



Universidad de Buenos Aires
Departamento de Química Biológica

Evaluación de inmunógenos basados en vectores virales no replicativos para la prevención de la enfermedad de Gumboro

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

LIC. ROMINA CARDONA

Directora de Tesis: Dra. Gabriela Calamante

Consejero de Estudios: Dr. Juan Carlos Calvo

Lugar de trabajo: Instituto de Biotecnología (IABiMo), UEDD INTA -
CONICET

BUENOS AIRES, MAYO 2021

RESUMEN

El virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa (IBDV) es el agente causal de una enfermedad aguda, altamente contagiosa y de distribución mundial denominada enfermedad de Gumboro. Se caracteriza por la destrucción de linfocitos B inmaduros en la bolsa de Fabricio (BF) que culmina con la atrofia de dicho órgano e induce inmunosupresión. 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. Los programas de vacunación, junto con la limpieza y desinfección de la granja y estrictas medidas de bioseguridad, son la base del control de esta enfermedad. Las vacunas utilizadas para el control de IBDV son las convencionales inactivadas o vivas atenuadas, las de complejos inmunes y las vectorizadas (recombinantes). Todas las vacunas vectorizadas expresan la proteína VP2 de IBDV, componente mayoritario de la cápside viral y antígeno principal contra el cual está dirigida la respuesta inmune del hospedador.

En este trabajo de Tesis se evaluó la eficiencia de la inmunización de vectores virales no replicativos que expresan la proteína VP2 de IBDV en pollos SPF (certificados como libres de patógenos específicos). Se utilizaron vectores basados en el virus vaccinia Ankara modificado (MVA) y en adenovirus humano tipo 5 (AdHu5/ Δ E1- Δ E3).

En primer lugar, se confirmó que el vector viral basado en MVA no infecta productivamente a los pollos. Esto se determinó a través del estudio de biodistribución luego de la aplicación de MVA por vía subcutánea en el ala (no indujo formación de lesiones nodulares) o por vía intramuscular en la pata (se detectó el genoma viral únicamente en el sitio de inoculación y hasta las 24 h post infección).

El vector MVA-VP2 fue obtenido previamente en nuestro laboratorio, y en este trabajo se obtuvo el adenovirus recombinante AdHu-VP2. Para ello, se implementó el sistema de dos componentes: i) el vector de expresión pAd/CMV/V5/DEST™ y, ii) las células HEK 293A. Los virus recombinantes obtenidos son incompetentes para la replicación en la mayoría de las células de mamíferos o aves debido a la ausencia de los genes que codifican para las proteínas esenciales E1 y E3, pero en el laboratorio se amplifican en cultivos de células HEK 293A (aportan en *trans* las dos proteínas indispensables para la replicación viral).

Posteriormente, se evaluó la protección frente al desafío con IBDV conferida por una única inmunización con MVA-VP2 en pollos SPF. Las aves fueron inmunizadas con distintas dosis ($5,2 \times 10^3$ UFP u 8×10^5 UFP) por vía i.m. La dosis baja protegió parcialmente mientras que la dosis alta indujo protección contra IBDV. En este último caso, se observó que el daño histopatológico en BF fue leve (*score* promedio de 2) y el título de IBDV en BF disminuyó significativamente respecto del cuantificado en el grupo de aves inmunizadas con virus MVA recombinantes que expresan una proteína no relacionada (MVA-GFP).

Luego, se evaluó la protección frente al desafío con IBDV con un esquema de inmunización *prime-boost* heterólogo combinando AdHu-VP2 (día 1 de edad) y MVA-VP2 (día 11 de edad). Se observó que AdHu-VP2 no induce protección contra IBDV, pero fue capaz de primar la respuesta inmune, que fue potenciada por la aplicación de la vacunación de refuerzo con MVA-VP2. La mayoría (5 de 6) de las aves vacunadas con AdHu-VP2/MVA-VP2 no presentaron lesiones histopatológicas en la BF y en el 50% de las aves de este grupo no se detectó la presencia del virus de desafío en dicho órgano. Finalmente, con el propósito de mejorar aún más los niveles de protección contra IBDV, se realizó un esquema de inmunización similar donde se aumentó 200 veces la dosis de AdHu-VP2 ($1,5 \times 10^9$ UFP) aplicada al día de edad (*prime*) y se mantuvo constante la dosis refuerzo (*boost*) con MVA-VP2 (8×10^5 UFP). Los resultados obtenidos mostraron que el aumento de la dosis del *prime* con AdHu-VP2 no mejoró los parámetros de protección contra IBDV.

En las aves protegidas no se detectaron anticuerpos específicos anti-IBDV.

En conjunto, los resultados obtenidos indican que el vector viral MVA-VP2 induce una respuesta inmune específica que protege contra IBDV cuando el desafío se realiza a los 27 días de edad, momento en que las aves presentan la mayor susceptibilidad a dicho patógeno. Los parámetros de protección (definidos como cantidad de IBDV y lesiones histopatológicas en BF) mejoraron cuando se realizó un esquema de dos dosis heterólogas combinando los vectores AdHu-VP2 ($6,6 \times 10^6$ UFP) y MVA-VP2 (8×10^5 UFP).

A futuro, se evaluará la potencialidad del candidato vacunal MVA-VP2 para la prevención de la enfermedad de Gumboro al aplicarlo por las vías de inmunización masivas usadas en la industria avícola (*in ovo* o al día de edad).

PALABRAS CLAVE: Vector viral; MVA; Adenovirus; vacuna veterinaria; IBDV; enfermedad de Gumboro.

Evaluation of immunogens based on non-replicative viral vectors for the prevention of Gumboro disease

ABSTRACT

The infectious bursal disease virus (IBDV) is the causative agent of an acute, highly contagious and globally distributed disease called Gumboro disease. It is characterized by the destruction of immature B lymphocytes in the bursa of Fabricius (BF) that culminates in the atrophy of that organ and induces immunosuppression. Between the third and sixth week of life, BF is at its maximum development, this period is the one with the greatest susceptibility to IBDV. Vaccination programs, together with farm cleaning and disinfection and strict biosecurity measures, are the basis for controlling this disease. The vaccines used to control IBDV are the conventional inactivated or live attenuated vaccines, those of immune complexes and the vectored (recombinant). All vectored vaccines express the VP2 protein of IBDV, a major component of the viral capsid and the main antigen against which the host's immune response is directed.

In this thesis work, the efficacy of the immunization of non-replicative viral vectors expressing the VP2 protein of IBDV in SPF chickens (certified as specific pathogens free) was evaluated. Vectors based on modified vaccinia Ankara virus (MVA) and human adenovirus type 5 (AdHu5 / $\Delta E1-\Delta E3$) were used.

First, it was confirmed that the MVA-based viral vector does not productively infect chickens. This was determined through the biodistribution study after the application of MVA subcutaneously in the wing (it did not induce formation of nodular lesions) or intramuscularly in the thigh (the viral genome was detected only in the inoculation site and up to 24 h post infection).

The MVA-VP2 vector was previously obtained in our laboratory, and in this work the recombinant adenovirus AdHu-VP2 was obtained. For this, the two-component system was implemented: i) the expression vector pAd/CMV/V5/DEST™ and, ii) the HEK 293A cells. The recombinant viruses obtained are incompetent for replication in most mammalian or avian cells due to the absence of the genes that code for the essential proteins E1 and E3, but in the laboratory they are amplified in HEK 293A cell cultures (they provide in *trans* the two proteins essential for viral replication).

Subsequently, the protection against IBDV challenge conferred by a single immunization with MVA-VP2 in SPF chickens was evaluated. The birds were i.m. immunized with different doses (5.2×10^3 PFU or 8×10^5 PFU). The low dose partially protected while the high dose induced protection against IBDV. In the latter case, it was observed that the histopathological damage in BF was slight (average score of 2) and the IBDV titer in BF decreased significantly compared to that quantified in the group of birds immunized with recombinant MVA viruses that express an unrelated protein (MVA-GFP).

Then, protection against IBDV challenge was evaluated with a heterologous *prime-boost* immunization scheme combining AdHu-VP2 (day 1 of age) and MVA-VP2 (day 11 of age). It was observed that AdHu-VP2 does not induce protection against IBDV but was able to prime the immune response, which was enhanced by the application of the booster vaccination with MVA-VP2. The majority (5 of 6) of the birds vaccinated with AdHu-VP2/MVA-VP2 did not present histopathological lesions in the BF and in 50% of the birds of this group the presence of the challenge virus was not detected in that organ. Finally, in order to further improve the levels of protection against IBDV, a similar immunization scheme was carried out with a 200-fold increase of the dose of AdHu-VP2 (1.5×10^9 PFU) applied to the day of age (prime) and the booster dose (boost) with MVA-VP2 (8×10^5 PFU) was kept constant. The results obtained showed that increasing the dose of the prime with AdHu-VP2 did not improve the protection parameters against IBDV.

Specific anti-IBDV antibodies were not detected in protected birds.

Altogether, the results obtained indicate that the MVA-VP2 viral vector induces a specific immune response that protects against IBDV when the challenge is carried out at 27 days

of age, a time when the birds have the highest susceptibility to this pathogen. Protection parameters (defined as the amount of IBDV and histopathological lesions in BF) improved when a two-dose heterologous schedule was performed combining the vectors AdHu-VP2 (6.6×10^6 PFU) and MVA-VP2 (8×10^5 PFU).

In the future, the potentiality of the MVA-VP2 vaccine candidate for the prevention of Gumboro disease will be evaluated when applied by the massive immunization routes used in the poultry industry (*in ovo* or at day of age).

KEY WORDS: Viral vector; MVA; Adenovirus; veterinary vaccine; IBDV; Gumboro disease.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA) y a su directora Dra. Ruth Heinz y a su ex directora Elisa Carillo por permitirme realizar este trabajo en el Instituto.

A toda la gente que integra el CICVyA, por crear un excelente lugar de trabajo, ameno y solidario y de gran calidad académica.

A Oscar Taboga, Director del IB, por siempre estar con la mejor predisposición ante mis pedidos, por apoyarme y alegrarse ante mis logros, por incentivar-me a ser mejor desde mis primeros días en el laboratorio de Virus Animales II, por tener siempre la palabra justa y por su honestidad sin filtros para mí siempre necesaria. ¡Gracias O!

A la Agencia Nacional de Ciencia y Técnica (ANPCyT) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONICET) por haberme otorgado las becas y gracias a ello haberme dado la posibilidad del sostén económico necesario para llevar adelante mis estudios.

A mi Consejero, Juan Carlos Calvo, por haberme guiado durante toda mi formación de grado y de posgrado, por haberme escuchado, orientado, ayudado y apoyado en todas las etapas de mis carreras tanto académica como emocionalmente. ¡Gracias Juan!

A la Dra. Gabriela Calamante. ¡Ay Ga! Sabes que no me alcanzan las palabras para agradecerte todos estos años en el laboratorio y fuera de él. No me alcanza un párrafo para transmitirte todo lo que quiero agradecerte. Hoy, puedo decirte que gracias a vos aprendí no solo mi formación científica, sino de todo lo que soy capaz y agradezco cada presión, cada pelea, cada risa, cada receta, cada charla, cada bajada de línea y cada DEAD LINE. Sos una excelente directora, investigadora, docente y una excelente persona, algo que no es fácil de encontrar en la vida. Te pido perdón por todo lo que no fui capaz de ver y hacer en su momento y de verdad espero haber estado a la altura con el trabajo desarrollado en esta tesis. ¡Gracias gracias gracias y MAS GRACIAS Ga!

A la excelente Facultad de Ciencias exactas y Naturales (FCEyN) de la Universidad de Buenos Aires, por haberme formado tanto en la carrera de postgrado como en mi carrera de grado.

Al estado que sostiene a la Universidad pública.

A Deby, ¡Deby! Gracias por haber sido incondicional, por haberme ayudado a ordenarme, a recordar, por todas las manos que me diste cada vez que tenía que llevar adelante ensayos kilométricos, por hacerme compañía, por retarme, por darme consejos, por compartir, por quererme, por bancarme. ¡Gracias De!

A Osvaldo Zabal y a todo el excelente equipo de la sección de cultivos de Virología, que gracias a ellos logré llevar adelante el desarrollo de todos los cultivos y ensayos necesarios para el desarrollo de esta tesis, gracias a sus sonrisas, su buena predisposición y a todo el conocimiento adquirido a través a ellos.

A Paula, por sus consejos, su buena onda, sus enseñanzas y su compu. Gracias por todo lo que estuviste durante todo el desarrollo de esta tesis. ¡Gracias Pau!

A María José Mónaco, ¡Majito! Ya que gracias a ella el trabajo día a día fue mucho más fácil y dinámico. ¡Gracias a su risa! ¡A su magia! ¡A sus manos! ¡Gracias Majun!

A Eva, Silvi, Mati, Juan, Pepe y Ana, por haberme dado siempre una mano con todo lo que necesité y sobre todo con el trabajo con los animales.

A todo el equipo de VA, a todos y cada uno de ellos, que cada uno desde su lugar logró poner más que un grano de arena en el desarrollo de esta tesis, tanto desde lo académico como desde lo personal. Gracias por haber participado de mis seminarios y gracias por el grupo humano que fueron. Gracias a este equipo todo fue más fácil.

A Silvio Díaz, encargado del Bioterio del Instituto de Biotecnología, por haberse ocupado de todo lo necesario con las aves y gracias a ello haberme facilitado el desarrollo de todos los experimentos realizados en este trabajo.

A todos los animales que fueron sacrificados durante el desarrollo de este trabajo de tesis.

A Fernando Delgado, por todo el análisis histopatológico de los tejidos que les enviamos y por todo el conocimiento que me transmitió.

A Zulma Canet y el equipo de Prohuerta, por toda la provisión de huevos fértiles para llevar adelante los ensayos en las aves y haber podido preparar todos los cultivos de fibroblastos de embrión de pollo (FEP) necesarios para el desarrollo de esta tesis.

A Roxana, Fabián y Elena, del lavadero del Instituto de Biotecnología, ya que gracias a ellos siempre tuve a disposición todo el material para trabajar haciendo que todo se torne más liviano y eficaz. ¡Gracias de todo corazón!

A Perla y todo el personal de secretaría, que siempre estuvieron ahí para orientarme y ayudarme en todo lo que necesité durante todos mis años en INTA.

A Ayelén, la secretaria del Departamento de Química Biológica de la FCEyN, por toda la orientación y ayuda en cosas en las cuales me sentí perdida, y además por su buena predisposición constante, sobre todo en estos últimos tiempos. ¡Gracias Aye!

A Vale. Ay Vale, gracias por haber encontrado tu camino, gracias por haberte cruzado en el mío. Gracias por tu magia y gracias por haberla compartido conmigo y hacer que mi vida hoy sea diferente y abundante. Sin vos, no sé qué hubiera pasado. Gracias por SER y ESTAR.

A Luciana, ¡Lu! Gracias por ser vos, por todo, por siempre, por seguir, por estar, por ser incondicional.

A Marcos y a Marito, por siempre estar al lado mío, bancándome, alivianándome la carga, y motivándome a ser mejor. Todo fue mejor con ellos. Gracias.

A Mint, La Colo, Andre, El Chino, Tío Seba, Nati, Romi, Nacho y Seba, gracias por estar y por hinchar y motivarme para que termine. ¡Gracias!

A mis hermanos, Caro y Martin, y a mis cuñados, Guido y Flor, por preocuparse constantemente, por incentivar me a crecer, por estar ahí incondicionalmente y por festejar conmigo cada logro.

A pipinauta, por ser el amor de la Tía, por existir y haber hecho que todos estos años sean maravillosos gracias a su presencia, él, sin saberlo, hizo que todo sea más liviano.

A mi Mamá y a mi Papá, que no puedo poner en palabras todo lo que hicieron por mí. Por haberme dado la vida y la posibilidad de que la viva de una manera maravillosa. Por permitirme fracasar y volver a empezar, por motivarme, por empujarme, por mimarme, por facilitarme los medios para mi desarrollo académico y personal. Gracias por haber

puesto de sus vidas para que desarrolle la mía. Gracias a ustedes también, esta tesis hoy está escrita. Los amo.

A July y Seba, por estar siempre ahí, al pie de cañón, festejando y bancando mis estados, mis logros (y no tan logros) y siempre poner lo mejor de ustedes para que yo me llene de energía y amor.

A Omi y Carla, por motivarme y entender cada estado y cada proceso. ¡Gracias por estar en mi vida!

¡A Lucía, Lu! Cuánta agua bajo el puente. Gracias por siempre estar, siempre sacar todo lo bueno de mí, por encontrar la luz en los rincones más oscuros, por ser mi amiga incondicional y por haberme apoyado siempre.

A mis amigos, todos y cada uno de ellos, que siempre me motivaron, preguntaron, apoyaron durante todo este proceso. No tengo más que agradecimiento para todos ustedes.

A Pía, Pí, gracias por siempre motivarme, por recordarme que estaba parada en el lugar equivocado y por haberme incentivado siempre a terminar mi carrera. ¡Gracias Martuli!

Seguramente no este nombrando a muchas personas que ayudaron de manera directa o indirecta en todos estos años de trabajo y formación que fui transitando. A todos ellos, les agradezco cada palabra, consejo, presencia y todo lo que aportaron para que esta tesis hoy esté finalizada. Gracias.

Y, por último, a mí, por haberme permitido transitar en armonía la escritura de este trabajo de tesis, por haberme permitido disfrutarla y hacerla propia, como siempre lo fue. Gracias por haber podido cerrar esta etapa pendiente y por haberme permitido volver a donde pertenezco.

Gracias desde el fondo de mi corazón a todos ustedes.

ÍNDICE

Índice	12
1 Introducción.....	17
1.1 El sector avícola y la prevención de enfermedades	17
1.2 El sistema inmunológico de las aves	21
1.3 El virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa.....	26
1.3.1 La enfermedad de Gumboro y su control por vacunación.....	29
1.4 Vectores virales basados en virus vaccinia Ankara modificado	34
1.5 Vectores virales basados en adenovirus humano tipo 5.....	43
1.6 Estrategia de inmunización <i>prime – boost</i> heterólogo	50
2 Hipótesis y Objetivos	53
2.1 Hipótesis	53
2.2 Objetivo general	53
2.2.1 Objetivos específicos	53
3 Materiales y Métodos.....	55
3.1 Líneas celulares, cultivos primarios y medios de cultivo celular	55
3.2 Animales	56
3.3 Virus.....	57
3.3.1 Infecciones Virales	58
3.3.1.1 Obtención de stocks virales de MVA y FWPV.....	58
3.3.1.2 Titulación de los stocks virales de MVA y FWPV	58
3.4 Metodología de ADN recombinante	59

3.4.1	Mini preparaciones de ADN plasmídico	59
3.4.2	Digestión con enzimas de restricción	60
3.4.3	Oligonucleótidos iniciadores o Cebadores	60
3.4.4	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	62
3.4.5	Electroforesis en geles de agarosa	63
3.4.6	Purificación de ADN a partir de geles de agarosa	64
3.4.7	Transformación de bacterias <i>E. coli</i> competentes	64
3.4.8	Secuenciación de ADN	65
3.5	Metodología para la obtención de adenovirus recombinantes que portan el gen codificante de la proteína VP2 (<i>gen vp2</i>)	65
3.5.1	Obtención del vector pAdHu-VP2.....	66
3.5.2	Aislamiento de los adenovirus AdHu-VP2	67
3.5.3	Amplificación y purificación de los adenovirus recombinantes.....	68
3.5.4	Titulación de los adenovirus recombinantes purificados.....	69
3.5.5	Análisis de la pureza del stock viral recombinante de AdHu-VP2.....	69
3.5.6	Extracción de ADN total de cultivos celulares infectados con los virus recombinantes.	70
3.5.7	Evaluación de la transcripción del <i>gen vp2</i> mediante RT-PCR	71
3.6	Metodologías utilizadas para la evaluación de la distribución <i>in vivo</i> (biodistribución) de poxvirus en pollos.....	72
3.6.1	Biodistribución de poxvirus administrados por vía intramuscular (i.m.)	72
3.6.2	Biodistribución de poxvirus administrados por vía subcutánea (s.c.).....	73
3.6.3	Preparación de homogenatos de tejido para realizar pasajes ciegos por FEP	74

3.6.4	Detección del genoma de poxvirus en muestras de tejido recolectados de las aves vacunadas	75
3.7	Metodologías utilizadas para los ensayos de eficiencia de los vectores virales que expresan la proteína VP2 de IBDV	75
3.7.1	Inmunógenos	75
3.7.2	Virus de desafío	76
3.7.3	Diseños experimentales.....	76
3.7.3.1	Esquema de vacunación con una sola dosis de MVA recombinante	76
3.7.3.2	Esquema vacunación <i>prime-boost</i> heterólogo combinando adenovirus y MVA recombinantes	77
3.7.4	Evaluación de la respuesta inmune humoral anti-IBDV por ELISA.....	77
3.7.5	Infección experimental con IBDV	78
3.7.6	Toma de muestras de la bolsa de Fabricio, titulación de IBDV y análisis histopatológico	78
3.7.6.1	Titulación de IBDV presente en las bolsas de Fabricio de las aves desafiadas	79
3.7.6.2	Análisis histopatológico de la bolsa de Fabricio	80
3.7.6.3	Análisis Estadístico.....	82
4	RESULTADOS	84
4.1	Estudio de la biodistribución de MVA recombinantes en pollos	84
4.1.1	Evaluación de la biodistribución del virus MVA inoculado por vía sub-cutánea en pollos.....	84
4.1.2	Evaluación de la biodistribución de MVA inoculado por vía intramuscular..	87
4.2	Obtención y caracterización de Adenovirus recombinantes (AdHu-5) que portan el gen codificante de la proteína VP2 de IBDV.....	91

4.3	Evaluación de la protección inducida por los vectores virales que expresan la proteína VP2 frente al desafío con IBDV	98
4.3.1	Evaluación de la protección conferida por la vacunación en dosis única de MVA-VP2	99
4.3.2	Evaluación de la protección ante un esquema de vacunación <i>prime-boost</i> heterólogo combinando los vectores virales MVA-VP2 y AdHu-VP2	103
5	Discusión.....	110
6	Conclusiones	125
7	Anexos	128
7.1	Anexo I	128
7.1.1	Comparación de la capacidad replicativa de MVA-VP2 y CNPV-VP2 <i>in vitro</i>	128
7.2	Anexo II	129
7.2.1	Detección de anticuerpos específicos anti-IBDV por ELISA.....	129
8	Bibliografía.....	133

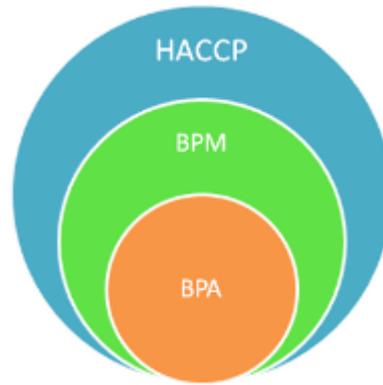
INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

1.1 EL SECTOR AVÍCOLA Y LA PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES

La República Argentina ocupa el 10° lugar en producción de carne de pollo y es el 8° exportador a nivel mundial (Boletín Avícola 2019 Año XXII N°82, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca). De acuerdo con el volumen, las exportaciones avícolas se distribuyeron principalmente entre los siguientes países: 35% China, 13% Sudáfrica, 8% Chile, 6% Vietnam y 4% Hong Kong, Rusia y Colombia. El 26 % restante corresponde a Cuba, Arabia Saudita, Angola y Yemen, entre otros. Son más de 60 países los destinos de las exportaciones. La relación exportación/producción para el año 2019 fue de 15%. Según el relevamiento de CONINAGRO (Confederación Intercooperativa Agropecuaria), en Argentina hay 6.500 granjas. El 83% de la producción se desarrolla en Buenos Aires y Entre Ríos. En tanto que la producción deja 2,1 millones de toneladas de carne aviar y 1,0 millón de huevos (Fuente: CONINAGRO, noviembre de 2019). Los argentinos consumen, en promedio, 43 kilos por año por habitante de carne aviar y 265 huevos por habitante por año, valores que se mantienen estables desde el año 2015.

El sector avícola fue incorporando mejoras tecnológicas en diversas áreas de la producción. La sanidad y la correcta nutrición constituyen, junto con el desarrollo de la genética, los pilares sobre los cuales se basa el incremento de la capacidad competitiva del sector, siendo que nuestro país mantiene un estatus sanitario óptimo, libre de las enfermedades de Newcastle e Influenza aviar. Las empresas también participan en el mejoramiento de la calidad mediante la puesta en marcha de planes de Buenas Prácticas Agropecuarias (BPA), Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y de Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (APPCC o HACCP, por sus siglas en inglés) auditados por los servicios veterinarios del SENASA.



Las grandes pérdidas en la productividad debidas a enfermedades infecciosas en aves son un problema sumamente importante y, por lo tanto, para propiciar un continuo y robusto desarrollo de la industria avícola se requiere un gran control sanitario. La vacunación representa la intervención más rentable para la prevención y el control de enfermedades y, es la herramienta más utilizada en medicina veterinaria. Es así que la comunidad veterinaria aplica el enfoque de Una Sola Salud (*One Health*) para proporcionar una protección adecuada al conjunto diverso de patógenos que amenazan continuamente a todas las especies. El concepto de Una Sola Salud reconoce que la salud de las personas está conectada con la salud de los animales y del medio ambiente. Se trata de un enfoque colaborativo, multisectorial y multidisciplinario que se aplica con el objetivo de conseguir soluciones óptimas para la salud teniendo en cuenta la interacción entre personas, animales, plantas y el medio en el que vivimos todos juntos. Si bien la mayoría de las vacunas veterinarias que se usan actualmente fueron desarrolladas hace varias décadas, como disciplina, el desarrollo de vacunas enfrenta numerosos desafíos.

La presencia de enfermedades infecciosas juega un rol fundamental como limitante del crecimiento del sector avícola y, la vacunación es el método más económico para la prevención y el control. En la actualidad, las aves en las granjas productoras se vacunan contra muchas enfermedades para prevenir las pérdidas directas (muerte, sintomatología clínica, caída de postura) o indirectas (inmunosupresión y consecuente predisposición superior a contraer otras enfermedades). Las vacunas que se utilizan están basadas en la inactivación del patógeno (**vacunas inactivadas**) o en su atenuación mediante pasajes sucesivos en animales o cultivos celulares (**vacunas atenuadas**). Son efectivas, pero presentan algunas desventajas: composición indefinida del antígeno,

reacciones adversas locales ocasionadas por los adyuvantes de la formulación, elevados costos debido a la necesidad de una estricta cadena de frío, riesgos de reversión a la patogenicidad en individuos inmunocomprometidos y la posibilidad de transmisión de patógenos no detectados (virus, bacterias). 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.

Las aplicaciones más exitosas de las vacunas de vectores virales son en el campo veterinario. Esto contrasta con el desarrollo de vacunas para uso humano, que implica requisitos regulatorios más estrictos, ensayos clínicos escalonados (Fase 1 a 3) y, por ende, el tiempo que transcurre hasta obtener la licencia y comience el retorno de la inversión. Al menos 15 vacunas basadas en vectores virales están autorizadas para uso veterinario (Draper and Heeney, 2010)(**Tabla 1**).

El sector avícola incorporó rápidamente las denominadas vacunas vectorizadas, obtenidas por técnicas biotecnológicas. En particular, aquellas basadas en los vectores virales derivados de herpesvirus de pavo (HVT), virus fowlpox (FWPV, viruela aviar) y virus canarypox (CNPV, viruela de canario). En nuestro país se utilizan principalmente las vacunas importadas basadas en HVT o la vacuna nacional vectorizada por CNPV (**Tabla 1**). Esta última, denominada R-VAC INMUNER IBD, protege contra la Enfermedad de Gumboro y es la primera vacuna recombinante argentina. Fue desarrollada en el marco de una colaboración público-privada entre el INTA (nuestro grupo de

investigación) y Laboratorios Inmuner S.A. Se aplica en monodosis al día de edad y es una vacuna efectiva aunque en las aves protegidas no se detectó la inducción de una respuesta inmune humoral anti IBDV (virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa, agente causal de la enfermedad de Gumboro) (Zanetti *et al.*, 2014, 2016; Novella *et al.*, 2018).

Vector Viral Recombinante	Patógeno blanco	Especies	Nombre comercial	Distribuidor	Aprobada para su uso en Argentina
Adenovirus Humano tipo 5	virus de la rabia	zorros y mapaches	Onrab	Artemis Technologies Inc.	
Virus vaccinia			Raboral		
ALVAC (virus canarypox)	virus de la influenza equina	caballos	ProteqFlu-Te (Europe) Recombitek (USA)	Boehringer Ingelheim	
	virus West Nile		Recombitek Equine WNV		
	virus de la rabia	gatos	Purevax Feline Rabies		en curso
	virus de la leucemia felina		Purevax FeLV		sí
	moquillo (distemper canino)	perros	RECOMBITEK rDistemper		sí
	hurones	Purevax Ferret Distemper			
Virus Canarypox (cepa Abbatista95)	virus de la enfermedad de Gumboro		R-VAC INMUNER IBD*	Laboratorios Inmuner	sí
Fowlpox virus (FWPV) o viruela aviar	virus de la influenza aviar y viruela aviar	pollos	Trovac AI H5	Boehringer Ingelheim	
	virus de la Enfermedad de Newcastle y viruela aviar		Vectormune FP-N		
	virus de la Laringotraqueítis Infecciosa Aviar y viruela aviar		Vectormune FP-LT	CEVA Salud Animal	sí
	Viruela Aviar y <i>Mycoplasma gallisepticum</i>		Vectormune FP-MG		
Virus de Enfermedad de Newcastle (NDV), cepa La Sota	virus de la Enfermedad de Newcastle e influenza aviar			Vaxigen K-NewH5	Avimex
Flavivirus YFV-17D (virus quimérico vivo)	virus West Nile	caballos	PreveNile	Intervet	
Herpesvirus de pavo (HVT)	virus de la enfermedad de Marek y de la enfermedad de Gumboro	pollos	Vaxxitek HVT + IBD	Boehringer Ingelheim	sí
	virus de la enfermedad de Marek y de la enfermedad de Newcastle		Vectormune HVT – NDV		sí
	virus de la enfermedad de Marek y de la Laringotraqueítis Infecciosa Aviar		Vectormune HVT LT	CEVA Salud Animal	sí

* Primera vacuna recombinante argentina desarrollada por INTA y Laboratorios Inmuner.

Tabla 1 - Vacunas veterinarias vectorizadas de uso comercial.

Para su uso en aves de corral, las vacunas recombinantes basadas en FWPV y HVT poseen la ventaja de ser bivalentes. La respuesta inmunitaria se induce contra el vector (protección contra viruela aviar o enfermedad de Marek, respectivamente) y contra el antígeno foráneo derivado de otro agente patógeno. Sin embargo, con las vacunas

vectorizadas por FWPV es fundamental determinar el momento óptimo de vacunación porque se debe sobrepasar la inmunidad pre-existente para garantizar protección. Esta inmunidad pre-existente puede estar originada por el traspaso pasivo de anticuerpos maternos, por vacunaciones previas de los planteles o por exposiciones a cepas circulante a campo (Skinner *et al.*, 2005). Las vacunas vectorizadas por HVT o CNPV no presentan este problema debido a que los vectores virales no son patógenos de pollos. Por otro lado, por el tipo de vector, algunas de las vacunas de HVT están formuladas como virus asociado a células y requieren una estricta cadena de frío (en nitrógeno líquido) para su almacenamiento y transporte. Actualmente, R-VAC INMUNER IBD también se comercializa congelada en nitrógeno líquido. Esto determina altos costos para su transporte desde los puntos de comercialización hasta las plantas de incubación. En el caso particular de nuestro país, donde la producción avícola está concentrada en una región geográfica (86% en Entre Ríos y Buenos Aires), estas vacunas son las de elección debido a su efectividad y porque se aplican con métodos de inmunización masiva (*in ovo* o al día de edad).

1.2 EL SISTEMA INMUNOLÓGICO DE LAS AVES

En las aves domésticas la competencia inmunológica es especialmente importante para el desempeño productivo, si los animales están inmunodeprimidos, la efectividad de las vacunas y/o de los medicamentos utilizados rutinariamente se reduce y, así, se incrementa la susceptibilidad a enfermedades.

En el ciclo de vida de las aves, el desarrollo de los embriones se realiza nutriéndose del saco vitelino del cual también se produce la absorción de anticuerpos maternos (del tipo IgG, pero denominada IgY por ser predominante en yema). La resistencia a la infección durante los primeros días de vida depende del transporte de la IgY materna (inmunidad pasiva o MDA del inglés *Maternal Derived Antibodies*). El huevo fertilizado contiene IgY en el saco vitelino y luego la albúmina adquiere las IgA e IgM durante su viaje por el oviducto, pero la concentración de estas últimas es más baja que la de IgY (**Figura 1**). Al principio, la IgY se une a sus receptores presentes en la membrana plasmática y es endocitada para conformar vesículas recubiertas que a su vez forman

vesículas desnudas que se mueven hacia la superficie celular basolateral y descargan su contenido dentro de la circulación fetal (Tressler and Roth, 1987). En el ave, la IgY materna es específicamente secuestrada de la normal circulación materna por el oocito en desarrollo y posteriormente se transporta desde la yema de huevo a través de la membrana del saco vitelino, hacia el embrión en desarrollo, apareciendo en la circulación fetal al día 7 y luego incrementándose a 0,1 mg/mL al día 15 hasta alcanzar 1,5 mg/mL en los pollos recién nacidos. Estos anticuerpos tienen un tiempo de permanencia en el animal de aproximadamente 3 semanas otorgando protección mientras que el sistema inmunológico se desarrolla (Kowalczyk *et al.*, 1985; Tressler and Roth, 1987).

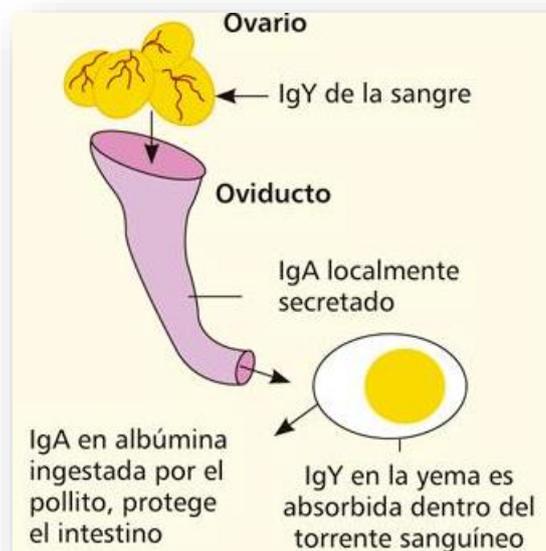


Figura 1 – Transferencia de inmunidad al pollito. (Tomado de Rev. Vet. Arg. 2011/12).

El sistema inmunológico de las aves es dependiente del tejido linfóide, el cual se clasifica en primario y secundario. El primario está compuesto por la bolsa de Fabricio y el timo mientras que el secundario incluye el bazo, las tonsilas cecales, las placas de Peyer, los nodos linfáticos y la glándula de Harder (**Figura 2**).

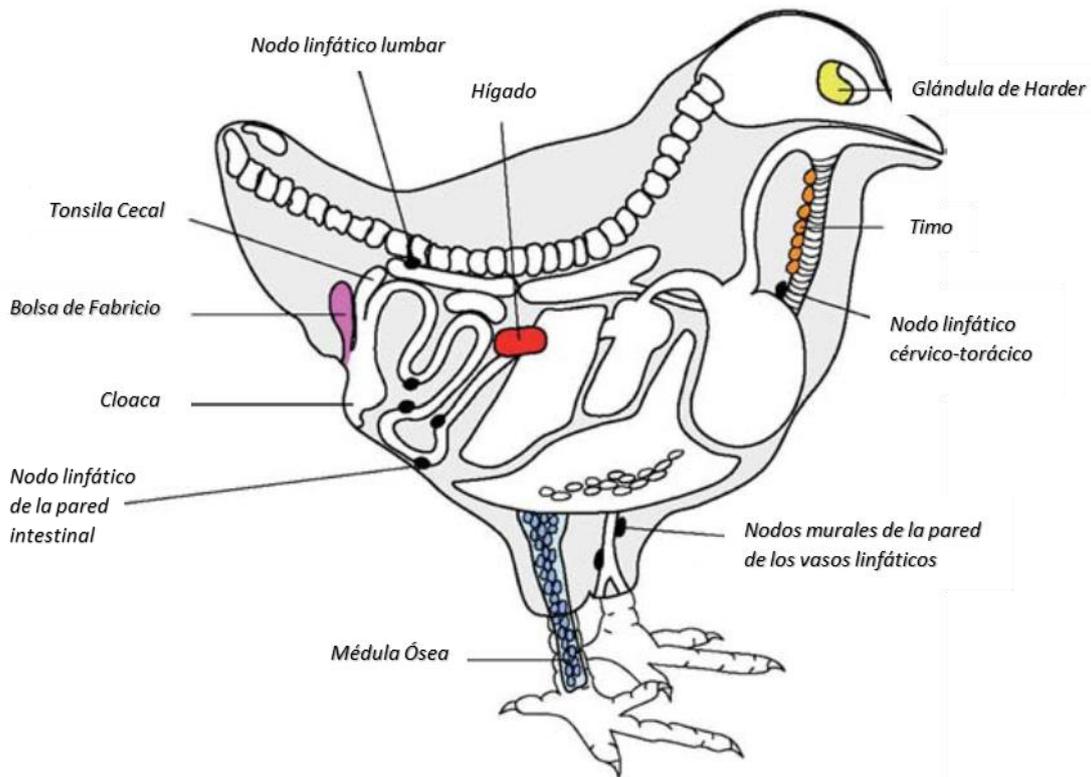


Figura 2 - Órganos linfoides de pollo (adaptado de (Jaffredo, Fellah and Dunon, 2006).

La bolsa de Fabricio recibió su nombre en honor al anatomista Italiano Dr. Hyeronimus Fabricius en el año 1621, debido a que él fue el primero en descubrir en las aves una pequeña bolsa por encima de la cloaca, sin tener conocimiento de su rol. Recién en 1956, donde por serendipia fue descubierta la función precisa del órgano, fue publicado un artículo en la revista *Poultry Science*: "La bolsa de *Fabricius* y la producción anticuerpos" por Bruce Glick, Timothy S. Chang, y R. George Jaap (Glick, Chang and Jaap, 1956) donde fue señalado como el órgano productor de linfocitos B. Por ello, se lo consideró el órgano linfoide primario y de suma importancia en el desarrollo de la inmunidad en aves jóvenes. Actualmente, el artículo escrito por Glick y col. es considerado un documento histórico de la revista.

La bolsa de Fabricio (BF) es un órgano sacciforme característico de las aves, ubicado por encima de la cloaca y por debajo del sacro. Se desarrolla a partir del 5° día de incubación como una evaginación del endodermo del intestino posterior. Aproximadamente a los 10 días de incubación este brote epitelial desarrolla una cavidad y su pared comienza a plegarse. La cavidad está revestida por un epitelio

estratificado que comienza a invaginarse en el mesodermo circundante aproximadamente a los 12 días de incubación. Las células linfoides serían células migrantes que poblarían el esbozo bursal (Lawzewitsh, 1984). La pared de la bolsa de Fabricio tiene una mucosa, que es la más gruesa de las capas de su pared y se proyecta hacia el lumen del órgano en forma de 12 pliegues denominados folias. En el ápice de cada folia el epitelio es simple cilíndrico y se denomina epitelio asociada a folículos (FAE, por su sigla en inglés) que recubre el 10% de la superficie de las folias. La cara interna de los pliegues está recubierta de epitelio pseudoestratificado cilíndrico: el epitelio interfolicular (IFE, por su sigla en inglés) que cubre el 90% de la superficie de las folias (**Figura 3**).

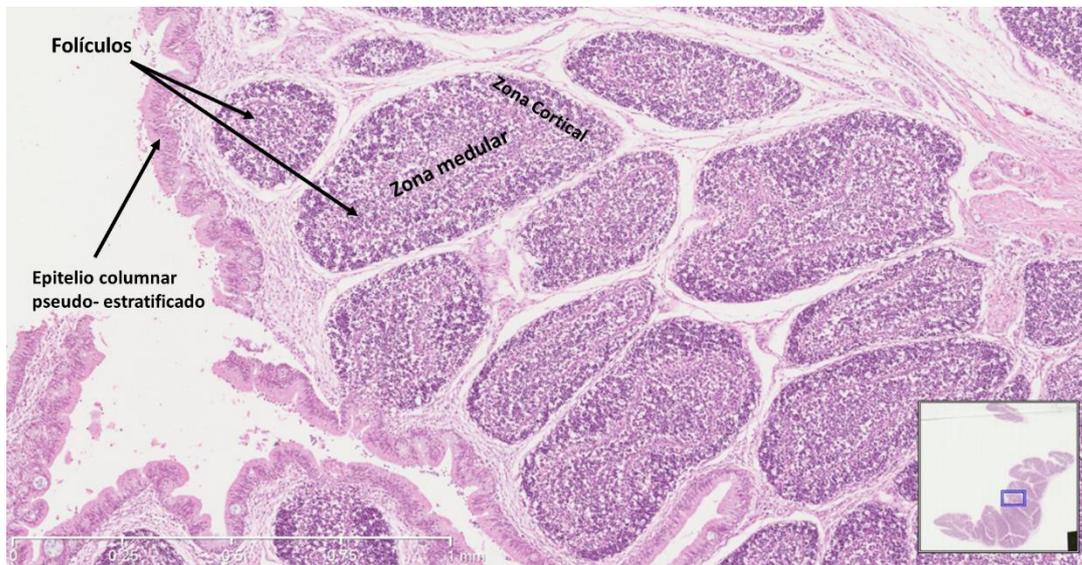


Figura 3 - Corte histológico de la bolsa de Fabricio de un pollo. Adaptado de <http://www.onlineveterinaryanatomy.net/>.

Cada pliegue contiene numerosos folículos linfoides separados unos de otros por medio de fibras de tejido conectivo. En la red reticular de los folículos, aparecen linfocitos apiñados de forma muy densa que ocupa una zona cortical externa los cuales se encuentran separados de los linfocitos de la zona medular por una membrana basal y una capa simple de células epiteliales, en donde dichas células se unen con el epitelio de células cúbicas de la mucosa. Las células especializadas presentes en este sitio son

capaces, mediante pinocitosis, de transferir material (por ejemplo, bacterias) desde la luz bursal a la médula folicular (Gordon and Jordan, 1985).

Brevemente, el desarrollo de la bolsa de Fabricio puede dividirse en tres fases: **A)** de crecimiento rápido, que va desde la eclosión hasta las tres semanas de edad, **B)** “plateau” o meseta, que abarca desde las cuatro a las ocho semanas de edad y, **C)** de regresión, en la cual la bolsa disminuye su tamaño, ocurriendo antes de la madurez sexual. (Glick, 1956; Taylor and McCorkle, 2009) (**Figura 4**).

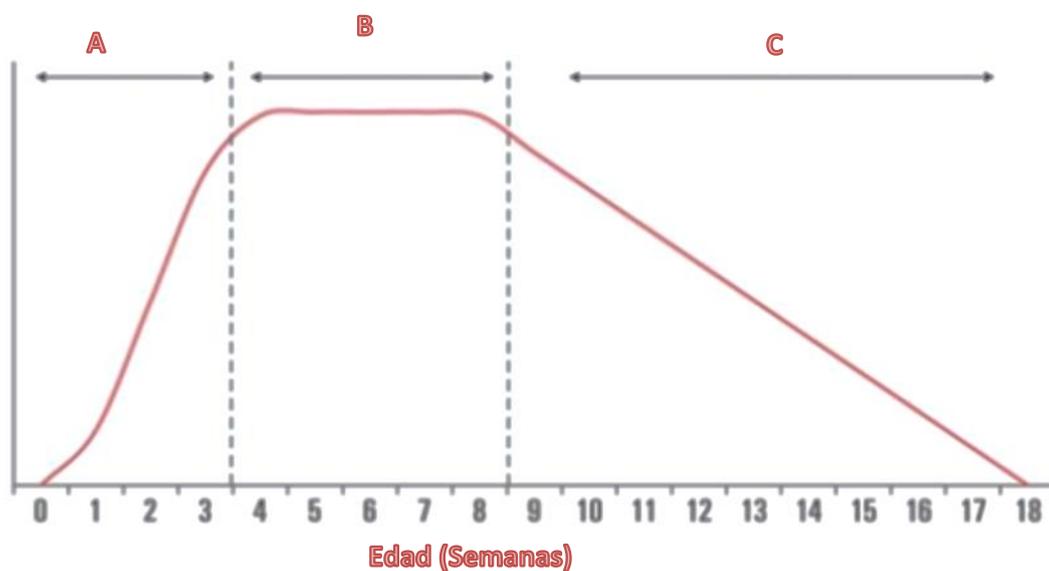


Figura 4 - Representación gráfica de las fases en el desarrollo de la bolsa de Fabricio. A: Fase de crecimiento; **B:** Fase Meseta; **C:** Fase de Regresión.

Algunas enfermedades, como las enfermedades de Gumboro y Marek, producen la destrucción de la bolsa de Fabricio. Si la infección sucede a una edad temprana, se previene la programación de las células B y, si el animal sobrevive, se afectará tanto la respuesta inmune a otras infecciones como la capacidad de inducir la producción de anticuerpos luego de la vacunación (Butcher and Miles, 1994).

Es importante destacar que, actualmente, la producción avícola se desarrolla en forma integrada, intensificándose la crianza del pollo parrillero. Esto conlleva factores que desencadenan estados inmunosupresivos y aumentan la susceptibilidad de las aves a

las enfermedades. La inmunosupresión puede ser causada por agentes infecciosos o no infecciosos. Los agentes inmunosupresores pueden afectar a todos los tipos de inmunidad y así, incrementan la susceptibilidad a agentes patógenos en forma inespecífica (Hoerr, 2010). La atrofia o cambios en los órganos linfoides, como, por ejemplo, la bolsa de Fabricio, son indicadores de inmunosupresión.

1.3 EL VIRUS DE LA ENFERMEDAD INFECCIOSA DE LA BOLSA

El virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa (IBDV) es el miembro prototipo perteneciente al género *Avibirnavirus* de la familia *Birnaviridae*. Su genoma está formado por dos segmentos de ARN doble cadena de diferente tamaño ARN (Müller, Scholtissek and Becht, 1979). El segmento A (3,2 kpb) contiene dos marcos de lectura abiertos (ORF) parcialmente superpuestos. El ORF 1 codifica para la proteína no estructural, VP5 (17 kDa) que no es esencial para la replicación *in vitro*, pero posee un rol importante en la patogenia (Mundt, Beyer and Muller, 1995). 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 5**). 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) (Lejal *et al.*, 2000; Irigoyen *et al.*, 2009). El segmento B (2,8 kpb) contiene un único ORF codifica para la que codifica para la proteína VP1 (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 está presente en la partícula viral en forma libre o asociada al genoma (VPg; **Figura 5**) (Tacken *et al.*, 2000; von Einem *et al.*, 2004).

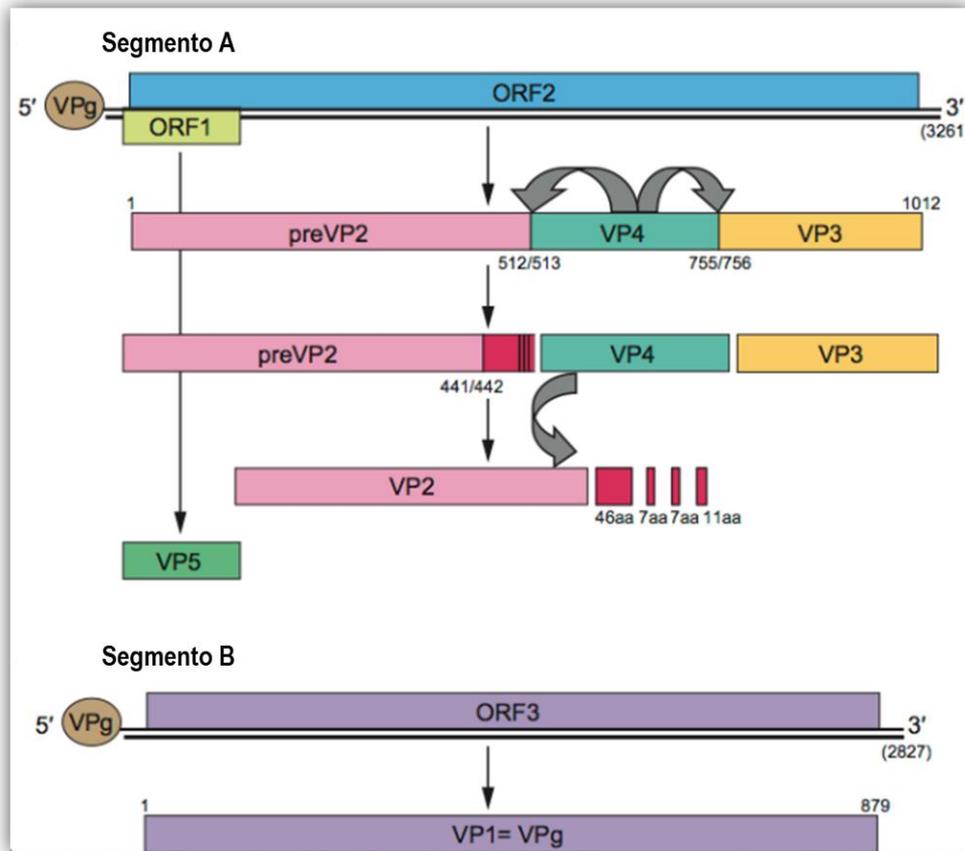


Figura 5 – Representación esquemática del genoma del virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa (IBDV) y del procesamiento de las proteínas codificadas. ORF: marco de lectura abierto. VP2 y VP3: proteínas de la cápside. pre-VP2: precursor de la proteína VP2. VP1: ARN polimerasa viral. VPg: proteína VP1 unida covalentemente al extremo 5' del genoma viral. VP4: proteasa viral. VP5: Proteína no estructural. Las flechas curvas indican sitios de escisión de proteasa. Los números representan posiciones de aminoácidos. Adaptado de Virus Taxonomy: International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV).

Los viriones de IBDV poseen una cápside proteica icosaédrica de 65-70 nm de diámetro, formada por 260 trímeros de la proteína VP2, que protruyen hacia el exterior. Los trímeros de la proteína estructural VP3 se encuentran hacia el interior y estabilizan la cápside (Böttcher *et al.*, 1997; Castón *et al.*, 2001) (**Figura 6**).

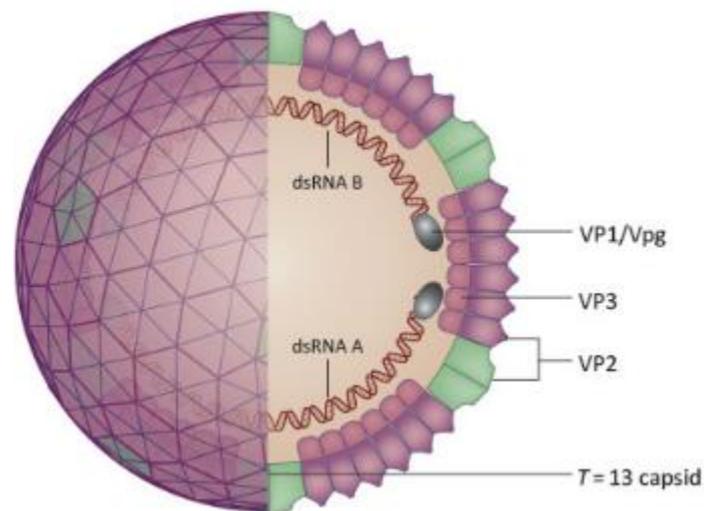


Figura 6 - Estructura de IBDV. (extraído de (Payne, 2017)).

La proteína VP2 es el componente mayoritario de la cápside viral. Es el antígeno principal de IBDV porque posee los determinantes antigénicos contra los cuales está dirigida la respuesta inmune del hospedador. En esta proteína se identificaron epitopes conformacionales capaces de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes contra el virus (Fahey, Erny and Crooks, 1989; Dey *et al.*, 2019). Además, esta proteína posee epitopes, aún no identificados, responsables de inducir una respuesta inmunitaria protectora de tipo celular. Las vacunas vectorizadas (basadas en virus fowlpox o canarypox) recombinantes que expresan la proteína VP2 protegen contra IBDV aun en ausencia de la inducción de anticuerpos seroneutralizantes (Shaw and Davison, 2000; Zanetti *et al.*, 2016).

La proteína de cápside VP2 es también la responsable de la variación antigénica, de la adaptación al crecimiento *in vitro* y de la virulencia del virus (Brandt *et al.*, 2001). De acuerdo a los cambios aminoacídicos en la región hipervariable (aa 206 a 350) de la proteína VP2, IBDV se clasifica en siete genogrupos, siendo el genogrupo 1 el que posee distribución mundial (Michel, Daral and Jackwood, 2017).

1.3.1 LA ENFERMEDAD DE GUMBORO Y SU CONTROL POR VACUNACIÓN

El virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa (IBDV) es el agente causal de una enfermedad aguda, altamente contagiosa y de distribución mundial denominada enfermedad de Gumboro o enfermedad infecciosa de la bolsa (IBD). Este virus afecta especialmente a aves jóvenes y posee un tropismo selectivo 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). En las aves afectadas, IBDV ocasiona linfopenia (inmunosupresión) y consecuentes infecciones secundarias (Ingrao *et al.*, 2013). 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 Den Berg, 2000).

IBDV es altamente estable en el medio ambiente y es transmitido por vía aérea (Zhao *et al.*, 2014). Posee gran resistencia a agentes físicos y químicos, por lo que persiste en los ambientes de crianza, incluso después de la limpieza y desinfección, infectando las parvadas subsiguientes (Eterradossi and Saif, 2013). La enfermedad de Gumboro afecta económicamente la producción de pollos alrededor del mundo de manera directa (mortalidad) o indirecta (asociada principalmente a una severa inmunosupresión).

Existen dos serotipos distintos de IBDV, designados como serotipos 1 y 2, que naturalmente pueden infectar pollos, pavos, gallinas, patos, avestruces y gallinas de Guinea (Eterradossi and Saif, 2013). La patogenia en pollos solo ha sido reportada a causa del serotipo 1, mientras que los del serotipo 2, aislados de pavos y patos, no son virulentos para pollos (McFerran *et al.*, 1980). En base a su patogenicidad, los IBDV del serotipo 1 se clasifican en tres patotipos: cepas clásicas, cepas variantes y cepas hipervirulentas (Eterradossi and Saif, 2013). Las cepas variantes inducen pocos signos clínicos (aunque pueden causar lesiones severas en la BF) 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). La “re-emergencia” de IBDV con variantes antigénicas y cepas muy

virulentas han sido las razones de pérdidas significativas y alta mortalidad en pollos, además el virus está en constante evolución en el campo lo que genera cambios en la antigenicidad y virulencia (Dey *et al.*, 2019). En el caso particular de Argentina, Vera *et al.* (2015) realizaron un análisis filogenético de 51 aislamientos de campo de IBDV y determinaron que corresponden a un linaje argentino que contiene un patrón particular de aminoácidos, extendido por todo territorio nacional, que causa cuadros clínicos de leves a moderados.

El esquema de clasificación actual del IBDV es confuso porque se basa en los tipos antigénicos, variante y clásica, así como en patotipos. Recientemente se propuso un nuevo esquema de clasificación para IBDV basado en seis genogrupos identificados a partir del análisis filogenético sobre la región hipervariable de la proteína VP2 de cepas de todo el mundo (Michel, Daral and Jackwood, 2017). Los genogrupos 1 y 4 son los que prevalecen en Sudamérica (Hernández *et al.*, 2015; Vera *et al.*, 2015; Tomás *et al.*, 2019). De acuerdo a este nuevo esquema, las cepas clásicas corresponden al genogrupo 1 y el linaje de IBDV divergente o distinto (dIBDV) corresponde al genogrupo 4.

La primera línea de defensa contra la enfermedad de Gumboro debe ser la bioseguridad, pero como se mencionó anteriormente, el virus es muy difícil de inactivar y eliminar de los galpones. Por ello, la segunda línea de defensa para proteger a los pollitos contra la infección es mediante el uso de vacunas que se emplean tanto en los lotes de reproductoras como en su progenie.

Las vacunas utilizadas para el control de IBDV son las convencionales inactivadas o vivas atenuadas, las de complejos inmunes y las vectorizadas (recombinantes).

Las **vacunas inactivadas** generalmente se administran a las aves en la etapa previa a la postura para inducir altos niveles de anticuerpos y transferirlos, a través de la yema de huevo, a la progenie (inmunidad pasiva). Estas vacunas pueden ser producidas en huevos embrionados, cultivos celulares o pollos, utilizando el virus vivo. Los IBDV cosechados se inactivan (por radiación, calor o tratamiento químico) y luego se formulan con un adyuvante oleoso para aumentar su inmunogenicidad. La calidad de las vacunas inactivadas varía según su contenido de antígeno, el proceso de

inactivación y la formulación de los adyuvantes (Gardin Y. *et al.*, 2014). Son muy seguras porque no replican en las aves. En general, estas vacunas se usan en aves reproductoras que recibieron durante las primeras semanas de vida alguna dosis de vacuna viva atenuada. De esta forma, se induce la producción de altos niveles de anticuerpos neutralizantes en las reproductoras, los cuales se transmiten pasivamente a la progenie a través de la yema y protegen a la descendencia durante el período crítico de la primera a la segunda semana de vida (Etteradossi and Saif, 2013).

En los animales jóvenes en general se utilizan las **vacunas convencionales vivas atenuadas**. Estas vacunas replican en el órgano blanco (la bolsa de Fabricio), imitan la infección en el hospedador e inducen respuestas inmunitarias de tipo humoral y celular que son protectoras. 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. Sin embargo, la presencia de anticuerpos maternos neutraliza al virus vacunal, por lo que es fundamental determinar el momento óptimo de la vacunación. Por lo tanto, la efectividad de este tipo de vacunas depende de tres factores: el tiempo óptimo de vacunación, los niveles de anticuerpos maternos anti-IBDV y la virulencia del virus vacunal. Las vacunas atenuadas vivas contra IBDV se clasifican en “suaves”: presentan poca efectividad en presencia de anticuerpos maternos y frente a vvIBDV; e “intermedias” o “intermedias plus”, las cuales sobrepasan niveles de anticuerpos maternos moderados o altos, respectivamente. Sin embargo, estas últimas ocasionan lesiones moderadas a graves en la BF y, por lo tanto, causan distintos grados de inmunosupresión (Mazariegos, Lukert and Brown, 1990; Tsukamoto *et al.*, 1995; Kumar, Singh and Prasad, 2000; Rautenschlein *et al.*, 2005). Una desventaja de las vacunas vivas atenuadas es la posible reversión de la virulencia y, en consecuencia, provocar enfermedad y/o pérdidas en la producción (Müller *et al.*, 2012). Por lo tanto, existe un dilema entre seguridad y eficacia, por lo cual en el momento de la vacunación es fundamental tener en cuenta los factores mencionados anteriormente.

Las **vacunas basadas en complejos inmunes** consisten en una suspensión de IBDV (cepa intermedia plus) que se mezcla con una concentración adecuada de anticuerpos policlonales anti-IBDV. El proceso resulta en una vacuna de un complejo virus-

anticuerpo, que puede ser aplicado *in ovo* o al día de edad. La cantidad de anticuerpos en el complejo es tan pequeña que no incrementa la inmunidad materna pero es suficiente para retrasar por varios días el curso normal de replicación del virus vacunal (Jeurissen *et al.*, 1998). Estas vacunas poseen la ventaja de sobrepasar la inmunidad materna, pero como la cepa vacunal es del tipo intermedia plus, produce lesiones en la BF y puede provocar inmunosupresión. Este tipo de vacunas se usa en pollos parrilleros.

Las **vacunas vectorizadas**, que combinan las características de seguridad y eficacia, constituyen una de las estrategias más exitosas para reemplazar las vacunas vivas atenuadas en la industria avícola. Todas las vacunas vectorizadas expresan la proteína VP2 como inmunógeno y están basadas en vectores virales derivados de virus de las enfermedades de Marek y Newcastle, fowlpox, canarypox, virus vaccinia Ankara modificado (MVA), adenovirus aviares y herpesvirus de pavo (HVT).

La vacuna fpIBD1, vector de FWPV que expresa la proteína VP2 fusionada a la enzima beta galactosidasa, fue una de las primeras que se obtuvo hace casi 30 años (Bayliss *et al.*, 1991). Sin embargo, como la eficiencia de fpIBD1 era variable (dependía de la inmunidad pre-existente contra el vector y de la cantidad o título del virus IBDV en el desafío) se discontinuó su uso. Recientemente, en nuestro laboratorio se desarrolló y evaluó un candidato a vacuna vectorizada por FWPV que expresa la proteína VP2 madura. Esta vacuna recombinante protegió parcialmente frente al desafío con IBDV porque evitó el daño histopatológico en la BF pero solo disminuyó 100 veces la cantidad del virus de desafío recuperado de dicho órgano (Federico, 2018).

Existen numerosos trabajos publicados sobre el uso de distintos virus para el desarrollo de vacunas vectorizadas contra la enfermedad de Gumboro, sin embargo, como se mencionó anteriormente, solo algunos de ellos se comercializan como vacunas contra IBDV (ver **Tabla 1**). Los vectores virales son capaces de inducir respuestas inmunes protectoras contra IBDV y como no producen lesiones significativas en la BF se evita el efecto adverso de las vacunas atenuadas convencionales: la inmunosupresión.

Las vacunas vectorizadas comerciales basadas en vectores de HVT se administran *in ovo* o al día de edad, mientras que la basada en el vector de canarypox (CNPV) está

aprobada para su aplicación al día de edad. Estas vacunas vectorizadas son capaces de sobrepasar la inmunidad materna porque no llevan la proteína VP2 en su estructura, la expresan *de novo* y, de esta forma, inducen respuestas inmunitarias específicas que son protectoras frente al desafío con IBDV. En el caso de las vacunas HVT-IBDV, son bivalentes para pollos porque protegen contra la enfermedad de Marek (por el vector) y contra IBDV (porque expresan la proteína inmunogénica VP2). Sin embargo, por la potente respuesta inmune anti-vector que se genera, la aplicación de dos vacunas vectorizadas que usan el mismo vector HVT reduce la eficiencia de una o ambas vacunas (Dunn *et al.*, 2019). Por otro lado, el vector de CNPV es muy seguro porque no replica en las aves vacunadas (Zanetti *et al.*, 2016) y no se detecta una respuesta inmune humoral anti vector (resultados no publicados). La desventaja que presentan estas vacunas es la necesidad de una estricta cadena de frío para su comercialización ya que deben ser almacenadas y transportadas en nitrógeno líquido. Esto se debe a que el virus HVT está asociado a células, mientras que para los vectores de CNPV se relaciona con el proceso de producción (combinación de dos factores: títulos virales obtenidos *in vitro* en infecciones en monocapas celulares y pérdida de viabilidad durante el proceso de liofilización).

Por lo tanto, las vacunas de vectorizadas para la prevención de la enfermedad de Gumboro se producen con las ventajas de proteger contra las cepas clásicas e hipervirulentas de IBDV, de superar la interferencia con los anticuerpos derivados de la madre y de disminuir o evitar el efecto secundario no deseado de las vacunas vivas atenuadas convencionales (inmunosupresión por daños en la BF) (Müller *et al.*, 2012; Prandini *et al.*, 2016).

Sin embargo, es posible desarrollar otros vectores virales que combinen las características antedichas, pero con la posibilidad de producirlos en cultivos en suspensión y/o almacenarlos/transportarlos liofilizados refrigerados (evitando el costo y la logística que implica mantener la cadena de frío de nitrógeno líquido).

1.4 VECTORES VIRALES BASADOS EN VIRUS VACCINIA ANKARA MODIFICADO

Los poxvirus pertenecen a la familia *Poxviridae*, que comprende a un grupo de virus ADN complejos 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. El ciclo de replicación se divide en tres etapas: temprana, intermedia y tardía (**Figura 7**). En la fase temprana, el aparato transcripcional empaquetado dentro del *core* de las partículas permite la síntesis de ARNm virales. Luego de su síntesis son extruidos a través de los poros presentes en la superficie del *core* hacia el citoplasma de la célula infectada. La transcripción de los genes intermedios y tardíos ocurre en el citoplasma de la célula sólo después de la replicación del ADN viral. Luego de una infección sincronizada, los ARNm pueden detectarse por aproximadamente 48 h (Fenner, 1996).

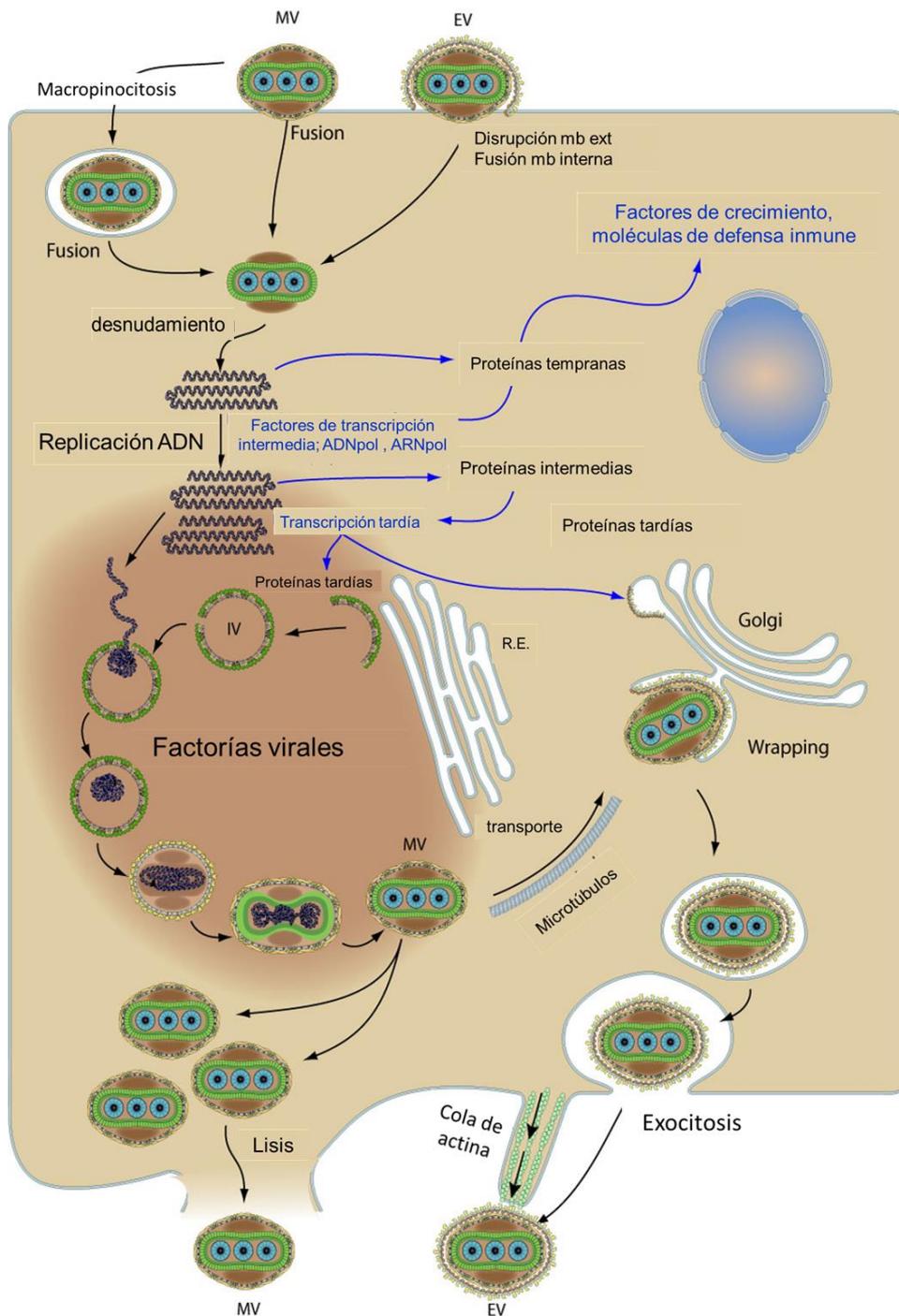


Figura 7 - Ciclo de replicación de poxvirus. MV: viriones maduros, EV: viriones envueltos, IV: viriones inmaduros (adaptado de <https://viralzone.expasy.org/4399>)

El proceso de ensamblaje, maduración y liberación de los poxvirus es muy complejo. Las proteínas y el ADN viral se acumulan en factorías virales citoplasmáticas, donde se forman los viriones inmaduros (IV). Luego de un proceso de adquisición de proteínas

estructurales y membranas, se forman los viriones maduros intracelulares (MV). La mayoría de los MV permanece en el citoplasma y pueden ser infectivos luego de su liberación por lisis celular; sin embargo, una fracción de ellos incorpora una envoltura de membrana adicional al atravesar el *trans*-Golgi originando los viriones envueltos (EV). Los EV se mueven a través de los microtúbulos de actina hacia la periferia de la célula. Al llegar a la membrana plasmática, la membrana externa de los EV se fusiona con la membrana plasmática resultando en la exocitosis de viriones asociados a células (forma predominante), o viriones extracelulares (libres). Los primeros, se acoplan a filamentos de actina citoplasmática que los proyectan hacia las células adyacentes (diseminación célula-célula) mientras que los segundos son los responsables de la diseminación del virus hacia células más alejadas (Fenner, 1996).

El virus vaccinia Ankara modificado (MVA) es un poxvirus perteneciente al género *Orthopoxviridae*. Su genoma está totalmente secuenciado y posee 178 kpb (Antoine *et al.*, 1998). Es un virus altamente atenuado obtenido luego de más de 570 pasajes de la cepa corioalantoidea del virus Vaccinia Ankara (CVA) en cultivos primarios de fibroblastos de embrión de pollo (FEP) (Sutter and Staib, 2003). El fenotipo atenuado del MVA es el resultado de la delección de grandes porciones del genoma y numerosas mutaciones que afectaron particularmente a las proteínas que interactúan con el hospedador, a los genes con motivos tipo anquirina y a algunas proteínas estructurales (Antoine *et al.*, 1998; Blanchard *et al.*, 1998). En 1998, Antoine y col., publicaron la secuencia completa de MVA. Su genoma contiene 178 kpb, aproximadamente un 15 % menos que la cepa parental CVA (208 kpb). En el genoma de MVA se mapearon 193 marcos de lectura abierto (ORF, por su sigla en inglés) que corresponden a 177 genes, 25 de los cuales están parcialmente delecionados y/o sufrieron mutaciones que originan proteínas truncadas (**Figura 8**).

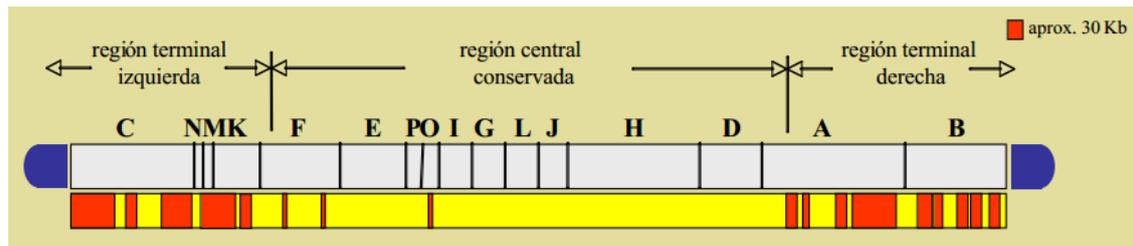


Figura 8 - Organización genómica del virus MVA. En la parte superior de la figura se muestra la molécula lineal de ADN bicatenario. En la parte inferior, se muestran los genes intactos (en amarillo) y las deleciones que se introdujeron en el genoma de MVA durante el proceso de atenuación (en rojo). Extraído de (Nájera García, 2007).

En la etapa final de la campaña de erradicación de la viruela se utilizó al virus MVA como vacuna y se administró a más de 120.000 personas (Meyer and Paul-Ehrlich, 2013). Los resultados obtenidos demostraron que MVA no es un virus patogénico y que puede usarse en animales e individuos inmunocomprometidos, a diferencia de otros poxvirus de tipo replicativo como VACV (Stittelaar *et al.*, 2001). Actualmente, el virus MVA está almacenado por el gobierno de los Estados Unidos como la vacuna para ser empleada contra el uso bioterrorista de la viruela (vacuna IMVAMUNE producida por la empresa Bavarian Nordic). Estos antecedentes son un excelente historial de la seguridad del uso de MVA como vacuna (revisado en (Gilbert, 2013).

El virus MVA posee un tropismo celular limitado, solo replica productivamente en cultivos de FEP, QT35d (células de embrión de codorniz) y BHK-21 (*Baby Hamster Kidney*). En la mayoría de las células de mamífero la reproducción viral está bloqueada en estadios tardíos de la infección, impidiendo el ensamblaje de ciertas proteínas estructurales y por consiguiente la formación de viriones maduro (M W Carroll and Moss, 1997; Drexler *et al.*, 1998; Gallego-Gómez *et al.*, 2003).

El uso de los poxvirus recombinantes como vectores virales en el desarrollo de vacunas comenzó hace más de 30 años con el virus vaccinia (VACV) y, luego continuó con el uso de las variantes atenuadas de VACV (como el virus MVA) o con los avipoxvirus (como los virus FWPV y CNPV) (revisado en (Sánchez-Sampedro *et al.*, 2015).

Las principales ventajas del uso de MVA como vacuna vectorizada son su perfil de seguridad y la potente respuesta inmunitaria que inducen contra el antígeno foráneo que expresan *in vivo*.

La metodología utilizada para la generación de poxvirus recombinantes es la recombinación homóloga *in vivo* entre el genoma viral y un ADN plasmídico que porta el gen de interés bajo regulación de un promotor temprano del virus vaccinia flanqueado por regiones virales no esenciales para la replicación viral *in vitro* (**Figura 9**). Los sitios blanco de inserción más utilizados son los genes *MVA086R* y *MVA165R* que codifican para la enzima timidina quinasa viral (TK) y la proteína viral hemaglutinina (HA), respectivamente (Antoine *et al.*, 1996; Scheiflinger, Falkner and Dorner, 1996).

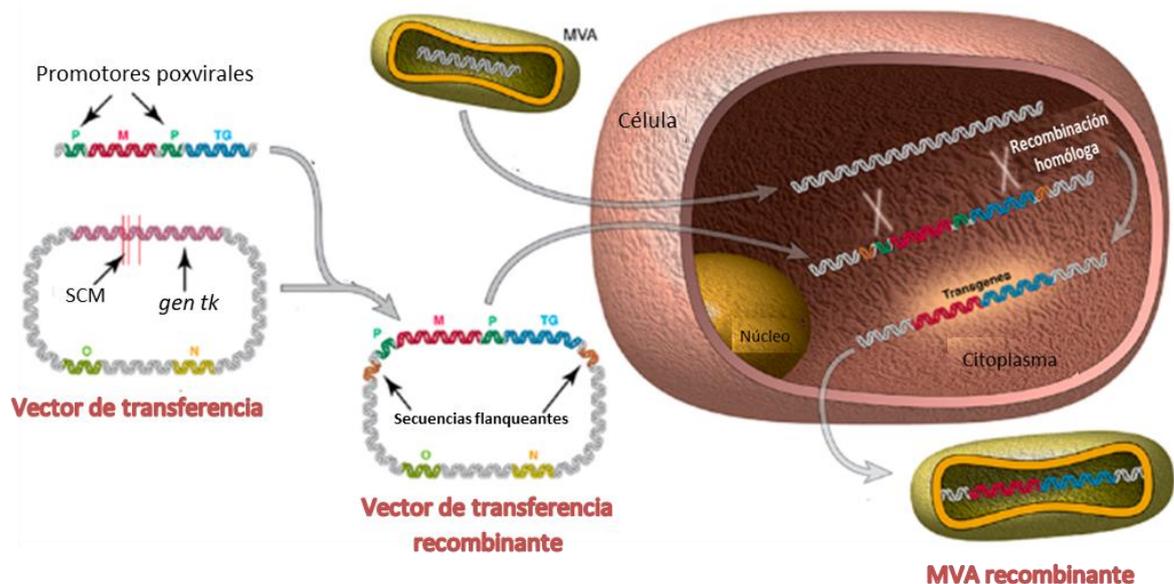


Figura 9 – Construcción de MVA recombinantes. El vector de transferencia recombinante que contiene el gen de interés se transfecta en células infectadas con el virus MVA. El MVA recombinante se produce por recombinación homóloga *in vivo*. *gen tk*: gen viral *MVA086R* (secuencias flanqueantes); M: gen que codifica para enzima marcadora (*lac Z* o *uid A*); TG: gen de interés; P: promotor temprano de poxvirus; O: Origen para la replicación del plásmido en bacterias; N: gen de resistencia a antibiótico (para la selección del plásmido en bacterias); SCM: sitio de clonado múltiple (adaptado de (Okoli *et al.*, 2018).

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*).

Existen numerosos trabajos publicados de pruebas preclínicas y clínicas de candidatos vacunales basados en MVA, pero hasta la fecha ninguna de estas vacunas está comercialmente disponible. En particular, los vectores de MVA se evaluaron en pruebas clínicas (Fase 1 y 2) como vacunas para la prevención de SIDA, malaria, tuberculosis, leishmaniosis, influenza (subtipo H5) y, actualmente, se realizan pruebas preclínicas contra COVID-19 (Consejo Superior de Investigaciones Científicas de España). En el caso de los vectores de MVA como vacunas veterinarias para mamíferos existen muchos trabajos publicados de pruebas preclínicas contra diversos virus, bacterias y parásitos (revisado en (Volz and Sutter, 2017)).

En cambio, son pocos los trabajos publicados del uso de MVA como vacuna vectorizada para pollos. Entre ellos, se destacan los vectores que expresan antígenos derivados del virus de influenza aviar (AIV; (Veits *et al.*, 2008; Boyd *et al.*, 2013; Kingstad-Bakke *et al.*, 2019) o de IBDV, de nuestro grupo de investigación (Zanetti *et al.*, 2012; Richetta *et al.*, 2017)).

En el caso de las vacunas contra influenza aviar se evaluaron dos estrategias distintas. Por un lado, se utilizaron vectores de MVA que expresan las proteínas hemoaglutinina H5 (Veits *et al.*, 2008) o H5 mosaico (H5M, (Kingstad-Bakke *et al.*, 2019)). Todos los animales vacunados con el vector MVA-H5 sobrevivieron al desafío, pero no se disminuyó la morbilidad ni la capacidad de eliminar virus infeccioso luego de la infección. El vector MVA-H5M indujo una potente respuesta inmunitaria (humoral y celular), protegió frente al desafío con distintas cepas de AIV y no se detectó excreción viral post-desafío. Por otro lado, se buscó una vacuna universal contra AIV por la inducción de una respuesta inmune contra proteínas altamente conservadas entre distintas cepas. Para ello, se evaluó la estrategia de vacunación que combina inmunizaciones secuenciales con dos vectores virales (MVA y adenovirus) que expresan el mismo antígeno foráneo: una construcción de fusión entre la nucleoproteína y la proteína de matriz de AIV. La protección contra el desafío con una cepa de baja patogenicidad fue parcial, pero este trabajo demuestra que se indujo una respuesta

inmune celular específica contra las proteínas de AIV y, a futuro, la inclusión de antígenos conservados podría ser ventajosa en el desarrollo de vacunas contra influenza aviar (Boyd *et al.*, 2013).

En nuestro laboratorio se obtuvo el virus MVA recombinante que porta y expresa la secuencia codificante de la proteína VP2 madura de IBDV (MVA-VP2). Los virus recombinantes expresan esta proteína en el citoplasma de las células infectadas (**Figura 10**) y, su inoculación en pollos (esquema de dos dosis homólogas) induce la producción de anticuerpos seroneutralizantes (SN) de IBDV. Sin embargo, el nivel de estos anticuerpos fue ocho veces menor que el inducido por la vacuna viva atenuada de IBDV (título SN de 128 y 1024, respectivamente; (Zanetti *et al.*, 2012).

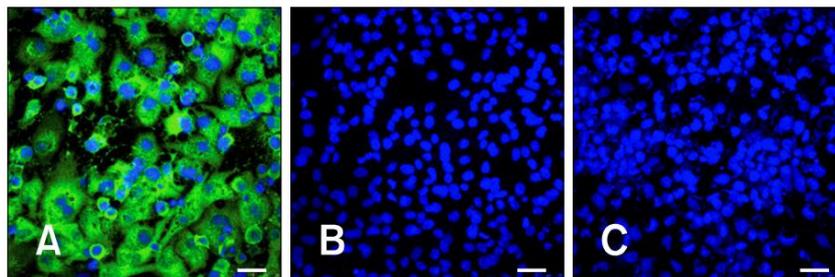


Figura 10 – Expresión de la proteína VP2 en células infectadas con MVA VP2. Ensayo de inmunofluorescencia sobre monocapas de células DF1 no infectadas (B) o infectadas con MVA-VP2 (A) o MVA no recombinante (C). La proteína VP2 se detectó con el anticuerpo monoclonal 17G2 (INGENASA) y un 2^{do} anticuerpo anti especie conjugado a Alexa 488. Los núcleos se tiñeron con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). La barra indica 25 μ m (fotografía extraída de (Zanetti *et al.*, 2012)).

Con el propósito de aumentar los niveles de anticuerpos específicos contra IBDV, el vector MVA-VP2 se evaluó en un esquema de inmunización de dos dosis heterólogas combinado con la proteína VP2 recombinante expresada en plantas. En este trabajo, los pollos se vacunaron a los 14 y 28 días de edad, y se desafiaron con IBDV a los 49 días de edad (etapa final de la fase meseta del desarrollo de la BF). El esquema de vacunación protegió contra el desafío independientemente del orden en que se administraron los inmunógenos heterólogos (proteína VP2/MVA-VP2 o viceversa). Sin embargo, en ambos casos, los niveles de anticuerpos seroneutralizantes de IBDV fueron menores a los observados con un esquema de dos dosis de la proteína

recombinante VP2 (Richetta *et al.*, 2017). Aunque los anticuerpos neutralizantes se consideraron la herramienta más relevante para proteger contra la infección por IBDV, estos resultados concuerdan con los obtenidos con la vacuna R-VAC INMUNER IBD (vectorizada por CNPV) donde hay protección aunque no se detecta una respuesta humoral específica contra IBDV (Zanetti *et al.*, 2016; Novella *et al.*, 2018).

La distribución *in vivo* o biodistribución del virus MVA fue evaluada en ratones por (Gómez *et al.*, 2007). En este estudio, se comparó el comportamiento del virus vaccinia (cepa WR, de replicación competente) y del virus MVA (no replicativo en células de mamíferos). Los virus recombinantes WRluc y MVA_{luc}, que expresan el gen de la luciferasa, se inmunizaron por vía sistémica o de mucosas y la actividad enzimática se determinó *in situ* por oxidación del sustrato molecular (luciferina) a través de imagen biofotónica. Las imágenes de bioluminiscencia mostraron que, a diferencia de WRluc, los recombinantes atenuados MVA_{luc} expresaron transitoriamente el gen reportero. Esta expresión estuvo limitada al sitio de inoculación y a las primeras 24-48 h post-infección para la mayoría de las vías analizadas (**Figura 11**).

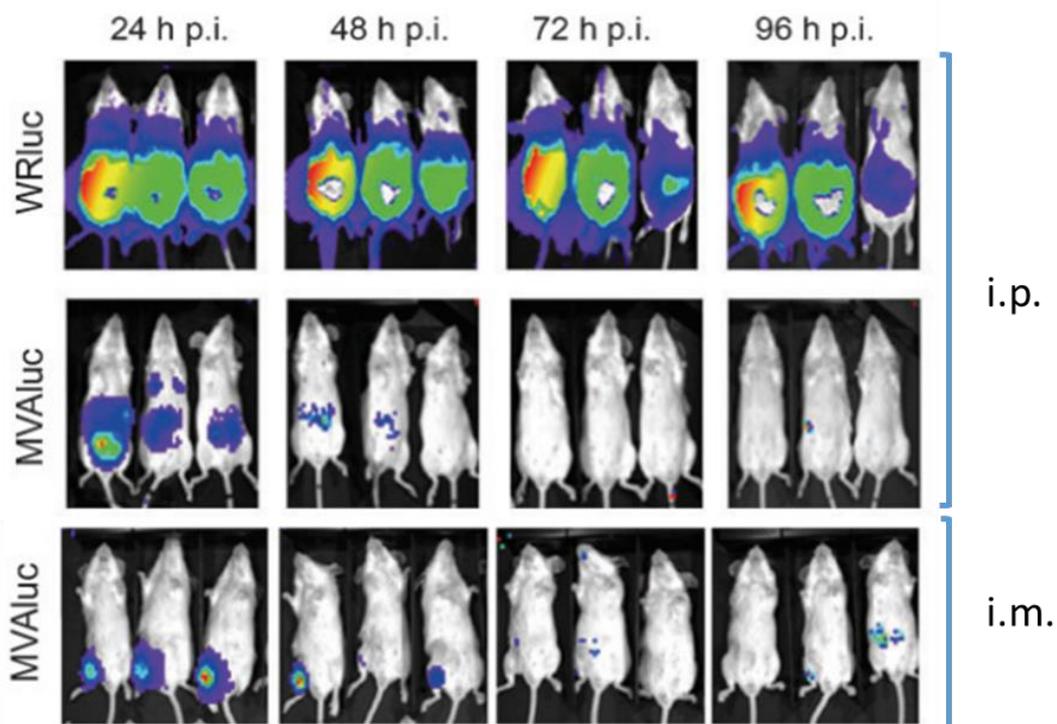


Figura 11 - Imágenes de bioluminiscencia de ratones inmunizados con WRluc (VACV) o MVA_{luc}, por vía intraperitoneal (i.p.) o intramuscular (i.m.). h.p.i.: horas post infección. Adaptado de (Gómez *et al.*, 2007).

A diferencia de mamíferos, donde la deficiencia de replicación y la seguridad de MVA están bien establecidas, muy poco se sabe sobre la infección por MVA en hospedadores aviares. Es un punto importante a determinar debido a que estos virus se aislaron por su capacidad replicativa en FEP.

En nuestro laboratorio, evaluamos (*ex vivo* e *in situ*) la actividad de la enzima marcadora β -glucuronidasa (GUS) luego de la inmunización del virus recombinante MVA-GUS por vía intramuscular en la pata de pollos (Zanetti F., resultados no publicados). Como se observa en la **Figura 12** al día uno y cuatro post-infección (únicos tiempos evaluados) la actividad de GUS se visualiza por la coloración azul en el tejido (degradación del sustrato cromogénico X-Gluc). La porción del tejido coloreado y la intensidad de dicha coloración (indicativos de la actividad de GUS) disminuyen con el tiempo. Este resultado indicaría que el virus MVA-GUS no replica productivamente en el sitio de inoculación.

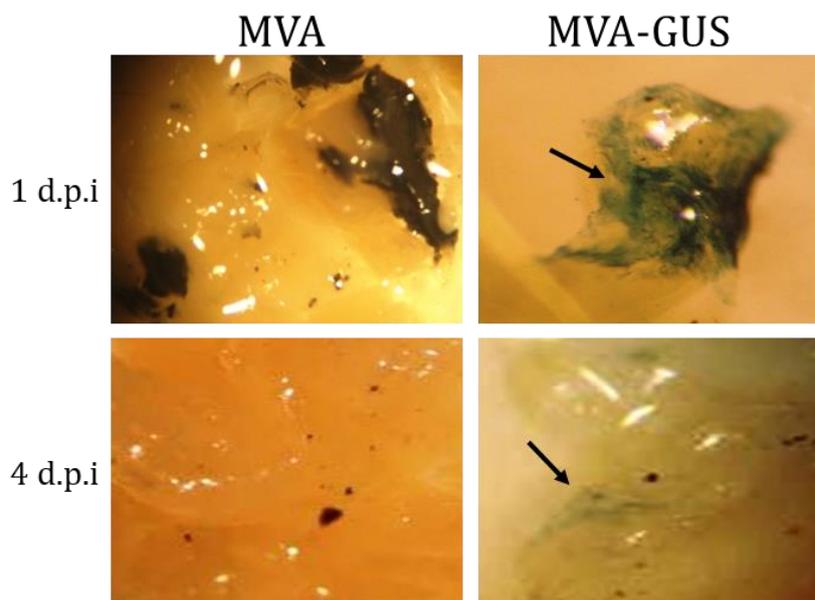


Figura 12 - Actividad de la enzima GUS *in situ* en el músculo de pollos infectados con MVA o MVA-GUS. El sitio de inoculación se identifica por marcación con tinta china (zonas de coloración negra), que se agrega a las preparaciones virales. Las flechas indican las zonas de coloración azul por degradación del sustrato cromogénico de la enzima GUS. d.p.i: días post-infección.

En un primer estudio de vacunación *in ovo* con MVA recombinante, Boyd *et al.* (2013) no observaron efectos adversos, pero tampoco era el objetivo de dicho trabajo

examinar la biodistribución o la patogénesis de la infección por MVA. En cambio, Langenmayer *et al.* (2018) realizaron un estudio detallado de la replicación de MVA por inoculación en membrana corioalantoidea (MCA) de huevos embrionados de 11 días. Como todos los poxvirus, el sitio principal de replicación de MVA fue la MCA. Además, el virus se diseminó a los tejidos embrionarios internos y externos, siendo el hígado el órgano blanco principal junto con las células como los macrófagos y las células hematopoyéticas, determinándolas como las células “target” del virus y postulándolas, además, como responsables de la propagación, pero no se detectaron lesiones en los órganos ni mortalidad (incluso a dosis tan altas como 10^7 unidades infecciosas). Teniendo en cuenta que los embriones de pollo están inmunológicamente inmaduros durante la ontogénesis, los resultados de estos autores indican el perfil de seguridad de MVA. Sin embargo, es fundamental completar estos estudios para determinar la capacidad replicativa de MVA en embriones de 18 días y en pollos de diferentes edades, que serían los blancos de las vacunas vectorizadas por MVA.

1.5 VECTORES VIRALES BASADOS EN ADENOVIRUS HUMANO TIPO 5

La familia *Adenoviridae* comprende a los virus sin envoltura más grandes conocidos hasta el momento (90-100 nm) y que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza.

Los adenovirus (Ad) tienen una morfología característica con una cápside icosaédrica que consta de tres proteínas principales: hexón (II), base de pentón (III) y una fibra nudosa (IV); junto con otras proteínas menores: VI, VIII, IX, IIIa y IV a2 (**Figura 13**; (Stewart, Fuller and Burnett, 1993). El genoma viral consiste en una molécula de ADN lineal y bicatenario de aproximadamente 35 kpb, con una proteína terminal (TP) unida covalentemente al extremo 5' (Rekosh *et al.*, 1977).

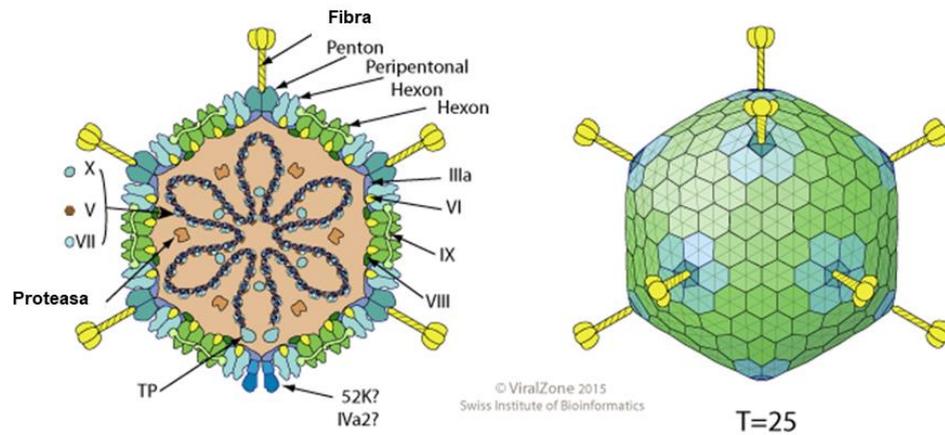


Figura 13 - Estructura de adenovirus. ([https://viralzone.expasy.org/4?outline=all by species](https://viralzone.expasy.org/4?outline=all%20by%20species)).

El genoma está flanqueado por repeticiones terminales invertidas (ITR) de 100-140 nucleótidos y una señal de empaquetamiento (ψ) cerca del ITR izquierdo. El ADN del virus está íntimamente asociado con la proteína VII, muy básica, y un péptido pequeño denominado *mu* (Anderson, Young and Flint, 1989). Otra proteína, V, está empaquetada con este complejo de ADN-proteína y proporcionaría una estructura de enlace a la cápside a través de la proteína VI (Matthews and Russell, 1995). El virus también contiene una proteasa codificada por virus (Weber, 1976; Webster *et al.*, 1989) que es necesaria para el procesamiento de algunas de las proteínas estructurales y, así, producir viriones maduros infecciosos. El genoma contiene gran cantidad de genes y su transcripción es nuclear, en dos fases: temprana (replicación) y tardía (ensamblado de los viriones). Todos los genes son transcritos por la enzima ARN polimerasa II de la célula hospedadora y producen múltiples ARNm por *splicing* alternativo y uso de diferentes sitios de poliadenilación (**Figura 14**).

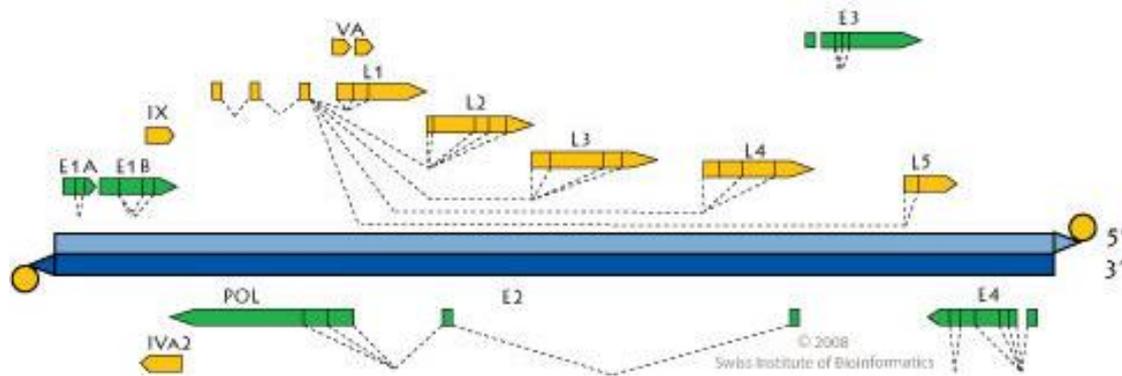


Figura 14 – Representación esquemática del genoma de adenovirus humano tipo 5 (AdHu-5; https://viralzone.expasy.org/4?outline=all_by_species).

El ciclo de replicación de los adenovirus ocurre en el núcleo de la célula hospedadora, utilizando la maquinaria celular, incluyendo la expresión de genes y la replicación del genoma de ADN (revisado en (Charman, Herrmann and Weitzman, 2019). Los viriones se asocian a la célula blanco por unión a su receptor Coxsackie/Adenovirus (CAR; (Bergelson *et al.*, 1997). Luego de la unión al CAR, son internalizados vía endocitosis mediada por integrinas (Russell, 2000) seguido por un proceso complejo de desarmado de las partículas virales, a partir de lo cual las nucleocápsides son transportadas activamente por los microtúbulos hasta los poros nucleares donde, finalmente, los genomas virales son importados al núcleo celular. Una vez en el núcleo, comienza el programa de expresión de los genes tempranos, que incluye la producción de los componentes de la maquinaria de replicación del ADN viral. La replicación del genoma de los Ad es un pre-requisito para la expresión de los genes virales tardíos que codifican las proteínas estructurales del virus (**Figura 15**).

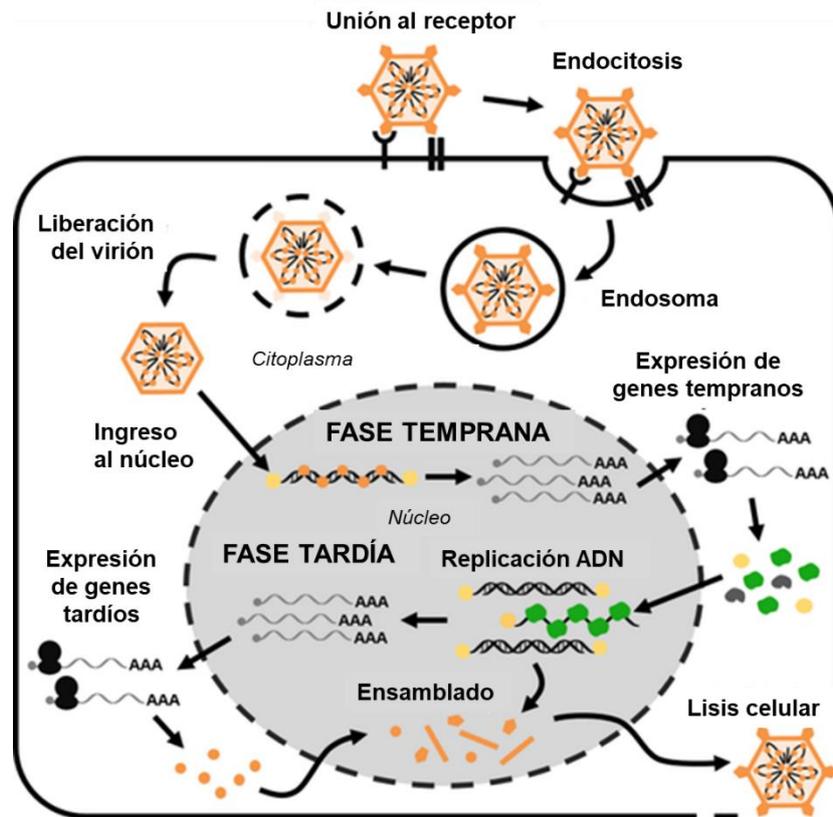


Figura 15 - Ciclo de replicación de adenovirus. (adaptado de (Charman, Herrmann and Weitzman, 2019).

Las proteínas tempranas de Ad, producidas antes de la replicación del ADN viral, modulan la expresión génica viral, dirigen la replicación del genoma viral y regulan diversos procesos celulares para optimizar el entorno de la célula hospedadora para la replicación viral. El gen E1A es el primero que se transcribe durante la infección por Ad y codifica dos fosfoproteínas principales que interactúan con una gran cantidad de proteínas celulares para regular diversos procesos biológicos, incluida la transcripción de genes virales y celulares, ciclo celular, apoptosis, diferenciación, transformación y respuestas inmunes. La proteína de Ad E1B-55K también es multifuncional y se requiere, junto con E1A, para la transformación oncogénica mediada por Ad de células primarias. Además, regula la exportación nuclear de ARNm virales, inhibe la exportación nuclear de ARNm celulares, inhibe las propiedades de activación transcripcional de p53 e induce la degradación proteasómica de proteínas celulares específicas. Es así que la proteína E1B-55K regula la replicación del virus, la expresión

génica viral y celular, una respuesta al daño del ADN y la apoptosis de la célula hospedadora (revisado en (Sohn and Hearing, 2016)).

La proteína E1A promueve la expresión de las unidades de transcripción E2, E3 y E4, que son esenciales para iniciar la replicación del genoma y suprimir las respuestas de inmunidad antiviral, incluida la apoptosis, la respuesta al daño del ADN y la inflamación. Los compartimientos de replicación se forman a las 6 – 8 h después de la entrada inicial y producen grandes cambios morfológicos en el núcleo (revisado en (Pied and Wodrich, 2019)). Luego de la replicación del ADN, comienza la expresión génica tardía de la mayoría de las proteínas estructurales, se ensamblan las cápsides virales y se empaquetan los genomas. Los viriones maduros se liberan de las células para iniciar una nueva ronda de infección (**Figura 15**).

Los vectores de Ad son candidatos prometedores como medicamentos de terapia avanzada para el tratamiento de tumores malignos, vacunas vectorizadas contra enfermedades infecciosas o vectores de transferencia génica para terapia génica.

Desde fines de los '80 (Alkhatib and Briedis, 1988) los Ad han sido evaluados como vectores virales para la prevención de enfermedades infecciosas porque tienen varias de las cualidades que se requieren para que una vacuna vectorizada sea exitosa: su genoma está bien caracterizado, sus viriones son estables y no eliminan el transgen, poseen un amplio tropismo celular, permanecen como episomas y se evita su inserción en el genoma celular, inducen potentes respuestas inmunes innatas y adaptativas (de anticuerpos y de células CD8+), existen técnicas simples bien establecidas para la construcción de Ad recombinantes y se alcanzan altos títulos virales *in vitro* (revisado en (Lasaro and Ertl, 2009; Folgori and Capone, 2012; Fougeroux and Holst, 2017)).

Los Ad defectivos en replicación se obtienen por delección de los genes del *locus* E1, el cual es esencial para la replicación viral. Su amplificación se realiza *in vitro* en las líneas celulares HEK 293A o PER.C6 que complementan en *trans* las proteínas E1 de AdHu-5.

Los **vectores AdHu-5/ Δ E** se usan para el desarrollo de vacunas en distintas especies (roedores, primates no humanos y humanos) debido a que combinan las características de seguridad (son bien tolerados y no replican en el organismo vacunado) y eficacia

(induces respuestas inmunes protectoras) (revisado en (Liniger, Zuniga and Naim, 2007). Numerosos trabajos han sido publicados utilizando estos tipos de vectores virales y, en el caso de humanos, se realizaron ensayos clínicos como candidatos a vacunas contra HIV, virus de Ébola y, más recientemente, contra SARS-CoV2 (NCT04398147, www.clinicaltrials.gov). La vacuna Sputnik V expresa la proteína *spike* de SARS-CoV2 a partir de vectores virales basados en Adenovirus humano 26 y 5.

Existen sistemas comerciales para la obtención de adenovirus recombinantes basados en el genoma de AdHu-5/ Δ E1- Δ E3, como el *ViraPower™ Adenoviral Expression System* (Thermo Fischer Scientific) que permite la obtención de partículas de Ad deficientes en su replicación, que se usan como vectores para la expresión transitoria de genes de interés en células de mamíferos (en división o quiescentes). Este sistema se utilizó en este trabajo de Tesis y consta de dos componentes: i) el vector de expresión pAd/CMV/V5/DEST™ y, ii) las células HEK 293A.

La expresión del gen de interés (transgen) está controlada por el promotor derivado del citomegalovirus (CMV) humano, que es reconocido por la enzima ARNpol II celular y se expresa constitutivamente.

Los Ad recombinantes se transducen dentro de las células blanco, son transportados al núcleo donde, sin integrarse al genoma del hospedador, se expresa la proteína de interés, la cual se detecta dentro de las 24 h post-transducción y se expresa mientras el genoma viral esté presente (**Figura 16**).

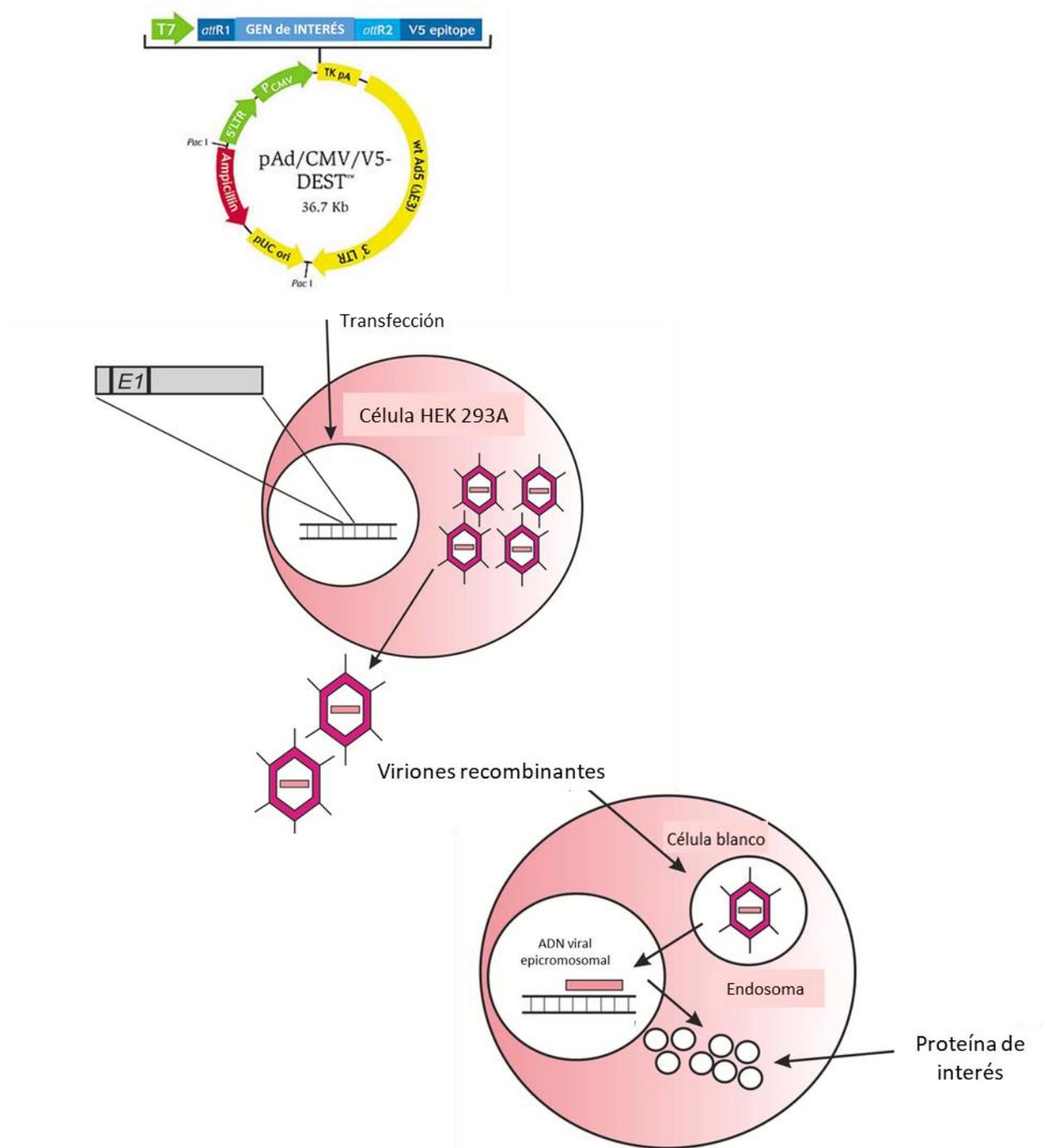


Figura 16 - Esquema de la estructura del vector adenoviral AdHu5/ΔE1-ΔE3. Modificado de (Salahuddin, 2011).

En el caso de vacunas para la prevención de enfermedades aviarias, la mayoría de los vectores de Ad están basados en adenovirus aviarios (CELO) o en virus adeno-asociado aviar. Según nuestros conocimientos, los vectores basados en AdHu-5 se evaluaron como vacunas contra influenza aviar (AIV) y bronquitis infecciosa mediante la expresión *in vivo* de los principales antígenos inmunoprotectores. En el caso de las

vacunas vectorizadas por AdHu-5, su aplicación *in ovo* indujo protección frente al desafío contra AIV (van Ginkel *et al.*, 2009; Toro *et al.*, 2010; Zeshan *et al.*, 2010; Mesonero *et al.*, 2011).

La seguridad de las vacunas basadas en AdHu5/ $\Delta E1$ - $\Delta E3$ está sustentada por los resultados de los ensayos clínicos (Fase 1 y 2) en humanos (Matz, Marzi and Feldmann, 2019; Zhu *et al.*, 2020) y por la evaluación de su biodistribución en ratas y ratones (Liu *et al.*, 2017). En el caso de aves, su seguridad fue demostrada indirectamente con la aplicación de las vacunas vectorizadas contra AIV *in ovo* (Boyd *et al.*, 2013).

1.6 ESTRATEGIA DE INMUNIZACIÓN *PRIME – BOOST* HETERÓLOGO

Uno de los factores que puede afectar la efectividad de las vacunas vectorizadas es la existencia de inmunidad previa contra el virus vector.

Para el caso del virus MVA, la inmunidad pre-existente dada por la enfermedad o por la vacunación contra la viruela (antes de su erradicación en la década del '70) significaría una limitación para el uso de este vector, sobretodo en personas mayores a 50 años. En cambio, la infección con algún serotipo adenoviral es altamente prevalente en la población (más del 60%), la primo - infección ocurre a temprana edad y, por ello, es muy frecuente la presencia de anticuerpos neutralizantes de Ad (mayormente IgG contra las proteínas de la cápside viral; (Majhen *et al.*, 2014).

Una estrategia ampliamente utilizada para sobrepasar las respuestas antivector es la denominada *prime-boost* heterólogo. Este esquema de inmunización involucra la administración de una dosis o *prime* de unos antígenos expresados a partir de un vector determinado para inducir la respuesta inmune específica y, luego, re-administrar los mismos antígenos en una segunda dosis refuerzo o *boost*, pero utilizando como inmunógeno un vector diferente.

Esta estrategia ha emergido como una herramienta poderosa para establecer inmunidad efectora y de memoria tanto nivel humoral como celular (Ramshaw and Ramsay, 2000; Woodland, 2004). Además, el esquema de inmunización *prime-boost*

heterólogo resultó ser más efectivas que la aplicación de dos dosis homólogas en términos de intensidad y durabilidad de la respuesta inmune, permitió sortear la limitación de la inmunidad generada en la primera dosis contra el vector o la preexistencia de la inmunidad contra los vectores virales (Lu, 2009).

La estrategia de *prime-boost* heterólogo es utilizada en el desarrollo de vacunas contra HIV, malaria y Ébola, entre otros, combinando distintos vectores virales y/o proteínas recombinantes.

En cuanto al desarrollo de vacunas aviares, el esquema *prime-boost* heterólogo combina vectores virales (HVT, poxvirus o Ad) entre sí o con vacunas a subunidad, vacunas inactivadas o génicas.

Como se mencionó anteriormente, (Boyd *et al.*, 2013) evaluaron una vacuna universal para la prevención de influenza aviar basada en un esquema de inmunización *prime-boost* heterólogo que combina vectores virales de MVA y AdHu-5 que expresan una construcción de fusión entre la nucleoproteína y la proteína de matriz (NP + M1). Este es el único trabajo donde se evaluó una combinación de estos vectores virales en pollos.

Teniendo en cuenta el impacto económico que genera directa o indirectamente la enfermedad de Gumboro y con el propósito de disponer de una vacuna vectorizada alternativa respecto de las actualmente disponibles en el mercado, proponemos evaluar el candidato vacunal MVA-VP2, sólo o combinado con el vector viral AdHu-VP2, como una herramienta prometedor para la prevención de la infección por IBDV, cuya producción en cultivos de células de mamíferos en suspensión alcance títulos virales elevados compatibles con los procesos de liofilización para el almacenamiento y distribución de vacunas refrigeradas.



HIPOTESIS Y OBJETIVOS

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS

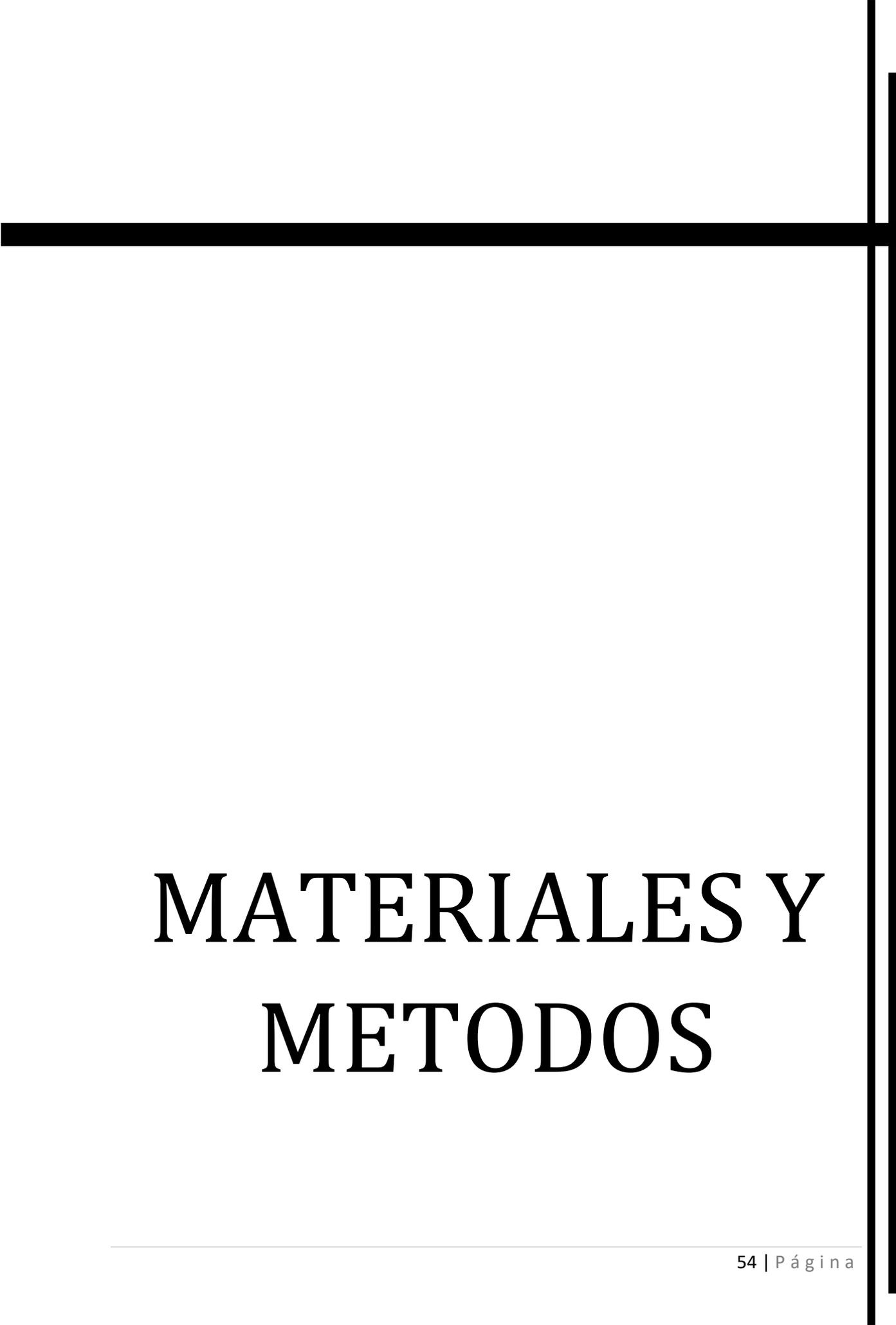
La respuesta inmune inducida por una única dosis del vector viral no replicativo MVA-VP2 o AdHu-VP2 no es suficiente para generar protección frente al desafío con IBDV.

2.2 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la eficiencia de la inmunización de vectores virales no replicativos que expresan la proteína VP2 de IBDV en pollos SPF.

2.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Estudiar la biodistribución de los virus MVA recombinantes en pollos.
- II. Obtener y caracterizar AdHu-5 recombinantes que porten la secuencia codificante de la proteína VP2 de IBDV.
- III. Evaluar la eficiencia del vector viral MVA-VP2, solo o combinado con AdHu-VP2, frente el desafío con IBDV.



MATERIALES Y METODOS

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LÍNEAS CELULARES, CULTIVOS PRIMARIOS Y MEDIOS DE CULTIVO CELULAR

Las líneas celulares empleadas en este trabajo fueron:

- ☞ *Baby Hamster Kidney* (BHK-21)
- ☞ *Human Embryonic Kidney 293* subclon A (HEK 293A)
- ☞ Células inmortalizadas de adenocarcinoma humano de cérvix (HeLa)

Todas provenientes de la *American Type Culture Collection*, ATCC®. Estas líneas fueron provistas por la Sección de Cultivos Celulares del Instituto de Virología del INTA – Castelar.

El cultivo primario empleado en este trabajo fue:

- ☞ Fibroblastos de embrión de pollo (FEP)

El cultivo primario fue preparado 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 col. (Staib, Drexler and Sutter, 2004).

El **medio de crecimiento** utilizado fue D–MEM (Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, EE.UU.) suplementado con 10 % de Suero Fetal Bovino (SFB) (Internegocios, Mercedes, Pcia. de Bs. As.), penicilina 100.000 U/mL, estreptomina 67 µg/mL y gentamicina 50 µg/mL (todos los antibióticos de Droguería Libertad) y L-glutamina 100 mM (Sigma – Aldrich, Misuri, EE.UU.). El **medio de mantenimiento** utilizado fue D–MEM, suplementado con 2 % de SFB y antibiótico/antimicótico (A/A) (100 U/mL penicilina, 100 U/mL estreptomina y 0,25 µg/mL antimicótico Fungizone®, Thermo Fischer Scientific). Para las titulaciones virales fue utilizado **medio de placa semisólido** que se preparó mezclando volúmenes iguales de medio de cultivo D-MEM 2X (conteniendo SFB 4 %, Hepes 50 mM pH 7 y A/A 2 X) y agarosa de bajo punto de fusión 2 % (fundida y precalentada a 55°C).

Todos los cultivos celulares se incubaron en estufa a 37°C con 5 % de CO₂.

3.2 ANIMALES

Para realizar los experimentos de biodistribución se utilizaron aves *Gallus gallus domesticus*, ponedoras semi-pesadas autosexantes Negra INTA y Rubia INTA provistas por el Programa ProHuerta de la EEA-INTA Pergamino. Estas razas son derivadas de un cruzamiento de la estirpe *Rhode Island Colorado* y gallinas de una estirpe *Plymouth rock* Barrada para el primer caso y una estirpe *Rhode Island Blanco* para el segundo.

En el caso de los experimentos de eficiencia de los candidatos vacunales vectorizados se utilizaron pollos *White Leghorn* provistos por Rosenbusch S.A. certificados como libres de patógenos específicos (de las siglas en inglés, SPF).

En ambos casos, los huevos fértiles se mantuvieron con humedad y a una temperatura de 37°C en una incubadora Yonar S.A. (C.A.B.A.) ubicada en el bioterio del Instituto de Biotecnología (CICVyA - INTA) hasta su nacimiento.

Transcurridas las 24 h del nacimiento, los animales fueron trasladados de la incubadora a una batea plástica durante al menos una semana, bajo condiciones de temperatura requerida para pollitos bebe, donde la fuente de calor fue suplementada con una lámpara infrarroja (de luz blanca de 250 watts) en una campana metálica. Al momento de inicio de los ensayos las aves fueron alojadas en jaulas individuales. A los pollos se les suministró agua corriente y alimento (Súper pollita B.B 0-6 semanas - Línea Recría y Postura, Metrive, Francisco Álvarez, Pcia. de Bs. As.) *ad libitum*.

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 CICUAE-CNIA-INTA. Solicitudes de Procedimiento N° 18/2012; 19/2012; 20/2013; 72/2013; 37/2014; 14/2015; 17/2015; 46/2015; 54/2015 y 55/2015.

3.3 VIRUS

En este trabajo se utilizaron los siguientes virus:

- ☞ **MVA-VP2:** virus vaccinia Ankara modificado (MVA) portador de la secuencia que codifica para la proteína VP2 del virus de enfermedad infecciosa de la bolsa (IBDV) (Zanetti *et al.*, 2012).
- ☞ **MVA-GFP:** MVA que porta el gen codificante de la proteína verde fluorescente (GFP) obtenido previamente en nuestro laboratorio (resultados no publicados).

Los virus recombinantes MVA-VP2 y MVA-GFP portan además el gen *uidA*, que codifica para la proteína marcadora β -glucuronidasa (GUS) que facilitó el aislamiento de los virus recombinantes por su capacidad de formar placas de lisis azules en presencia del sustrato cromogénico X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido, Inalco®, California, USA). En este trabajo, la expresión de la enzima GUS facilitó el recuento de las unidades formadoras de placa (UFP) para la titulación de los stocks virales (**sección 3.3.1.2**).

- ☞ **FWPV:** virus de la viruela aviar (virus fowlpox), cepa vacunal atenuada provista por Laboratorios Delamer.
- ☞ **AdHu-GFP:** adenovirus humano atenuado, serotipo 5 (AdHu-5) que expresa la proteína GFP (gentilmente cedido por Dr. M. Perez-Filgueira, Inst. de Virología-INTA).
- ☞ **IBDV:** virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa de Fabricio, cepa clásica de IBDV (Genogrupo 1) denominada LZD INMUNER, provista por Laboratorios Inmuner S.A. (Concepción del Uruguay, Entre Ríos). La reconstitución de la vacuna liofilizada se realizó en el momento de su utilización siguiendo las recomendaciones del fabricante.

La amplificación de los poxvirus (MVA-VP2, MVA-GFP y FWPV) se realizó en monocapas de FEP. La obtención y propagación de los adenovirus recombinantes se realizó en monocapas de células HEK 293A.

3.3.1 INFECCIONES VIRALES

3.3.1.1 OBTENCIÓN DE STOCKS VIRALES DE MVA Y FWPV

Monocapas de FEP con 80-90% de confluencia, crecidas en botellas plásticas de 25, 75 ó 150 cm² (T25 – T75 – T175) se lavaron con *buffer* PBS y se infectaron con 0,5-1 mL de los virus a una multiplicidad de infección [unidad formadora de placa (UFP)/célula] de 0,1. Se incubó durante 45 min con agitación cada 15 min, a 37 °C, CO₂ 5 % y posteriormente se agregaron 5; 15 o 30 mL de medio de mantenimiento, respectivamente. Las células se incubaron durante 3-4 días hasta la observación del efecto citopático generalizado. Finalmente, las células y los sobrenadantes de infección se juntaron y se congelaron a -80°C. Con el propósito de lisar las células y favorecer la liberación del virus se realizaron 3 ciclos de congelado (-80°C) y descongelado (37°C).

3.3.1.2 TITULACIÓN DE LOS STOCKS VIRALES DE MVA Y FWPV

Se realizaron diluciones seriadas al décimo de la suspensión viral. Las monocapas de FEP 100 % confluentes, crecidas en placas de 60 mm de diámetro (P60), se lavaron con medio D-MEM y se infectaron con 500 µL de las diluciones virales. Luego de 45 min de adsorción a 37°C, con agitación cada 15 min, los inóculos se descartaron y las monocapas se lavaron nuevamente. Posteriormente, se agregaron 3 mL de medio de placa semisólido. Se dejó solidificar a temperatura ambiente durante 20 min y luego se incubó en estufa hasta la visualización de las placas de lisis (5 días aproximadamente).

En el caso de MVA-VP2 y MVA-GFP, el medio semisólido contenía además 0,2 mg/mL del sustrato cromogénico X-Gluc, que permite la visualización de placas de lisis azules por la actividad de enzima marcadora GUS. Para el virus FWPV el medio semisólido contenía 20 mg/mL de rojo neutro (3-amino-7-dimetilamino-2-metil fenazina clorhidrato; Sigma – Aldrich) para teñir las células vivas y facilitar la visualización de las placas de lisis siendo las mismas detectadas por el contraste generado por la ausencia del colorante en las zonas donde ocurrió la lisis celular.

El título del stock viral se expresó como número de unidades formadoras de placas de lisis (UFP) por mL, eligiendo la infección donde la dilución viral utilizada permitiera contar entre 30-100 placas de lisis por P60.

3.4 METODOLOGÍA DE ADN RECOMBINANTE

Las técnicas de ADN recombinante se realizaron de acuerdo con las técnicas estándar (Maniatis, Fritsch and Sambrook, 1982; Sambrook, Fritsch and Maniatis, 1989). Las enzimas fueron compradas a New England Biolabs, PROMEGA y Thermo Fischer Scientific, y se usaron según las especificaciones del fabricante.

3.4.1 MINI PREPARACIONES DE ADN PLASMÍDICO

Se utilizó una modificación del método de Birnboim & Doly (Birnboim and 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 x g en una microcentrífuga de mesada.

I. PURIFICACIÓN RÁPIDA

El precipitado del cultivo bacteriano se re-suspendió en 300 µL de Solución I (Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM). Luego, se agregaron 300 µL de Solución II (NaOH 0,2 N, SDS 1 %), se mezcló suavemente por inversión y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Se agregaron 400 µL de Solución III (acetato de potasio 5 M) y se mezcló por inversión. El floculado se centrifugó a 10.000 x g durante 10 min, se tomó el sobrenadante libre de floculado y se traspasó a un tubo de microcentrífuga limpio, donde se precipitó el ADN plasmídico por el agregado de 1 volumen de isopropanol y centrifugación a 10.000 x g durante 10 min, a 4°C. Se lavó el precipitado con etanol 70 %, se secó a 37°C y finalmente se resuspendió en 50 µL de agua con ARNasa (100 µg/mL).

II. ADN PLASMÍDICO DE ALTA CALIDAD (GRADO DE SECUENCIACIÓN O TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS)

Se usaron los kits comerciales *Plasmid Mini* y *Plasmid Midi* (Qiagen). En general, el ADN se resuspendió en 100 µL de agua bidestilada estéril con un rendimiento promedio de 200 - 300 ng/µL en el caso de las minipreparaciones y de 1 – 1,5 µg/µL en el caso de las midi preparaciones. Si el plásmido poseía un tamaño mayor a 5 kpb la elución se realizó a 65°C en 500 µL de agua bidestilada estéril.

La concentración de ADN se determinó a 260 nm en un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000.

3.4.2 DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Para las digestiones con enzimas de restricción de los diferentes plásmidos se utilizaron 500 ng de ADN, 5 U de enzima, *buffer* de restricción apropiado en un volumen final de 30 µL. Las reacciones se incubaron de 2 a 3 h a la temperatura recomendada para cada enzima. **Tabla 2.**

<i>Nombre</i>	<i>Sitio de reconocimiento</i>
<i>Hind III</i>	5' ...A [▼] AGCTT...3' 3' ...TTCGA [▲] T...5'
<i>Eco RV</i>	5' ...GAT [▼] ATC...3' 3' ...CTA [▲] TAG...5'
<i>Pac I</i>	5' ...TTAAT [▼] TAA...3' 3' ...AAT [▲] TAATT...5'

Tabla 2 - Endonucleasas de restricción utilizadas en este trabajo. Los símbolos (▼ ; ▲) indican los sitios de corte.

3.4.3 OLIGONUCLEÓTIDOS INICIADORES O CEBADORES

En la siguiente tabla (**Tabla 3**) se indican las secuencias de los cebadores utilizados:

Cebador	Secuencia nucleotídica (5' - 3')	Tf*	Fuente
E1a fw	ATCGAAGAGGTACTGGCTGA	52	(Dion, Fang and Garver, 1996a)
E1a rv	CCTCCGGTGATAATGACAAG	52	(Dion, Fang and Garver, 1996a)
GAPDHfw	AGAACATCATCCCAGCGTCC	60	(Carballeda <i>et al.</i> , 2011)
GAPDHrv	CGGCAGGTCAGGTCAACA	58	(Carballeda <i>et al.</i> , 2011)
M13rv	GTCATAGCTGTTTCCTG	50	<i>primer universal</i>
M16s fw	CCTGTTTACCAAAAACATCAC	50	(Roellig <i>et al.</i> , 2013)
M16s rv	AYTGTCGATAKGRACCTWRARTAG	53	(Roellig <i>et al.</i> , 2013)
MVA165fw	TCCCCGCGGATGACACGATTACCAATA	61	Del Laboratorio
MVA165rv	TCCCCGCGGATAAGTACCGGCATCTCT	64	Del Laboratorio
MVA157IntF	GGAAATGCTTACTTTTGCTA	53	(Holgado <i>et al.</i> , 2016)
MVA160rv	AGAATTCGCCACATAAATGCGTTGGAG	60	Del Laboratorio
T7	AATACGACTCACTATAGGGAGA	52	<i>primer universal</i>
V5	ACCGAGGAGAGGGTTAGGGAT	56	<i>primer universal</i>
VP2 1276 fw	TCACACTAGTAGCCTACG	48	Del Laboratorio
VP2 1452 rv	GCTCCTGCAATCTTCAGG	50	Del Laboratorio
VP2 EcoRI fw	GAATTCGCCGCCCATGACAAACCTGCAAG	67	Del Laboratorio
VP2 Forward	GCTAGCCGCCCATGACAAACCTGCAAGATC	68	(Zanetti <i>et al.</i> , 2012)
VP2 HindIII rv	AAGCTTCTAGATCTGCCCTGCAATCTTC	68	Del Laboratorio
VP2-284-1 rv	CCGTTAGCCCATTGTCTG	46	Del Laboratorio
VP2-Bgl II	AGATCTGCTCCTGCAATCTTCAGG	72	(Gómez <i>et al.</i> , 2013)
VP2i1fw	CGGAGTCTCACAGT	44	Del Laboratorio
VP2i1rv	TCCCCACAGTCAAATTGT	56	Del Laboratorio

Tabla 3 – Secuencia de cebadores utilizados para la amplificación por PCR, escritos en sentido 5' → 3'. Tf* temperatura de fusión o hibridación (*annealing*), expresada en °C.

3.4.4 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Para la amplificación de los fragmentos génicos correspondientes, las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 μL . La mezcla de reacción y los perfiles de ciclado se detallan a continuación. La temperatura de fusión (T_f) para la hibridación de los ácidos nucleicos se detalla en la **Tabla 3**.

La temperatura de fusión (T_f) para la hibridación de ácidos nucleicos se estimó según la siguiente fórmula:

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

ADN templado		200 ng
Enzima GoTaq[®] DNA polimerasa (Promega[®])		0,2 μL
Buffer extensión templado 3 (10X) Roche[®]		2,5 μL
Oligonucleótidos iniciadores (sentido y antisentido)		1 μL de c/u
dNTPs 10 mM		1,25 μL
Agua ultrapura		c.s.p. 25 μl
Desnaturalización inicial	95° C; 5 min.	1 ciclo
Desnaturalización	95° C; 1 min.	30 ciclos
Anillado	50° C - 65° C; 45 seg.	
Extensión	72° C; 1 min.	
Extensión final	72 ° C; 10 min.	1 ciclo

Los productos de amplificación por PCR se resolvieron en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio y se visualizaron utilizando luz U.V. como se describe en el punto **3.4.5** de esta sección.

En la siguiente tabla (

Tabla 4) se indican los tamaños (en pares de bases) de los amplicones obtenidos con las diferentes combinaciones de oligonucleótidos iniciadores mediante amplificación por PCR:

<i>Par de oligonucleótidos iniciadores</i>	<i>Tamaño del amplicón (pb)</i>
<i>E1a fw – E1a rv</i>	416
<i>GAPDHfw – GAPDHrv</i>	264
<i>M16s fw – M16s rv</i>	480
<i>MVA157IntF – MVA160rv</i>	1000
<i>MVA165fw – MVA165rv</i>	303
<i>T7 – V5</i>	1636
<i>T7 – VP2 Hind III rv</i>	1500
<i>VP2 EcoRI fw – VP2 HindIII rv</i>	1343
<i>VP2i1fw – VP2-284-1 rv</i>	540
<i>VP2 Forward - VP2-Bgl II</i>	1343

Tabla 4 – Tamaño de los amplicones esperados con los pares de oligonucleótidos mencionados.

En todos los casos se realizó un control en el que se incluyeron todos los reactivos excepto ADN para descartar la presencia de contaminantes en alguno de los reactivos utilizados.

3.4.5 ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

El gel se preparó con *buffer* TAE (Tris acetato 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) y 1 % p/v de agarosa y luego se agregó bromuro de etidio en una concentración de 0,5 µg/mL de gel. Para sembrar las muestras se utilizó un *buffer* de siembra de concentración 10X (glicerol 50 %, TAE 5X, azul de bromofenol 1 %). La electroforesis se realizó utilizando el mismo *buffer* TAE a 5-10 V/cm a temperatura ambiente. Para la visualización de las bandas de ADN se utilizó bromuro de etidio en una concentración de 0,5 µg/mL de gel y un transiluminador de luz UV.

Los geles se fotografiaron utilizando un transiluminador de luz ultravioleta y se digitalizaron utilizando el equipo GelDoc (BioRad) y el software QuantityOne 1-D Analysis Software (versión 4.6.3) provisto por el fabricante.

3.4.6 PURIFICACIÓN DE ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA

Las bandas de ADN resueltas mediante electroforesis en geles de agarosa se purificaron utilizando el kit *Qiaex II purification system* (QIAGEN) según las especificaciones del fabricante. El ADN así obtenido se resuspendió en *buffer* Tris-HCl 10 mM, pH 8.

3.4.7 TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS *E. COLI* COMPETENTES

Bacterias *E. coli* químicamente competentes para la transformación se obtuvieron mediante el método descrito por Hanahan y col. (Hanahan, Jessee and Bloom, 1985), fueron mantenidas congeladas en alícuotas a -80 °C hasta su uso. Al momento de la transformación, se descongelaron en hielo y a 50 µL de bacterias se les agregaron 3-5 µL del producto de ligación, se mezcló suavemente y se incubó en hielo 45 min. A continuación, se realizó un choque térmico a 42°C por 90 seg y se dejó en hielo por 2 min adicionales. Luego, se agregaron 200 µL de medio LB con el antibiótico necesario para el proceso de selección, se incubó a 37°C con agitación suave durante 45 min y finalmente se sembró en placas conteniendo medio LB – Agar (1,5 % p/v) con el antibiótico

correspondiente al gen de resistencia de cada vector utilizado. Las placas se incubaron a 37 °C toda la noche.

3.4.8 SECUENCIACIÓN DE ADN

La secuenciación de las construcciones genéticas generadas en este trabajo se realizó en el Servicio Interno de Genotipificación y Secuenciación Automática (SIGYSA) del Instituto de Biotecnología-INTA. Se utilizó el kit de secuenciación *Big Dye Terminator V 3.1* (Thermo Fischer Scientific) y el equipo *Genetic Analyzer 3500xl* (Applied Biosystems).

Para el análisis de las secuencias, su alineamiento y comparación con el GenBank se utilizaron los programas NTI Vector y BLAST-Blastx.

3.5 METODOLOGÍA PARA LA OBTENCIÓN DE ADENOVIRUS RECOMBINANTES QUE PORTAN EL GEN CODIFICANTE DE LA PROTEÍNA VP2 (*GEN VP2*)

En este trabajo se utilizó el plásmido pAd/CMV/V5-DEST (Thermo Fischer Scientific) que es un vector destino adaptado para usar la Tecnología Gateway® donde la expresión del gen de interés está regulada por el promotor del citomegalovirus. Brevemente, el sistema se basa en clonar la secuencia de interés en un vector denominado “vector de entrada” para luego sub-clonarlo en el “vector destino”. Este sub-clonado ocurre por recombinación (LR) homóloga *in vitro* entre las regiones Rtt y Ltt de ambos plásmidos de “entrada” y “destino”, flanqueantes a la secuencia de interés.

Con este sistema se obtiene un adenovirus recombinante incompetente para la replicación en la mayoría de las células de mamíferos, que en el laboratorio puede ser amplificado en cultivos de células HEK 293A porque aportan en *trans* dos proteínas indispensables para la replicación viral.

El adenovirus recombinante expresa el gen de interés en células de mamífero de manera transitoria y en ausencia de replicación viral, característica de seguridad buscada para el desarrollo de vacunas vectorizadas vivas no replicativas.

3.5.1 OBTENCIÓN DEL VECTOR PADHU-VP2

La secuencia codificante para la proteína de cápside VP2 madura de IBDV fue obtenida de un plásmido disponible en nuestro laboratorio (denominado VT-TOPO-VP2). Para clonar el gen de interés en el vector de entrada del sistema adenovirus (Topo TA Cloning Gateway, pCR[®]8/GW/TOPO[®], Thermo Fischer Scientific) se amplificó por PCR la secuencia del *gen vp2* utilizando los cebadores VP2 EcoRI fw y VP2 HindIII rv (**ver tablas de ítems 3.4.2 y 3.4.3**) y como templado el plásmido VT-TOPO-VP2.

El producto de amplificación por PCR se analizó en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, se escindió del gel y se purificó como se describió anteriormente.

Una vez obtenido el fragmento purificado se procedió a la adición de un extremo 3' de adeninas mediante la incubación de 20 µL del producto de PCR purificado en una solución conteniendo 0,3 µL Platinum[®] Taq DNA Polymerase (Thermo Fischer Scientific), 2 µL *buffer* 10X Platinum[®] Taq DNA Polymerase, 0,4 µL dATP 10 mM, 1 µL MgCl₂ 2 mM durante 20 min a 72° en baño térmico y puesto inmediatamente en hielo para su posterior clonado en el plásmido pCR[®]8/GW/TOPO[®]. Se tomaron 4,5 µL del fragmento de amplificación correspondiente al *gen vp2* - 3'adenilado y se incubaron con 0,5 µL del vector de entrada y 1 µL de solución salina a temperatura ambiente durante 3 h.

Posteriormente, se transformaron bacterias competentes *E. coli* DH5α con los 3 µL de la mezcla de ligación (descrito en el **ítem 3.4.7 de esta sección**). El total de la transformación (53 µL) se sembró en placas de Petri conteniendo LB agarizado conteniendo espectinomicina 100 µg/mL.

Al día siguiente de la transformación, se picaron algunos clones con escarbadiantes, se crecieron en 5 mL de LB – espectinomicina 100 µg/mL durante toda la noche a 37°C en agitación. Posteriormente, se realizaron minipreparaciones de ADN plasmídico según lo descrito en el **ítem 3.4.1**. Para confirmar la presencia del inserto se realizó una amplificación por PCR utilizando los iniciadores VP2 forward y VP2-Bgl II (**ver tablas de ítems 3.4.3 y 3.4.4**). Una vez seleccionados los clones recombinantes, la orientación del gen de interés (respecto de los flancos de recombinación con el vector) se realizó mediante mapeo de restricción con las enzimas *Hind* III y *Eco* RV (New England Biolabs)

(**Tabla 2**). Para ello, se utilizaron 1-10 µg del ADN plasmídico, 5 U de enzima, *buffer* de restricción apropiado, en un volumen final de 20-50 µL. Las reacciones se incubaron 2-5 h a 37°C.

El inserto de los clones que poseía el gen de interés en la orientación correcta se secuenció utilizando los cebadores internos específicos del *gen vp2*: VP2i1rv, VP2i1fw, VP2 Forward, VP2 1276 y VP2 1452 (**Tabla 3**).

De esta forma se seleccionó el clon plasmídico pCR8-VP2.

Posteriormente, se realizó la reacción de recombinación LR entre las secuencias *aatL* del vector de entrada pCR8-VP2 y *attR* del vector destino pAd/CMV/V5-DEST™ utilizando la enzima LR Clonase® II, en un volumen final de 9 µL durante 2 h a temperatura ambiente, según las instrucciones del fabricante. Luego, para remover la enzima clonasa, se agregó Proteinasa K (2 µg/µL, Promega®), se incubó 10 min a 37°C y, con el total de la mezcla de recombinación, se transformaron bacterias competentes *E. coli* DH5α (descrito en el **ítem 3.4.7 de esta sección**). El producto de transformación se plaqueó en medio LB agarizado conteniendo ampicilina (100 µg/mL) y se incubó toda la noche a 37°C. Al día siguiente, se picaron algunas colonias, se crecieron en medio LB - ampicilina y se analizó la presencia del gen de interés mediante amplificación por PCR utilizando como templado de reacción 1,5 µL del cultivo bacteriano saturado y los cebadores específicos para amplificar el *gen vp2* completo. Una vez seleccionado el clon recombinante, denominado pAdHu-VP2, se purificó el ADN plasmídico como se describió en el **ítem 3.4.1 de esta sección**. El clon seleccionado se secuenció utilizando los cebadores específicos del *gen vp2*: VP2i1rv, VP2i fw, VP2 Forward, VP2 1276 y VP2 1452 (**Tabla 3**).

3.5.2 AISLAMIENTO DE LOS ADENOVIRUS ADHU-VP2

Previo a la transfección, el vector pAdHu-VP2 fue linealizado para favorecer la exposición de las secuencias repetidas invertidas (ITRs) que permitirán la correcta replicación y empaquetamiento del virus. Además, con este tratamiento se eliminan las secuencias bacterianas (origen de replicación del plásmido y gen de resistencia a ampicilina).

Entonces, el vector pAdHu-VP2 fue digerido con la enzima *Pac I* (New England Biolabs) (**Tabla 2**), en *buffer* NEB 1.1 (New England Biolabs), durante 4 h a 37°C.

El vector pAdHu-VP2 linealizado se purificó o no a partir de gel de agarosa, y se cuantificó su masa de manera similar a la descrita anteriormente.

Diferentes cantidades (10; 5; 2 y 1 µg) del vector pAdHu-VP2 linealizado (purificado o sin purificar) se utilizaron para transfectar monocapas de células HEK 293A (70–80% de confluencia) utilizando el lípido catiónico Lipofectamine™2000 (Thermo Fischer Scientific) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Posteriormente, los cultivos celulares transfectados se incubaron en estufa a 37°C, 5% CO₂. A las 4; 9 y 16 h post-transfección se descartó el sobrenadante de cultivo y se lo reemplazó por medio de mantenimiento (ver ítem 3.1 de esta sección). Luego, a las 48 h post transfección se reemplazó el medio de cultivo por medio de mantenimiento fresco y las monocapas celulares se incubaron durante 10 – 12 días en estufa a 37°C, con 5 % de CO₂, hasta la observación al microscopio de efecto citopático característico de adenovirus: células redondeadas y agrupadas en forma de racimos. En ese momento se cosecharon juntos las células y el sobrenadante, obteniéndose lo que se denominó “pasaje 1 (P1)”. Se realizaron 3 ciclos de congelado (-80°C) / descongelado (37°C) para liberar el virus, y los restos celulares se eliminaron por centrifugación a baja velocidad (10 min a 1500 x g, 4°C). Se prepararon alícuotas de 0,5 mL de la suspensión viral AdHu-VP2 / P1 que se conservaron a -80°C hasta su utilización.

3.5.3 AMPLIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS ADENOVIRUS RECOMBINANTES

Para la amplificación de los stocks de AdHu-VP2 y AdHu-GFP se infectaron monocapas de células HEK 293A crecidas en botellas T175 con una alícuota de 500 µL del virus correspondiente. A las 48 h se cosecharon los sobrenadantes, se congelaron/descongelaron y clarificaron como fue descrito en el párrafo anterior. Las suspensiones virales obtenidas constituyeron los stocks virales AdHu-VP2 (P2) o AdHu-GFP, que se conservaron a -80°C. Luego, utilizando estos stocks virales se infectaron monocapas de células HEK 293A crecidas en 5 botellas T175 o Nunc® Cell Factory (2528 cm²) de manera similar a la descrita anteriormente. Las suspensiones virales clarificadas

obtenidas se sembraron sobre un colchón de sacarosa (25% p/v en *buffer* NET: Tris – HCl 10 mM, pH: 8, EDTA 1 mM, NaCl 200 mM) y se centrifugaron a 60.494 x g durante 3 h a 4°C. Los pellets obtenidos se re-suspendieron en 2-4 mL de *buffer* NET, se prepararon alícuotas que se conservaron a -80°C hasta su utilización en los ensayos de inmunización en animales. Una alícuota se utilizó para cuantificar el título viral.

3.5.4 TITULACIÓN DE LOS ADENOVIRUS RECOMBINANTES PURIFICADOS

Monocapas de células HEK 293A crecidas al 90% de confluencia en placas de 6 pocillos (P6) se infectaron con 300 µL de diluciones seriadas al décimo (partiendo de la dilución 10^{-2} hasta la dilución 10^{-10}) de los stocks virales de los adenovirus recombinantes purificados. Luego de un período de adsorción de 24 h a 37°C, 5% CO₂, se retiró el inóculo y se agregó medio de placa semisólido.

Las células se incubaron durante 10 – 12 días a 37°C, 5% CO₂. Posteriormente se agregó una solución de 20 mg/mL de rojo neutro para facilitar la visualización de las placas de lisis.

Finalmente, se contabilizó el número de unidades formadoras de placa (UFP) y el título viral se expresó como UFP/mL (de manera similar a la descrita en el ítem 3.3.1.2 de esta sección).

3.5.5 ANÁLISIS DE LA PUREZA DEL STOCK VIRAL RECOMBINANTE DE ADHU-VP2

Luego de sucesivos pasajes en células HEK 293A, los adenovirus recombinantes depletados de la región E1 podrían revertir a adenovirus salvaje (*wild-type*, wt) por recombinación homóloga con el gen *e1a* presente en el genoma de las células HEK 293A (Goldsmith *et al.*, 1994; Lochmüller *et al.*, 1994).

Con el stock viral recombinante AdHu-VP2 se infectaron monocapas de células HeLa, que son no permisivas para la replicación de los adenovirus recombinantes (AdΔE1) y permisivas para Ad-wt (Dion, Fang and Garver, 1996b). Los cultivos celulares se infectaron

a una multiplicidad de infección alta (30 UFP/célula) y a las 48 h post infección las células se cosecharon y clarificaron como se describió anteriormente, y se obtuvo una suspensión viral pasaje 1 (P1) que se utilizó como inóculo para infectar monocapas de células HeLa (pasaje ciego). Los genomas virales se caracterizaron molecularmente mediante amplificación por PCR. Para ello, a partir del sobrenadante del clarificado del P2 se extrajo ADN total (según el protocolo descrito en el punto siguiente) que se utilizó como templado de una reacción de amplificación por PCR con los cebadores: E1a fw – E1a rv y M16s fw – M16s rv.

3.5.6 EXTRACCIÓN DE ADN TOTAL DE CULTIVOS CELULARES INFECTADOS CON LOS VIRUS RECOMBINANTES.

La caracterización molecular de los virus recombinantes (MVA-VP2 o AdHu-VP2) se realizó a partir del ADN extraído de cultivos infectados. Para ello, monocapas celulares (FEP o HEK 293A, respectivamente) crecidas en P60 se infectaron con 500 μ L de los virus (recombinantes o no) como se describió anteriormente. A los 4-5 días post infección se descartó el medio de cultivo y las monocapas se lavaron con PBS. Las células se cosecharon en 1 mL de PBS y se realizaron 3 ciclos de congelado (-80°C) y descongelado (37°C) para favorecer la liberación del virus.

El ADN total se extrajo según una modificación del método descrito por Dellaporta (Dellaporta, Wood and Hicks, 1983). Brevemente, se utilizaron 350 μ L de los extractos celulares a los cuales se les agregaron 350 μ L de *buffer* de extracción EB 2X (Tris 200mM pH 8, EDTA 200mM pH 8, SDS 2 %, β -mercaptoetanol 20 mM, NaCl 200 mM) y se agitó usando vortex durante 10 seg. Se incubó a 65°C por 10 min y se agregaron 250 μ L de acetato de potasio 5 M mezclando por inversión 20 veces e incubando en hielo por 20 min. Posteriormente, se centrifugó por 30 min a 10.000 x g en microcentrífuga a 4°C . Se recuperó la fase acuosa y los ácidos nucleicos se precipitaron por el agregado de un volumen de isopropanol. Se mezcló por inversión y se centrifugó durante 20 min a 12000 x g. Luego, se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó 2 veces con 500 μ L de etanol 70% y se centrifugó 15 min a 10.000 x g. El pellet se secó a 37°C y se resuspendió en 40-

50 μ L de agua bidestilada. El ADN así purificado (1-5 μ L se utilizó como templado en las reacciones de amplificación por PCR.

Además, se realizó como control la extracción de ADN total a partir de monocapas de células no infectadas.

3.5.7 EVALUACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN DEL *GEN VP2* MEDIANTE RT-PCR

Monocapas de células HeLa (80% confluentes) fueron infectadas con 500 μ L del stock viral AdHu-VP2 sin diluir (alta multiplicidad de infección). A las 24 h post infección se descartó el medio de cultivo, las monocapas se lavaron dos veces con PBS y los extractos celulares se cosecharon en 0,3 mL de TRIzol® (Thermo Fischer Scientific). Luego se almacenaron a 4°C hasta su utilización. La extracción del ARN total se realizó según las instrucciones del fabricante. Utilizando el equipo Nanodrop ND-1000 (Thermo Fischer Scientific) se determinó la concentración del ARN total purificado y su grado de pureza (relación de absorbancia 260/280 nm con valor mayor a 2).

Posteriormente, las muestras de ARN se trataron con la enzima DNAsa I (Thermo Fischer Scientific) para eliminar los restos de ADN contaminante. Brevemente, se preparó una mezcla con 1 μ L de *buffer* 10X, 1 μ L de DNAsa I (2 Unidades enzimáticas), 7 μ L de agua DEPC libre de nucleasas y se agregaron 2 μ L de la muestra de ARN. Se incubó 15 min a temperatura ambiente y luego se inactivó la enzima por el agregado 1 μ L de EDTA 25mM e incubación a 70°C durante 10 min. El ARN tratado se guardó a -80°C hasta su utilización.

Para la obtención de ADN complementario (ADNc) a partir del ARN extraído, se realizó la reacción de transcripción reversa (RT) utilizando la enzima retrotranscriptasa (RT) SuperScript III (Thermo Fischer Scientific).

Primeramente, una mezcla conteniendo 50 ng de hexameros al azar (6-mer o N₆) y 12 μ L de ARN se colocó en un baño seco a 65°C durante 10 min. Luego, se transfirió inmediatamente al hielo y se agregaron 4 μ L de 5X *First-Strand Buffer* (Thermo Fischer Scientific), 1 μ L de DTT (ditiotretitol) 0,1 M, 1 μ L de dNTPs 5mM (Promega), 1 μ L de la solución inhibidora de nucleasas de ARN (RNase OUT, Thermo Fischer Scientific) y 1 μ L de la enzima SuperScript III RT (200 U/ μ L). Se incubó a 50°C durante 45 min. Posteriormente,

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 el par de oligonucleótidos VP2i1fw /VP2-284-1 rv (**ver Tabla 4 - ítem 3.4.3 de esta sección**) y, como templado los ADNc o los ARN tratados con DNAsa I (como control para verificar la ausencia de ADN contaminante).

3.6 METODOLOGÍAS UTILIZADAS PARA LA EVALUACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN *IN VIVO* (BIODISTRIBUCIÓN) DE POXVIRUS EN POLLOS

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 INTA Castelar.

En este trabajo de tesis se evaluó la capacidad de los poxvirus MVA de infectar productivamente a los pollos mediante inmunizaciones por vía intramuscular (en el muslo) o subcutánea (en la membrana del ala). Brevemente, en las aves inoculadas por vía intramuscular se evaluó la presencia del genoma viral mediante amplificación por PCR (tanto en el sitio de inmunización como en otros órganos del ave). En el caso de las aves inoculadas por punción alar se evaluó la formación de las lesiones nodulares características de las vacunas atenuadas vivas de viruela aviar (“toma” de la vacuna).

3.6.1 BIODISTRIBUCIÓN DE POXVIRUS ADMINISTRADOS POR VÍA INTRAMUSCULAR (I.M.)

Los pollos fueron inoculados a los 11 días de edad con MVA conteniendo 0,5% v/v tinta china (preparada en PBS estéril con antibiótico/antimicótico (A/A, **ver ítem 3.1**). La adición de tinta china no interfiere con la replicación de los virus mientras que permite identificar el sitio exacto de inoculación en el músculo de la pata (Johnston *et al.*, 1997). A distintos tiempos, los animales fueron sacrificados y se tomaron muestras de diversos tejidos, que se conservaron a -80°C hasta su procesamiento (descrito en el **ítem 3.6.3 de esta sección**).

Los tejidos recolectados fueron: músculo no inyectado (**Ni**, corresponde a la pata no inoculada), músculo inyectado (**Mi**, identificado por la presencia de tinta china), bolsa de Fabricio (**BF**), bazo (**Ba**), hígado (**Hi**), duodeno (**Du**) y/o tonsilas cecales (**TC**).

Con el propósito de respetar el principio de las “tres Rs” (Reducción, Refinamiento y Reemplazo) en el uso de animales de experimentación, en una primera etapa se realizaron dos ensayos utilizando un solo animal por tiempo con el propósito de determinar el tiempo post-inmunización (pi) a evaluar. Una vez determinado el tiempo pi al cual se detecta la replicación viral se realizó un ensayo aumentando el número de animales y acotando la variable tiempo.

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
Tiempos evaluados	1 – 3 – 6 d.p.i	16 – 24 h.p.i	16 – 24 – 72 h.p.i
Aves/Tiempo	1	1	5
Edad aves	11	11	11
Inoculo/vía de inoculación	1,6 x 10 ⁷ UFP de MVA/i.m.	2,5 x 10 ⁶ UFP de MVA/i.m.	1,4 x 10 ⁷ UFP de MVA/i.m.
Tejidos recolectados	Ni, Mi, BF, Ba, Hi, Du y TC.	Ni, Mi, BF, Ba e Hi.	Ni, Mi, BF, Ba e Hi.

Tabla 5 – Esquema experimental ensayos de Biodistribución.

3.6.2 BIODISTRIBUCIÓN DE POXVIRUS ADMINISTRADOS POR VÍA SUBCUTÁNEA (S.C.)

Las aves (de 7 o 25 días de edad) fueron inoculados por vía s.c. en la membrana del ala con 1,4 x 10⁴ UFP de MVA o 5 x 10² UFP de FWPV, utilizando un aplicador de doble lanceta.

	Ensayo 1	Ensayo 2
Tiempos evaluados	Observación de la lesión durante 14 d.p.i	3 d.p.i
Número de aves	2	3
Edad aves	7	25
Virus inoculado	MVA – FWPV	MVA
Vía de inoculación	Membrana del Ala	Membrana del Ala
Tejidos recolectados	-	Membrana del ala, Hi, Ba y BF.

Tabla 6 - Esquema experimental ensayo de Biodistribución.

3.6.3 PREPARACIÓN DE HOMOGENATOS DE TEJIDO PARA REALIZAR PASAJES CIEGOS POR FEP

Los tejidos recolectados fueron descongelados, colocados en placas de Petri estériles y cortados hasta la destrucción total del tejido con la hoja de un bisturí. Luego, el tejido disgregado se transfirió a un microtubo de 1,5 mL, se pesó en balanza de precisión y se agregó *buffer* PBS estéril en proporción 1 mL/mg de tejido. El homogenato obtenido se agitó en el vortex durante por 45 s, se sometió a 3 ciclos de congelado/descongelado y se centrifugó a baja velocidad para descartar los restos celulares de manera similar a la descrita anteriormente. Se conservó el sobrenadante a -80°C hasta su utilización.

Los homogenatos se utilizaron como inóculo para infectar cultivos de FEP (dos pasajes ciegos). Brevemente, las células se infectaron con 500 µL de una dilución al décimo del sobrenadante del homogenato obtenido y se incubaron en estufa a 37°C, con 5 % de CO₂, por un período de 5-6 días. Luego, se cosecharon las células, se sometieron a 3 ciclos de congelado/descongelado para liberar los virus y se centrifugaron a baja velocidad para descartar los restos celulares. Se conservó el sobrenadante como “pasaje 1” (P1). Esta suspensión se utilizó como inóculo (500 µL del P1 sin diluir) para infectar monocapas de FEP. A los 5-6 días, se cosecharon las células de manera similar a la descrita anteriormente y se obtuvo el “pasaje 2” (P2), que se almacenó a -80°C hasta su utilización.

3.6.4 DETECCIÓN DEL GENOMA DE POXVIRUS EN MUESTRAS DE TEJIDO RECOLECTADOS DE LAS AVES VACUNADAS

La purificación de ADN total a partir de las muestras de tejidos recolectados se realizó siguiendo dos protocolos diferentes:

- I. A partir de las suspensiones virales provenientes de los dos pasajes ciegos por FEP (ver punto anterior) se purificó el ADN total siguiendo la metodología descrita en el **ítem 3.5.6 de esta sección**.
- II. Las muestras de tejido fueron disgregadas, en condiciones de esterilidad, utilizando un mortero de porcelana y nitrógeno líquido. Posteriormente, el ADN total fue purificado utilizando el kit QIAamp® DNA Mini KIT (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El ADN total purificado se utilizó como templado en reacciones de amplificación por PCR utilizando cebadores específicos para detectar la presencia del genoma viral. Además, se realizó como control la amplificación por PCR del gen aviar *gapdh* para descartar la presencia de inhibidores de la reacción.

3.7 METODOLOGÍAS UTILIZADAS PARA LOS ENSAYOS DE EFICIENCIA DE LOS VECTORES VIRALES QUE EXPRESAN LA PROTEÍNA VP2 DE IBDV

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 CNIA-INTA.

3.7.1 INMUNÓGENOS

- ↻ MVA-VP2 y MVA-GFP: 0,5 mL de los stocks virales (preparados como se indica en el **ítem 3.3.1.1 de esta sección**) se inocularon por vía i.m. en la pata.

- ☞ AdHu-VP2 y AdHu-GFP: 0,1-0,2 mL de los stocks virales purificados (preparados como se indica en el ítem 3.5.3 de esta sección) se inocularon por vía i.m. en la pata.
- ☞ Vacuna viva de IBDV: se utilizó la vacuna comercial LZD INMUNER, provista por Laboratorios Inmuner S.A. (Concepción del Uruguay, Entre Ríos). 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.

3.7.2 VIRUS DE DESAFÍO

Se utilizó una cepa clásica de IBDV (Genogrupo 1). La semilla liofilizada fue reconstituida a una concentración de 30 mg/10 mL de diluyente. Las aves fueron inoculadas con 500 μ L (aproximadamente 8×10^5 DICT₅₀) del virus de desafío, por vía oral. El título del virus de desafío se cuantificó de manera similar al procedimiento indicado en el ítem 3.7.6.1.

3.7.3 DISEÑOS EXPERIMENTALES

3.7.3.1 ESQUEMA DE VACUNACIÓN CON UNA SOLA DOSIS DE MVA RECOMBINANTE

Grupos de 5 o 6 pollos, de 11 días de edad, fueron inmunizados según la siguiente tabla:

Grupo	Inmunógeno	Ensayo 1	Ensayo 2
MVA – VP2	MVA – VP2	$5,2 \times 10^3$ UFP	8×10^5 UFP
MVA – GFP	MVA – GFP	$1,7 \times 10^5$ UFP	8×10^5 UFP
IBDV	Vacuna comercial LZD		no menor a 10^3 DIE ₅₀ **
PBS*	PBS		400 μ L

Tabla 7 - Esquema experimental de los ensayos de inmunización.

*grupo conformado por 5 animales.

**así especificado en el prospecto de la vacuna comercial.

3.7.3.2 ESQUEMA VACUNACIÓN *PRIME-BOOST* HETERÓLOGO COMBINANDO ADENOVIRUS Y MVA RECOMBINANTES

Grupos de 3, 5 o 6 pollos de 1 y 11 días de edad, fueron inmunizados según la siguiente tabla:

Grupo	Ensayo 1		Ensayo 2	
	Inmunógeno Prime (dosis)	Inmunógeno Boost (dosis)	Inmunógeno Prime (dosis)	Inmunógeno Boost (dosis)
AdHu-VP2/MVA-VP2	AdHu-VP2 (6,65 x 10 ⁶ UFP)	MVA-VP2 (8 x 10 ⁵ UFP)	AdHu-VP2 (1,5 x 10 ⁹ UFP)	MVA-VP2 (8 x 10 ⁵ UFP)
AdHu-GFP/MVA-GFP	AdHu-GFP (1,75 x 10 ⁸ UFP)	MVA-GFP (8 x 10 ⁵ UFP)	-	-
AdHu-VP2	AdHu-VP2 (6,65 x 10 ⁶ UFP)	-	AdHu-VP2 ** (1,5 x 10 ⁹ UFP)	-
IBDV LZD	-	Vacuna comercial* LZD (no menor a 10 ³ DIE ₅₀)	-	-
PBS	-	-	400 µL **	400 µL

Tabla 8 - Esquema experimental de los ensayos de inmunización con el esquema *prime-boost*.

*grupo conformado por 5 animales.

**grupos conformados por 3 animales.

3.7.4 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL ANTI-IBDV POR ELISA

A los 14 días post vacunación se tomaron muestras de sangre para evaluar la presencia de anticuerpos específicos anti-IBDV utilizando el kit comercial *Flock Check* IBD de

Laboratorios IDEXX. Brevemente, las muestras de sangre recolectadas se centrifugaron 4 min a 2.000 rpm en microcentrífuga. El suero obtenido fue almacenado a -20°C hasta su utilización.

A los 14 días post vacunación se tomaron muestras de sangre para evaluar la presencia de anticuerpos específicos anti-IBDV por ELISA. Brevemente, se utilizaron las placas de 96 pocillos recubiertas con el antígeno viral (IBDV) del *kit comercial Flock Check IBD* de *Laboratorios IDEXX*. Las muestras de sangre recolectadas se centrifugaron 4 min a 2.000 rpm en microcentrífuga. La presencia de los anticuerpos totales anti-IBDV se evaluó por duplicado utilizando 100 µL de una dilución 1/25 de los sueros 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 version 2.2.237.

3.7.5 INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON IBDV

A los 27 días de edad las aves se infectaron por vía oral con aproximadamente 8×10^5 DICT₅₀ (dosis infectivas embrión de pollo 50%/mL) de una cepa clásica de IBDV (Genogrupo 1) y se sacrificaron a los 5 días post-infección para evaluar la presencia de IBDV y el daño histopatológico en la BF (ver puntos siguientes).

3.7.6 TOMA DE MUESTRAS DE LA BOLSA DE FABRICO, TITULACIÓN DE IBDV Y ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO

Luego del sacrificio de las aves se prepararon homogenatos de BF en PBS (1 mg de tejido/mL), 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 (Reed and Muench, 1938). El resto del órgano se fijó en formol tamponado (pH 7) para su posterior análisis histopatológico.

Para determinar si las aves vacunadas con los vectores que expresan la proteína VP2 estaban protegidas frente al desafío con IBDV, en este trabajo de Tesis se utilizó el criterio que incluye la evaluación simultánea de dos parámetros: a) disminución significativa del título de IBDV recuperado en bolsa de Fabricio respecto del grupo control “estricto” (animales vacunados con los vectores virales que expresan la proteína no relacionada GFP) y b) que las lesiones histopatológicas en BF sean nulas o leves (y significativamente distintas respecto del grupo de aves inmunizado con los vectores virales que expresan la proteína GFP).

Estos criterios son similares a los utilizados en otros trabajos de nuestro grupo de investigación (Zanetti *et al.*, 2016, Richetta *et al.*, 2017, Federico, 2018)

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).

3.7.6.1 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 μ L/pocillo de una misma dilución viral excepto en la última fila en donde se adicionó el mismo volumen de medio D-MEM. Posteriormente, se agregan a todos los pocillos de la placa 100 μ L de una suspensión de FEP ($4,2 \times 10^5$ cél/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 and Muench, 1938) y se expresó como Dosis infectiva en cultivo de tejido 50% por mL (DICT₅₀/mL).

3.7.6.2 ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO DE LA BOLSA DE FABRICIO

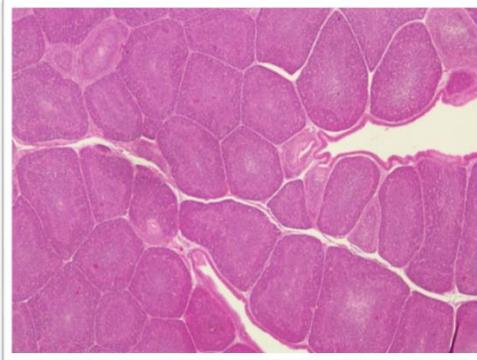
El análisis histopatológico fue realizado por el Dr. F. Delgado del Instituto de Patobiología, CICVyA, INTA.

Brevemente, las BF se fijaron en formol 10 % tamponado (pH 7) y se embebieron en parafina. Posteriormente se realizaron cortes con micrótopo, 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 descrito por Pérez en el año 2008 (Pérez C., Alba Ch. and Icochea D., 2008):

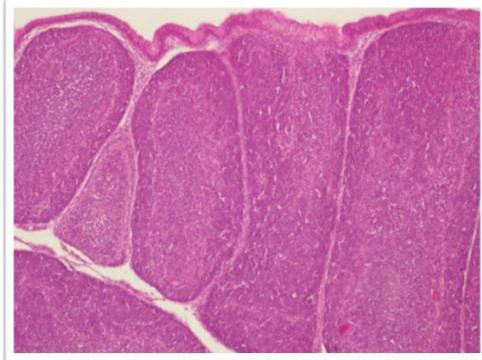
- ☞ **Score 1** – No se observan lesiones. El cortex y la médula no se ven alterados.
- ☞ **Score 2** – Se observa una leve depleción linfoide en la mayoría de los folículos de la bolsa. El revestimiento del epitelio se observa corrugado. (Hasta un 30% de folículos afectados).
- ☞ **Score 3** – El tejido muestra reducción linfoide (de moderada a severa) en la mayoría de los folículos, los cuales se observan pálidos y vacuolados. Se observa infiltración inflamatoria tanto en los folículos como en el estroma interfolicular. Se observa la pérdida de la mayor parte del revestimiento epitelial y pueden observarse restos celulares en algunos de los folículos. (31 al 75 % de folículos afectados).
- ☞ **Score 4** – La bolsa muestra la pérdida de los folículos linfoides y se produce una transformación glandular con incremento del tejido conectivo interfolicular. Se observan cavidades quísticas en algunos folículos e infiltración de macrófagos, células plasmáticas y células linfoides en el tejido conectivo del estroma. (más del 75% de los folículos afectados).

En la siguiente figura se observan las imágenes (aumento de 40 X y 100 X) compatibles con los diferentes grados de lesiones o *scores*.

40X

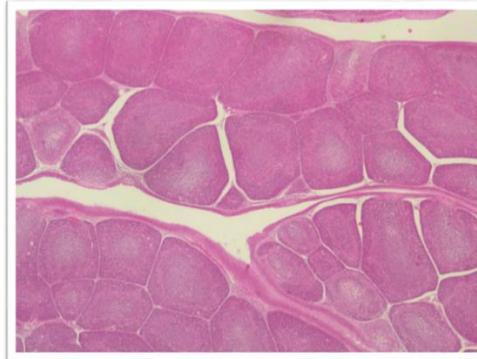


100x

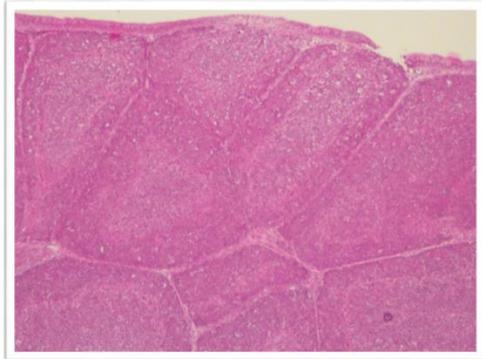


Score 1

40X

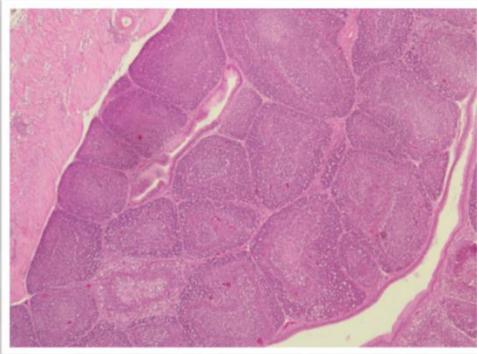


100X

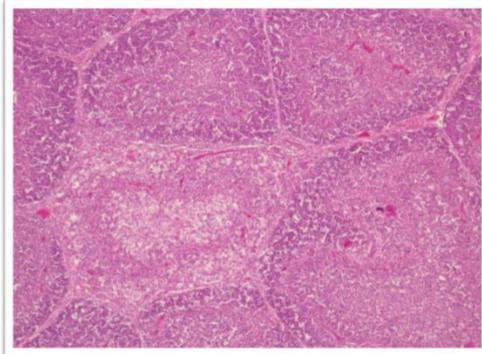


Score 2

40X



100X



Score 3

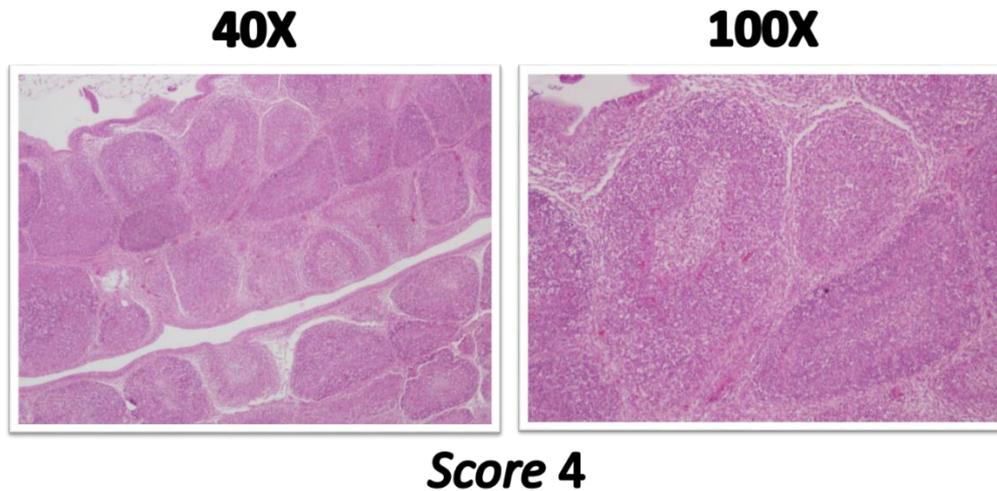


Figura 17 - Cortes histopatológicos de la bolsa de Fabricio. Se observan las lesiones del órgano de los diferentes *scores* (1 a 4) con aumento de 40X y 100X.

El *score* promedio de las lesiones histopatológicas por grupo de calculó según la siguiente fórmula:

$$(N.1 + N.2 + N.3 + N.4) / N^{\circ} \text{ total aves del grupo}$$

Donde **N** representa la cantidad de aves del grupo con lesiones histopatológicas correspondientes a un determinado *score* (de 1 a 4).

3.7.6.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se compararon los resultados del grupo de aves vacunadas con los vectores que expresan la proteína VP2 y el grupo inmunizado con los vectores que expresan una proteína no relacionada (GFP). El análisis estadístico se realizó con el test no paramétrico de Mann Whitney (GraphPad Prism 8).



RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 ESTUDIO DE LA BIODISTRIBUCIÓN DE MVA RECOMBINANTES EN POLLOS

Definimos biodistribución a la distribución tisular *in vivo* de un vector luego de ser inoculado en un animal. Tal como se ha mencionado, los virus MVA recombinantes son incapaces de replicar en la mayoría de las células de mamífero y su replicación en el laboratorio se realiza en cultivos primarios de fibroblastos de embrión de pollo (FEP) o cultivos de células BHK-21 (Miles W. Carroll and Moss, 1997; Drexler *et al.*, 1998; Okeke, Nilssen and Traavik, 2006).

Desde la década del '90 los virus MVA han sido investigados como vectores seguros para el desarrollo de vacunas virales recombinantes contra enfermedades infecciosas que afectan a animales y humanos. Como se mencionó anteriormente, a diferencia de mamíferos, donde la deficiencia de replicación y la seguridad de MVA están bien establecidas, muy poco se sabe sobre la infección por MVA en hospedadores aviares. Existen dos trabajos publicados que confirman, directa o indirectamente, la seguridad de los virus MVA recombinantes cuando se inoculan en membrana corioalantoidea (embriones de 11 días) o como vacuna *in ovo* (a los 18 días de desarrollo embrionario), respectivamente (Boyd *et al.*, 2013; Langenmayer *et al.*, 2018). Teniendo en cuenta que los virus MVA se aislaron por más de 500 pasajes sucesivos en FEP, en este trabajo de Tesis se evaluó su capacidad replicativa en pollos con el propósito de determinar el perfil de seguridad de los virus MVA que se utilizarán para el desarrollo de vacunas aviares.

4.1.1 EVALUACIÓN DE LA BIODISTRIBUCIÓN DEL VIRUS MVA INOCULADO POR VÍA SUBCUTÁNEA EN POLLOS

Las vacunas de viruela aviar (virus fowlpox o FWPV) están basadas en cepas vivas atenuadas que replican de manera limitada en el sitio de inoculación (membrana del ala), induciendo inmunidad protectora de por vida. La replicación viral limitada y la consecuente respuesta inmune del hospedador originan la formación de una pequeña

lesión nodular característica denominada “toma” de la vacuna. Además, se puede formar una costra de color marrón a negro en el sitio de la membrana del ala donde se aplicó la vacuna, que finalmente se desprende y cae. La lesión nodular aparece aproximadamente al día 6 post-inoculación y es reabsorbida entre los 11 y 14 días post-inoculación (dpi) (OIE, 2018).

En base a estos antecedentes, en este Trabajo de Tesis se evaluó si los vectores de MVA inducían la formación de lesiones nodulares al ser aplicados por vía subcutánea en la membrana del ala (punción alar) según el procedimiento descrito en 3.6.2 Materiales y Métodos. La dosis (definida como unidades formadoras de placa, UFP) de MVA utilizada fue aproximadamente 30 veces mayor que la dosis de la vacuna de FWPV.

La **Figura 18** muestra la evolución de las lesiones nodulares producidas en la membrana del ala por la inoculación de los poxvirus MVA y FWPV en aves de 7 días de edad. Para el caso de la viruela aviar (cepa vacunal) se observó la formación de una lesión nodular característica denominada “toma” de la vacuna. La lesión fue visible a partir del segundo día post inoculación (dpi), fue aumentando de tamaño hasta alcanzar su máximo de aproximadamente 3 mm al sexto día después de la vacunación. Posteriormente, se observó la formación de una costra (7 dpi) que se desprendió al día 11 pi. Finalmente, la lesión nodular fue reabsorbida al día 12 post vacunación.

En cambio, la inoculación del vector de MVA en la membrana del ala no indujo la formación de lesiones nodulares ni formación de costras. Solo se observó una pequeña zona de inflamación menor a 0,5 mm de diámetro la cual podría ser atribuida a la herida originada por el instrumental utilizado para la punción.

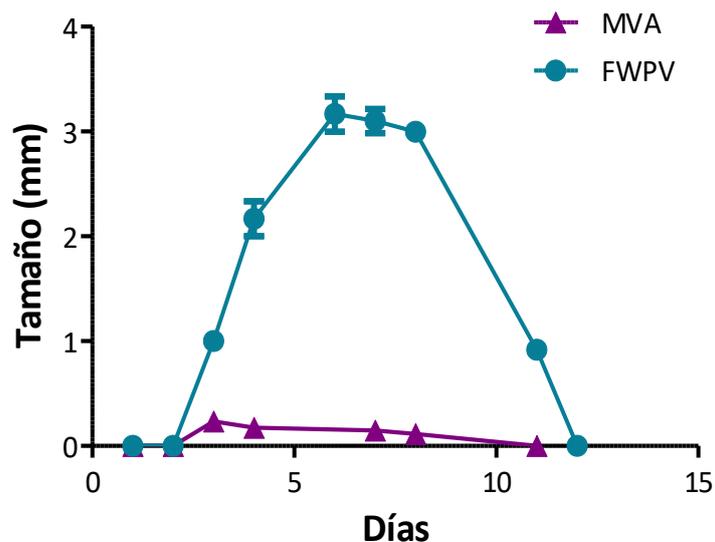


Figura 18 - Evaluación del tamaño de la lesión nodular (“toma” de la vacuna). Las aves de 7 días de edad se inmunizaron por vía s.c. en el ala con una vacuna comercial de viruela aviar (FWPV; 5×10^2 UFP) o con el vector MVA ($1,4 \times 10^4$ UFP). Durante 12 días, se registró el tamaño del nódulo utilizando un calibre. Se muestra el promedio del tamaño, expresado en mm, por día, por grupo.

Con el propósito de detectar el genoma viral, los pollos se vacunaron con MVA de manera similar (punción en la membrana del ala), a los 3 dpi las aves fueron sacrificadas, se tomaron muestras de distintos tejidos (membrana del ala, hígado, bazo y bolsa de Fabricio) y se analizaron como se indica en las secciones 3.6.3 y 3.6.4 de Materiales y Métodos. De esta forma, la presencia del genoma viral se evaluó en las muestras de ADN purificado directamente en los tejidos o luego de realizar dos pasajes ciegos por FEP.

En todas las muestras se amplificó por PCR el gen aviar *gapdh*, que codifica para la enzima gliceraldehído fosfato deshidrogenasa, lo cual indicó la ausencia de inhibidores de la reacción de PCR en las muestras de ADN. En cambio, no se pudo amplificar por PCR el gen viral *MVA165R* en ninguna de las muestras evaluadas (resultados no mostrados).

La ausencia de lesión nodular visible luego de la inoculación del vector de MVA en la membrana del ala y la falta de detección del genoma viral, indicaría que MVA no está presente en el sitio de inoculación y no induce la respuesta inmune celular e inflamatoria que determina la formación de nódulos característicos de las vacunas de viruela aviar, que replican de forma limitada en el sitio de inoculación.

4.1.2 EVALUACIÓN DE LA BIODISTRIBUCIÓN DE MVA INOCULADO POR VÍA INTRAMUSCULAR

La vía de inmunización intramuscular (i.m.) es otra de las vías ampliamente utilizadas para las vacunas vectorizadas por poxvirus, aunque no es una vía de inmunización compatible con la industria avícola debido a la limitación que presenta para su uso masivo. Sin embargo, en este trabajo de tesis la vía i.m. fue seleccionada para evaluar la capacidad replicativa *in vivo* de los vectores de MVA porque, con el agregado de tinta china en la suspensión del inmunógeno, se identifica fácilmente el sitio de inoculación. Esta metodología fue utilizada previamente en nuestro laboratorio para evaluar la biodistribución en pollos de los vectores basados en virus canarypox (Zanetti *et al.*, 2016).

Como se describe en la sección **3.6.1 de Materiales y Métodos**, los pollos fueron inoculados por vía i.m. en una pata y la distribución *in vivo* de MVA se realizó mediante amplificación por PCR para detectar el genoma viral en diferentes tejidos y a distintos tiempos post-inmunización. Para respetar el principio de las “tres Rs” (Reducción, Refinamiento y Reemplazo), se realizaron dos ensayos con un solo animal por tiempo para acotar el momento post infección donde se detecta el genoma viral y, en base a esta información se realizó el ensayo de biodistribución de MVA en grupos de 5 aves por tiempo.

La detección del genoma de MVA se realizó utilizando oligonucleótidos específicos para amplificar por PCR los genes virales *MVA157L* o *MVA165R* que codifican para la enzima 3 β -hidroxi-esteroide deshidrogenasa o para la proteína hemoaglutinina, respectivamente.

En el momento que se realizaron estos experimentos, en el único trabajo publicado donde se había evaluado la biodistribución de un poxvirus en pollos era con el vector viral basado en el virus raccoonpox (Hwa *et al.*, 2010). En dicho estudio, la presencia del virus recombinante que expresa luciferasa fue registrada mediante imágenes de bioluminiscencia hasta el tercer día pi. En base a estos antecedentes, en este trabajo de Tesis se realizó el primer ensayo en el cual fueron inoculados tres pollos de 11 días de edad con el vector de MVA y la toma de muestras de los distintos tejidos se realizó a los días 1; 3 y 6 pi.

En la **Figura 19** se observa que en todas las muestras de ADN (purificadas de los diferentes tejidos a los tres tiempos evaluados) se amplificó por PCR el gen aviar *gapdh*. En cambio, no fue posible la detección del genoma de MVA en ninguno de los tejidos y tiempos analizados (datos no mostrados).

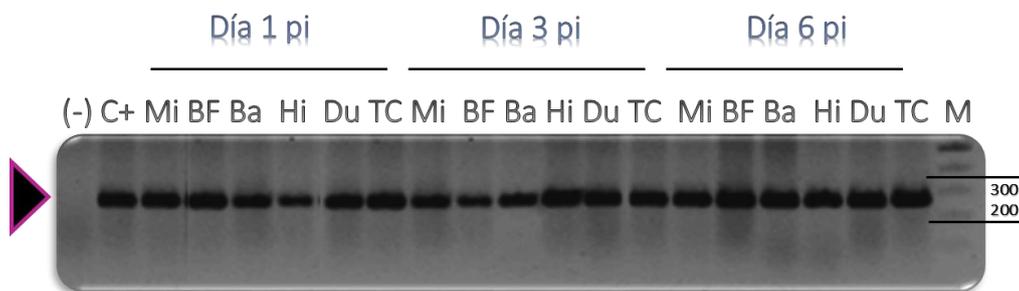


Figura 19 - Amplificación por PCR del gen aviar *gapdh*. En la reacción de PCR se utilizaron los oligonucleótidos iniciadores GAPDHfw – GAPDHrv. Los productos de la reacción se resolvieron mediante electroforesis en geles de agarosa 1% y tinción con bromuro de etidio. Las muestras de ADN se obtuvieron a partir de músculo inyectado (Mi), bolsa de Fabricio (BF), bazo (Ba), hígado (Hi), duodeno (Du) y tonsilas cecales (TC), (-): sin ADN, C+: ADN purificado de FEP, M: Marcador de peso molecular *1Kb plus* (Thermo Fischer Scientific). La flecha indica la posición esperada para el amplicón correspondiente al gen aviar *gapdh*. Los tamaños se indican en pares de bases.

Teniendo en cuenta que a veces es necesario realizar pasajes ciegos por cultivo celular para amplificar la cantidad y poder detectar un virus, con los homogenatos de los tejidos recolectados se realizaron 2 pasajes ciegos por cultivos de células susceptibles (FEP). En ningún caso se observó el efecto citopático característico del virus MVA ni fue posible detectar la presencia del genoma viral mediante amplificación por PCR (resultados no mostrados).

En base a estos resultados, se realizó un nuevo experimento para evaluar tiempos más cortos post infección: 16 y 24 h.

Cuando la amplificación por PCR se realizó a partir de ADN obtenido directamente de los tejidos colectados, el amplicón correspondiente al gen aviar *gapdh* se detectó en todos los casos, **Figura 20**, sin embargo, no fue posible amplificar el genoma viral (resultados no mostrados).



Figura 20 - Amplificación por PCR del gen aviar *gapdh*. En la reacción de PCR se utilizaron los oligonucleótidos iniciadores GAPDHfw – GAPDHrv. Los productos de la reacción se resolvieron mediante electroforesis en geles de agarosa 1% y tinción con bromuro de etidio. Las muestras de ADN se obtuvieron a las 16 o 24 hpi a partir de músculo inyectado (Mi), músculo no inyectado (Ni), hígado (Hi), bolsa de Fabricio (BF) y bazo (Ba). (-): sin ADN, C+: ADN purificado de FEP. La flecha indica la posición esperada para el amplicón correspondiente al gen aviar *gapdh*.

Luego, para incrementar la cantidad de virus que podrían contener las muestras de homogenatos de los diferentes tejidos, se realizaron dos pasajes ciegos por FEP. El ADN total purificado de estas últimas células se utilizó como templado para la reacción de amplificación por PCR del gen viral MVA165R. Así, se detectó la presencia del amplicón de 303 pb únicamente en las muestras provenientes del sitio de inoculación (músculo inyectado) a los dos tiempos pi evaluados (**Figura 21**).

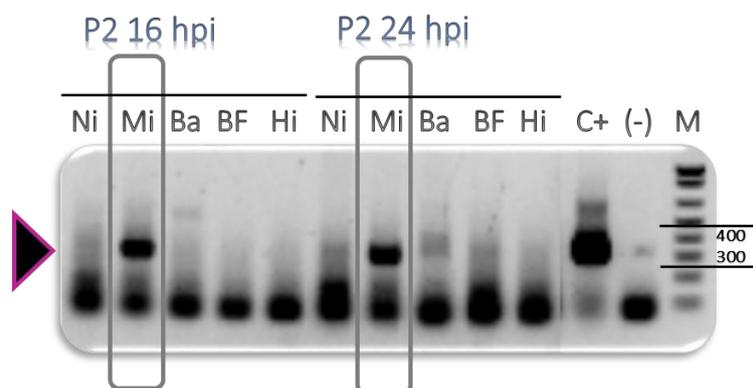


Figura 21 - Amplificación por PCR del gen viral *MVA165R*. En la reacción de PCR se utilizaron los oligonucleótidos iniciadores MVA165fw - MVA165rv. Los productos de la reacción se resolvieron mediante electroforesis en geles de agarosa 1% y tinción con bromuro de etidio. Los templados de ADN se obtuvieron luego de realizar dos pasajes ciegos por FEP (P2) de las muestras colectadas a las 16 o 24 hpi a partir de: músculo no inyectado (Ni), músculo inyectado (Mi), bazo (Ba), bolsa de Fabricio (BF); Hígado (Hi), (-): sin ADN, C+: ADN de MVAwt, M: Marcador de peso molecular *1Kb plus* (Thermo Fisher Scientific). La flecha indica la posición esperada para el amplicón correspondiente al gen viral MVA165. Los tamaños se indican en pares de bases.

De acuerdo a estos resultados, se realizó un experimento incluyendo un mayor número de aves (n=5) por tiempo. Los animales fueron inoculados con los virus MVA, las muestras se colectaron a las 16, 24 y 72 hpi y la evaluación del genoma viral fue determinada mediante amplificación por PCR luego de realizar dos pasajes ciegos por FEP.

En todas las muestras se detectó la amplificación del gen aviar *gapdh* (datos no mostrados). En la **Figura 22**, puede observarse que el amplicón de 1.000 pb correspondiente al gen viral *MVA157L* se detectó a las 16 hpi, en las muestras correspondientes al sitio de inoculación en tres de los cinco animales inoculados del grupo. En el resto de los tejidos analizados para este tiempo pi no se detectó la presencia del genoma de MVA.

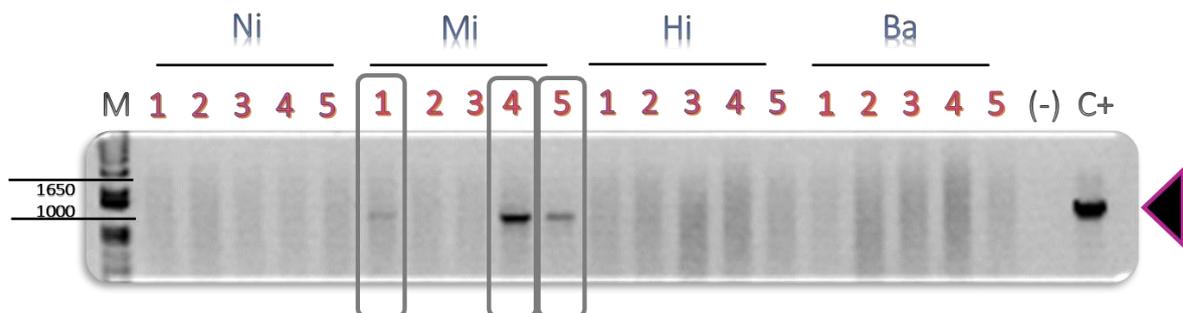


Figura 22 - Amplificación por PCR del gen viral *MVA157L*. En la reacción de PCR se utilizaron los oligonucleótidos iniciadores MVA157IntF – MVA160rv. Los productos de la reacción se resolvieron mediante electroforesis en geles de agarosa 1% y tinción con bromuro de etidio. Los templados de ADN se obtuvieron luego de realizar dos pasajes ciegos por FEP de las muestras colectadas de las aves (1 a 5) a las 16 hpi a partir de músculo no inyectado (Ni), músculo inyectado (Mi), bazo (Ba), hígado (Hi), (-): sin ADN, C+: ADN de MVAwt, M: Marcador de peso molecular *1Kb plus* (Thermo Fisher Scientific). La flecha indica la posición esperada para el amplicón correspondiente al gen viral *MVA157L*. Los tamaños se indican en pares de bases.

En ninguna de las muestras analizadas para los grupos inoculados con MVA a las 24 o 72 hpi pudo detectarse el genoma viral (datos no mostrados).

En conjunto, los resultados obtenidos indican que MVA no infecta productivamente a los pollos y que al aplicarlo por vía i.m. el genoma viral se detecta solo en el sitio de inoculación hasta las 24 hpi en algunas de las aves vacunadas.

4.2 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ADENOVIRUS RECOMBINANTES (ADHU-5) QUE PORTAN EL GEN CODIFICANTE DE LA PROTEÍNA VP2 DE IBDV

Como se mencionó anteriormente, existen numerosos trabajos que muestran que la estrategia de vacunación *prime-boost* heteróloga resulta más efectiva que la aplicación de dos dosis homólogas en términos de intensidad y durabilidad de la respuesta inmune. En el desarrollo de vacunas aviares, estos esquemas de inmunización combinan vectores virales (HVT, poxvirus o Ad) entre sí o con vacunas a subunidad, vacunas inactivadas o génicas.

En base a estos antecedentes, uno de los objetivos de este trabajo de Tesis fue la obtención de los virus AdHu-5 recombinantes que expresan la secuencia codificante de la proteína VP2 de IBDV, para evaluarlos en un esquema de inmunización *prime-boost* heterólogo combinado con el vector viral MVA-VP2.

Los adenovirus recombinantes que expresan la proteína VP2 de IBDV se obtuvieron utilizando el vector pAd/CMV/V5-DEST™ (Thermo Fischer Scientific) como se describió en la sección 3.5 de Materiales y Métodos. El sistema se basa en clonar la secuencia de interés en un vector denominado “vector de entrada” para luego sub-clonarlo en el “vector destino”. Este sub-clonado ocurre por recombinación homóloga *in vitro* entre las regiones *attL* y *attR*, flanqueantes a la secuencia de interés, que están presentes en los plásmidos de “entrada” y “destino”, respectivamente (**Figura 23**).

Con este sistema se obtiene un adenovirus recombinante incompetente para la replicación en la mayoría de las células de mamíferos debido a la ausencia de los genes que codifican para las proteínas esenciales E1 y E3 pero que en el laboratorio puede ser amplificado en cultivos de células HEK 293A debido a que aportan en *trans* las dos proteínas indispensables para la replicación viral. La expresión del gen de interés estará dirigida por el promotor de citomegalovirus.

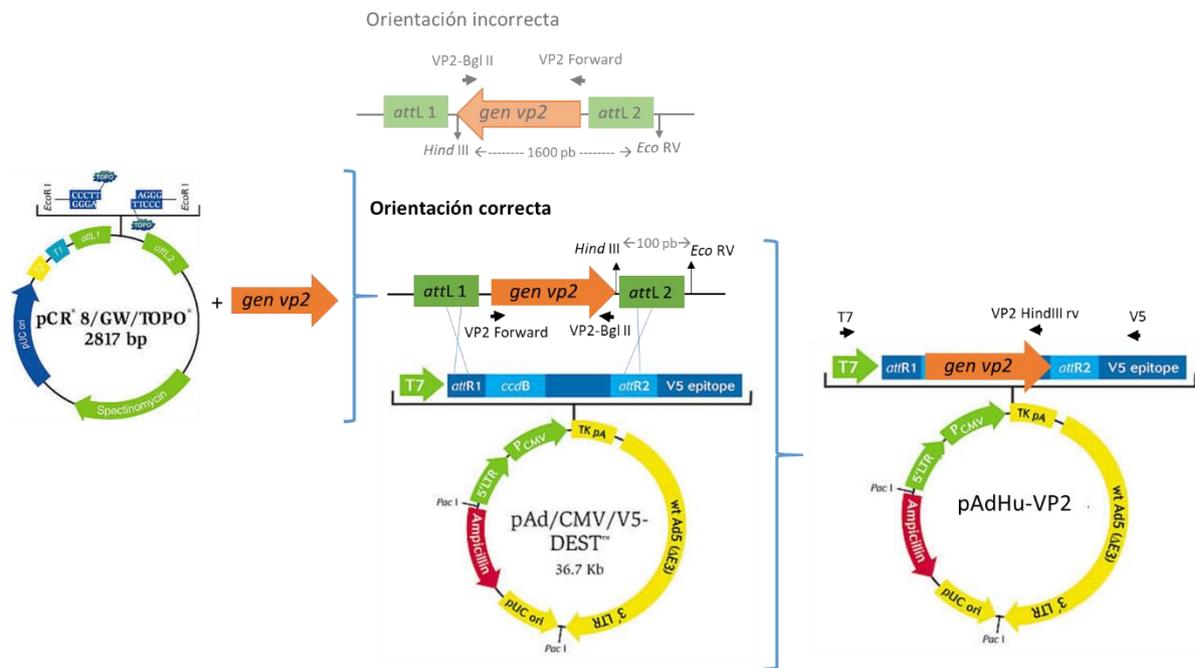


Figura 23 – Estrategia de clonado de la construcción plasmídica denominada pAdHu-VP2.

La secuencia codificante de la proteína VP2 (*gen vp2*) se amplificó por PCR utilizando el par de oligonucleótidos VP2 EcoRI fw - VP2 HindIII rv y se clonó en el vector de entrada pCR®8/GW/TOPO. El primer análisis de los clones recombinantes se realizó por amplificación por PCR directa sobre los cultivos bacterianos (en fase estacionaria), utilizando los oligonucleótidos VP2 Forward y VP2-Bgl II. Como se observa en la **Figura 24A**, en todos los clones se amplificó un fragmento de aproximadamente 1.400 pb correspondiente al tamaño del *gen vp2* completo.

Posteriormente, se seleccionaron cuatro clones al azar (N° 1 a 4) y se purificó el ADN plasmídico para determinar la orientación del fragmento clonado. Teniendo en cuenta que el clonado del *gen vp2* en el vector de entrada es del tipo T-A y que el inserto de interés debe estar orientado correctamente respecto de las secuencias attL que recombinarán con el vector destino para garantizar su correcta transcripción a partir del promotor, se realizó el análisis por restricción con las enzimas *Hind* III y *Eco* RV (**Figura 24B**). Como se indica en el esquema de la **Figura 23**, los fragmentos de restricción esperados son diferentes si el *gen vp2* está clonado en la orientación correcta (4,1 kpb y 100 pb) o incorrecta (2,7 y 1,5 kpb). Además, mediante amplificación por PCR se confirmó

la presencia del *gen vp2* en todos los clones (**Figura 24C**). De los cuatro clones que portaban el *gen vp2*, tres clones poseían el inserto clonado en la orientación correcta (N° 1 a 3). Se seleccionó uno de ellos al azar y la identidad del *gen vp2* se confirmó por secuenciación. Al plásmido recombinante, se lo denominó pCR8-VP2.

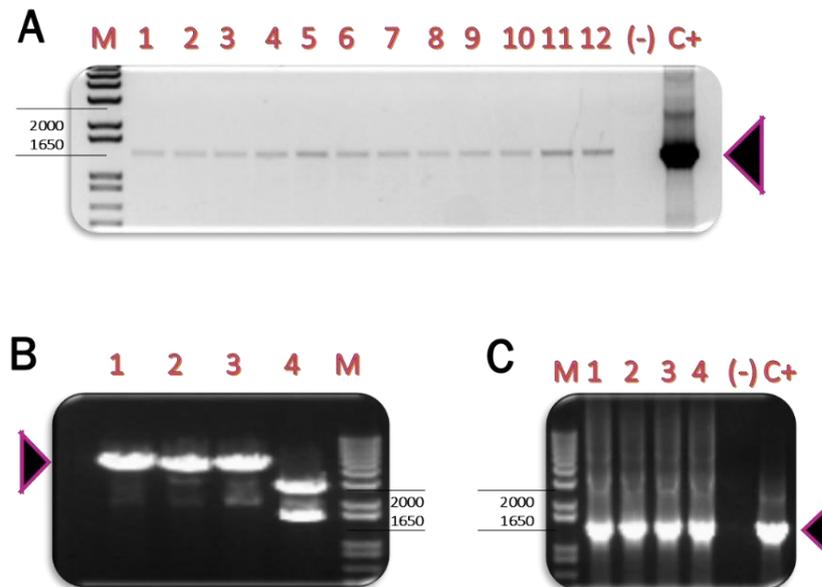


Figura 24 - Análisis de los clones pCR8-VP2. **A)** Amplificación por PCR del *gen vp2* utilizando los cebadores VP2-Forward y VP2-Bgl II. 1 a 12: clones plasmídicos; (-): sin ADN y C+: ADN de MVA-VP2. La flecha indica el tamaño esperado para el *gen vp2* (1,4 kpb). **B)** Los clones recombinantes (N° 1 a 4) se trataron con las enzimas de restricción *Eco* RV y *Hind* III. La flecha indica el fragmento de 4,1 kpb esperado para los clones conteniendo el *gen vp2* en orientación correcta. **C)** Los clones recombinantes (N° 1 a 4) se amplificaron por PCR utilizando los cebadores específicos para el *gen vp2* Forward y VP2-Bgl II, (-): sin ADN y C+: ADN de MVA-VP2. La flecha indica el tamaño esperado para el *gen vp2* (1,4 kpb). Los fragmentos de ADN se resolvieron mediante electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio. M: Marcador de peso molecular *1Kb plus* (Thermo Fisher Scientific).

Una vez corroborada la secuencia, el gen de interés se insertó en el vector destino pAd/CMV/V5-DEST™ mediante recombinación homóloga entre dicho vector y el plásmido pCR8-VP2 utilizando la enzima LR Clonase® II (ver sección 3.5.1 de Materiales y Métodos). De las 12 colonias recombinantes crecidas en medio selectivo, se seleccionó una al azar, se amplificó y se purificó el ADN plasmídico. La presencia del gen de interés se confirmó mediante amplificación por PCR utilizando los cebadores específicos T7 y VP2-Hind III rv, que hibridan sobre el vector y sobre el *gen vp2*, respectivamente (**Figura 25A**; esquema

Figura 23). Posteriormente, se confirmó la identidad del *gen vp2* y la construcción obtenida, denominada pAdHu-VP2, se utilizó para obtener los adenovirus recombinantes.

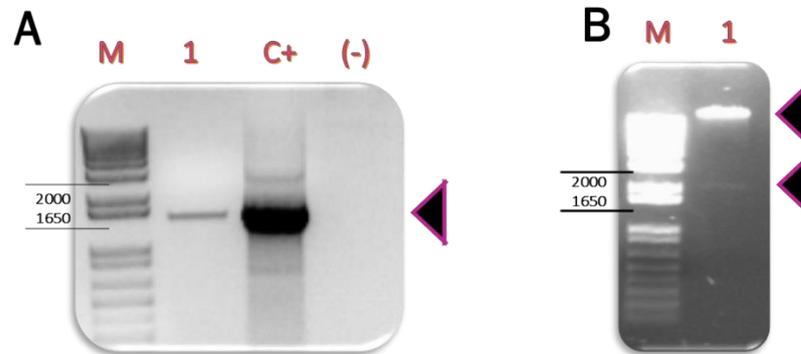


Figura 25 - Análisis del clon pAdHu-VP2. **A)** Amplificación por PCR de la región que contiene al *gen vp2* utilizando los cebadores T7 y VP2 Hind III rv. 1: Clon recombinante seleccionado, C+: ADN del plásmido pRSet-VP2 (disponible en el laboratorio) y (-): sin ADN. La flecha indica el tamaño del amplicón esperado (1,5 kpb). **B)** El clon recombinante (Nº 1) fue tratado con la enzima de restricción *Pac I*. Las flechas indican los fragmentos de restricción esperados de 12 kpb y 2 kpb. Los fragmentos de ADN se resolvieron mediante electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio M: Marcador de peso molecular *1Kb plus* (Thermo Fisher Scientific).

El vector pAdHu-VP2 fue linealizado con la enzima de restricción *Pac I* para favorecer la exposición de las secuencias repetidas invertidas (ITRs) flanqueantes al inserto de interés y que constituyen los orígenes de replicación del ADN viral. Como se muestra en la **Figura 25B**, luego de este tratamiento se originan dos fragmentos de ADN: **a)** el de mayor tamaño que corresponde al vector linealizado que porta el genoma del adenovirus recombinante (12 kpb) y, **b)** el de menor tamaño (2 kpb) que corresponde a un fragmento del plásmido que contiene el gen de resistencia a ampicilina y el origen de replicación bacteriano.

El vector linealizado (purificado a partir de geles de agarosa o sin purificar) se transfectó en un cultivo de células HEK 293A. Los cultivos celulares se incubaron hasta la aparición del efecto citopático característico de adenovirus: células redondeadas y agrupadas en racimos (**Figura 26B**). En cambio, en el control de células sin transfectar no se observaron cambios morfológicos, **Figura 26A**. De esta forma, se obtuvieron los virus recombinantes AdHu-VP2, que se denominaron con los números 1 o 2 porque provenían de las

transfecciones realizadas con el vector pAdHu-VP2 purificado o no purificado, respectivamente.

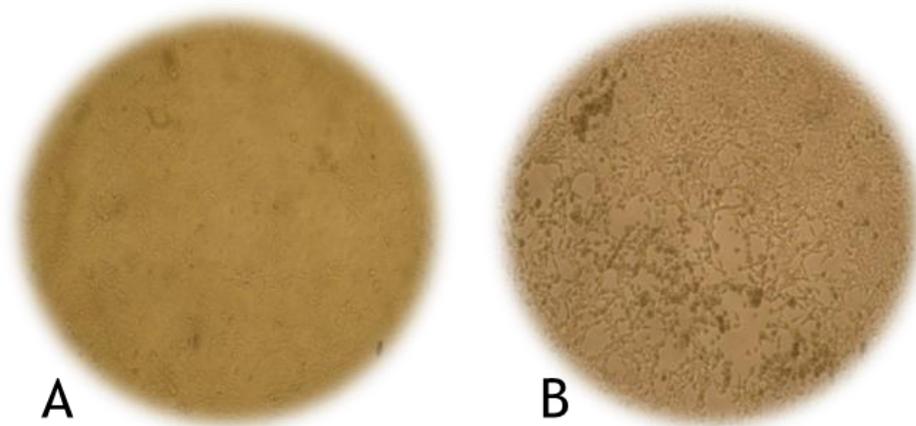


Figura 26 – Efecto citopático de adenovirus en células HEK 293A. En las fotos se observan las células sin transfectar/sin infectar (**A**) o transfectadas con el vector pAdHu-VP2 purificado (**B**). Las fotografías se tomaron en un microscopio óptico invertido, con un aumento de 100X.

Los stocks virales recombinantes AdHu-VP2 se amplificaron en cultivos de células HEK 293A y se confirmó la presencia del inserto mediante amplificación PCR utilizando los cebadores específicos T7 y V5 que hibridan por fuera del gen de interés. Como se observa en la **Figura 27A**, se obtuvo un amplicón del tamaño esperado (1,6 kpb) en los dos stocks virales recombinantes. Luego, la presencia del *gen vp2* se confirmó por PCR utilizando el par de cebadores VP2i1fw y VP2-284-1rv que amplificaron un fragmento interno de dicho gen de aproximadamente 550 pb (**Figura 27B**).

La expresión a nivel transcripcional del *gen vp2* en cultivos de células infectadas con los adenovirus recombinantes se realizó mediante la técnica de RT-PCR como se describe en la sección **3.5.7 de Materiales y Métodos**. Se utilizaron los oligonucleótidos VP2i1fw y VP2-284-1rv que amplifican un fragmento de aproximadamente 550 pb correspondiente a una región interna de la secuencia codificante del *gen vp2*. Se confirmó la ausencia de ADN celular contaminante en las muestras de ARN ya que no se detectaron productos de

amplificación cuando se utilizó ARN como templado en la reacción de PCR. Solo se observaron productos de amplificación en las reacciones de RT-PCR (**Figura 27C**).

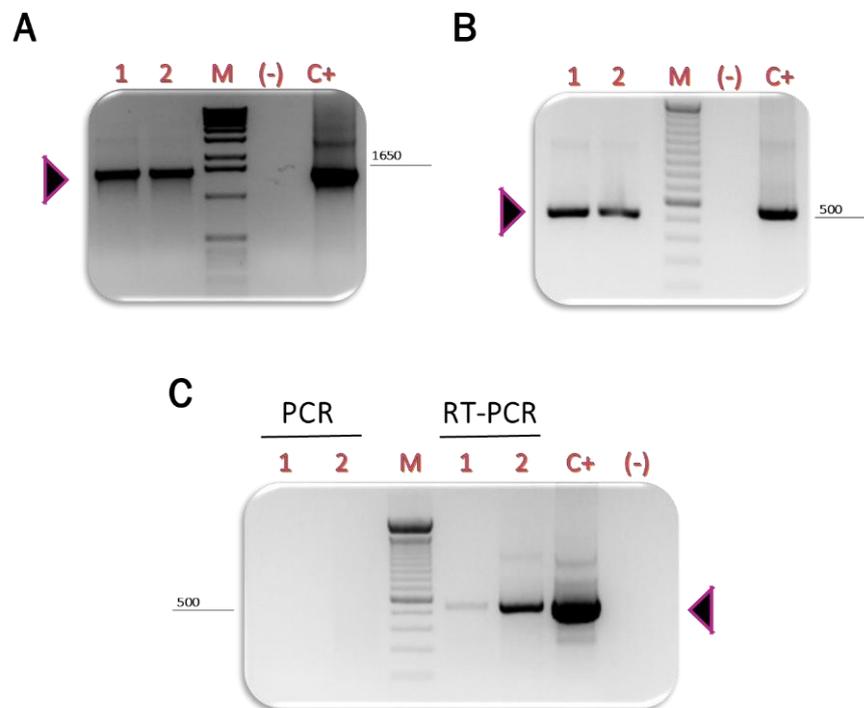


Figura 27 - Caracterización molecular de los adenovirus recombinantes AdHu-VP2. **A)** Amplificación por PCR con el par de oligonucleótidos T7-V5. **B)** Amplificación por PCR de una porción del *gen vp2* utilizando los cebadores VP2i1fw y VP2-284-1 rv. (-): sin ADN; C+: ADN del plásmido pAdHu-VP2; M: Marcador de peso molecular *100 bp* (Thermo Fisher Scientific). En (A) y (B) las amplificaciones por PCR se realizaron a partir de ADN extraído de células HEK 293A infectadas con los stocks de AdHu-VP2 (1 o 2). **C)** Amplificaciones por PCR o RT-PCR utilizando como templado ARN extraído de células HeLa infectadas con los stocks de AdHu-VP2 (1 o 2) y como cebadores a los oligonucleótidos VP2i1fw / VP2-284-1 rv. Los fragmentos de ADN se resolvieron mediante electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio. (-): sin ADN; C+: ADN del plásmido pAdHu-VP2; M: Marcadores de peso molecular (Thermo Fisher Scientific) *1Kb plus (A)* o *100 bp (B y C)*. La flecha indica el tamaño esperado de los fragmentos amplificados en cada una de las reacciones de PCR o RT-PCR.

Los AdHu-5/ Δ E1- Δ E3 recombinantes obtenidos con el sistema utilizado en este trabajo de Tesis se amplifican en cultivos de células HEK 293A que expresan constitutivamente las proteínas de la región E1, las aportan en *trans* y, así, los adenovirus recombinantes pueden ser amplificados *in vitro*. Sin embargo, luego de sucesivos pasajes en células HEK 293A, los adenovirus recombinantes (depletados de la región E1) podrían revertir a adenovirus salvaje (*wild-type*, Adwt) por recombinación homóloga con el gen *e1a* presente en el genoma de las células HEK 293A (Goldsmith *et al.*, 1994; Lochmüller *et al.*, 1994). Con el propósito de determinar la pureza (ausencia de Adwt) de los stocks de virus

recombinantes AdHu-VP2, se realizaron dos pasajes ciegos en células HeLa y, posteriormente, se amplificó por PCR el gen *e1a*. Las células HeLa son permisivas para la replicación de los Adwt, pero no permiten la replicación de los adenovirus recombinantes (que carecen del gen *e1a*). Para detectar el genoma de Adwt se utilizó el par de oligonucleótidos E1a fw - E1a rv que amplifican la región genómica viral *e1a*. El amplicón de 416 pb que determina la presencia de virus Adwt sólo se detectó en las muestras que provienen del ADN purificado a partir de células HEK 293A (control positivo de la reacción de PCR) (**Figura 28A**). Como la ausencia de amplicón determina que el stock viral de AdHu-VP2 está puro, se confirmó la amplificación del gen mitocondrial del ARNr 16S en todas las muestras lo cual determina que en las muestras de ADN no había inhibidores de la reacción de PCR (**Figura 28B**). En conjunto, estos resultados demostraron la obtención de los stocks virales puros ($\Delta e1a$) de AdHu-VP2 que portan y expresan a nivel transcripcional el gen de interés (*gen vp2*). Para continuar este trabajo de Tesis se seleccionó el stock viral AdHu-VP2 N° 1 porque provenía de la transfección realizada con el vector pAdHu-VP2 purificado.

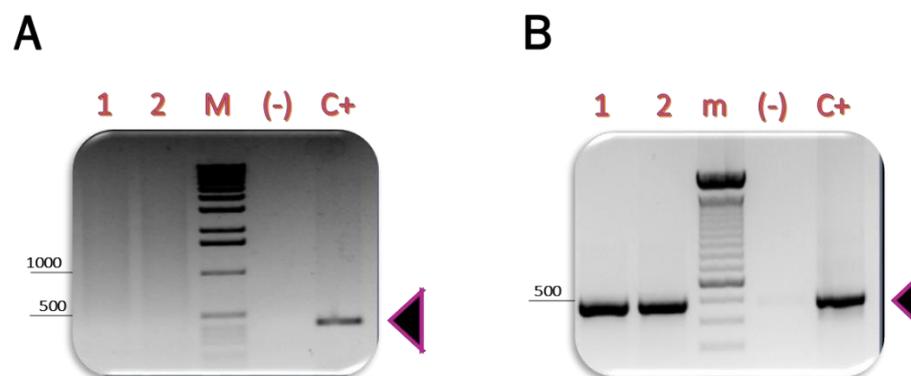


Figura 28 – Análisis de la pureza (ausencia de Adwt) de los stocks virales AdHu-VP2 mediante amplificación por PCR. Las amplificaciones por PCR se realizaron a partir de ADN extraído de células HeLa luego de dos pasajes ciegos de los stocks de AdHu-VP2 (1 o 2) utilizando el par de oligonucleótidos E1a fw - E1a rv (**A**) o M16s fw - M16s rv (**B**). C+: ADN de células HEK 293A sin infectar; (-): sin ADN. La flecha indica el tamaño del amplicón esperado de 416 pb (**A**) o 480 pb (**B**). M: Marcador de peso molecular *1Kb plus* (Thermo Fischer Scientific). m: Marcador de peso molecular *100 bp* (Thermo Fischer Scientific). Los fragmentos de amplificación por PCR se resolvieron mediante electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio.

4.3 EVALUACIÓN DE LA PROTECCIÓN INDUCIDA POR LOS VECTORES VIRALES QUE EXPRESAN LA PROTEÍNA VP2 FRENTE AL DESAFÍO CON IBDV

En este trabajo de Tesis se evaluó la capacidad protectora del candidato vacunal MVA-VP2, sólo o combinado con el vector viral AdHu-VP2, como una herramienta prometedora para la prevención de la infección por IBDV, cuya producción en cultivos de células de mamíferos en suspensión alcance títulos virales elevados compatibles con los procesos de liofilización para el almacenamiento y distribución de vacunas refrigeradas. En particular, durante este trabajo de Tesis se comparó el crecimiento de los virus MVA-VP2 y CNPV-VP2 *in vitro* (curvas de crecimiento de múltiples pasos) en monocapas de FEP (ver **Anexo I**). Se observó que la producción total de los virus MVA-VP2 fue aproximadamente 80 veces mayor que la del vector viral CNPV-VP2, esta diferencia fue aún más grande (de 132 veces) para la población viral liberada al medio extracelular. Para ambos virus, el mayor título viral se obtuvo entre las 40 y 50 h post-infección. Por otro lado, en el trabajo de colaboración entre INTA y Fundación Pablo Cassará se avanzó en la implementación de las condiciones de producción de los virus MVA recombinantes en células BHK-21 sobre *microcarriers* en suspensión a una escala media de 250 mL y adaptadas al crecimiento con concentraciones de suero fetal bovino de 0,1 a 0,3 % (información resguardada por acuerdo de confidencialidad).

La severidad de la enfermedad causada por IBDV está directamente relacionada con el número de células sensibles presentes en la bolsa de Fabricio (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 Den Berg, 2000). En base a estos antecedentes, la capacidad de los vectores virales MVA-VP2 (solos o combinados con AdHu-VP2) de inducir inmunidad protectora frente al desafío con IBDV (cepa clásica, genogrupo 1) se evaluó en esta ventana temporal, en pollos SPF.

Los parámetros evaluados para determinar el grado de protección fueron:

- ☞ Las lesiones histopatológicas presentes en las BF: permite establecer el grado de afección o atrofia del tejido linfoide. Se utilizó el *score* descrito por Pérez y col. (Pérez

C., Alba Ch. and Icochea D., 2008). La descripción y fotografías se detallan en la sección **3.7.6.2** de Materiales y Métodos.

↪ 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.

En todos los casos se compararon los resultados del grupo de aves vacunadas con los vectores que expresan la proteína VP2 y el grupo inmunizado con los vectores que expresan una proteína no relacionada (GFP).

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

4.3.1 EVALUACIÓN DE LA PROTECCIÓN CONFERIDA POR LA VACUNACIÓN EN DOSIS ÚNICA DE MVA-VP2

En primer lugar, se evaluó la protección frente al desafío con IBDV inducida por una única inmunización conteniendo diferentes cantidades de MVA-VP2 aplicada por vía intramuscular (i.m.) según el esquema descrito en **Materiales y Métodos 3.7.3.1**.

Brevemente, los animales fueron inmunizados con una dosis de $5,2 \times 10^3$ UFP de MVA-VP2 (ensayo 1) o 8×10^5 UFP (ensayo 2) por vía i.m. en la pata, a los 11 días de edad. Todas las aves fueron desafiadas a los 27 días de edad con una cepa clásica (genogrupo 1) de IBDV administrada por vía oral según se describe en el ítem **3.7.5** de **Materiales y Métodos**. Previo al desafío, se tomaron muestras de sangre para evaluar por ELISA la presencia de anticuerpos específicos contra IBDV. Sin embargo, en ninguno de los animales vacunados con MVA-VP2 (baja o alta dosis) se detectaron anticuerpos anti-IBDV en las muestras de sangre obtenidas previo al desafío (**ver Anexo II**).

Con respecto al título del virus de desafío (IBDV) recuperado de las BF se observó que todas las aves inmunizadas con el vector viral de MVA-GFP, que expresa una proteína no relacionada (proteína fluorescente verde, GFP), presentaron altos títulos de IBDV

(mayores o iguales a 10^6 DICT₅₀/mL). Al comparar los valores del título de IBDV recuperado de las BF entre los grupos de los animales inmunizados con MVA-GFP o aquellos que recibieron una dosis de $5,2 \times 10^3$ UFP de MVA-VP2, no se observaron diferencias significativas. Sin embargo, en el grupo de aves inmunizadas con MVA-VP2 se distinguen claramente dos subgrupos (de 3 aves cada uno) donde los títulos de IBDV recuperado de las BF fueron de alrededor de 10^3 o mayores a 10^6 DICT₅₀/mL (**Figura 29**).

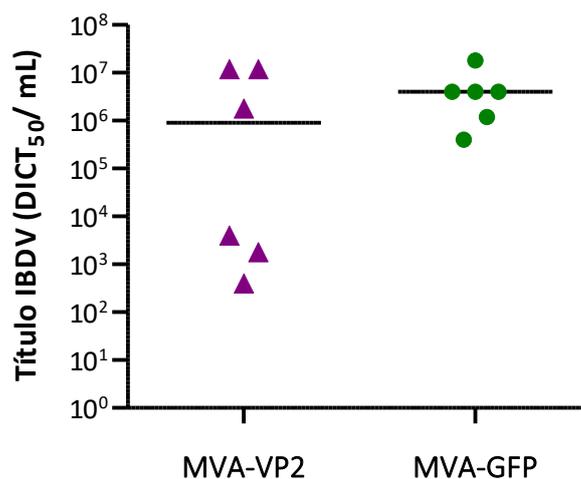


Figura 29 - Título viral de IBDV cuantificado en homogenatos de bolsa de Fabricio luego del desafío con IBDV. Grupos de 6 pollos SPF se inmunizaron por vía i.m. a los 11 días de edad con MVA-VP2 ($5,2 \times 10^3$ UFP) o MVA-GFP ($1,7 \times 10^5$ UFP). Todas las aves se desafiaron con una cepa clásica (genogrupo 1) 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 and Muench, 1938). Diferencias no significativas entre los grupos MVA-VP2 y MVA-GFP (Test Mann-Whitney, 2 colas).

Por otra parte, el análisis histopatológico de las BF reveló que los animales que recibieron el vector viral MVA-GFP presentaban lesiones moderadas a severas con un *score* promedio mayor a 3. En cambio, las aves vacunadas con MVA-VP2 presentaron un *score* promedio de 2. En el análisis individual, se observa que el 50% de las aves pertenecientes al grupo MVA-VP2 no presentaron lesiones y el resto de las aves de este grupo solo presentaron lesiones moderadas (*score* 3; **Tabla 9**).

Grupo	Lesiones histopatológicas (N° animales/score de 1 a 4)				Score promedio ± DS
	1	2	3	4	
MVA-GFP	0	1	3	2	3,17 ± 0,37
MVA-VP2	3	0	3	0	2,00 ± 0,55

Tabla 9 - Lesiones histopatológicas en bolsa de Fabricio luego del desafío con IBDV en pollos SPF inmunizados con una dosis de $5,2 \times 10^3$ UFP de MVA-VP2. Los números indican la cantidad de aves de cada grupo clasificadas con cierto *score* histopatológico, su valor promedio y la desviación estándar (DS) por grupo. Se utilizó el *score* descrito por (Pérez C., Alba Ch. and Icochea D., 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%). DS: desviación estándar. El análisis estadístico se realizó mediante el test de Mann-Whitney (2 colas). $p= 0,0843$ (diferencias no significativas).

En los animales vacunados con MVA-VP2 que presentaron títulos virales de IBDV del orden de 10^3 DICT₅₀/mL, no se observó daño histopatológico en las BF (*score* 1). En cambio, los animales inmunizados con MVA-GFP o MVA-VP2 que presentaron títulos virales de IBDV en BF del orden de 10^6 DICT₅₀/mL se observó infiltración inflamatoria, reducción linfoide y pérdida del revestimiento epitelial en un porcentaje superior al 31% de los folículos (*score* 3 y 4). Estos resultados indican que la aplicación de una única dosis de $5,2 \times 10^3$ UFP de MVA-VP2 no fue suficiente para proteger a las aves del desafío con IBDV ya que no se observaron diferencias significativas entre los grupos inmunizados con MVA-VP2 o MVA-GFP para los dos parámetros evaluados.

Entonces, se evaluó la protección frente al desafío con IBDV inducida por una dosis más alta (8×10^5 UFP) del vector viral MVA-VP2, en comparación con el virus MVA-GFP que expresa una proteína no relacionada. Además, se incluyeron grupos de aves control que recibieron PBS (por vía i.m.) o la vacuna comercial de IBDV LZD INMUNER (por vía ocular, según instrucciones del fabricante). Todas las aves vacunadas con LZD INMUNER estuvieron protegidas frente al desafío con IBDV porque en el 67% de los animales no se detectó la presencia de IBDV en BF (título viral ≤ 10 DICT₅₀/mL, límite de detección de la metodología utilizada) y en las aves restantes el título viral de IBDV recuperado de la BF fue del orden 10^2 - 10^3 DICT₅₀/mL. La mayoría (5 de 6) de estas aves no presentaron lesiones en la BF (*score* 1), excepto un animal que presentó daño severo (*score* 4). Por otro lado, en todos los animales inmunizados con PBS o con MVA-GFP se detectaron altos títulos de IBDV, con valores de aproximadamente 10^7 DICT₅₀/mL en los homogenatos de las BF y el daño histopatológico de la BF fue severo con un *score* promedio por grupo de

3,6 y 3,33 respectivamente (**Figura 30 - Tabla 10**). En contraste, se observó una disminución significativa ($p=0,0022$) en el título del virus de desafío recuperado de las BF del grupo de pollos vacunados con MVA-VP2 respecto del grupo de animales inmunizados con MVA-GFP (**Figura 30**). En particular, el título de IBDV en BF promedio en cuatro de los seis animales vacunados con MVA-VP2 fue de $7,5 \times 10^3$ DICT₅₀/mL, aproximadamente 1.500 veces menor del valor observado en el grupo de aves inmunizadas con MVA-GFP ($1,2 \times 10^7$ DICT₅₀/mL).

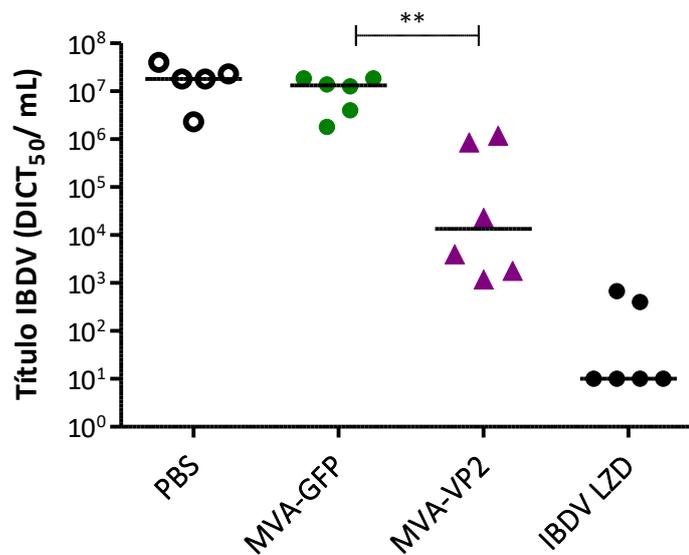


Figura 30 - Título viral de IBDV cuantificado en homogenatos de bolsa de Fabricio luego del desafío con IBDV. Grupos de 6 pollos SPF fueron inmunizados a los 11 días de edad con: MVA-VP2 (8×10^5 UFP, vía i.m.), MVA-GFP (8×10^5 , vía i.m.) o con la vacuna viva comercial de IBDV (LZD INMUNER, vía ocular según especificaciones del fabricante). Un grupo de 5 pollos fue inmunizado con PBS (500 μ L, vía i.m.). Todas las aves se desafiaron con una cepa clásica (genogrupo 1) 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 and Muench, 1938). El análisis estadístico se realizó mediante el test de Mann-Whitney (2 colas). ** $p=0,0022$.

Por otro lado, el *score* promedio de las lesiones histopatológicas en la BF de los pollos que recibieron MVA-VP2 fue de 2. El 50% de las aves no presentaron lesiones histopatológicas en la bolsa de Fabricio (*score* 1) y el otro 50% de las aves presentaron lesiones moderadas (*score* 3; **Tabla 10**).

En conjunto, estos resultados indican que la aplicación de una sola dosis de 8×10^5 UFP de MVA-VP2 (por vía i.m.) induce protección frente al desafío con IBDV porque fue suficiente para reducir significativamente tanto el título de IBDV presente en las BF como

el daño histopatológico en dicho órgano respecto de lo observado en el grupo de aves inoculadas con MVA-GFP.

Grupo	Lesiones histopatológicas (N° animales/score de 1 a 4)				Score promedio ± DS
	1	2	3	4	
PBS	0	0	2	3	3,60 ± 0,27
MVA-GFP	1	0	1	4	3,33 ± 0,60
MVA-VP2	3	0	3	0	2,00 ± 0,54
VACUNA LZD	5	0	0	1	1,50 ± 0,61

Tabla 10 - Lesiones histopatológicas en bolsa de Fabricio luego del desafío con IBDV en pollos SPF inmunizados con una dosis de 8×10^5 UFP de MVA-VP2. Los números indican la cantidad de aves clasificadas con cierto *score* histopatológico, su valor promedio y la desviación estándar (DS) por grupo. Se utilizó el *score* descrito por (Pérez C., Alba Ch. and Icochea D., 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%). El análisis estadístico se realizó mediante el test de Mann-Whitney (2 colas). * $p < 0,05$.

4.3.2 EVALUACIÓN DE LA PROTECCIÓN ANTE UN ESQUEMA DE VACUNACIÓN *PRIME-BOOST* HETERÓLOGO COMBINANDO LOS VECTORES VIRALES MVA-VP2 Y AdHu-VP2

Los resultados obtenidos mostraron que el vector viral MVA-VP2 induce protección frente al desafío por IBDV porque reduce significativamente el título de IBDV en BF, pero a un nivel tal que ocasiona daño histopatológico moderado en algunas de las aves vacunadas. Entonces, con el propósito de incrementar la protección conferida por una única dosis de MVA-VP2 se evaluó la eficiencia de un esquema de vacunación de dos dosis heterólogas combinando los vectores MVA-VP2 y AdHu-VP2. Con este esquema se espera inducir una respuesta inmune potente y evitar que la respuesta anti-vector bloquee el efecto de la dosis de refuerzo.

El diseño experimental fue descrito en la sección **3.7.3.2** de Materiales y Métodos. La primera inoculación o *prime* fue realizada al día de edad (salida de la incubadora) con AdHu-VP2 y la vacunación refuerzo o *boost* fue a los 11 días de edad. Todos los animales fueron desafiados con IBDV (cepa clásica, genogrupo 1) a los 27 días de edad. Previo al desafío, se tomaron muestras de sangre para evaluar por ELISA la presencia de anticuerpos específicos contra IBDV, pero en ninguno de los animales vacunados con los

vectores virales que expresan la proteína VP2 se detectaron anticuerpos anti-IBDV (ver **Anexo II**).

Se realizaron dos ensayos para evaluar la combinación de un *prime* conteniendo distintas cantidades del vector viral AdHu-VP2 ($6,65 \times 10^6$ UFP o $1,5 \times 10^9$ UFP) y la inmunización de refuerzo o *boost* con el virus MVA-VP2 a una dosis fija (8×10^5 UFP).

En la **Figura 31** y **Tabla 11** se muestran los resultados del primer ensayo. Los animales del grupo control fueron inmunizados con un esquema de dos dosis combinando los vectores virales AdHu-GFP y MVA-GFP que expresan una proteína no relacionada con el virus IBDV. Todas las aves de este grupo presentaron altos títulos de IBDV y lesiones histopatológicas severas en BF (*score* promedio de 3,83). Por otro lado, los animales que recibieron la vacuna comercial LZD INMUNER estuvieron protegidos frente al desafío con IBDV ya que en la mayoría de las aves (4 de 5) no se detectó IBDV en BF y ninguna ave presentó lesiones histopatológicas. La aplicación de una única dosis de AdHu-VP2 al día de edad no fue suficiente para proteger frente del desafío con IBDV, pero fue capaz de primar la respuesta inmune que, posteriormente, fue potenciada por la inmunización de refuerzo con el vector viral MVA-VP2. Cinco de las seis aves inmunizadas con AdHu-VP2 en dosis única presentaron altos títulos de IBDV (aproximadamente 10^7 DICT₅₀/mL) y lesiones histopatológicas moderadas a severas en BF (*score* promedio de 3).

Grupo	Lesiones histopatológicas (N° animales/ <i>score</i> de 1 a 4)				<i>Score</i> promedio \pm DS
	1	2	3	4	
AdHu-GFP/MVA-GFP	0	0	1	5	3,83 \pm 0,41
AdHu-VP2	1	0	3	2	3,00 \pm 0,55
AdHu-VP2 /MVA-VP2	5	0	1	0	1,33 \pm 0,44
VACUNA LZD	5	0	0	0	1,00 \pm 0,0

} ns
} * **

Tabla 11 - Lesiones histopatológicas en bolsa de Fabricio luego del desafío con IBDV en pollos SPF inmunizados con el esquema de *prime-boost* heterólogo con AdHu-VP2 (dosis de $6,65 \times 10^6$ UFP) y MVA-VP2. Los números indican la cantidad de aves clasificadas con cierto *score* histopatológico, su valor promedio y la desviación estándar (DS) por grupo. Se utilizó el *score* descrito por (Pérez C., Alba Ch. and Icochea D., 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%). El análisis estadístico se realizó mediante el test de Mann-Whitney (2 colas). **p* = 0,0289; ***p* = 0,0033; ns: diferencias no significativas.

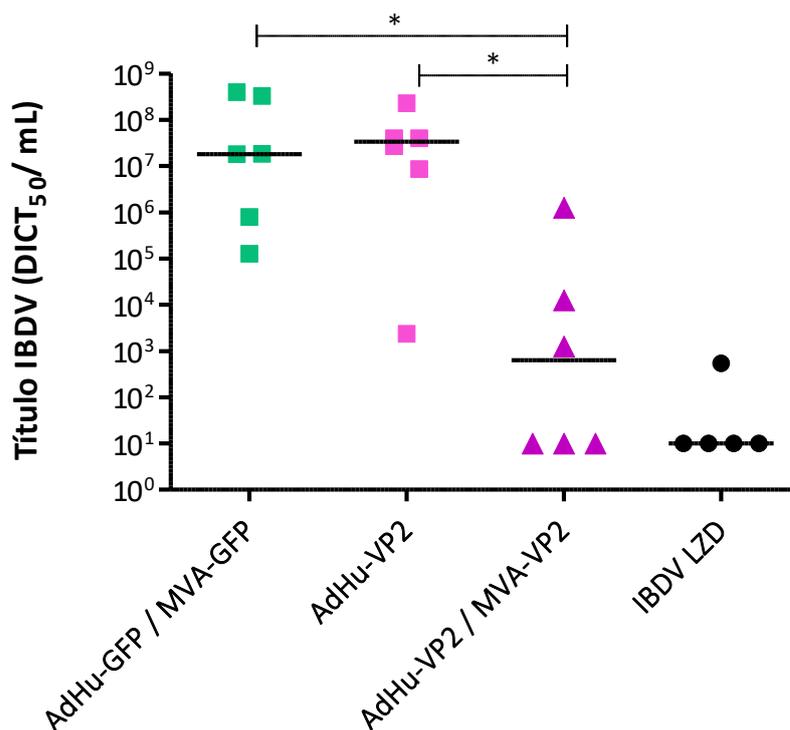


Figura 31 – Título viral de IBDV cuantificado en homogenatos de bolsa de Fabricio luego del desafío con IBDV. Grupos de 6 pollos SPF fueron inmunizados con AdHu-VP2 ($6,6 \times 10^6$ UFP, vía i.m. al día de edad) sólo o combinado con MVA-VP2 (8×10^5 UFP, vía i.m. a los 11 días de edad). Los grupos control (conteniendo 5 o 6 pollos) se inmunizaron con la vacuna viva comercial de IBDV (LZD INMUNER, a los 11 días de edad por vía ocular según especificaciones del fabricante) o con el esquema de dos dosis con AdHu-GFP ($1,75 \times 10^8$ UFP, vía i.m. al día de edad) y MVA-GFP (8×10^5 UFP, vía i.m. a los 11 días de edad). Todas las aves se desafiaron con una cepa clásica (genogrupo 1) 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 and Muench, 1938). El análisis estadístico se realizó mediante el test de Mann-Whitney (2 colas). * $p < 0,05$.

Sólo en un animal del grupo inmunizado con AdHu-VP2 no presentó lesiones histopatológicas en BF, lo cual se relaciona con el bajo título de IBDV cuantificado en los homogenatos de dicho órgano ($2,3 \times 10^3$ DICT₅₀/mL).

Como se observa en la **Figura 31** y **Tabla 11**, el esquema de dos dosis heterólogas AdHu-VP2/ MVA-VP2 protegió frente al desafío con IBDV ya que redujo significativamente tanto el título de IBDV en BF como el daño histopatológico en comparación con los grupos de animales inmunizados con AdHu-GFP/MVA-GFP o con una única dosis de AdHu-VP2 ($p < 0,05$). Es importante destacar que la mayoría (5 de 6) de las aves vacunadas con AdHu-VP2/MVA-VP2 no presentaron lesiones histopatológicas en la BF y que en el 50% de las aves de este grupo no se detectó la presencia del virus de desafío en dicho órgano. Dos

animales presentaron títulos de IBDV del orden de 10^3 - 10^4 DICT₅₀/mL, pero no tuvieron lesiones histopatológicas en BF. Solo un pollo de este grupo presentó lesiones histopatológicas moderadas (*score* 3) que se relacionó con la presencia de un título de aproximadamente 10^6 DICT₅₀/mL de IBDV en BF.

En base a los niveles de producción *in vitro* de los vectores virales AdHu-VP2 y MVA-VP2, se determinó que era posible aumentar casi 100 veces la dosis del vector adenoviral para primar la respuesta inmune con una cantidad similar (10^9 UFP) a la utilizada por (Boyd *et al.*, 2013). Entonces, con el objetivo de evaluar si era posible mejorar aún más los niveles de protección contra IBDV se realizó un ensayo donde la dosis aplicada al día de edad (*prime*) contenía $1,5 \times 10^9$ UFP de AdHu-VP2 y la dosis refuerzo (*boost*) con MVA-VP2 se mantuvo igual que en el ensayo anterior (8×10^5 UFP).

Las aves de los grupos control inmunizadas con placebo (PBS) o con una única dosis de AdHu-VP2 al día de edad no estuvieron protegidas frente al desafío con IBDV. La mayoría de los animales presentaron en la BF lesiones histopatológicas severas (*score* promedio de 4 o 3,33, respectivamente) y altos títulos del virus de desafío ($\geq 10^6$ DICT₅₀/mL) (**Figura 32 - Tabla 12**).

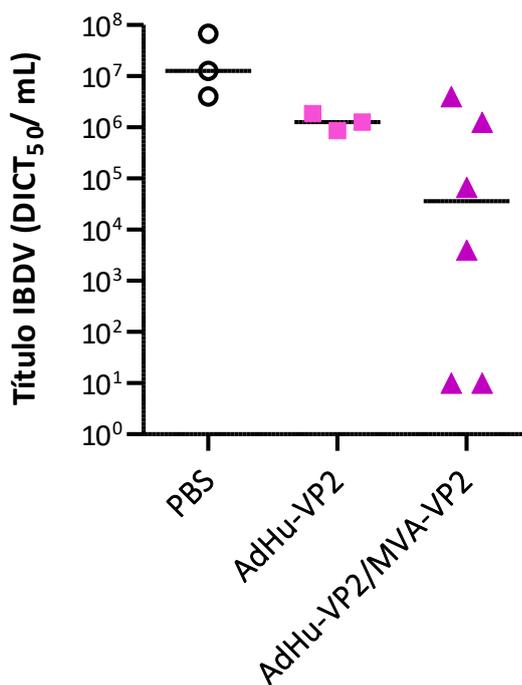


Figura 32 – Título viral de IBDV cuantificado en homogenatos de bolsa de Fabricio luego del desafío con IBDV. Un grupo de 6 pollos SPF fue inmunizado al día de edad con AdHu-VP2 ($1,5 \times 10^9$ UFP, vía i.m.) y a los 11 días con MVA-VP2 (8×10^5 UFP, vía i.m.). Los grupos control de 3 pollos cada uno se inmunizaron al día de edad con AdHu-VP2 ($1,5 \times 10^9$ UFP, vía i.m.) o PBS (500 μ L, vía intramuscular). Todas las aves se desafiaron con una cepa clásica (genogrupo 1) 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 and Muench, 1938). Diferencias no significativas entre los grupos AdHu-VP2 y AdHu-VP2/MVA-VP2 (Test Mann-Whitney, 2 colas).

Por otro lado, a diferencia de lo observado en el ensayo anterior, los resultados obtenidos mostraron que el aumento de 200 veces en la dosis del “*prime*” con AdHu-VP2 no mejoró los parámetros de protección contra IBDV al aplicar el esquema heterólogo a los días 1 y 11 de edad de las aves. Como se observa en la Figura 32, en un tercio de los animales (2 de 6) no se detectó IBDV en BF mientras que en los pollos restantes el título viral presente en BF después del desafío fue del orden 10^3 - 10^4 o de aproximadamente 10^6 DICT₅₀/mL. Estos datos se relacionaron con las lesiones histopatológicas observadas en BF en cada una de las aves: tres sin lesiones (*score* 1), una con lesión leve (*score* 2) y dos con lesiones severas (*score* 4) (Tabla 12).

Grupo	Lesiones histopatológicas (N° animales/score de 1 a 4)				Score promedio ± DS
	1	2	3	4	
PBS	0	0	0	3	4,00 ± 0,0
AdHu-VP2	0	1	0	2	3,33 ± 0,58
AdHu-VP2 /MVA-VP2	3	1	0	2	2,17 ± 0,74

ns

Tabla 12 - Lesiones histopatológicas en bolsa de Fabricio luego del desafío con IBDV en pollos SPF inmunizados con el esquema de *prime-boost* heterólogo con AdHu-5 (dosis de $1,5 \times 10^9$ UFP) y MVA-VP2. Los números indican la cantidad de aves clasificadas con cierto *score* histopatológico, su valor promedio y la desviación estándar (DS) por grupo. Se utilizó el *score* descrito por (Pérez C., Alba Ch. and Icochea D., 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%). El análisis estadístico se realizó mediante el test de Mann-Whitney (2 colas). $p= 0,2696$ (diferencias no significativas, ns).

En conjunto, los resultados obtenidos indican que el vector viral MVA-VP2 induce una respuesta inmune específica que protege contra IBDV cuando el desafío se realiza a los 27 días de edad, momento en que las aves presentan la mayor susceptibilidad a dicho patógeno (tercera a sexta semana de vida). Los parámetros de protección (definidos como cantidad de IBDV y lesiones histopatológicas en BF) mejoraron cuando se realizó un esquema de dos dosis heterólogas combinando los vectores AdHu-VP2 ($6,6 \times 10^6$ UFP) y MVA-VP2 (8×10^5 UFP). En las aves protegidas no se detectaron anticuerpos específicos anti-IBDV.

DISCUSIÓN

5 DISCUSIÓN

La avicultura ha crecido fenomenalmente desde los tiempos de la agricultura de traspatio hasta convertirse en un negocio rentable y de gran proliferación alrededor del mundo. Según los datos informados en el Boletín Avícola del Ministerio de Agricultura, durante 2019 la producción mundial de carne de pollo alcanzó 99 millones de toneladas con un incremento del 3,6 % respecto del año anterior. Estados Unidos, Brasil, China, Unión Europea, India, Rusia y México se ubicaron en los primeros lugares de producción y la Argentina ocupó el lugar N° 10, lo que demuestra su continuo crecimiento e importancia en este sector productivo.

El intensivo sistema de producción avícola ha llevado a la aparición de brotes de enfermedades frecuentes como la enfermedad infecciosa de la bolsa (IBD) que ocupa un lugar destacado en muchos países, incluida la Argentina. Desde su descubrimiento en Delaware (EE.UU.) hace casi 60 años, la enfermedad infecciosa de la bolsa representa una amenaza económica para la industria avícola en todo el mundo. Después de la enfermedad de Newcastle, IBD es la segunda y más importante enfermedad de las aves de corral (Aslam *et al.*, 2018). La infección subclínica temprana causada por IBD es la principal causa de pérdida económica debido a que produce una supresión severa y duradera del sistema inmune y las aves inmunocomprometidas están más susceptibles a otras infecciones y, además, no responden a la vacunación. Por ello, es esencial prevenir la infección a una edad temprana y así controlar el efecto inmunosupresor del IBDV (Müller, Islam and Raue, 2003).

En la industria se utilizan estrictas medidas de higiene, sin embargo, eliminar las partículas de IBDV resistentes y persistentes de la granja es una tarea difícil ya que el virus permanece infeccioso durante 122 días en el gallinero o hasta 52 días en alimento y agua, por lo tanto, se deben seguir rigurosamente las medidas sanitarias de rutina para la correcta desinfección que disminuya la carga viral y reduzca el riesgo de transmisión. También es importante la erradicación de vectores mecánicos como mosquitos, gusanos de la harina y pequeños roedores. Por otro lado, la limpieza inadecuada de las campanas expone a las aves a contraer la enfermedad a una edad temprana, cuando son muy

susceptibles (Etteradossi and Saif, 2013). Además de las medidas de higiene, IBD se controla por inmunización con vacunas convencionales (vivas atenuadas o inactivadas) o vacunas de nueva generación (a complejos inmunes y vectorizadas por virus). El desarrollo de vacunas de nueva generación está relacionado con el diseño racional de estrategias vacunales que contribuyan tanto a sobrepasar la inmunidad materna como a disminuir o eliminar los efectos no deseados de las vacunas vivas atenuadas (inmunosupresión). Si bien existen numerosas plataformas para el desarrollo de vacunas, este trabajo de Tesis se focaliza en las bondades de los vectores virales no replicativos *in vivo*. En este contexto, las plataformas para desarrollar vacunas de nueva generación basadas en vectores virales no replicativos *in vivo* serían las de elección porque combinan seguridad y eficacia: estimulan una respuesta inmune protectora, potente y duradera, en ausencia de replicación productiva en el organismo blanco de vacunación.

Un listado actualizado de todas las vacunas basadas en vectores virales autorizadas en distintas partes del mundo para uso comercial en aves de corral fue compilado en el trabajo de revisión realizado por (Romanutti, Keller and Zanetti, 2020). Brevemente, son 20 vacunas basadas en solo tres vectores virales (herpesvirus de pavo, virus fowlpox y canarypox) y contra al menos cinco patógenos diferentes (*Mycoplasma gallisepticum*, virus de la influenza aviar, de laringotraqueítis infecciosa y de las enfermedades de Newcastle y Gumboro).

Actualmente, en nuestro país se comercializan tres tipos de vacunas de nueva generación para la prevención de IBD: vectorizada por herpesvirus de pavo (VAXXITEK HVT+IBD de Boehringer Ingelheim y VECTORMUNE HVT-IBD de Ceva), vectorizada por virus canarypox (R-VAC INMUNER IBD de Laboratorios Inmuner S.A.) y de complejo antígeno-anticuerpo (CEVAC® TRANSMUNE IBD de Ceva, BDA BLEN® de Boehringer Ingelheim y MB-1 de Phibro Salud Animal). Todas estas vacunas se administran por vías de inmunización masiva (*in ovo* o al día de edad). En particular, las vacunas vectorizadas portan la secuencia codificante de la proteína VP2 de IBDV, componente mayoritario de la cápside viral que posee los determinantes antigénicos contra los cuales está dirigida la respuesta inmune del hospedador.

La vacuna R-VAC INMUNER IBD fue desarrollada por INTA (por nuestro grupo de investigación) y Laboratorios Inmuner S.A. (PyME nacional). Es la única vacuna recombinante aviar que se produce en el país, las demás son importadas por empresas multinacionales. En virtud que los establecimientos productivos sostienen esquemas de vacunación intensiva contra IBD, Laboratorios Inmuner proyecta un nicho de mercado de aproximadamente 10 millones de dosis anuales. Esta vacuna recombinante, basada en el vector de virus canarypox, se produce en cultivos primarios de fibroblastos de embrión de pollo y, por los títulos virales alcanzados *in vitro* y la dosis definida como protectora, su almacenamiento es en nitrógeno líquido y se transporta congelada hasta las granjas de producción avícola. La empresa Laboratorios Inmuner se encuentra en Concepción del Uruguay, Entre Ríos, cercana a los núcleos productivos avícolas (86% de los establecimientos se encuentran en Entre Ríos y Buenos Aires).

En el marco de la colaboración INTA-Laboratorios Inmuner, se abordan otras estrategias para el desarrollo de una vacuna contra IBD vectorizada, alternativa respecto de las actualmente disponibles en el mercado, cuya producción *in vitro* alcance títulos virales elevados compatibles con los procesos de liofilización para el almacenamiento y/o distribución de vacunas refrigeradas. Los virus MVA pueden ser producidos en cultivos celulares en suspensión, en procesos semi-continuos y continuos en bio-reactores, y se alcanzan títulos virales al menos 10 veces mayores que en cultivos estáticos (Tapia *et al.*, 2017). Teniendo en cuenta que los virus MVA requieren contacto célula-célula para una replicación eficaz, en estos sistemas de bio-reactores se usan soportes como *microcarriers* o medios químicamente definidos que inducen agregados celulares de tamaños apropiados. Entonces, esta ventaja en la producción se sumaría a las características reportadas para las vacunas basadas en vectores virales de MVA: inducen respuestas humorales y celulares contra el antígeno foráneo (eficiencia), generan inmunidad duradera, poseen elevada estabilidad (física y genética), pueden ser administradas por diferentes vías y son seguras (no infectan productivamente a mamíferos). Para su uso en avicultura, es importante destacar que las aves de producción no poseen inmunidad materna contra los virus MVA y que la respuesta inmune anti-FWPV (virus de la viruela aviar o fowlpox) no bloquearía al vector viral de MVA debido a la gran divergencia filogenética existente entre ambos virus (Gubser *et al.*, 2004).

El perfil de seguridad de los vectores de MVA en mamíferos está ampliamente demostrado porque se lo utilizó como vacuna en la última etapa de la campaña de erradicación de la viruela y por estudios *in vitro* en distintos tipos celulares, de biodistribución en ratones, en ensayos preclínicos y clínicos con diversos MVA recombinantes (M W Carroll and Moss, 1997; Drexler *et al.*, 1998; Gallego-Gómez *et al.*, 2003; Meyer and Paul-Ehrlich, 2013; Sánchez-Sampedro *et al.*, 2015; Volz and Sutter, 2017). En cambio, poco se sabe sobre la capacidad replicativa de MVA en pollos y un par de estudios demuestran su inocuidad al ser inyectado *in ovo* (Boyd *et al.*, 2013; Langenmayer *et al.*, 2018). En estos trabajos, los virus MVA recombinantes se inocularon en embriones de 18 u 11 días, respectivamente. En el primer estudio no se observaron efectos adversos en las aves nacidas y la vacunación indujo una respuesta inmune específica contra el antígeno foráneo. En el segundo caso, se determinó que el sitio principal de replicación de MVA fue la membrana corioalantoidea (característico de los miembros de la Familia *Poxviridae*), desde allí se diseminó a otros tejidos embrionarios, pero no se detectaron lesiones en los órganos ni mortalidad (incluso a dosis tan altas como 10^7 unidades infecciosas).

En este contexto se enmarca este Trabajo de Tesis, donde se realizaron las pruebas de concepto de la eficiencia del candidato vacunal MVA-VP2, sólo o combinado con el vector adenoviral AdHu-VP2, como una herramienta prometedora para la prevención de la infección por IBDV en pollos SPF. Además, se determinó la biodistribución de MVA en pollos luego de su inmunización por vía subcutánea (s.c) en la membrana del ala o intramuscular (i.m.) en el muslo.

Primeramente, se demostró que la inoculación de MVA por vía s.c. no induce la formación de lesiones nodulares características de las vacunas de FWPV (“toma” de la vacuna). Este resultado es similar a lo descrito para la vacuna R-VAC INMUNER IBD vectorizada por el virus canarypox (Zanetti *et al.*, 2016).

La reacción inflamatoria local se origina por una replicación controlada de FWPV en el sitio de inmunización, que desencadena una respuesta inmune celular específica, acompañada con una reacción inflamatoria local, que controla la infección del virus vacunal y genera memoria inmunológica (Giotis and Skinner, 2019). Estas lesiones

nodulares aumentan de tamaño (hasta un diámetro de 3-6 mm a los 7-8 días), luego se forma una costra que finalmente se desprende y los nódulos son reabsorbidos luego de 12-15 días post-inmunización (pi). En el manejo sanitario de las aves de corral, estos nódulos o pequeñas inflamaciones de los tejidos es la mejor evidencia de una vacunación exitosa contra la viruela aviar (FWPV). Es así, que, en parvadas grandes, 5-6 días después de la vacunación con FWPV debe examinarse alrededor del 10 % de las aves en busca de lesiones nodulares o "toma" de vacuna. La falta de la cantidad adecuada (90-100 %) de "tomas de vacuna" puede deberse a que la aplicación se realizó en aves con respuesta inmune pre-existente (vacunación anterior o exposición a cepas de campo), la baja potencia de la vacuna (por ejemplo, usada después de la fecha de vencimiento o mal conservada) o una aplicación inapropiada. Teniendo en cuenta el rol de la "toma de la vacuna" para la prevención de viruela aviar, disponer de una vacuna vectorizada por poxvirus, como el MVA, que no interfiera con este proceso es fundamental para el manejo integral de los pollos de producción.

En el momento que se inició este trabajo de Tesis, solo se había publicado un estudio de evaluación de la biodistribución en pollos de un vector poxviral basado en el virus raccoonpox (Hwa *et al.*, 2010). En dicho estudio, el virus recombinante que expresa luciferasa fue inmunizado por vía i.m. y la expresión del transgen fue registrada mediante imágenes de bioluminiscencia hasta el tercer día pi. Teniendo en cuenta que en INTA no se dispone del equipo para registrar imágenes fluorescentes *in vivo*, el diseño experimental usado en este trabajo de Tesis consistió en la inmunización de pollos de 11 días de edad con el vector de MVA por vía i.m. en la pata, tomando muestras de los distintos tejidos a diferentes tiempos pi. La detección del genoma de MVA se realizó mediante amplificación por PCR a partir de muestras de los tejidos recolectados, o luego de dos pasajes ciegos por cultivo celular (fibroblastos de embrión de pollo, FEP). Además, para identificar el sitio de inoculación, a la suspensión de MVA se le agregó tinta china. Como este diseño experimental implicó que a cada tiempo evaluado era necesario sacrificar a las aves, para respetar el principio de las "tres Rs" (Reducción, Refinamiento y Reemplazo), se realizaron dos ensayos con un solo animal por tiempo para acotar el momento post infección donde se detecta el genoma viral y, en base a esta información se realizó el ensayo de biodistribución de MVA en grupos de 5 aves por tiempo. Como el

vector basado en el virus raccoonpox (RCN) es detectado hasta los 3 dpi, en el primer ensayo los tiempos seleccionados correspondieron a los días 1; 3 y 6. Sin embargo, y a diferencia de lo descrito para RCN, no se detectó el genoma de MVA en los tejidos y tiempos analizados. Luego, se evaluó la biodistribución a tiempos más cortos (16 y 24 h) pi y el genoma viral se detectó mediante amplificación por PCR en muestras provenientes de dos pasajes ciegos por cultivo celular de los homogenatos de músculo inyectado colectados a las 16 y 24 h pi. De acuerdo a estos resultados, se realizó el experimento de biodistribución del vector de MVA en 5 aves por tiempo (16, 24 y 72 hpi). La presencia del genoma viral solo fue detectada en 3 de las 5 aves en las muestras provenientes del sitio de inoculación (músculo inyectado) colectadas a las 16 hpi. Estos resultados concuerdan con los observados para el vector de canarypox en pollos, ya que el genoma viral se detecta hasta las 24 hpi en el sitio de inoculación (Zanetti *et al.*, 2016).

En conjunto, los resultados obtenidos indican que MVA no infectaría productivamente a los pollos y que el genoma viral se detecta en el sitio de inoculación hasta las 24 hpi en algunas de las aves vacunadas. De esta manera, se confirmó que los virus MVA actúan como vectores no replicativos en pollos y las vacunas derivadas de ellos son seguras porque no se diseminan en el ave vacunada y, en consecuencia, se evitaría su dispersión hacia otras aves o hacia el agroecosistema. Este trabajo constituye el primer estudio donde se describe la biodistribución de MVA en pollos y aporta evidencia científica con respecto a su seguridad para el diseño racional de vacunas vectorizadas aviares.

CON LA EVALUACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN IN VIVO DEL VECTOR MVA EN POLLOS SE CUMPLIÓ EL PRIMER OBJETIVO ESPECÍFICO DE ESTE TRABAJO DE TESIS.

El segundo objetivo específico en este trabajo fue la obtención y caracterización del vector viral de adenovirus humano tipo 5 (AdHu-5) recombinante que porta la secuencia codificante de la proteína VP2 de IBDV. Los vectores AdHu-5/ Δ E (carecen del *locus* E1, esencial para la replicación viral), se usan para el desarrollo de vacunas en distintas especies porque combinan las características de seguridad (son bien tolerados y no

replican en el organismo vacunado) y eficacia (induce respuestas inmunes protectoras) (revisado en (Liniger, Zuniga and Naim, 2007). En este trabajo de Tesis, se utilizó el sistema comercial *ViraPower™ Adenoviral Expression System* (Thermo Fischer Scientific) que facilita el aislamiento de adenovirus recombinantes basados en el genoma de AdHu-5/ Δ E1- Δ E3. Este sistema consta de dos componentes: **i)** el vector de expresión pAd/CMV/V5/DEST™ y, **ii)** las células HEK 293A (que complementan en *trans* las proteínas E1 de AdHu-5). Entonces, el gen codificante de la proteína VP2 se clonó en el “vector de entrada” pCR®8/GW/TOPO y, luego, el gen de interés se insertó en el “vector destino” pAd/CMV/V5-DEST™ mediante recombinación homóloga *in vitro* entre las regiones *attL* y *attR*, flanqueantes a la secuencia de interés, que están presentes en los plásmidos de “entrada” y “destino”. La construcción genética final, denominada pAdHu-VP2, se transfectó en células HEK 293A y se obtuvieron los adenovirus recombinantes AdHu-Vp2, que fue caracterizado molecularmente por las técnicas de PCR y RT-PCR.

El sistema comercial de obtención de los AdHu-5/ Δ E1- Δ E3 resultó ser una herramienta de fácil uso y durante este trabajo de Tesis se implementó la metodología en nuestro laboratorio. Además, se utilizaron protocolos estandarizados con los que se obtienen altos títulos virales. Así, el proceso de purificación del stock viral de AdHu-VP2, por ultra centrifugación a través de colchón de sacarosa, rindió títulos virales del orden de $1 \times 10^{8-10}$ UFP/mL), similar a los esperados según el manual *ViraPower™ Adenoviral Expression System* y a los reportados en otros trabajos que usan protocolos similares (He *et al.*, 1998).

Es importante destacar que este sistema es una alternativa ventajosa para obtener un vector adenoviral recombinante para aves y mamíferos, y realizar las primeras pruebas de concepto en modelos animales. Sin embargo, durante tiempo de ejecución de este trabajo de Tesis, desde la Coordinación de Vinculación Tecnológica de INTA no fue posible conocer los términos que impone la empresa Thermo Fischer Scientific para el uso comercial de un putativo producto obtenido con esta tecnología.

UTILIZANDO UN SISTEMA COMERCIAL SE OBTUVO Y CARACTERIZÓ MOLECULARMENTE EL VIRUS RECOMBINANTE ADHU-VP2 Y SE CUMPLIÓ CON EL SEGUNDO OBJETIVO ESPECÍFICO DE ESTE TRABAJO DE TESIS.

Desde hace varios años, en el Instituto de Biotecnología-INTA se abordan distintas estrategias para el desarrollo de una vacuna recombinante para la prevención de IBD. Así, se obtuvieron diversos inmunógenos recombinantes a subunidades (como la proteína VP2 expresada en plantas) o basados en vectores poxvirales (CNPV, MVA y FWPV) o adenovirales (en este Trabajo) recombinantes que expresan la proteína VP2 (Zanetti *et al.*, 2012; Gómez *et al.*, 2013; Richetta *et al.*, 2017; Federico, 2018; Lucero *et al.*, 2019).

En particular, en este trabajo de Tesis se realizaron las pruebas de concepto para determinar la eficiencia del vector MVA-VP2. La protección frente al desafío con IBDV inducida por el vector viral MVA-VP2 solo o combinado con AdHu-VP2 se evaluó en pollos SPF. Brevemente, en el esquema de inmunización de dosis única, se utilizaron distintas cantidades del vector viral MVA-VP2 ($5,2 \times 10^3$ UFP o 8×10^5 UFP) que se aplicaron por vía i.m en aves de 11 días de edad. En el esquema de inmunización *prime-boost* heterólogo los pollos se vacunaron al día de edad por vía i.m. con AdHu-VP2 ($6,65 \times 10^6$ UFP o $1,5 \times 10^9$ UFP) y la inmunización de refuerzo con MVA-VP2 (8×10^5 UFP) se aplicó a los 11 días de edad. En todos los casos, las aves se desafiaron con una cepa clásica (genogrupo 1) de IBDV a los 27 días de edad, que corresponde al período de mayor susceptibilidad a la infección causada por IBDV (Van Den Berg, 2000).

Con respecto a los esquemas de inmunización utilizados en este trabajo, el diseño experimental estuvo basado tanto en trabajos descriptos por otros investigadores como en ensayos de nuestro grupo de investigación. En particular, para el caso de la inmunización de MVA-VP2 en dosis única, los resultados de este trabajo se compararon con los obtenidos con otros vectores poxvirales que expresan VP2 (CNPV y FWPV) desarrollados en nuestro laboratorio. Por otro lado, el esquema *prime-boost* heterólogo se eligió en base a lo reportado por (Boyd *et al.*, 2013). Estos autores demostraron que el mejor nivel de inmunogenicidad específico para las proteínas foráneas (NP-M1) derivadas

del virus de influenza aviar (AIV) se obtuvo con la combinación de los vectores virales recombinantes AdHu-5 (*prime*) y MVA (*boost*), que además protegió parcialmente contra el desafío con AIV. Es importante destacar que en dicho trabajo se compararon siete esquemas de vacunación distintos, con *prime-boost* homólogo y heterólogo donde se combinaron los vectores virales AdHu-5 y MVA que expresan las proteínas de AIV (NP+M1) o una proteína no relacionada (GFP).

En este trabajo de tesis se demostró que la vacunación de pollos con una única inmunización de MVA-VP2 indujo protección contra IBDV cuando se aplicó la denominada dosis alta (8×10^5 UFP). Cuando las aves se vacunaron con una única dosis baja ($5,2 \times 10^3$ UFP) la protección frente al desafío fue parcial, y se distinguieron claramente dos subgrupos (de 3 aves cada uno) donde los títulos de IBDV recuperado de las bolsas de Fabricio (BF) fueron de alrededor de 10^3 o mayores a 10^6 DICT₅₀/mL. Este último valor fue el determinado en los 6 pollos inmunizados con el virus MVA recombinante que expresa una proteína no relacionada (MVA-GFP). La disminución de tres órdenes en el título del virus de desafío recuperado de las BF de tres de las aves vacunadas con MVA-VP2 se asoció con la ausencia de lesiones histopatológicas en dicho órgano. En cambio, en el grupo de aves inmunizadas con una única dosis conteniendo 8×10^5 UFP de MVA-VP2 (dosis alta) se observó que luego del desafío con IBDV el daño histopatológico en BF fue leve (*score* promedio de 2) y el título de IBDV en BF disminuyó significativamente respecto del cuantificado en el grupo de aves inmunizadas con MVA-GFP. Brevemente, luego del desafío, el 50% de las aves vacunadas con MVA-VP2 no presentaron lesiones histopatológicas en BF y, en promedio, la disminución del título del virus de desafío recuperado de la BF fue de 1500 veces respecto del cuantificado para el grupo inmunizado con MVA-GFP. Las lesiones histopatológicas en las BF de los pollos de este último grupo correspondían al *score* promedio de 3,33 (de moderada atrofia a severa necrosis).

Cuando se comparan estos resultados con los descriptos para FW-VP2 (Federico, 2018) se observa que con el mismo esquema de inmunización (vacunación al día 11 y desafío al día 27 de edad), la aplicación de una única dosis conteniendo cantidades similares de dos vectores poxvirales diferentes (MVA y FWPV) que expresan *in vivo* el mismo antígeno (proteína VP2 de IBDV) induce diferentes niveles de protección contra el desafío. Los

resultados descriptos para FW-VP2 mostraron una reducción significativa del título de IBDV recuperado de BF, con valores de 50 a 100 veces menores que los observados en el grupo de aves inoculadas con FWPV no recombinante y, en consecuencia, el daño histopatológico en las BF fue de leve a moderado (con un *score* promedio de 2,67). Estos datos sugieren que la magnitud de la respuesta inmunitaria contra IBDV depende tanto de la expresión *in vivo* de la proteína VP2 como de otros factores, aquí no estudiados, relacionados al *background* genético del vector poxviral; con respecto a la protección inducida por R-VAC INMUNER IBD (vector de canarypox que expresa la proteína VP2, CNPV-VP2, obtenido en nuestro laboratorio), no es posible realizar una comparación directa ya que se utilizó otro esquema de inmunización. La eficiencia de esta vacuna se evaluó por su inmunización al día de edad, aplicada por vía subcutánea y desafío con diferentes cepas de IBDV a distintas edades de las aves (21; 35 o 50 días). Por otro lado, en este Trabajo de Tesis los vectores virales MVA-VP2 y CNPV-VP2 se compararon en cuanto a su capacidad replicativa *in vitro* (curva de crecimiento de múltiples pasos). Los dos vectores virales alcanzaron el mayor título viral entre las 40-50 h post-infección, pero la producción de MVA-VP2 fue de 80 o 132 veces mayor que la de CNPV-VP2 para las poblaciones virales infectivas intra o extracelulares, respectivamente. Estos datos son alentadores para el candidato vacunal MVA-VP2 porque una vacuna superadora respecto a las disponibles actualmente en el mercado, además de eficaz y segura, debería alcanzar títulos virales elevados compatibles con los procesos de liofilización para el almacenamiento y distribución de vacunas refrigeradas.

Como se mencionó anteriormente, el candidato vacunal MVA-VP2 indujo protección contra IBDV al ser aplicado en monodosis. Sin embargo, las aves inmunizadas presentaron un título de IBDV recuperado de BF de 40 a 1.000 veces mayor que el cuantificado en el grupo de aves que recibieron la vacuna viva atenuada de IBDV. Además, en este último grupo de animales las lesiones histopatológicas de la BF observadas después del desafío presentaron un *score* promedio de 1,5 (5 aves sin lesiones y 1 ave con lesiones severas).

Con el propósito de mejorar la eficiencia del candidato vacunal MVA-VP2, y disminuir aún más los parámetros que correlacionan con protección (título del virus de desafío y lesiones histopatológicas en BF), se evaluó el esquema de vacunación *prime-boost*

heterólogo que combina la inmunización secuencial de los vectores AdHu-VP2 al día de edad (*prime*) y MVA-VP2 a los 11 días de edad (*boost*), y el desafío con IBDV a los 27 días de edad.

Estos esquemas se utilizan frecuentemente en el diseño racional de vacunas para la prevención de enfermedades humanas con la intención de generar respuestas inmunes potentes (en términos de intensidad y durabilidad) y de gran avidez. Con respecto a su uso en aves, los esquemas *prime-boost* heterólogos combinan vectores virales (HVT, poxvirus o Ad) entre sí o con vacunas a subunidad, vacunas inactivadas, vivas atenuadas o génicas (Haygreen *et al.*, 2006; Steensels *et al.*, 2007; Rauw *et al.*, 2010; Boyd *et al.*, 2013; Richard-Mazet *et al.*, 2014; Richetta *et al.*, 2017; Dunn *et al.*, 2019).

En este trabajo se demostró que AdHu-VP2 (dosis de $6,65 \times 10^6$ UFP) no indujo protección contra IBDV, pero fue capaz de primar la respuesta inmune específica, la cual fue posteriormente potenciada por la aplicación de la vacunación de refuerzo con MVA-VP2. La mayoría (5 de 6) de las aves vacunadas con AdHu-VP2/MVA-VP2 no presentaron lesiones histopatológicas en la BF, un pollo presentó lesiones moderadas, lo cual determinó un *score* promedio de 1,33. Además, en el 50 % de las aves de este grupo no se detectó la presencia del virus de desafío en dicho órgano. En base a estos resultados y con el propósito de mejorar aún más los niveles de protección contra IBDV, se realizó un esquema de inmunización similar donde se aumentó 200 veces la dosis de AdHu-VP2 ($1,5 \times 10^9$ UFP) aplicada al día de edad (*prime*) y se mantuvo constante la dosis refuerzo (*boost*) con MVA-VP2 (8×10^5 UFP). Los resultados obtenidos mostraron que el aumento de la dosis del *prime* con AdHu-VP2 no mejoró los parámetros de protección contra IBDV. La dosis utilizada de AdHu-VP2 fue la más alta posible teniendo en cuenta las condiciones de producción y purificación viral, similar a la utilizada por (Boyd *et al.*, 2013) en pollos y a las reportadas por otros autores para su uso en mamíferos (revisado en (Lauer, Borrow and Blanchard, 2017)). Sin embargo, en el primer caso, los adenovirus recombinantes que expresan las proteínas NP+M1 de AIV no indujeron protección contra el desafío cuando se aplicaron en única dosis. En el segundo caso, en mamíferos se observó que la respuesta inmune inducida por los vectores adenovirales no sería suficiente para proteger frente al desafío cuando se aplica en única dosis y, que la efectividad de la vacunación de refuerzo

utilizando otro inmunógeno recombinante depende del momento de su aplicación, debido al tipo de respuesta de memoria inducida contra el transgen. Los vectores de adenovirus inducen una fuerte respuesta de memoria efectora de células T CD8 + y poco de células T CD8 + de memoria central (Rollier *et al.*, 2011). Este fenómeno, estaría en parte relacionado con el tiempo durante el cual se expresa el antígeno foráneo. Así, una dosis más alta del vector adenoviral en el “primado” de la respuesta afectaría el desarrollo de las células de memoria y obstaculizaría desfavorablemente el efecto de la dosis de refuerzo. Si bien el sistema inmunológico es muy diferente en aves y mamíferos, en el caso que en los pollos ocurriera un mecanismo similar al descrito por Rollier *et al.* (2011), las diferencias de protección contra IBDV observadas en los esquemas de inmunización *prime-boost* heterólogo podría ser explicada por los niveles de la respuesta efectora inducida por las distintas cantidades del vector AdHu-VP2 aplicado en el *prime*.

Por otro lado, en este trabajo de Tesis se demostró que el vector AdHu-VP2 aplicado en única dosis al día de edad no protegió contra el desafío con IBDV, aun cuando se utilizaron dosis altas ($1,5 \times 10^9$ UFP) dato que concuerda con lo observado por (Boyd *et al.*, 2013) para AIV, y en consecuencia se lo descartaría como candidato a vacuna vectorizada para la prevención de la enfermedad de Gumboro.

Es importante destacar que la protección inducida por el vector viral MVA-VP2, solo o combinado con AdHu-VP2, ocurre en ausencia de una respuesta inmune humoral específica contra IBDV. En ninguna de las aves protegidas se detectaron anticuerpos anti-IBDV. Este resultado concuerda con lo observado para los vectores virales basados en los virus canarypox (R-VAC INMUNER IBDV, Zanetti *et al.*, 2016) y fowlpox (Bayliss *et al.*, 1991; Shaw and Davison, 2000; Federico, 2018), por lo que otros mecanismos inmunes efectores, tales como inmunidad mediada por células, podrían estar involucrados en la protección inducida por vectores recombinantes basados en vectores poxvirales no replicativos *in vivo*.

En el trabajo realizado por Richetta *et al.* (2017), en colaboración con nuestro grupo de investigación, el vector MVA-VP2 se evaluó en un esquema de inmunización *prime-boost* heterólogo combinado con un inmunógeno recombinante basado en la proteína VP2 expresada en plantas (pVP2). En este caso, los pollos se inocularon a los días 14 y 28, y

fueron desafiados a los 49 días de edad. Los tres esquemas de inmunización evaluados (MVA-VP2/pVP2, pVP2/MVA-VP2 y pVP2/pVP2) protegieron frente al desafío con IBDV, evitando que el virus de desafío llegue a la BF (títulos virales IBDV menores a $1,26 \times 10^3$ DICT₅₀/mL, definido como límite de detección de la metodología) y las lesiones histopatológicas fueron leves (*score* promedio 1 – 1,5). En todos los casos se detectaron anticuerpos específicos anti IBDV antes del desafío con títulos SN de 256; 128 ó 2.048 para los grupos de aves vacunados con MVA-VP2/pVP2, pVP2/MVA-VP2 o pVP2/pVP2, respectivamente. Si evaluamos en conjunto los resultados de este Trabajo de Tesis, los previamente descritos por nuestro grupo (Zanetti *et al.*, 2012) y los observados por Richetta *et al.* (2017), el vector MVA-VP2 induciría principalmente una respuesta inmune celular a partir de la síntesis *de novo* de la proteína VP2, mientras que la respuesta humoral anti IBDV observada por estos últimos autores estaría inducida mayoritariamente por el inmunógeno proteico (pVP2). Otros integrantes de nuestro grupo, especialistas en inmunología aviar, realizarán investigaciones con el propósito de caracterizar los mecanismos inmunes involucrados en la protección inducida por los vectores MVA-VP2 y CNPV-VP2.

CON LOS RESULTADOS DESCRIPTOS SE CUMPLIÓ CON EL TERCER OBJETIVO ESPECÍFICO DE ESTE TRABAJO DE TESIS EL CUAL ERA EVALUAR LA EFICIENCIA DEL VECTOR VIRAL MVA-VP2, SOLO O COMBINADO CON ADHU-VP2, FRENTE EL DESAFÍO CON IBDV.

Los resultados obtenidos en este Trabajo de Tesis son alentadores y constituyen las primeras pruebas de concepto del candidato vacunal MVA-VP2. Se demostró que induce protección frente al desafío con IBDV (eficiencia), que no replica productivamente en pollos (seguridad) y que su producción *in vitro* alcanza títulos virales mayores que el vector basado en virus canarypox. Sin embargo, es necesario continuar con las investigaciones para determinar la eficiencia de MVA-VP2 aplicado en monodosis al día de edad (vía de inmunización masiva utilizada en la industria avícola), la protección que

induce frente a cepas de campo de IBDV, su capacidad de sobrepasar la inmunidad materna (MDA) contra IBDV y la ausencia de interferencia con la aplicación de otras vacunas aviares.

Es importante destacar que las vacunas vectorizadas como las basadas en MVA-VP2 serían las de elección para proteger contra la enfermedad de Gumboro cuando los pollos presentan mayor susceptibilidad a esta enfermedad, lo cual está directamente relacionado con el número de células susceptibles presentes en la BF (aves jóvenes y hasta las 6-8 semanas de edad). Teniendo en cuenta que estas vacunas vectorizadas no inducen una respuesta inmune humoral contra IBDV, para inmunizar a las gallinas reproductoras, previo a la postura deberán utilizarse otras vacunas, como las inactivadas formuladas con adyuvantes o inmunógenos a subunidad como los propuestos por Lucero *et al.* (2019), debido a que inducen altos niveles de anticuerpos específicos que se transmiten a la progenie.



CONCLUSIONES

6 CONCLUSIONES

- ☞ MVA-VP2 administrado por vía subcutánea en la membrana del ala no induce la formación de lesiones nodulares características de las vacunas de viruela aviar. Entonces, no interferiría con la observación de la “toma de la vacuna” luego de la inmunización con FWPV por punción alar.

- ☞ MVA-VP2 administrado por la vía intramuscular es detectado solamente en el sitio de inoculación hasta las 24 hpi.

- ☞ La vacunación con MVA-VP2, en única dosis de 8×10^5 UFP por vía i.m., indujo protección frente al desafío contra IBDV al reducir tanto el título del virus de desafío recuperado de la BF como los daños histopatológicos en dicho órgano.

- ☞ El vector viral AdHu-VP2 aplicado en única dosis al día de edad no indujo protección frente al desafío con IBDV.

- ☞ Los mejores parámetros de protección se observaron al aplicar el esquema de inmunización *prime-boost* heterólogo AdHu-VP2 (dosis de $6,65 \times 10^6$ UFP) / MVA-VP2 (8×10^5 UFP) porque no se observó daño histopatológico ni se detectó el virus de desafío en las BF en 83% y 50% de las aves vacunadas, respectivamente.

- ☞ La cantidad de vector viral AdHu-VP2 utilizado para “primar” la respuesta inmune específica contra la proteína VP2 fue determinante para observar el efecto de la vacunación de refuerzo con MVA-VP2 a los tiempos evaluados.

- ☞ La protección inducida por los vectores que expresan la proteína VP2 se relacionaría con la inducción de una respuesta inmunitaria de tipo celular porque no se detectaron anticuerpos anti-IBDV en las aves vacunadas.

Los resultados obtenidos alientan la potencialidad de MVA-VP2, solo o combinado con AdHu-VP2, como candidato para obtener una vacuna vectorizada alternativa respecto de las actualmente disponibles en el mercado para prevenir la enfermedad de Gumboro.

ANEXOS

7 ANEXOS

7.1 ANEXO I

7.1.1 COMPARACIÓN DE LA CAPACIDAD REPLICATIVA DE MVA-VP2 Y CNPV-VP2 *IN VITRO*

La vacuna comercial vectorizada por virus canarypox (CNPV), denominada R-VAC INMUNER IBD, expresa la proteína VP2 y protege contra el desafío con IBDV fue desarrollada en nuestro laboratorio y en colaboración con Laboratorios Inmuner S.A. Es una vacuna eficaz y segura. En este trabajo de Tesis y en el contexto de colaboración con la empresa, se realizaron las primeras pruebas de concepto para evaluar si MVA-VP2 podría ser una vacuna superadora respecto de las actualmente disponibles en el mercado.

Una vacuna superadora, además de ser segura y efectiva, deberá tener alguna ventaja a nivel de producción, como por ejemplo alcanzar títulos virales elevados compatibles con los procesos de liofilización para el almacenamiento y distribución de vacunas refrigeradas. En este contexto, para comparar la capacidad de los virus MVA-VP2 y CNPV-VP2 (R-VAC INMUNER IBD) de replicar en FEP se realizó una curva de crecimiento viral de múltiples pasos. Brevemente, monocapas de FEP crecidas en placas P60 se infectaron con 5×10^4 UFP de MVA-VP2 o CNPV-VP2 para obtener una multiplicidad de infección de 0,01. A distintos tiempos post infección (0; 17; 24; 28; 41 y 52 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.

Como se observa en la siguiente **Figura 33** los virus MVA-VP2 se obtuvieron títulos virales mayores que con CNPV-VP2. A nivel de virus maduro intracelular, el título de MVA-VP2 fue aproximadamente 80 veces mayor que el obtenido para CNPV-VP2. En cambio, esta diferencia fue aún mayor (132 veces) para la porción de virus extracelular.

Para ambos virus, el mayor título viral se obtuvo entre las 40 y 50 h post-infección. A estos tiempos, la cantidad de virus intra o extracelular de MVA-VP2 fue del mismo orden,

mientras que para CNPV-VP2 la fracción de virus intracelular fue 10 veces mayor que la extracelular.

Esta es la primera vez que, en nuestro laboratorio, se compara la capacidad replicativa de dos vectores poxvirales recombinantes que expresan el mismo antígeno foráneo. Para cada uno de ellos, se demostró previamente que su capacidad replicativa era similar a la del respectivo poxvirus no recombinante (Zanetti *et al.*, 2012, 2014).

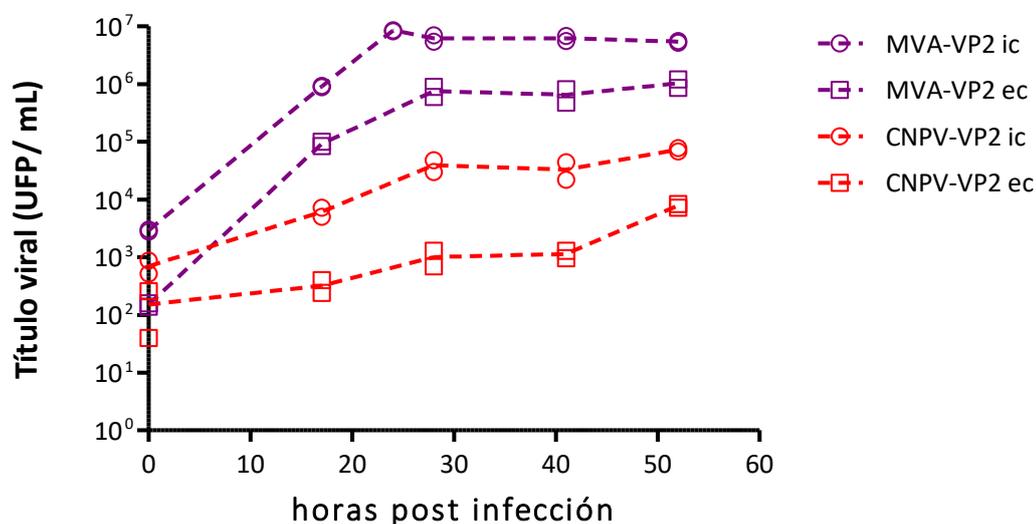


Figura 33 - Curvas de crecimiento de múltiples pasos de los virus MVA-VP2 y CNPV-VP2 en FEP. Análisis del crecimiento viral en cultivos de FEP infectados a baja multiplicidad de infección (0,01) con MVA-VP2 o CNPV-VP2. Cuantificación (UFP/mL) del virus intracelular (ic) y extracelular (ec) a diferentes tiempos post infección (0; 17; 24; 28; 41 y 52 hpi). Se muestran los resultados de dos experimentos independientes.

7.2 ANEXO II

7.2.1 DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS ANTI-IBDV POR ELISA

En todos los ensayos de evaluación de la protección inducida por los vectores virales que expresan la proteína VP2 se determinó la presencia de anticuerpos específicos contra IBDV previo al desafío con dicho patógeno. Brevemente, a los 25 días de edad (14 días después de la última inmunización) se tomaron muestras de sangre para estimar la

presencia de anticuerpos específicos anti-IBDV utilizando el kit comercial *Flock Check* IBD de Laboratorios IDEXX según se describe en la sección **3.7.4 de Materiales y Métodos**.

Como se observa en la **Figura 34**, la inducción de una respuesta humoral específica anti-IBDV sólo fue observada luego de la inmunización con la vacuna comercial LZD Inmuner. En cambio, no se detectaron anticuerpos específicos contra IBDV en las aves de los grupos control (inoculados con PBS o con los vectores virales que expresan una proteína no relacionada) ni en las aves de los grupos experimentales vacunados con los vectores virales que expresan la proteína VP2 de IBDV.

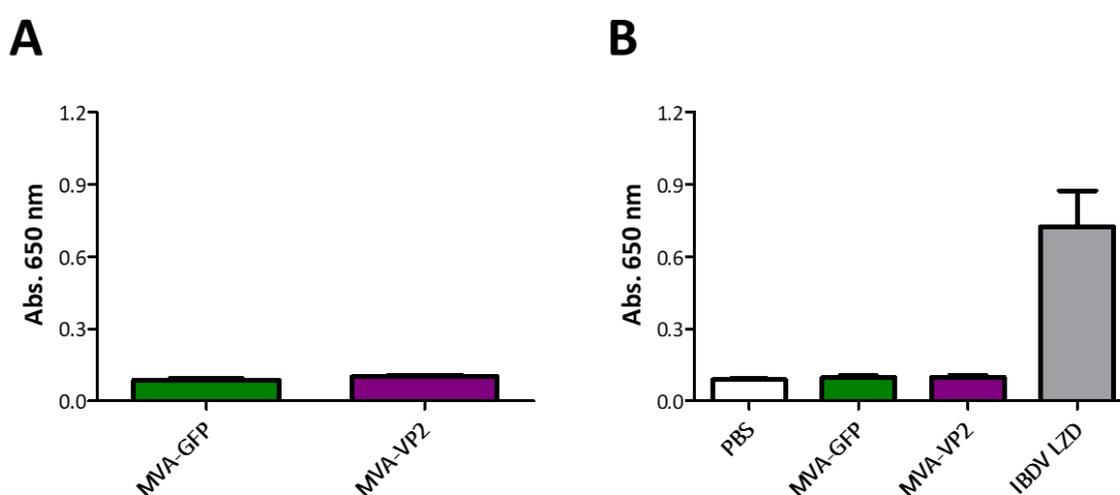


Figura 34 - Detección de anticuerpos específicos anti-IBDV. Se tomaron muestras de sangre a los 25 días de edad (dos días antes del desafío) y se determinó la presencia de anticuerpos anti-IBDV utilizando el kit comercial *Flock Check* IBD de Laboratorios IDEXX. **A)** Grupos de 6 pollos SPF se inmunizaron por vía i.m. a los 11 días de edad con MVA-VP2 ($5,2 \times 10^3$ UFP) o MVA-GFP ($1,7 \times 10^5$ UFP). **B)** Grupos de 6 pollos SPF fueron inmunizados a los 11 días de edad con: MVA-VP2 (8×10^5 UFP, vía i.m.), MVA-GFP (8×10^5 , vía i.m.) o con la vacuna viva comercial de IBDV (LZD INMUNER, vía ocular según especificaciones del fabricante). Un grupo de 5 pollos fue inmunizado con PBS (500 μ L, vía i.m.).

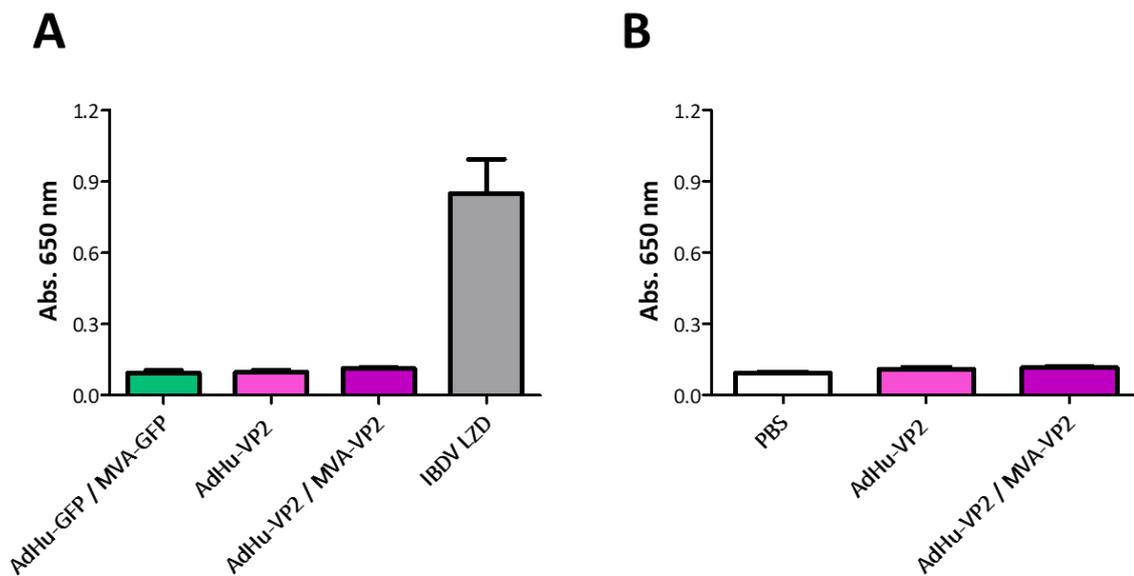
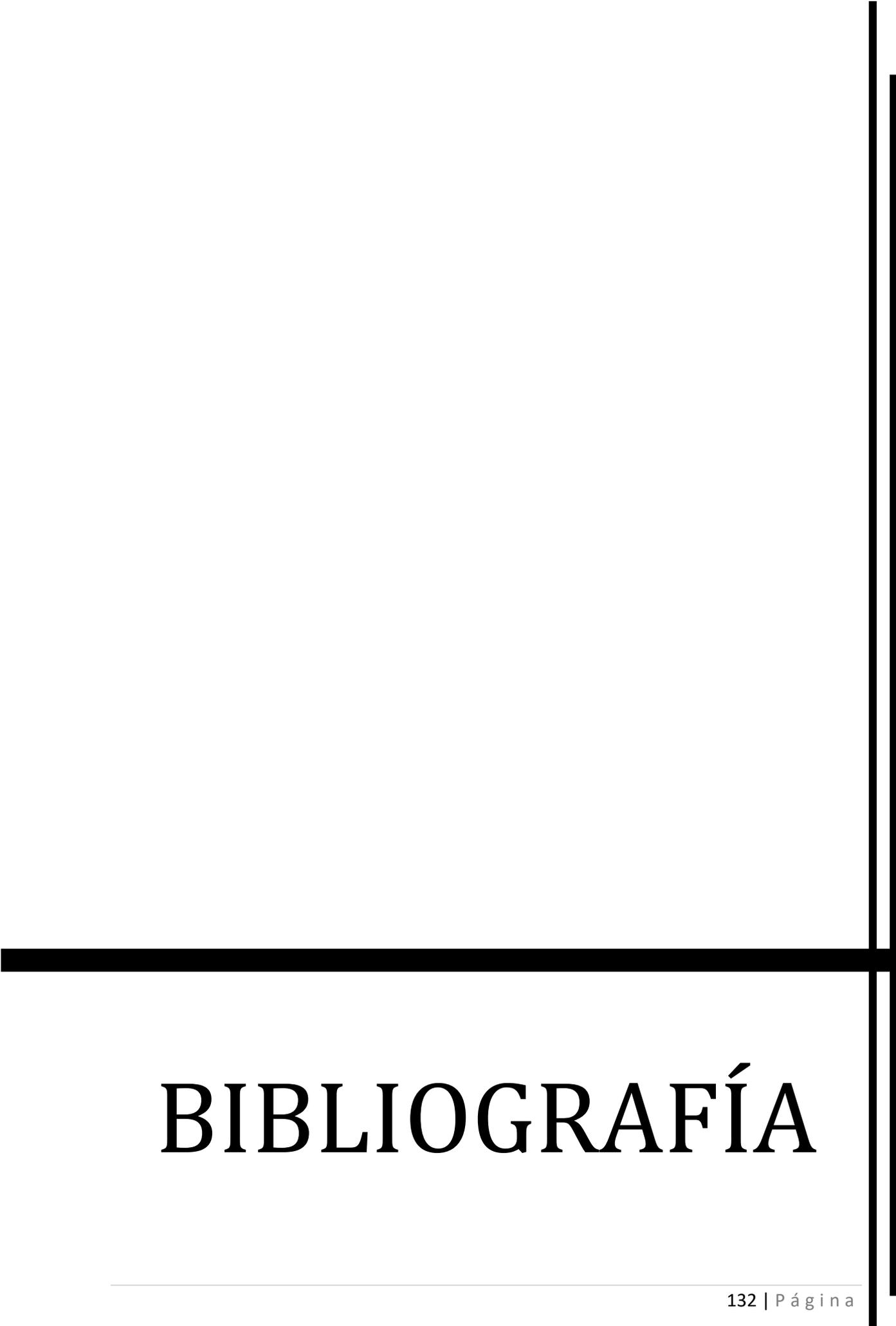


Figura 35 - Detección de anticuerpos específicos anti-IBDV. Se tomaron muestras de sangre a los 25 días de edad (dos días antes del desafío) y se determinó la presencia de anticuerpos anti-IBDV utilizando el kit comercial *Flock Check* IBD de Laboratorios IDEXX. **A)** Grupos de 6 pollos SPF fueron inmunizados con AdHu-VP2 ($6,6 \times 10^6$ UFP, vía i.m. al día de edad) sólo o combinado con MVA-VP2 (8×10^5 UFP, vía i.m. a los 11 días de edad). Los grupos control (conteniendo 5 o 6 pollos) se inmunizaron con la vacuna viva comercial de IBDV (LZD INMUNER, a los 11 días de edad por vía ocular según especificaciones del fabricante) o con el esquema de dos dosis con AdHu-GFP ($1,75 \times 10^8$ UFP, vía i.m. al día de edad) y MVA-GFP (8×10^5 UFP, vía i.m. a los 11 días de edad). **B)** Un grupo de 6 pollos SPF fue inmunizado al día de edad con AdHu-VP2 ($1,5 \times 10^9$ UFP, vía i.m.) y a los 11 días con MVA-VP2 (8×10^5 UFP, vía i.m.). Los grupos control de 3 pollos cada uno se inmunizaron al día de edad con AdHu-VP2 ($1,5 \times 10^9$ UFP, vía i.m.) o PBS (500 μ L, vía intramuscular).



BIBLIOGRAFÍA

8 BIBLIOGRAFÍA

Alkhatib, G. and Briedis, D. J. (1988) 'High-level eucaryotic in vivo expression of biologically active measles virus hemagglutinin by using an adenovirus type 5 helper-free vector system.', *Journal of Virology*, 62(8).

Anderson, C. W., Young, M. E. and Flint, S. J. (1989) 'Characterization of the adenovirus 2 virion protein, Mu', *Virology*, 172(2), pp. 506–512. doi: 10.1016/0042-6822(89)90193-1.

Antoine, G. *et al.* (1996) 'Characterization of the vaccinia MVA hemagglutinin gene locus and its evaluation as an insertion site for foreign genes', *Gene*, 177(1–2), pp. 43–46. doi: 10.1016/0378-1119(96)00267-3.

Antoine, G. *et al.* (1998) 'The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: Comparison with other orthopoxviruses', *Virology*, 244(2), pp. 365–396. doi: 10.1006/viro.1998.9123.

Aslam, R. *et al.* (2018) 'Occurrence of Important Viral and Bacterial Diseases in Poultry Flocks in District Khairpur Mir's, Sindh, Pakistan', *OALib*, 05(04), pp. 1–4. doi: 10.4236/oalib.1104488.

Bayliss, C. D. *et al.* (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), pp. 193–205. doi: 10.1007/BF01310475.

Van Den Berg, T. P. (2000) 'Acute infectious bursal disease in poultry: A review', *Avian Pathology*, 29(3), pp. 175–194. doi: 10.1080/03079450050045431.

Bergelson, J. M. *et al.* (1997) 'Isolation of a common receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5', *Science*, 275(5304), pp. 1320–1323. doi: 10.1126/science.275.5304.1320.

Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979) 'A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA', *Nucleic Acids Research*, 7(6), pp. 1513–1523.

Blanchard, T. J. *et al.* (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), pp. 1159–1167. doi: 10.1099/0022-1317-79-5-1159.

Böttcher, B. *et al.* (1997) 'Three-dimensional structure of infectious bursal disease virus determined by electron cryomicroscopy.', *Journal of Virology*, 71(1).

Boyd, A. C. *et al.* (2013) 'Towards a universal vaccine for avian influenza: Protective efficacy of modified Vaccinia virus Ankara and Adenovirus vaccines expressing conserved influenza antigens in chickens challenged with low pathogenic avian influenza virus', *Vaccine*, 31(4), pp. 670–675. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.11.047.

Brandt, M. *et al.* (2001) 'Molecular Determinants of Virulence, Cell Tropism, and Pathogenic Phenotype of Infectious Bursal Disease Virus', *Journal of Virology*, 75(24), pp. 11974–11982. doi: 10.1128/jvi.75.24.11974-11982.2001.

Butcher, G. D. and Miles, R. . (1994) *Como prevenir la enfermedad. Industria Avícola*. Edición La. Illinois, EUA.

Carballeda, J. M. *et al.* (2011) 'Activation of the immune response against Infectious Bursal Disease Virus after intramuscular inoculation of an intermediate strain', *Immunobiology*, 216(9), pp. 1028–1033. doi: 10.1016/j.imbio.2011.03.003.

Carroll, M W and Moss, B. (1997) '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), pp. 198–211. doi: 10.1006/viro.1997.8845.

Carroll, Miles W. and Moss, B. (1997) '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), pp. 198–211. doi: 10.1006/viro.1997.8845.

Castón, J. R. *et al.* (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), pp. 10815–10828. doi: 10.1128/jvi.75.22.10815-10828.2001.

- Charman, M., Herrmann, C. and Weitzman, M. D. (2019) 'Viral and cellular interactions during adenovirus DNA replication', *FEBS Letters*, 593(24), pp. 3531–3550. doi: 10.1002/1873-3468.13695.
- Dellaporta, S., Wood, J. and Hicks, J. (1983) 'A rapid method for DNA extraction from plant tissue.', *Plant molecular Biology*.
- Dey, S. *et al.* (2019) 'Infectious bursal disease virus in chickens: prevalence, impact, and management strategies', *Veterinary Medicine: Research and Reports*, Volume 10, pp. 85–97. doi: 10.2147/vmrr.s185159.
- Dion, L. D., Fang, J. and Garver, R. I. (1996a) 'Supernatant rescue assay vs. polymerase chain reaction for detection of wild type adenovirus-contaminating recombinant adenovirus stocks', *Journal of Virological Methods*, 56(1), pp. 99–107. doi: 10.1016/0166-0934(95)01973-1.
- Dion, L. D., Fang, J. and Garver, R. I. (1996b) 'Supernatant rescue assay vs. polymerase chain reaction for detection of wild type adenovirus-contaminating recombinant adenovirus stocks', *Journal of Virological Methods*, 56(1), pp. 99–107. doi: 10.1016/0166-0934(95)01973-1.
- Draper, S. J. and Heeney, J. L. (2010) 'Viruses as vaccine vectors for infectious diseases and cancer', *Nature Reviews Microbiology*, 8(1), pp. 62–73. doi: 10.1038/nrmicro2240.
- Drexler, I. *et al.* (1998) 'Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara replicates in baby hamster kidney cells, a potential host for virus propagation, but not in various human transformed and primary cells', *Journal of General Virology*, 79(2), pp. 347–352. doi: 10.1099/0022-1317-79-2-347.
- Dunn, J. R. *et al.* (2019) 'Evaluation of Protective Efficacy When Combining Turkey Herpesvirus-Vector Vaccines', *Avian diseases*, 63(1), pp. 75–83. doi: 10.1637/11979-092818-Reg.1.
- von Einem, U. I. *et al.* (2004) 'VP1 of infectious bursal disease virus is an RNA-dependent RNA polymerase', *Journal of General Virology*, 85(8), pp. 2221–2229. doi: 10.1099/vir.0.19772-0.

Etteradossi and Saif (2013) *Diseases of Poultry*. 13ra edici, *Pox. Diseases of Poultry*. 13ra edici. Edited by S. D.E. et al. USA.

Fahey, K. J., Erny, K. and 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), pp. 1473–1481. doi: 10.1099/0022-1317-70-6-1473.

Federico, C. R. (2018) *Los virus fowlpox como vectores virales para el desarrollo de vacunas de nueva generación*. UBA.

Fenner, F. (1996) 'Poxviruses. En: Fields Virology', in Fields, B. N., Knipe, D. M., and Howley, P. M. (eds) *Vol 2*. 3ed edn. New York, USA: Lippincott-Raven Press, pp. 2673–2702.

Folgori, A. and Capone, S. (2012) 'Engineered Viruses as Vaccine Platforms', in Baschieri and Selene (eds) *Innovation in Vaccinology - from design, through to delivery and testing*. Springer, pp. 65–86.

Fougeroux, C. and Holst, P. J. (2017) 'Future Prospects for the Development of Cost-Effective Adenovirus Vaccines', *International journal of molecular sciences*. Int J Mol Sci. doi: 10.3390/ijms18030686.

Gallego-Gómez, J. C. *et al.* (2003) 'Differences in Virus-Induced Cell Morphology and in Virus Maturation between MVA and Other Strains (WR, Ankara, and NYCBH) of Vaccinia Virus in Infected Human Cells', *Journal of Virology*, 77(19), pp. 10606–10622. doi: 10.1128/jvi.77.19.10606-10622.2003.

Gardin Y. *et al.* (2014) 'Gumboro Disease Special: The rational use of vaccines and vaccinations for real control of Gumboro disease, supplement of World Poultry'. Holanda-Francia: Reed Business International Agri Media.

Gilbert, S. C. (2013) 'Clinical development of Modified Vaccinia virus Ankara vaccines', *Vaccine*, 31(39), pp. 4241–4246. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.03.020.

van Ginkel, F. W. *et al.* (2009) 'Induction of mucosal immunity in the avian Harderian gland with a replication-deficient Ad5 vector expressing avian influenza H5 hemagglutinin', *Developmental and Comparative Immunology*, 33(1), pp. 28–34. doi:

10.1016/j.dci.2008.07.018.

Giotis, E. S. and Skinner, M. A. (2019) 'Spotlight on avian pathology: fowlpox virus', *Avian Pathology*, 48(2), pp. 87–90. doi: 10.1080/03079457.2018.1554893.

Glick, B. (1956) 'Normal Growth of the Bursa of Fabricius in Chickens', *Poultry Science*, 35(4), pp. 843–851. doi: 10.3382/ps.0350843.

Glick, B., Chang, T. S. and Jaap, R. G. (1956) 'The Bursa of Fabricius and Antibody Production', *Poultry Science*, 35(1), pp. 224–225. doi: 10.3382/ps.0350224.

Goldsmith, K. T. *et al.* (1994) 'Trans Complementation of an EIA-Deleted with Codelivered E I A S e q u e n c e s to M a k e Adenovirus Recombinant A d e n o v i r a l P r o d u c e r Cells', 1348(November), pp. 1341–1348.

Gómez, C. E. *et al.* (2007) 'Virus distribution of the attenuated MVA and NYVAC poxvirus strains in mice', *Journal of General Virology*, 88(9), pp. 2473–2478. doi: 10.1099/vir.0.83018-0.

Gómez, E. *et al.* (2013) 'Transient expression of VP2 in *Nicotiana benthamiana* and its use as a plant-based vaccine against Infectious Bursal Disease Virus', *Vaccine*, 31(23), pp. 2623–2627. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.03.064.

Gordon, R. F. and Jordan, F. T. . (1985) *Bursitis Infeciosa. Enfermedades de las Aves*. Traducido. Mexico: El Manual Moderno.

Gubser, C. *et al.* (2004) 'Poxvirus genomes: A phylogenetic analysis', *Journal of General Virology*, 85(1), pp. 105–117. doi: 10.1099/vir.0.19565-0.

Hanahan, D., Jessee, J. and Bloom, F. R. (1985) 'Techniques for transformation of *E. Coli*', in Glover, D. M. and Hames, B. . (eds) *DNA Cloning: a practical approach*. Oxford: University Press, Oxford, pp. 1–35.

Haygreen, E. A. *et al.* (2006) 'In ovo DNA immunisation followed by a recombinant fowlpox boost is fully protective to challenge with virulent IBDV', *Vaccine*, 24(23), pp. 4951–4961. doi: 10.1016/j.vaccine.2006.03.060.

He, T. C. *et al.* (1998) 'A simplified system for generating recombinant adenoviruses', in

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. National Academy of Sciences, pp. 2509–2514. doi: 10.1073/pnas.95.5.2509.

Hernández, M. *et al.* (2015) 'Genetic characterization of South American infectious bursal disease virus reveals the existence of a distinct worldwide-spread genetic lineage', *Avian Pathology*, 44(3), pp. 212–221. doi: 10.1080/03079457.2015.1025696.

Hoerr, F. J. (2010) 'Clinical aspects of immunosuppression in poultry.', *Avian diseases*. Avian Dis, pp. 2–15. doi: 10.1637/8909-043009-Review.1.

Holgado, M. P. *et al.* (2016) 'Deletion of A44L, A46R and C12L vaccinia virus genes from the MVA genome improved the vector immunogenicity by modifying the innate immune response generating enhanced and optimized specific T-cell responses', *Viruses*, 8(5). doi: 10.3390/v8050139.

Hwa, S.-H. *et al.* (2010) 'Characterization of Recombinant Raccoonpox Vaccine Vectors in Chickens', *Avian Diseases Digest*, 5(4), pp. e5–e6. doi: 10.1637/9528-931510-digest.1.

Ingrao, F. *et al.* (2013) 'Infectious Bursal Disease: A complex host-pathogen interaction', *Developmental and Comparative Immunology*, 41(3), pp. 429–438. doi: 10.1016/j.dci.2013.03.017.

Irigoyen, N. *et al.* (2009) 'Autoproteolytic activity derived from the infectious bursal disease virus capsid protein', *Journal of Biological Chemistry*, 284(12), pp. 8064–8072. doi: 10.1074/jbc.M808942200.

Jaffredo, T., Fellah, J. S. and Dunon, D. (2006) 'Immunology of Birds and Reptiles', *Encyclopedia of Life Sciences*, pp. 1–11. doi: 10.1038/npg.els.0000521.

Jeurissen, S. H. M. *et al.* (1998) 'The working mechanism of an immune complex vaccine that protects chickens against infectious bursal disease', *Immunology*, 95(3), pp. 494–500. doi: 10.1046/j.1365-2567.1998.00617.x.

Johnston, P. A. *et al.* (1997) 'Applications in In Ovo Technology', *Poultry Science*, 76(1), pp. 165–178. doi: 10.1093/ps/76.1.165.

Kingstad-Bakke, B. A. *et al.* (2019) 'Effective mosaic-based nanovaccines against avian influenza in poultry', *Vaccine*, 37(35), pp. 5051–5058. doi: 10.1016/j.vaccine.2019.06.077.

Kowalczyk, K. *et al.* (1985) 'Quantitation of maternal-fetal IgG transport in the chicken', *Immunology*, 54(4), pp. 755–762. Available at: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3980047/?from_single_result=Quantitation+of+mater+nal-fetal+IgG+transport+in+the+chicken.+Immunology (Accessed: 3 June 2020).

Kumar, K., Singh, K. C. P. and 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), pp. 357–360. doi: 10.1023/A:1005225501513.

Langenmayer, M. C. *et al.* (2018) 'Tracking Modified Vaccinia Virus Ankara in the Chicken Embryo: In Vivo Tropism and Pathogenesis of Egg Infections', *Viruses*, 10(9), p. 452. doi: 10.3390/v10090452.

Lasaro, M. O. and Ertl, H. C. J. (2009) 'New insights on adenovirus as vaccine vectors', *Molecular Therapy*. Nature Publishing Group, pp. 1333–1339. doi: 10.1038/mt.2009.130.

Lauer, K. B., Borrow, R. and Blanchard, T. J. (2017) 'Multivalent and multipathogen viral vector vaccines', *Clinical and Vaccine Immunology*. Edited by C. J. Papasian. American Society for Microbiology. doi: 10.1128/CVI.00298-16.

Lawzewitsh, I. (1984) *Lecciones de Histopatología Veterinaria, Vol. 3*. Tercera Ed. Buenos Aires, Argentina: Hemisferio Sur S.A.

Lejal, N. *et al.* (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), pp. 983–992. doi: 10.1099/0022-1317-81-4-983.

Liniger, M., Zuniga, A. and Naim, H. Y. (2007) 'Use of viral vectors for the development of vaccines', *Expert Review of Vaccines*, 6(2), pp. 255–266. doi: 10.1586/14760584.6.2.255.

Liu, Q. *et al.* (2017) 'Biodistribution and residence time of adenovector serotype 5 in normal and immunodeficient mice and rats detected with bioluminescent imaging', *Scientific Reports*, 7(1), pp. 1–9. doi: 10.1038/s41598-017-03852-0.

Lochmüller, H. *et al.* (1994) 'Emergence of Early Region 1-Containing Replication-Competent Adenovirus in Stocks of Replication-Defective Adenovirus Recombinants ($\Delta E1 + \Delta E3$) During Multiple Passages in 293 Cells', *Human Gene Therapy*, 5(12), pp. 1485–1491.

doi: 10.1089/hum.1994.5.12-1485.

Lu, S. (2009) 'Heterologous prime-boost vaccination', *Current Opinion in Immunology*. Elsevier Current Trends, pp. 346–351. doi: 10.1016/j.coi.2009.05.016.

Lucero, M. S. *et al.* (2019) 'Plant-based vaccine candidate against Infectious bursal disease: An alternative to inactivated vaccines for breeder hens', *Vaccine*, 37(36), pp. 5203–5210. doi: 10.1016/j.vaccine.2019.07.069.

Majhen, D. *et al.* (2014) 'Adenovirus-based vaccines for fighting infectious diseases and cancer: Progress in the field', *Human Gene Therapy*. Mary Ann Liebert Inc., pp. 301–317. doi: 10.1089/hum.2013.235.

Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1982) 'Molecular cloning: a laboratory manual', *Cold Spring Harbor Laboratory*. Available at: <https://ci.nii.ac.jp/naid/10012152714/> (Accessed: 24 July 2020).

Manual OIE (2012) 'Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals', *World Organisation for Animal Health*, (May), pp. 1185–1191. doi: 10.1007/s13398-014-0173-7.2.

Matthews, D. A. and Russell, W. C. (1995) 'Adenovirus protein-protein interactions: Molecular parameters governing the binding of protein VI to hexon and the activation of the adenovirus 23K protease', *Journal of General Virology*, 76(8), pp. 1959–1969. doi: 10.1099/0022-1317-76-8-1959.

Matz, K. M., Marzi, A. and Feldmann, H. (2019) 'Ebola vaccine trials: progress in vaccine safety and immunogenicity', *Expert Review of Vaccines*, 18(12), pp. 1229–1242. doi: 10.1080/14760584.2019.1698952.

Mazariegos, L. A., Lukert, P. D. and Brown, J. (1990) 'Pathogenicity and Immunosuppressive Properties of Infectious Bursal Disease "Intermediate" Strains', *Avian Diseases*, 34(1), p. 203. doi: 10.2307/1591353.

McFerran, J. B. *et al.* (1980) 'Isolation and serological studies with infectious bursal disease viruses from fowl, turkeys and ducks: Demonstration of a second serotype', *Avian Pathology*, 9(3), pp. 395–404. doi: 10.1080/03079458008418423.

Mesonero, A. *et al.* (2011) 'Avian Influenza In Ovo Vaccination with Replication Defective Recombinant Adenovirus in Chickens: Vaccine Potency, Antibody Persistence, and Maternal Antibody Transfer', *Avian Diseases*, 55(2), pp. 285–292. doi: 10.1637/9600-112210-reg.1.

Meyer, H. and Paul-Ehrlich (2013) 'Summary report on first, second and third generation smallpox vaccines', *World Health Organization: Geneva, Switzerland.*, (August), p. 33.

Michel, L. O., Daral, · and Jackwood, J. (2017) 'Classification of infectious bursal disease virus into genogroups', 162, pp. 3661–3670. doi: 10.1007/s00705-017-3500-4.

Müller, H. *et al.* (2012) 'Current status of vaccines against infectious bursal disease', *Avian Pathology*, 41(2), pp. 133–139. doi: 10.1080/03079457.2012.661403.

Müller, H., Islam, M. R. and Raue, R. (2003) 'Research on infectious bursal disease - The past, the present and the future', *Veterinary Microbiology*, 97(1–2), pp. 153–165. doi: 10.1016/j.vetmic.2003.08.005.

Müller, H., Scholtissek, C. and Becht, H. (1979) 'The genome of infectious bursal disease virus consists of two segments of double-stranded RNA.', *Journal of Virology*, 31(3).

Mundt, E., Beyer, J. and Muller, H. (1995) 'Identification of a novel viral protein in infectious bursal disease virus-infected cells', *Journal of General Virology*, 76(2), pp. 437–443. doi: 10.1099/0022-1317-76-2-437.

Nájera García, J. L. (2007) *Caracterización "in vitro" e "in vivo" de los vectores atenuados de poxvirus MVA y NYVAC como candidatos vacunales frente al VIH/SIDA*. Universidad Autónoma de Madrid.

Novella, R. *et al.* (2018) 'R-VAC INMUNER IBD: the first recombinant canarypox vector-based vaccine developed in Argentina against Gumboro's disease', in. Reino Unido: 15th Meeting of the Avian Immunology Research Group.

OIE (2018) 'Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres', in. Paris, Francia, pp. 580–588. Available at: www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.03.10_Viruela_aviar.pdf.

Okeke, M. I., Nilssen, Ø. and Traavik, T. (2006) 'Modified vaccinia virus Ankara multiplies

in the rat IEC-6 cells and limited production of mature virions occurs in other mammalian cell lines', *Journal of General Virology*, 87(1), pp. 21–27. doi: 10.1099/vir.0.81479-0.

Okoli, A. *et al.* (2018) 'CRISPR/Cas9—Advancing orthopoxvirus genome editing for vaccine and vector development', *Viruses*, 10(1), pp. 1–27. doi: 10.3390/v10010050.

Payne, S. (2017) 'Family Birnaviridae', in *Viruses*. Elsevier, pp. 227–229. doi: 10.1016/b978-0-12-803109-4.00027-1.

Pérez C., C., Alba Ch., M. and Icochea D., E. (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), pp. 54–61. doi: 10.15381/rivep.v19i1.1197.

Pied, N. and Wodrich, H. (2019) 'Imaging the adenovirus infection cycle', *FEBS Letters*, 593(24), pp. 3419–3448. doi: 10.1002/1873-3468.13690@10.1002/(ISSN)1873-3468.REVIEWS.

Prandini, F. *et al.* (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), pp. 114–125. doi: 10.1080/03079457.2015.1127891.

Ramshaw, I. A. and Ramsay, A. J. (2000) 'The prime-boost strategy: Exciting prospects for improved vaccination', *Immunology Today*. Elsevier Ltd, pp. 163–165. doi: 10.1016/S0167-5699(00)01612-1.

Rautenschlein, S. *et al.* (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), pp. 231–237. doi: 10.1637/7310-112204r.

Rauw, F. *et al.* (2010) 'Improved vaccination against Newcastle disease by an in ovo recombinant HVT-ND combined with an adjuvanted live vaccine at day-old', *Vaccine*, 28(3), pp. 823–833. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.10.049.

Reed, L. J. and Muench, H. (1938) 'A simple method of estimating fifty per cent endpoints', *American Journal of Epidemiology*, 27(3), pp. 493–497. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a118408.

- Rekosh, D. M. K. *et al.* (1977) 'Identification of a protein linked to the ends of adenovirus DNA', *Cell*, 11(2), pp. 283–295. doi: 10.1016/0092-8674(77)90045-9.
- Richard-Mazet, A. *et al.* (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). doi: 10.1186/s13567-014-0107-6.
- Richetta, M. *et al.* (2017) 'Comparison of homologous and heterologous prime-boost immunizations combining MVA-vectored and plant-derived VP2 as a strategy against IBDV', *Vaccine*, 35(1), pp. 142–148. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.11.029.
- Roellig, D. M. *et al.* (2013) 'Hemi-nested PCR and RFLP methodologies for identifying blood meals of the Chagas disease vector, *Triatoma infestans*.', *PloS one*, 8(9). doi: 10.1371/journal.pone.0074713.
- Rollier, C. S. *et al.* (2011) 'Viral vectors as vaccine platforms: Deployment in sight', *Current Opinion in Immunology*, 23(3), pp. 377–382. doi: 10.1016/j.coi.2011.03.006.
- Romanutti, C., Keller, L. and Zanetti, F. A. (2020) 'Current status of virus-vectored vaccines against pathogens that affect poultry', *Vaccine*. Elsevier Ltd, pp. 6990–7001. doi: 10.1016/j.vaccine.2020.09.013.
- Russell, W. C. (2000) 'Update on adenovirus and its vectors', *Journal of General Virology*, 81(11), pp. 2573–2604. doi: 10.1099/0022-1317-81-11-2573.
- Salahuddin, P. (2011) 'Gene Therapy Applications', in Kang, C. (ed.) *Gene Therapy Applications*. IntechOpen, pp. 1999–2443. doi: 10.5772/1013.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) 'Molecular cloning: a laboratory manual.', *Molecular cloning: a laboratory manual.*, (Ed. 2).
- Sánchez-Sampedro, L. *et al.* (2015) 'The evolution of poxvirus vaccines', *Viruses*, 7(4), pp. 1726–1803. doi: 10.3390/v7041726.
- Scheiflinger, F., Falkner, F. G. and Dorner, F. (1996) *Evaluation of the thymidine kinase (tk) locus as an insertion site in the highly attenuated vaccinia MVA strain*, Arch Virol. Springer-Verlag.

Shaw, I. and 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), pp. 3230–3241. doi: 10.1016/S0264-410X(00)00133-X.

Skinner, M. A. *et al.* (2005) 'Fowlpox virus as a recombinant vaccine vector for use in mammals and poultry', *Expert Review of Vaccines*. Taylor & Francis, pp. 63–76. doi: 10.1586/14760584.4.1.63.

Sohn, S. Y. and Hearing, P. (2016) 'Adenovirus early proteins and host sumoylation', *mBio*. American Society for Microbiology. doi: 10.1128/mBio.01154-16.

Staib, C., Drexler, I. and Sutter, G. (2004) 'Construction and isolation of recombinant MVA.', *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, pp. 77–100. doi: 10.1385/1-59259-789-0:077.

Steensels, M. *et al.* (2007) 'Efficacy of an inactivated and a fowlpox-vectored vaccine in muscovy ducks against an Asian H5N1 highly pathogenic avian influenza viral challenge', in *Avian Diseases*. American Association of Avian Pathologists, pp. 325–331. doi: 10.1637/7628-042806r.1.

Stewart, P. L., Fuller, S. D. and Burnett, R. M. (1993) 'Difference imaging of adenovirus: bridging the resolution gap between X-ray crystallography and electron microscopy.', *The EMBO Journal*, 12(7), pp. 2589–2599. doi: 10.1002/j.1460-2075.1993.tb05919.x.

Stittelaar, K. J. *et al.* (2001) 'Safety of modified vaccinia virus Ankara (MVA) in immune-suppressed macaques', *Vaccine*, 19(27), pp. 3700–3709. doi: 10.1016/S0264-410X(01)00075-5.

Sutter, G. and Staib, C. (2003) 'Vaccinia vectors as candidate vaccines: The development of modified vaccinia virus Ankara for antigen delivery', *Current Drug Targets - Infectious Disorders*. Curr Drug Targets Infect Disord, pp. 263–271. doi: 10.2174/1568005033481123.

Tacken, M. G. J. *et al.* (2000) 'Interactions in vivo between the proteins of infectious bursal disease virus: Capsid protein VP3 interacts with the RNA-dependent RNA polymerase, VP1', *Journal of General Virology*, 81(1), pp. 209–218. doi: 10.1099/0022-1317-81-1-209.

- Tapia, F. *et al.* (2017) 'Efficient and stable production of modified vaccinia Ankara virus in Two-stage semicontinuous and in continuous stirred tank cultivation systems', *PLoS ONE*, 12(8). doi: 10.1371/journal.pone.0182553.
- Taylor, R. L. and McCorkle, F. M. (2009) 'A landmark contribution to poultry science- Immunological function of the bursa of fabricius', *Poultry Science*, 88(4), pp. 816–823. doi: 10.3382/ps.2008-00528.
- Tomás, G. *et al.* (2019) 'Avian Pathology Antigenicity, pathogenicity and immunosuppressive effect caused by a South American isolate of infectious bursal disease virus belonging to the "distinct" genetic lineage'. doi: 10.1080/03079457.2019.1572867.
- Toro, H. *et al.* (2010) 'Avian Influenza Vaccination in Chickens and Pigs with Replication-Competent Adenovirus-Free Human Recombinant Adenovirus 5', *Avian Diseases*, 54(s1), pp. 224–231. doi: 10.1637/8773-033109-reg.1.
- Tressler, R. L. and Roth, T. F. (1987) 'IgG receptors on the embryonic chick yolk sac.', *The Journal of biological chemistry*, 262(32), pp. 15406–15412. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2960667> (Accessed: 3 June 2020).
- Tsukamoto, K. *et al.* (1995) 'Efficacy of Three Live Vaccines against Highly Virulent Infectious Bursal Disease Virus in Chickens with or without Maternal Antibodies', *Avian Diseases*, 39(2), p. 218. doi: 10.2307/1591863.
- Veits, J. *et al.* (2008) 'Protective efficacy of several vaccines against highly pathogenic H5N1 avian influenza virus under experimental conditions', *Vaccine*, 26(13), pp. 1688–1696. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.01.016.
- Vera, F. *et al.* (2015) 'Molecular characterization of infectious bursal disease virus (IBDV) isolated in Argentina indicates a regional lineage', *Archives of Virology*, 160(8), pp. 1909–1921. doi: 10.1007/s00705-015-2449-4.
- Volz, A. and Sutter, G. (2017) 'Modified Vaccinia Virus Ankara: History, Value in Basic Research, and Current Perspectives for Vaccine Development', in *Advances in Virus Research*. Academic Press Inc., pp. 187–243. doi: 10.1016/bs.aivir.2016.07.001.
- Weber, J. (1976) 'Genetic analysis of adenovirus type 2 III. Temperature sensitivity of

- processing viral proteins.', *Journal of Virology*, 17(2), pp. 462–471. doi: 10.1128/jvi.17.2.462-471.1976.
- Webster, A. *et al.* (1989) 'Characterization of the adenovirus proteinase: substrate specificity.', *The Journal of general virology*, 70 (Pt 12)(12), pp. 3225–34. doi: 10.1099/0022-1317-70-12-3225.
- Woodland, D. L. (2004) 'Jump-starting the immune system: Prime-boosting comes of age', *Trends in Immunology*. Elsevier Ltd, pp. 98–104. doi: 10.1016/j.it.2003.11.009.
- Zanetti, F. A. *et al.* (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), pp. 199–201. doi: 10.4142/jvs.2012.13.2.199.
- Zanetti, F. A. *et al.* (2014) 'Canarypox virus expressing infectious bursal disease VP2 protein as immunogen for chickens', *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(1), pp. 231–234. doi: 10.1590/S1517-83822014000100032.
- Zanetti, F. A. *et al.* (2016) 'Recombinant canarypox virus expressing the VP2 protein of infectious bursal disease virus induces protection in vaccinated SPF chickens', *Virologica Sinica*, 31(3), pp. 266–269. doi: 10.1007/s12250-015-3680-6.
- Zeshan, B. *et al.* (2010) 'Immunogenicity and protective efficacy of a replication-defective infectious bronchitis virus vaccine using an adenovirus vector and administered in ovo', *Journal of Virological Methods*, 166(1–2), pp. 54–59. doi: 10.1016/j.jviromet.2010.02.019.
- Zhao, Y. *et al.* (2014) 'Airborne virus sampling: Efficiencies of samplers and their detection limits for infectious bursal disease virus (IBDV)', *Annals of agricultural and environmental medicine : AAEM*, 21(3), pp. 464–471. doi: 10.5604/12321966.1120585.
- Zhu, F. C. *et al.* (2020) 'Safety, tolerability, and immunogenicity of a recombinant adenovirus type-5 vectored COVID-19 vaccine: a dose-escalation, open-label, non-randomised, first-in-human trial', *The Lancet*, 395(10240), pp. 1845–1854. doi: 10.1016/S0140-6736(20)31208-3.