasa. La reacción se incubó a 16°C toda la noche. En todos los casos se incluyó un control de ligación con vector y sin inserto para, posteriormente, estimar el aporte de vector sin digerir o religado al número de colonias transformantes.

7.6 Transformación de bacterias

Las bacterias *E. coli* DH5α se hicieron competentes para la transformación mediante el método de Hanahan (Hanahan, 1985) y se almacenaron congeladas a -70°C.

Las bacterias competentes se descongelaron y mantuvieron en hielo durante 10 min. A 50 µL de bacterias competentes se le agregaron 5 µL del producto de las reacciones de ligación, se mezcló por pipeteo y se incubó en hielo durante 30 min. Posteriormente se realizó un choque térmico a 42°C por 2 min y se dejó en hielo durante 2 min adicionales. Se agregaron 200 µL de medio LB, se incubó durante 1 h con agitación suave a 37°C y se plaqueó en medio LB-agar suplementado con ampicilina (100 µg/mL). Para el clonado de amplicones de PCR en el vector comercial *pCR2.1-TOPO-*

TA (Thermo Fischer Scientific), se realizó la identificación de las colonias recombinantes mediante la expresión del gen *lac Z* para lo cual se usaron placas de LB-agar/Ampicilina suplementadas con 40 μ L de IPTG (isopropil-1-tio- β -D-galactósido, 0,1 mM) y 60 μ L de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido, 20 mg/mL). De esta forma, se identificaron las colonias blancas o azules que corresponden a bacterias transformadas con el plásmido con inserto o sin inserto, respectivamente.

En todos los casos, las placas se incubaron a 37°C toda la noche y las colonias se picaron con escarbadiantes esterilizados, que se utilizaron para inocular cultivos de 3-5 mL de LB/Ampicilina.

7.7 Purificación de ADN plasmídico

Se utilizó una modificación del método de Birnboim y Doly, 1979. Se partió de 3 mL de cultivo de bacterias en medio Luria-Bertani (LB) con antibiótico, crecidas toda la noche a 37°C. Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 10.000 rpm en una microcentrífuga de mesada.

7.7.1 Purificación rápida para el análisis de clones recombinantes

El precipitado del cultivo bacteriano se resuspendió en 100 μ L de solución I (Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM). Tras una incubación de 5 min a temperatura ambiente, se agregaron 200 μ L de solución II (NaOH 0,2 N, SDS 1%). Se mezcló suavemente por inversión y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 150 μ L de solución III (acetato de potasio 3 M) fría, se mezcló por inversión y se incubó en hielo por 15 min. El floculado se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min, luego se tomó el sobrenadante y se lo traspasó a un tubo de microcentrífuga limpio, donde se precipitó el ADN plasmídico por el agregado de 1 volumen de isopropanol y posterior centrifugación a 10.000 x g durante 10 min a 4°C. El precipitado se lavó con 500 μ L de etanol 70% y el *pellet* final se secó durante 30 min a 37°C. Finalmente, se resuspendió en 50 μ L de agua bidestilada conteniendo ARNasa A (100 μ g/mL).

7.7.2 Preparación de ADN plasmídico de alta calidad

Se utilizó el *kit* comercial *Plasmid Mini* (Qiagen). El ADN obtenido se resuspendió en 50 μ L de agua bidestilada estéril con un rendimiento promedio de 200 ng/ μ L.

En la purificación de ADN plasmídico de alta calidad para la transfección de células eucariotas se empleó el *kit* comercial *HiSpeed Plasmid Midi Kit* (Qiagen). La elución se

realizó en 500 μL de agua bidestilada estéril. La concentración de ADN se determinó a 260 nm en un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000. El rendimiento promedio de las midi preparaciones de ADN fue de 300 ng/ μL .

8. Secuenciación de ADN

Para verificar la identidad de los clones recombinantes se realizó la secuenciación automática de los mismos en el Servicio Interno de Genotipificación y Secuenciación Automatizada (UGB) del Instituto de Biotecnología de INTA Castelar. Los plásmidos purificados por los *kits* comerciales previamente descriptos se secuenciaron con los oligonucleótidos correspondientes, empleando el *kit* de secuenciación *BigDye Terminator v3.1* y el secuenciador automático *Genetic Analyzer de Applied Biosystems (ABI) 3130xl (Applied Biosystems)*.

El análisis de las secuencias y alineamiento de las mismas se realizó utilizando las herramientas *on line* de JustBio (<http://www.justbio.com/hosted-tools.html>).

9. Técnicas para la obtención de FWPV recombinantes

Todos los procedimientos se llevaron a cabo en flujos laminares verticales, utilizando medios y sueros estériles precalentados a 37°C y *tips* con filtro. Las monocapas de fibroblastos de embrión de pollo se incubaron en estufa a 37°C con 5% de CO₂.

Los medios utilizados fueron:

Medio MEM-D: medio mínimo esencial modificado por Dulbecco (Gibco) suplementado con 0,3 mg/mL de L-glutamina, 3,7 mg/mL de bicarbonato de sodio (ICN), 50 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina, 66 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina y 100 U/mL de penicilina.

Medio de mantenimiento: medio MEM-D conteniendo 2 % de suero fetal bovino y suplementado con antibiótico/antimicótico 1X (100 U/mL de penicilina, 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina y 0,25 $\mu\text{g/mL}$ de antimicótico Fungizone®, Gibco), Hepes (ácido 4-(2-hidroximetil) 1-piperazin-etán-sulfónico, Sigma) 25 mM pH 7,5.

Medio de placa semisólido: MEM-D 2X suplementado con 2 % de suero fetal bovino, antibiótico/antimicótico 1X (Gibco), Hepes 25 mM y 0,7 % de agarosa de tipo VII de bajo punto de fusión (Sigma).

Medio de placa semisólido con sustrato: MEM-D suplementado con 0,2 mg/mL de X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido) y 0,7% de agarosa de tipo VII de bajo punto de fusión (Sigma).

9.1 Amplificación de los *stocks* de FWPV

Para la amplificación de virus fowlpox (recombinantes o no recombinantes) se utilizaron monocapas de FEP crecidas con una confluencia aproximada de 80 a 90% en botellas plásticas de 25, 75 ó 175 cm². Las monocapas se lavaron con medio MEM-D y se infectaron con 0,5 mL de virus con una multiplicidad de infección [MOI = unidad formadora de placa (ufp)/célula] de 0,1. Se incubó durante 45 min a 37°C, CO₂ 5% y posteriormente se agregaron 5-25 mL de medio de mantenimiento. Las células se incubaron durante 4-5 días hasta la observación del efecto citopático. Finalmente, se recolectaron las células y los sobrenadantes de infección y se congelaron a – 70°C. Con el propósito de lisar las células y favorecer la liberación del virus, se realizaron 3 ciclos de congelado (-70°C) y descongelado (37°C).

9.2 Titulación de los *stocks* de FWPV

Monocapas de FEP crecidas en placas de 60 mm de diámetro (P60) con una confluencia aproximada del 80% se lavaron con medio MEM-D y se infectaron con 500 μ L de diluciones seriadas al décimo de la suspensión viral. Luego de 45 min de adsorción a 37°C, con agitación cada 15 min, se descartaron los inóculos y nuevamente se lavaron las monocapas con medio MEM-D.

Posteriormente, se agregaron 3 mL de medio de placa semisólido, el cual se preparó mezclando volúmenes iguales de medio MEM-D 2X conteniendo SFB 4%, Hepes 50 mM y AB/AM 2X (precalentado a 37°C) y de agarosa de bajo punto de fusión 2% (fundida y precalentada a 42°C). Se dejó solidificar a temperatura ambiente durante 15 min y luego se incubó en estufa gaseada hasta la visualización de las placas de lisis (aproximadamente 5 días post-infección). El título del *stock* viral se expresó como unidades formadoras de placas de lisis (UFP) por mL, eligiendo la infección donde la dilución viral utilizada permitiera contar entre 30-60 placas de lisis /P60.

9.3 Transfección transitoria de FEP infectados con FWPV

Para la evaluación de la actividad de la enzima β -glucuronidasa bacteriana (GUS) *in situ* se utilizó el protocolo implementado previamente en el Instituto de Biotecnología (Conte Grand, 2006). Monocapas de FEP crecidas con una confluencia aproximada del

80% en una placa de 24 pocillos (P24) se infectaron con 150 μ L de FWPV por pocillo a una multiplicidad de infección de 1. Se incubó durante 2 h a 37°C con 5% de CO₂ y agitación suave cada 15 min, posteriormente, se agregaron 0,5 mL de medio MEM-D suplementado con 2% de suero fetal bovino (Internegocios) y se incubó nuevamente en las mismas condiciones.

En simultáneo con la infección, se preparó la mezcla ADN/lipofectina y para ello, en un tubo de microcentrífuga se incubaron 2,5 μ L de lipofectina (Thermo Fischer Scientific) con 22,5 μ L de medio MEM-D durante 30 min a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación se agregó al tubo 1 μ g del ADN plasmídico VT-F030 (porta el *cassette* de expresión pH6-GUS) diluido en 25 μ L de medio MEM-D. Para permitir la formación de los complejos ADN-lipofectina se incubó durante 15 min a temperatura ambiente y luego se agregaron 150 μ L de medio MEM-D.

Los FEP infectados se lavaron 2 veces con medio MEM-D y se agregaron los complejos ADN-lipofectina y se incubó durante 2 h a 37°C, 5% de CO₂. Luego, por pocillo se agregaron 0,3 mL de medio MEM-D conteniendo 2% de SFB y se incubó en las mismas condiciones durante 48 h. Posteriormente, las monocapas transfectadas se lavaron con PBS, se fijaron durante 5 min con solución fijadora (formaldehído 2% y glutaraldehído 0,05%, en PBS) y se lavaron nuevamente con PBS. Finalmente, las células se incubaron en oscuridad durante 18 h a 37°C con el *buffer* GUS (ferrocianuro de potasio 5 mM, ferrocianato de potasio 5 mM, cloruro de magnesio 2mM y X-gluc 0,2 mg/mL en PBS) y se visualizó la aparición de células azules al microscopio óptico.

9.4 Transfección estable de FEP infectados con FWPV

Se infectó una monocapa de FEP (80% de confluencia) crecida en una botella plástica de 25 cm² con 1 mL de FWPV a una multiplicidad de infección de 0,05. Se incubó durante 2 h con agitación cada 15 minutos a 37°C, CO₂ 5% y, posteriormente, se agregaron 5 mL de medio MEM-D suplementado con 2% de SFB y se incubó en las mismas condiciones.

Se preparó un tubo de microcentrífuga conteniendo 31,3 μ L de lipofectina (Thermo Fischer Scientific) y 88,7 μ L de medio MEM-D, se incubó durante 30 min a temperatura ambiente para estabilizar el lípido catiónico en el medio de cultivo utilizado. Además, se preparó un tubo de microcentrífuga con 10 μ g del ADN plasmídico VT-F030-VP2 en 120 μ L de medio MEM-D. Los complejos ADN-

lipofectina se obtuvieron mezclando los 120 μ L de ADN con los 120 μ L de lipofectina en un tubo plástico de 5 mL e incubando durante 15 min a temperatura ambiente. Transcurridos los 15 min se agregaron 2 mL de medio MEM-D. Mientras tanto las monocapas infectadas se lavaron dos veces con medio MEM-D, se agregó por volcado la mezcla ADN/lipofectina y se incubó durante al menos 1 h en estufa gaseada. Luego, se agregaron 3 mL de medio MEM-D suplementado con 2% de SFB y se incubó durante toda la noche a 37°C, CO₂ 5%. Al día siguiente, se descartó el sobrenadante de cultivo, se agregaron 5 mL de medio de mantenimiento y se incubó hasta la visualización del efecto citopático. Finalmente se cosecharon las células y el sobrenadante, y se sometieron a 3 ciclos de congelado a -70°C y descongelado a 37°C para liberar el virus. La suspensión viral se almacenó a -70°C hasta su utilización.

9.5 Aislamiento de los FWPVr por clonado de partículas infectivas bajo agar

Se realizaron diluciones seriadas al décimo de la suspensión viral proveniente de la transfección estable. Las monocapas de FEP (crecidas en P60 con una confluencia aproximada del 80%) se lavaron e infectaron con las diluciones virales durante 45 minutos, a 37°C y 5% CO₂, para permitir la adsorción y entrada del virus. Posteriormente, se agregaron 3 mL de medio semisólido por P60, se dejó solidificar a temperatura ambiente y se incubó en estufa gaseada hasta la visualización de las placas de lisis (5-6 días post infección). Para realizar el aislamiento de los virus recombinantes que expresaban la enzima GUS, se agregaron 2 mL de medio de placa semisólido con sustrato, y las monocapas celulares se incubaron hasta la visualización de placas de lisis azules.

Utilizando *tips* con filtro se picaron algunas placas de lisis azules en 500 μ L de medio MEM-D y se realizaron 3 ciclos de congelado (-70°C) y posterior descongelado (37°C) para liberar el virus. Se repitió el clonado de las partículas infectivas hasta obtener un *stock* viral homogéneo, es decir 100% de placas de lisis azules, proceso que requirió de 23 pasajes. Finalmente, se amplificó el *stock* viral recombinante, según se describió anteriormente (ver punto 9.1), para su posterior caracterización.

10. Técnicas para la caracterización molecular de los FWPVr

10.1 Obtención de ADN viral

Se infectaron monocapas de FEP crecidas en placas P60 con 500 μ L del virus FW-VP2 a una multiplicidad de infección menor a 1 y se incubó durante 45 min a 37°C para

permitir la adsorción y entrada del virus. Posteriormente, se agregaron 3 mL de medio de mantenimiento y se incubó en estufa a 37°C durante 5 días. Transcurrido el tiempo de incubación se descartó el medio de cultivo, las monocapas se lavaron dos veces con PBS y los extractos celulares se cosecharon en 1 mL de PBS. Finalmente se realizaron 3 ciclos de congelado (-70°C) y descongelado (37°C) para liberar las partículas virales.

Para la extracción del ADN se utilizaron 350 µL de los extractos celulares, a los cuales se les agregaron 350 µL de *buffer* de extracción 2X (Tris 200 mM pH 8, EDTA 20 mM, NaCl 200mM, SDS 2 % y β-mercaptoetanol 20mM (Dellaporta y col., 1983)). La mezcla se agitó mediante vortex durante 5 segundos y se incubó a 65 °C durante 10 min. Luego se agregaron 250 µL de acetato de potasio 5 M, mezclando por inversión 20 veces y se incubó en hielo durante 20 min. Luego se centrifugó a 10.000 x g durante 5 min en microcentrífuga a 4 °C. La fase acuosa (700 µL aproximadamente) se recuperó en un tubo de microcentrífuga limpio. Se agregaron 700 µL de isopropanol absoluto y se mezcló por inversión durante 30 segundos. Se centrifugó en microcentrífuga a 12.000 rpm durante 20 min a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* se lavó 2 veces con 500 µL de etanol 70 % y se centrifugó durante 15 min a 10000 rpm. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* final, previamente secado a 50 °C, se resuspendió en 40-100 µL de agua bidestilada incubando a 50 °C durante 10-20 min.

10.2 Obtención de ADN copia (ADNc) por transcripción reversa

Se infectaron monocapas de FEP crecidas en placas P60 con virus recombinante o no recombinante, a una MOI de 1 y se incubó durante 45 min a 37°C para permitir la adsorción y entrada del virus. Posteriormente, se agregaron 3 mL de medio de mantenimiento y se incubó en estufa a 37°C durante. Luego de 24 h, se descartó el medio de cultivo, las monocapas se lavaron dos veces con PBS, los extractos celulares se cosecharon en 1 mL de PBS y se sometieron a 3 ciclos de congelado (-70°C) y descongelado (37°C) para liberar las partículas virales. A partir de estos extractos celulares, se aisló ARN total utilizando el reactivo TRIzol (Thermo Fischer Scientific) según el protocolo descrito por el fabricante. Brevemente, el método consiste en la extracción orgánica con cloroformo y la purificación del ARN por precipitación con isopropanol. Las muestras de ARN obtenidas se trataron con una nucleasa específica de ADN (DNasa I, Thermo Fischer Scientific) para eliminar el ADN remanente. Para ello, se tomaron 2 µL de la solución conteniendo el ARN, se agregaron 7 µL de agua libre de nucleasas, 1 µL de solución *buffer* en concentración 10X y 1 µL (2 U) de DNAasa I. Se

incubó a temperatura ambiente durante 15 min y para inactivar la enzima se agregó 1 μ L de EDTA 20 μ M y se incubó a 65 °C durante 10 min. . El ARN tratado se guardó a -70 °C hasta su utilización.

Para la obtención de ADN copia (ADNc) a partir del ARN extraído, se realizó la reacción de transcripción reversa (RT) utilizando la enzima *SuperScript III* (Thermo Fischer Scientific). A 12 μ L de la solución de ARN se le adicionaron 0,5 μ L (50 ng) de oligonucleótidos al azar (6-mer) y 1 μ L de una solución 10 mM de nucleótidos trifosfato (ATP, CTP, GTP y TTP). Se incubó la mezcla 10 min a 65 °C y luego se transfirió inmediatamente al hielo. Posteriormente, se agregó 1 μ L de la solución inhibidora de nucleasas de ARN (*RNAse OUT*, Thermo Fischer Scientific), 4 μ L de solución *buffer* en concentración 5X y 1 μ L de la solución de enzima retrotranscriptasa (2 U/ μ L). La mezcla se incubó a 50 °C durante 45 minutos, la enzima fue inactivada mediante una incubación de 10 min a 65 °C y el ADNc se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

Las amplificaciones por PCR se realizaron utilizando como templado los ADNc o los ARN tratados con DNAsa I (como control para verificar la ausencia de ADN contaminante). Se realizaron amplificaciones para determinar la expresión de: a) gen viral *fpv016* (control positivo de expresión de genes virales) y b) un fragmento interno del *gen vp2* (gen de interés).

10.3 Detección de la proteína VP2 mediante *Western blot*

10.3.1 Obtención y preparación de las muestras

Monocapas de FEP crecidas en placas P60 se infectaron con 500 μ L del virus FW-VP2 o FW-WT (MOI = 1), se incubaron durante 45 min a 37°C para permitir la adsorción y entrada de los virus y, posteriormente, se agregaron 3 mL de medio de mantenimiento. Se incubó en estufa a 37°C durante 48 h o 5 días. Transcurrido el tiempo de incubación, se descartó el sobrenadante y las monocapas se lavaron utilizando PBS. Posteriormente, las células presentes en cada P60 se cosecharon con 1 mL de PBS, se centrifugó durante 5 min a 2.000 rpm en microcentrífuga, se descartó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en 50 μ L de *buffer* de siembra de proteínas 2 X (Tris-HCl 100 mM pH 6,8, SDS 4%, azul de bromofenol 0,02%, β -mercaptoetanol 1,8%, glicerol 20%). Las muestras se hirvieron durante 5 min y se almacenaron a -20°C.

10.3.2 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

Las muestras obtenidas en el paso anterior se sembraron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida de concentración 12% con un grado de entrecruzamiento acrilamida-bisacrilamida de 29:1 y de un tamaño aproximado de 6 x 9 cm. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 100 V, en *buffer* Tris-glicina-SDS (Tris-HCl 25 mM pH= 8,8, glicina 190 mM, SDS 0,1%). En la tabla N° 6 se describe la composición de los geles.

	Gel separador 12%	Gel concentrador
Acrilamida-bisacrilamida	2 mL	0,5 mL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	1,3 mL	-
Tris-HCl 1 M pH 6,8	-	0,38 mL
SDS 10 %	50 µL	30 µL
H ₂ O	1,7 mL	2,1 mL
Persulfato de amonio 10 %	50 µL	30 µL
TEMED	2 µL	3 µL

Tabla N° 6. Composición de los geles de poliacrilamida.

10.3.3 Electrotransferencia

Luego de la electroforesis, los geles de poliacrilamida fueron electrotransferidos en el *buffer* de transferencia (Tris-HCl 25 mM pH= 8,8, glicina 190 mM, metanol 20 %). Para ellos se cortaron rectángulos de nitrocelulosa (GE *Healthcare*) de mayor tamaño que los geles de poliacrilamida y se hidrataron durante 5 min en *buffer* de transferencia. Se dispuso sobre la cara del *cassette* de transferencia correspondiente al electrodo negativo (Bio-Rad): una esponja del tipo *Scotch Brite* (Bio-Rad), un papel de filtro *Whatmann* 3MM, el gel de poliacrilamida, la membrana de nitrocelulosa, un papel de filtro *Whatmann* 3MM y una esponja tipo *Scotch Brite*. El *cassette* se montó dentro de la cuba de transferencia (Bio-Rad), la cual se llenó con *buffer* de transferencia y se aplicó una corriente constante de 200 mA durante 2 h, de forma tal que las proteínas de los geles se transfieran a las membranas de nitrocelulosa. La correcta transferencia de proteínas a la nitrocelulosa se verificó por tinción con Rojo Ponceau 0,1% (en ácido acético 5%).

10.3.4 Detección inmunológica de las proteínas por *Western blot*

Luego de la transferencia, las membranas de nitrocelulosa se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente en solución de bloqueo (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05%, leche descremada 5%). Luego del bloqueo, se lavaron con la solución de lavado TBS-Tween (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05%) y se incubaron con suero policlonal de conejo anti-VP2 preparado en *buffer* de dilución TBS-Tween-leche (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05%, leche descremada 3%).

Luego de 1 h de incubación a temperatura ambiente con agitación suave, se recuperó la dilución del 1° anticuerpo y las membranas se lavaron 3 veces con solución de lavado TBS-Tween durante 15 min cada vez. Posteriormente, las membranas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con agitación suave, en una dilución apropiada en *buffer* de dilución del segundo anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con la enzima fosfatasa alcalina.

Transcurrida la hora de incubación se descartó la dilución del segundo anticuerpo y las membranas se lavaron 3 veces con solución de lavado TBS-Tween durante 15 min cada vez. A continuación se realizó un último lavado de 10 min con *buffer* de revelado de fosfatasa alcalina (Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM) y se agregaron 10 mL de solución de revelado (10 mL de *buffer* de revelado, 66 µL de *Nitro blue tetrazolium* (NBT, 50 mg/mL en dimetilformamida 70%, Promega) y 33 µL de bromo-cloro-indoilo-fosfato (BCIP, 50 mg/mL en dimetilformamida 100%, Promega). Se incubó con agitación suave por 10 min en oscuridad, hasta visualizar las bandas. La reacción de revelado se detuvo por lavados con agua, las membranas se secaron al aire y se guardaron.

10.4 Curva de crecimiento de múltiples pasos

Monocapas de FEP crecidas en placas P60 se infectaron con FW-WT o FW-VP2 con una MOI = 0,01. A distintos tiempos post infección (0; 18; 30; 48 y 66 hpi) de cada P60 se cosecharon por separado las células y el sobrenadante de infección y se realizaron 3 ciclos de congelado (-70°C) y descongelado (37°C). Las suspensiones virales correspondientes a cada tiempo se titularon en FEP por duplicado. Los títulos se expresaron como los valores promedio (ufp/mL) de dos experimentos independientes.

11. Evaluación de las lesiones nodulares (“toma de la vacuna”) generadas por la vacunación con FWPV en la membrana del ala

Todos los procedimientos de los experimentos realizados con animales fueron evaluados y aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAE) del CICVyA-INTA Castelar.

Grupos de seis pollos SPF de 21 días de edad se inmunizaron por vía subcutánea mediante punción en la parte interna de la membrana del ala utilizando una lanceta de doble punta. La dosis aplicada fue de 6×10^3 UFP del virus recombinante (FW-VP2) o no recombinante (FW-WT). Diariamente, durante un período de 12 días, se observó el sitio de inoculación y se midieron las lesiones nodulares utilizando un calibre comercial.

12. Metodologías utilizadas para los ensayos de eficacia de los vectores virales que expresan la proteína VP2 de IBDV

En todos los ensayos se utilizaron grupos de 6 aves cada uno. Los procedimientos realizados con animales fueron aprobados por el CICUAE-CICVyA.

12.1 Inmunógenos

- FW-VP2 y FW-WT: en la tabla N° 7 se indica la dosis y la vía de inmunización utilizada según la edad a la que las aves fueron vacunadas:

Edad (días)	Vía de inmunización	Dosis (UFP)
1	s.c. en el cuello	6×10^3
11	i.m. en la pata	2×10^5
21	s.c. en el ala	6×10^3

Tabla N° 7. Dosis y vía de inmunización con FW-WT y FW-VP2 utilizada según la edad de las aves.

- Vacuna viva de IBDV: se utilizó la vacuna comercial LZD INMUNER. La reconstitución de la vacuna liofilizada se realizó en el momento de su utilización siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se aplicó una gota (30 μ L) de la vacuna reconstituida por vía ocular.

12.2 Diseños experimentales

12.2.1 Esquema de vacunación con una sola dosis de FW-VP2 por vía s.c. en el ala

Las aves se inmunizaron a los 21 días de edad con FW-WT o FW-VP2 y se desafiaron a los 35 días de edad. Previo al desafío (33 días de edad) se tomaron muestras de sangre para evaluar la presencia de anticuerpos específicos anti-IBDV.

12.2.2 Esquema de vacunación con una sola dosis de FW-VP2 por vía i.m.

Las aves se inmunizaron a los 11 días de edad con FW-WT, FW-VP2 o con la vacuna viva de IBDV. Se incluyó un grupo de aves inoculadas con PBS (control negativo). Todos los animales se desafiaron a los 27 días de edad y, previo al desafío (día 25), se tomaron muestras de sangre para determinar los anticuerpos específicos anti-IBDV.

12.2.3 Esquema de vacunación con dosis múltiples de FW-VP2

Las aves se inmunizaron con dos o tres dosis de FW-VP2 a distintas edades (expresadas en días) como se muestra en la siguiente tabla:

Grupo	1ra dosis	2da dosis	3ra dosis
FW-WT	-	-	21 días, s.c.
FW-VP2 (2d)	11 días, i.m.	21 días, s.c.	-
FW-VP2 (3d)	1 día, s.c.	11 días, i.m.	21 días, s.c.

Tabla N° 8. Esquema de vacunación con dosis múltiples de FW-VP2.

Se realizaron sangrías exploratorias a los días 9; 19; 33 y 40 días de edad para evaluar la presencia de anticuerpos específicos anti-IBDV. A los 35 días de edad todas las aves se infectaron por vía oral con IBDV.

12.3 Evaluación de la respuesta inmune humoral anti-IBDV por ELISA

Las sangrías exploratorias se realizaron por la vena braquial o del ala a las edades indicadas en cada ensayo. La sangre se colectó en microtubos con heparina sódica (Laboratorio Veinfar), se centrifugó durante 5 min a 2500 rpm en microcentrífuga y el plasma se almacenó a -20°C hasta su utilización.

Para evaluar la presencia de anticuerpos específicos anti-IBDV se utilizó el *kit* comercial *Flock Check* IBD de Laboratorios IDEXX. Este *kit* provee placas de 96 pocillos recubiertas con el antígeno viral (IBDV) y se utiliza para titular anticuerpos específicos en dilución 1/500. Sin embargo, en este trabajo de tesis la presencia de los

anticuerpos totales anti-IBDV se evaluó por duplicado utilizando 100 µL de una dilución 1/50 de las muestras de plasma de las aves vacunadas. Luego de 30 min de incubación con los sueros incógnita, se realizaron 5 lavados con agua destilada, se agregó el suero anti-especie (pollo) conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP) provisto por el *kit* y se incubó durante 30 min. Luego de realizar 5 lavados con agua destilada, se agregó la solución del sustrato TMB (3,3', 5,5'-tetrametil-benzidina) provista por el fabricante. Transcurridos 15 min la reacción colorimétrica se detuvo por el agregado de solución de frenado (*Stop Solution*). Finalmente, se midió la absorbancia a 650 nm utilizando el lector de placas Thermo® MultiskaSpectrum, *Software* versión 2.2.237.

12.4 Infección experimental con IBDV

Se utilizó una cepa de virulencia intermedia de IBDV. La semilla liofilizada fue reconstituida a una concentración de 30 mg/10 mL de diluyente. A los 27 o 35 días de edad las aves se infectaron por vía oral con 8×10^4 DICT₅₀ (dosis infectivas en cultivo de tejidos 50%) de IBDV y se sacrificaron a los 5 días post-infección para evaluar la presencia de IBDV y el daño histopatológico en la bolsa de Fabricio (BF). Además, se calculó el índice bursal (ver puntos siguientes).

Las aves se consideraron protegidas cuando se redujo significativamente el título de IBDV recuperado de BF y el daño histopatológico fue nulo o leve (*score* 1 o 2).

12.5 Determinación del índice bursal

Este índice relaciona el peso de la BF en relación al peso corporal y es empleado para determinar la presencia o no de atrofia de la Bolsa de Fabricio (Giambrone; 1987).

Luego del sacrificio de las aves, cada animal fue pesado de forma individual utilizando una balanza comercial. A continuación a cada ave se le extrajo y pesó la BF. Con estos datos se determinó el índice bursal según la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{peso de la bolsa de fabricio}}{\text{peso corporal}} * 1000.$$

12.6 Toma de muestras de BF, titulación de IBDV y análisis histopatológico

Se prepararon homogenatos de BF en PBS (1 mg de tejido/µL), se diluyó de manera seriada (en base 10), se utilizó para infectar monocapas de fibroblastos de embrión de pollo y se calculó el título viral por el método desarrollado por Reed y Muench (1938).

El resto del órgano se fijó en formol buffereado para su posterior análisis histopatológico.

12.6.1 Titulación de IBDV presente en las bolsas de Fabricio de las aves desafiadas

Se prepararon diluciones seriadas al décimo de la suspensión viral en microtubos de 1,5 mL. La titulación se realizó en placas de 96 pocillos (P96) para cultivos celulares. En cada fila de la placa se agregaron 50 µL/pocillo de una misma dilución viral excepto en la última fila en donde se adicionó el mismo volumen de medio MEM-D. Posteriormente, se agregan a todos los pocillos de la placa 100 µL de una suspensión de FEP ($4,2 \times 10^5$ células/mL). Las células se incubaron en estufa a 37 °C con atmósfera de 5% CO₂ durante 4 días. Al final de este período las monocapas de cada pocillo se observaron microscópicamente registrando como positivo la presencia de redondeamiento celular (efecto citopático).

El título viral se calculó aplicando el método desarrollado por Reed y Muench (Reed y Muench, 1938) y se expresó como dosis infectiva en cultivo de tejido 50% por mL (DICT₅₀/mL).

12.6.2 Análisis histopatológico de BF

El análisis histopatológico fue realizado por el Dr. Fernando Delgado del Instituto de Patobiología, CICVyA, INTA Castelar.

Brevemente, las BF se fijaron en formol 10% *bufferado* y se embebieron en parafina. Posteriormente se realizaron cortes con micrótopo y, se tiñeron con hematoxilina y eosina previa a su observación al microscopio. Se analizó la presencia de lesiones (necrosis y/o depleción linfoide) e infiltrado inflamatorio en los folículos de las bolsas. Se estableció un *score* de las lesiones según lo descripto por Pérez y col., 2008, en la figura 10 se observan las imágenes compatibles con los diferentes grados de lesiones.

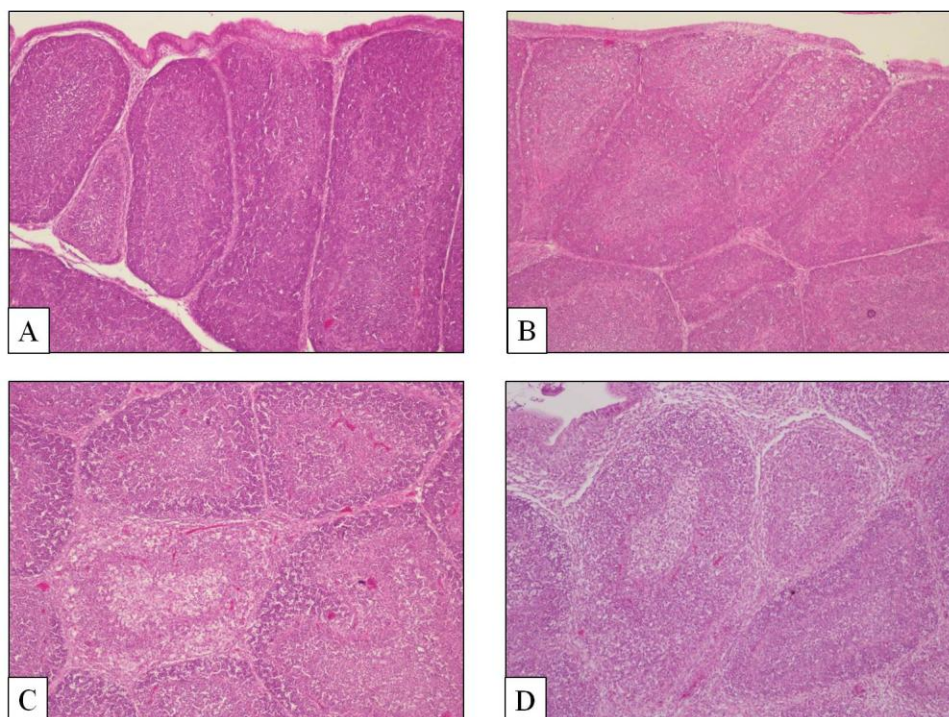


Figura 10. Grado o *score* de lesiones histopatológicas en pollos SPF, fotografías de secciones de tejido de BF teñidas con hematoxilina-eosina (aumento: 100X). A) *score* 1: no lesión; B) *score* 2: leve depleción de células linfoides en folículos (< 30%); C) *score* 3: moderada atrofia o depleción de células de los folículos (31-75%); D) *score* 4: severa necrosis y atrofia en todos los folículos (> 75%).

13. Evaluación del efecto de la respuesta inmune anti-FWPV sobre la “toma de la vacuna” de viruela aviar

El procedimiento realizado fue aprobado por el CICUAE-CICVyA.

Grupos de 6 aves se inmunizaron con FW-VP2 una vez, a los 11 días de edad (vía i.m.), o dos veces, a los días 1 y 11 (vía s.c. e i.m., respectivamente). Se incluyeron dos grupos de aves sin vacunar. A los 21 días de edad, los pollos se inmunizaron o no con FW-VP2 por vía s.c. en la membrana del ala como se indica en la siguiente tabla:

Grupo	Día 1	Día 11	Día 21
PBS	-	-	-
FW-VP2	-	-	+
FW-VP2/1d	-	+	+
FW-VP2/2d	+	+	+

Tabla N° 9. Esquema de vacunación con FW-VP2.

Las aves se observaron diariamente, durante 12 días, y se registró el tamaño de la lesión nodular utilizando un calibre comercial.

14. Análisis estadístico

Las diferencias estadísticas entre los grupos experimentales se analizaron utilizando el test no paramétrico de Mann Whitney (prueba de 2 colas) y Anova de dos factores, que se encuentran dentro del programa *GraphPad Prism 6*.

Resultados



RESULTADOS

1. Diseño y construcción del vector de transferencia VT-F030-VP2

El gran tamaño del genoma de los poxvirus impide la manipulación directa del ADN por técnicas de ingeniería genética. Es por ello que los poxvirus recombinantes se obtienen *in vivo* (cultivos celulares) mediante un proceso de recombinación homóloga entre el genoma viral y un vector de transferencia (VT) que lleva las secuencias de interés flanqueadas por las regiones virales que serán el sitio blanco de inserción. Estas secuencias se encuentran interrumpidas por un “*cassette* de expresión” que posee el gen de interés bajo regulación de un promotor poxviral. Cabe destacar que sólo se pueden obtener poxvirus recombinantes estables si el gen foráneo es insertado en un sitio no esencial para la replicación viral *in vitro*.

El VT se transfecta en un cultivo celular permisivo (por ej. cultivo de fibroblastos de embrión de pollo, FEP) previamente infectado con un poxvirus (por ej. FWPV). Dentro de la célula ocurre la recombinación homóloga entre el VT y el genoma viral, produciendo la progenie viral recombinante con una baja frecuencia (menor al 0,1%). En nuestro laboratorio, los virus recombinantes se purifican mediante clonado de partículas infectivas bajo agar. Las placas de lisis recombinantes se identifican porque presentan coloración azul debido a la actividad de la enzima marcadora β -glucuronidasa bacteriana (GUS, codificada por el gen *uid A*) sobre su sustrato específico (X-Gluc), que se adicionó al medio de cultivo agarizado.

Entonces, un VT típico deberá contener las siguientes estructuras genéticas:

- i) el gen de interés río abajo de un promotor poxviral
- ii) el gen *uid A* río abajo de un promotor poxviral
- iii) dos regiones genéticas (de al menos 250-300 pb) poxvirales flanqueando los “*cassettes* de expresión” i) y ii) que servirán como sitio blanco de recombinación homóloga con el genoma viral.

Por tal motivo, en la primera etapa de este trabajo de tesis, se realizó el diseño y la construcción del vector de transferencia para obtener virus FWPVr utilizando como sitio blanco de inserción al gen *fp9.030* (Laidlaw y Skinner., 2004; acceso GenBank: AJ581527.1; nucleótidos 34.125 a 36.578). Este gen codifica una putativa fosfodiesterasa alcalina y, mediante mutagénesis por delección, Laidlaw y col. (1998) demostraron que no es esencial para la replicación viral en cultivos celulares. Por otro

lado, en nuestro laboratorio se obtuvieron virus canarypox (CNPV) recombinantes por inserción de genes foráneos interrumpiendo al gen *CNPV048* que es el gen ortólogo al *fp9.030* de FWPV. La interrupción del gen *CNPV048* no alteró la capacidad de replicación *in vitro* del CNPV recombinante (Zanetti y col., 2014).

Basados en la secuencia publicada de la cepa vacunal FP9 (acceso GenBank: AJ581527.1) (Laidlaw y Skinner, 2004) se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar por PCR dos regiones denominadas izquierda o FPV030i (299 pb) y derecha o FPV030d (295 pb) que corresponden a las posiciones nucleotídicas 35.258-34.959 y 34.609-34.904 del genoma de FWPV dentro del gen *fp9.030*, respectivamente. Para la amplificación de la región izquierda se utilizaron los cebadores F30i-fw y F30i-rv los cuales incorporan los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción *Sac* I y *Not* I, respectivamente. Por otro lado, para la amplificación de la región derecha se utilizaron los cebadores F30d-fw y F30d-rv los cuales incorporan los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción *Xho* I y *Kpn* I, respectivamente (Figura 11A y B).

Posteriormente, cada producto de amplificación se purificó por gel y se clonó en el plásmido pCR2.1-TOPO-TA (Thermo Fischer Scientific). Los clones recombinantes se analizaron mediante la técnica de PCR utilizando los mismos pares de oligonucleótidos que permitieron la amplificación de cada región del gen *fp9.030*, y los plásmidos recombinantes obtenidos se denominaron pTOPO-IZQ y pTOPO-DER (Figura 11C). Para continuar con la construcción del vector de transferencia, se eligieron los clones recombinantes N° 7 y N° 15 de los plásmidos pTOPO-IZQ y pTOPO-DER, respectivamente.

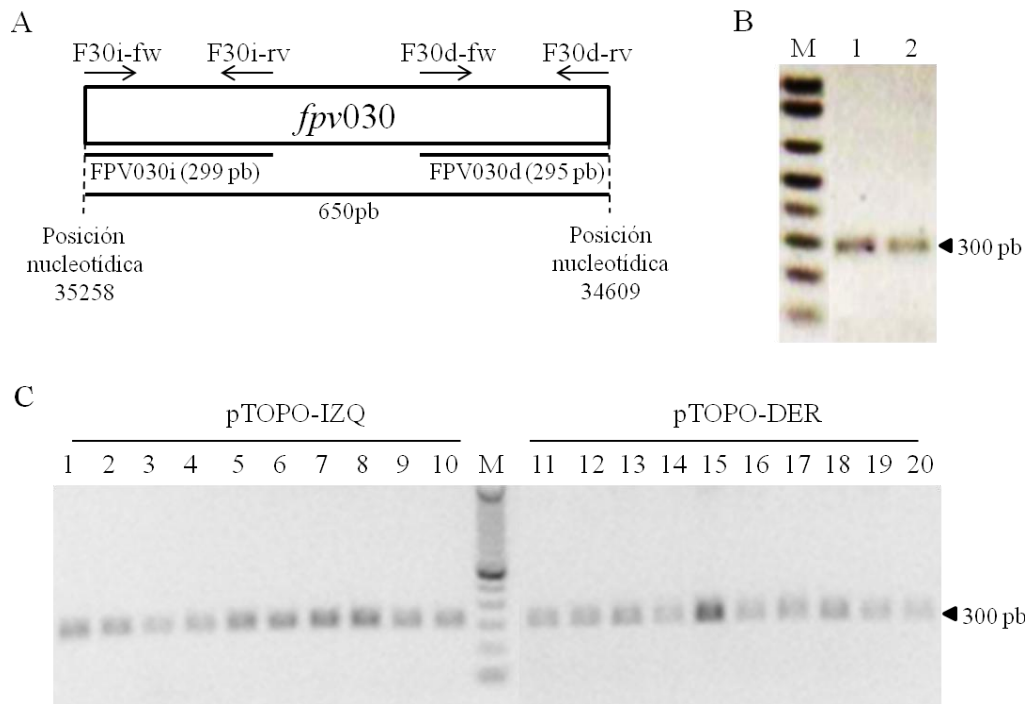


Figura 11. Amplificación por PCR de dos regiones derivadas del gen *fp9.030*. **A)** Esquema del gen *fp9.030* donde se indica la posición de los oligonucleótidos utilizados en la reacción de amplificación por PCR y el tamaño de los amplicones esperados en cada caso. **B)** Amplificación por PCR de los fragmentos FPV030i (calle 1) y FPV030d (calle 2). M: 1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo Fischer Scientific). **C)** Análisis de los clones pTOPO-IZQ (calles 1 a 10) y pTOPO-DER (calles 11 a 20) mediante amplificación por PCR utilizando oligonucleótidos iniciadores específicos. M: 100 bp DNA Ladder (New England Biolabs). Las puntas de flecha indican la posición de los amplicones esperados en cada caso (300 pb). En todos los casos, los tamaños de los fragmentos de amplificación se confirmaron por electroforesis en geles de agarosa 1,5% y tinción con bromuro de etidio.

Luego, el plásmido pTOPO-IZQ fue digerido en forma simultánea con las enzimas de restricción *Sac* I y *Not* I, y el inserto liberado se subclonó direccionalmente en el plásmido pBlueScript (Stratagene) previamente digerido con las mismas enzimas de restricción. Los clones resultantes se analizaron mediante reacciones de PCR específicas para la amplificación de la región izquierda del gen *fp9.030*. De esta forma, se identificaron 24 clones recombinantes en los cuales, además, se verificó la presencia del inserto mediante digestión simultánea con las mismas enzimas utilizadas en el clonado, dicha construcción se denominó pBs-IZQ. Posteriormente, la región derecha del gen *fp9.030* presente en el plásmido pTOPO-DER fue digerida con enzimas de restricción *Xho* I y *Kpn* I y subclonada direccionalmente en la construcción pBs-IZQ. Los clones recombinantes se seleccionaron mediante la amplificación de la totalidad del inserto por PCR. En este caso, se utilizaron los oligonucleótidos F30i-fw y F30d-rv, que permitieron la amplificación de un fragmento de aproximadamente 600 pb, el cual

comprende las regiones izquierda y derecha derivadas del gen *fp9.030* y el sitio de clonado múltiple (SCM) presente en la construcción recombinante denominada pBs-ID (Figura 12A). De los clones recombinantes obtenidos, se eligió el clon N° 1 y su identidad se confirmó mediante secuenciación (Figura 12B).

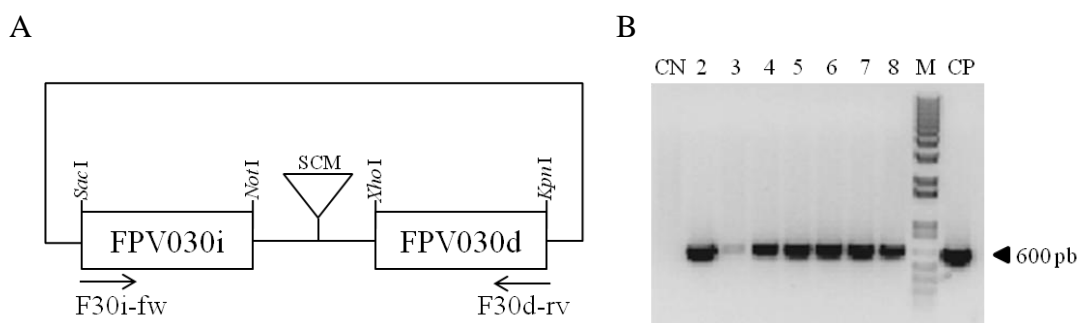


Figura 12. Análisis de los clones pBs-ID recombinantes. A) Esquema del plásmido pBs-ID. B) Análisis de los clones pBs-ID (calles 2 a 8) mediante PCR utilizando el par de oligonucleótidos F30i-fw y F30d-rv. CN: control negativo (sin ADN), M: *1Kb Plus DNA ladder* (Thermo Fischer Scientific). CP: control positivo (ADN extraído de FEP infectadas con FWPV). Las puntas de flecha indican la posición del amplicón esperados (600 pb). Los tamaños de los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa 1% y tinción con bromuro de etidio.

Una vez obtenido el vector pBs-ID, que porta las regiones que serán blanco de recombinación homóloga con el genoma viral, se procedió al subclonado de forma direccionada del promotor sintético temprano-tardío pE/L del virus vaccinia. El plásmido pE/L, obtenido previamente en nuestro laboratorio, se digirió con las enzimas de restricción *Xho* I y *Bam* HI, liberando un inserto de 112 pb que comprende el promotor pE/L, un sitio de clonado múltiple y una secuencia terminadora de la transcripción poxviral. Este inserto se purificó por gel y se subclonó en el plásmido pBs-ID, previamente digerido con las mismas enzimas de restricción, obteniéndose el plásmido denominado pBs-IDP (Figura 13A). Los clones recombinantes obtenidos se analizaron mediante restricción con las enzimas *Sac* I y *Kpn* I. Como se observa en la Figura 13B la totalidad de los clones analizados liberaron el fragmento esperado de aproximadamente 700 pb, indicando que todos ellos incorporaron el inserto de 112 pb que contiene el pE/L. En los clones pBs-IDP N° 4 y N° 8 se confirmó la secuencia del pE/L mediante secuenciación (Figura 13C).

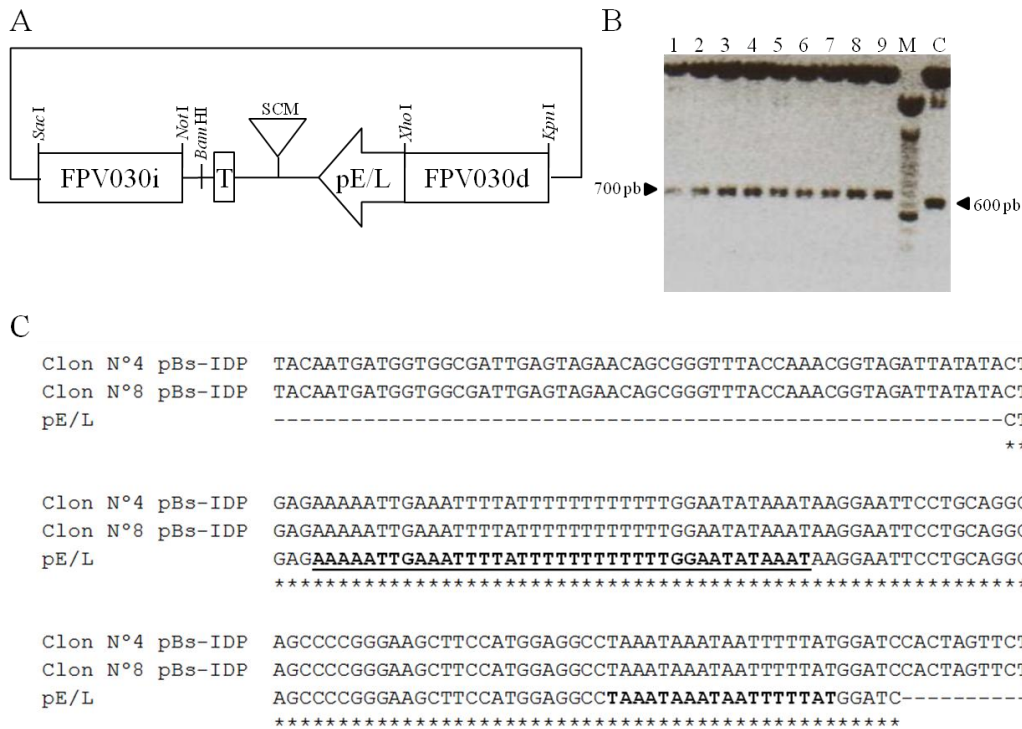


Figura 13. Análisis de los clones pBs-IDP recombinantes. **A)** Esquema del vector pBs-IDP. pE/L: promotor sintético temprano/tardío de poxvirus, T: secuencias terminadoras de la transcripción de poxvirus, SMC: sitio de clonado múltiple. **B)** El ADN plasmídico de los 9 clones recombinantes obtenidos se analizó mediante digestión con las enzimas de restricción *Sac* I y *Kpn* I. Los productos de digestión se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa 1% y tinción con bromuro de etidio. **C):** ADN plasmídico de pBs-ID N° 2 digerido con *Sac* I y *Kpn* I. M: 100 bp DNA Ladder (New England Biolabs) **C)** Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de los clones recombinantes pBs-IDP N° 4 y N° 8 con la secuencia del promotor pE/L (negrita y subrayada) y la secuencia terminadora de la transcripción/traducción (negrita).

Posteriormente, en el plásmido pBs-IDP (clon N° 4) se subclonó el *cassette* para la expresión del gen marcador (*uid A*) que codifica para la enzima β -glucuronidasa bacteriana (GUS), que permitirá el aislamiento de los FWPVr. El *cassette* pH6-*uidA* contiene el gen *uid A* río abajo del promotor del gen *H6* (pH6) del virus vaccinia y se obtuvo a partir de una construcción disponible en nuestro laboratorio. Los clones recombinantes obtenidos se analizaron mediante un ensayo de restricción utilizando *Not* I (enzima utilizada en el clonado) y se confirmó que 6 clones presentaban el inserto de interés (datos no mostrados). Se secuenciaron dos de estos clones recombinantes y se confirmó la presencia del *cassette* marcador y su orientación en la construcción final. De esta forma, se obtuvo el vector de transferencia denominado VT-F030, el cual contiene 4 sitios de restricción únicos (*Stu* I, *Nco* I, *Hind* III y *Eco* RI) que pueden ser

utilizados para clonar, de forma direccionada, distintos genes de interés río abajo del promotor poxviral pE/L (Figura 14).

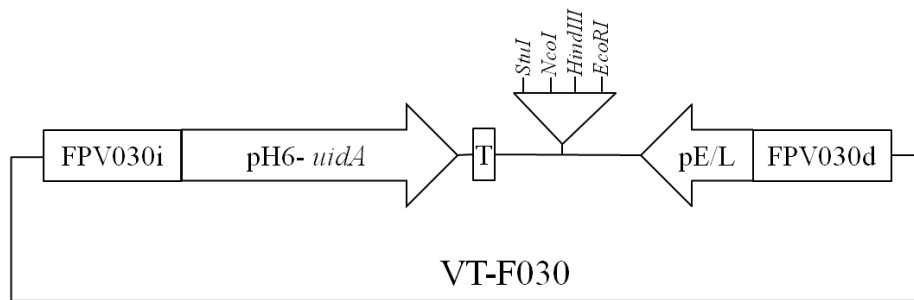
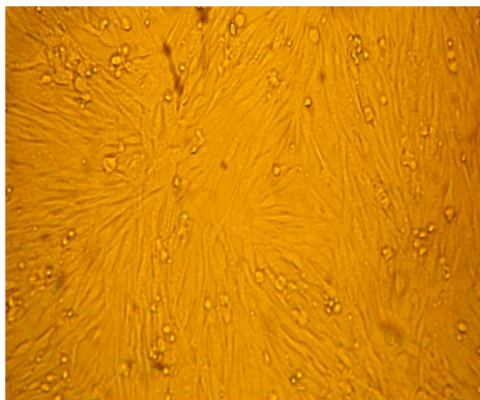


Figura 14. Esquema del VT-F030. Se muestran las regiones flanqueantes (FPV030i y FPV030d) correspondientes al gen *fp9.030* que permitirán la recombinación homóloga con el genoma viral, el *cassette* pH6-*uidA* y la construcción genética del pE/L río abajo del cual se clonarán los genes de interés. Las flechas indican el sentido de la transcripción desde los promotores. pH6: promotor del gen *H6* del virus vaccinia, *uidA*: gen marcador que codifica para la enzima β -glucuronidasa bacteriana (GUS), T: secuencias terminadoras de la transcripción de poxvirus. El esqueleto del plásmido corresponde al vector pBlueScript.

Una vez obtenido el vector de transferencia VT-F030, se realizó la detección de la actividad de GUS *in situ*, empleando como sustrato X-Gluc, mediante un ensayo de infección/transfección transitoria. Utilizando un microscopio óptico, se observaron células que presentaban coloración azul, indicativo de la actividad de GUS, en las monocapas de FEP infectadas con FWPV y transfectadas con el VT-F030 (Figura 15B). Además, como era de esperar no se observaron células con coloración azul en los cultivos de FEP sin infectar/ sin transfectar (Figura 15A).

A



B

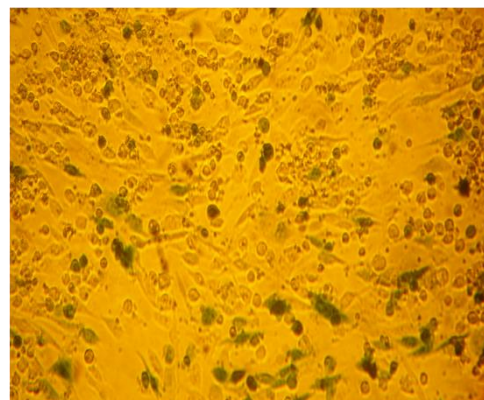


Figura 15. Evaluación de la actividad de la enzima GUS *in situ* en FEP infectados con FWPV y transfectados con VT-F030. Se muestra un campo de una monocapa de FEP sin infectar (A) o infectada con FWPV y transfectada con el plásmido VT-F030 (B) y reveladas a las 48 hpi con el sustrato X-Gluc. Las células se observaron al microscopio óptico con un aumento de 200X.

De esta forma, se obtuvo el VT-F030 que permitirá la obtención de diversos FWPV recombinantes por inserción de genes de interés en la región genómica correspondiente al gen *fp9.030*. Además, facilitará la identificación de los virus recombinantes por su capacidad de formar placas de lisis azules debido a la actividad de la enzima GUS en presencia del sustrato X-Gluc.

En particular, en este trabajo de tesis, el gen de interés seleccionado fue la secuencia codificante de la proteína VP2 madura de IBDV, denominado *gen vp2*.

La región codificante del *gen vp2* se obtuvo mediante PCR utilizando como templado el vector VT-CN-GUS-VP2 obtenido previamente en nuestro laboratorio (Zanetti y col., 2014) y los oligonucleótidos iniciadores VP2-fw y VP2-rv, los cuales incorporan los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción *Eco* RI y *Hind* III, respectivamente, que permitieron el subclonado direccionado en el VT-F030. El producto de amplificación obtenido se purificó y clonó en el plásmido pCR2.1-TOPO-TA (Thermo Fischer Scientific). Los clones recombinantes se analizaron por digestión con las enzimas de restricción *Eco* RI y *Hind* III. Como se indica en la Figura 16A, en tres de los clones analizados se observó la presencia del fragmento de ADN correspondiente al inserto del *gen vp2*.

Luego, el plásmido pTOPO-VP2 (Nº2) se digirió simultáneamente con las enzimas de restricción *Eco* RI y *Hind* III, y el inserto liberado (de aproximadamente 1,3 kpb) se subclonó direccionalmente en el VT-F030 previamente digerido con las mismas enzimas de restricción. Los clones resultantes denominados VT-F030-VP2 se analizaron mediante amplificación por PCR utilizando los oligonucleótidos iniciadores VP2-fw y VP2-rv (Figura 16B).

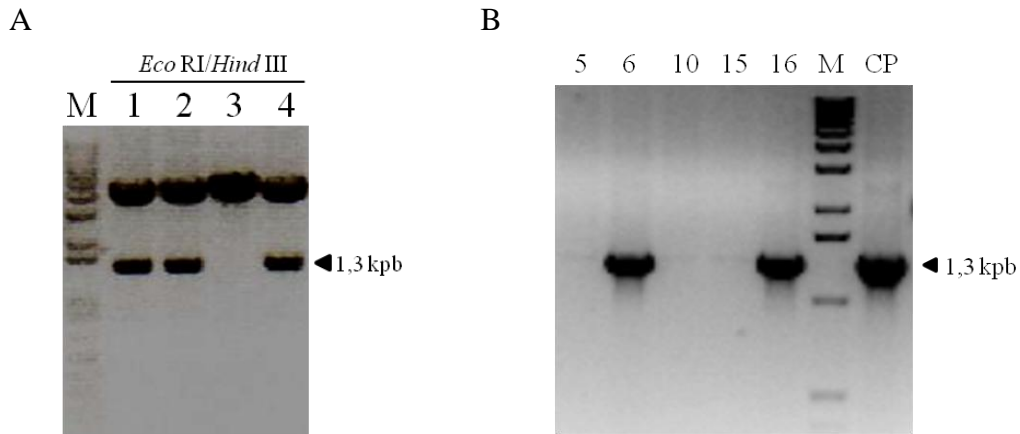


Figura 16. Análisis de los clones pTOPO-VP2 (A) y VT-F030-VP2 (B). A) Análisis de los clones recombinantes pTOPO-VP2 mediante ensayo de restricción utilizando las enzimas *Eco* RI y *Hind* III. B) Análisis los clones recombinantes VT-F030-VP2 por PCR utilizando los oligonucleótidos VP2-fw y VP2-rv. Los tamaños de los productos de digestión y los amplicones obtenidos se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa 1% y tinción con bromuro de etidio. M: 1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo Fischer Scientific). Los números indican los clones analizados, las puntas de flecha indican el tamaño esperado del fragmento del *gen vp2* (1,3 kpb). CP: ADN plasmídico del vector VT-CN-GUS-VP2.

La secuencia correspondiente al *gen vp2* inserto en los VT-F030-VP2 (N° 6 y 16) se confirmó mediante secuenciación. El análisis de las secuencias obtenidas reveló que ambos clones presentaban un cambio nucleotídico en la posición 720 de la región codificante del *gen vp2* respecto de la secuencia utilizada como molde. Sin embargo, este cambio nucleotídico originó una mutación sinónima porque no modificó el aminoácido (Figura 17).

De esta forma, se obtuvo el VT que porta el *gen vp2* flanqueado por regiones genómicas poxvirales que permitieron la obtención posterior de virus FWPVr mediante recombinación homóloga.

```

CLON_Nº 6      MTNLQDQTQQIVPFIRSLMPTTGPASIPDDTLEKHLRSETSTYNLTVGDTGSGGLIVFF
VT-CN-GUS-VP2 MTNLQDQTQQIVPFIRSLMPTTGPASIPDDTLEKHLRSETSTYNLTVGDTGSGGLIVFF
CLON_Nº 16    MTNLQDQTQQIVPFIRSLMPTTGPASIPDDTLEKHLRSETSTYNLTVGDTGSGGLIVFF
*****

CLON_Nº 6      PGFPGSIVGAHYTLQSNNGYKFDQMLLTAQNLPASYNCRSLVSRSLTVRSSTLPGGVYAL
VT-CN-GUS-VP2 PGFPGSIVGAHYTLQSNNGYKFDQMLLTAQNLPASYNCRSLVSRSLTVRSSTLPGGVYAL
CLON_Nº 16    PGFPGSIVGAHYTLQSNNGYKFDQMLLTAQNLPASYNCRSLVSRSLTVRSSTLPGGVYAL
*****

CLON_Nº 6      NGTINAVTFQGSLSSELTDVSYNGLMSATANINDKIGNVLVGEVTVLSLPTSVDLGYVRL
VT-CN-GUS-VP2 NGTINAVTFQGSLSSELTDVSYNGLMSATANINDKIGNVLVGEVTVLSLPTSVDLGYVRL
CLON_Nº 16    NGTINAVTFQGSLSSELTDVSYNGLMSATANINDKIGNVLVGEVTVLSLPTSVDLGYVRL
*****

CLON_Nº 6      GDPIPAIGLDPKMWATCDSSDRPRVYITAAADYQFSSQYQAGGVTTILFSANIDAITS
VT-CN-GUS-VP2 GDPIPAIGLDPKMWATCDSSDRPRVYITAAADYQFSSQYQAGGVTTILFSANIDAITS
CLON_Nº 16    GDPIPAIGLDPKMWATCDSSDRPRVYITAAADYQFSSQYQAGGVTTILFSANIDAITS
*****

CLON_Nº 6      SIGGELVFQTSVQGLILGATIYLIIGFDGTAVITRAAADNGLTAGTDNLMFPNIVIPTSE
VT-CN-GUS-VP2 SIGGELVFQTSVQGLILGATIYLIIGFDGTAVITRAAADNGLTAGTDNLMFPNIVIPTSE
CLON_Nº 16    SIGGELVFQTSVQGLILGATIYLIIGFDGTAVITRAAADNGLTAGTDNLMFPNIVIPTSE
*****

CLON_Nº 6      ITQPITSIKLEIVTSKSGGQAGDQMSWSASGSLAVTIHGGNYPGALRPVTLVAYERVATG
VT-CN-GUS-VP2 ITQPITSIKLEIVTSKSGGQAGDQMSWSASGSLAVTIHGGNYPGALRPVTLVAYERVATG
CLON_Nº 16    ITQPITSIKLEIVTSKSGGQAGDQMSWSASGSLAVTIHGGNYPGALRPVTLVAYERVATG
*****

CLON_Nº 6      SVVTVAGVSNFELIPNPELAKNLVTEYGRFDPGAMNYTKLILSERDRLGIKTVWPTREYT
VT-CN-GUS-VP2 SVVTVAGVSNFELIPNPELAKNLVTEYGRFDPGAMNYTKLILSERDRLGIKTVWPTREYT
CLON_Nº 16    SVVTVAGVSNFELIPNPELAKNLVTEYGRFDPGAMNYTKLILSERDRLGIKTVWPTREYT
*****

CLON_Nº 6      DFREYFMEVADLNSPLKIAGQI
VT-CN-GUS-VP2 DFREYFMEVADLNSPLKIAGQI
CLON_Nº 16    DFREYFMEVADLNSPLKIAGQI
*****

```

Figura 17. Alineación de las secuencias aminoacídicas del *gen vp2* codificadas en los clones VT-F030-VP2 Nº 6 y 16 y en el VT-CN-GUS-VP2 utilizado como molde. En color celeste se resaltó la posición aminoacídica correspondiente a la mutación sinónima.

2. Obtención y caracterización del virus recombinante FW-VP2

Los virus FW-VP2 se obtuvieron por recombinación homóloga *in vivo* entre el genoma de la cepa vacunal FP9 y el VT-F030-VP2 (clon Nº 6). El *screening* de los virus FW-VP2 recombinantes se realizó por clonado de las partículas infectivas bajo agar y análisis de la expresión del gen marcador *uid A* (Figura 18). Las placas de lisis que presentaban color azul se aislaron y se amplificaron en cultivos de FEP. En total se realizaron 23 pasajes de clonado viral hasta obtener un *stock* homogéneo que produjo el 100% de placas de lisis azules

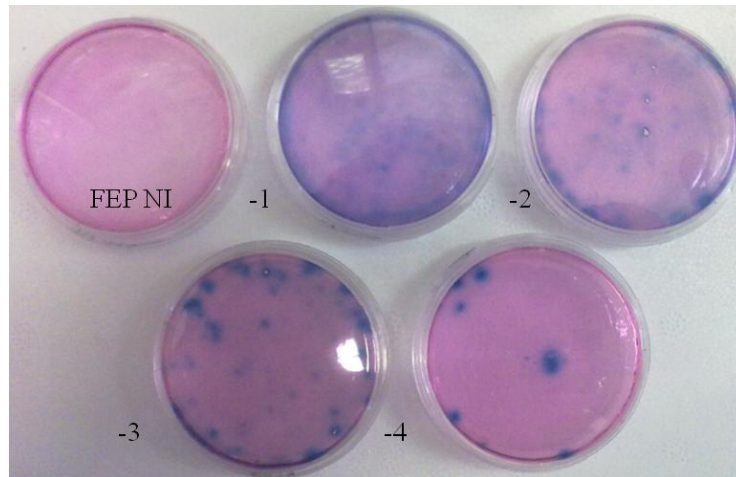


Figura 18. Aislamiento de los FWPV recombinantes. El aislamiento de los FWPVr se realizó por clonado de las partículas infectivas bajo agar y análisis de la expresión del gen marcador *uid A*. Se muestran 4 placas de 60 mm (P60) infectadas con las diluciones seriadas al décimo (-1 a -4) de un clon viral (pasaje N° 16) y una P60 sin infectar (FEP NI). Cada punto azul corresponde a una placa de lisis del virus recombinante.

Debido a que el proceso de aislamiento de FW-VP2 se realizó por *screening* de la actividad enzimática de GUS, fue necesario corroborar la ausencia de virus FWPV salvaje (FW-WT) así como también la presencia y expresión del *gen vp2* en los virus recombinantes obtenidos. Para ello, se seleccionaron tres clones recombinantes FW-VP2 (N° 23, 24 y 25), los cuales se amplificaron en cultivo celular y se caracterizaron molecularmente mediante la técnica de PCR.

En primer lugar, se confirmó la presencia de ADN viral en todas las muestras provenientes de células infectadas con FW-WT y FW-VP2 (clones 23 a 25) mediante la amplificación por PCR del gen viral *fp9.016* (no involucrado en la recombinación homóloga; datos no mostrados).

Luego, se evaluó la presencia del gen de interés (*gen vp2*) mediante amplificación por PCR utilizando los oligonucleótidos VP2-fw y VP2-rv que amplifican un fragmento de ADN de 1,3 kpb correspondiente a la región codificante del *gen vp2* de IBDV (Figura 19A). Estos amplicones se detectaron en las muestras provenientes de células infectadas con los 3 clones de FW-VP2 (Figura 19B, calles B), mientras que no se observaron productos de amplificación en las reacciones de PCR realizadas con los ADN extraídos de FEP infectados con FW-WT.

Posteriormente se analizó la pureza (ausencia de genoma wt) de los *stocks* virales de FW-VP2. Para ello, se realizó una amplificación por PCR de la región genómica donde

Luego de confirmar tanto la inserción del *gen vp2* dentro del genoma de FWPV como la pureza de las poblaciones virales recombinantes para los *stocks* de FW-VP2 N° 23 y 25, se eligió continuar con el primero de ellos y se evaluó la expresión del *gen vp2* a nivel transcripcional y traduccional mediante las técnicas de RT-PCR y *Western blot*, respectivamente.

En las muestras provenientes de ADNc obtenidas por RT-PCR a partir de FEP infectados con FW-WT y FW-VP2 se confirmó la presencia de los transcritos del gen viral *fp9.016* mediante la amplificación por RT-PCR. En cambio, no se observaron productos de amplificación en las muestras provenientes de células sin infectar (Figura 20A).

Además, como se observa en la figura 20B, el amplicón (de 550 pb) correspondiente a un fragmento interno del transcripto del *gen vp2* solo se observó en la muestra proveniente de FEP infectados con FW-VP2, confirmando la correcta expresión del *gen vp2*, a nivel de transcripción, a las 24 hpi.

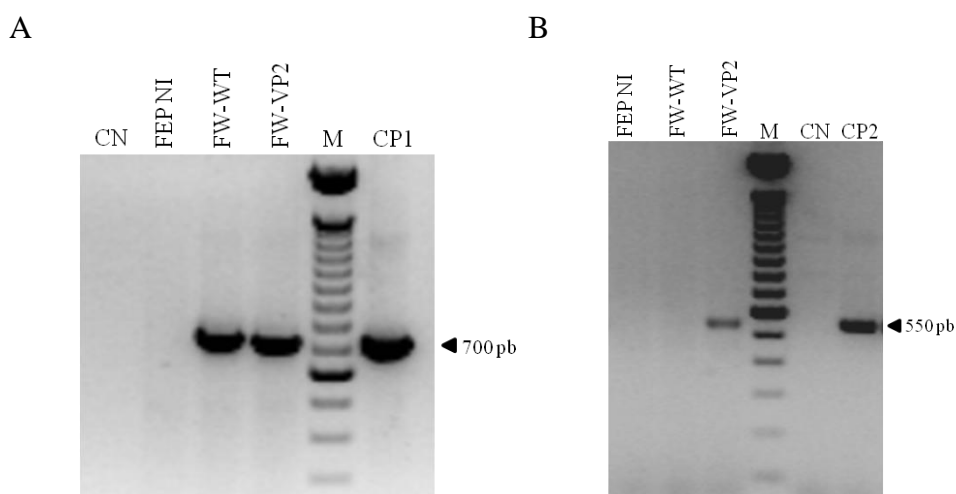


Figura 20. Evaluación de transcripción del *gen vp2* en células FEP infectadas con el virus FW-VP2. A) Amplificación por RT-PCR del transcripto del gen viral *fp9.016*. B) Amplificación por RT-PCR del transcripto del *gen vp2*. En todos los casos, los productos de la reacción de amplificación por PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa 1% y tinción con bromuro de etidio. Las amplificaciones por RT-PCR se realizaron a partir de ARN extraído de células FEP infectadas con FW-WT, FW-VP2 o sin infectar (FEP NI). Se incluyó un control de la reacción de PCR sin templado (CN) y como controles positivos: CP1 (ADN de de células FEP infectadas con FW-WT) y CP2 (ADN de VT-F030-VP2). M: 100 bp DNA Ladder (New England Biolabs).

Luego, mediante la técnica de *Western blot* se confirmó la expresión de la proteína VP2 de IBVDV en cultivos FEP infectados con FW-VP2, por distintos períodos de tiempo (48

h y 5 días), mientras que no se detectó ninguna banda reactiva en muestras provenientes de células infectadas con FW-WT (Figura 21).

En conjunto, estos resultados indican que se obtuvo un *stock* puro del virus recombinante FW-VP2 que porta y expresa la secuencia codificante de la proteína VP2 de IBDV.

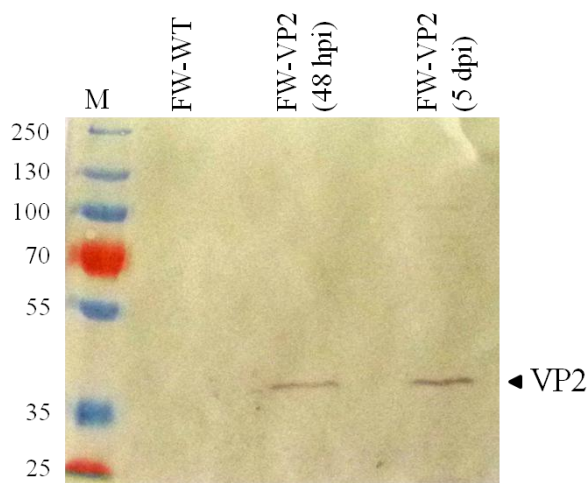


Figura 21. Evaluación de la expresión de la proteína VP2 madura expresada a partir de virus FW-VP2. Las proteínas presentes en homogenatos de infección infectados con el virus recombinante (FW-VP2) o no recombinante (FW-WT), cosechados a las 48 hpi o 5 dpi, se resolvieron mediante PAGE 12%-SDS y se analizaron por *Western blot* utilizando un antisuero policlonal de conejo anti-VP2 como primer anticuerpo y anti-conejo conjugado a la enzima fosfatasa alcalina como segundo anticuerpo. M: marcador de peso molecular *Page Ruler* (Fermentas). Los pesos moleculares aparentes se indican en kDa.

Una vez obtenidos los FWPV recombinantes que expresan la proteína VP2 de IBDV era de interés determinar si la inserción de una secuencia foránea interrumpiendo el gen *fp9.030* alteraba la capacidad replicativa viral. Para ello, se realizó una curva de crecimiento en múltiples pasos en la que se comparó la replicación de los virus FW-WT y FW-VP2 en FEP. Con estos virus se infectaron cultivos celulares a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,01, las progenies virales intra y extracelulares se cosecharon por separado a diferentes tiempos post infección y se titularon en monocapas de FEP.

En las curvas de crecimiento obtenidas no se observaron diferencias significativas entre las cinéticas de replicación de los FWPV recombinantes y no recombinantes, lo que sugiere que el gen *fp9.030* no juega un rol significativo en la replicación del virus en cultivo celular (Figura 22).

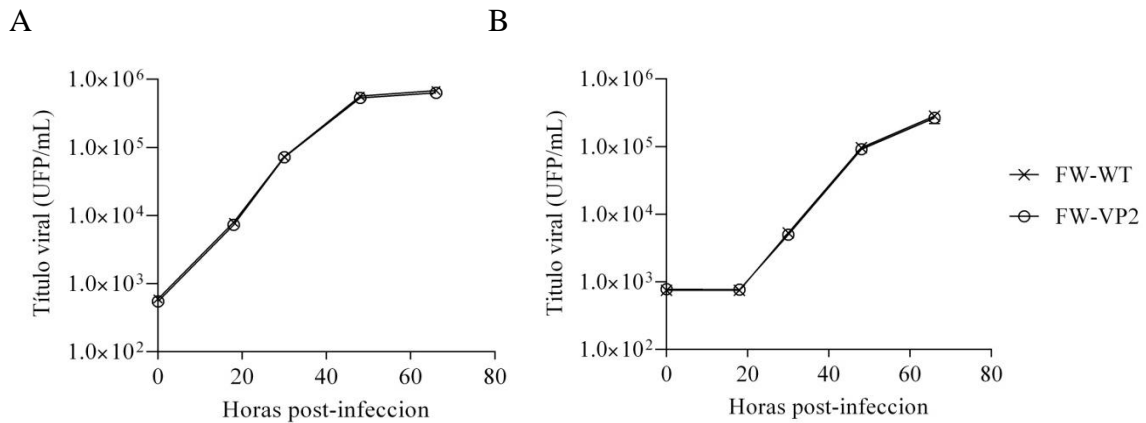


Figura 22. Curvas de crecimiento de múltiples pasos de los virus FW-WT y FW-VP2 en FEP. Análisis del crecimiento viral en cultivos de FEP infectados a baja MOI (0,01) con FW-VP2 o FW-WT. Cuantificación (UFP/mL) del virus intracelular (**A**) y extracelular (**B**) a diferentes tiempos post infección. Los títulos de FW-WT o FW-VP2 obtenidos a las 0; 16; 24; 48 y 66 hpi se expresan como los valores promedio (UFP/mL) de dos experimentos independientes.

Por último, con el objetivo comparar el comportamiento *in vivo* del virus recombinante respecto del virus salvaje, se midió diariamente el tamaño de las lesiones nodulares generadas por la administración de FWPV por vía subcutánea (s.c.) en la membrana del ala (“toma” de la vacuna) hasta su desaparición. En la figura 23 podemos observar la aparición de las lesiones en ambos grupos al primer día de medición, alcanzando el máximo tamaño (FW-WT 0,44 cm y FW-VP2 0,42 cm) a los 5 dpi y su reabsorción a los 12 dpi. Estos resultados indican que el virus recombinante se comporta *in vivo* de manera similar al virus salvaje (cepa vacunal de viruela aviar).

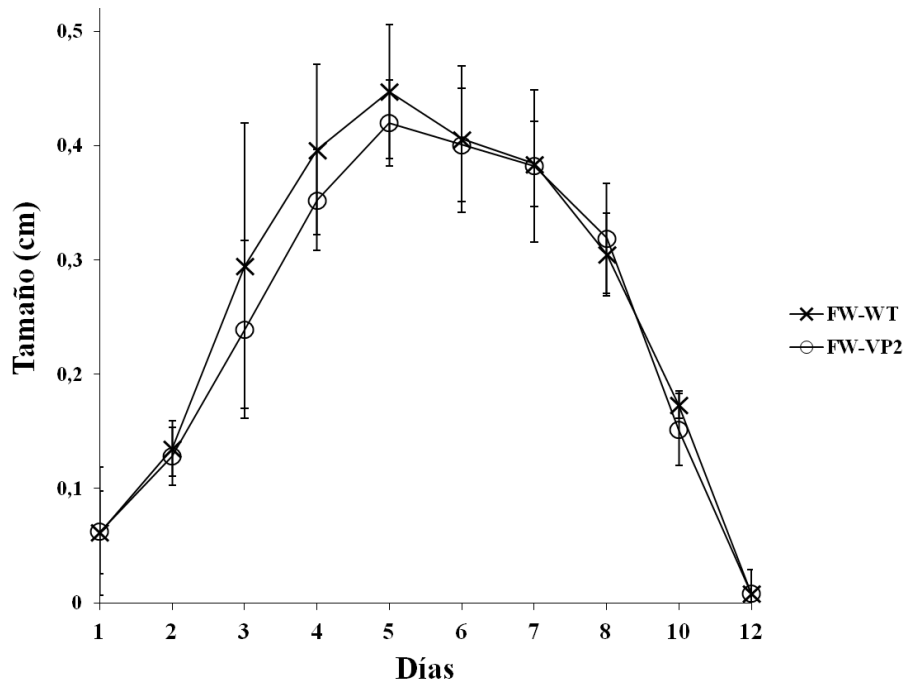


Figura 23. Medición del desarrollo de las lesiones nodulares generadas por la administración de FW-WT o FW-VP2 por vía subcutánea en el ala (“toma de la vacuna”). La medición de las lesiones se realizó diariamente hasta la desaparición de las mismas, utilizando un calibre.

3. Evaluación de la capacidad inmunogénica de FW-VP2

Como se describió previamente, la severidad de la enfermedad causada por IBDV está directamente relacionada con el número de células sensibles presentes en la BF. La mayor susceptibilidad a la infección se observa entre la tercera y sexta semana de vida, cuando las BF se encuentran en pleno desarrollo (van der Berg, 2000).

Con el objetivo de evaluar la capacidad de los virus recombinantes FW-VP2 de inducir inmunidad protectora en esta ventana temporal, se realizaron dos esquemas de vacunación (con una o múltiples inmunizaciones con FW-VP2, por vías subcutánea y/o intramuscular) y desafío con IBDV (cepa de virulencia intermedia, por vía oral a los 27 o 35 días de edad) en pollos SPF. Brevemente, los parámetros evaluados para determinar el grado de protección fueron:

- el índice bursal: relaciona el peso de la BF y el peso corporal de las aves. Este parámetro macroscópico correlaciona con atrofia de la bolsa de Fabricio.
- las lesiones histopatológicas presentes en las BF: permite establecer el grado de afección o atrofia del tejido linfoide. Se utilizó el *score* descrito por Perez y col., 2008.

- el título de IBDV en BF: parámetro que tiene una relación inversa con la protección. A mayor nivel de protección, menor es la cantidad de virus de desafío presente en la BF.

Las aves se consideraron protegidas cuando se redujo significativamente el título de IBDV recuperado de BF y el daño histopatológico fue nulo o leve (*score* 1 o 2, respectivamente).

3.1 Evaluación de la protección conferida por la administración de una única dosis de FW-VP2 por vía subcutánea

En primer lugar, se evaluó la protección conferida por una única inmunización, por vía s.c., con FW-VP2 frente al desafío con IBDV. Brevemente, las aves se vacunaron en la membrana del ala con 6×10^3 UFP de los virus recombinantes o no recombinantes a los 21 días de edad. A los 35 días de edad todas las aves se desafiaron con IBDV. Además, previo al desafío, se tomaron muestras de sangre para evaluar la presencia de anticuerpos totales específicos contra IBDV por ELISA. En ninguna de las aves vacunadas con FW-VP2 se detectaron anticuerpos específicos anti-VP2 (datos no mostrados).

Como se observa en la figura 24A, las aves que recibieron una única inmunización con FW-VP2 aplicada por vía s.c. en la membrana del ala poseen un índice bursal significativamente mayor que las aves inoculadas con el virus no recombinante ($p=0,026$). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en cuanto al título de IBDV presente en las BF luego del desafío (Figura 24B). Estos resultados indican que la vacunación con FW-VP2 logra evitar de forma significativa la atrofia de las BF, ya que se observa un aumento del índice bursal.

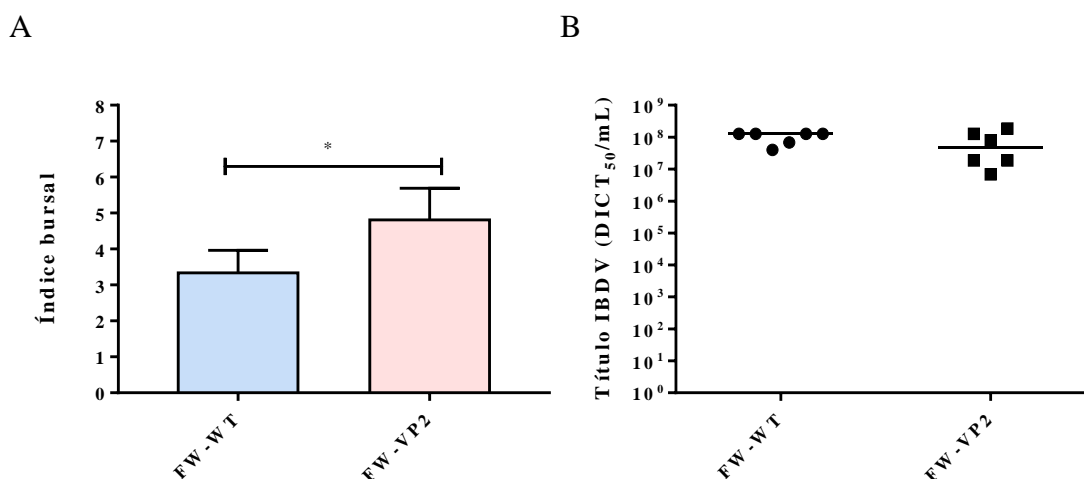


Figura 24. A) Medición del índice bursal calculado con la siguiente fórmula: (peso BF/peso corporal) x 1000. B) Título de IBDV en bolsa de Fabricio. Todas las aves fueron inmunizadas por vía s.c. en la membrana del ala a los 21 días de edad con 6×10^3 UFP de virus recombinante (grupo FW-VP2) o no recombinante (grupo FW-WT). El título viral de IBDV presente en las BF se calculó utilizando el método de Reed y Muench (Reed y Muench, 1938). Mann Whitney test (* $p < 0,05$).

En cuanto al análisis histopatológico de las BF, se observó que el 33% de los animales vacunados con FW-VP2 no presentaron lesiones, el 50% presentaron lesiones leves y solo un animal presentó lesiones severas. En cambio, todos los animales vacunados con FW-WT presentaron lesiones desde moderadas a severas (Tabla 10).

Grupo	Lesiones histopatológicas (Nº animales/score de 1 a 4) ^a				Score promedio
	1	2	3	4	
FW-WT	0	0	4	2	3,33
FW-VP2	2	3	0	1	2

Tabla 10. Lesiones histopatológicas en bolsa de Fabricio luego del desafío con IBDV en pollos inmunizados con una dosis de FW-VP2 por vía subcutánea. Los números indican la cantidad de aves clasificadas con determinado *score* histopatológico. Se utilizó el *score* descripto por (Pérez y col., 2008): 1: no lesión; 2: leve depleción de células linfoides en folículos (< 30%); 3: moderada atrofia o depleción de células de los folículos (31-75%); 4: severa necrosis y atrofia en todos los folículos (> 75%).

En conjunto, estos resultados indican que a pesar de que no se detectaron diferencias significativas en cuanto al título de IBDV presente en las BF, la aplicación de una sola dosis de 6×10^3 UFP de FW-VP2 (por vía s.c.) fue suficiente para reducir significativamente la atrofia de la BF observándose solo daños histopatológicos leves.

3.2 Evaluación de la protección conferida por la administración de una única dosis de FW-VP2 por vía intramuscular

Se evaluó la protección conferida por una única inmunización con FW-VP2 frente al desafío con IBDV. Las aves se vacunaron con 2×10^5 UFP de los virus recombinantes o no recombinantes por vía intramuscular (i.m.) a los 11 días de edad y a los 27 días de edad todas las aves se desafiaron con IBDV. Previo al desafío se tomaron muestras de suero para evaluar la presencia de anticuerpos totales específicos contra IBDV por ELISA. Sin embargo, en ninguna de las aves vacunadas con FW-VP2 fue posible detectar la presencia de anticuerpos específicos anti-VP2.

Con respecto al título del virus de desafío (IBDV) recuperado de las BF se observó que los animales vacunados con FW-WT presentaron altos títulos de IBDV (mayores a 10^7 DICT₅₀/mL), similares a los obtenidos con el grupo de aves control negativo (recibieron PBS). Las aves que recibieron la vacuna viva comercial de IBDV presentaron, en BF, títulos de IBDV menores a 100 DICT₅₀/mL.

La mayoría de aves vacunadas con el vector viral FW-VP2 presentaban títulos de IBDV menores a 10^6 DICT₅₀/mL en BF. Estos valores fueron significativamente menores ($p=0,0022$) a los obtenidos en el grupo de aves inmunizadas con FWPV no recombinante (Figura 25).

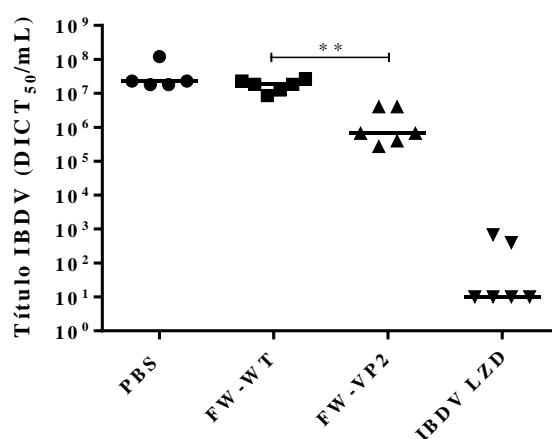


Figura 25. Título viral de IBDV cuantificado en homogenatos de bolsa de Fabricio luego del desafío con IBDV en pollos SPF. Grupos de 6 pollos SPF se inmunizaron a los 11 días de edad con PBS (500 μ L, vía i.m.), FW-VP2 o FW-WT (2×10^5 UFP, vía i.m.) o con la vacuna viva comercial de IBDV (IBDV LZD, vía ocular según especificaciones del fabricante). Todas las aves se desafiaron con una cepa de virulencia intermedia de IBDV a los 27 días de edad. El título viral de IBDV presente en las BF se calculó utilizando el método de Reed y Muench (Reed y Muench, 1938). El análisis estadístico se realizó mediante el test de Mann-Whitney (2 colas). $**p < 0,01$.

El análisis histopatológico de las BF mostró que la mayoría de los animales vacunados con FW-WT o PBS presentaban lesiones histopatológicas graves con un *score* promedio mayor a 3 (Tabla 11). En el caso de las aves vacunadas con FW-VP2 se observaron *score* entre 2 y 3, indicando que la reducción significativa en el título viral de IBDV fue suficiente para producir un daño histopatológico de leve a moderado en la BF.

Las aves que recibieron la vacuna viva de IBDV no presentaron lesiones a excepción de un animal que presentó lesiones leves (Tabla 11).

Grupo	Lesiones histopatológicas (Nº animales/ <i>score</i> de 1 a 4)				<i>Score</i> promedio
	1	2	3	4	
PBS*	0	0	2	3	3,6
FW-WT	0	1	2	3	3,3
FW-VP2	0	2	4	0	2,67
Vacuna IBDV	5	1	0	0	1,17

Tabla 11. Lesiones histopatológicas en bolsa de Fabricio luego del desafío con IBDV en pollos inmunizados con una dosis de FW-VP2 por vía intramuscular. Los números indican la cantidad de aves clasificadas con determinado *score* histopatológico. Se utilizó el *score* descripto por (Pérez y col., 2008): 1: no lesión; 2: leve depleción de células linfoides en folículos (< 30%); 3: moderada atrofia o depleción de células de los folículos (31-75%); 4: severa necrosis y atrofia en todos los folículos (> 75%). * En este grupo se indican los resultados de 5 aves debido a la muerte inespecífica de un animal antes de las 24 hpi.

En conjunto, estos resultados indican que la aplicación de una sola dosis de 2×10^5 UFP de FW-VP2 (por vía i.m.) fue suficiente para reducir significativamente el título de IBDV presente en las BF, observándose un daño histopatológico leve a moderado en las mismas.

3.3 Evaluación de la protección conferida por FW-VP2 aplicado en esquema de dosis múltiples

En base a los resultados observados con la aplicación de una sola inmunización con FW-VP2, se evaluó la protección conferida por el virus recombinante en un esquema de dosis múltiples (dos o tres dosis) como se describe en el apartado 12.2.3 de Materiales y Métodos. Todas las aves fueron desafiadas a los 35 días de edad con IBDV y los parámetros de protección se evaluaron como se describió anteriormente.

Primeramente, se evaluó la inducción de la respuesta inmune humoral específica anti-VP2 en las muestras de sangre obtenidas de todas las aves a los 33 días de edad (previo al desafío). Como era de esperar no se detectaron anticuerpos anti-VP2 en el grupo vacunado con el virus salvaje, mientras que en el grupo de aves que recibieron dos inmunizaciones de FW-VP2 se detectaron bajos niveles de anticuerpos. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los grupos que recibieron FW-WT y FW-VP2 (2d). En cambio, la aplicación de una tercera inmunización con el virus recombinante indujo un aumento significativo ($p=0,0152$) de anticuerpos anti-VP2 respecto del grupo FW-VP2 (2d) y muy significativo ($p=0,0022$) respecto del grupo FW-WT (Figura 26).

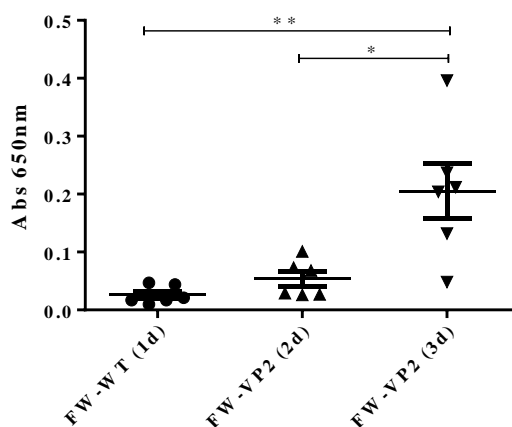
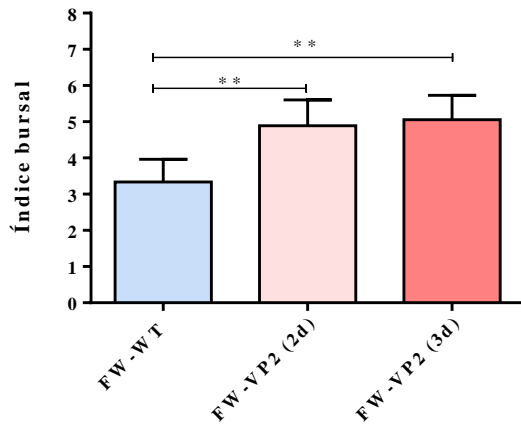


Figura 26. Detección de anticuerpos específicos anti-VP2. Se tomaron muestras de sangre a los 33 días de edad (previo al desafío) y se determinó la presencia de anticuerpos anti VP2 utilizando el *kit* comercial *Flock Check IBD* de Laboratorios IDEXX.

Con respecto a la protección, como se aprecia en la figura 27A, los grupos FW-VP2 (2d) y FW-VP2 (3d) presentaron un índice bursal significativamente mayor al obtenido con el grupo FW-WT. Además, en los grupos que recibieron 2 o 3 inmunizaciones del virus recombinante se evidenció una reducción significativa ($p=0,0022$) del título del virus de desafío en BF de más de 100 veces en comparación con las aves que recibieron FW-WT (Figura 27B). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en cuanto al índice bursal o al título de IBDV en BF entre los animales de los grupos FW-VP2 (2d) y FW-VP2 (3d).

A



B

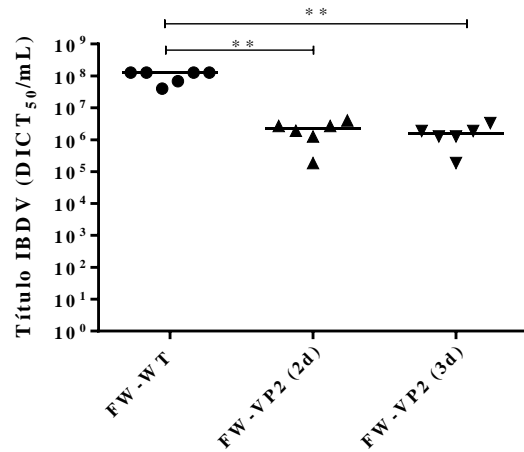


Figura 27. A) Medición del índice bursal calculado con la siguiente fórmula. (peso BF/peso corporal) x 1000. B) Título de IBDV en bolsa de Fabricio. Grupo FW-WT (inmunización s.c. en el ala a los 21 días de edad), grupo FW-VP2 (2d) (inmunización i.m. a los 11 días de edad y s.c. en el ala a los 21 días de edad) y grupo FW-VP2 (3d) (inmunización s.c. en el cuello al día de vida, i.m. a los 11 días de edad y s.c. en el ala a los 21 días de edad). Por vía s.c. en el ala los animales recibieron 6×10^3 UFP; por vía s.c. en el cuello recibieron 6×10^3 UFP; por vía i.m. recibieron 2×10^5 UFP de virus recombinante o salvaje. El título viral de IBDV presente en las BF se calculó utilizando el método de Reed y Muench (Reed y Muench, 1938). Los resultados obtenidos se analizaron utilizando la prueba de Mann Whitney (** $p < 0.01$).

Por otra parte, el análisis histopatológico de las BF reveló que los animales que recibieron el virus salvaje presentaban lesiones moderadas a severas con un *score* promedio mayor a 3. En cambio, las aves que recibieron 2 o 3 dosis de FW-VP2 presentaron un *score* promedio de 2 y 2,17, respectivamente. En el análisis individual, se observa que el 50% de las aves pertenecientes al grupo FW-VP2 (2d) no presentaron lesiones y el resto de las aves de este grupo solo presentaron lesiones moderadas (*score* 3). Sin embargo, las aves pertenecientes al grupo FW-VP2 (3d) presentaron variabilidad entre individuos observándose desde la ausencia de lesiones (2 animales) hasta lesiones graves (1 animal) (Tabla 12).

Grupo	Lesiones histopatológicas (Nº animales/score de 1 a 4) ^a				Score promedio
	1	2	3	4	-
FW-WT	0	0	4	2	3,33
FW-VP2 (2d)	3	0	3	0	2
FW-VP2 (3d)	2	2	1	1	2,17

Tabla 12. Lesiones histopatológicas en bolsa de Fabricio luego del desafío con IBDV en pollos inmunizados con dosis múltiples de FW-VP2. Los números indican la cantidad de aves clasificadas con determinado *score* histopatológico. Se utilizó el *score* descrito por (Pérez y col., 2008): 1: no lesión; 2: leve depleción de células linfoides en folículos (< 30%); 3: moderada atrofia o depleción de células de los folículos (31-75%); 4: severa necrosis y atrofia en todos los folículos (> 75%).

En conjunto estos resultados indican que dos inmunizaciones con FW-VP2 son capaces de reducir de forma significativa tanto la atrofia de la BF (mayor índice bursal) como el título de IBDV y las lesiones histopatológicas presentes en las BF. Además, se observó que una tercera inmunización no logra mejorar los parámetros de protección inducidos con dos inmunizaciones, sin embargo es capaz de aumentar significativamente ($p=0,0022$) la cantidad de anticuerpos anti-VP2.

Por último, con el propósito de determinar si la presencia de una respuesta anti vector estaría bloqueando el efecto de las dosis refuerzo, se midió diariamente el tamaño de las lesiones nodulares en el ala (“toma” de la vacuna) generadas por la aplicación de FW-VP2 a los 21 días de edad. La respuesta inmune específica contra FWPV (anti-vector) se evaluó como la capacidad de impedir o retrasar la formación de estas lesiones.

La aplicación de 1 o 2 inmunizaciones previas con FW-VP2 evitó la formación de lesiones nodulares en la membrana del ala, característica de la “toma de la vacuna de viruela aviar” (Figura 28). En estas aves, a los 3 dpi se observaron lesiones nodulares de, en promedio, 0,06 cm de diámetro y que fueron reabsorbidas a los 6 dpi. En cambio, en las aves que no habían sido inmunizadas previamente, la aplicación de FW-VP2 en la membrana del ala originó lesiones nodulares 4 veces mayores (en promedio de 0,24 cm de diámetro) y que fueron reabsorbidas a los 12 dpi (Figura 28). Estos resultados confirman que 1 o 2 inmunizaciones previas con FW-VP2 indujeron una respuesta anti-vector que evitó la formación de la lesión nodular denominada “toma de la vacuna”.

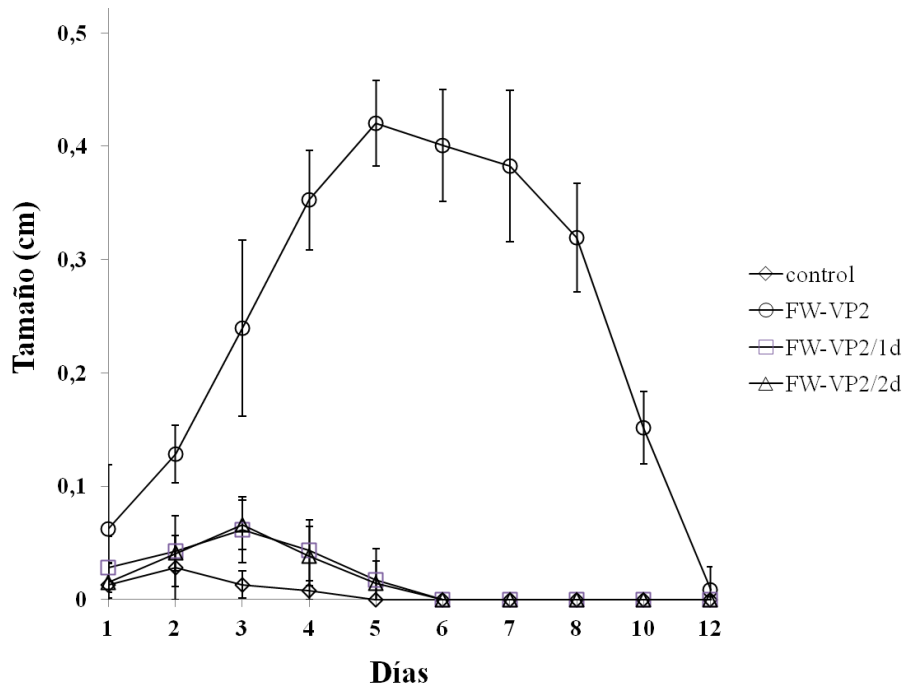


Figura 28. Evaluación del efecto de la respuesta inmune anti-FWPV sobre la “toma de la vacuna” de viruela aviar. Las aves se inmunizaron por vía subcutánea en la membrana del ala con PBS (control) o con FW-VP2 a los 21 días de edad. Las aves de los grupos control y FW-VP2 no fueron inmunizadas previamente. En cambio, las aves de los grupos FW-VP2/1d y FW-VP2/2d se inmunizaron previamente con 1 ó 2 dosis de FW-VP2, respectivamente. La medición de la lesiones se realizó diariamente hasta la desaparición de las mismas, utilizando un calibre.

Discusión



DISCUSIÓN

La vacunación es el método más económico y eficaz utilizado en la prevención de enfermedades infecciosas. En la industria avícola las aves se vacunan contra una amplia variedad de enfermedades infecciosas con el fin de evitar pérdidas directas ocasionadas por la muerte de los animales y la caída de la postura, o indirectas causadas por la inmunosupresión de las aves.

En particular, el virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa (IBDV) es un patógeno de alta relevancia en la producción avícola debido a la severa inmunosupresión que genera en las aves y a la gran resistencia que posee tanto a agentes físicos como químicos, pudiendo persistir en los ambientes de crianza incluso después de la limpieza y desinfección e infectando a las parvadas subsiguientes (Etteradossi y Saif, 2013). La inmunosupresión asociada con IBDV causa que las aves infectadas se vuelvan muy susceptibles a patógenos oportunistas e incluso puede afectar la respuesta inmune a otras vacunas, disminuyendo la eficacia de las mismas (Muller y col., 2003). Por otro lado, según la cepa circulante de IBDV se registran diferentes tasas de mortalidad, siendo del 50-100% para las cepas hipervirulentas (Manual OIE, 2012).

Desde hace muchos años, en la industria avícola la prevención de la enfermedad causada por IBDV se realiza mediante la administración de vacunas convencionales basadas en virus inactivado o vivo atenuado, que si bien son efectivas poseen ciertas desventajas como la necesidad de aplicar múltiples dosis o la inducción de un cierto grado de inmunosupresión, respectivamente. Es por ello que existe una tendencia para sustituir las vacunas convencionales por vacunas alternativas que combinen eficacia y seguridad.

En nuestro país se encuentran disponibles comercialmente cuatro vacunas de nueva generación para la prevención de la enfermedad infecciosa de la bolsa (IBD): CEVAC® TRANSMUNE IBD (Ceva), VAXXITEK HVT+IBD (Merial-Boehringer Ingelheim), VECTORMUNE HVT-IBD (Ceva) y R-VAC INMUNER IBD (Laboratorios Inmuner S.A.). La primera de ellas está basada en un complejo antígeno IBDV-anticuerpo que puede aplicarse *in ovo* (embriones de 18 días de incubación) o de forma subcutánea al día de vida de las aves. Esta vacuna es efectiva en presencia de anticuerpos maternos anti-IBDV porque el antígeno está “protegido” por los anticuerpos del complejo inmune y retrasa por varios días la replicación del virus vacunal que inducirá la respuesta

inmune protectora. Sin embargo, presenta la desventaja de poseer en su composición una cepa de IBDV de virulencia intermedia *plus* (cepa vacunal Winterfield 2512) que puede ocasionar lesiones en la BF, con consecuencias en el sistema inmunológico de las aves. Asimismo, tiene la limitación de no permitir diferenciar entre animales infectados y vacunados (DIVA). Las otras tres vacunas antes mencionadas están basadas en vectores virales que expresan la proteína VP2 de IBDV. Las vacunas de Merial-Boehringer Ingelheim y de Ceva están vectorizadas por el virus herpes de pavo (HVT) mientras que la de Laboratorios Inmuner está vectorizada por virus canarypox. Todas poseen la ventaja de no contener a IBDV en su composición y de no interferir en el diagnóstico de la enfermedad.

En base a estos antecedentes, y teniendo en cuenta las ventajas que ofrecen los poxvirus para el desarrollo de vacunas vectorizadas, nos propusimos implementar la metodología de vectores virales basados en virus fowlpox con el propósito de desarrollar vacunas bivalentes para pollos, que protejan contra la viruela aviar (vector) y contra otro patógeno de interés (antígeno foráneo vectorizado). En particular, en este trabajo de tesis se seleccionó a la proteína VP2 de (IBDV) como antígeno modelo para realizar las pruebas de concepto de un nuevo candidato vacunal basado en FWPV recombinantes (FWPV_r).

Teniendo en cuenta que la metodología para la obtención de FWPV_r no se encuentra disponible comercialmente, el objetivo general de esta tesis fue la implementación de una plataforma que permita obtener FWPV_r capaces de actuar *in vivo* como vectores de expresión de genes foráneos insertados en regiones genómicas no esenciales para la replicación viral.

Debido a que el gran tamaño del genoma de los poxvirus impide la manipulación directa del ADN por técnicas de ingeniería genética los poxvirus recombinantes se obtienen *in vivo* (cultivos celulares) mediante la recombinación homóloga entre el genoma viral y un vector de transferencia (VT) que lleva las secuencias de interés flanqueadas por las regiones virales que serán el sitio blanco de inserción. Además, teniendo en cuenta que los poxvirus replican en el citoplasma celular y que luego de la recombinación homóloga el virus salvaje replicará normalmente, en el diseño del VT es también necesario elegir el promotor poxviral que dirigirá la expresión del gen foráneo y el método de selección o *screening* de los virus recombinantes. Entonces, el primer objetivo específico de este trabajo de tesis fue el diseño del VT que permita obtener

FWPVr. Para ello, fue necesario elegir el promotor poxviral, identificar el sitio blanco de inserción y definir el método que permita seleccionar los FWPVr.

Los promotores poxvirales se clasifican en cuatro clases de acuerdo a su patrón de expresión temporal durante el ciclo de replicación viral: temprana, intermedia, tardía y constitutiva (temprano-tardía) (Baur y col., 2010). Los promotores tempranos dirigen la expresión génica antes de la replicación del ADN viral, seguida por los promotores intermedios y tardíos, que se activan secuencialmente (Carroll y Moss 1997 b). Por este motivo, la elección del promotor influye en el nivel y el momento de la expresión génica heteróloga (Taylor y Paoletti 1988). Boyle y colaboradores demostraron que la fuerza del promotor utilizado para la expresión del antígeno determina la dosis efectiva del antígeno y, por lo tanto, puede influir en el nivel de la respuesta inmune generada (Boyle, 1992). Generalmente, los promotores que son activos tanto en la fase temprana como en la fase tardía del ciclo de replicación viral, se emplean para dirigir la expresión *de novo* de antígenos en vectores poxvirales (Sutter y Staib 2003). Además, este tipo de promotores tiene la capacidad de dirigir la expresión transgénica a lo largo de todo el ciclo de replicación viral, asegurando la presencia de altos niveles de expresión de la proteína heteróloga para inducir potentes respuestas inmunitarias (Moss y Earl, 2002; Wennier y col., 2013). En general, cuando el vector es replicativo o con replicación limitada en el animal blanco de vacunación se utilizan los promotores de expresión temprana/tardía naturales o sintéticos, como p7.5 y pE/L (Skinner y col., 2005; Chakrabarti y col., 1997). Este sería el caso del vector viral basado en cepa vacunal de FWPV que se utilizará para vacunar pollos. En cambio, el mismo vector en una célula de mamífero no replicará por lo que la expresión del gen foráneo ocurrirá sólo durante la fase temprana de infección. En este caso, el ciclo replicativo viral será abortivo, no se duplicará el ADN viral y no iniciará la transcripción de la fase tardía.

En nuestro laboratorio se obtuvieron diversos inmunógenos basados en virus canarypox (CNPV) y vaccinia Ankara modificado (MVA) recombinantes. En todos los casos la expresión del antígeno foráneo, dirigida por el promotor pE/L, se confirmó de manera directa *in vitro* (*Western blot*) o indirecta *in vivo* (detección respuesta inmune específica) en mamíferos y aves. Debido a estos antecedentes, en este trabajo de tesis se utilizó el promotor pE/L para dirigir la expresión del gen de interés con el propósito de garantizar su expresión durante todo el ciclo de replicación viral.

Por otro lado, el sitio de inserción del gen foráneo puede incidir en la capacidad de replicación viral, en la estabilidad genética o incluso en el comportamiento *in vivo* del virus recombinante. En este trabajo se seleccionó el gen *fp9.030* como blanco de recombinación. Esta elección se basó en un estudio realizado por Laidlaw y colaboradores quienes demostraron que la mutagénesis por delección de este gen no afecta la capacidad de replicación viral *in vitro* (Laidlaw y col., 1998). Además, en nuestro laboratorio los CNPV recombinantes se obtienen por inserción de las secuencias foráneas interrumpiendo el gen *CNPV048*, ortólogo al gen *fp9.030* de FWPV (Zanetti y col., 2014).

Con respecto al método para el aislamiento de los FWPVr, se eligió la expresión de la enzima marcadora β -glucuronidasa (GUS) que facilita el posterior *screening* de los virus recombinantes por su capacidad de formar placas de lisis azules en presencia del sustrato X-Gluc. Este método es utilizado exitosamente en nuestro laboratorio para obtener CNPV y MVA recombinantes.

Como se describió en la sección de resultados, se utilizaron construcciones genéticas disponibles en el laboratorio o se amplificaron secuencias de interés mediante la técnica de PCR y se construyó el vector de transferencia VT-F030, herramienta molecular que permite la obtención de FWPVr por inserción de genes de interés en la región genómica correspondiente al gen *fp9.030*. En este vector, las secuencias de interés se clonan río abajo del promotor poxviral sintético pE/L y, posee el *cassette* denominado pH6-*uidA* para la expresión de la enzima GUS.

En este trabajo de tesis nos propusimos evaluar los FWPVr como inmunógenos contra la enfermedad de Gumboro en pollos. La elección del antígeno de interés se realizó considerando trabajos previos donde se describió la antigenicidad de la proteína VP2 en distintos vectores virales (Bayliss y col., 1991; Heine y Boyle, 1993; Darteil y col., 1995; Tsukamoto y col., 1999 y 2002; Huang y col., 2004; Francois y col., 2004; Cao y col., 2005; Zanetti y col., 2012 y 2014). La proteína VP2 es el componente mayoritario de la cápside de IBDV y contra la cual está dirigida la respuesta inmune protectora del hospedador. En el desarrollo de vacunas de nueva generación (vectorizadas o a subunidades) es el antígeno de elección para inducir protección contra IBDV.

Entonces, en el VT-F030 se subclonó la secuencia codificante de la proteína VP2 madura de IBDV obteniendo el VT-F030-VP2.

Con la obtención de los VT-F030 y VT-F030-VP2 se cumplió el primer objetivo específico de este trabajo de tesis.

Posteriormente, el VT-F030-VP2 se utilizó para obtener FWPVr por recombinación homóloga con el genoma viral de una cepa vacunal de dicho virus. Cabe destacar que la elección de la cepa parental a utilizar en el desarrollo de FWPVr es un factor clave. En la bibliografía se encuentran reportados decenas de trabajos en los cuales se utilizan distintas cepas parentales para la obtención de FWPVr (revisado en Sánchez-Sampedro y col., 2015), entre las cuales se destacan las cepas atenuadas TROVAC y FP9. Probablemente la gran cantidad de modificaciones y deleciones que alberga la cepa FP9 puede explicar la capacidad de esta cepa para inducir potentes respuestas inmunes celulares (Anderson y col., 2004). Asimismo, presenta la ventaja de poseer en su genoma sólo un remanente de secuencias del REV, ya que se observó que la presencia de este provirus en otras cepas de FWPV aumenta la inmunosupresión en las aves infectadas (Hertig y col., 1997; Singh y col., 2005; Davidson y col., 2008). Por otro lado, la cepa FP9 se utilizó en el desarrollo de vacunas experimentales contra enfermedades humanas como la tuberculosis (Rowland y col., 2013) y la malaria (Imoukhuede y col., 2006) y contra enfermedades aviares como IBD (Bayliss y col., 1991). En base a estos antecedentes, seleccionamos la cepa FP9 para la obtención de los FWPVr. Luego del proceso de infección (con la cepa FP9 de FWPV) y transfección (con el VT-F030-VP2) los virus recombinantes se aislaron por su capacidad de formar placas de lisis azules en presencia del sustrato X-Gluc. De este modo se obtuvo un *stock* puro de virus recombinante FW-VP2 y se confirmó la expresión del gen de interés a nivel transcripcional (mediante RT-PCR) y traduccional (por *Western blot*). En este último caso, se confirmó que el promotor pE/L dirigió la expresión del *gen vp2* durante todo el ciclo de replicación viral, detectándose la expresión de la proteína VP2 hasta los 5 dpi (último tiempo evaluado).

Una vez obtenidos los FWPVr se evaluó si la inserción de secuencias foráneas interrumpiendo el *gen fp9.030* afectaba la replicación viral *in vitro*. Las curvas de crecimiento de múltiples pasos de FP9 y FW-VP2 fueron similares tanto para la fracción de virus extracelular como intracelular. Estos datos indican que el *gen fp9.030* no es esencial para la replicación viral *in vitro*. Si bien este gen es ortólogo al que se utiliza en nuestro laboratorio para obtener CNPV recombinantes, existen ejemplos que muestran variabilidad entre diferentes poxvirus. En particular, uno de los sitios blanco

más utilizado para la obtención de virus vaccinia (VV) recombinantes es el gen que codifica para la proteína timidina quinasa (gen *FPV086*). Sin embargo, este gen es esencial para el crecimiento *in vitro* de los FWPV. En este sentido, Scheiflinger y col. (1997) demostraron que no fue posible obtener FWPVr puros utilizando como sitio blanco de inserción el gen *FPV086*. Por otro lado, Ogawa y colaboradores utilizaron como sitio de inserción el gen *FPV109* y observaron que la producción intracelular de los FWPVr no se veía afectada pero que el número de viriones extracelulares liberados por el virus recombinante representaba sólo el 20% del liberado por el virus parental (Ogawa y col., 1993). Este gen es homólogo al gen *FI2L* del VV, y en ese momento se desconocía la función de dichos genes. Actualmente, se conoce que dicha proteína es de expresión tardía y tiene un rol importante en el transporte de los viriones intracelulares envueltos (IEV) hacia la superficie celular mediado por microtúbulos. Por lo tanto, la ausencia del gen *FPV109* altera la morfología de los IEV disminuyendo la producción de virus extracelular envuelto (van Eijl y col., 2002).

Una condición indispensable para el uso de microorganismos genéticamente modificados como vacunas es su inocuidad. Si bien los FW-VP2 se obtuvieron en el contexto genético de una cepa vacunal de FWPV, fue importante demostrar que la interrupción del gen *fp9.030* no afecta las lesiones nodulares en la membrana del ala, características de la “toma de la vacuna” de viruela aviar. Esta técnica se utiliza en la industria avícola para evidenciar una vacunación exitosa contra la viruela aviar. Mediante esta metodología Heine y Boyle (1993), observaron que las lesiones generadas por la cepa vacunal FPV-M3 alcanzan el máximo tamaño a los 5 dpi, en cambio el virus recombinante derivado de dicha cepa parental presenta un tamaño de lesión menor, indicando que el sitio de inserción (río abajo del gen *FPV086*) estaría afectando el comportamiento del virus recombinante *in vivo*. En nuestro trabajo el virus recombinante se comporta *in vivo* de manera similar al virus parental. Se observó la aparición de las lesiones nodulares el primer día post vacunación, alcanzando el máximo tamaño a los 5 dpi (FW-WT 0,44 cm; FW-VP2 0,42 cm) y su reabsorción a los 12 dpi. De esta forma, se determinó por primera vez que la interrupción del gen *fp9.030* no afectaría el comportamiento *in vivo* de los FWPVr al ser inoculados en pollos por vía s.c. en la membrana del ala.

La obtención de los virus FW-VP2 recombinantes y su posterior caracterización permitió cumplimentar el segundo objetivo específico de este trabajo de tesis.

La utilidad de los FWPVr en el desarrollo de vacunas no puede ser predicho a nivel de diseño del vector viral, sino que para cada desarrollo es necesario evaluar su eficacia en animales de experimentación. Con lo cual, una vez obtenidos y caracterizados los virus recombinantes FW-VP2, nos propusimos evaluarlos como inmunógenos contra IBD en pollos certificados como libres de patógenos específicos (SPF). La protección conferida por el virus recombinante se evaluó entre la tercera y sexta semana de vida, período en el cual las aves presentan la mayor susceptibilidad a la infección causada por IBDV (van der Berg, 2000).

Las pruebas de concepto realizadas durante este trabajo de tesis para evaluar la protección conferida por FW-VP2 incluyeron distintos esquemas de vacunación (vía de inoculación y cantidad de dosis). Con respecto a las vías de inmunización, está descrito en la bibliografía que las inmunizaciones realizadas con FWPVr por vía intranasal o por vía ocular resultaron poco efectivas (Beard y col., 1992; Boyle y Heine, 1994; Qiao y col., 2009). En la industria avícola las aves son inmunizadas contra la viruela aviar por vía subcutánea en la membrana del ala y en la bibliografía existen sendos trabajos que demuestran la efectividad de esta vía en la inmunización con FWPVr (Tong y col., 2001; Yang y col., 2008; Sun y col., 2008; Qiao y col., 2009; Zhang y col., 2010).

Por otro lado, Qiao y colaboradores observaron que la inmunización por vía intramuscular con FWPVr que expresan los antígenos HA y NA del virus de la influenza aviar evita la diseminación del virus de desafío y genera protección frente al mismo, demostrando la efectividad de esta vía de inmunización (Qiao y col., 2009).

En este trabajo de tesis demostramos que la vacunación de pollos con una única dosis de FW-VP2 indujo diferentes grados de protección según se aplicara por vía s.c. en el ala o i.m. en la pata. En el primer caso, observamos que las aves presentaron daños histopatológicos leves en las BF y un aumento significativo del índice bursal pero no se detectaron diferencias significativas en cuanto al título de IBDV presente en las BF. En cambio, una única dosis de FW-VP2 por vía intramuscular indujo protección frente al desafío con IBDV porque se observó una reducción tanto del título del virus de desafío recuperado de la BF como de los daños histopatológicos en dicho órgano.

Con respecto al esquema de dosis múltiples, la aplicación de dos o tres inmunizaciones con FW-VP2 indujo una respuesta inmune específica capaz de reducir de forma significativa la atrofia de la BF (observándose mayor índice bursal), el título de IBDV y la gravedad de las lesiones histopatológicas presentes en BF. Sin embargo, la aplicación

de la tercera inmunización no mejoró los parámetros de protección inducidos con dos inmunizaciones de FW-VP2. El efecto esperado por la aplicación de una dosis de refuerzo estaría alterado por la inmunidad pre-existente contra el vector, generada por las inmunizaciones previas con el mismo. En relación a esto, son pocos los trabajos bibliográficos en los cuales se estudió el efecto de la respuesta inmune anti-vector. Swayne y colaboradores observaron que la protección conferida por una vacuna recombinante basada en un FWPV puede verse afectada si los animales fueron vacunados previamente contra la viruela aviar o si fueron expuestos a cepas de campo de FWPV. Los autores sugieren que la inmunidad pre-existente, ya sea humoral (anticuerpos derivados de la madre) o celular, podría restringir la infección y expresión del FWPVr (Swayne y col., 2000 b). Sin embargo, en otros trabajos se observó que la presencia de anticuerpos maternos contra FWPV, AIV o NDV no interfiere con la inmunidad conferida por el FWPVr (Bublot y col., 2006; Taylor y col., 1996). En general, las vacunas vectorizadas con FWPV y HVT no se ven significativamente afectadas por la presencia de anticuerpos derivados de la madre (inmunidad pasiva), ya que la inmunidad contra el vector es principalmente mediada por células (Armour y García, 2014).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, decidimos realizar la medición de las lesiones nodulares en la membrana del ala como una forma directa de evaluar la respuesta anti-vector. Observamos que las aves que recibieron 1 o 2 inmunizaciones previas con el virus recombinante desarrollaron lesiones nodulares 4 veces más pequeñas en comparación con las lesiones observadas en los animales que no fueron previamente inmunizados con el FW-VP2. Además, en las aves que no habían sido inmunizadas previamente, el tiempo requerido para la reabsorción de las lesiones fue el doble que el observado en las aves previamente inmunizadas con el FW-VP2. Esto indicaría que la eficacia del FW-VP2 es alterada por la inmunidad pre-existente contra FWPV.

Por otro lado, sólo se detectó una respuesta humoral específica contra IBDV en las aves vacunadas con tres dosis de FW-VP2. Estos resultados son similares a los obtenidos previamente en nuestro laboratorio con el vector viral CN-VP2 (Zanetti y col., 2014). En el mencionado estudio se detectaron niveles muy bajos de anticuerpos anti-IBDV después de la administración intramuscular de una única dosis de CN-VP2 (en pollos SPF) y fue necesaria la aplicación de dosis de refuerzo para aumentar significativamente los títulos de anticuerpos específicos (Zanetti y col., 2014). Luego de la aplicación de

CN-VP2 en única dosis, por vía s.c., al día de edad no fue posible detectar anticuerpos específicos anti-IBDV. Sin embargo, CN-VP2 indujo protección contra el desafío con IBDV, tanto frente a cepas de virulencia intermedia (Zanetti y col, 2016) como frente a cepas de campo (resultados no publicados que forman parte del *dossier* para el registro ante SENASA de la vacuna R-VAC-INMUNER IBD). Además, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis son consistentes con otros reportados en la bibliografía (Bayliss y col., 1991, Shaw y Davison 2000). Estos autores informaron que no fue posible detectar anticuerpos anti-VP2 en las aves vacunadas con un FWPV recombinante que expresa la proteína VP2 de IBDV aunque se observó una protección completa contra mortalidad y daños en la bolsa luego del desafío con una cepa virulenta de IBDV. Esto sugiere que otros mecanismos inmunes efectores, tales como inmunidad mediada por células, podrían estar involucrados en la protección inducida por vectores recombinantes basados en avipoxvirus.

La caracterización de la protección inducida por FW-VP2 en pollos SPF constituyó el tercer objetivo específico de este trabajo de tesis.

Si bien los resultados obtenidos en esta tesis son alentadores y constituyen la primera evaluación de FWPVr en el país, sería importante determinar la protección inducida por el FW-VP2 frente a cepas de campo de IBDV y de viruela aviar (FWPV), evaluando su potencial como vacuna bivalente contra ambas enfermedades.

Una estrategia que se utiliza para mejorar la respuesta inmune inducida por la vacunación y para sobrepasar la respuesta anti-vector generada por la aplicación de múltiples dosis, consiste en utilizar regímenes *prime-boost* heterólogos. Esta estrategia se basa en iniciar (*prime*) la respuesta inmunitaria utilizando un inmunógeno como por ejemplo una vacuna convencional o una vacuna a subunidad, para luego reforzar (*boost*) la respuesta inmune desencadenada inmunizando con un vector viral (como por ejemplo poxvirus o adenovirus) que exprese el mismo antígeno. Este tipo de estrategia aumenta significativamente la inmunidad específica lograda inicialmente, incluso en animales con inmunidad preexistente contra al vector (Zavala y col. 2001; Gherardi y col. 2003; Webster y col. 2005; Steensels y col., 2009; Niqueux y col., 2013; Richard-Mazet y col., 2014). En este contexto, sería interesante evaluar la eficacia del vector FW-VP2 en esquemas de inmunización *prime-boost* heterólogos combinado con vacunas

convencionales de IBDV, utilizando al vector viral como dosis refuerzo tanto para IBDV como para viruela aviar.

Por último, otra estrategia que mejoraría la eficacia de este candidato vacunal es la co-expresión de inmunomoduladores para potenciar las respuestas inmunes humorales y celulares con el propósito de inducir una mayor protección. Existen reportes que muestran que la co-expresión de proteínas inmunoduladoras como interleuquina-6 (Qian y col., 2012) interleuquina-18 (Chen y col., 2011) e IFN- γ (Wang y col., 2009; Shi y col., 2011) aumentan significativamente la eficacia de las vacunas basadas en FWPVr.

En conjunto, en este trabajo de tesis se implementó exitosamente la metodología de obtención de FWPV recombinantes, plataforma que puede ser utilizada para el desarrollo de vacunas para el sector veterinario.

El candidato vacunal FW-VP2 indujo protección frente al desafío con IBDV al ser inmunizado en una o dos dosis por vía i.m. Esto alienta su evaluación como candidato vacunal contra IBDV en esquemas de inmunización compatibles con la industria avícola.

Conclusiones



CONCLUSIONES

- Se diseñó y construyó el vector de transferencia denominado VT-F030 que permite la obtención de FWPV recombinantes por inserción de genes de interés en la región genómica correspondiente al gen *fp9.030*.
- Se obtuvo un candidato vacunal basado en FWPV que porta y expresa la secuencia codificante de la proteína VP2 madura de IBDV.
- Se demostró que la inserción de genes foráneos interrumpiendo el gen *fp9.030* no afecta la capacidad de replicación del virus recombinante *in vitro*.
- La vacunación, en única dosis por vía s.c., con FW-VP2 induce protección parcial frente al desafío con IBDV en pollos SPF porque reduce la atrofia de la BF, observándose daños histopatológicos leves, pero no disminuye el título del virus de desafío recuperado de la BF.
- La vacunación, en única dosis por vía i.m., con FW-VP2 induce protección frente al desafío con IBDV en pollos SPF debido a que reduce tanto el título del virus de desafío recuperado de la BF como los daños histopatológicos en dicho órgano.
- La aplicación de 2 o 3 dosis de FW-VP2 incrementa los niveles de anticuerpos específicos anti-IBDV pero no mejora la protección conferida por una única inmunización, porque el efecto de la dosis refuerzo estaría alterado por la inmunidad anti-vector inducida por las vacunaciones previas.

Los resultados obtenidos alientan la potencialidad del uso de los virus FW-VP2 (solos o combinados con otros inmunógenos recombinantes o convencionales) como vacuna inductora de respuestas protectoras contra IBDV en aves. Además, la plataforma desarrollada en este trabajo de tesis, implementada por primera vez en nuestro país, permitirá obtener FWPV recombinantes para la expresión de distintos antígenos de interés con el propósito de desarrollar vacunas que contribuyan al control y erradicación de enfermedades infecciosas que afectan al sector pecuario.

Bibliografía



BIBLIOGRAFÍA

- Afonso, C. L., Tulman, E. R., Lu, Z., Zsak, L., Kutish, G. F., & Rock, D. L. (2000). The genome of fowlpox virus. *Journal of Virology*, 74(8), 3815–3831. <http://doi.org/10.1128/JVI.74.8.3815-3831.2000>
- Amano, H., Morikawa, S., Shimizu, H., Shoji, I., Kurosawa, D., Matsuura, Y., Miyamura T., & Ueda, Y. (1999). Identification of the canarypox virus thymidine kinase gene and insertion of foreign genes. *Virology*, 256(2), 280–290. <http://doi.org/10.1006/VIRO.1999.9648>
- Anderson, R. J., Hannan, C. M., Gilbert, S. C., Laidlaw, S. M., Sheu, E. G., Korten, S., Sinden R., Butcher G., Skinner M., & Hill, A. V. S. (2004). Enhanced CD8+ T cell immune responses and protection elicited against Plasmodium berghei malaria by prime boost immunization regimens using a novel attenuated fowlpox virus. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 172(5), 3094–100. <http://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.172.5.3094>
- Antoine, G., Scheifflinger, F., Dorner, F., & Falkner, F. G. (1998). The complete genomic sequence of the modified vaccinia ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. *Virology*, 244(2), 365–396. <http://doi.org/10.1006/viro.1998.9123>
- Armour, N. K., & García, M. (2014). Current and future applications of viral-vectored recombinant vaccines in poultry. *The Poultry Informed Professional* (Vol. 134).
- Azad, A. A., Jagadish, M. N., Brown, M. A., & Hudson, P. J. (1987). Deletion mapping and expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of a birnavirus. *Virology*, 161(1), 145–152. [http://doi.org/10.1016/0042-6822\(87\)90180-2](http://doi.org/10.1016/0042-6822(87)90180-2)
- Baur, K., Brinkmann, K., Schweneker, M., Pätzold, J., Meisinger-Henschel, C., Hermann, J., Steigerwald R., Chaplin P., Suter M., & Hausmann, J. (2010). Immediate-early expression of a recombinant antigen by modified vaccinia virus ankara breaks the immunodominance of strong vector-specific B8R antigen in acute and memory CD8 T-cell responses. *Journal of Virology*, 84(17), 8743–52. <http://doi.org/10.1128/JVI.00604-10>
- Baxendale, W., and D. Luttkicken. (1981). The results of field trials with an inactivated Gumboro vaccine. *Dev Biol Stand.* 51, 211-19.
- Bayliss, C. D., Peters, R. W., Cook, J. K. A., Reece, R. L., Howes, K., Binns, M. M., & Bournsnel, M. E. G. (1991). A recombinant fowlpox virus that expresses the VP2 antigen of infectious bursal disease virus induces protection against mortality caused by the virus. *Archives of Virology*, 120(3–4), 193–205. <http://doi.org/10.1007/BF01310475>
- Beard, C. W., Schnitzlein, W. M., & Tripathy, D. N. (1992). Effect of route of administration on the efficacy of a recombinant fowlpox virus against H5N2 avian influenza. *Avian Dis*, 36(4), 1052–1055. <http://doi.org/10.2307/1591573>

- Besseboua, O., Ayad, A., & Benbarek, H. (2015). Determination of the optimal time of vaccination against infectious bursal disease virus (Gumboro) in Algeria. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 82(1), 887. <http://doi.org/doi:10.4102/ojvr.v82i1.887>.
- Bimboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6), 1513–1523. <http://doi.org/10.1093/nar/7.6.1513>
- Binns, M. M., Britton, B. S., Mason, C., & Boursnell, M. E. G. (1990). Analysis of the fowlpox virus genome region corresponding to the vaccinia virus D6 to A1 region: location of, and variation in, non-essential genes in poxviruses. *Journal of General Virology*, 71(12), 2873–2881. <http://doi.org/10.1099/0022-1317-71-12-2873>
- Blanchard, T. J., Andrea, P., Alcami, A., & Smith, G. L. (1998). Modified vaccinia virus Ankara undergoes limited replication in human cells and lacks several immunomodulatory proteins: implications for use as a human vaccine. *Journal of General Virology*, 79(5), 1159–1167. <http://doi.org/10.1099/0022-1317-79-5-1159>
- Blasco, R., & Moss, B. (1995). Selection of recombinant vaccinia viruses on the basis of plaque formation. *Gene*, 158(2), 157–162. [http://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00149-Z](http://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00149-Z)
- Block, H., Meyer-Block, K., Rebeski, D. E., Scharr, H., de Wit, S., Rohn, K., & Rautenschlein, S. (2007). A field study on the significance of vaccination against infectious bursal disease virus (IBDV) at the optimal time point in broiler flocks with maternally derived IBDV antibodies. *Avian Pathology*, 36(5), 401–409. <http://doi.org/10.1080/03079450701589175>
- Bolte, A. L., Meurer, J., & Kaleta, E. F. (1999). Avian host spectrum of avipoxviruses. *Avian Pathology*, 28(5), 415–432. <http://doi.org/10.1080/03079459994434>
- Böttcher, B., Kiselev, N. A., Stel'Mashchuk, V. Y., Perevozchikova, N. A., Borisov, A. V., & Crowther, R. A. (1997). Three-dimensional structure of infectious bursal disease virus determined by electron cryomicroscopy. *Journal of Virology*, 71(1), 325–30.
- Boulanger, D., Smith, T., & Skinner, M. A. (2000). Morphogenesis and release of fowlpox virus. *Journal of General Virology*, 81(3), 675–687. <http://doi.org/10.1099/0022-1317-81-3-675>
- Boursnell, M. E. G., Green, P. F., Samson, A. C. R., Campbell, J. I. A., Deuter, A., Peters, R. W., Millar N., Emmerson P., & Binns, M. M. (1990). A recombinant fowlpox virus expressing the hemagglutinin-neuraminidase gene of Newcastle disease virus (NDV) protects chickens against challenge NDV. *Virology*, 178(1), 297–300. [http://doi.org/10.1016/0042-6822\(90\)90408-J](http://doi.org/10.1016/0042-6822(90)90408-J)
- Boyle, D. B. (1992). Quantitative assessment of poxvirus promoters in fowlpox and vaccinia virus recombinants. *Virus Genes*, 6(3), 281–290. <http://doi.org/10.1007/BF01702566>

- Boyle, D. B., & Heine, H. G. (1994). Influence of dose and route of inoculation on responses of chickens to recombinant fowlpox virus vaccines. *Veterinary Microbiology*, *41*(1–2), 173–181. [http://doi.org/10.1016/0378-1135\(94\)90146-5](http://doi.org/10.1016/0378-1135(94)90146-5)
- Boyle DB (2007). Advances in Infectious Diseases. In Poxviruses. Genus Avipoxvirus. Editores: Mercer AA, Schmidt A, Weber O. Birkhauser Verlag, Basel. Switzerland. p. 217-251.
- Brandt, M., Yao, K., Liu, M., Heckert, R. A., & Vakharia, V. N. (2001). Molecular determinants of virulence, cell tropism, and pathogenic phenotype of infectious bursal disease virus. *Journal of Virology*, *75*(24), 11974–11982. <http://doi.org/10.1128/JVI.75.24.11974-11982.2001>
- Broyles, S. S. (2003). Vaccinia virus transcription. *Journal of General Virology*, *84*(9), 2293–2303. <http://doi.org/10.1099/vir.0.18942-0>
- Bublot, M., Pritchard, N., Swayne, D. E., Selleck, P., Karaca, K., Suarez, D. L., Audonnet J., & Mickle, T. R. (2006). Development and use of fowlpox vectored vaccines for avian influenza. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1081*(1), 193–201. <http://doi.org/10.1196/annals.1373.023>
- Cao, Y. C., Shi, Q. C., Ma, J. Y., Xie, Q. M., & Bi, Y. Z. (2005). Vaccination against very virulent infectious bursal disease virus using recombinant T4 bacteriophage displaying viral protein VP2. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, *37*(10), 657–664. <http://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2005.00101.x>
- Carroll, M. W., & Moss, B. (1997 a). Host range and cytopathogenicity of the highly attenuated mva strain of vaccinia virus: propagation and generation of recombinant viruses in a nonhuman mammalian cell line. *Virology*, *238*(2), 198–211. <http://doi.org/10.1006/viro.1997.8845>
- Carroll, M. W., & Moss, B. (1997 b). Poxviruses as expression vectors. *Current Opinion in Biotechnology*, *8*(5), 573–577. [http://doi.org/10.1016/S0958-1669\(97\)80031-6](http://doi.org/10.1016/S0958-1669(97)80031-6)
- Caston, J. R., Martinez-Torrecuadrada, J. L., Maraver, A., Lombardo, E., Rodriguez, J. F., Casal, J. I., & Carrascosa, J. L. (2001). C terminus of infectious bursal disease virus major capsid protein VP2 is involved in definition of the T number for capsid assembly. *Journal of Virology*, *75*(22), 10815–10828. <http://doi.org/10.1128/JVI.75.22.10815-10828.2001>
- Chakrabarti, S., Sisler, J. R., & Moss, B. (1997). Compact, synthetic, vaccinia virus early/late promoter for protein expression. *BioTechniques*, *23*(6), 1094–1097.
- Chang, H. C., Lin, T. L., & Wu, C. C. (2003). DNA vaccination with plasmids containing various fragments of large segment genome of infectious bursal disease virus. *Vaccine*, *21*(5–6), 507–513. [http://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00473-5](http://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00473-5)

- Chang, H. C., Lin, T. L., & Wu, C. C. (2001). DNA-mediated vaccination against infectious bursal disease in chickens. *Vaccine*, 20(3–4), 328–335. [http://doi.org/10.1016/S0264-410X\(01\)00376-0](http://doi.org/10.1016/S0264-410X(01)00376-0)
- Chen, H.-Y., Shang, Y.-H., Yao, H.-X., Cui, B.-A., Zhang, H.-Y., Wang, Z.-X., & Duan, T.-Y. (2011). Immune responses of chickens inoculated with a recombinant fowlpox vaccine coexpressing HA of H9N2 avian influenza virus and chicken IL-18. *Antiviral Research*, 91(1), 50–56. <http://doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.04.007>
- Collier, L. H. (1955). The development of a stable smallpox vaccine. *The Journal of Hygiene*, 53(1), 76–101.
- Conte Grand M.D. (2006). Vectores virales de expresión basados en virus canarypox recombinantes: su desarrollo y evaluación como inmunógenos derivados de patógenos de interés pecuario. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.
- Cosgrove, A. S. (1962). An Apparently New Disease of Chickens: Avian Nephrosis. *Avian Diseases*, 6(3), 385. <http://doi.org/10.2307/1587909>
- Cottingham, M. G., & Carroll, M. W. (2013). Recombinant MVA vaccines: dispelling the myths. *Vaccine*, 31(39), 4247–4251. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.03.021>
- Cottingham, M. G., van Maurik, A., Zago, M., Newton, A. T., Anderson, R. J., Howard, M. K., Schneider J., & Skinner, M. A. (2006). Different levels of immunogenicity of two strains of Fowlpox virus as recombinant vaccine vectors eliciting T-cell responses in heterologous prime-boost vaccination strategies. *Clinical and Vaccine Immunology : CVI*, 13(7), 747–57. <http://doi.org/10.1128/CVI.00088-06>
- Coulibaly, F., Chevalier, C., Gutsche, I., Pous, J., Navaza, J., Bressanelli, S., Delmas B., & Rey, F. A. (2005). The birnavirus crystal structure reveals structural relationships among icosahedral viruses. *Cell*, 120(6), 761–772. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.009>
- Darteil, R., Bublot, M., Laplace, E., Bouquet, J.-F., Audonnet, J.-C., & Rivière, M. (1995). Herpesvirus of turkey recombinant viruses expressing infectious bursal disease virus (IBDV) VP2 immunogen induce protection against an IBDV virulent challenge in chickens. *Virology*, 211(2), 481–490. <http://doi.org/10.1006/viro.1995.1430>
- Davidson, I., Shkoda, I., & Perk, S. (2008). Integration of the reticuloendotheliosis virus envelope gene into the poultry fowlpox virus genome is not universal. *Journal of General Virology*, 89(10), 2456–2460. <http://doi.org/10.1099/vir.0.2008/001313-0>
- Davison, F., Magor, K.E., & Kaspers, B. (2008). Structure and evolution of avian immunoglobulins. En: *Avian Immunology 1^{ra} edición*. p. 107-28. Editores: F. Davison, B. Kaspers & K.A. Schat. London: Academic Press, Inglaterra.

- De Wit, J.J. (1998). Gumboro disease: estimation of optimal time of vaccination by the Deventer formula. *Polish Veterinary Journal*, 3, 19-22.
- Dellaporta, S. L., Wood, J., & Hicks, J. B. (1983). A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1(4), 19-21. <http://doi.org/10.1007/BF02712670>
- Delmas, B., F.S.B. Kibenge, J.C. Leong, E. Mundt, V.N. Vakharia, and J.L. Wu (2004). Virus Taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.
- Dey, S., Chellappa, M., Pathak, D., Gaikwad, S., Yadav, K., Ramakrishnan, S., & Vakharia, V. (2017). Newcastle disease virus vectored bivalent vaccine against virulent infectious bursal disease and Newcastle disease of chickens. *Vaccines*, 5(4), 31. <http://doi.org/10.3390/vaccines5040031>
- Dobos, P., Hill, B. J., Hallett, R., Kells, D. T., Becht, H., & Teninges, D. (1979). Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. *Journal of Virology*, 32(2), 593-605.
- Draper, S. J., & Heeney, J. L. (2010). Viruses as vaccine vectors for infectious diseases and cancer. *Nature Reviews Microbiology*, 8(1), 62-73. <http://doi.org/10.1038/nrmicro2240>
- Etteradossi & Saif (2013). Pox. En: Diseases of Poultry, 13^{ra} edición, Sección 2, Capítulo 7: 219-246. Editores: Swayne D.E., Glisson J.R., McDougald L.R., Nolan L.K., Suarez D.L. & Nair V. Wiley-Blackwell, USA.
- Fahey, K. J., Crooks, J. K., & Fraser, R. A. (1987). Assessment by ELISA of passively acquired protection against infectious bursal disease virus in chickens. *Australian Veterinary Journal*, 64(7), 203-7.
- Fahey, K. J., Erny, K., & Crooks, J. (1989). A conformational immunogen on VP-2 of infectious bursal disease virus that induces virus-neutralizing antibodies that passively protect chickens. *Journal of General Virology*, 70(6), 1473-1481. <http://doi.org/10.1099/0022-1317-70-6-1473>
- Fenner, F. (1996). Poxviruses. *En Fields Virology*, 3^{ra} edición. Vol. 2, capítulo 83: 2673-2702. Editores: Fields, B. N.; Knipe, D. M. y Howley, P. M. Lippincott-Raven Press, New York, USA.
- Ferrer, M. F., Del Médico Zajac, M. P., Zanetti, F. A., Valera, A. R., Zabal, O., & Calamante, G. (2011). Recombinant MVA expressing secreted glycoprotein D of BoHV-1 induces systemic and mucosal immunity in animal models. *Viral Immunology*, 24(4), 331-339. <http://doi.org/10.1089/vim.2011.0018>
- Flint, S.J., Enquist, L.W., Racaniello, V.R., & Skalka, A.M. (2003). Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control of Animal Viruses. 2^{da} edición. ASM Press, Washington DC, USA.

- Fodor, N., Dube, S. K., Fodor, I., Horváth, E., Nagy, E., Vakharia, V. N., & Rencendorsh, A. (1999). Induction of protective immunity in chickens immunised with plasmid dna encoding infectious bursal disease virus antigens. *Acta Veterinaria Hungarica*, 47(4), 481–492. <http://doi.org/10.1556/AVet.47.1999.4.8>
- Francois, A., Chevalier, C., Delmas, B., Eterradossi, N., Toquin, D., Rivallan, G., & Langlois, P. (2004). Avian adenovirus CELO recombinants expressing VP2 of infectious bursal disease virus induce protection against bursal disease in chickens. *Vaccine*, 22(17–18), 2351–2360. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2003.10.039>
- Gardin Y. (1994). Application of an invasive vaccine under controlled conditions to solve Gumboro disease problems in France. En: Proceedings of the 1st International Symposium on Infectious Bursal Disease and Chicken Infectious Anaemia. p. 286-304. Rauschholzhausen, Germany.
- Gardin Y., Palya V., Paniago M., Cazaban C., Alva B., Lozano F & Attrache J. (2014). Gumboro Disease Special: The rational use of vaccines and vaccinations for real control of Gumboro disease, supplement of World Poultry. Publicado por Reed Business International Agri Media. Holanda-Francia.
- Garriga, D., Querol-Audi, J., Abaitua, F., Saugar, I., Pous, J., Verdaguer, N., Caston J. R., & Rodriguez, J. F. (2006). The 2.6-Angstrom structure of infectious bursal disease virus-derived T=1 particles reveals new stabilizing elements of the virus capsid. *Journal of Virology*, 80(14), 6895–6905. <http://doi.org/10.1128/JVI.00368-06>
- Ge, J., An, Q., Song, S., Gao, D., & Ping, W. (2015). Construction of recombinant baculoviruses expressing infectious bursal disease virus main protective antigen and their immune effects on chickens. *PLOS ONE*, 10(7), e0132993. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0132993>
- Gherardi, M. M., Nájera, J. L., Pérez-Jiménez, E., Guerra, S., García-Sastre, A., & Esteban, M. (2003). Prime-boost immunization schedules based on influenza virus and vaccinia virus vectors potentiate cellular immune responses against human immunodeficiency virus Env protein systemically and in the genitoretal draining lymph nodes. *Journal of Virology*, 77(12), 7048–57. <http://doi.org/10.1128/JVI.77.12.7048-7057.2003>
- Giambrone J. (1987). Evaluation and morphometric relationships in the infectious disease of the bursa as a diagnostic method: *The American Association of Avian Pathology*, Bull Tech, 23, 24-38.
- Giambrone, J. J., Dormitorio, T., & Brown, T. (2001). Safety and efficacy of *in ovo* administration of infectious bursal disease viral vaccines. *Avian Diseases*, 45(1), 144–148. <http://doi.org/10.2307/1593021>
- Gómez, E., Lucero, M. S., Chimeno Zoth, S., Carballeda, J. M., Gravisaco, M. J., & Berinstein, A. (2013). Transient expression of VP2 in *Nicotiana benthamiana* and its use as a plant-based vaccine against Infectious Bursal Disease Virus. *Vaccine*, 31(23), 2623–2627. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.03.064>

- Gubser, C., Hué, S., Kellam, P., & Smith, G. L. (2004). Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. *Journal of General Virology*, 85(1), 105–117. <http://doi.org/10.1099/vir.0.19565-0>
- Haddad, E. E., Whitfill, C. E., Avakian, A. P., Ricks, C. A., Andrews, P. D., Thoma, J. A., & Wakenell, P. S. (1997). Efficacy of a novel infectious bursal disease virus immune complex vaccine in broiler chickens. *Avian Diseases*, 41(4), 882–9. <http://doi.org/10.2307/1592342>
- Hanahan D. (1985). Techniques for transformation of *Escherichia coli*. *En: DNA Cloning: a Practical Approach*, Vol. 1, p. 109-135. Editor: Glover, D.M... IRL Press. Oxford, Inglaterra.
- Harrison, S. C., Alberts, B., Ehrenfeld, E., Enquist, L., Fineberg, H., McKnight, S. L., Moss B., O'Donnell M., Ploegh H., Schmid S.L., K., Walter K.P., & Theriot, J. (2004). Discovery of antivirals against smallpox. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(31), 11178–92. <http://doi.org/10.1073/pnas.0403600101>
- Hatano, Y., Yoshida, M., Uno, F., Yoshida, S., Osafune, N., Ono, K., & Yamada, M. (2001). Budding of fowlpox and pigeonpox viruses at the surface of infected cells. *Journal of Electron Microscopy*, 50(2), 113–124. <http://doi.org/10.1093/jmicro/50.2.113>
- Heine, H. G., & Boyle, D. B. (1993). Infectious bursal disease virus structural protein VP 2 expressed by a fowlpox virus recombinant confers protection against disease in chickens. *Archives of Virology*, 131(3–4), 277–292. <http://doi.org/10.1007/BF01378632>
- Heine, H. G., Foord, A. J., Young, P. L., Hooper, P. T., Lehrbach, P. R., & Boyle, D. B. (1997). Recombinant fowlpox virus vaccines against Australian virulent Marek's disease virus. Gene sequence analysis and comparison of vaccine efficacy in specific pathogen free and production chickens. *Virus Research*, 50(1), 23–33. [http://doi.org/10.1016/S0168-1702\(97\)00049-X](http://doi.org/10.1016/S0168-1702(97)00049-X)
- Hertig, C., Coupar, B. E. H., Gould, A. R., & Boyle, D. B. (1997). Field and vaccine strains of fowlpox virus carry integrated sequences from the avian retrovirus, reticuloendotheliosis virus. *Virology*, 235(2), 367–376. <http://doi.org/10.1006/viro.1997.8691>
- Hsieh, M. K., Wu, C. C., & Lin, T. L. (2010). DNA-mediated vaccination conferring protection against infectious bursal disease in broiler chickens in the presence of maternal antibody. *Vaccine*, 28(23), 3936–3943. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.03.066>
- Huang, Z., Elankumaran, S., Yunus, A. S., & Samal, S. K. (2004). A recombinant Newcastle disease virus (NDV) expressing VP2 protein of infectious bursal disease virus (IBDV) protects against NDV and IBDV. *Journal of Virology*, 78(18), 10054–63. <http://doi.org/10.1128/JVI.78.18.10054-10063.2004>

- Humphreys, I. R., & Sebastian, S. (2018, January). Novel viral vectors in infectious diseases. *Immunology*. <http://doi.org/10.1111/imm.12829>
- Huo, S., Zuo, Y., Li, N., Li, X., Zhang, Y., Wang, L., Liu H., Zhang J., Cui D., He P., Xu J., Li Y., Zhu X., & Zhong, F. (2016). Chicken IL-7 as a potent adjuvant enhances IBDV VP2 DNA vaccine immunogenicity and protective efficacy. *Veterinary Microbiology*, *193*, 145–155. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.08.016>
- Hutchings, C. L., Gilbert, S. C., Hill, A. V. S., & Moore, A. C. (2005). Novel protein and poxvirus-based vaccine combinations for simultaneous induction of humoral and cell-mediated immunity. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *175*(1), 599–606. <http://doi.org/10.1093/imm/175/1/599>
- Ignjatovic, J., Gould, G., Trinidad, L., & Sapats, S. (2006). Chicken recombinant antibodies against infectious bursal disease virus are able to form antibody–virus immune complex. *Avian Pathology*, *35*(4), 293–301. <http://doi.org/10.1080/03079450600823378>
- Imoukhuede, E. B., Berthoud, T., Milligan, P., Bojang, K., Ismaili, J., Keating, S., Nwakanma D., Keita S., Njie F., Sowe M., Todryk S., Laidlaw S.M., Skinner M.A., Lang T., Gilbert S., Greenwood B.M., & Hill, A. V. (2006). Safety and immunogenicity of the malaria candidate vaccines FP9 CS and MVA CS in adult Gambian men. *Vaccine*, *24*(42–43), 6526–6533. <http://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2006.06.022>
- Irigoyen, N., Garriga, D., Navarro, A., Verdaguer, N., Rodríguez, J. F., & Castón, J. R. (2009). Autoproteolytic Activity Derived from the Infectious Bursal Disease Virus Capsid Protein. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(12), 8064–8072. <http://doi.org/10.1074/jbc.M808942200>
- Iván, J., Velhner, M., Ursu, K., Germán, P., Mató, T., Drén, C. N., & Mészáros, J. (2005). Delayed vaccine virus replication in chickens vaccinated subcutaneously with an immune complex infectious bursal disease vaccine: Quantification of vaccine virus by real-time polymerase chain reaction. *Canadian Journal of Veterinary Research*, *69*(2), 135–142.
- Jackwood, D. H., & Saif, Y. M. (1987). Antigenic Diversity of Infectious Bursal Disease Viruses. *Avian Diseases*, *31*(4), 766. <http://doi.org/10.2307/1591028>
- Jeurissen, S. H. M., Janse, E. M., Lehrbach, P. R., Haddad, E. E., Avakian, A., & Whitfill, C. E. (1998). The working mechanism of an immune complex vaccine that protects chickens against infectious bursal disease. *Immunology*, *95*(3), 494–500. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2567.1998.00617.x>
- Karaca, K., Sharma, J. M., Winslow, B. J., Junker, D. E., Reddy, S., Cochran, M., & McMillen, J. (1998). Recombinant fowlpox viruses coexpressing chicken type I IFN and Newcastle disease virus HN and F genes: Influence of IFN on protective efficacy and humoral responses of chickens following *in ovo* or post-hatch

- administration of recombinant viruses. *Vaccine*, 16(16), 1496–1503.
[http://doi.org/10.1016/S0264-410X\(97\)00295-8](http://doi.org/10.1016/S0264-410X(97)00295-8)
- Kates, J. R., & McAuslan, B. R. (1967). Poxvirus DNA-dependent RNA polymerase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 58(0027–8424 (Print)), 134–141.
- Kates, J., & Beeson, J. (1970). Ribonucleic acid synthesis in vaccinia virus: II. Synthesis of polyriboadenylic acid. *Journal of Molecular Biology*, 50(1), 19–33.
[http://doi.org/10.1016/0022-2836\(70\)90101-4](http://doi.org/10.1016/0022-2836(70)90101-4)
- Kim, S., Sung, H. W., Han, J. H., Jackwood, D., & Kwon, H. M. (2004). Protection against very virulent infectious bursal disease virus in chickens immunized with DNA vaccines. *Veterinary Microbiology*, 101(1), 39–51.
<http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.03.009>
- Kumar, K., Singh, K. C. P., & Prasad, C. B. (2000). Immune responses to intermediate strain IBD vaccine at different levels of maternal antibody in broiler chickens. *Tropical Animal Health and Production*, 32(6), 357–360.
<http://doi.org/10.1023/A:1005225501513>
- Laidlaw, S. M., Anwar, M. A., Thomas, W., Green, P., Shaw, K., & Skinner, M. A. (1998). Fowlpox virus encodes nonessential homologs of cellular alpha-SNAP, PC-1, and an orphan human homolog of a secreted nematode protein. *J Virol*, 72(8), 6742–6751.
- Laidlaw, S. M., & Skinner, M. A. (2004). Comparison of the genome sequence of FP9, an attenuated, tissue culture-adapted European strain of Fowlpox virus, with those of virulent American and European viruses. *Journal of General Virology*, 85(2), 305–322. <http://doi.org/10.1099/vir.0.19568-0>
- Lee, C.-C., Ko, T.-P., Chou, C.-C., Yoshimura, M., Doong, S.-R., Wang, M.-Y., & Wang, A. H.-J. (2006). Crystal structure of infectious bursal disease virus VP2 subviral particle at 2.6Å resolution: implications in virion assembly and immunogenicity. *Journal of Structural Biology*, 155(1), 74–86.
<http://doi.org/10.1016/j.jsb.2006.02.014>
- Lee, L. F., Bacon, L. D., Yoshida, S., Yanagida, N., Zhang, H. M., & Witter, R. L. (2004). The efficacy of recombinant fowlpox vaccine protection against Marek's disease: its dependence on chicken line and B haplotype. *Avian Diseases*, 48(1), 129–137. <http://doi.org/10.1637/7083>
- Lee, L. F., Witter, R. L., Reddy, S. M., Wu, P., Yanagida, N., & Yoshida, S. (2003). Protection and synergism by recombinant fowl pox vaccines expressing multiple genes from Marek's disease virus. *Avian Diseases*, 47(3), 549–558.
<http://doi.org/10.1637/6073>
- Lejal, N., Da Costa, B., Delmas, B., & Huet, J.-C. (2000). Role of Ser-652 and Lys-692 in the protease activity of infectious bursal disease virus VP4 and identification of its substrate cleavage sites. *Journal of General Virology*, 81(4), 983–992.
<http://doi.org/10.1099/0022-1317-81-4-983>

- Leong, J. C., D. Brown, P. Dobeos, F. S. B. Kmenge, J. E. Ludert, H. Müller, E. Mundt & B. Nicholson, (2000). Family Birnaviridae. En: virus Taxonomy. 7th Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. p. 481-490. Editor: van Regenmortel, C.M. Academic Press.
- Letzel, T., Coulibaly, F., Rey, F. A., Delmas, B., Jagt, E., van Loon, A. A. M. W., & Mundt, E. (2007). Molecular and structural bases for the antigenicity of VP2 of infectious bursal disease virus. *Journal of Virology*, *81*(23), 12827–12835. <http://doi.org/10.1128/JVI.01501-07>
- Li, J., Huang, Y., Liang, X., Lu, M., Li, L., Yu, L., & Deng, R. (2003). Plasmid DNA encoding antigens of infectious bursal disease viruses induce protective immune responses in chickens: Factors influencing efficacy. *Virus Research*, *98*(1), 63–74. <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2003.08.017>
- Li, J., Liang, X., Huang, Y., Meng, S., Xie, R., Deng, R., & Yu, L. (2004). Enhancement of the immunogenicity of DNA vaccine against infectious bursal disease virus by co-delivery with plasmid encoding chicken interleukin 2. *Virology*, *329*(1), 89–100. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2004.07.033>
- Li, K., Gao, H., Gao, L., Qi, X., Gao, Y., Qin, L., Wang Y., & Wang, X. (2013). Adjuvant effects of interleukin-18 in DNA vaccination against infectious bursal disease virus in chickens. *Vaccine*, *31*(14), 1799–1805. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.01.056>
- Li, K., Liu, Y., Zhang, Y., Gao, L., Liu, C., Cui, H., Qi X., Gao Y., Zhong L., & Wang, X. (2017). Protective efficacy of a novel recombinant Marek's disease virus vector vaccine against infectious bursal disease in chickens with or without maternal antibodies. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *186*, 55–59. <http://doi.org/10.1016/j.vetimm.2017.02.003>
- Limbach, K. J., & Paoletti, E. (1996). Non-replicating expression vectors: applications in vaccine development and gene therapy. *Epidemiology and Infection*, *116*(3), 241–256. <http://doi.org/10.1017/S0950268800052547>
- Liu, L., Zhang, W., Song, Y., Wang, W., Zhang, Y., Wang, T., Li K., Pan Q., Qi X., Gao Y., Gao L., Liu C., Zhang Y., Wang Y., He G., Wang X., & Cui, H. (2018). Recombinant *Lactococcus lactis* co-expressing OmpH of an M cell-targeting ligand and IBDV-VP2 protein provide immunological protection in chickens. *Vaccine*, *36*(5), 729–735. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.12.027>
- Lucio, B., & Hitchner, S. B. (1979). Infectious bursal disease emulsified vaccine: effect upon neutralizing-antibody levels in the dam and subsequent protection of the progeny. *Avian Diseases*, *23*(2), 466–478. <http://doi.org/10.2307/1589577>
- Mahgoub, H. A., Bailey, M., & Kaiser, P. (2012). An overview of infectious bursal disease. *Archives of Virology*, *157*(11), 2047–2057. <http://doi.org/10.1007/s00705-012-1377-9>

- Maniatis T., Fritsch E. F. & Sambrook J. (1982). *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Mayr, A., & Malicki, K. (1966). Attenuation of virulent fowl pox virus in tissue culture and characteristics of the attenuated virus. *Zentralbl Veterinarmed B*, 13(1), 1–13.
- Mazariegos, L., Lukert, P., & Brown, J. (1990). Pathogenicity and immunosuppressive properties of infectious bursal disease “intermediate” strains. *Avian Diseases*, 34(1), 203–208. <http://doi.org/10.2307/1591353>
- McFerran, J. B., McNulty, M. S., McKillop, E. R., Connor, T. J., McCracken, R. M., Collins, D. S., & Allan, G. M. (1980). Isolation and serological studies with infectious bursal disease viruses from fowl, turkeys and ducks: Demonstration of a second serotype. *Avian Pathology*, 9(3), 395–404. <http://doi.org/10.1080/03079458008418423>
- Moss, B. (2006). Poxvirus entry and membrane fusion. *Virology*, 344(1), 48–54. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2005.09.037>
- Moss, B. (1996 a). Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(21), 11341–8. <http://doi.org/10.1073/pnas.93.21.11341>
- Moss, B. (1996 b). *Poxviridae: the viruses and their replication*. En: *Fields Virology*, 3^{ra} ed. Vol. 2, capítulo 83: 2637-2671. Editores: Fields, B. N.; Knipe, D. M. y Howley, P. M. New York. Lippincott-Raven Press.
- Moss, B., & Earl, P. L. (2002). Overview of the vaccinia virus expression system. In *Current Protocols in Molecular Biology* (Vol. Chapter 16, p. Unit16.15). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <http://doi.org/10.1002/0471142727.mb1615s60>
- Müller, H., Scholtissek, C., & Becht, H. (1979 a). The genome of infectious bursal disease virus consists of two segments of double-stranded RNA. *Journal of Virology*, 31(3), 584–9.
- Müller, H., Islam, M. R., & Raue, R. (2003). Research on infectious bursal disease--the past, the present and the future. *Veterinary Microbiology*, 97(1–2), 153–65. <http://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2003.08.005>
- Müller, H., Mundt, E., Etteradossi, N., & Islam, M. R. (2012). Current status of vaccines against infectious bursal disease. *Avian Pathology*, 41(2), 133–139. <http://doi.org/10.1080/03079457.2012.661403>
- Müller, R., Käufer, I., Reinacher, M., & Weiss, E. (1979 b). Immunofluorescent studies of early virus propagation after oral infection with infectious bursal disease virus (IBDV). *Zentralblatt Für Veterinärmedizin Reihe B*, 26(5), 345–352. <http://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1979.tb00823.x>

- Mundt, E., Beyer, J., & Muller, H. (1995). Identification of a novel viral protein in infectious bursal disease virus-infected cells. *Journal of General Virology*, 76(2), 437–443. <http://doi.org/10.1099/0022-1317-76-2-437>
- Munyon, W., Paoletti, E., & Grace, J. T. (1967). RNA polymerase activity in purified infectious vaccinia virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 58(6), 2280–7.
- Negash, T., Al-Garib, S. O., & Gruys, E. (2004). Comparison of *in ovo* and post-hatch vaccination with particular reference to infectious bursal disease. A review. *Veterinary Quarterly*, 26(2), 76–87. <http://doi.org/10.1080/01652176.2004.9695170>
- Niqueux, É., Guionie, O., Amelot, M., & Jestin, V. (2013). Prime-boost vaccination with recombinant H5-fowlpox and Newcastle disease virus vectors affords lasting protection in SPF Muscovy ducks against highly pathogenic H5N1 influenza virus. *Vaccine*, 31(38), 4121–4128. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.06.074>
- Ogawa, R., Calvert, J. G., Yanagida, N., & Nazerian, K. (1993). Insertional inactivation of a fowlpox virus homologue of the vaccinia virus F12L gene inhibits the release of enveloped virions. *Journal of General Virology*, 74(1), 55–64. <http://doi.org/10.1099/0022-1317-74-1-55>
- OIE (2012). *Infectious bursal disease (gumboro disease)*. En: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Capítulo 2.3.12. p. 528-44. París, Francia.
- OIE (2016). Viruela aviar. En: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Capítulo 2.3.10. p. 580-88. París, Francia.
- Paoletti, E. (1996). Applications of pox virus vectors to vaccination: an update. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(21), 11349–11353. <http://doi.org/10.1073/pnas.93.21.11349>
- Pastoret, P.-P., & Vanderplasschen, A. (2003). Poxviruses as vaccine vectors. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 26(5–6), 343–355. [http://doi.org/10.1016/S0147-9571\(03\)00019-5](http://doi.org/10.1016/S0147-9571(03)00019-5)
- Pérez C., C., Alba Ch., M., Icochea D., E., & D., E. I. (2008). Evaluación de dos programas de vacunación con la cepa 2512 de la enfermedad de gumboro frente a la infección experimental con la cepa F52/70. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 19(1), 54–61. <http://doi.org/10.15381/rivep.v19i1.1197>
- Pitcovski, J., Gutter, B., Gallili, G., Goldway, M., Perelman, B., Gross, G., Krispel S., Barbakov M., & Michael, A. (2003). Development and large-scale use of recombinant VP2 vaccine for the prevention of infectious bursal disease of chickens. *Vaccine*, 21(32), 4736–4743. [http://doi.org/10.1016/S0264-410X\(03\)00525-5](http://doi.org/10.1016/S0264-410X(03)00525-5)

- Poulet, H., Minke, J., Pardo, M. C., Juillard, V., Nordgren, B., & Audonnet, J.-C. (2007). Development and registration of recombinant veterinary vaccines. *Vaccine*, *25*(30), 5606–5612. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.11.066>
- Pradhan, S. N., Prince, P. R., Madhumathi, J., Arunkumar, C., Roy, P., Narayanan, R. B., & Antony, U. (2014). DNA vaccination with VP2 gene fragment confers protection against Infectious Bursal Disease Virus in Chickens. *Veterinary Microbiology*, *171*(1–2), 13–22. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.02.019>
- Prandini, F., Simon, B., Jung, A., Pöppel, M., Lemiere, S., & Rautenschlein, S. (2016). Comparison of infectious bursal disease live vaccines and a HVT-IBD vector vaccine and their effects on the immune system of commercial layer pullets. *Avian Pathology*, *45*(1), 114–125. <http://doi.org/10.1080/03079457.2015.1127891>
- Qian, C., Chen, S., Ding, P., Chai, M., Xu, C., Gan, J., Peng D., & Liu, X. (2012). The immune response of a recombinant fowlpox virus coexpressing the HA gene of the H5N1 highly pathogenic avian influenza virus and chicken interleukin 6 gene in ducks. *Vaccine*, *30*(44), 6279–6286. <http://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2012.08.008>
- Qiao, C., Yu, K., Jiang, Y., Li, C., Tian, G., Wang, X., & Chen, H. (2006). Development of a recombinant fowlpox virus vector-based vaccine of H5N1 subtype avian influenza. *Dev Biol (Basel)*, *124*, 127–132.
- Qiao, C., Jiang, Y., Tian, G., Wang, X., Li, C., Xin, X., Chen H., & Yu, K. (2009). Recombinant fowlpox virus vector-based vaccine completely protects chickens from H5N1 avian influenza virus. *Antiviral Research*, *81*(3), 234–238. <http://doi.org/10.1016/j.antiviral.2008.12.002>
- Rautenschlein, S., Kraemer, C., Vanmarcke, J., & Montiel, E. (2005). Protective efficacy of intermediate and intermediate plus infectious bursal disease virus (IBDV) vaccines against very virulent IBDV in commercial broilers. *Avian Diseases*, *49*(2), 231–237. <http://doi.org/10.1637/7310-112204R>
- Reed, L. J., & Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Epidemiology*, *27*(3), 493–497. <http://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>
- Richard-Mazet, A., Goutebroze, S., Le Gros, F.-X., Swayne, D. E., & Bublot, M. (2014). Immunogenicity and efficacy of fowlpox-vectored and inactivated avian influenza vaccines alone or in a prime-boost schedule in chickens with maternal antibodies. *Veterinary Research*, *45*(1), 107. <http://doi.org/10.1186/s13567-014-0107-6>
- Robert-Guroff, M. (2007). Replicating and non-replicating viral vectors for vaccine development. *Current Opinion in Biotechnology*, *18*(6), 546–556. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.10.010>
- Rong, J., Jiang, T., Cheng, T., Shen, M., Du, Y., Li, S., Wang S., Xu B., & Fan, G. (2007). Large-scale manufacture and use of recombinant VP2 vaccine against

infectious bursal disease in chickens. *Vaccine*, 25(46), 7900–7908. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.09.006>

- Rosel, J. L., Earl, P. L., Weir, J. P., & Moss, B. (1986). Conserved TAAATG sequence at the transcriptional and translational initiation sites of vaccinia virus late genes deduced by structural and functional analysis of the *Hind* III H genome fragment. *Journal of Virology*, 60(2), 436–49.
- Rowland, R., Pathan, A. A., Satti, I., Poulton, I. D., Matsumiya, M. M. L., Whittaker, M., Angela M. Minassian, Minassian A. M., O'Hara G. A., Hamill M., Scott J.T., Harris S.A., Poyntz H.C., Bateman C., Meyer J., Williams N., Gilbert S.C., Lawrie A.M., Hill A.V., & McShane, H. (2013). Safety and immunogenicity of an FP9-vectored candidate tuberculosis vaccine (FP85A), alone and with candidate vaccine MVA85A in BCG-vaccinated healthy adults. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 9(1), 50–62. <http://doi.org/10.4161/hv.22464>
- Sadasiv, E. C., Chang, P. W., & Gulka, G. (1985). Morphogenesis of canary poxvirus and its entrance into inclusion bodies. *American Journal of Veterinary Research*, 46(2), 529–535.
- Sapats, S. I., Trinidad, L., Gould, G., Heine, H. G., van den Berg, T. P., Etteradossi, N., Jackwood D., Parede L., Toquin D., & Ignjatovic, J. (2006). Chicken recombinant antibodies specific for very virulent infectious bursal disease virus. *Archives of Virology*, 151(8), 1551–1566. <http://doi.org/10.1007/s00705-006-0729-8>
- Saugar, I., Luque, D., Oña, A., Rodríguez, J. F., Carrascosa, J. L., Trus, B. L., & Castón, J. R. (2005). Structural polymorphism of the major capsid protein of a double-stranded RNA virus: an amphipathic α helix as a molecular switch. *Structure*, 13(7), 1007–1017. <http://doi.org/10.1016/J.STR.2005.04.012>
- Scheiflinger, F., Falkner, F. G., & Dorner, F. (1997). Role of the fowlpox virus thymidine kinase gene for the growth of FPV recombinants in cell culture. *Archives of Virology*, 142(12), 2421–2431. <http://doi.org/10.1007/s007050050252>
- Sharma, J. M., Kim, I. J., Rautenschlein, S., & Yeh, H. Y. (2000). Infectious bursal disease virus of chickens: Pathogenesis and immunosuppression. *Developmental and Comparative Immunology*. [http://doi.org/10.1016/S0145-305X\(99\)00074-9](http://doi.org/10.1016/S0145-305X(99)00074-9)
- Shaw, I., & Davison, T. F. (2000). Protection from IBDV-induced bursal damage by a recombinant fowlpox vaccine, fpIBD1, is dependent on the titre of challenge virus and chicken genotype. *Vaccine*, 18(28), 3230–3241. [http://doi.org/10.1016/S0264-410X\(00\)00133-X](http://doi.org/10.1016/S0264-410X(00)00133-X)
- Shi, X.-M., Zhao, Y., Gao, H.-B., Jing, Z., Wang, M., Cui, H., Tong G., & Wang, Y.-F. (2011). Evaluation of recombinant fowlpox virus expressing infectious bronchitis virus S1 gene and chicken interferon- γ gene for immune protection against heterologous strains. *Vaccine*, 29(8), 1576–1582. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.12.102>

- Shirinov, F. B., Ibragimova, A. I., & Misirov, Z. G. (1972). Spread of fowl pox virus by the mite *Dermanyssus gallinae*. *Veterinariya (Moscow)*, (4), 48–49.
- Singh, P., Schnitzlein, W. M., & Tripathy, D. N. (2005). Construction and characterization of a fowlpox virus field isolate whose genome lacks reticuloendotheliosis provirus nucleotide sequences. *Avian Diseases*, 49(3), 401–408. <http://doi.org/10.1637/7340-020705R.1>
- Skeeles, J. K., Lukert, P. D., Fletcher, O. J., & Leonard, J. D. (1979). Immunization studies with a cell-culture-adapted infectious bursal disease virus. *Avian Diseases*, 23(2), 456–465. <http://doi.org/10.2307/1589576>
- Skinner, M. A., Laidlaw, S. M., Eldaghayes, I., Kaiser, P., & Cottingham, M. G. (2005). Fowlpox virus as a recombinant vaccine vector for use in mammals and poultry. *Expert Review of Vaccines*, 4(1), 63–76. <http://doi.org/10.1586/14760584.4.1.63>
- Śmiałek, M., Śmiałek, A., & Koncicki, A. (2016). Practical aspects of estimation of optimal time for vaccination of chicken against IBD with use of „Deventer formula”. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 19(2), 425–427. <http://doi.org/10.1515/pjvs-2016-0053>
- Srinivasan, V., Schnitzlein, W. M., & Tripathy, D. N. (2001). Fowlpox virus encodes a novel DNA repair enzyme, CPD-photolyase, that restores infectivity of UV light-damaged virus. *Journal of Virology*, 75(4), 1681–8. <http://doi.org/10.1128/JVI.75.4.1681-1688.2001>
- Staib, C., Drexler, I., & Sutter, G. (2004). Construction and isolation of recombinant MVA. In *Vaccinia Virus and Poxvirology* (pp. 77–99). Totowa, NJ: Humana Press. <http://doi.org/10.1385/1-59259-789-0:077>
- Steensels, M., Bublot, M., Van Borm, S., De Vriese, J., Lambrecht, B., Richard-Mazet, A., Chanavat-Bizzini S., Duboeuf M., Le Gros F.-X., & van den Berg, T. (2009). Prime–boost vaccination with a fowlpox vector and an inactivated avian influenza vaccine is highly immunogenic in Pekin ducks challenged with Asian H5N1 HPAI. *Vaccine*, 27(5), 646–654. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.11.044>
- Sun, H.-L., Wang, Y.-F., Tong, G.-Z., Zhang, P.-J., Miao, D.-Y., Zhi, H.-D., Wang M., & Wang, M. (2008). Protection of chickens from Newcastle disease and infectious laryngotracheitis with a recombinant fowlpox virus co-expressing the F, HN genes of Newcastle disease virus and gB gene of infectious laryngotracheitis virus. *Avian Diseases*, 52(1), 111–117. <http://doi.org/10.1637/7998-041807-Reg>
- Sun, J. H., Yan, Y. X., Jiang, J., & Lu, P. (2005). DNA Immunization against very virulent infectious bursal disease virus with VP2-4-3 gene and chicken IL-6 gene. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, 52(1), 1–7. <http://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2004.00813.x>
- Sutter, G., & Staib, C. (2003). Vaccinia Vectors as Candidate Vaccines: The Development of Modified Vaccinia Virus Ankara for Antigen Delivery. *Current*

- Swayne, D. E., Garcia, M., Beck, J. R., Kinney, N., & Suarez, D. L. (2000 a). Protection against diverse highly pathogenic H5 avian influenza viruses in chickens immunized with a recombinant fowlpox vaccine containing an H5 avian influenza hemagglutinin gene insert. *Vaccine*, 18(11–12), 1088–1095. [http://doi.org/10.1016/S0264-410X\(99\)00369-2](http://doi.org/10.1016/S0264-410X(99)00369-2)
- Swayne, D. E., Beck, J. R., & Kinney, N. (2000 b). Failure of a recombinant fowl poxvirus vaccine containing an avian influenza hemagglutinin gene to provide consistent protection against influenza in chickens preimmunized with a fowl pox vaccine. *Avian Dis*, 44(1), 132–137. <http://doi.org/10.2307/1592516>
- Taghavian, O., Spiegel, H., Hauck, R., Hafez, H. M., Fischer, R., & Schillberg, S. (2013). Protective oral vaccination against infectious bursal disease virus using the major viral antigenic protein VP2 produced in *Pichia pastoris*. *PLoS ONE*, 8(12), e83210. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0083210>
- Tartaglia, J., Perkus, M. E., Taylor, J., Norton, E. K., Audonnet, J. C., Cox, W. I., van Der Hoeven J., Meignier B., Riviere M., Languet B., & Paoletti, E. (1992). NYVAC: A highly attenuated strain of vaccinia virus. *Virology*, 188(1), 217–232. [http://doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)90752-B](http://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90752-B)
- Taylor, J., Christensen, L., Gettig, R., Goebel, J., Bouquet, J. F., Mickle, T. R., & Paoletti, E. (1996). Efficacy of a recombinant fowl pox-based Newcastle disease virus vaccine candidate against velogenic and respiratory challenge. *Avian Dis*, 40(1), 173–180. <http://doi.org/10.2307/1592386>
- Taylor, J., Edbauer, C., Rey-Senelongue, A., Bouquet, J. F., Norton, E., Goebel, S., Desmettre P., & Paoletti, E. (1990). Newcastle disease virus fusion protein expressed in a fowlpox virus recombinant confers protection in chickens. *Journal of Virology*, 64(4), 1441–1450.
- Taylor, J., & Paoletti, E. (1988). Fowlpox virus as a vector in non-avian species. *Vaccine*, 6(6), 466–468. [http://doi.org/10.1016/0264-410X\(88\)90091-6](http://doi.org/10.1016/0264-410X(88)90091-6)
- Taylor, J., Trimarchi, C., Weinberg, R., Languet, B., Guillermin, F., Desmettre, P., & Paoletti, E. (1991). Efficacy studies on a canarypox-rabies recombinant virus. *Vaccine*, 9(3), 190–193. [http://doi.org/10.1016/0264-410X\(91\)90152-V](http://doi.org/10.1016/0264-410X(91)90152-V)
- Taylor, J., Weinberg, R., Kawaoka, Y., Webster, R. G., & Paoletti, E. (1988 a). Protective immunity against avian influenza induced by a fowlpox virus recombinant. *Vaccine*, 6(6), 504–508. [http://doi.org/10.1016/0264-410X\(88\)90101-6](http://doi.org/10.1016/0264-410X(88)90101-6)
- Taylor, J., Weinberg, R., Languet, B., Desmettre, P., & Paoletti, E. (1988 b). Recombinant fowlpox virus inducing protective immunity in non-avian species. *Vaccine*, 6(6), 497–503. [http://doi.org/10.1016/0264-410X\(88\)90100-4](http://doi.org/10.1016/0264-410X(88)90100-4)

- Tong, G.-Z., Zhang, S.-J., Meng, S.-S., Wang, L., Qiu, H.-J., Wang, Y.-F., & Wang, M. (2001). Protection of chickens from infectious laryngotracheitis with a recombinant fowlpox virus expressing glycoprotein B of infectious laryngotracheitis virus. *Avian Pathology*, *30*(2), 143–148. <http://doi.org/10.1080/03079450120044542>
- Tripathy, D. N., Hanson, L. E., & Killinger, A. H. (1974). Atypical fowlpox in a poultry farm in Illinois. *Avian Diseases*, *18*(1), 84–90. <http://doi.org/10.2307/1589245>
- Tripathy, D. N., Schnitzlein, W. M., Morris, P. J., Janssen, D. L., Zuba, J. K., Massey, G., & Atkinson, C. T. (2000). Characterization of poxviruses from forest birds in Hawaii. *Journal of Wildlife Diseases*, *36*(2), 225–230. <http://doi.org/10.7589/0090-3558-36.2.225>
- Tripathy & Reed (2013). Pox. En: *Diseases of Poultry*, 13^{ra} edición, Sección 2, Capítulo 10: 333–349. Editores: Swayne D.E., Glisson J.R., McDougald L.R., Nolan L.K., Suarez D.L. & Nair V. Wiley-Blackwell, USA.
- Tsukamoto, K., Saito, S., Saeki, S., Sato, T., Tanimura, N., Isobe, T., Mase M., Imada T., Yuasa N., & Yamaguchi, S. (2002). Complete, long-lasting protection against lethal infectious bursal disease virus challenge by a single vaccination with an avian herpesvirus vector expressing VP2 antigens. *Journal of Virology*, *76*(11), 5637–45. <http://doi.org/10.1128/JVI.76.11.5637-5645.2002>
- Tsukamoto, K., Tanimura, N., Kakita, S., Ota, K., Mase, M., Imai, K., & Hihara, H. (1995). Efficacy of three live vaccines against highly virulent infectious bursal disease virus in chickens with or without maternal antibodies. *Avian Diseases*, *39*(2), 218–229. <http://doi.org/10.2307/1591863>
- Tsukamoto, K., Kojima, C., Komori, Y., Tanimura, N., Mase, M., & Yamaguchi, S. (1999). Protection of chickens against very virulent infectious bursal disease virus (IBDV) and Marek's Disease Virus (MDV) with a recombinant MDV expressing IBDV VP2. *Virology*, *257*(2), 352–362. <http://doi.org/10.1006/viro.1999.9641>
- Tulman, E. R., Afonso, C. L., Lu, Z., Zsak, L., Kutish, G. F., & Rock, D. L. (2004). The genome of canarypox virus. *Journal of Virology*, *78*(1), 353–66. <http://doi.org/10.1128/JVI.78.1.353-366.2004>
- Vakharia, V. N., Snyder, D. B., He, J., Edwards, G. H., Savage, P. K., & Mengel-Whereat, S. A. (1993). Infectious bursal disease virus structural proteins expressed in a baculovirus recombinant confer protection in chickens. *Journal of General Virology*, *74*(6), 1201–1206. <http://doi.org/10.1099/0022-1317-74-6-1201>
- van den Berg, T. P., Morales, D., Eterradossi, N., Rivallan, G., Toquin, D., Raue, R., Zierenberg K., Zhang M. F., Zhu Y.P., Wang C. Q., Zheng H. J., Wang X., Chen G. C., Lim B. L., & Müller, H. (2004). Assessment of genetic, antigenic and pathotypic criteria for the characterization of IBDV strains. *Avian Pathology*, *33*(5), 470–476. <http://doi.org/10.1080/03079450400003650>
- van den Berg, T. P. (2000). Acute infectious bursal disease in poultry: A review. *Avian Pathology*, *29*(3), 175–194. <http://doi.org/10.1080/03079450050045431>

- van Eijl, H., Rodger, G., Zhang, W.-H., Hollinshead, M., & Smith, G. L. (2002). The vaccinia virus F12L protein is associated with intracellular enveloped virus particles and is required for their egress to the cell surface. *Journal of General Virology*, 83(1), 195–207. <http://doi.org/10.1099/0022-1317-83-1-195>
- van Loon, A. A. W. M., Mundt, E., Zeyda, I., & de Haas, N. (2002). Alteration of amino acids in VP2 of very virulent infectious bursal disease virus results in tissue culture adaptation and attenuation in chickens. *Journal of General Virology*, 83(1), 121–129. <http://doi.org/10.1099/0022-1317-83-1-121>
- von Einem, U. I., Gorbalenya, A. E., Schirrmeier, H., Behrens, S.-E., Letzel, T., & Mundt, E. (2004). VP1 of infectious bursal disease virus is an RNA-dependent RNA polymerase. *Journal of General Virology*, 85(8), 2221–2229. <http://doi.org/10.1099/vir.0.19772-0>
- Wang, Y.-F., Sun, Y.-K., Tian, Z.-C., Shi, X.-M., Tong, G.-Z., Liu, S.-W., Zhi H.-D., Kong X.-G., & Wang, M. (2009). Protection of chickens against infectious bronchitis by a recombinant fowlpox virus co-expressing IBV-S1 and chicken IFN γ . *Vaccine*, 27(50), 7046–52. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.09.065>
- Webster, D. P., Dunachie, S., Vuola, J. M., Berthoud, T., Keating, S., Laidlaw, S. M., McConkey S. J., Poulton I., Andrews L., Andersen R. F., Bejon P., Butcher G., Sinden R., Skinner M. A., Gilbert S. C., & Hill, A. V. S. (2005). Enhanced T cell-mediated protection against malaria in human challenges by using the recombinant poxviruses FP9 and modified vaccinia virus Ankara. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(13), 4836–4841. <http://doi.org/10.1073/pnas.0406381102>
- Wei, C. M., & Moss, B. (1975). Methylated nucleotides block 5'-terminus of vaccinia virus messenger RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(1), 318–322. <http://doi.org/10.1073/pnas.72.1.318>
- Weli, S. C., & Tryland, M. (2011). Avipoxviruses: infection biology and their use as vaccine vectors. *Virology Journal*, 8, 49. <http://doi.org/10.1186/1743-422X-8-49>
- Weli, S. C., Nilssen, ivind, & Traavik, T. (2004). Morphogenesis of fowlpox virus in a baby hamster kidney cell line. *Medical Electron Microscopy*, 37(4), 225–235. <http://doi.org/10.1007/s00795-004-0257-0>
- Weli, S. C., Nilssen, Ø., & Traavik, T. (2005). Avipoxvirus multiplication in a mammalian cell line. *Virus Research*, 109(1), 39–49. <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2004.10.009>
- Wennier, S. T., Brinkmann, K., Steinhäüßer, C., Mayländer, N., Mnich, C., Wielert, U., Dirmeier U., Hausmann J., Chaplin P., & Steigerwald, R. (2013). A novel naturally occurring tandem promoter in modified vaccinia virus ankara drives very early gene expression and potent immune responses. *PLoS ONE*, 8(8), e73511. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0073511>

- Whitfill, C. E., Haddad, E. E., Ricks, C. A., Skeeles, J. K., Newberry, L. A., Beasley, J. N., Andrews P. D., Thoma J. A., & Wakenell, P. S. (1995). Determination of optimum formulation of a novel infectious bursal disease virus (IBDV) vaccine constructed by mixing bursal disease antibody with IBDV. *Avian Diseases*, *39*(4), 687–99. <http://doi.org/10.2307/1592404>
- Wiktor, T. J., Macfarlan, R. I., Reagan, K. J., Dietzschold, B., Curtis, P. J., Wunner, W. H., & Koprowski, H. (1984). Protection from rabies by a vaccinia virus recombinant containing the rabies virus glycoprotein gene. *Immunology*, *81*(November), 7194–7198. <http://doi.org/10.1073/pnas.81.22.7194>
- Winterfield, R. W., & Hitchner, S. B. (1962). Etiology of an infectious nephritis-nephrosis syndrome of chickens. *American Journal of Veterinary Research*, *23*, 1273–1279.
- Winterfield, R., Hitchner S., Appleton G. & Cosgrove A. (1962). Avian nephrosis, nephritis and Gumboro, disease. L and H News and Views, L and M. Laboratories, Selbyville, Delaware.
- Wu, H., Singh, N. K., Locy, R. D., Scissum-Gunn, K., & Giambrone, J. J. (2004). Immunization of chickens with VP2 protein of infectious bursal disease virus expressed in *Arabidopsis thaliana*. *Avian Diseases*, *48*(3), 663–668. <http://doi.org/10.1637/7074>
- Yang, G., Li, J., Zhang, X., Zhao, Q., Liu, Q., & Gong, P. (2008). *Eimeria tenella*: Construction of a recombinant fowlpox virus expressing rhomboid gene and its protective efficacy against homologous infection. *Experimental Parasitology*, *119*(1), 30–36. <http://doi.org/10.1016/j.exppara.2007.12.009>
- Zanetti, F. A., Cardona, R., Federico, C. R., Chimeno-Zoth, S., & Calamante, G. (2016). Recombinant canarypox virus expressing the VP2 protein of infectious bursal disease virus induces protection in vaccinated SPF chickens. *Virologica Sinica*, *31*(3), 266–269. <http://doi.org/10.1007/s12250-015-3680-6>
- Zanetti, F. A., Grand, M. D. C., Mitarotonda, R. C., Taboga, O. A., & Calamante, G. (2014). Canarypox virus expressing infectious bursal disease VP2 protein as immunogen for chickens. *Brazilian Journal of Microbiology*, *45*(1), 231–234. <http://doi.org/10.1590/S1517-83822014000100032>
- Zanetti, F. A., Zajac, M. P. D. M., Taboga, O. A., & Calamante, G. (2012). Evaluation of modified vaccinia virus Ankara expressing VP2 protein of infectious bursal disease virus as an immunogen in chickens. *Journal of Veterinary Science*, *13*(2), 199–201. <http://doi.org/10.4142/jvs.2012.13.2.199>
- Zavala, F., Rodrigues, M., Rodriguez, D., Rodriguez, J. R., Nussenzweig, R. S., & Esteban, M. (2001). A Striking Property of Recombinant Poxviruses: Efficient Inducers of in Vivo Expansion of Primed CD8+ T Cells. *Virology*, *280*(2), 155–159. <http://doi.org/10.1006/VIRO.2000.0792>

Zhang, G. Z., Zhang, R., Zhao, H. L., Wang, X. T., Zhang, S. P., Li, X. J., Qin C. Z., Lv, J. X. Zhao C. M., & Zhou, J. F. (2010). A safety assessment of a fowlpox-vectored *Mycoplasma gallisepticum* vaccine in chickens. *Poultry Science*, 89(6), 1301–1306. <http://doi.org/10.3382/ps.2009-00447>

Anexo 1



ANEXO 1. PERFILES DE CICLADO

Amplificación de la región izquierda (FPV030i) del gen <i>fp9.030</i>			
	Ciclado		
	Desnaturalización inicial		95°C, 5 min
Oligonucleótidos: F30i-fw y F30i-rv	5 ciclos	Desnaturalización	95°C, 1 min
		Hibridación	46°C, 1 min
		Elongación	72°C, 1 min
Pares de bases amplificadas: 299	30 ciclos	Desnaturalización	95°C, 1 min
		Hibridación	60°C, 1 min
		Elongación	72°C, 1 min
	Elongación final		72°C, 10 min

Amplificación de la región derecha (FPV030d) del gen <i>fp9.030</i>			
	Ciclado		
	Desnaturalización inicial		95°C, 5 min
Oligonucleótidos: F30d-fw y F30d-rv	5 ciclos	Desnaturalización	95°C, 1 min
		Hibridación	46°C, 1 min
		Elongación	72°C, 1 min
Pares de bases amplificadas: 295	30 ciclos	Desnaturalización	95°C, 1 min
		Hibridación	60°C, 1 min
		Elongación	72°C, 1 min
	Elongación final		72°C, 10 min

Amplificación de la región genómica viral que comprende el sitio blanco de inserción (diferencial para los genomas de FW-WT y FW-VP2)			
	Ciclado		
	Desnaturalización inicial		95°C, 5 min
Oligonucleótidos: F30i-fw y F30d-rv	7 ciclos	Desnaturalización	95°C, 1 min
		Hibridación	46°C, 1 min
		Elongación	72°C, 4 min
Pares de bases amplificadas: 600 (FW-WT) /4000 (FW-VP2)	30 ciclos	Desnaturalización	95°C, 1 min
		Hibridación	60°C, 1 min
		Elongación	72°C, 4 min
	Elongación final		72°C, 10 min

Amplificación del <i>gen vp2</i>			
		Ciclado	
		Desnaturalización inicial	95°C, 5 min
Oligonucleótidos: VP2-fw y VP2-rv	5 ciclos	Desnaturalización	95°C, 1 min
		Hibridación	46°C, 1 min
		Elongación	72°C, 2 min
Pares de bases amplificadas: 1300	30 ciclos	Desnaturalización	95°C, 1 min
		Hibridación	60°C, 1 min
		Elongación	72°C, 2 min
	Elongación final		72°C, 10 min

Amplificación de una región interna del <i>gen vp2</i>			
		Ciclado	
		Desnaturalización inicial	95°C, 5 min
Oligonucleótidos: VP2i1-fw y 284-1- rv	30 ciclos	Desnaturalización	95°C, 30 seg
		Hibridación	53°C, 30 seg
Pares de bases amplificadas: 550		Elongación	72°C, 45 seg
	Elongación final		72°C, 5 min

Amplificación del <i>gen viral fp9.016</i>			
		Ciclado	
		Desnaturalización inicial	95°C, 5 min
Oligonucleótidos: F016-fw y F016-rv	30 ciclos	Desnaturalización	95°C, 1 min
		Hibridación	48°C, 1 min
Pares de bases amplificadas: 700		Elongación	72°C, 1 min
	Elongación final		72°C, 10 min