

Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Buenos Aires

Instituto de Virología - CICVyA
INTA Castelar

**“Estudio *in vitro* e *in vivo* de una cepa
recombinante de Herpesvirus bovino 1
(BoHV-1 Δ gE β gal)”**

Trabajo de Tesis presentado para optar por el grado de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Autora: Fiorella Kotsias

Directora: Dra. Sonia Alejandra Romera

A mis padres y mi hermana, quienes me cuidan en un lugar cálido y de amor.

A mis amigos, quienes me ayudan a ver más allá de todo esto.

A Francisco, quien me lleva lejos.

Agradecimientos

A la Dra. Alejandra Romera, directora de esta Tesis, por darme una oportunidad en un momento en el que las estadísticas estaban en contra; por la confianza y el entusiasmo y la profunda convicción de que las cosas de alguna manera iban a salir bien. Por todo lo que aprendí muchas gracias.

A la Dra. Gabriela Calamante, por ayudarme a terminar este trabajo con una gran dedicación desinteresada. Por su alegría, contención y por su optimismo, especialmente los viernes.

Al Dr. Fernando Fernández, director del Instituto de Virología, por permitirme formar parte del Instituto durante el tiempo en el que se desarrolló esta Tesis.

Al Dr. Andrés Wigdorovitz, coordinador de Área de Vacunas, por todo el apoyo brindado al laboratorio donde se realizó este trabajo.

Al Dr. Mariano Pérez Filgueira, por la atenta lectura de este manuscrito y por todas las coincidencias.

A los Dres. Patricia Zamorano, María José Dus Santos, Mónica Jacobsen, María Barrandeguy, Norberto Fondevila, por la presencia cotidiana y los consejos cada vez que fueron necesarios.

A Osvaldo Zabal, Teresa Morán y Estela Fernández, de la Sección de Cultivos de Tejidos del Instituto de Virología, por sacar pilas de células de la galera cada vez que las necesité.

Al Dr. Javier Blanco Viera, Fernando Delgado y Félix Capellino, del Instituto de Patobiología, por su invaluable ayuda en la tarea agotadora del trabajo en los boxes.

A Gladys Francinelli y María del Carmen Tagle, del sector de Histotecnia del Instituto de Patobiología, y a Julián Diodati, Blanca y Catalina la Unidad de Microscopía Electrónica y Bioquímica Aplicada, por recibirme con tanta calidez en un lugar donde aprendí cosas raras y distintas.

A las Dras. Daniela Tosto, Carolina Martínez y Susana Marcucci, del Instituto de Biotecnología, por la ayuda hacia el final de este trabajo.

A los Dres. Etienne Thiry y Benoit Muylkens de la Universidad de Liege, Bélgica, por las discusiones enriquecedoras salpicadas a lo largo del desarrollo de este trabajo.

A Marta Radolci y Pamela Angeletti, de la sala de lavado, por su carrito milagroso.

A Diego Soraire y Javier Rosende, por ser tan buenos compañeros y cuidar de nosotras.

Al CONICET y a INTA, por financiar este trabajo.

A Beatriz García Peixoto, Soledad Escudero y Claudia Góngora por su permanente ayuda desde la Secretaría del Instituto de Virología, a Ramón Escobar por llevarnos por el buen camino y a Leonardo Birgy, por estar dispuesto a enfrentar los fantasmas de los pasillos a altas horas de la noche.

A María de los Ángeles Palacios, Darío Malacari, Silvina Maidana, Daniela Cianfrini, Analía Radl y Carlos Palacios, mis compañeros del Lab F, por la ayuda de todos los días, el trabajo en equipo, el cariño y los intensos momentos compartidos.

A Sebastián Pappalardo, Verónica Bianco, Matías Ostrowski, Valeria Olivera, Valeria Quattrocchi, Cecilia Langellotti, Sebastián Digiácomo e Ignacio Cebrián, mis compañeros del gran Lab D, por cómo nos divertimos y lo bien que la pasamos.

A Diego Compaired, Selene Juliá, Bessie Craig, Mariana Domínguez, Lucas Ferrari, Gustavo Asenzo, Anabel Rodríguez, Gabriel Pinto, Gabriel De Stéfano, Marina Lomónaco, Marina Mozgovej, Diego González, Fernanda González, Andrea Pécora, Ayelén Sammarruco, Demian Bellido, Sol Pérez Aguirreburualde, Sebastián Chiavenna, Agustina Rimondi, Juan Pablo Jaworski, Danilo Bucafusco, Myrian Trotta, Gisela Marcoppido, Sabrina Rodríguez, Diego Franco, Aldana Vissani, Silvia Tordoya, Cecilia Olguin, Juan Pega, Guillermina Stafforini, Ariel Pereda, por el beso-pasillo, el radio-pasillo, el mate-pasillo, la terapia-pasillo.

A Florencia Ferrer y Flavia Zanetti, del Instituto de Biotecnología, por prestarme un espacio desde donde mirar distinto las cosas.

A la Cátedra de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires, su profesor titular el Dr. Eduardo V. Moras y las profesoras Dra. Nora Guida, Marcela Martínez Vivot y Ana María Barboni, por dejarme ir, y a su vez conservarme a su lado permitiéndome ver que el mundo es más grande.

A María del Carmen Martínez, por cuidarme con tanto afecto; y a todos mis compañeros de la Cátedra de Enfermedades Infecciosas, por compartir la tarea de enseñar y aprender.

A Vanina Petrelli, Silvio D. Marchetti y Julián E. Piñeyro, por acompañarme desde aquellas épocas de decisiones, inocencia e incertidumbres.

A Florencia Luci, Julieta Pesce, Ariel del Mastro, Leonardo Figueroa, Martín Oteiza, Carlos Pallordet, Richard Reiss, Juan San Miguel, Pablo Schlesinger, Pablo Traversa y Demián Zayat, mis amigos con quienes entiendo quién soy.

A Mirta Navaz y Carlos D'Alessio, y sus hijos Josefina, Agustín, Ignacio y Mariana, por acompañar mis elecciones durante estos años.

A Hilda C. Bax y María Dimópulos, mis abuelas, por ser grandes cocineras y ni imaginarse de qué se trata esta Tesis.

A la Dra. Silvia Burlando y al Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, y a la Lic. Cristina Vila, quienes me consiguieron otra oportunidad.

A Paula Del Médico Zajac, Fátima Ladelfa y Ana Laura Zamit, por las incontables ayudas a lo largo de estos años, pero especialmente por ser las amigas que aparecieron sin querer, y para quedarse.

A María Mesplet, por ser amiga, acá y allá, siempre, por la contención y las palabras en el momento justo, y por la dinámica loca y rica que nos une.

A Matías Pandolfi y Javier Aguirre, por sus gritos y canciones y toda la intensidad.

A Carlos Diuk y Alejo Flah, por ser unos capos.

A Camila Charvay, Mariana Daicz, Magalí Karasik, Ana Florencia Silbering y María José Subiela, por ser las amigas con las que crezco y hacerme sentir parte de algo sagrado.

A Sophia Kotsias, mi hermana, por las risas contagiosas y las charlas desordenadas, las desveladas de cafés tibios y palabras justas.

A Stella M. Diamanti y Basilio A. Kotsias, mis padres, por la riqueza de sus ejemplos contrapuestos, por encontrar en mí lo mejor de cada uno, y por ser incondicionales en su amor.

A Amelia, Trece, Yusufakis, Manuel y Hannah, por dormir sobre los papers y estar ahí cada vez que levantaba la vista.

A Francisco D'Alessio, por enseñarme a compartir todo esto y hacerlo parte de los dos.

Indice

Abreviaturas y siglas.....	7
Resumen	10
Abstract	12
Introducción	14
1. Herpesvirus Bovino 1	15
1.A. Clasificación.....	15
1.B. Epidemiología	21
1.C. Ciclo de replicación viral	24
1.D. Patogenia.....	28
1.E. Cuadro clínico y lesiones inducidas luego de la infección.....	37
1.F. Diagnóstico.....	40
1.G. Vacunas.....	40
2. La Glicoproteína E (gE)	45
2.A. Estructura	45
2.B. Funciones <i>in vitro</i>	46
2.C. Funciones <i>in vivo</i>	49
Hipótesis y objetivos.....	52
Materiales y métodos.....	54
1. Caracterización <i>in vivo</i>	55
1.A. Virus y células	55
1.B. Animales	55
1.C. Diseño experimental I	55
1.D. Diseño experimental II.....	56
1.E. Ensayo de infección viral de bovinos	57
1.F. Evaluación de signos clínicos	58
1.G. Eutanasia y necropsias	58
1.H. Toma de muestras.....	59
1.I. Análisis de las secreciones nasales	59
1.I.1. Titulación viral de secreciones nasales.....	59
1.I.2. Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	60
1.J. Evaluación respuesta inmune humoral.....	63
1.J.1. Ensayo de ELISA para determinación de anticuerpos totales en suero.....	63
1.J.2. Ensayo de ELISA para evaluación de IgA e IgG1 en secreciones nasales	64
1.J.3. Ensayo de seroneutralización.....	65
1.K. Análisis de los tejidos	65
1.K.1. Aislamiento viral	65
1.K.2. Inmunohistoquímica.....	66
1.L. Amplificación por PCR a partir de tejidos	67
1.L.1. Extracción de ADN a partir de tejidos congelados.....	67
1.L.2. Amplificación por PCR.....	67
2. Caracterización <i>in vitro</i>	69
2.A. Virus y células	69
2.B. Titulación viral	69
2.C. Cinética de penetración	69
2.C.1. Tinción con cristal violeta	70
2.D. Cinética de replicación viral.....	70
2.E. Ensayo de tamaño de placa de infección	71
2.F. Ensayo de tamaño de placa de lisis.....	71
2.G. Microscopía electrónica.....	71
2.G.1. Tinción negativa	71
2.G.2. Inclusión.....	72

2.G.3. Microscopio electrónico de transmisión	72
3. Caracterización genómica	73
3.A. Oligonucleótidos	73
3.B. Purificación de virus	73
3.C. Extracción de ADN a partir de virus purificado	74
3.D. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	74
3.E. Electroforesis en geles de agarosa nativos	74
3.F. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa	74
3.G. Secuenciación automática	75
3.H. Digestión con endonucleasas de restricción	75
3.I. Herramientas bioinformáticas	75
Resultados	76
1. Estudio de la infección aguda por BoHV-1 Δ gE β gal en bovinos	77
1.A. Infección experimental de bovinos con el virus BoHV-1 LA	77
1.A.1. Excreción viral y signología clínica	77
1.A.2. Respuesta inmune	79
1.B. Infección experimental de bovinos con el virus BoHV-1 Δ gE β gal	80
1.B.1. Excreción viral y signología clínica	81
1.B.2. Respuesta inmune	82
1.C. Estudio de la distribución viral en tejidos	83
1.C.1. Aislamiento viral	84
1.C.2. Detección de antígenos virales	85
2. Estudio de la latencia de BoHV-1 Δ gE β gal en bovinos	88
2.A. Reactivación de los animales infectados con la cepa BoHV-1 LA	88
2.A.1. Excreción viral y signología clínica	88
2.A.2. Respuesta inmune	89
2.B. Reactivación de los animales infectados con la cepa BoHV-1 Δ gE β gal	90
2.B.1. Excreción viral y signología clínica	90
2.B.2. Respuesta inmune	90
2.C. Evaluación de los sitios de establecimiento de latencia	91
2.C.1. Detección de antígenos virales	91
2.C.2. Detección de ADN viral	94
3. Estudio del comportamiento <i>in vitro</i> de la cepa BoHV-1 Δ gE β gal	96
3.A. Estudio del efecto citopático	96
3.B. Estudio del ingreso viral a las células	97
3.C. Estudio del pasaje célula a célula	98
3.C.1. Cinética de crecimiento de múltiples pasos	98
3.C.2. Ensayo de tamaño de placas de infección	101
3.D. Estudio del egreso viral	103
3.D.1. Ensayo de tamaños de placas de lisis	103
3.D.2. Cinética de crecimiento de un paso	105
3.D.3. Ensayos ultraestructurales	109
4. Caracterización genómica del virus BoHV-1 Δ gE β gal	111
4.A. Análisis de la zona de recombinación del genoma de BoHV-1 Δ gE β gal	111
4.B. Mapeo del genoma de BoHV-1 Δ gE β gal	113
4.C. Análisis de los patrones de restricción del genoma de BoHV-1 Δ gE β gal	116
Discusión	121
Conclusiones	145
Bibliografía	147

Abreviaturas y siglas

A	absorbancia
ABTS	ácido sulfónico 2-2'-azino-bis-3-etilbenceno-6-tiazolin
AcM	anticuerpo monoclonal
ADN	ácido desoxirribonucleico
AIHV-1	herpesvirus alcefalino 1
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BLHV	herpesvirus linfotrópico bovino
BHV-1, -2, -4, -5	herpesvirus bovino 1, 2, 4, 5
BuHV-1	herpesvirus bubalino 1
CICVyA	Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas
cm	centímetros
CMH	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
CNIA	Centro Nacional de Investigaciones Agronómicas
CpHV-1	herpesvirus caprino 1
CRB	Complejo Respiratorio Bovino
CvHV-1, -2	herpesvirus cévido 1 y 2
°C	grados Celsius
D.O.	densidad óptica
DICT ₅₀	dosis infecciosa en cultivo de tejidos 50%
DIVA	<i>differentiating infected from vaccinated animals</i>
dNTPs	desoxirribonucleósidos trifosfato
dpi	días post infección
dpt	días post tratamiento inmunosupresor
E	temprano (<i>early</i>)
EBV	virus de Epstein Barr
ECP	efecto citopático
EDTA	ácido etilendiaminetetracético
EHV-1, -2, -3, -4	herpesvirus equino 1, 2, 3 y 4
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ElkHV-1	herpesvirus del alce 1
FeHV-1	herpesvirus felino 1
g	glicoproteína
gapdh	gliceraldehído - 3 - fosfato dehidrogenasa
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GT	ganglio trigémino
h	hora/s
H/E	hematoxilina/eosina
HCMV	citomegalovirus humano
Hpi	horas post infección
HSV-1, -2	virus herpes simple 1 y 2
ICTV	<i>International Committeé on the Taxonomy of Viruses</i>
IE	inmediato temprano (<i>immediate early</i>)
IEtu	unidad transcripcional inmediato temprana
IFN α / β - γ	interferon alfa/beta, gama
Ig	inmunoglobulina
IHQ	inmunohistoquímica
IL	interleuquina
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
IBR	rinotraqueítis infecciosa bovina (<i>Infectious Bovine Rhinotracheitis</i>)
IPB	balanopostitis pustular infecciosa (<i>Infectious Pustular Balanopostitis</i>)
IPV	vulvovaginitis pustular infecciosa (<i>Infectious Pustular Vulvovaginitis</i>)
IR	repetición interna
kpb	kilo pares de bases
L	tardío (<i>late</i>)
LA	Los Angeles

LN	linfonódulo
log ₁₀	logaritmo en base 10
LR	asociado a la latencia (<i>latency related</i>)
M	molar
MDBK	línea celular de riñón bovino Mardin Darby
moi	multiplicidad de infección (<i>multiplicity of infection</i>)
MF	microscopio de fluorescencia
min	minuto/s
ml	mililitros
mM	milimolar
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Nº	número/s
ng	nanogramos
nm	nanómetro
nt	nucleotido
ORF	marco de lectura abierto (<i>open reading frame</i>)
OvHV-2	herpesvirus ovino 2
pb	pares de bases
PBS	buffer fosfato salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (<i>polimerase chain reaction</i>)
pi	post infección
PrV	virus de la pseudorrabia (<i>pseudorabies virus</i>)
PTA	ácido fosfo túngstico
RFLP	polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (<i>Restriction Fragments Length Polymorphism</i>)
rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecil sulfato de sodio
seg	segundo/s
SFB	suero fetal bovino
SN	seroneutralización
SNC	sistema nervioso central
SNP	sistema nervioso periférico
T	tonsila
Taq ADN pol	ADN polimerasa de <i>Thermophilus aquaticus</i>
TBS	buffer tris salino
TK	timidina quinasa
TLRs	receptores tipo <i>toll</i> (<i>toll like receptors</i>)
TR	repetición terminal
UE	Unión Europea
UFP	unidad formadora de placa
UL	región única larga
US	región única corta
UV	ultravioleta
V	volts
vol	volumen
VT	vector de transferencia
VZV	virus varicela zoster
βgal	beta galactosidasa
µg	microgramos
µl	microlitros
µm	micrometros

Resumen

Estudio *in vitro* e *in vivo* de una cepa recombinante de Herpesvirus bovino 1 (BoHV-1 Δ gE β gal)

El herpesvirus bovino 1 es un alfaherpesvirus que infecta al ganado bovino produciendo cuadros clínicos respiratorios, genitales y/o reproductivos. Es un virus neurotrópico que establece latencia en ganglios sensoriales, y la reexcreción viral luego de la reactivación de la infección latente es responsable de la perpetuación del agente en los rodeos. En nuestro país la seroprevalencia puede alcanzar el 80% y la vacunación es la estrategia utilizada para el control de la enfermedad. En nuestro laboratorio se desarrolló, a partir de la cepa BoHV-1.1 Los Angeles (LA), un virus recombinante mediante el reemplazo alélico del gen que codifica para la glicoproteína E por el gen *lac z*, denominada BoHV-1 Δ gE β gal, para su utilización como vacuna marcadora.

La caracterización genómica de la cepa BoHV-1 Δ gE β gal verificó la ausencia de cambios en las regiones flanqueantes al gen *gE* y permitió identificar específicamente los sitios donde ocurrió el intercambio alélico. El estudio de *RFLP* mostró que esta cepa posee un patrón diferente al esperado, indicando modificaciones en ciertos sitios de restricción. El estudio del comportamiento *in vitro* mostró que esta cepa es menos eficiente en la producción de partículas virales infectivas así como en la dispersión viral respecto a la cepa parental BoHV-1 LA y a otras cepas gE-, tanto en el mecanismo de pasaje célula a célula como en el de liberación de partículas virales infectivas al medio extracelular. El virus BoHV-1 Δ gE β gal se encuentra atenuado en su virulencia en el hospedador natural, y esta atenuación es mayor que la descrita para otras cepas gE-, ya que si bien induce una respuesta inmune humoral sérica y de mucosas, no se excreta ni produce enfermedad clínica luego de la infección intranasal, así como tampoco establece una infección latente ni se reactiva experimentalmente.

La experiencia de infección viral con BoHV-1 y la metodología desarrollada en este trabajo aplicada al análisis de muestras provenientes de animales infectados constituyen una valiosa herramienta para el estudio de la patogenia de virus genéticamente modificados, virus recombinantes y aislamientos de campo. Por otro lado, resulta una contribución al conocimiento de la cepa parental BoHV-1 LA que se utiliza en las experiencias de desafío viral. Los resultados de este trabajo de Tesis, conjuntamente con los antecedentes de inmunogenicidad, protección frente al desafío viral e inocuidad de la cepa BoHV-1 Δ gE β gal, sumado a la creciente tendencia mundial en el uso de vacunas marcadoras vivas en el control de la enfermedad causada por BoHV-1, indican que la cepa BoHV-1 Δ gE β gal podría incorporarse como inmunógeno vivo en los esquemas de vacunación de futuros planes de control y erradicación de BoHV-1 en nuestro país sin riesgos de producir enfermedad, latencia o diseminarse a otros animales, reduciendo la incidencia de enfermedad respiratoria bovina.

Palabras clave: herpesvirus bovino 1; infección viral aguda, latencia y reactivación; vacunas marcadoras; glicoproteína E; constitución genómica.

Abstract

***In vitro* and *in vivo* study of a recombinant strain of Bovine herpesvirus 1 (BoHV-1 Δ gE β gal)**

Bovine herpesvirus 1 is an alphaherpesvirus that infects cattle producing respiratory, genital and reproductive disease. It is a neurotropic virus that establishes latency in sensory ganglia, and viral reexcretion after reactivation of latent infections is responsible for the perpetuation of the agent in the field. In our country, seroprevalence can reach 80% and vaccination is the strategy used to control this disease. A recombinant virus was developed in our laboratory to be used as a marker vaccine, from BoHV-1.1 strain Los Angeles (LA) through allelic replacement of the gene encoding glycoprotein E by the *lac z* gene, named BoHV-1 Δ gE β gal.

Genomic characterization of BoHV-1 Δ gE β gal strain verified the absence of changes in the *gE* gene flanking regions, and specifically identified the sites where allelic exchange occurred. The RFLP study showed that this strain has a different pattern than expected, indicating changes in certain restriction sites. The study of the *in vitro* behavior established that this strain is less efficient in producing infectious viral particles as well as in viral dispersion when compared to the parental or other *gE* gene deleted strains, both in the mechanism of cell-to-cell spread and in the release of infectious viral particles into the extracellular medium. BoHV-1 Δ gE β gal virus is attenuated in the natural host, and this attenuation is greater than that described for other *gE* gene deleted strains, albeit immunogenic, it is not excreted nor produces clinical disease after intranasal infection, and does not establish a latent infection or is reactivated experimentally.

The experience of BoHV-1 viral infection and the methodology developed in this work applied to the analysis of samples from infected animals are a valuable tool for studying the pathogenesis of genetically modified viruses, recombinant virus and field isolates. On the other hand, it is a contribution to the knowledge of parental BoHV-1 LA strain which is used in viral challenge experiences. The results of this thesis work, taken together with the history of immunogenicity, protection against viral challenge and safety of BoHV-1 Δ gE β gal strain and the increasing global trend towards the use of live marker vaccines in controlling diseases caused by BoHV-1, indicate that BoHV-1 Δ gE β gal strain could be incorporated as a live immunogen in vaccination schemes of future BoHV-1 control and eradication plans in our country without risk of causing illness, latency or virus spread to other animals, therefore reducing the incidence of bovine respiratory disease.

Keywords: bovine herpesvirus 1; acute viral infection, latency and reactivation; marker vaccines, glycoprotein E; genomic constitution

Introducción

1. HERPESVIRUS BOVINO 1

El herpesvirus bovino 1 (BoHV-1) es un virus neurotrópico que ocasiona una variedad de síntomas clínicos, más comúnmente rinotraqueítis, conjuntivitis y enfermedad genital. En los animales adultos BoHV-1 puede causar signos clínicos respiratorios benignos o reducir la producción láctea como así también infertilidad y abortos. En los animales más jóvenes BoHV-1 es uno de los agentes causales del Complejo Respiratorio Bovino (CRB). Este último está conformado por un conjunto de enfermedades comunes, denominadas generalmente neumonía. Es un síndrome complejo en cuyo desarrollo intervienen distintos agentes infecciosos que, junto con otros factores, generan un estado de compromiso inmunitario en el bovino que desencadena signos respiratorios serios. Situaciones estresantes, como castración, descorne, destete, transporte, cambios bruscos de temperatura, temporales, hacinamiento, etc., son los principales factores que contribuyen a la presentación de CRB ya que BoHV-1 permanece en estado latente en el hospedador de por vida. Cuando este síndrome se produce en animales sometidos a viajes, arreos o movimientos muy estresantes, se denomina: "fiebre del transporte".

Los patógenos implicados en CRB son BoHV-1, el virus de la Diarrea viral bovina, virus Sincicial Respiratorio bovino y Parainfluenza 3, así como bacterias, principalmente *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* serotipo A1, *Pasteurella multocida* y *Haemophilus somnus*. Tanto *Mannheimia haemolytica* como *Pasteurella multocida* son bacterias consideradas habitantes normales del tracto respiratorio y se encuentran presentes sin causar enfermedad alguna. Sin embargo, cuando se produce una combinación de estrés e infección viral se convierten en agentes terminales de la enfermedad, pudiendo llegar a causar la muerte de los animales. Esto ocasiona enormes pérdidas económicas en la industria ganadera mundial.

Actualmente, la principal estrategia de prevención contra BoHV-1 la constituyen las medidas de manejo adecuadas y la vacunación de los animales.

1.A. Clasificación

BoHV-1 pertenece a la familia *Herpesviridae*, subfamilia *alfaherpesvirinae*, género *Varicellovirus*. Todos los miembros de la familia *Herpesviridae* comparten una morfología común del virión (Pellet y Roizman, 2007)(Figura 1). La estructura del virión consta de:

- *Core*: contiene el ADN viral que en algunos casos está asociado a una estructura proteínica. El material genético de los herpesvirus consiste en una cadena doble de ADN lineal, que se circulariza inmediatamente tras ser liberado de la cápside en el núcleo de la célula infectada. El ADN tiene un tamaño aproximado entre 120 y 230 kbp, dependiendo de las secuencias repetitivas internas y terminales.

- Cápside: presenta simetría icosaédrica y mide aproximadamente 100-110nm de diámetro. Está compuesta por 162 capsómeros (150 hexámeros y 12 pentámeros).
- Tegumento: estructura compuesta de material amorfo que rodea la cápside.
- Envoltura: Es una estructura con apariencia típica trilaminar, pues proviene de membranas celulares parcialmente modificadas. La envoltura posee lípidos conteniendo insertas glicoproteínas codificadas por el virus. El número de glicoproteínas diferentes varía de acuerdo a la especie.

El virión puede medir desde 120 a 300 nm. Esta variación depende, en parte, del grosor del tegumento y del estado de la envoltura, pudiendo variar de unos herpesvirus a otros o, incluso, dentro de la misma especie.

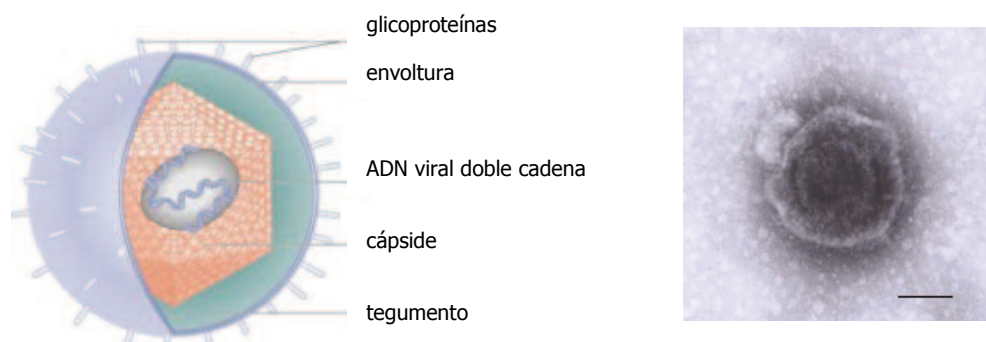


Figura 1. Morfología de BoHV-1. Esquema de un virión de herpesvirus donde se encuentran señaladas las estructuras principales. Imagen de un virión de BoHV-1 cepa Los Angeles teñido negativamente y visualizado mediante microscopía electrónica de transmisión. La barra indica 100 nm.

Entre las características biológicas compartidas por todos los herpesvirus caben destacar:

- 1- El genoma codifica para un gran número de enzimas involucradas en el metabolismo de los ácidos nucleicos (timidina quinasa, timidilato sintetasa, dUTPasa, ribonucleótido reductasa), en la síntesis de ADN (ADN polimerasa, helicasa, primasa) y en el procesamiento de proteínas (proteína quinasa).
- 2- La síntesis del ADN viral y el ensamble de la cápside ocurre en el núcleo. Las cápsides adquieren la envoltura durante el tránsito por la membrana nuclear.
- 3- La producción de la progenie viral está invariablemente acompañada por la destrucción de la célula infectada. Las células blanco pueden variar enormemente; mientras unos infectan neuronas, otros pueden infectar linfocitos u otros tipos celulares distintos.
- 4- Estos virus son capaces, tras una infección aguda, de producir latencia en el hospedador infectado, durante la cual, solo un muy pequeño número de transcritos virales son

producidos. En las células que contienen virus latente, el genoma viral se encuentra circularizado.

El Grupo de Estudio de Herpesvirus perteneciente al Comité Internacional de Taxonomía Viral (International Committee on the Taxonomy of Viruses – ICTV) ha clasificado a los herpesvirus en 3 subfamilias, basándose en sus propiedades biológicas: *Alfa*, *beta* y *gammaherpesvirinae*. Asimismo, utilizando datos de homología de secuencias de ADN, similitud de organización genómica y estudios de proteínas virales mediante ensayos inmunológicos, se clasificaron dichos virus en diversos géneros.

- **Alfaherpesvirinae:** Tienen un rango variable de posibles huéspedes, ciclo reproductivo relativamente corto, una rápida diseminación en cultivo de tejidos, eficiente destrucción celular y alta capacidad para establecer latencia principalmente en ganglios sensoriales. Esta subfamilia contiene los géneros Simplexvirus (HSV-1, *Herpes simplex virus 1*), Varicellovirus (VZV, *Varicella zoster virus*), Mardivirus (previamente denominado *Marek's disease-like virus*), e Iltovirus (previamente denominado *Infectious laryngotracheitis-like virus*) (ICTV, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>). Dos características biológicas fundamentales influyen y determinan el tipo de enfermedades que desarrollan: la neurovirulencia y la latencia. La capacidad que poseen los alfaherpesvirus de infectar células nerviosas ocasiona el establecimiento de latencia (generando un reservorio del virus) e, incluso, el desarrollo de enfermedades neurológicas severas.
- **Betaherpesvirinae:** Tienen un rango de huésped muy estrecho. El ciclo reproductivo y el progreso de la infección en cultivo son lentos. La célula infectada puede aumentar mucho de tamaño (citomegalia). El virus puede establecer una infección latente en glándulas secretoras, células linfoides, riñón y otros tejidos. Esta subfamilia está compuesta por los géneros Cytomegalovirus (HCMV, *Human cytomegalovirus*), Muromegalovirus (MCMV, *Murine cytomegalovirus*) y Roseolovirus (HHV-7, *Human herpes virus 7*).
- **Gamaherpesvirinae:** El rango de hospedador experimental de los miembros de esta subfamilia está limitado a la familia u orden a la cual pertenece el hospedador natural. *In vitro*, todos los miembros de este grupo replican en células linfoblásticas, aunque en algunos casos pueden causar infecciones líticas en células fibroblásticas o epiteliales. Existen virus específicos de linfocitos T y B, y se ha demostrado virus latente en tejidos linfoides. Esta subfamilia contiene dos géneros: Lymphocryptovirus (EBV, *Epstein-Barr virus*) y Rhadinovirus (SaHV-2, *Saimiriine herpesvirus 2*).

Adicionalmente, los herpesvirus relacionados son clasificados como especies diferentes de acuerdo a dos criterios:

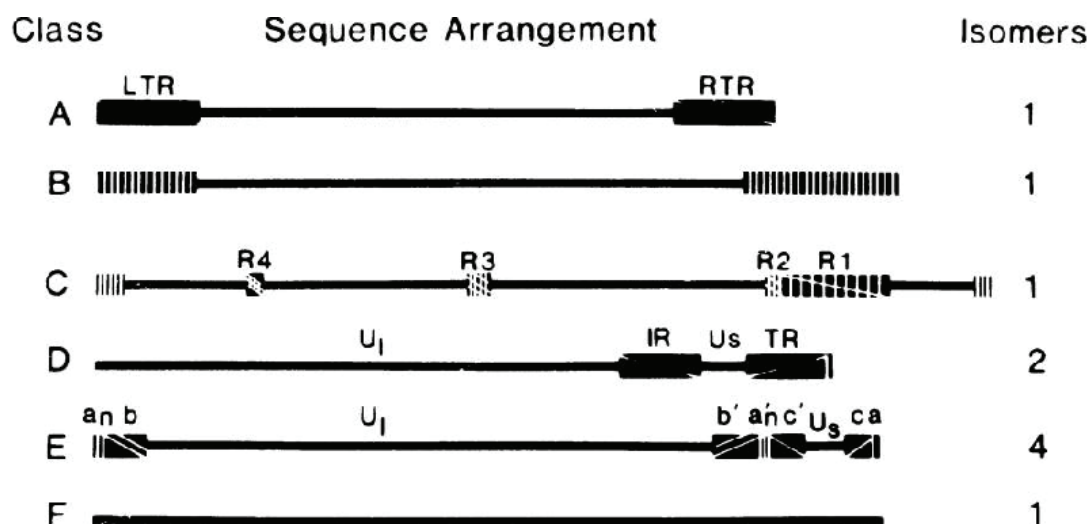
1. Si sus secuencias nucleotídicas difieren a lo largo de todo el genoma de manera fácilmente demostrable ó,
2. Si ocupan nichos biológicos distintos en virtud de su epidemiología y patogenia, o si tienen distintos hospedadores naturales.

La familia *Herpesviridae* agrupa numerosos agentes virales que poseen gran importancia económica, encontrando varias especies que afectan a rumiantes (Tabla 1) (Schwyzer y Ackerman, 1996; Thiry et al., 2006; Deim et al., 2007; Myulkens et al., 2007).

Agente	Subfamilia	Enfermedad	Hospedador
BoHV-1	<i>Alfaherpesvirinae</i>	Enfermedad respiratoria y reproductiva	Bovino
BoHV-2	<i>Alfaherpesvirinae</i>	Mamilitis ulcerativa	Bovino
BoHV-4	<i>Gammaherpesvirinae</i>	Enfermedad reproductiva	Bovino
BoHV-5	<i>Alfaherpesvirinae</i>	Meningoencefalitis en terneros	Bovino
BLHV	<i>Gammaherpesvirinae</i>	No determinado	Bovino
CpHV-1	<i>Alfaherpesvirinae</i>	Enfermedad generalizada en cabritos, genital en adultos	Caprinos
OvHV-2/AIHV-1	<i>Gammaherpesvirinae</i>	Fiebre catarral maligna	Bovinos
BuHV-1	<i>Alfaherpesvirinae</i>	Enfermedad genital subclínica	Búfalos
PRV	<i>Alfaherpesvirinae</i>	Porcinos: enfermedad respiratoria, nerviosa y reproductiva. Rumiantes y carnívoros: enfermedad neurológica mortal	Porcinos
CvHV-1	<i>Alfaherpesvirinae</i>	Enfermedad ocular	Ciervo colorado
CvHV-2	<i>Alfaherpesvirinae</i>	Infección genital subclínica	Reno
EiKHV-1	<i>Alfaherpesvirinae</i>	Infección genital subclínica	Wapiti

Tabla 1: Herpesvirus que infectan a rumiantes (Schwyzer y Ackerman, 1996; Thiry et al., 2006; Deim et al., 2007; Myulkens et al., 2007).

El estudio de la organización del genoma viral otorga un criterio diferente de clasificación de los herpesvirus. El tamaño de la molécula de ADN varía de 120 a 250 kpb y su secuencias contienen una composición de G+C entre el 31% y el 75% del total. Los genomas poseen secuencias repetidas tanto internas como terminales que pueden variar en número de copias llevando de esta manera a variaciones en el tamaño del genoma de hasta 10 kpb. La presencia y ubicación de estas secuencias repetidas permiten la división de los herpesvirus en 6 grupos, designados con las letras A a F (Pellet y Roizman, 2007). BoHV-1 ha sido clasificado como perteneciente al grupo D (Figura 2).



Copyright © 2001 by Lippincott Williams & Wilkins

Figura 2. Esquema de la organización genómica de las seis clases de genoma presentes en la Familia Herpesviridae. Los genomas A, B, C, D, E, y F están ejemplificados por herpesvirus de *channel catfish*, herpes virus saimiri (SaHV-2), virus Epstein-Barr (EBV), virus varicela zoster (VZV), virus herpes simple (HSV) y herpesvirus tupaia, respectivamente. En el esquema las líneas horizontales representan regiones únicas o casi únicas. Las regiones repetidas están dibujadas como rectángulos y designadas como repeticiones terminales izquierda y derecha (LTR y RTR) para el grupo A, repeticiones R1 a R4 para repeticiones internas del grupo C, e interna y terminal para grupo D. Los extremos del grupo E (HSV-1) consisten de dos elementos. Uno de los extremos contiene *n* copias de la secuencia "a" al lado de una secuencia más larga denominada "b". El otro extremo posee una secuencia "a" seguida de una secuencia denominada "c". Las secuencias terminales "ab" y "ca" están insertadas en orientaciones invertidas (marcadas con comillas) de modo de separar la región única en un dominio largo (UL) y uno corto (US). Las repeticiones terminales de los genomas de tipo F aún no han sido descritas. En el grupo B, las secuencias terminales están reiteradas muchas veces en ambos extremos. El número de repeticiones en cada extremo puede ser diferente. Los componentes de los genomas D y E pueden invertir su posición. En los de clase D, el componente corto (US) se invierte en relación al largo (UL). Aunque, con muy poca frecuencia, el segmento largo podría invertirse, la mayoría de las moléculas de ADN forman dos poblaciones que difieren en la orientación del componente corto. En los genomas E, tanto el componente largo como el corto pueden invertirse por lo que el ADN viral consiste de cuatro isómeros equimolares. Figura y leyenda extraídas de Roizman y Pellet, 2001.

El herpesvirus bovino 1 posee un genoma lineal de ADN doble cadena, organizado en una región única larga (UL) y una región única corta (US) la cual se encuentra flanqueada por las repeticiones invertidas interna (IR) y terminal (TR) (genoma tipo D) (Pellet y Roizman, 2007). La secuencia US (junto con los fragmentos IR y TR) pueden invertir su orientación en relación a la región UL, por lo que el ADN extraído de la progenie viral de células infectadas posee una cantidad equimolar de dos poblaciones que difieren solo en la orientación de la región US respecto de la UL.

El tamaño total del genoma de BoHV-1 es de 135.3 kpb y posee 73 marcos abiertos de lectura (*open reading frame*, ORF). Hasta el momento la única secuencia publicada del genoma completo de BoHV-1 se realizó a partir de cinco cepas de BoHV-1: K22, Cooper, P8-2, 34 y Jura (acceso a GenBank NC_001847.1). Los genes codificados son homólogos a los de HSV-1

(alfaherpesvirus prototipo) con la única excepción del gen UL0.5 que está presente solo en el genoma de BoHV-1 (Delhon et al., 2003). El genoma del virus codifica para diez glicoproteínas; seis de ellas están en la región UL, glicoproteína K (gK) (UL53), gC (UL44), gB (UL27), gH (UL22), gM (UL10), gL (UL1) y las cuatro restantes en la región US, gG (US4), gD (US6), gI (US7) y gE (US8). La proteína codificada por el gen UL49.5 (gN) es considerada una falsa glicoproteína ya que no está glicosilada (Liang et al., 1996) (Figura 3).

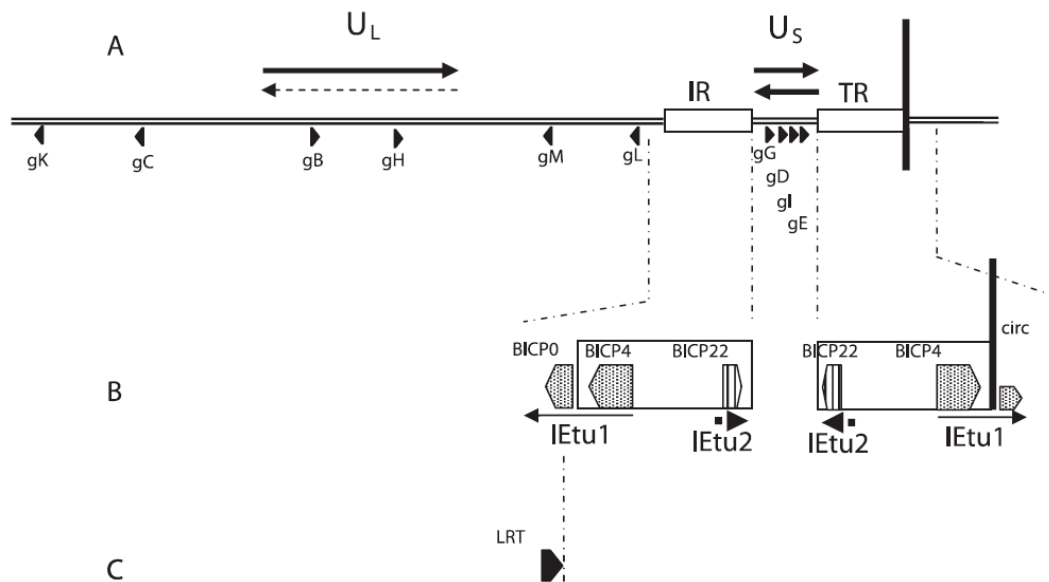


Figura 3. (A) Organización del genoma de BoHV-1. La replicación del ADN viral genera cantidades equimolares de dos isómeros principales que difieren en la orientación relativa de los segmentos UL y US (flechas horizontales). La ubicación de los 10 genes que codifican las glicoproteínas de BoHV-1 está indicada por cabezas de flechas. La barra vertical indica el sitio de unión del genoma luego de la circularización. (B) Vista esquemática de las dos unidades transcripcionales inmediato-tempranas (IETu-1 y -2) cuyos promotores se ubican en las regiones IR y TR. La activación del promotor de IETu1 ubicado en IR produce la transcripción de los genes BICP4 y BICP0 mientras que la activación del promotor de IETu1 ubicado en TR produce la transcripción de los genes BICP4 y circ. La activación del promotor de IETu2 produce la transcripción del gen BICP22. (C) Localización de la región de BoHV-1 que se transcribe activamente durante la latencia originando el transcrito asociado a la latencia (LTR). Figura y leyenda extraídas de Muylkens et al., 2007.

El estudio del genoma de BoHV-1 ha sido abordado principalmente mediante el análisis de los patrones de los fragmentos obtenidos luego de la digestión con endonucleasas de restricción (RFLP: *restriction fragment length polymorphism*). En 1983, Mayfield et al. clonaron los fragmentos resultantes de la digestión de la cepa Cooper de BoHV-1 con la enzima *HindIII* (Mayfield et al., 1983), determinando el patrón con el que luego se compararon distintos aislamientos de BoHV-1 (Seal et al., 1985) (Figura 4). Esta metodología permitió estudiar aislamientos provenientes de otras especies y su relación con BoHV-1 (Varady et al., 1994; Engels et al., 1992) y aportó los primeros datos respecto a la existencia de cepas neuropatogénicas de BoHV-1 con perfiles de restricción diferentes, que luego fueron reclasificadas como BoHV-5 (Engels et al., 1986; Horiuchi et al., 1995). Asimismo, el estudio de cepas vacunales atenuadas ha sido realizado mediante esta técnica (Kamiyoshi et al., 2008; Rijsewijk et al., 1999b). En Argentina se subtipificaron de esta manera aislamientos de campo de BoHV-1 y BoHV-5 (Pidone et al., 1999).

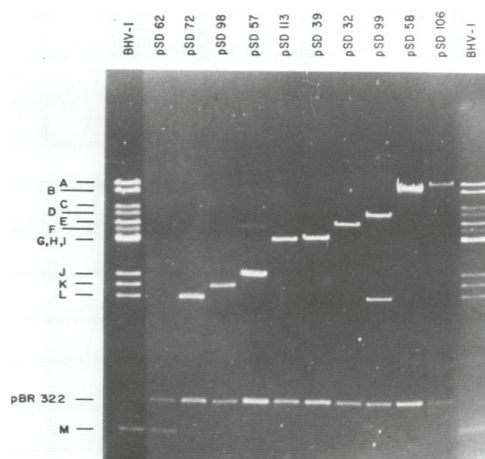


Figura 4: Imagen de un gel de agarosa mostrando el patrón de digestión con *HindIII* a partir del ADN de la cepa Cooper de BoHV-1 y los correspondientes fragmentos clonados. Figura y leyenda extraídas de Mayfield et al., 1983.

1.B. Epidemiología

El BoHV-1 es el agente causal de la rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR), la vulvovaginitis pustular infecciosa (IPV) y la balanopostitis pustular infecciosa (IPB) (Wyler et al., 1989). Diversos estudios basados en análisis de restricción (Engels et al., 1986; Metzler et al., 1986) y en la utilización de anticuerpos monoclonales (Rijsewijk, 1999a; Spilki et al., 2005; D'Arce et al., 2002) permitieron la descripción de tres subtipos de BoHV-1 (BoHV-1.1, BoHV-1.2a y BoHV-1.2b).

El subtipo BoHV-1.1 agrupa las cepas asociadas a los casos respiratorios y es prevalente en Europa y América. El subtipo BoHV-1.2a está asociado a una amplia gama de manifestaciones clínicas tales como IBR, IPV, IPB y abortos, habiéndose detectado en Europa en los años 70 y actualmente presente en Brasil. El subtipo BoHV-1.2b comprende las cepas asociadas con casos de infección genital y respiratoria, aunque no así abortos, y son aisladas en Australia y Europa (Edwards et al., 1990; Jones y Chowdhury, 2007).

Las infecciones con BoHV-1 están distribuidas mundialmente aunque existen diferencias en la prevalencia y la incidencia de las mismas (Ackermann y Engels, 2006). Un reporte de Algeria indica una seroprevalencia del 20% (Achour y Moussa, 1996). En Estados Unidos (EEUU), Canadá, Australia y Nueva Zelanda la seroprevalencia es alta debido a que se realiza vacunación contra BoHV-1 de forma individual, lo cual puede ayudar en la disminución de pérdidas económicas debido a los signos clínicos de la infección (van Drunen Littel-van der Hurk et al., 1997). En Holanda un reporte de 1994 detectó una seroprevalencia del 49% en vaquillonas de primera parición y del 91% en vacas adultas (Van Wuyckhuise et al., 1994). Datos recientes de Polonia indican que la seroprevalencia de BoHV-1 es del 21% en los rodeos mientras que los toros confinados a los centros de inseminación artificial son negativos gracias a la implementación

exitosa de un programa de erradicación en dichos centros en 1976 (Rola et al., 2009). Asimismo, se han reportado brotes de enfermedad respiratoria debida a BoHV-1 en Croacia (Lojkic et al., 2009). En relación a países del Este solo algunos de ellos, como Filipinas, Singapur, Sri Lanka y Vietnam, reportaron no haber tenido casos de IBR recientemente (Ackermann y Engels, 2006).

Los primeros brotes de IBR en Europa se presentaron en los años 70s (Edwards, 1988; Metzler et al., 1985). Desde ese momento, diversos países comenzaron a desarrollar programas oficiales de control de BoHV-1. Dado que la Unión Europea (UE) permitió a los países libres de IBR exigir condiciones de importación de animales, semen y embriones, aumentaron los esfuerzos para controlar y erradicar al BoHV-1 de la UE (Ackermann y Engels, 2006). En un encuentro reciente de especialistas en BoHV-1 se actualizaron las situaciones de varios países y se plantearon las dificultades encontradas en el control y erradicación de este agente (ESVV, 2009). IBR es una de las enfermedades incluidas en la directiva 64/432 de la UE de modo que los países miembros pueden implementar programas de erradicación y tomar medidas contra la introducción de la enfermedad desde otros países miembros (Franken, 2008). Sin embargo la erradicación no es obligatoria y cada país tenía sus propios estándares de calificación. Por ello, la UE ha establecido criterios epidemiológicos a seguir, y la cooperación entre los laboratorios de diferentes países en términos de uso de sueros de referencia, controles de los lotes de ELISA y pruebas serológicas bianuales, ha permitido resolver las diferencias entre las legislaciones de cada país individual. En la Tabla 2 se encuentran los detalles respecto de la situación de los países de la UE así como las vacunas permitidas. Se puede observar que en la mayoría de los países, las vacunas marcadoras son utilizadas vivas o inactivadas, y en algunos casos son las únicas permitidas en el contexto de un plan de erradicación. Así, Dinamarca, Suecia, Finlandia, Austria, Noruega y Suiza al igual que la provincia de Bolzano en Italia y varias regiones de Alemania se encuentran libres de BoHV-1. La República Checa y el resto de Alemania tienen programas de erradicación en marcha.

En América Latina la seroprevalencia de BoHV-1 es muy elevada, con niveles de entre 19-84 % en México (Magaña Urbiña et al., 2005), 25-55 % y 75% en rodeos lecheros en Uruguay (Gil et al., 2003), 22-67 % en Perú (Zacarías et al., 2002; Sánchez et al., 2003), en Colombia entre 20 a 53 % (Góngora et al., 1995) y hasta de 74,7 % en algunos casos (Betancur et al., 2006). En Argentina, los índices de seroprevalencia promedian el 60 % del ganado bovino (entre 24,8 y 84,1 % según la región y la edad de los animales) (Odeón et al., 2001), y en Brasil el porcentaje es de entre el 19 y 85 % (Cerqueira et al., 2000; Guiarte Quincozes, 2005). Un estudio reciente informó que la seroprevalencia en el estado de Paraná es de 71,3% (Dias et al., 2008).

País	Estatus	Plan de erradicación	Tipo de vacunas permitidas
Noruega	Libre sin vacunación	No	Ninguna
Suecia			
Finlandia			
Dinamarca			
Austria			
Suiza			
Italia	Libre sin vacunación (Bolzano)	Obligatorio	Convencionales y marcadoras (vivas o inactivadas)
	Endémico	Voluntario	
Alemania	Libre sin vacunación (Franconia y Palatina)	Obligatorio	Marcadoras (vivas o inactivadas)
	Endémico		
República Checa	Endémico	Obligatorio	Marcadoras (vivas o inactivadas)
Eslovaquia	Endémico	Obligatorio	Convencionales y marcadoras (vivas o inactivadas)
Hungría			
Bélgica			
Francia	Endémico	Voluntario	Convencionales y marcadoras (vivas o inactivadas)
Holanda			
Polonia	Endémico	No	Marcadoras (inactivadas solamente)
Irlanda	Endémico	No	Marcadoras (vivas o inactivadas)
España	Endémico	No	Convencionales y marcadoras (vivas o inactivadas)
Reino Unido			
Grecia			

Tabla 2: Estatus de los países de la UE respecto a BoHV-1 (Franken, 2008; Beer y Koenig, 2008; Cavirani, 2008).

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

Diversos trabajos han estudiado los factores que constituyen un riesgo para la infección con BoHV-1. Algunos de estos factores, tales como la edad, el sexo (las hembras son más susceptibles que los machos), el tamaño del rebaño y la carga animal, fueron caracterizados exhaustivamente (Boelaert et al., 2005; Solis-Calderon et al., 2003; Vonk Noordegraaf et al., 2004). Asimismo, se reportaron como factores importantes para el contacto directo de animales (y consecuentemente el contagio de BoHV-1), la adquisición o compra de animales y la participación de los mismos en eventos especiales (van Schaik et al., 2002, 2003). En el estado de Paraná, Brasil, un estudio reciente identificó a los establecimientos productores de carne, con historia de abortos, el uso de servicio natural, la producción en campos arrendados y el ingreso de animales como los de mayor riesgo (Dias et al., 2008).

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

lecheras, y consecuentemente infectar animales negativos. Por lo tanto, los animales *carriers* deben ser identificados en el marco de un programa de control de la infección. La identificación de los mismos se realiza mediante la detección de anticuerpos anti BoHV-1; sin embargo, los anticuerpos adquiridos pasivamente (por el calostro) pueden interferir en la respuesta humoral luego de la infección (Lemaire et al., 1995, 2000a; Bradshaw et al., 1996). Por lo tanto, es necesario desarrollar otras técnicas que permitan detectar a los animales latentemente infectados.

Otro tema de importancia en la epidemiología de BoHV-1 es la capacidad de este virus de traspasar la barrera de especies. Existen evidencias de campo y experimentales que sugieren la infección de diversas especies de rumiantes con BoHV-1; sin embargo, no hay indicios claros de que estas especies actúen como reservorios del virus (Ackermann et al., 1986). En situaciones naturales, se han detectado ovejas y cabras con infecciones agudas y latentes por BoHV-1 (Tolari et al., 1990), pero no tendrían un rol importante en la transmisión del virus a los bovinos (Hage et al., 1997). A su vez se han detectado anticuerpos contra BoHV-1 en muchas especies de rumiantes a campo (Thiry et al., 2006). Se han reportado infecciones experimentales con establecimiento de latencia de ovejas, cabras y búfalos con BoHV-1 (Wafula et al., 1985; Engels et al., 1992; Lehmkuhl et al., 1985; Six et al., 2001; Scicluna et al., 2009), mientras que los ciervos colorados presentan una susceptibilidad limitada (Thiry J et al., 2006; Reid et al., 1986). Por otra parte, los bovinos son susceptibles a infecciones por BuHV-1 (Bubaline herpesvirus 1), CpHV-1 (Caprine herpesvirus 1), CvHV-1 (Cervid herpesvirus 1), CvHV-2 (Cervid herpesvirus 2) y ElkHV-1 (Elk herpesvirus 1) (Deregt et al., 2005; Ackermann et al., 1986; Six et al., 2001; Reid et al., 1986). Se demostró la reactividad serológica cruzada entre estos virus y BoHV-1, pudiendo conducir a diagnósticos erróneos e interferir con los programas de control y erradicación de BoHV-1 (Thiry et al., 2008).

En cuanto a especies que puedan ser utilizadas como modelo de infección, los conejos pueden ser infectados por vía intranasal e intraconjuntival desarrollando signología característica (Valera et al., 2008; Meyer et al., 1996), mientras que los ratones no son susceptibles a la infección. Recientemente, se desarrollaron ratones genéticamente modificados que son altamente susceptibles a la infección con BoHV-1, ya que no producen los receptores de INF- α/β o de INF- γ así como tampoco generan linfocitos B y T maduros (Abril et al., 2004).

1.C. Ciclo de replicación viral

La infección de células permisivas por BoHV-1 se inicia con el proceso de ingreso, el cual ocurre en tres etapas. La primera interacción involucra el pegado lábil entre las glicoproteínas virales (gB y/o gC) y los glicosaminoglicanos celulares (Okazaki et al., 1991, 1993, 1994; Li et al., 1995; Liang et al., 1992, 1993; Mettenleiter et al., 2002). Luego, se produce la unión estable de la glicoproteína D (gD) a un receptor celular (Campadelli-Fiume et al., 2000; Spear et al., 2003). Finalmente, la fusión de la membrana celular con la envoltura viral lleva a la entrada definitiva del

virión (Wild et al., 1998). Este proceso es mediado por las glicoproteínas gB (Gerdtts et al., 2000), el complejo formado entre las glicoproteínas gH/gL (Meyer et al., 1998; Schroder y Keil, 1999) y gD (Liang et al., 1995; Reske et al., 2007). El mecanismo de fusión no está aún completamente dilucidado, excepto el hecho de que la unión de gD con receptores específicos debe ocurrir previamente a la fusión (Spear et al., 2006).

Según estudios realizados con HSV-1, una vez dentro del citoplasma las cápsides son transportadas al núcleo a través de la unión a la dineína de los microtúbulos (Sodeik et al., 1997). En esta unión participarían las proteínas del tegumento UL34 y UL31 (Ye et al., 2000, Dhoner et al., 2002; Reynolds et al., 2004) y/o VP26 (Antinone et al., 2006). La entrada del ADN viral al núcleo ocurre a nivel de los poros de la envoltura nuclear, donde las cápsides liberan el ADN. En cuanto el ADN ingresa al núcleo, éste se circulariza sin necesidad de expresión de proteínas virales (Garber et al., 1993; Fraefel et al., 1993).

Mientras las cápsides son transportadas al núcleo, las proteínas del tegumento son vertidas en el citoplasma, donde tendrían un rol importante en las etapas tempranas de la infección. La proteína VP8 es la más abundante de BoHV-1 (Carpenter et al., 1991; van Drunnen Littel-van der Hurk et al., 1995) y se dirige hacia el núcleo gracias a una secuencia de localización nuclear (Zheng et al., 2004). Para HSV-1, se sugiere que esta proteína tiene la capacidad de unirse a ARN, co-localiza en el núcleo con bICP4, el principal transactivador viral y se probó *in vivo* que se une al menos a un transcripto viral, bICPO (Donnelly et al., 2007). Otra proteína del tegumento es el producto del gen UL41, responsable en BoHV-1 de la supresión de la síntesis de proteínas celulares (Koppers-Lalic et al., 2001) mediante la degradación de los ARNm. La proteína VP16, conocida también como α -TIF (factor transactivador de genes α) es la responsable de la iniciación de la transcripción de genes de BoHV-1, transactivando a los genes inmediato-tempranos (*immediate early*, IE) (genes α). Sin embargo, no todas las proteínas del tegumento se desprenden de la cápside durante el ingreso y se demostró que al menos los productos de los genes UL36, UL37 y US3 se mantienen asociados a la cápside hasta su anclaje a la membrana nuclear (Granzow et al., 2005).

La expresión de genes de BoHV-1 está regulada temporalmente a lo largo de la infección (Wirth et al., 1989). Durante la cascada de transcripción se pueden distinguir tres grupos de genes virales dependiendo del momento de la infección en la cual se expresan: los genes α o genes IE (*immediate early*), los genes β o genes tempranos (*early*, E) y los genes γ o genes tardíos (*late*, L), que codifican proteínas involucradas principalmente en la regulación del ciclo viral, en la replicación del ADN viral y en la morfogénesis de nuevos viriones, respectivamente.

La transcripción de los genes IE es iniciada por un complejo formado por VP16 y proteínas celulares que se unen a una región de las secuencias promotoras de las dos unidades transcripcionales IE (*transcriptional units*, IETu1 y IETu2) de BoHV-1 (Misra et al., 1994, 1995; Wirth et al., 1991). La IETu1 codifica las proteínas bICP0 y bICP4 (Fraefel et al 1994; Schwyzer et al., 1993; Zhang et al., 2005). El transcripto viral *circ* surge de la activación del promotor de IETu1

presente en la unión del genoma circularizado de BoHV-1 (Fraefel et al., 1993). IEtu2 codifica la proteína bICP22. Estas tres proteínas, una vez producidas en el citoplasma, son importadas al núcleo donde inducirán la disminución de la expresión de los genes α y activarán la expresión de los genes β y γ .

Las proteínas codificadas por los genes β presentan su pico de expresión entre las 4 y 8 horas post infección (hpi). Las mismas están implicadas en el metabolismo de nucleótidos y en los eventos ligados a la replicación del ADN viral. Esta última da origen a la formación de concatémeros, una gran molécula de ADN constituida por muchos genomas ligados covalentemente cabeza-cola (Schynts et al., 2003b).

En cuanto a los genes γ , existen dos grupos: los genes γ_1 o tardíos precoces, que presentan una expresión aumentada por la síntesis del ADN viral; y los γ_2 , o tardíos propiamente dichos, en los cuales la expresión es totalmente dependiente de la síntesis de ADN viral. Las proteínas estructurales (cápside, tegumento, envoltura), codificadas por los genes γ , se producen en gran cantidad en el citoplasma o en el retículo endoplasmático. Algunas de ellas migran hacia el núcleo donde se ensamblarán para formar las nuevas cápsides. Estos genes asimismo codifican para las glicoproteínas virales: las glicoproteínas B, D, H, K y L, las cuales son esenciales para lograr una infección productiva en cultivo de tejidos y para la entrada de partículas virales extracelulares a las células; las glicoproteínas C, E, I, G, M y N (UL49,5) son consideradas como no esenciales (revisado por Dingwell et al., 1995; Davison et al., 2002).

El ensamblaje de las cápsides y el empaquetamiento del ADN ocurren en el núcleo de las células infectadas. Este proceso es muy complejo e involucra diversos pasos ordenados: el ensamblaje de los 162 capsómeros ocurre sobre un esqueleto de proteínas (Homa y Brown, 1997); luego, el ADN concatémico es clivado en unidades genómicas por un complejo mecanismo y se empaqueta en la cápside simultáneamente con el desprendimiento de la misma de la estructura proteica de andamiaje (Klupp et al., 2006; Schynts et al., 2002), lo cual estabilizaría las cápsides virales (Roos et al., 2009).

La maduración y la salida de los viriones del núcleo se producen luego de la encapsidación del genoma viral. Se han sugerido diversas hipótesis para explicar los mecanismos involucrados en el trayecto que realizan los viriones para atravesar la barrera núcleo citoplasmática así como la adquisición del tegumento y la envoltura. La primer hipótesis propone que los viriones conservan la envoltura adquirida en la membrana nuclear interna durante todo el trayecto a través del retículo endoplasmático y el aparato secretorio hasta el exterior celular (modelo luminal) (Campadelli-Fiume et al., 1991; Enquist et al., 1998). El segundo modelo es el de *envelopment-deenvelopment-reenvelopment* y es actualmente el más aceptado (revisado en Mettenleiter, 2006a, b) (Figura 4). En este modelo, la envoltura primaria es adquirida cuando las cápsides conteniendo el ADN "brotan" por la membrana nuclear interna hacia el espacio periplásmico (*envelopment*). Luego, se fusiona la envoltura primaria con la membrana nuclear externa, trasladando las cápsides desnudas

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

El proceso secuencial (*envelopment-deenvelopment-reenvelopment*) de egreso viral en la morfogénesis de los viriones ocurre en compartimientos subcelulares distintos e involucra distintas proteínas virales (revisado en Mettenleiter, 2006). Así, en la adquisición de la envoltura primaria es necesaria la interacción entre UL31 y UL34, que forman parte de los viriones primarios pero están ausentes en las partículas maduras (Fuchs et al., 2002). En ausencia de UL31 y UL34, las cápsides intranucleares no alcanzan la membrana nuclear interna para comenzar el proceso de adquisición de la envoltura primaria, y la fosforilación de UL31 por US3 es necesaria para esto en HSV-1 (Mou et al., 2009). La proteína US3, presente tanto en viriones primarios y maduros de PRV (Granzow et al., 2004) y HSV-1 (Reynolds et al., 2002) está involucrada en la pérdida de esta envoltura primaria, ya que en su ausencia viriones envueltos se acumulan en el espacio perinuclear (Klupp et al., 2001). En HSV-1, las glicoproteínas gB y gH actúan de manera redundante para promover la fusión entre la envoltura primaria viral y la membrana externa nuclear, ya que en ausencia de ambas los viriones se acumulan en el espacio perinuclear. La fosforilación de la cola citoplasmática de gB por parte de US3 sería el evento central del proceso de fusión en HSV-1 (Wisner et al., 2009).

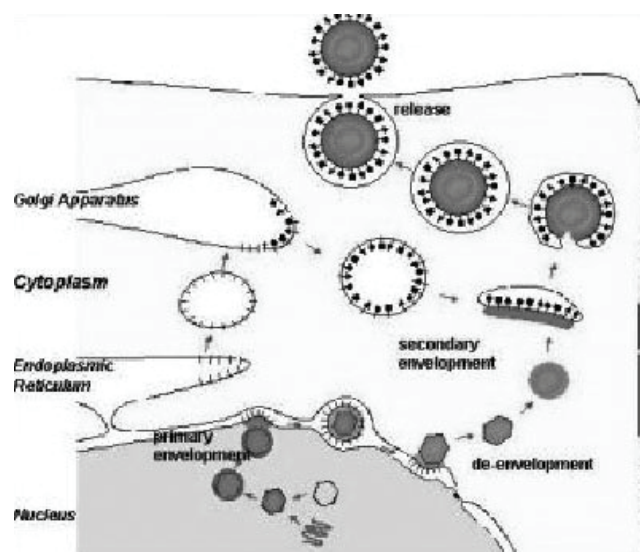


Figura 4. Esquema del modelo "envelopment-deenvelopment-reenvelopment" de egreso de herpesvirus. Figura y leyenda extraídas de Mettenleiter, 2002.

Luego de la fusión entre la envoltura y la membrana nuclear externa, las nucleocápsides son liberadas al citoplasma, donde se comprobó que llevan las proteínas UL36, UL37 y US3 (Fuchs et al., 2002). La adquisición del resto del tegumento y la envoltura secundaria por brotación en vesículas del sistema trans Golgi depende de la interacción de varias proteínas virales, muchas aún no estudiadas. En el sistema de trans Golgi se incorporan otras dos proteínas del tegumento (UL11 y UL49). UL49 interactúa con la cola citoplasmática de gE y gM en PRV (Fuchs et al., 2002) y gH en HSV-1 (Gross et al., 2003) y su ausencia produce la acumulación de cápsides en el citoplasma (Brack et al., 1999, 2000), lo mismo ocurre luego de la delección de UL11 y gM en PRV (Kopp et al., 2004) y en HSV-1 (Leege et al., 2009). En HSV-1, este fenotipo se observó luego de la delección tanto de gE como de gD (Farnsworth et al., 2003), mientras que la delección de sólo una de estas proteínas no mostró alteraciones en la adquisición de la envoltura secundaria y egreso de los viriones (Lee et al., 2009). La proteína UL48 podría ser central en esta etapa de maduración en PRV y HSV-1 y se ha comprobado su interacción con UL46, UL47, UL41, UL49 (Mettenleiter, 2002). La proteína UL48 interactúa con UL3,5 en BoHV-1 y PRV y la ausencia de esta última impide el egreso viral (Lam et al., 2000, 2004; Fuchs et al., 2007). Asimismo, la interacción entre la proteína UL20 y la gK estaría involucrada en la maduración (Fuchs et al., 1997) aunque para HSV-1 esta interacción no sería necesaria y sólo la UL20 estaría involucrada en la adquisición de la envoltura secundaria (Melancon et al., 2007).

Finalmente, la adquisición de la envoltura secundaria y el direccionamiento a las membranas de las células infectadas se produce por la acción de glicoproteínas virales que se encuentran en las membranas de las vesículas derivadas del aparato de Golgi de manera aún no esclarecida, aunque se supone que existe cierta redundancia en la participación de las distintas glicoproteínas en este proceso.

1.D. Patogenia

Entrada, infección aguda y diseminación

La puerta de entrada natural de BoHV-1 la constituyen la cavidad nasal, orofaringe y la conjuntiva ocular, así como la vagina y el prepucio del bovino, siendo el contacto directo la forma de contagio más común. La infección respiratoria se produce por el contacto nariz con nariz entre los animales aunque la transmisión por aerosoles ha sido reportada (Mars et al., 2000b). La infección genital ocurre comúnmente durante la monta pero también puede transmitirse mediante semen contaminado utilizado en inseminación artificial (Parsonson y Snowdon, 1975; Grom et al., 2006; Eaglesome y García, 1997; van Oirschot, 1995).

El mecanismo molecular responsable del tropismo del virus por las células epiteliales de las mucosas respiratoria y genital no ha sido aún dilucidado. La glicoproteína C podría ser la

responsable de la primera interacción entre el virus y la célula del hospedador, aunque esto no ha sido establecido para BoHV-1 ya que los virus deletados en el gen *gC* retienen la virulencia en el bovino (Kaashoek et al., 1998). Sin embargo, diferencias encontradas entre la secuencia nucleotídica de *gC* de los subtipos 1.1 y 1.2 de BoHV-1 (Rijsewijk et al., 1999a) podrían explicar los distintos tropismos de estos subtipos en las infecciones naturales, aunque experimentalmente se ha demostrado que ambos pueden replicar eficientemente en células del epitelio genital y respiratorio (Miller et al., 1984; Smith et al., 1980; Edwards et al., 1991) tal como es el caso de HSV-1 y 2 (Gerber et al., 1995).

Luego de ingresar, el virus se multiplica activamente en las células epiteliales de las mucosas respiratoria y genital y en las tonsilas durante aproximadamente cinco días. Como consecuencia se producen nuevos viriones y la muerte de las células infectadas. Así aparece la patología típica de la infección primaria y se produce el pico de excreción viral, descendiendo hacia los 10-12 días aproximadamente. La replicación local y destrucción de las células infectadas darán origen a las lesiones típicas de la infección viral con BoHV-1 en bovinos, como por ejemplo vesículas en la piel y úlceras en mucosas, lesiones en tracto respiratorio superior y genital.

Luego de un ciclo de multiplicación viral en las células epiteliales del portal de entrada, las partículas virales se diseminan de tres maneras diferentes: local, por viremia y neuronal.

La diseminación local se produce por dos vías diferentes: la propagación extracelular, donde las partículas virales producidas son liberadas al medio extracelular y se diseminan hasta encontrar una célula susceptible; y, la diseminación célula a célula, en la cual las partículas virales pueden pasar directamente de una célula infectada a una célula adyacente. El pasaje de célula a célula puede ocurrir por formación de sincicios debido a la fusión de la membrana plasmática de la célula infectada con la membrana plasmática de las células adyacentes no infectadas (Turner et al., 1998). Se ha demostrado que las glicoproteínas B, D, H y L de HSV-1 son necesarias y suficientes para la fusión de membranas (Turner et al., 1998). Otro mecanismo de pasaje del virus de una célula a otra es a través de las uniones celulares. En este caso, se requiere de la participación de un gran repertorio de proteínas virales: *gE*, *gG*, *gI*, *gB*, *gD*, *gH* y *gL* (Muykens et al., 2003; Nakamichi et al., 2000). Este mecanismo será abordado en mayor profundidad más adelante. Finalmente, un mecanismo adicional de pasaje entre células estudiado en Prv es el de la formación de proyecciones celulares inducidas por la proteína quinasa viral *Us3* que comunican células distantes entre sí (Favoreel et al., 2005).

La diseminación por viremia podría ocurrir en infecciones con BoHV-1, como es el caso de la enfermedad sistémica mortal en terneros seronegativos (Mechor et al., 1987; Higgins et al., 1986) o el aborto en vacas preñadas (Miller et al., 1991). Recientemente se presentaron datos que indicarían, luego de analizar fetos bovinos abortados, que el acceso del virus se habría producido vía hematogena (Crook et al., 2009). Existen evidencias sobre la circulación libre del virus ya que se lo ha aislado de suero de animales infectados experimentalmente por vía intranasal (Kaashoek et al., 1996a). Asimismo, es posible que ocurra una viremia asociada a células linfoides ya que se

demonstró *in vitro* que BoHV-1 infecta leucocitos de sangre periférica (Hanon et al., 1996) Sin embargo, la diseminación asociada a células es controversial porque si bien se ha detectado la presencia de ADN viral por PCR en linfocitos de sangre periférica, no se logró aislar el virus (Fuchs et al., 1999; Mweene et al., 1996).

Luego de la infección inicial de los tejidos periféricos, las partículas virales nuevas invaden el sistema nervioso periférico a través de las terminaciones axonales de las neuronas sensitivas de la región infectada. De esta forma, se establece una infección latente de por vida, que, bajo ciertas condiciones, puede reactivarse y producir una reinfección del tejido periférico. Dependiendo de la especie viral en cuestión, de la virulencia de la cepa y de características del hospedador implicado (especie, edad, estado inmunológico), luego o durante la replicación viral en el SNP, la infección se disemina hacia el sistema nervioso central (SNC) causando infecciones letales (Enquist et al., 1998, 2002). Las mucosas orofaríngea y nasal son invadidas principalmente por ramas de los nervios craneales trigémino y olfatorio. Estos dos nervios constituyen las vías más comunes de acceso al SNP. Si el ingreso del virus fue por vía genital, este replica en las mucosas vaginal y prepucial, estableciendo latencia en los ganglios sacros.

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

Latencia y reactivación

Los alfa herpesvirus poseen la capacidad de establecer latencia en neuronas de ganglios sensoriales (ganglios trigémino y sacro), aunque se ha demostrado la existencia de ADN viral en diversas regiones del SNC y tonsilas (revisado por Vogel et al., 2003). Durante la latencia no se produce virus infeccioso, y solo bajo ciertos estímulos esta situación será revertida induciéndose la reactivación del virus y la re-excreción del mismo en el sitio inicial de infección (Sheffy y Rodman, 1973).

Los procesos de latencia y reactivación son de fundamental importancia a nivel de la virulencia y la patogenia de los alfa herpesvirus dado que el genoma viral latente no puede ser eliminado del hospedador infectado (Muylkens et al., 2003), de modo que un hospedador latentemente infectado constituye un reservorio natural del virus. Asimismo, se han reportado casos de latencia doble: neuronas humanas latentemente infectadas con HSV-1 y VZV (Theil et al., 2003) y bovinos con 2 cepas de BoHV-1 (Whetstone y Miller, 1989) o con BoHV-1 y BoHV-5 (Campos et al., 2009). Hasta el momento no se ha reportado la existencia de una cepa de BoHV-1 que no establezca una infección latente en ganglio trigémino (GT).

El ciclo de latencia-reactivación puede ser dividido en tres etapas principales: establecimiento, mantenimiento y reactivación (Jones, 2003; Jones y Chowdhury, 2007). El establecimiento de la latencia ocurre durante la infección aguda que comienza en las células de las mucosas, con una cascada muy regulada de transcripción de genes virales que lleva a la activación de caspasas y p53 y produce altos niveles de muerte celular programada (Winkler et al., 1999, Devireddy y Jones, 1999). Las partículas virales entrarían a las terminales de las neuronas sensitivas distribuidas en el epitelio, ganando acceso al SNP mediante pasaje célula a célula (Enquist et al., 1998). Si la infección se inició a través de la cavidad oral, nasal o conjuntival, el sitio de latencia lo constituyen los cuerpos de las neuronas sensitivas del GT, a donde llega el virus mediante transporte asociado a microtúbulos a través de los axones. Así, durante los cinco primeros días post infección (dpi), pueden detectarse altos niveles de expresión de genes virales (Schang y Jones, 1997) y virus infeccioso en GT (Inman et al., 2002). Luego, la detección de transcriptos o partículas virales se detiene, pero se puede detectar genoma viral en GT (Mweene et al., 1996; van Engelenburg et al., 1995a; Meyer et al., 2001). El período en el cual se deja de detectar virus infeccioso y expresión de genes virales pero con presencia de ADN viral en GT se considera como el establecimiento de la latencia (Jones y Chowdhury, 2007).

La etapa de mantenimiento de la latencia dura toda la vida del hospedador y se define como el período donde no se detectan partículas virales infecciosas por aislamiento viral (Jones, 2003). El genoma viral "en latencia" está presente en forma de episoma circular (Rock y Fraser, 1983, 1985) y está asociado a histonas celulares (Deshmane et al., 1989).

La etapa de reactivación se inicia luego de que ciertos estímulos externos (por ejemplo, estrés e inmunosupresión) inducen la expresión de genes virales. Hasta el momento no se ha definido si la neurona que realiza la reactivación sobrevive y mantiene la latencia, o si muere como consecuencia de la infección productiva del virus (Jones, 2003). La reactivación de los alfa herpesvirus produce enfermedades recurrentes y transmisión del virus a hospedadores susceptibles. Aunque la reactivación de la infección latente por BoHV-1 no ocasiona, en general, una recurrencia de la enfermedad clínicamente significativa, tiene como consecuencia la dispersión viral en el rodeo y suele ser el origen de un cuadro más severo de neumonía, en la cual la infección viral predispone a la patogenicidad de bacterias comensales del aparato respiratorio bovino (Jones y Chowdhury, 2007).

En el mecanismo de regulación del ciclo de latencia-reactivación está presente la acción de dos transcritos virales: el transcripto del gen *LR* (*latency related*) y del ORF-E. El transcripto del gen *LR* es el primer transcripto viral expresado en neuronas y ha sido detectado en GT a las 24 hpi mientras que no se detectó la expresión de genes IE o E a estos tiempos tempranos (Devireddy y Jones, 1998). El transcripto LR jugaría un rol central en el resultado de la infección viral en neuronas. El gen LR se transcribe en grandes cantidades en neuronas (Rock et al., 1987, 1992; Kutish et al., 1990) y es antisentido al gen *bICP0*. La expresión del gen *LR* estaría regulada por factores dependientes del tipo celular ya que se observó que la ubicación del sitio de inicio de la transcripción de *LR* durante la infección lítica se encuentra río abajo del sitio de inicio de la transcripción durante la infección en GT (Bratanich et al., 1992a; Hossain et al., 1995). El gen *LR* contiene dos ORF (ORF-1 y ORF-2) y codifica para dos productos que promueven el establecimiento de la latencia inhibiendo la apoptosis (Ciacci-Zanella et al., 1999; Delhon et al., 2003; Henderson et al., 2004). Asimismo, el ARN LR es necesario para inhibir la infección productiva, bloqueando la expresión de genes virales mediante la inhibición de la expresión del gen *bICP0* (Bratanich et al., 1992b; Geiser et al., 2002; Schang et al., 1996) y la proliferación celular, impidiendo el ingreso a la fase S del ciclo celular (Schang et al., 1996; Geiser y Jones, 2005).

La expresión tanto del ORF-1 como del ORF-2, así como la presencia de sus productos, ha sido detectada en las neuronas de GT de animales latentemente infectados (Meyer et al., 2007a; Hossain et al., 1995, Jiang et al., 1998). Se demostró recientemente que el producto del ORF-2 posee actividad anti-apoptótica en células de neuroblastoma murino transfectadas (Shen y Jones, 2008). Se determinó que ORF-1 interactúa con un factor de transcripción celular (Meyer et al., 2007b) y que a su vez este factor estimula la infección productiva así como la reactivación del estado latente cooperando con α TIF para activar la función promotora del IEtu1 (Meyer y Jones, 2009). Adicionalmente, se comprobó que el tratamiento con dexametasona de animales latentemente infectados induce la expresión de estos factores de transcripción celulares que estimulan la actividad de *bICP0*, aunque esto no necesariamente culmine en la expresión de genes tardíos ni en la reexcreción viral (Workman et al., 2009). A su vez, se detectó la expresión de una proteína de fusión entre el ORF 1 y 2 (Devireddy et al., 2003; Jiang et al., 2004) a los 7 dpi (7d cDNA) que interactúa con dos proteínas pro-apoptóticas (Meyer et al., 2007b). Esto impediría la muerte programada de neuronas mediada por linfocitos T citotóxicos (Jones y Chowdhury, 2007), contribuyendo al establecimiento de la latencia.

El ORF-E es un marco abierto de lectura presente dentro de la secuencia promotora del gen *LR*, es "*antisense*" al transcripto LR y se encuentra río abajo del ORF de *bICP0*. El transcripto del ORF-E se expresa en células con una infección productiva y en el GT de animales latentemente infectados (Inman et al., 2004). El producto del ORF-E es detectado en los núcleos de estas neuronas del GT con un suero policlonal y produce proyecciones de tipo neuríticas en células de neuroblastoma de ratón transfectadas de manera estable con vectores que expresan ORF-E, lo cual estimularía la restauración de las funciones neuronales luego de la infección contribuyendo al establecimiento y mantenimiento de la latencia (Perez et al., 2007).

Se han realizado varios estudios *in vivo* para determinar el rol del gen *LR* durante las infecciones aguda y latente. De esta forma, bovinos infectados con un virus que no expresa el LR desarrollaron un cuadro clínico más benigno, con excreción viral nasal y ocular reducida y menor aislamiento de virus de tonsilas y GT que el virus salvaje (Perez et al., 2005; Inman et al., 2001). En GT se detectó menor cantidad de ADN viral (Inman et al., 2002) pero mayores niveles de apoptosis hacia el final de la infección aguda (Lovato et al., 2003). Luego de un tratamiento inmunosupresor con dexametasona que indujo la reactivación y reexcreción viral en los bovinos infectados con el virus salvaje, no se detectó reexcreción del virus mutante (Inman et al., 2002). Estos resultados indican que el gen *LR* está involucrado en la reactivación viral en bovinos. El rol del ORF-E en este proceso no ha sido aún estudiado.

Aunque el principal sitio de latencia de BoHV-1 así como de otros alfa herpesvirus son las neuronas del GT, pueden establecerse infecciones latentes o persistentes en sitios no neurales. Se ha detectado genoma viral en tonsilas (Winkler et al., 2000, Perez et al., 2005), células de sangre periférica (Fuchs et al., 1999), linfonódulos y bazo (Mweene et al., 1996), aún en ausencia de virus infeccioso. El transcripto LR no es detectado de manera abundante en tejido linfoide (Winkler et al., 2000) pero sí en tonsilas, promoviendo la reactivación viral en este tejido mediante la expresión de *bICP0* (Perez et al., 2005). En las tonsilas de animales infectados con un virus mutante en el cual no se expresa el gen *LR*, la reactivación se bloqueó luego de la expresión de *bICP0*, sugiriendo que el gen *LR* sería el responsable de los diferentes resultados de la infección en tejidos neurales y no neurales (Perez et al., 2006).

La reactivación viral puede ocurrir luego de la exposición a un estímulo de estrés natural (Thiry et al., 1985b, 1987) o debido a la administración de corticosteroides (Sheffy y Davies, 1972). De esta forma se produce reexcreción viral y transmisión a animales no infectados, generalmente sin manifestaciones clínicas. En las neuronas del GT la reactivación involucra el comienzo de un nuevo ciclo de replicación viral con expresión de antígenos virales (Winkler et al., 2002). La reactivación con dexametasona inducida en conejos latentemente infectados con BoHV-1 mostró que sólo una pequeña proporción de neuronas reactivaba la infección viral (Rock et al., 1992). La progenie viral llega a los sitios de infección primaria a través de los axones neuronales (transporte anterógrado) y se ha sugerido que el estado inmunitario luego de la infección primaria o vacunación y la cepa viral influyen la reexcreción viral una vez que la progenie alcanza el epitelio de la mucosa (Muylkens et al., 2007).

Con respecto al estado inmunitario del animal, se comprobó que la respuesta inmune adquirida luego de la infección natural o luego de un esquema de vacunación controlaría la reexcreción viral (Pastoret et al., 1980). Por lo tanto, intentos de reactivación cercanos a la fecha de primoinfección no inducirían la reexcreción viral en bovinos (Muylkens et al., 2007). Animales con altos títulos de anticuerpos neutralizantes previos a la reactivación no reexcretan virus luego

de un tratamiento con dexametasona (Bosch et al., 1997). La cepa viral utilizada en la primoinfección también determinaría la probabilidad de reactivación y reexcreción de virus. La reactivación experimental de siete cepas distintas de BoHV-1 demostró que no todos los animales infectados reexcretan virus, y que la cantidad de virus reexcretado difiere entre las cepas estudiadas (Kaashoek et al., 1996b). Infecciones con una mutante deletada en los genes *gC* y *gE* estableció latencia pero no se reexcretó luego de la administración de dexametasona (Muylkens et al., 2006b), mientras que sí se reexcretó una cepa TK- (Whetstone et al., 1992). Una cepa de BoHV-1.2 deletada en los genes *gC* y *gI*, así como dos recombinantes entre esta y BoHV-5, establecieron latencia en GT aunque la reactivación en este caso no fue estudiada (Del Médico Zajac et al., 2009c). Respecto a las cepas deletadas en el gen *gE*, en algunos casos se ha reportado reexcreción (Schyns et al., 2003a; Dispas et al., 2003) mientras que en otros no (Franco et al., 2002b; Kaashoek et al., 1994). Esto será abordado en más profundidad más adelante.

La respuesta inmune del hospedador jugaría un rol fundamental en la regulación del ciclo de latencia-reactivación, ya que la presencia de linfocitos T CD8+ productores de IFN- γ previene la reactivación viral en neuronas de ratones latentemente infectados con HSV-1 (revisado por Bystrická y Russ, 2005; Divito et al., 2006). En el caso de BoHV-1, se detectaron focos de infiltración mononuclear en los GT de animales infectados, en los cuales se distinguen células productoras de IFN- γ en contacto cercano con cuerpos neuronales (Winkler et al., 2002). Esto ocurre también durante la latencia, lo cual sugiere que la persistencia de células T podría regular el ciclo de latencia –reactivación (Jones y Chowdhury, 2007). El gen *LR* podría regular esta infiltración ya que se detectaron mayor número de focos de infiltración en los GT de animales infectados con el mutante LR- (Perez et al., 2006). Durante la latencia se detectan, ocasionalmente, células neuronales que expresan antígenos virales y ADN viral, lo cual sugiere la existencia de un nivel bajo de reactivación espontánea (Winkler et al., 2002).

Respuesta inmune inducida, evasión de la respuesta inmune y rol de BoHV-1 en el complejo respiratorio bovino

Una vez que se produce la infección viral, la primera respuesta del hospedador está constituida por reacciones inflamatorias y celulares no específicas (Babiuk et al., 1996; Jones y Chowdhury, 2007). Algunos de los mecanismos no específicos son constitutivos, tal como el sistema de complemento. Los interferones (α/β), inducidos por la replicación del virus dentro de las células, y otros cambios celulares producidos por la infección, modulan el tráfico y el reclutamiento de varios tipos de células efectoras, tales como macrófagos, neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) y células *natural killer* (NK), al sitio de infección (Bielefeldt Ohman et al., 1991; Griebel et al., 1987, 1989). Estas células inducen la secreción de "citoquinas tempranas", las cuales inician la respuesta inflamatoria, reclutan y activan las células inflamatorias, e inician y regulan la respuesta inmune específica (Campos et al., 1994; Denis et al., 1994). La respuesta

inmune celular específica es detectada desde el quinto dpi y alcanza la actividad máxima a los 7-10 dpi. Esta respuesta correlaciona con la recuperación de la infección y es previa a la aparición de niveles significativos de anticuerpos (Babiuk et al., 1996; Romera et al., 2000a). Los linfocitos T colaboradores median la lisis de las células infectadas a través de la secreción de IFN- γ e IL-2 que activan a macrófagos y células NK, y reclutando e induciendo la proliferación de linfocitos T citotóxicos. La respuesta inmune humoral puede ser detectada desde el décimo día pi aproximadamente (Romera et al., 2000a). La respuesta de anticuerpos anti BoHV-1 es considerada más importante en prevenir una infección que en la recuperación de la misma (Babiuk et al., 1996). Los anticuerpos pueden neutralizar partículas virales extracelulares e inhibir su dispersión (por ejemplo en las superficies de mucosas), y participan en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (Rouse et al., 1976). Asimismo, la inmunidad pasiva otorgada por los anticuerpos calostrales de vacas inmunes a BoHV-1, es altamente eficaz en la protección de los neonatos frente a la enfermedad (Mechor et al., 1987).

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

La primera respuesta del hospedador frente a una infección viral consiste en la expresión y secreción de los interferones (IFNs), llevando a las células a un estado antiviral y contribuyendo a la inducción y regulación de la subsiguiente respuesta inmune antiviral. La estimulación celular por IFN- α/β produce la síntesis de la proteína quinasa dependiente de ARN doble cadena (PKR). Luego de la infección viral, se activa la PKR, la cual fosforila la subunidad α del factor de iniciación de la traducción, eIF2 α , y de esta manera, se bloquea la traducción del ARN viral en proteínas dentro de la célula hospedadora. La proteína viral ICP34.5 de HSV-1 contrarresta el efecto de la PKR, ya que desfosforila el factor eIF2 α (Mossman et al., 2002). Asimismo, la proteína US11 es una proteína que se asocia al ARN, impidiendo la activación de la PKR (Cassady et al., 1998). La proteína ICP0 previene la transcripción de los genes regulados por IFN tanto en HSV-1 (Eidson et al., 2002) como en BoHV-1 (Henderson et al., 2005; Jones y Chowdhury, 2007), a través de la inhibición de los factores regulatorios activados por IFN -3 (IRF-3) y IRF-7 (Lin et al., 2004).

Un segundo mecanismo del sistema inmune inespecífico, es el sistema del complemento. La vía alternativa del complemento consiste en una cascada regulada de reacciones que conducen a la destrucción de las células infectadas por la formación de un complejo de ataque a la membrana. La enzima clave para la activación de este sistema es la C3 convertasa. La

glicoproteína C de diversos alfa herpesvirus, interfiere con esta enzima en dos niveles diferentes (Favoreel et al., 2003). El primer mecanismo, reportado en HSV-1, PrV, BoHV-1 y EHV-1 (Fries et al., 1986; Huemer et al., 1992, 1993 y 1995), consiste en la asociación de la gC (a través de un dominio central) al fragmento C3b, el cual es un componente esencial de la C3 convertasa (Friedman et al., 1984). El segundo consiste en la interacción del dominio N-terminal de gC con una proteína sérica, la properdina, la cual interviene en la estabilización de la C3 convertasa. De esta manera, la gC acelera la degradación de la C3 convertasa al secuestrar la properdina (Hung et al., 1994).

Recientemente, se ha descrito un nuevo modo de inmunomodulación en los alfa herpesvirus. Se trata de la interacción viral con el sistema de quimoquinas, las cuales juegan un rol crucial en la organización de las respuestas inmunitarias e inflamatorias antivirales. Los virus han desarrollado tres estrategias que les permiten modular la acción de las quimoquinas: la secreción de quimoquinas homólogas agonistas o antagonistas, la síntesis de receptores homólogos, y la secreción de proteínas solubles que se asocian a quimoquinas. La glicoproteína G, de gran parte de los alfa herpesvirus, representa un ejemplo de la tercer estrategia. Esta glicoproteína, tanto en su forma secretada como expresada a nivel de la membrana plasmática de las células infectadas, posee la capacidad de asociar diversas quimoquinas. De esta manera, bloquea la interacción de la quimoquina con su receptor celular e inhibe la transducción de señales y la migración celular inducida por ella. Este mecanismo se ha demostrado *in vitro* en BoHV-1, BoHV-5, herpesvirus caprino 1 (CpHV-1), herpesvirus cervino 1 (CvHV-1), herpesvirus de reno 1 (RanHV-1), EHV-1, EHV-3 (Bryant et al., 2003) y herpesvirus felino 1 (FeHV-1) (Costes et al., 2005; Van de Walle et al., 2009)

En cuanto a los mecanismos virales de evasión de la respuesta inmune específica, los virus han desarrollado distintos mecanismos para interferir en la detección y eliminación de las células infectadas por los linfocitos T citotóxicos. En este sentido, BoHV-1 ha desarrollado al menos dos mecanismos de regulación negativa (*down regulation*) de la presentación antigénica en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (CMH I). Un mecanismo involucra a proteínas homologas a UL49,5 (glicoproteína N) codificadas por miembros del género Varicellovirus. Estas han sido descritas para BoHV-1 (Gopinath et al., 2002; Koppers-Lalic et al., 2008; Liang et al., 1996), PrV (Ambagala et al., 2000, 2003) y EHV-1 (Koppers-Lalic et al., 2005). La UL49,5 se asocia con gM durante la infección (Jons et al., 1998; Lipinska et al., 2006) e interfiere con el transportador asociado a la presentación de antígenos (TAP) a nivel del retículo endoplasmático, un componente clave de la vía de presentación antigénica citosólica restringida a CMH de clase I (Verweij et al., 2009; Lipinska et al., 2006; Jones y Chowdhury, 2007). UL49,5 de BoHV-1, así como de PRV, EHV-1 y EHV-4 inhiben la traslocación de TAP. Asimismo, la UL49,5 de BoHV-1 media la degradación dependiente de proteosoma de TAP (Lipinska et al., 2009). El segundo mecanismo presente en BoHV-1 sería el de disminuir la síntesis de moléculas del CMH I, en el cual

participa la proteína UL41 (junto a UL49,5). Esta última ha sido identificada como una de las proteínas responsables del *shutt-off* de la síntesis de proteínas celulares (Hinkley et al., 2000). Por otra parte, se reportó que para PRV, la *down regulation* de CMH I se produce tanto por UL49,5 como por US3 (Deruelle et al., 2009)

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

El complejo gE-gI de varios alfa herpesvirus puede actuar de receptor de la fracción Fc de los anticuerpos circulantes así como en la polarización de complejos inmunes sobre la membrana de la célula infectada y su posterior secreción o endocitosis (Favoreel et al., 1997; 2007; Johnson et al., 1987). Asimismo, la propagación viral de célula a célula y el transporte axonal (retrógrado) permiten reducir al máximo la fase extracelular de los viriones y, de esta manera, se evade el reconocimiento por los efectores del sistema inmune (Favoreel, 2008). Estos mecanismos de evasión en los cuales intervendría la gE serán abordados más adelante.

La infección por BoHV-1 incrementa la mortalidad en bovinos ya que modifica algunos aspectos de la respuesta inmune que favorecen la enfermedad bacteriana secundaria (Yates, 1982). Uno de ellos es el daño en el epitelio de las mucosas que reduce el *clearance* de partículas en el tracto respiratorio debido a la pérdida de secreción mucosa y células ciliadas (Tikoo, 1995). Asimismo, la infección por BoHV-1 disminuye la actividad de macrófagos alveolares, neutrófilos y linfocitos. (Brown et al., 1988; Warren et al., 1996, Leite et al., 2005; Winkler et al., 1999). Respecto al sinergismo virus-bacteria, la exposición de leucocitos a citoquinas pro-inflamatorias liberadas en respuesta a la infección por BoHV-1 aumenta la severidad de las lesiones pulmonares (Leite, 2002, 2004). El rol del estrés en la interacción entre virus y bacterias en el tracto respiratorio ha sido estudiado en modelos de infección con BoHV-1 y sobreinfección con *Mannheimia haemolytica* (Babiuk et al., 1996) y se encontró que el estrés estimula la expresión de receptores *toll-like* (TLRs) y sus funciones proinflamatorias a causa de la infección con BoHV-1, lo que en parte explicaría la severidad de las lesiones producto de la infección bacteriana (revisado por Hodgson et al., 2005). Todo esto, en conjunto con los mecanismos de evasión del sistema inmune inducidos por BoHV-1 ya descritos y aquellos propios de las bacterias, participa en la progresión y severidad de la enfermedad respiratoria bovina.

1.E. Cuadro clínico y lesiones inducidas luego de la infección

La infección con BoHV-1 puede producir un cuadro subclínico, rinitis, conjuntivitis, enfermedad genital, abortos, y una infección en el tracto respiratorio denominada complejo respiratorio bovino o fiebre del transporte (*shipping fever*) (Tikoo et al., 1995). Debido a la

inmunosupresión ocasionada por el virus, los animales pueden sufrir infecciones secundarias bacterianas, por ejemplo con *Manhemia haemolytica*, *Pasteurella multocida* y *Haemophilus somnus*, y, en consecuencia, desarrollar neumonía. El complejo respiratorio bovino es considerado como la enfermedad productiva más importante que afecta al ganado bovino. Es una enfermedad multifactorial que tiene al sistema inmune del bovino en el centro de su patogenia y en la cual intervienen como factores predisponentes tanto las prácticas de manejo así como las interacciones entre virus y bacterias (Duff y Galyean, 2007).

La severidad de la enfermedad causada por este virus está influenciada por factores tales como la virulencia de la cepa (Kaashoek et al., 1996b), factores del hospedador que le confieran resistencia (especialmente la edad) y potenciales infecciones bacterianas concomitantes.

Las infecciones subclínicas con BoHV-1 son bastante frecuentes, y su presentación estaría relacionada a características de virulencia de la cepa así como al estado inmunitario del hospedador. Diversas cepas de BoHV-1 poseen una baja capacidad de inducir signos clínicos y se han clasificado como cepas de baja virulencia (Kaashoek et al., 1996b). Los cuadros de signos leves podrían atribuirse a la inmunidad pasiva adquirida por los animales, especialmente en áreas endémicas. En este sentido, se ha demostrado que los anticuerpos colostrales son eficientes en la protección contra los signos clínicos de BoHV-1 (Lemaire et al., 2000b).

El período de incubación de la enfermedad es de 2 a 6 días (Yates, 1982), luego del cual los animales desarrollan pirexia por 4 o 5 días (temperatura máxima de 41°C), acompañada de apatía, sialorrea y anorexia. Las vacas lecheras presentan disminución en su producción durante esos días (Hage et al., 1998; van Schaik et al., 1999). Luego, comienzan a observarse signos respiratorios tales como apariencia rojiza de la mucosa nasal, descarga nasal serosa a mucopurulenta y, en casos severos, estridor traqueal, tos y disnea (Tikoo et al., 1995). Una examinación endoscópica de bovinos infectados con BoHV-1 reveló que el epitelio mucoso de traquea y faringe presentaba apariencia rojiza y numerosos focos necróticos embebidos en exudados fibrinosos (revisado en Muylkens et al., 2007; Jones y Chowdhury, 2007). Asimismo, la infección con este virus induce signos oculares tales como conjuntivitis y secreción mucopurulenta (Hughes et al., 1964; Bartha et al., 1966), que en algunos casos se asocia a la infección concomitante con *Moraxella bovis* dando lugar a un cuadro clínico definido, conocido como queratoconjuntivitis infecciosa bovina (Pugh et al., 1970).

Se han encontrado casos naturales de abortos por BoHV-1 en vacas gestantes en el cuarto a octavo mes, aunque la inoculación experimental de este virus a vacas gestantes en los primeros tres meses también indujo abortos (Chow et al., 1964; Kendrick, 1973; Miller et al., 1986). Sin embargo, el aborto por BoHV-1 es considerado una consecuencia de la infección respiratoria en una vaca seronegativa. El virus atravesaría la barrera materno-fetal y causaría la infección letal del feto, y dado que las lesiones en hígado fetal son observadas en todos los casos, la ruta hematológica a través de las venas umbilicales sería la vía de acceso al feto (Chow et al., 1964; Owen et al., 1964; Crook et al., 2009). A pesar de encontrarse lesiones en la placenta así como en

diversos órganos fetales, la degeneración de la placenta sería secundaria a la muerte fetal por la infección con BoHV-1 (Molello et al., 1966). Un estudio histopatológico detallado de abortos inducidos experimentalmente describió que la lesión principal es la necrosis multifocal hepática y placentitis necrótica, sugiriendo que la patogénesis del aborto por BoHV-1 involucra la infección necrotizante del endotelio vascular de la placenta y de múltiples órganos fetales (Rodger et al., 2007). Hasta el momento, solo los subtipos 1 y 2a de BoHV han sido asociados con abortos (Miller et al., 1991).

Los bovinos neonatos pueden sufrir una infección multisistémica luego de la infección congénita con BoHV-1 antes del parto o una infección temprana post-natal (Mechor et al., 1987; Higgins y Edwards, 1986; Bryan et al., 1994). Estos animales presentan salivación excesiva y diarrea y mueren en 4-5 días. Las lesiones encontradas en el tracto digestivo constan de gliosis, esofagitis y ruminitis aguda necrotizante (Tikoo et al., 1995).

El subtipo genital de BoHV-1 se transmite generalmente durante el apareamiento. La vulvovaginitis pustular infecciosa comienza con micciones frecuentes y leve inflamación de la vagina que progresa a enrojecimiento y edema de la vulva para finalmente producir pápulas en las mucosa que se erosionan y pueden desarrollar úlceras (Yates, 1982). En el toro, se observan lesiones similares en el prepucio y pene dando origen a la balanopostitis infecciosa (van Oirschot, 1995). Si bien la infección está restringida a los órganos genitales, la infección bacteriana secundaria produce cuadros más severos que pueden conducir al desarrollo de orquitis en el toro y endometritis con descarga vaginal purulenta en la vaca (Miller y van der Maaten, 1984; Kendrick y Straub, 1967). El impacto negativo de esta última en la fertilidad de la vaca es transitorio mientras que en los toros se pueden producir adherencias como secuela de la infección que comprometan la *performance* reproductiva futura (Gibbs y Rweyemamu, 1977).

La lesión primaria post infección es la necrosis focal de las mucosas nasal, laríngea, traqueal o genital (Fulton et al., 2009). Esta lesión es probablemente la secuela directa de la replicación viral y el efecto citopático producido. El animal responde con una intensa respuesta inflamatoria local, de modo que las lesiones pueden coalescer y formar pústulas que constituyen grandes acúmulos de leucocitos. Cuando se asocian infecciones bacterianas, pueden observarse lesiones compatibles con bronconeumonía lobar con o sin pleuritis y bronquiolitis necrosante (Fulton et al., 2009). En los fetos abortados se encuentran múltiples focos de necrosis e infiltración leucocitaria, particularmente en el hígado (Rodger et al., 2007). Recientemente se han descrito lesiones de encefalitis en fetos abortados con diagnóstico etiológico confirmado de BoHV-1 (Brower et al., 2008).

El estudio de la distribución de virus infeccioso en el bovino sugiere que BoHV-1 se disemina a numerosos tejidos linfoides y epiteliales cercanos a la puerta de entrada rápidamente luego de la infección. Sin embargo, el aislamiento de virus de los mismos es posible durante los primeros días ya que a la semana la cantidad de tejidos positivos decrece considerablemente (van Engelenburg

et al., 1995a). Sin embargo, es posible detectar genoma viral en estos sitios durante un período más prolongado (Mweene et al., 1996, van Engelenburg et al., 1995a)

1.F. Diagnóstico

El diagnóstico de las enfermedades causadas por BoHV-1 puede presumirse sobre la base de los signos clínicos, histopatológicos y epidemiológicos. Sin embargo, el diagnóstico definitivo requiere la identificación del agente (o sus componentes) y/o la detección de los anticuerpos específicos que induce. En la práctica veterinaria de nuestro país, no se realiza la diferenciación entre BoHV-5 y 1, y entre subtipos de este último (Del Médico Zajac et al, 2009a).

En casos de abortos, cuadros nerviosos y eventualmente casos respiratorios, las muestras (cotiledón placentario, feto, encéfalo, hisopados genitales o nasales) remitidas al laboratorio de referencia pueden ser procesadas por aislamiento viral en cultivos celulares. El efecto citopático en cultivo celular consiste en agrandamiento y redondeamiento de las células así como la formación de sincicios. También puede realizarse el diagnóstico etiológico usando técnicas complementarias como la inmunofluorescencia o la inmunoperoxidasa. La técnica de PCR ha demostrado ser más sensible en el diagnóstico de BoHV-1 a partir de semen (van Engelenburg et al, 1995b).

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

Debido a que el estado de latencia es una consecuencia de la infección con BoHV-1, cualquier animal con anticuerpos debe considerarse como un portador y potencial fuente de infección por la posible excreción intermitente del virus al ambiente.

1.G. Vacunas

En regiones donde se registra un alto número de animales infectados con BoHV-1, la estrategia elegida para el control de las infecciones es la vacunación. La vacunación debe lograr diferentes niveles de protección, desde reducción de la patogenia y la transmisión del virus, hasta la prevención y la erradicación del mismo (van Drunen Littel-van der Hurk, 2006). Asimismo, si se plantea como objetivo la erradicación del virus, es necesario contar con vacunas que sean protectivas y que permitan diferenciar animales vacunados de infectados. Para ello, se desarrollaron vacunas marcadoras o DIVA (*differentiating infected from vaccinated animals*),

basadas en subunidades virales (proteínas virales inmunogénicas) o cepas deleteadas (por ejemplo las cepas BoHV-1 deleteadas en el gen *gE*) (van Drunen Littel-van der Hurk, 2006; van Oirschot, 1999).

Las vacunas para BoHV-1 se pueden clasificar en cuatro tipos: inertes (virus completo inactivado o subunidades), vivas modificadas, génicas y basadas en vectores.

Las vacunas inertes a virus completo se producen por inactivación con calor, tratamiento con detergentes o inactivación química. En este contexto, las vacunas inactivadas resultan ser en general mas seguras, aunque es necesario realizar múltiples aplicaciones, administrarlas con adyuvantes que aumenten su inmunogenicidad, y de acuerdo al método de inactivación, la inmunogenicidad puede verse afectada (Jones y Chowdhury, 2007; Romera et al., 2000a). En la actualidad, EEUU y países de Latinoamérica utilizan estas vacunas convencionales de BoHV-1, multivalentes, asociadas a otros inmunógenos involucrados en la enfermedad respiratoria o abortígena bovina. Vacunas inactivadas a base de BoHV-1 resultaron protectivas frente al desafío viral con BoHV-5 en terneros (Del Médico Zajac et al., 2006).

Tres glicoproteínas virales (gB, gC y gD) han sido propuestas por su inmunogenicidad, como candidatas para su uso como vacunas a subunidades, siendo a su vez potenciales vacunas marcadoras. Si bien las tres demostraron ser protectivas luego del desafío viral cuando se administraron con adyuvantes efectivos, la vacuna formulada a partir de una versión truncada secretada de gD indujo mayores títulos de anticuerpos neutralizantes y redujo de manera más efectiva el cuadro clínico y la replicación viral luego del desafío (van Drunen-Littel van der Hurk et al., 1990; Babiuk et al., 1987; Zhu y Letchworth, 1996). Sin embargo, estas vacunas no han sido probadas a gran escala y no se comercializan en la actualidad.

Las vacunas vivas modificadas se han obtenido por selección de aislamientos atenuados, por pasajes seriados en cultivo de tejidos o por selección de variantes termosensibles. Existen numerosos trabajos donde se han probado los niveles de protección de diversos tipos de vacunas vivas modificadas frente a la infección con BoHV-1 (revisado por van Drunen Littel-van den Hurk, 2006; Castrucci et al., 2002a, b). Estas vacunas lograron reducir la replicación viral, la transmisión y la severidad de la enfermedad, pero no son capaces de prevenir la infección (Ackermann y Engels, 2006; Patel, 2005).

En los últimos 15 años se han desarrollado vacunas mediante ingeniería genética a través de la delección de genes virales no esenciales. Numerosas mutantes virales han sido construidas y sus propiedades *in vivo* han sido estudiadas; entre ellas, la virulencia en el hospedador natural, el establecimiento de latencia y reactivación, la posibilidad de transmisión horizontal así como la inmunogenicidad y protección frente al desafío viral. Estudios utilizando cepas de BoHV-1 con delección de los genes que codifican para gG, gC o TK mostraron conservar su virulencia en el bovino y reactivar del estado latente (Kaashoek et al., 1994, 1996a, 1998; Chowdhury, 1996). Los estudios de una mutante LR- así como de una US9- demostraron que ambos virus estaban atenuados y no reactivaron la infección latente bajo condiciones experimentales (Inman et al.,

2002; Butchi et al., 2007). Asimismo se han desarrollado numerosas cepas deleteadas en el gen *gE* (gE-) que serán descritas con mayor profundidad en la siguiente sección.

Respecto a las vacunas gE-, varios países de Europa han iniciado programas de control con el objetivo de erradicar BoHV-1 basados en el uso de vacunas marcadoras formuladas a partir de una cepa deleteada en el gen *gE* (Tabla 2). Estas vacunas, inactivadas o vivas atenuadas, usadas en conjunto con la detección serológica de anticuerpos específicos contra gE permite discriminar animales vacunados de infectados (van Oirschot, 1997). Luego de comenzar a utilizarlas, se describió que la cepa vacunal contenía otras deleciones además del gen *gE* (Rijsewijk et al., 1999b), y tras varios años de utilización y comercialización, se han planteado algunos inconvenientes. Por un lado, los ensayos de ELISA disponibles que detectan anticuerpos anti gE presentan una baja sensibilidad (Kramps et al., 1996; Perrin et al., 1996). Por otra parte, la cepa vacunal se excreta luego de la administración como vacuna viva, aún en terneros con anticuerpos calostrales (Lemaire et al., 2000c). Asimismo, establece una infección latente (Lemaire et al., 2001; van Engelenburg et al., 1995a) y se ha detectado reexcreción de virus vacunal bajo condiciones experimentales (Lemaire et al., 2001; Schynts et al., 2003a) y naturales (Dispas et al., 2003). Esto ha generado preocupación en dos aspectos: la posibilidad de recombinación de la cepa vacunal con cepas circulantes y la diseminación de la cepa vacunal en los rodeos bovinos (Myulken et al., 2007). Respecto al primero, se han aislado *in vitro* cepas gE- que restauraron su virulencia *in vivo* (Myulken et al., 2006a, b) y se han recuperado un alto número de recombinantes luego de coinfecciones bajo condiciones experimentales (Schynts et al., 2003a). Respecto al segundo aspecto, si bien se ha sugerido que la posibilidad de diseminación sería baja (Mars et al., 2000a, b), la excreción viral luego de la vacunación así como la reexcreción de virus vacunal latente han convertido en un tema controversial el uso de esta cepa como vacuna viva (Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare, European Commission, 2000).

En el marco del proyecto "Mejoramiento de vacunas contra BoHV" subsidiado por la Agencia de Promoción Científica y Tecnológica (BID 802/OC-AR PICT 53), el grupo de trabajo en el cual realicé este trabajo de Tesis desarrolló una cepa marcadora atenuada contra BoHV-1, denominada BoHV-1 Δ gE β gal. La misma fue generada por reemplazo alélico del gen codificante para la glicoproteína E por el gen *lacZ* (Puntel et al., 1999; 2001; Romera et al., 2000b), utilizando la cepa de BoHV-1.1 Los Ángeles (LA) como cepa parental.

Para la construcción de la cepa BoHV-1 Δ gE β gal se amplificaron por PCR las regiones flanqueantes al gen *gE* con oligonucleótidos específicos, degenerados con el propósito de introducir sitios de restricción para el posterior clonado. De esta manera se obtuvieron los fragmentos izquierdo (L) (780 pb) y derecho (R) (630 pb) que se clonaron separadamente en vectores intermedios y se digirieron con endonucleasas de restricción. Luego, los fragmentos resultantes se clonaron secuencialmente en el vector Puc19, dando origen al vector PucLR, que fue digerido con *BamHI*. Por otra parte, el plásmido comercial pCMV β (Clontech) fue digerido con *PstI* liberando el cassette de expresión del gen *lacZ* de *E coli* bajo el promotor inmediato temprano de

CMV y la secuencia de poliadenilación de SV40. Se realizó el “rellenado” de los extremos cohesivos tanto de PuclR digerido con *BamHI* como del cassette de expresión de la enzima β -galactosidasa, y finalmente se ligó el gen marcador con el vector PuclR obteniéndose el vector de transferencia (VT) PuclR β gal de 8,5 Kpb (Figura 5). Luego de realizar los ensayos de cotransfección en células MDBK utilizando el VT y ADN viral purificado en células MDBK se obtuvo y purificó por plaqueo un clon positivo para la actividad de la enzima β -galactosidasa (color azul en presencia del sustrato específico de la enzima). Este clon se caracterizó mediante amplificación por PCR y por *Southern blot* (utilizando las sondas específicas L, R y *gE*), confirmando la delección del gen *gE* y la presencia de las secuencias flanqueantes L y R. La ausencia de expresión de la *gE* se corroboró mediante un ensayo de *Western blot* utilizando un anticuerpo monoclonal dirigido contra dicha glicoproteína (Puntel, 2002a). Tanto la cepa viral obtenida como el método de obtención han sido presentadas ante el Instituto Nacional de la Propiedad Industrial para su patentamiento (Patente: “Cepa mutada recombinante del virus Herpes Bovino de tipo 1, Método para obtener dicha cepa, plásmido vector y vacuna”. Acta N° 02 01 04305- USDA-2002).

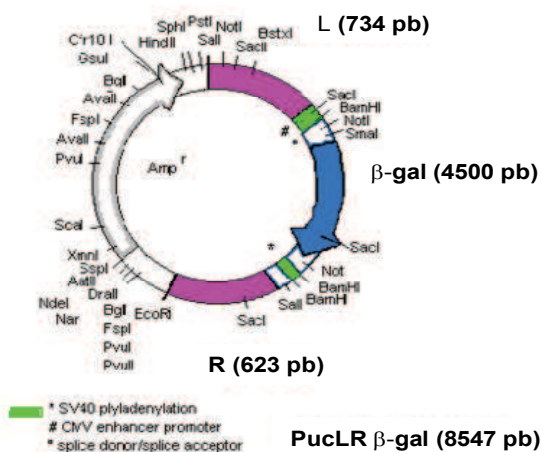


Figura 5: Esquema del vector de transferencia PuclR β gal. Figura y leyenda extraídas de Puntel, 2002a.

Esta nueva cepa genéticamente modificada, administrada como vacuna inactivada o viva fue capaz de proteger bovinos contra el desafío viral con virus BoHV-1 parental (Puntel et al., 2001). La inmunogenicidad de la cepa BoHV-1 Δ gE β gal fue la misma con respecto a la parental cuando se utilizó como inmunógeno inactivado inoculado por vía subcutánea o intramuscular, tanto en la respuesta humoral como celular. Asimismo, esta cepa recombinante fue protectora frente al desafío con la cepa BoHV-1 LA ya que disminuyó la excreción viral y la signología clínica post desafío respecto de los animales control (Romera et al., 2002; Puntel, 2002a). Se demostró que la cepa inactivada puede ser formulada como vacuna en combinación con otros antígenos, para la prevención conjunta de varias enfermedades manteniendo sus características inmunogénicas y protectoras (Romera et al., 2004).

La cepa BoHV-1 Δ gE β gal utilizada como vacuna viva indujo una respuesta inmune específica que resultó protectora frente al desafío viral, inoculada por vía intranasal e intramuscular, y al ser utilizada luego de un proceso de liofilización (Romera et al., 2005). Además, se comprobó que utilizada como vacuna viva es segura en cuanto a los riesgos de abortogenicidad y transmisión a animales no vacunados, y completamente inocua en cuanto a la generación de efectos colaterales en el bovino (Puntel et al., 2001; Romera et al., 2004).

Finalmente, fue posible la diferenciación serológica entre animales vacunados con la cepa BoHV-1 Δ gE β gal e infectados con la cepa salvaje en todas las experiencias en bovinos mediante la utilización de un ELISA diferencial que detecta anticuerpos dirigidos contra la gE (Herdcheck, IDEXX) (Puntel et al., 2002b).

2. LA GLICOPROTEÍNA E (gE)

Las vacunas DIVA o marcadoras que se utilizan actualmente así como la desarrollada en nuestro grupo de trabajo y objeto de estudio de esta Tesis poseen deleciones del gen *gE*. A continuación se describen la estructura y funciones sugeridas para dicha proteína y las propiedades *in vitro* e *in vivo* de las cepas delecionadas en el gen *gE*.

2.A. Estructura

El gen que codifica para la glicoproteína E (gen *gE*) se encuentra ubicado en la región US del genoma de BoHV-1 (Leung-Tack et al., 1994) (Figura 3). La secuencia de dicho gen posee una composición de bases de 70,4% de G-C y un grado de identidad variable en comparación con los genes que codifican glicoproteínas homólogas a gE en otros alfa herpesvirus (53,6% con PRV y 58,2% con EHV-1) (Rebordosa et al., 1994). El marco abierto de lectura codifica para un polipéptido de 575 aminoácidos con una masa molecular estimada de 65 kDa, con dos potenciales sitios de N-glicosilación y dos de O-glicosilación (Rebordosa et al., 1994; Leung-Tack et al., 1994). El perfil de hidrofobicidad de la proteína reveló la presencia de dos regiones hidrofóbicas, ambas conteniendo secuencias compatibles con alfa hélices, una en el extremo N-terminal (posible secuencia señal) y otra a continuación (posible dominio de transmembrana). Asimismo se encontraron dos regiones ricas en cisteínas, una de ellas en el dominio extracelular (Rebordosa et al., 1994).

Una vez sintetizada, la gE se une con la glicoproteína I (gI) en el retículo endoplasmático de forma no covalente (Whitbeck et al., 1996; Yoshitake et al., 1997). La presencia del dominio extracelular de gE, una zona rica en cisteínas, es suficiente para acomplejarse con gI (Tyborowska et al., 2000). La fosforilación de la cola citoplasmática de gE en el residuo tirosina está asociada a su segregación entre compartimientos celulares (Alconada et al., 1996; Shaw et al., 2000). Asimismo, se determinó por mutaciones puntuales que dos motivos basados en tirosinas de la cola citoplasmática de gE de PrV son responsables del agrupamiento de esta glicoproteína en la superficie celular (*capping*) (Favoreel et al., 1999, Desplanques et al., 2007).

El complejo gE/gI es glicosilado en el aparato de Golgi y se sitúa en la envoltura viral y en las membranas de las células infectadas (Whitbeck et al., 1996). La masa molecular de la proteína madura es de 92-94 kDa (Yoshitake et al., 1997; Whitbeck et al., 1996). Estudios *in vitro* de localización subcelular detectaron la presencia de gE en las membranas celulares laterales que están en contacto con células vecinas, y su ausencia de las membranas apical y basal (Nakamichi et al., 2002). Yoshitake et al describieron que la ausencia de gI no altera esta ubicación de gE en las membranas (Yoshitake et al., 1997).

2.B. Funciones *in vitro*

Se han encontrado proteínas homólogas a gE en todos los miembros de la subfamilia *alphaherpesvirinae* (Jacobs et al., 1994) lo cual sugiere que podrían tener funciones biológicas importantes y comunes. El gen *gE* fue clasificado como no esencial en estudios previos (Baranowski et al., 1996; Denis et al., 1996; Schwyzer et al., 1996; Tikoo et al., 1995; Furth et al., 1997). Esto se concluyó principalmente a partir del estudio de cepas vacunales atenuadas o recombinantes, o por comparación directa con genes homólogos codificados por HSV-1. En un estudio reciente utilizando bibliotecas de disrupción o deleción génica, construidas a partir de un clon infeccioso de BoHV-1, se confirmó mediante amplificación por PCR en tiempo real que el gen *gE* es no esencial para la replicación *in vitro* de BoHV-1 (Robinson et al., 2008).

Sin embargo, esta proteína está involucrada en varios aspectos del crecimiento *in vitro* de BoHV-1. Al estudiar la replicación de cepas de BoHV-1 con deleciones en el gen *gE* se encontró que en las cinéticas de un único paso la producción viral era similar a la de los virus parentales (Chowdury et al., 1999; Spilki et al., 2004; Rebordosa et al., 1996; Rijsewijk et al., 1999b; Muylkens et al., 2006a; Kalthoff et al., 2008; Trapp et al., 2003). En algunos casos a las 12 hpi se detectaron alrededor de 10 veces más partículas virales deleteadas que salvajes en la fracción extracelular, alcanzando idénticos títulos finales (Spilki et al., 2004; Rijsewijk et al., 1999b; Muylkens et al., 2006a). Esto se ha atribuido a la limitación que tienen las cepas gE- en el pasaje célula a célula, por lo que la única manera de salida de la célula sería egresando al medio extracelular. Dos trabajos realizados con el genoma viral clonado como un cromosoma bacteriano artificial (BAC) y analizan variantes deleteadas en gE presentan datos de cinéticas de múltiples pasos con resultados no concluyentes (Trapp et al. 2003; Kalthoff et al., 2008). Estudios realizados con cepas gE- de HSV-1 no encontraron diferencias en las cinéticas de un paso excepto a las 12 hpi, donde al igual que para las cepas de BoHV-1 gE-, se encontró mayor cantidad de virus gE- que parental en la fracción extracelular (Balan et al., 1994). Un trabajo en EHV-1 describe iguales cinéticas de un paso para un virus deleteado en gE y la cepa parental (Tsujimura et al., 2006).

Se ha demostrado la disminución en el tamaño de placas de lisis de diversos virus deleteados en el gen *gE* comparado con las cepas parentales, lo cual ha sugerido que la glicoproteína E está involucrada en el pasaje célula a célula de BoHV-1, (Rebordosa et al., 1996; Spilki et al., 2002; Brum et al., 2009; Trapp et al., 2003; Kalthoff et al., 2008). Si bien el dominio extracelular de gE puede acomplejarse con gI, no es suficiente para el pasaje célula a célula, ya que una proteína truncada en dicho dominio forma placas de lisis similares a las de un virus con deleción completa del gen *gE* (Tyborowska et al., 2000). Las funciones de la gE podrían complementarse con las de otras proteínas virales involucradas en el pasaje célula a célula (Muylkens et al., 2006a). En este sentido, se observó un efecto aditivo en la disminución del tamaño de placa de virus dobles deleteados en gE/gG o gE/VP22, lo cual sugeriría cierta

redundancia y la utilización de vías independientes en el pasaje célula a célula (Kalthoff et al., 2008; Trapp et al., 2003).

El mecanismo de pasaje de célula a célula ha sido extensamente estudiado en HSV-1 (Johnson et al., 2002) y se ha demostrado que el complejo gE/gI es necesario para que este proceso sea eficiente tanto en células epiteliales como en neuronas (Dingwell et al., 1994, 1995, 1998; Snyder, 2008). En este pasaje la progenie viral es dirigida específicamente a las uniones celulares de las membranas laterales de las células epiteliales polarizadas (Johnson et al., 2001). El dominio extracelular del complejo gE/gI es necesario para el movimiento de virus a través de las uniones intercelulares, posiblemente uniéndose a receptores que se expresan en estas (Collins et al., 2003; Wisner et al., 2000; Polcicova et al., 2005). El dominio citoplasmático de gE promueve la acumulación de gE/gI en la red de Trans Golgi (Alconada et al., 1999; McMillan et al., 2001). Aquí, al igual que en los endosomas, HSV-1 adquiere la envoltura secundaria (Farnsworth et al., 2003; Wisner et al., 2004). Esto ocurre a tiempos tempranos de la infección y luego el complejo se dirige a las uniones celulares (Farnsworth et al., 2006). Un estudio sobre la distribución subcelular de la gE luego de la infección de células MDBK con BoHV-1 mostró que ésta se localiza únicamente en las membranas laterales en contacto con otras células, con un patrón similar al de la β -catenina, una proteína citoplasmática que sirve de anclaje para el esqueleto de actina a las uniones adherentes, un tipo de unión intercelular. Las uniones adherentes se acumulan en las uniones celulares durante la infección con BoHV-1 (Nakamichi et al., 2002).

Respecto al complejo gE/gI de PRV, hay evidencias de que estaría involucrado en el pasaje célula a célula de partículas virales en neuronas en cultivo (Ch'ng et al., 2005; Tirabassi et al., 1998; Enquist et al., 1998; Mettenleiter, 2003) así como células epiteliales (Zsak et al., 1992). El potencial neuroinvasivo de PRV recae en la intervención de al menos tres proteínas de membrana no esenciales que dirigen el transporte retrógrado del virus (trayecto hacia los ganglios sensoriales): las glicoproteínas E, I y la proteína Us9 (Kritas et al., 1995; Enquist et al., 2002; Brideau et al., 2000; Card et al., 1992; Tirabassi y Enquist, 2000). En BoHV-5, un alfa herpesvirus neuroinvasivo y neurovirulento que infecta bovinos, estas características dependen notablemente tanto de la expresión de gE como de la proteína Us9, ambas involucradas en el transporte viral desde la neurona presináptica hacia la postsináptica (Chowdhury et al., 2000, 2002). Para EHV-1, una cepa gE- utilizada para infectar ratones y hamsters mostró no ser neurovirulenta aunque la neuroinvasividad no fue estudiada (Tsujimura et al., 2006). Se ha sugerido que la habilidad de BoHV-1 de ser transportado de manera anterógrada (desde los cuerpos celulares del GT a las terminaciones nerviosas de la mucosa nasal y el epitelio de las corneas) luego de la reactivación viral en bovinos depende de gE (Brum et al., 2009), y en especial de la cola citoplasmática (Liu et al., 2008), como ha sido sugerido para HSV-1 (McGraw et al., 2009; McGraw y Friedman, 2009).

En cuanto a los procesos de maduración y egreso viral, en PrV se sugirió que la delección simultánea de gM y gE/gI resulta en un drástico impedimento de dichos procesos. Las cápsides

egresan del núcleo pero no adquieren la envoltura secundaria en el Trans Golgi, observándose la presencia de agregados de cápsides rodeadas de un material electrodensito en el citoplasma (Brack et al., 1999). Posteriormente, se definió que la porción citoplasmática de gE y gM eran las responsables de este fenotipo (Brack et al., 2000; Nixdorf et al., 2001) y que el material electrodensito contenía proteínas del tegumento, entre ellas UL49 (Fuchs et al., 2002). Asimismo, una cepa de PRV deletada en los genes gM y UL11 produjo el mismo tipo de agregados (Kopp et al., 2004). En HSV-1, mutantes deletadas en los genes *gD* y *gE* producen agregados similares de cápsides con tegumento en el citoplasma celular (Farnworth et al., 2003). Dado que las colas citoplasmáticas de estas glicoproteínas interactúan con VP22 y UL11 (Farnworth et al., 2007), en conjunto estos trabajos sugieren la participación de diversas glicoproteínas, entre ellas gE, y proteínas del tegumento, durante el ensamblado viral.

Respecto a la participación de gE en la evasión del sistema inmune, se demostró *in vitro* que el complejo gE/gI funciona como receptor para el dominio Fc de las IgG en HSV-1 (Johnson et al., 1987; Johnson et al., 1988; Frank y Friedman, 1989), VZV (Litwin et al., 1992) y PRV (Favoreel et al., 1997). La unión de anticuerpos a la célula infectada mediante el dominio Fc impide la unión de anticuerpos específicos por impedimento estérico y esto interfiere con la lisis de las células infectadas mediada por anticuerpos (Van der Walle et al., 2003; Nagashunmugam et al., 1998). El fenómeno de *antibody bipolar bridging* fue descrito para HSV-1 (Frank y Friedman, 1989) y luego reportado para PRV (Favoreel et al., 2003, 2006). Este es un mecanismo que previene la activación eficiente de los componentes del sistema inmune dependientes de anticuerpos ya que los anticuerpos específicos se unen a sus antígenos blanco mediante la porción Fab y simultáneamente al receptor gE/gI por el dominio Fc. Otra estrategia de interferencia con la respuesta inmune durante la infección por PRV consiste en la eliminación de complejos inmunes de la membrana de células infectadas con este virus. Esto involucra el agregado, la polarización y la secreción o endocitosis de los mismos, donde la región Fc de gE mostró ser necesaria al menos para la etapa de agregación (*capping*) (Favoreel et al., 2007). Además, la fosforilación de dos residuos de tirosina de la cola citoplasmática de gE es crucial para la eficiente polarización de los complejos en zonas definidas de la membrana plasmática de las células infectadas (Favoreel et al., 1999). En monocitos infectados con PRV se produce la internalización de los complejos inmunes en lugar de la secreción de los mismos (Van der Walle et al., 2003). Para BoHV-1 y EHV-1 no existen resultados concluyentes sobre la implicancia de gE/gI en estos mecanismos (Audonnet et al., 1990; Whitbeck et al., 1996). Para BoHV-1 esto ha sido abordado mediante inmunoprecipitación utilizando sueros no inmunes de bovino, porcino, murino, equino y de conejo, sin embargo no se encontraron evidencias claras de que la gE o el complejo gE/gI funcionara como receptor Fc (Whitbeck et al., 1996).

2.C. Funciones *in vivo*

La función de gE de BoHV-1 en la infección *in vivo* se estudió mediante el uso de virus deleteados en el gen *gE* en el bovino, comprobándose que en su ausencia se reduce la virulencia en el huésped natural.

La primera cepa con delección del gen *gE* reportada como atenuada se denominó Za y se comprobó luego que tiene deleteado los genes *gE/gI* y *US9* (Rijsewijk et al., 1999b). La cepa Za fue extensamente estudiada, probándose su capacidad inmunogénica y protectora en formulaciones vacunales inactivada o viva y de aplicación por distintas vías (Bosch et al., 1996, 1997). Luego de la administración intranasal de este virus, todos los animales excretaron altos títulos virales y los signos clínicos consistieron en una leve secreción nasal (Kaashoek et al., 1994; Mars et al 2000a, b). Lo mismo se observó luego de la infección intranasal de terneros con esta cepa que poseían inmunidad pasiva anti-BoHV-1 (Lemaire et al., 2000c, 2001). Asimismo, se determinó que en algunos casos se producía excreción viral luego de la administración intramuscular, mientras que era segura para el uso como vacuna viva en hembras preñadas y terneros (Strube et al., 1996). De esta manera, se determinó que la cepa Za a pesar de inducir un menor título de anticuerpos neutralizantes que las vacunas convencionales era protectora frente al desafío viral, por lo que se ha comercializado desde entonces en distintos países europeos.

Una cepa Lam gE- estudiada en bovinos produce lesiones y signos clínicos leves, se excreta en secreciones nasales y oculares con títulos menores que la parental luego de la infección intranasal (van Engelenburg et al., 1994, 1995a; Kaashoek et al 1996b, 1998; Schynts et al., 2003a) e infecta el mismo número de tejidos que la cepa parental pero por menor tiempo (van Engelenburg et al., 1995a). Asimismo, se comprobó que induce un bajo nivel de anticuerpos neutralizantes aunque protege frente al desafío con el virus salvaje (Kaashoek et al., 1994, 1996, 1998, van Engelenburg et al., 1994). Dos virus recombinantes construidos a partir de la cepa Cooper que poseen deleteado el ORF completo del gen *gE* (reemplazado por el gen *lac z* o GFP) no indujeron signos clínicos luego de la infección intranasal de bovinos (Chowdhury et al., 1999; Brum et al., 2009). Si bien ambas cepas se excretaron en secreciones nasales y oculares, presentaron un menor título y un período de excreción más corto que la cepa salvaje e indujeron menor cantidad de anticuerpos neutralizantes. En Brasil, se construyó un virus gE- a partir de un aislamiento brasilero de BoHV-1.2 (Franco et al., 2002a) que luego de la infección experimental se excretó en secreciones nasales y oculares e indujo signos clínicos leves (Franco et al., 2002b) mientras que no indujo abortos ni se transmitió horizontalmente entre animales (Spilki et al., 2005). Asimismo, un virus deleteado en los genes *gG*, *gE* y *US2*, desarrollado a partir de la cepa Cooper, indujo títulos menores de anticuerpos neutralizantes que la cepa salvaje o parental (Belknap et al., 1999). Una cepa de campo con mutaciones puntuales en el gen *gE* demostró ser virulenta en el bovino (Egyed et al., 2000). Asimismo, un trabajo en el cual se estudiaron *in vivo* mutantes con el fenotipo gE- obtenidas por recombinación *in vitro* entre una cepa deleteada en el gen *gE* y cepas salvajes

mostró que algunas de ellas eran virulentas en el bovino (Muylkens et al., 2006b). Como ya se mencionó, la cepa BoHV-1ΔgEβgal construida en el laboratorio de Inmunología y Herpesvirus del Instituto de Virología de INTA Castelar, se comportó de manera atenuada luego de la vacunación de bovinos con la cepa viva, y no se detectó virus en las secreciones nasales durante el período post-vacunación (Romera et al., 2005). Sin embargo, hasta el momento, no se han estudiado los alcances de esta atenuación, ni se ha caracterizado su comportamiento *in vivo* o *in vitro*.

La glicoproteína E no es necesaria para la neuroinvasión y por ende el establecimiento de la infección latente (Klopffleisch et al., 2006, Knapp et al., 1997). Es por ello que es posible detectar ADN viral en el GT de animales latentemente infectados con diversas cepas gE- (van Engelenburg et al., 1995a; Lemaire et al., 2001; Mweene et al., 1996). Sin embargo, la reactivación de animales latentemente infectados con cepas deleteadas en el gen *gE* es controversial. En diversos ensayos utilizando la cepa Lam gE- no se observó reactivación viral (van Engelenburg et al., 1995a; Kaashoek et al., 1996b, 1998), mientras que en otro trabajo usando la misma cepa reactivaron 4 de los 5 animales tratados con dexametasona (Schynts et al., 2003a). La cepa brasilera 1.2 deleteada en el gen *gE* utilizada como vacuna viva en bovinos no fue aislada de las secreciones nasales de los animales tratados con dexametasona (Franco et al., 2002b). Respecto a la cepa Za, distintos trabajos reportaron la ausencia de excreción viral luego de inducir la reactivación experimentalmente (Kaashoek et al., 1994; Mars et al., 2000a), aunque sí se detectó reexcreción espontánea de esta cepa 8 meses después de haber sido administrada como vacuna viva (Dispas et al., 2003). Otra cepa gE- basada en la cepa Cooper no se reexcretó luego de la administración de dexametasona pero sí se confirmó la expresión de antígenos virales mediante inmunohistoquímica en GT, lo cual indicaría que el transporte anterógrado está comprometido, como ya se mencionó previamente (Brum et al., 2009).

Por todo lo expuesto, en países con alta prevalencia de infección por BoHV-1 como el nuestro, la vacunación es la estrategia de elección para el control de esta enfermedad, resultando de suma importancia contar con una vacuna que además de proteger al rodeo, permita discriminar entre animales infectados y vacunados. La cepa BoHV-1ΔgEβgal podría ser una candidata vacunal para cumplir con esta función.

La inclusión de vacunas marcadoras vivas en distintos esquemas de inmunización en el diseño de planes de control ha sido recomendada y actualmente se utilizan en países de la UE. En este sentido, a pesar de contar con datos acerca de su capacidad protectora e inmunogénica, resulta de particular interés investigar la atenuación de la cepa BoHV-1ΔgEβgal, para conocer su comportamiento y evaluar el impacto que tendría su utilización como inmunógeno vivo.

La cepa parental BoHV-1 LA, a partir de la cual se desarrolló la cepa BoHV-1ΔgEβgal, ha sido escasamente estudiada hasta el momento. El efecto producido por la delección del gen *gE*

puede variar entre recombinantes dependiendo de la cepa a partir de la cual fue construida. Por otro lado, la cepa BoHV-1 LA se utiliza frecuentemente en las experiencias de desafío viral con BoHV-1, por lo que resulta imprescindible el conocimiento de su patogénesis.

Es así que surge como objetivo principal de esta Tesis caracterizar *in vivo* e *in vitro* las cepas BoHV-1 Δ gE β gal y BoHV-1 LA.

Hipótesis y objetivos

HIPÓTESIS

El comportamiento *in vitro* e *in vivo* de la cepa recombinante BoHV-1 Δ gE β gal está atenuado respecto a la cepa parental BoHV-1 LA.

La cepa parental BoHV-1 LA es de menor virulencia que otras cepas salvajes de BoHV-1.

La delección del gen *gE* sumado al fenotipo del virus parental, contribuyen a la marcada atenuación del virus BoHV-1 Δ gE β gal.

OBJETIVOS

General

Caracterizar la atenuación de la cepa BoHV-1 Δ gE β gal *in vivo* e *in vitro* respecto de la cepa parental BoHV-1 LA.

Particulares

- a. Evaluar y comparar la signología clínica y la excreción viral inducida por las cepas BoHV-1 Δ gE β gal y BoHV-1 LA en terneros infectados experimentalmente durante el periodo agudo de la infección y luego de un tratamiento de inmunosupresión.
- b. Estudiar la dispersión y distribución de los virus BoHV-1 Δ gE β gal y BoHV-1 LA o sus componentes en los tejidos de los animales infectados experimentalmente.
- c. Determinar los parámetros de replicación *in vitro* de las cepas BoHV-1 Δ gE β gal y BoHV-1 LA.
- d. Analizar el *background* genómico de los virus BoHV-1 Δ gE β gal y BoHV-1 LA.

Materiales y métodos

1. CARACTERIZACION *IN VIVO*

1.A. Virus y células

Las cepas virales utilizadas en los ensayos in vivo fueron las siguientes:

- BoHV-1 Δ gE β gal: cepa genéticamente modificada basada en el virus salvaje BoHV-1.1 LA obtenida en el Instituto de Virología, INTA Castelar (Puntel, 2002a). El gen que codifica para la glicoproteína E (gen *gE*) fue reemplazado por un *cassette* marcador portando el gen *lac z* (expresa la enzima β -galactosidasa) (pCMV β , Clontech) y
- BoHV-1 Los Angeles (LA) (ATCC).

Todas las cepas fueron propagadas en la línea celular de riñón bovino Mardin Darby (MDBK) a 37°C, 5% CO₂. Para el aislamiento viral a partir de tejidos se utilizó además un cultivo primario de testículo fetal bovino (TFB). Se utilizó como medio de mantenimiento medio de cultivo mínimo esencial de Eagle (MEM-E, Gibco), suplementado con 2 % de suero fetal bovino (SFB) (Gibco) y antibiótico/antimicótico [100 unidades/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomycin y 0,25 μ g/ml de anfotericina B, (Gibco)].

La línea celular y el cultivo primario fueron provistos por la Sección de Cultivos de Tejidos del Instituto de Virología, INTA Castelar.

1.B. Animales

Se utilizaron bovinos serológicamente negativos a BoHV-1, raza Aberdeen Angus de 4-6 meses de edad. Los animales fueron provistos por el Campo Experimental del CNIA de INTA Castelar. El manejo de los mismos se realizó bajo las normas del Código de Bienestar Animal de EEUU (*Guide for the Care and use of laboratory animals, Natural Research Council. National Academy Press, 1996. Washington USA*).

1.C. Diseño experimental I: Infección aguda de bovinos con BoHV-1 LA y BoHV-1 Δ gE β gal

En una primera experiencia se utilizaron 9 bovinos de 4-6 meses de edad serológicamente negativos a BoHV-1 determinados por ELISA. La infección se realizó con la cepa viral LA de BoHV-1 con una dosis total de 10⁸ DICT₅₀ por vía intranasal en boxes de bioseguridad tipo II (Figura 1, Tabla 1A).

En un segundo ensayo se inocularon 6 bovinos de 4-6 meses de edad serológicamente negativos a BoHV-1 determinados por ELISA con la cepa BoHV-1 Δ gE β gal por vía intranasal con una dosis total de 10^8 DICT₅₀ en boxes de bioseguridad tipo II (Figura 1, Tabla 1B).

Para ambas infecciones se utilizó un 11^{vo} pasaje del virus correspondiente. El día de la infección se consideró el día 0 post infección (pi).

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

Luego de realizada la infección, se recolectaron muestras de secreciones nasales día por medio para la evaluación de niveles y período de excreción viral y anticuerpos en secreciones nasales. Se tomaron muestras de suero los días 14 y 42 pi y los correspondientes a la necropsia de cada animal para detectar niveles de anticuerpos.

Se registró la temperatura rectal y la signología clínica de los animales diariamente.

1.D. Diseño experimental II: Tratamiento inmunosupresor de bovinos infectados con BoHV-1 LA y BoHV-1 Δ gE β gal (Figura 1).

El tratamiento inmunosupresor de los grupos infectados con los virus parental y recombinante se realizó en dos experiencias independientes. Durante la primera experiencia se inocularon 2 de los bovinos previamente infectados con la cepa BoHV-1 LA con dexametasona por vía endovenosa con una dosis de 0,1 mg/kg durante 5 días consecutivos (Decadrón, Laboratorio Sidus). Este procedimiento se repitió en la segunda experiencia con 2 bovinos infectados con la cepa BoHV-1 Δ gE β gal.

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

Desde el comienzo del tratamiento se recolectaron muestras de secreciones nasales diariamente para la evaluación de niveles y período de excreción viral y anticuerpos en secreciones nasales; y suero el día del inicio del tratamiento y al día de la necropsia para detectar niveles de anticuerpos.

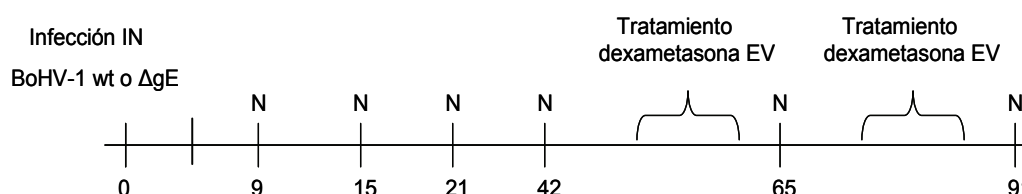


Figura 1: Diseño experimental. N: necropsia. Los números indican los días post infección (pi).

A				B			
N° animal	Necropsia (dpi)	Tratamiento inmunosupresor (dpi)		N° animal	Necropsia (dpi)	Tratamiento inmunosupresor (dpi)	
		Inicio	Final			Inicio	Final
37	5			502	9		
2243	9			506	15		
10	9			287	21		
284	15			189	42		
35	15			509	65	48	52
14	21			1016	91	74	78
2	42						
22	65	48	52				
21	91	74	78				

Tabla 1: A: Animales infectados con la cepa BoHV-1 LA. B: Animales infectados con la cepa BoHV-1ΔgEβgal.

1.E. Ensayo de infección viral de bovinos

Los grupos de bovinos que serían infectados fueron alojados en Boxes de Bioseguridad grado II pertenecientes al CICVyA, INTA Castelar. Estas instalaciones cuentan con cinco salas de aislamiento de las cuales una es doble. Las salas se encuentran unidas a través de un pasillo central. Cada sala simple cuenta con 4 comederos y 2 bebederos independientes y una puerta cepo, mesada y pileta, iluminación general, boca de gas con conector para manguera y argollas para sujeción de animales. Para el ingreso de personal, los boxes cuentan con un vestuario en zona limpia, ducha (no enclavada), vestuario en zona sucia, sala de preparación de materiales, baño en zona sucia, comunicación telefónica. Además, el box posee un sistema de ventilación forzado con renovación del 100% del aire, con sistema de depresión para asegurar que no haya escape de agentes infecciosos al exterior.

La sala de necropsia está equipada con una mesa para realizar las necropsias, digestor para la eliminación de los animales, puente grúa para el manejo de los mismos, pileta, vapor y manguera de alta presión para la higiene del lugar, personal y materiales utilizados en la sala. La sala tiene comunicación con 3 boxes a través de airlock equipados con luz UV y puertas

enclavadas. Además, posee ingreso y egreso independiente de la sala y disponibilidad de duchas en caso de que el personal se retire por la sala y no por los boxes.

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

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

1.F. Evaluación de signos clínicos

El día de la infección se tomó la temperatura rectal y se observó el estado general de los animales a fin de establecer valores basales. Los días subsiguientes a la infección, y hasta el final de la experiencia, los animales fueron examinados día por medio, se registraron en una planilla individual la temperatura rectal, presencia de moco (seroso, seromucoso o mucopurulento), lesiones en la superficie mucosa y conjuntivitis, y el estado general. Para registrar estos datos y evitar interpretaciones subjetivas, se desarrolló una planilla donde se describen detalladamente todas las características a observar, indicando presencia/ausencia y grado de severidad.

1.G. Eutanasia y necropsias

Los animales fueron sedados 1 hora antes de la eutanasia con 0,05 mg/kg de acepromacina (Acedan, Laboratorio Holliday) por vía intramuscular (Plumb, 1999) y luego sacrificados mediante inyección endovenosa de pentobarbital sódico y difenilhidantoína sódica (Euthanyle, Laboratorios Browser). La dosis promedio utilizada fue de 30 mg/kg aproximadamente. La eutanasia se produce por muerte cerebral conjuntamente con colapso circulatorio y paro respiratorio. La muerte cerebral ocurre antes que el paro cardíaco. Luego de la aplicación por vía endovenosa, el pentobarbital sódico produce una rápida acción anestésica y se induce un estado de inconsciencia. Este estado progresa rápidamente a una anestesia profunda con reducción concomitante de la presión sanguínea. Unos segundos más tarde, cesa la respiración debido a la depresión del centro respiratorio, la actividad encefalográfica se hace isoelectrica indicando muerte cerebral y cesa la actividad cardiaca. La necropsia se realizó inmediatamente después del sacrificio.

1.H. Toma de muestras

Durante los períodos pre y post tratamiento inmunosupresor (pt) se tomaron muestras de secreciones nasales y suero según los esquemas de cada diseño experimental.

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

Las muestras de sangre fueron obtenidas de vena yugular utilizando agujas 18G x 1 ½" y jeringas de 10 o 20 ml. Las muestras de suero fueron conservadas a -20°C.

Luego de la necropsia, se tomaron muestras de los siguientes órganos: linfonódulos de cabeza y cuello (mandibular y retrofaríngeo), mucosas nasal, orofaríngea, olfatoria, traqueal, glándula parótida, tonsila, pulmón, hígado, bazo, riñón, bulbo olfatorio y ganglio trigémino (GT).

Las muestras de tejidos tomadas durante la necropsia para estudios de histología se fijaron por inmersión en una solución salina de formaldehído al 4%. El tiempo de fijación fue de 24 horas a temperatura ambiente.

Las muestras para aislamiento viral en cultivo de células se tomaron con material estéril y se transportaron en aluminio y con hielo seco hasta almacenarlas a -80°C.

Los restos de los animales fueron procesados dentro de la sala y desechados al digestor, para luego ser tratados en la planta de tratamiento de residuos.

1.I. Análisis de las secreciones nasales

1.I.1. Titulación viral de secreciones nasales

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

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

1.1.2. Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Purificación de ADN a partir de células infectadas

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

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

Extracción de ADN a partir de secreciones nasales

La extracción de ADN viral a partir de secreciones nasales se realizó con el *kit* comercial *QIAamp DNA Mini kit* (Qiagen). Para ello, se utilizaron 200 μl de cada secreción nasal. El ADN obtenido fue resuspendido en 50 μl de Tris 10 mM pH 8.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los oligonucleótidos utilizados para las reacciones de amplificación por PCR que permiten diferenciar las cepas virales utilizadas se detallan en la tabla 2.

Oligonucleótido	Secuencia (5'a 3')	Amplicón	Tamaño producto	Virus	Fuente
1-gE-F	TCTAGAAGCGAAGAATAAACG	<i>gE</i>	302 pb	BoHV-1 LA	Este trabajo
1-gE-R	GGATCCTGCCAAATGCCCTTT				
gE1	AGGAGACGCAGTTGGCGCTGAC	<i>gE</i>	281 pb	BoHV-1 LA	Schynts et al., 1999
gE2	CAGGAAGTACCAGTCGATGCTG				
gC1	TGTGACTTGGTGCCCATGTCGC	<i>gC</i>	390 pb	BoHV-1 LA y BoHV-1ΔgEβgal	Schynts et al., 1999
gC2	GAGCAAAGCCCCGCCAAGGAG				
B1	CAACCGAGACGGAAAGCTCC	<i>gC</i>	354 pb	BoHV-1 LA y BoHV-1ΔgEβgal	Claus et al., 2005
Bcon	AGTGACGTACAGCGGCTCG				
Beta 2	TTGGCGTAAGTGAAGCGACCC	<i>Lac z + US9</i>	1596 pb	BoHV-1ΔgEβgal	Este trabajo
FD-R	GGTACCGAACTGGCACGTAGC				

Tabla 2. Oligonucleótidos para diferenciación de cepas virales utilizadas.

Las reacciones se realizaron bajo las siguientes condiciones: para reacciones de 12,5 μl finales se utilizaron 5 ng de ADN total (viral y celular), buffer de la enzima Taq ADN polimerasa 1X (GoTaq Green Buffer, Promega), 6% Dimetil-sulfóxido (DMSO) (Sigma), MgCl₂ 2 mM, dNTPs 200 μM (cada uno, Invitrogen), 100 ng de oligonucleótidos sentido y antisentido y 1-2 U de la enzima Taq ADN polimerasa (Invitrogen). Siempre se incluyó como control negativo una reacción de PCR con todos los reactivos excepto el ADN.

Las condiciones finales de ciclado para cada amplificación se detallan a continuación. La temperatura de fusión (T_f) estimada para el paso de hibridación de ácidos nucleicos se calculó según la siguiente fórmula:

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

Amplificación del gen <i>gE</i>	Ciclado	
	Desnaturalización inicial: 95°C, 5 min.	
Oligonucleótidos 1-gE-F y 1-gE-R	45 ciclos	Desnaturalización 95°C, 30seg Hibridación 61°C, 30 seg Elongación 72°C, 1 min.
Tamaño 302 pb	Elongación final: 72°C, 5 min.	
Amplificación del gen <i>gC</i> y <i>gE</i> (Schynts et al., 1999)	Ciclado	
	Desnaturalización inicial: 95°C, 5 min.	
Oligonucleótidos gC1 y gC2 gE1 y gE2	45 ciclos	Desnaturalización 95°C, 30seg Hibridación 56°C, 30 seg Elongación 72°C, 1 min.
Tamaño 390 y 281 pb	Elongación final: 72°C, 5 min.	
Amplificación del gen <i>gC</i>	Ciclado	
	Desnaturalización inicial: 96°C, 10 min.	
Oligonucleótidos B1 y Bcon	45 ciclos	Desnaturalización 96°C, 1 min Hibridación 58°C, 1 min Elongación 72°C, 1 min.
Tamaño 354 pb	Elongación final: 72°C, 10 min.	
Amplificación del gen <i>lac z</i>	Ciclado	
	Desnaturalización inicial: 96°C 10 min.	
Oligonucleótidos Beta 2 y FD-R	35 ciclos	Desnaturalización 96°C, 1 min Hibridación 56°C, 30 seg Elongación 72°C, 2 min.
Tamaño 1596 pb	Elongación final: 72°C 10 min.	

En la Tabla 3 se detallan los resultados esperados para cada cepa viral y en la Figura 2 se observan las reacciones correspondientes.

	Lac Z	gE	gC
BoHV-1 LA	-	+	+
BoHV-1ΔgEβgal	+	-	+

Tabla 3. Resultados esperados de la amplificación por PCR de los virus bajo estudio. (+): Resultado positivo. (-): Resultado negativo

(+):

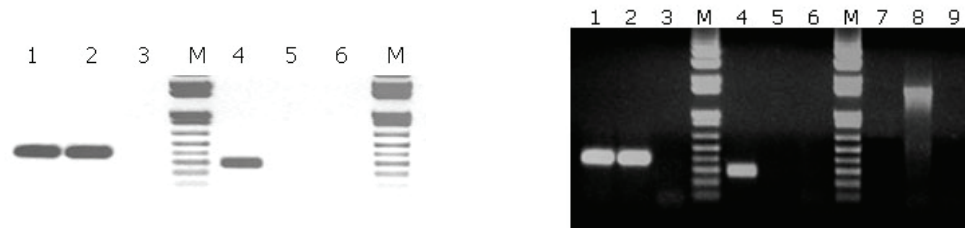


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación por PCR. Calles 1, 4 y 7: BoHV-1 LA. Calles 2, 5 y 8: BoHV-1ΔgEβgal. Calles 3, 6 y 9: Control negativo. **A.** Calles 1-3: fragmento de 354 pb del gen *gC*. Calles 4-6: fragmento de 302 pb del gen *gE*. **B.** Calles 1-3: fragmento de 390 pb del gen *gC*. Calles 4-6: fragmento de 281 pb del gen *gE*. Calles 7-9: fragmento de 1596 pb del gen *lacZ*. M: Marcador de peso molecular (1 Kbp Plus, Invitrogen).

Electroforesis en geles de agarosa nativos

Las muestras de ADN se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa de concentraciones entre 0,8 % y 1,5 % en *buffer* TAE 1X (Tris-acetato 10 mM, EDTA 1 mM) a 5-10 V/cm². Para visualizar las bandas de ADN se utilizó bromuro de etidio a una concentración de 0,5 μg/ml de gel y un transiluminador de luz UV. Las muestras se sembraron con *buffer* de siembra de concentración 10X (glicerol 50 %, TAE 5x, azul de bromofenol 1%).

Los geles se fotografiaron utilizando el equipo Fotodyne y el programa *Quantity One* (Bio-Rad).

1.J. Evaluación respuesta inmune humoral

1.J.1. Ensayo de ELISA para determinación de anticuerpos totales en suero

Este ensayo fue puesto a punto previamente (Romera et al, 2000a) y se describe brevemente a continuación.

Producción de antígeno

En los ELISAs que se describen a continuación se utilizó como antígeno el virus BoHV-1 cepa LA semipurificado. Se infectaron botellas de cultivo celular de 75 cm² de superficie (T75) conteniendo una monocapa de células MDBK con el virus a una moi de 0,1. Cuando el efecto citopático fue extensivo, las botellas fueron congeladas a -70°C; luego se descongelaron y congelaron 2 veces para liberar las partículas virales intracelulares. Esta suspensión se trasvasó a los tubos correspondientes y se centrifugó durante 30 min a 3000 x g para clarificar las producciones virales y reducir la presencia de detritos celulares. El sobrenadante fue transferido a tubos de ultracentrífuga y se centrifugó a 12000 x g por 2 horas a 4°C. A continuación, se descartó el sobrenadante y el pellet conteniendo el virus fue resuspendido vigorosamente en 500 μl de

buffer NET pH 7,5 (Tris base 20 M, NaCl 0,12 M, EDTA 0,01 M) y transferido a criotubos de 1,5 ml. Se agregó un volumen de glicerol 100 % y se guardó a -20°C hasta su utilización. Este mismo procedimiento se realizó con cultivos celulares no infectados de modo de producir el antígeno negativo (restos celulares).

Las producciones de antígeno positivo y negativo fueron diluidas en buffer carbonato bicarbonato pH 9.6 (Na₂CO₃ 0,015 M, NaHCO₃ 0,035 M) y sembradas en placas de 96 pocillos (Immulon IB, Dynatech Laboratories) en columnas alternadas. Se incubaron durante la noche (12-16 hs) a 4°C (paso de sensibilización) y al día siguiente fueron lavadas 3 veces con buffer fosfato salino (PBS) 1 X conteniendo Tween 20 al 0,05 % v/v (Promega) (PBS-T). Como primer paso se realizó un bloqueo con el buffer PBS-T ovoalbúmina 1% p/v (PBS-T-OVA) durante 30 min a 37°C con agitación, este buffer fue utilizado para todas las diluciones subsiguientes. Luego de la etapa de bloqueo se colocaron los sueros bovinos diluidos en forma seriada (1:4) comenzando en 1/40 para los sueros incógnita y control negativo y 1/2560 para el control positivo. Las placas se incubaron por 30 min a 37°C en agitación y luego de 3 lavados con PBS-T-OVA, se agregó el anticuerpo anti bovino conjugado con la enzima peroxidasa (peroxidasa de rábano, HRP, horse radish peroxidase -Kirkegaard & Perry Laboratories, KPL) diluido 1:2000. Luego de una incubación de 30 min a 37°C en agitación, se realizaron 3 lavados con PBS-T y se agregó la solución de revelado compuesta por ácido sulfónico 2-2'-azino-bis-3-etilbenceno-6-tiazolin 1 mM (ABTS) (SIGMA) y 3% p/v peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en buffer citrato pH 5 (ácido cítrico 0.457 M). Las densidades ópticas fueron medidas en un lector de ELISA (Multiskan EX, Termo Labsystems) a una longitud de onda de 405nm (A405). La reacción se dejó progresar hasta que el valor de A405 del suero control positivo alcanzara valores entre 0,6-1,2 (entre 10 y 20 minutos). El título de cada muestra se calculó como el logaritmo de la inversa de la máxima dilución de la muestra que alcanzara una A405 corregida (A405 antígeno positivo – A405 antígeno negativo) mayor o igual al 40% de la A405 corregida del suero control positivo.

1.J.2. Ensayo de ELISA para evaluación de IgA e IgG1 en secreciones nasales

El ensayo de ELISA utilizado para detección de IgA e IgG1 en secreciones nasales fue desarrollado previamente en nuestro laboratorio (Del Médico Zajac, 2006). Brevemente, se sensibilizaron placas de 96 pocillos (Immulon IB, Dynatech Laboratories) con antígeno positivo y negativo en columnas alternadas. Luego del paso de bloqueo de las placas, se agregaron las muestras de secreciones nasales incógnita en diluciones seriadas de orden 4, comenzando en 1/8; las secreciones control positivas y negativas se utilizaron en una dilución 1/8. Luego de una incubación de 45 min a 37°C en agitación, se volcó el sobrenadante, se lavaron las placas tres veces con PBS-T y se agregó el anticuerpo monoclonal (AcM) anti IgG1 de bovino (DAS17) o anti IgA de bovino conjugado con peroxidasa (Bethyl Lab, Inc). Luego de incubación y lavados, a la placa para detección de IgG1 se le agregó el anticuerpo anti ratón conjugado con peroxidasa, según lo descripto en la sección anterior. Finalizada dicha incubación, se agregó a ambas placas la solución de revelado conteniendo 3 % p/v H₂O₂ y OPD (orto-fenildiamina 0,06 mg/ml, Sigma) en

buffer citrato fosfato pH 5 (ácido cítrico 0,035 M, Na₂HPO₄ 0,067 M). Luego de 10 min la reacción fue frenada agregando H₂SO₄ 2,5 M y la absorbancia se midió a 490 nm (A₄₉₀). El título de cada muestra analizada se calculó como en logaritmo de la inversa de la máxima dilución de la muestra que alcanza una A₄₉₀ corregida mayor o igual al 30 % (IgA) o 10 % (IgG1) de la A₄₉₀ corregida de la secreción control positiva.

1.J.3. Ensayo de seroneutralización

El ensayo de seroneutralización (SN) realizado se basa en el método virus fijo-suero variable. Los sueros incógnita, control positivo y negativo fueron inactivados durante 30 min a 56°C, se realizaron las diluciones en MEM-E y se incubaron por cuadruplicado con 200 dosis infecciosas en cultivo de tejidos (DICT) de BoHV-1 en una placa de cultivo sin células. Luego de una incubación de 1 hora a 37°C, la mezcla suero-virus fue transferida a una placa de cultivo celular de 96 pocillos fondo plano (Costar, Corning Incorporated) conteniendo células MDBK. Luego de 72 horas de incubación a 37°C y 5 % de CO₂, las placas fueron observadas para evaluar la presencia de ECP. El título de anticuerpos neutralizantes fue calculado como el logaritmo de la inversa de la máxima dilución a la cual no se observa ECP. En cada ensayo se incluyó una titulación viral para confirmar la cantidad de DICT utilizadas y un control de viabilidad celular.

1.K. Análisis de los tejidos

1.K.1. Aislamiento viral

Los tejidos obtenidos en las necropsias y conservados a -80°C se cortaron con material estéril hasta obtener una pieza de 1 cm por 1 cm. En un mortero previamente enfriado, se colocó la muestra, hasta 1/10 del volumen de arena estéril y 3 ml de MEM-E. Se mortereó hasta disgregar completamente el tejido. Se pasó la suspensión a un tubo de centrifuga y se lavó el mortero con 2 ml adicionales de MEM-E que se incorporaron al tubo. Se centrifugó durante 20 minutos a 11000 g (Sorval RC5C). El sobrenadante obtenido se utilizó para infectar monocapas de células MDBK y TFB (muestra pura y diluciones 1/10 en MEM-E). Se incubó durante 1 hora a 37°C y 5% de CO₂, se retiró el inóculo, se realizaron 2 lavados con MEM-E y se incubó 72 horas con MEM-E 2% SFB a 37°C y 5% de CO₂. Las monocapas se observaron diariamente en busca de efecto citopático.

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

Inmunofluorescencia directa

Las monocapas negativas luego del tercer pasaje fueron procesadas para detección de antígenos virales mediante inmunofluorescencia. Brevemente, las células fueron fijadas con acetona al 40% en PBS 1X durante 20 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregó el antisuero policlonal anti BoHV-1 conjugado con isotiocianato de fluoresceína (VMRD) y se incubaron durante 30 minutos a 37°C en cámara húmeda. Finalmente, se realizaron 2 lavados con PBS 0,01M y se observaron al microscopio de fluorescencia (Olympus BX40).

1.K.2. Inmunohistoquímica

Inclusión de las muestras en parafina, confección de los tacos de parafina y cortes.

Luego de la fijación de los tejidos, éstos fueron incluidos en parafina. Brevemente, las muestras fijadas se tallaron con bisturí y se acomodaron en los *cassettes* histológicos, debidamente identificados. Las piezas fueron deshidratadas en alcoholes de graduación creciente hasta etanol absoluto, y se aclararon en xileno para extraer el agente deshidratante. Se introdujeron los *cassettes* en parafina líquida para embeber completamente la muestra. Todo esto se realizó en un equipo automatizado (Citadel 2000) del Laboratorio de Histopatología, Instituto de Patobiología, CICVyA. Finalmente, las piezas se retiraron del *cassette* y se colocaron en un molde según la orientación deseada de corte, al cual se le vertió parafina líquida y se dejó solidificar a temperatura ambiente.

Con un micrótopo (Leica) se realizaron cortes de 3 µm y se montaron sobre portaobjetos silanizados (Dako).

Inmunohistoquímica

Para disolver la parafina, los portaobjetos debidamente identificados se sumergieron dos veces durante 10 minutos en xileno. Luego, se hidrataron en soluciones con porcentajes decrecientes de etanol, 5 minutos en etanol 100%, 5 minutos en etanol 96%, 5 minutos en etanol 70% y finalmente 5 minutos en agua bidestilada. Se realizó el bloqueo de las peroxidasas endógenas incubando los portaobjetos durante 30 minutos en una solución 3% de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en PBS y se lavaron sucesivamente con agua bidestilada y *buffer* tris salino (TBS) con 0,5% de Tween 20 (TBS-T) durante 5 minutos. La recuperación antigénica se realizó con Proteasa XIV (Invitrogen) 0,05% en PBS 0,1M incubando 15 minutos a 37°C en cámara húmeda.

El anticuerpo primario se diluyó 1/5000 en Tris-HCl 0,05M pH 7,6 y 1% de albúmina sérica bovina (Sigma) y se incubó con los portaobjetos a 4°C durante 16 horas en cámara húmeda. Se utilizó como anticuerpo primario líquido ascítico proveniente de un ratón inoculado con un hibridoma secretor de anticuerpos anti BoHV-1 producido en nuestro laboratorio. Luego de 2

lavados con TBS-T, las muestra fueron incubadas 10 minutos a temperatura ambiente con un anticuerpo anti ratón biotinilado (Dako) y luego incubadas 10 minutos a temperatura ambiente con estreptavidina peroxidasa de rábano (HRP, *horse radish peroxidase*) (Dako). Finalmente se reveló por tratamiento con una solución de 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) (AEC 0.1M, H₂O₂ 3% en buffer acetato pH 5) durante 20 minutos a 37°C. La contratinción se realizó con hematoxilina de Mayer durante 1 minuto, sumergiendo luego los portaobjetos en agua corriente para producir el viraje de color. Por último, los portaobjetos fueron montados con glicerina preparada en PBS para su visualización al microscopio óptico.

1.L. Amplificación por PCR a partir de tejidos

1.L.1. Extracción de ADN a partir de tejidos congelados

Piezas de aproximadamente 100 mg de GT y tonsila fueron homogeneizadas en un mortero previamente enfriado, mediante el agregado de nitrógeno líquido, hasta obtener un polvo fino. Este polvo se utilizó para infectar monocapas de células MDBK, lo que permite excluir que la presencia de ADN en el tejido se deba a la replicación del virus en las células del tejido.

El resto de la muestra fue digerida con buffer de lisis (Cloruro de sodio 0,15M; Tris-HCl pH=7,5 20mM; ácido etilendiaminotetraacético [EDTA, Sigma] pH=8 10mM; N-laurilsarcosine sódico 0,5% [Sigma]; Proteinasa K 33 U/ml [Invitrogen]; Ditioneitol [DTT, Sigma] 40mM) durante 16 horas a 56°C. El ADN fue extraído dos veces con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (Invitrogen) y precipitado con etanol absoluto. El pellet se resuspendió en 60 µl de Tris 10 mM pH=8.

Alternativamente, la extracción de ADN se realizó mediante el uso de un kit comercial QIAamp DNA Mini kit (Qiagen). Para ello, se utilizaron 50 mg de cada muestra. El ADN obtenido fue resuspendido en 60 µl de Tris 10 mM pH=8.

1.L.2. Amplificación por PCR

A partir del ADN extraído de los GT y tonsilas, se amplificó por PCR un fragmento interno del gen codificante para la enzima gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa (gen *gapdh*), gen celular de expresión constitutiva. Para la amplificación de este gen se utilizaron 2 µl del ADN obtenido, *buffer* de la enzima Taq ADN polimerasa 1X (Go Taq Green, Promega), dNTPs 200 µM, 100 ng de oligonucleótidos sentido y antisentido (GAPDH-F y GAPDH-R) y 1 unidad de enzima Taq DNA polimerasa (Invitrogen). La secuencia de los oligonucleótidos y el programa de ciclado se detallan a continuación:

Oligonucleótido	Secuencia (5'a 3')	Amplificón	Tamaño producto	Fuente
GAPDH - F	GCATCGTGGAGGGACTTATGA	GAPDH	250 pb	Este trabajo
GAPDH - R	GGCCATCCACAGTCTTCTG			

Amplificación del gen <i>gapdh</i>	Ciclado	
	Desnaturalización inicial: 95°C 5 min.	
Oligonucleótidos GAPDH-F y GAPDH-R	30 ciclos	Desnaturalización 95°C, 1 min Hibridación 53°C, 1 min Elongación 72°C, 1 min.
Tamaño 250 pb	Elongación final: 72°C 10 min.	

Seguidamente, las muestras positivas a la amplificación por PCR del gen *gapdh* se analizaron en busca de ADN viral. Para esto, se realizaron dos reacciones de PCR para amplificar un fragmento de 390 pb del gen *gC* y un fragmento de 281 pb del gen *gE* de BoHV-1 y los productos se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa como se describió en la sección 9.B. Asimismo, mediante diluciones seriadas de ADN de ambos virus se calculó la sensibilidad de las reacciones de PCR utilizadas, confirmando el valor publicado por Schynts et al. (1999) de 0,5 pg de ADN viral.

2. CARACTERIZACIÓN *IN VITRO*

2.A. Virus y células

Las cepas virales utilizadas en los ensayos *in vitro* fueron las siguientes:

- BoHV-1ΔgEβgal (Puntel, 2002a),
- BoHV-1 Los Angeles (LA) (ATCC),
- BoHV-1 Colorado (ATCC),
- BoHV-1 Lam (Metzler et al., 1985) y
- BoHV-1 Difivac (Rijsewijk et al., 1999b).

Éstas dos últimas cepas fueron provistas por el Dr. Thiry del Departamento de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Virología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Liege, Bélgica.

La propagación de las cepas virales y el mantenimiento de los cultivos celulares se llevaron a cabo tal como se detalla en la sección 1 de Materiales y Métodos de caracterización *in vivo*.

2.B. Titulación viral

La cuantificación de virus infectivo se realizó por titulación a punto final como ya se detalló en la sección anterior de Materiales y Métodos.

2.C. Cinética de penetración

(modificado de: Mettenleiter, 1989; Osterrieder et al., 1996; Neubauer et al., 1997)

En dos ensayos independientes, monocapas de células MDBK crecidas en placas de 6 pocillos fueron enfriadas a 4°C durante 15 minutos e infectadas con BoHV-1 LA o BoHV-1ΔgEβgal (300 unidades formadoras de placa [UFP] por ml) por duplicado. Se incubaron durante 2 horas a 4°C para permitir la adsorción del virus a las células pero no la penetración. Luego, se retiró el inóculo, se agregó MEM-E pre-calentado a 37°C y las células se incubaron a esa temperatura. El cambio de temperatura permite la penetración viral y se consideró ese momento como el tiempo 0 del ensayo. A los 0, 5, 15, 25, 40, 60 minutos después del cambio a 37°C se retiró el medio y se lavaron las células con PBS. Uno de los pocillos (tratamiento control) se incubó durante 2 minutos con PBS mientras que el otro pocillo (tratamiento ácido) se incubó con 2 ml de una solución ácida (135 mM

NaCl, 10 mM KCl, 40 mM de ácido cítrico, pH 3) para inactivar los viriones que no hubieran penetrado. Luego de 2 lavados con PBS 1X se agregó a todos los pocillos 4 ml de un medio semisólido de carboximetilcelulosa (CMC) (1,5% CMC [Sigma], SFB 2% en MEM-D 2X). Las placas se incubaron durante 72 horas y se tiñeron con cristal violeta. Se contaron las placas de lisis en el pocillo tratado y en el control para cada tiempo ensayado y se calculó el porcentaje de penetración de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de penetración} = \frac{\text{número de placas de lisis luego del tratamiento ácido}}{\text{número de placas de lisis luego del tratamiento control}} \times 100$$

2.C.1. Tinción con cristal violeta

Se extrajo el medio semisólido de las placas de células por volcado y se agregó 1 ml de formaldehído 4% (formaldehído 10% preparado en PBS) por pocillo. Se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el formol y se incubó durante 20 minutos con 1 ml de solución de cristal violeta por pocillo (cristal violeta 1%, etanol 10% en PBS, filtrado). Se retiró el colorante y se lavó bajo agua de canilla. Se dejó secar sobre papel durante 24 horas. Finalmente se contaron las placas en cada pocillo.

2.D. Cinética de replicación viral

Monocapas de células MDBK crecidas en placas de 60 mm de diámetro (p60) fueron infectadas, en dos ensayos independientes, con BoHV-1 LA, BoHV-1ΔgEβgal (11vo pasaje) o BoHV-1 Colorado, a multiplicidades de infección (moi) de 0,1 y 5 (cinética de múltiples pasos y de un único paso, respectivamente). Luego de la infección, las placas fueron incubadas 2 horas a 4°C para sincronizar la adsorción y posteriormente, 2 horas a 37°C. Luego, fueron tratadas con solución ácida (40mM ácido cítrico, 10 mM KCl, 135 mM NaCl) durante 2 minutos, con el fin de inactivar las partículas virales que no hayan penetrado en las células, y lavadas con PBS 1X. Finalmente, se agregó medio MEM-E 2% SFB y se incubó a 37°C por tiempos diferentes. Los tiempos de incubación ensayados fueron: 0; 3; 6; 12; 24; 36; 48 y 72 horas pi (hpi) para la moi 0,1 y 0; 3; 6; 9; 12; 15; 18 y 24 hpi para la moi 5. Para cada uno de los tiempos se obtuvieron, separadamente, las fracciones intracelular (células cosechadas en 3 ml de MEM-E) y extra celular (3 ml del sobrenadante). Estas fracciones fueron tituladas en MDBK según lo detallado anteriormente. Cada tiempo se realizó por duplicado y cada fracción fue titulada dos veces.

2.E. Ensayo de tamaño de placa de infección

Monocapas de células MDBK fueron crecidas en placas de 12 pocillos e infectadas con diluciones seriadas en base 10 de las cepas virales BoHV-1 LA o BoHV-1ΔgEβgal. Luego de 2 horas de incubación a 37°C el inóculo viral fue removido y se agregaron 2 ml de medio semisólido con CMC por pocillo. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 72 horas. Transcurrido este tiempo, las células fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) 4% (2 g PFA en 50 ml de PBS 1X) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó un lavado con PBS 1X y las células fueron incubadas con un anticuerpo anti BoHV conjugado con FIT-C (FITC) (VMRD, Inc.) durante 1 hora a 37°C en oscuridad. Luego las células fueron lavadas con PBS 1X y las placas de infección fueron fotografiadas con una cámara digital (Olympus C-7070) acoplada a un microscopio de fluorescencia. El área de las placas de infección fue calculada con el programa *ImageJ* (*ImageJ* se encuentra disponible en <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

2.F. Ensayo de tamaño de placa de lisis

La infección de las células se realizó según lo descrito en el punto anterior. Se utilizaron las cepas BoHV-1 LA, BoHV-1ΔgEβgal, BoHV-1 Lam y Difivac. Luego de 72 horas de incubación a 37°C, las placas de lisis generadas por la infección fueron fijadas y teñidas con cristal violeta, según se describió anteriormente. Finalmente placas de lisis aisladas y elegidas al azar fueron fotografiadas y se utilizó el programa *ImageJ* para el cálculo de sus superficies.

2.G. Microscopía electrónica

2.G.1. Tinción negativa

Se colocó una gota de la muestra de virus BoHV-1 LA o BoHV-1ΔgEβgal clarificado de aproximadamente 25 μl sobre un papel de film. Contigua a ésta se colocó una gota del mismo volumen de PTA (Acido Fosfo Túngstico), se sumergió completamente la grilla de cobre en la muestra, siempre con la membrana de colodión hacia arriba, y se la dejó por 2 minutos. Luego se extrajo la grilla, se quitó el excedente de material con papel de filtro, y se la sumergió de la misma manera en la gota de PTA también por dos minutos. Todo esto se llevó a cabo en una placa de Petri con base de cera de dentista.

Una vez cumplido este proceso, las grillas se almacenaron en placas de Petri en un fondo de papel de filtro hasta que su secado y observación.

2.G.2. Inclusión

Se infectaron monocapas de células MDBK con BoHV-1 LA o BoHV-1ΔgEβgal con una *moi* de 10 y se incubaron durante 16 horas a 37°C y 5 % de CO₂. Transcurrido este tiempo, las muestras fueron fijadas en glutaraldehído al 2% en *buffer* Millonig. Luego de lavar con dicho *buffer* se realizó una post fijación en tetróxido de osmio al 2% durante 2 horas en frío, se lavaron con agua destilada y se comenzó el proceso de deshidratación con alcoholes ascendentes, 3 pasajes de 5 minutos en cada alcohol, luego 2 pases en acetona y finalmente se colocaron en solución de preinclusión (resina/acetona al medio) durante 16 horas. Las inclusiones se realizaron en moldes con resina pura y se colocaron en estufa a 56°C durante 72 horas. Luego se realizó el tallado de los tacos y se cortó con un ultramicrotomo (Sorvall MT-2B). Se realizaron cortes ultrafinos (60 – 90 nm), se montaron en grillas y se contrastaron con Uranilo – Reynold's para posterior observación en el microscopio.

2.G.3. Microscopio electrónico de transmisión

Se utilizó un microscopio electrónico de transmisión (Jeol 1200 EX II) para observar tanto las tinciones negativas de ambos virus así como los cortes de las monocapas infectadas.

Las tomas fotográficas fueron realizadas en película plana, y a un Kilo voltaje de 85 KV. El aumento al cual se realizaron las tomas fue de 50000 aumentos.

Todos los experimentos ultraestructurales se llevaron a cabo en la Unidad de Microscopía Electrónica y Bioquímica Aplicada, CICVyA, INTA Castelar.

3. CARACTERIZACION GENÓMICA

3.A. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados para las distintas reacciones de PCR realizadas se detallan en la siguiente tabla.

Oligonucleótido	Secuencia blanco	Secuencia del oligonucleótido (5' a 3')	Tamaño del producto*	Fuente
1-UL52-F 1-UL52-R	UL52	GAAGGAAACCAAGTCGGG GGCTTTACTCCAACAGCG	223	Del Médico Zajac et al., 2009b
1-UL43-F 1-UL43-R	UL43	AGGTCTCGGGCTGGCGGTCT CTGTGCTTCTGCGTCGGGG	207	Del Médico Zajac et al., 2009b
UL41-F UL41-R	UL41	GGGGCTCTTCAAGCT(A/G)CTGC AAGATCGGGTAGTAGGAGCG	236	Del Médico Zajac et al., 2009b
UL40-F UL40-R	UL40	GCCAAACAGAGGAGGCAG CATGATTCTATTCGAGGGC	348	Del Médico Zajac et al., 2009b
UL36-F UL36-R	UL36	CGTTTCTGCGGCTGGCCTTC TCACCAGCGCCAGCGACGT	317	Del Médico Zajac et al., 2009b
UL34-F UL34-R	UL34	AAGGCGCAGTATCGCGAGA AGCTGCTTCGTGCGCATGCC	346	Del Médico Zajac et al., 2009b
UL29-F UL29-R	UL29	GGGCTTCGTGTACGTCTG CAGCCACTACCACCCGAA	224	Del Médico Zajac et al., 2009b
DNApolF1 DNApolR3	UL30	TACAACATCGTCAACTTCGACTG ATGGCCAGCCAATCGCGCA	914	Maidana, Tesis doctoral
CR39gB-F CR40gB-R	UL27	CACGACCTGGGCGGGCAGCAC GACAGCCACACCTTCGCGTTGCAG	678	Ros y Belak, 1999
1-UL11-F 1-UL11-R	UL11	ATGGGACAGGCGGCTCGTGC CAAATCGTGTAAATCTTTGCGTGT	329	Del Médico Zajac et al., 2009b
CR52gD-F gD-R	US6	CCCGMYGCCGATACAACCTAC TACCCGAGGAGGCACACAAG	595	Ros y Belak, 1999

Tabla 4: Secuencia de los oligonucleótidos utilizados.

* Tamaño del fragmento amplificado utilizando los oligonucleótidos indicados

3.B. Purificación de virus

Monocapas de células MDBK fueron crecidas en botellas de cultivo celular de 150 cm² de superficie (T150) e infectadas con las cepas BoHV-1ΔgEβgal o BoHV-1 LA a moi 1. Cuando el ECP fue extensivo, los frascos fueron congelados a -70°C. Luego de dos rondas sucesivas de congelado (-70°C) y descongelado, se realizó el clarificado a 3000 rpm durante 20 min a 4°C. El sobrenadante fue ultracentrifugado a 100000 g (Beckman L-90K) durante 1 hora a 4°C y se volcó el sobrenadante y se secó el interior del tubo con papel. El pellet se resuspendió en 1 ml de *buffer* TE (Tris 200 mM pH 8, EDTA 20 mM) con NP-40 0,1 % v/v (Sigma) e incubado a 37°C por 30 minutos y a 56°C por 1 hora. Luego se llevó a 30 ml con TE, se agregaron 5 ml de sacarosa 30% p/v en el fondo del tubo y se ultracentrifugó a 100000 g durante 2 horas a 4°C. Se volcó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 500 µl de *buffer* de extracción (TE pH 8, SDS 1%,

Proteinasa K 0,5 mg/ml). Para lograr la disolución del pellet, se incubó a 56°C por 2 horas. Luego se procedió a la extracción de ADN.

3.C. Extracción de ADN a partir de virus purificado

Para extraer ADN viral a partir de virus purificado se agregó un volumen de fenol: cloroformo: isoamílico (24:25:1), se mezcló por inversión, se centrifugó a 13000 rpm por 10 min a temperatura ambiente y se recuperó la fase acuosa. La misma fue nuevamente tratada con fenol: cloroformo: isoamílico, mezclada y centrifugada a 13000 rpm por 10 minutos. Luego se agregó 1/10 de volumen de acetato de sodio (AcNa) 3M y 2 volúmenes de etanol absoluto, y se incubó 1 hora a -70°C. Posteriormente se centrifugó a 13.000 rpm por 10 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y el pellet fue lavado 2 veces con 600 µl de etanol 70%. Luego el pellet fue secado y resuspendido en 50 µl de agua deionizada por 16 horas a 4°C. Finalmente se corroboró la integridad del ADN obtenido mediante electroforesis en gel de agarosa 1% y se cuantificó la muestra por absorbancia a 260 nm utilizando un espectrofotómetro UV Nanodrop ND-1000.

3.D. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 12,5 µl. Se utilizaron 5 ng de ADN viral, *buffer* de la enzima Taq ADN polimerasa *Green Go Taq 5x* (Promega), dNTPs 200 µM (cada uno), 100 ng de oligonucleótidos sentido y antisentido y 1 unidad de Taq DNA polimerasa (Invitrogen).

Debido al alto contenido de GC del genoma de los herpesvirus fue necesario, en todos los casos, utilizar un programa de ciclado del tipo *touch-down*.

3.E Electroforesis en geles de agarosa nativos

Las muestras de ADN se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa de acuerdo a lo detallado previamente en la sección Materiales y Métodos.

3.F. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa

Los productos de PCR fueron purificados a partir de geles de agarosa. Para ello, se realizó una electroforesis en gel de agarosa y la banda del tamaño esperado se escindió del gel utilizando bisturí y se purificó con el *kit* comercial, *Illustra GFX™ PCR DNA and gel band purification kit* (GE Healthcare). El ADN obtenido fue resuspendido en 20µl de Tris 10 mM pH=8.

3.G. Secuenciación automática

La secuenciación de los productos de amplificación por PCR y de ADN genómico viral se realizó utilizando el Servicio Interno de Genotipificación y Secuenciación- Ibiotec (Instituto de Biotecnología, CICVyA). En este lugar se trabaja con el *kit Big Dye Terminator* v3.1 (Applied Biosystems) y con el secuenciador 3130 xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Todas las secuencias se realizaron en ambas cadenas.

3.H. Digestión con endonucleasas de restricción

Para las digestiones de ADN genómico se utilizaron 10 µg de ADN, 1-5 U de enzima, *buffer* de restricción apropiado 1X y albúmina sérica bovina 1X (BSA 10 mg/ml) en un volumen final de 20 µl. Las reacciones se incubaron 3 horas a la temperatura recomendada para cada enzima. En caso de ser necesario luego de la digestión las enzimas se inactivaron según las recomendaciones del fabricante (Promega).

3.I. Herramientas bioinformáticas

El acceso a la secuencia genómica de BoHV-1 se realizó utilizando el sitio *web* de NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

La edición, el análisis y alineamiento de las secuencias de ácidos nucleicos y de proteínas se realizó con los programas VectorNTI versión 8.0 (InforMax, Inc, 1994-2002), BioEdit versión 7.0.5.3 (Hall, 1999) y con las herramientas del sitio *web* JustBio.com de acceso libre a través de Internet (www.justbio.com).

Resultados

1. ESTUDIO DE LA INFECCIÓN AGUDA POR BoHV-1 Δ gE β gal EN BOVINOS

Con el objetivo de evaluar la virulencia de la cepa BoHV-1 Δ gE β gal en el hospedador natural, se diseñó una experiencia de infección viral de bovinos. Asimismo, para contar con los parámetros de excreción viral, signos clínicos y respuesta inmune asociados a la infección aguda con la cepa parental se realizó la infección experimental de bovinos con la cepa BoHV-1 LA, obteniéndose una herramienta de comparación. Las infecciones se desarrollaron como dos experiencias independientes para evitar la contaminación cruzada entre ambos agentes.

1.A. Infección experimental de bovinos con el virus BoHV-1 LA

Para estudiar los parámetros de excreción viral, signos clínicos y respuesta inmune asociados a la infección aguda con BoHV-1 se realizó la infección de 9 bovinos por vía intranasal con la cepa LA de BoHV-1.

1.A.1. Excreción viral y signología clínica

Los animales fueron infectados por vía intranasal (aerolización) con 3 ml de $10^{7,5}$ DICT₅₀/ml del virus BoHV-1 LA. Una vez finalizada la inoculación, el virus sobrante fue retitulado para confirmar la dosis administrada, registrándose un título viral de $10^{7,0}$ DICT₅₀/ml.

Luego de la infección, las secreciones nasales fueron analizadas de acuerdo a lo detallado en la sección de materiales y métodos. Los animales excretaron partículas virales infectivas desde el día 1 hasta el día 12 post infección (pi) (Figura 1). Los niveles máximos de excreción viral se detectaron entre los días 4 y 8 pi, alcanzando valores de $10^{7,5}$ DICT₅₀/ml.

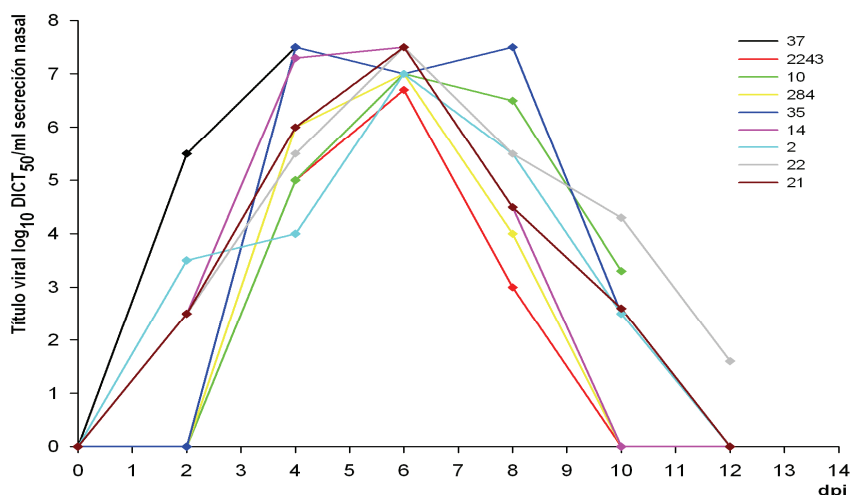


Figura 1. Curvas de excreción viral nasal individuales de los animales infectados con BoHV-1 LA.

Para la identificación de la cepa viral excretada, el ADN extraído de las secreciones nasales de los animales infectados con BoHV-1 LA fue analizado por PCR. Todas las muestras resultaron positivas para las reacciones de amplificación del gen *gE* (300 pb) y *gC* (400 pb) de BoHV-1 (Figura 2), y negativas para *lacZ*, según lo esperado. De esta manera se confirmó la identidad del virus excretado.

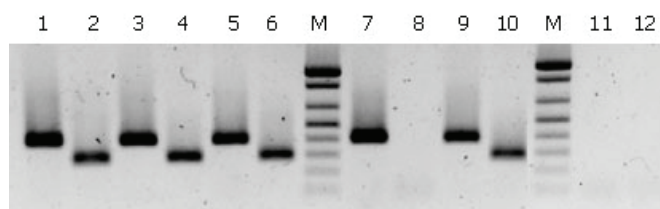


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación por PCR. Calles 1-6: secreciones nasales de animales infectados con BoHV-1 LA. Calles 7 y 8: BoHV-1 Δ gE β gal. Calles 9 y 10: BoHV-1 LA. Calles 11 y 12: Control negativo. M: Marcador de peso molecular (1 Kbp Plus, Invitrogen). Calles 1, 3, 5, 7, 9 y 12: fragmento del gen *gC*. Calles 2, 4, 6, 8, 10 y 12: fragmento del gen *gE*.

Los hisopados conjuntivales y vulvares se realizaron cuando los animales manifestaron signos clínicos y/o lesiones compatibles con la enfermedad causada por este agente. En ningún caso se detectaron partículas virales en estas muestras.

Todos los animales infectados con la cepa BoHV-1 LA mostraron signología respiratoria moderada. A partir del segundo día pi, los animales presentaron secreción nasal serosa, que luego se transformó en seromucosa y mucopurulenta de distintas intensidades, de leve a severa (Tabla 1) (Figura 3). Cuatro animales (No 37, 243, 284 y 35) presentaron un registro de temperatura rectal superior a 39,5°C el día 4 pi. Por su parte, otros cuatro bovinos (No 284, 14, 35 y 21) presentaron secreción ocular seromucosa leve al día 8 pi.



Figura 3. Signología clínica observada en animales inoculados con BoHV-1 LA. A: rinitis seromucosa severa. B: Conjuntivitis seromucosa leve.

Animal \ dpi	0	2	4	6	8	10	12	14	16
37	0	1	4						
243	0	0	0	4	4				
10	0	1	2	3	3				
284	0	0	4	5	6	3	3	0	
35	0	1	0	4	4	3	3	3	
14	0	0	1	3	4	3	3	1	0
2	0	1	1	4	6	3	3	3	1
22	0	0	1	1	1	3	5	4	0
21	0	0	1	3	6	4	7	6	4

Tabla 1. Signología clínica registrada en animales inoculados con BoHV-1 LA. Las celdas sombreadas corresponden a los días para los cuales esos animales ya habían sido eutanasiados. El grado de severidad de la rinitis se registró según la siguiente escala de valores arbitrarios (Puntel, 2002a): serosa leve=1, serosa moderada=2, seromucosa leve=3, seromucosa moderada=4, seromucosa severa=5, mucopurulenta leve= 6, mucopurulenta moderada=7, mucopurulenta severa=8.

1.A.2. Respuesta inmune

Para determinar la presencia de anticuerpos anti-BoHV en suero y secreciones nasales se realizaron los ensayos de ELISA detallados en la sección de materiales y métodos.

Las muestras de secreciones nasales tomadas durante el período pi fueron analizadas mediante un ensayo de ELISA para evaluar niveles de anticuerpos de clase IgA e IgG1. En 5 de 8 animales se detectaron anticuerpos de clase IgA al día 7 pi con títulos de 0,9 (\log_{10}). Al día 9 pi todos los animales desarrollaron IgA, alcanzando valores de 2,1 (\log_{10}) a los 12 dpi (Tabla 2A). Los anticuerpos de clase IgG1 se detectaron al día 9 pi en todas las muestras, con títulos máximos de 3,3 (\log_{10}) a los 12 dpi (Tabla 2B).

La respuesta inmune humoral en suero fue evaluada por ELISA para anticuerpos totales contra BoHV-1. Todos los animales seroconvirtieron luego de la infección, alcanzando títulos máximos de 2,8/3,4 (\log_{10}) (Tabla 3). Los terneros eutanasiados a los días 5 y 9 pi no presentaron anticuerpos en suero.

Animal	A			B		
	dpi	7	9	12	7	9
37						
243	0,9	0,9		0	0,9	
10	0,9	1,5		0	0,9	
284	0	0,9	2,1	0	0	2,1
35	0,9	1,5	1,5	0	1,5	3,3
14	0,9	0,9	1,5	0	0,9	2,7
2	0	0,9	2,1	0	0,9	2,1
22	0,9	1,5	2,1	0	0	1,5
21	0	0,9	1,5	0	0,9	2,7

Tabla 2: Anticuerpos IgA (A) e IgG1 (B) en hisopados nasales de animales infectados con la cepa BoHV-1 LA a distintos dpi medidos por ELISA y expresados como \log_{10} . Las celdas sombreadas corresponden a los días para los cuales esos animales ya habían sido eutanasiados.

Animal	37	10	1243	35	284	14	2	22	21
Dpi	5*	9*	9*	15*	15*	21*	42*	42	42
Título	0	0	0	2,8	2,2	2,8	2,2	2,2	2,2

Tabla 3: Respuesta de anticuerpos inducida luego de la infección. Anticuerpos IgG totales en suero de animales infectados con la cepa BoHV-1 LA, medidos por ELISA indirecto, expresado como título \log_{10} . El * indica que el dpi corresponde al día de eutanasia.

Los resultados de excreción viral y signología clínica presentados en esta sección permiten concluir que se logró reproducir experimentalmente el cuadro clínico asociado a infecciones con BoHV-1. La infección de bovinos con la cepa de referencia LA de BoHV-1 produjo una alta y prolongada excreción viral y signología clínica moderada, así como la inducción de una respuesta inmune específica, tanto en suero como en mucosas.

1.B. Infección experimental de bovinos con el virus BoHV-1 Δ gE β gal

Para estudiar el comportamiento *in vivo* de la cepa recombinante BoHV-1 Δ gE β gal se realizó la infección experimental de 6 bovinos.

1.B.1. Excreción viral y signología clínica

Los animales fueron infectados por vía intranasal (aerolización) con 3 ml de $10^{7.5}$ DICT₅₀/ml del virus BoHV-1ΔgEβgal. Una vez finalizada la inoculación, el virus sobrante fue retitulado para confirmar la dosis administrada registrándose un título viral de $10^{7.3}$ DICT₅₀/ml.

Durante la infección aguda no se detectaron partículas virales infectivas en cultivos de tejidos en las muestras de hisopados nasales de ninguno de los animales infectados. Luego de tres pasajes ciegos, se detectó efecto citopático en la muestra de un sólo animal correspondiente al día 2 pi.

Se analizó la presencia de ADN viral en las secreciones correspondientes a los días 4 y 7 pi mediante amplificación por PCR de dos fragmentos del gen *gC*. Las muestras de todos los animales fueron positivas para los días estudiados (Figura 4).

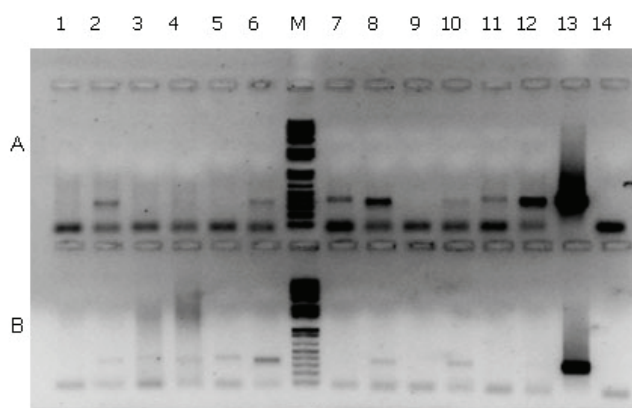


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación por PCR de dos fragmentos del gen *gC* utilizando ADN de secreciones nasales tomadas el día 4 pi (A) y 7 pi (B). Se muestran los resultados de los animales 189 (calles 1 y 2), 287 (calles 3 y 4), 502 (calles 5 y 6), 506 (calles 7 y 8), 509 (calles 9 y 10) y 1016 (calles 11 y 12). Calle 13: control positivo. Calle 14: Control negativo. M: Marcador de peso molecular (1 Kbp Plus, Invitrogen).

Los resultados negativos del aislamiento viral en cultivo de tejidos indican que la cepa BoHV-1ΔgEβgal no se excreta luego de la infección intranasal. Sin embargo, la presencia de ADN viral en los hisopados nasales de los animales infectados con la cepa BoHV-1ΔgEβgal a los 4 y 7 días pi indicaría replicación viral. Estos resultados sugieren un bajo nivel de replicación *in vivo* de este virus, o una baja excreción del mismo en secreciones nasales.

Los animales infectados con la cepa BoHV-1ΔgEβgal no mostraron signos clínicos ni cambios de la temperatura rectal durante el período observado y se mantuvieron sanos durante toda la experiencia.

1.B.2. Respuesta inmune

Se realizó un ELISA para detectar la presencia de anticuerpos en las secreciones nasales. Todos los animales presentaron anticuerpos de clase IgA en las secreciones correspondientes a los días 7, 9 ó 12 pi (Tabla 4), con títulos entre 0,9 y 1,5 (\log_{10}).

Animal \ dpi	7	9	12
502	0,9	0,9	
506	0,9	0,9	0,9
287	0,9	0,9	1,5
189	0,9	0,9	0,9
509	0	0	0,9
1016	0,9	0,9	1,5

Tabla 4: Anticuerpos IgA en hisopados nasales de animales infectados con la cepa BoHV-1 Δ gE β gal a distintos dpi medidos por ELISA y expresados como \log_{10} . Las celdas sombreadas corresponden a los días para los cuales esos animales ya habían sido eutanasiados

Sólo un animal infectado (Nº 506) presentó anticuerpos de clase IgG1 en secreciones nasales a los 9 y 12 dpi con un título de 0,9 (\log_{10}).

Todos los animales infectados desarrollaron anticuerpos totales a los tiempos ensayados, alcanzando valores máximos de 2,2 (\log_{10}) (Tabla 5). Sólo el animal eutanasiado al día 9 no presentó anticuerpos ya que es una fecha temprana para detección de los mismos. Asimismo, se hallaron anticuerpos neutralizantes en el suero de todos los animales durante el ensayo (Tabla 6).

Animal	502	506	287	189	509	1016
dpi	9*	15*	21*	42*	42	42
Título	0	1,6	1,6	1,6	1,6	2,2

Tabla 5: Respuesta de anticuerpos inducida luego de la infección. Anticuerpos IgG totales en suero de animales infectados con la cepa BoHV-1 Δ gE β gal, por ELISA indirecto, expresado como título \log_{10} . El * indica que el dpi corresponde al día de eutanasia.

Animal \ dpi	9	15	21	42
502	+			
506	nd	+		
287	nd	+	+	
189	nd	+	nd	+
509	nd	+	nd	+
1016	nd	+	nd	+

Tabla 6. Presencia de anticuerpos neutralizantes en las muestras de suero de animales infectados con la cepa BoHV-1 Δ gE β gal a distintos días pi. (-) ausencia de anticuerpos; (+) presencia de anticuerpos; nd: no determinado. Las celdas sombreadas corresponden a los días para los cuales esos animales ya habían sido eutanasiados.

Todos los animales infectados con la cepa BoHV-1 Δ gE β gal desarrollaron una respuesta inmune humoral detectable, tanto sérica como de mucosas. Estos resultados sugieren que en dichos animales se produjo una estimulación del sistema inmune debido a la presencia del virus, confirmando la infección de los mismos.

Conjuntamente, estos datos indican que la cepa BoHV-1 Δ gE β gal logra infectar a los animales e inducir una respuesta inmune específica. Sin embargo, no es excretada en secreciones nasales ni genera signos clínicos de enfermedad en el bovino. Todo esto indicaría que la cepa BoHV-1 Δ gE β gal se encuentra atenuada *in vivo*.

1.C. Estudio de la distribución viral en tejidos

El estudio de la distribución viral en los tejidos de los animales infectados con los virus BoHV-1 Δ gE β gal y BoHV-1 LA se abordó mediante aislamiento viral e inmunohistoquímica. El aislamiento viral a partir de órganos mantenidos a -80°C permitió detectar la presencia de virus infectivo a tiempos tempranos luego de la infección. También se estudió la distribución de antígenos virales en las células infectadas de distintos tejidos a partir de órganos fijados e incluidos en parafina utilizando la técnica de inmunohistoquímica.

1.C.1. Aislamiento viral

Para conocer la distribución viral en los tejidos durante la infección aguda, se realizó el cultivo en células MDBK y TFB de las muestras procesadas de tejidos congelados a -80°C de los animales infectados con la cepa BoHV-1 $\Delta\text{gE}\beta\text{gal}$ y eutanasiados a los días 9 y 15 pi así como también de los tejidos de animales infectados con la cepa BoHV-1 LA y eutanasiados a los días 5, 9 y 15 pi.

En los tejidos del día 5 pi del animal infectado con la cepa BoHV-1 LA se detectó virus infeccioso en mucosa nasal, olfatoria, orofaríngea y traqueal, así como en linfonódulos de cabeza y cuello, glándula parótida y bulbo olfatorio (Tabla 7). Los tejidos positivos correspondientes al día 9 pi fueron mucosa nasal y orofaríngea, linfonódulo retrofaríngeo y tonsila para el animal infectado con BoHV-1 LA, mientras que para el animal infectado con el virus BoHV-1 $\Delta\text{gE}\beta\text{gal}$ solamente mucosa orofaríngea. Los resultados negativos se confirmaron mediante tres pasajes ciegos sobre células MDBK y posterior inmunofluorescencia. Las muestras procesadas pertenecientes a los animales infectados y sacrificados al día 15 pi fueron negativas para ambos virus.

Tejido	BoHV-1 LA 5 dpi	BoHV-1 LA 9 dpi	BoHV-1 $\Delta\text{gE}\beta\text{gal}$ 9 dpi
Mucosa nasal	+	+	-
Mucosa orofaríngea	+	+	+
Mucosa olfatoria	+	-	-
Mucosa traqueal	+	-	nd
Linfonódulo retrofaríngeo	-	+	-
Linfonódulo mandibular	+	nd	nd
Tonsila	-	+	-
Glándula parótida	+	-	-
Bulbo olfatorio	+	-	-

Tabla 7. Resultados del aislamiento viral de tejidos provenientes de animales infectados con BoHV-1 LA a los 5 y 9 dpi y BoHV-1 $\Delta\text{gE}\beta\text{gal}$ a los 9 dpi. (+): Resultado positivo. (-): Resultado negativo. nd: no determinado

Los resultados de la Tabla 7 muestran la distribución de los virus BoHV-1 LA y BoHV-1 $\Delta\text{gE}\beta\text{gal}$ en los tejidos luego de la infección en bovinos. El número de muestras positivas observadas al día 5pi de la cepa BoHV-1 LA confirman la dispersión de dicha cepa, afectando a tejidos próximos a la puerta de entrada del agente.

1.C.2. Detección de antígenos virales

Para conocer la distribución de antígenos virales en los tejidos durante la infección aguda con los virus BoHV-1ΔgEβgal y BoHV-1 LA se realizaron cortes por micrótopo de muestras de órganos de los animales infectados y eutanasiados al día 9 pi y se procesaron por la técnica de inmunohistoquímica. Se utilizó como anticuerpo primario un anticuerpo monoclonal anti-BoHV-1 y se marcó con el sistema streptavidina-biotina, revelando con una solución de carbazol. Para la contratincción se utilizó hematoxilina de Mayer.

A los 9 dpi se detectaron antígenos virales en la mucosa orofaríngea y en el linfonódulo mandibular de los animales infectados con la cepa BoHV-1ΔgEβgal. Los tejidos de los animales infectados con el virus BoHV-1 LA en los cuales se detectaron antígenos virales fueron mucosas orofaríngea y nasal, y linfonódulos retrofaríngeo y mandibular (Tabla 8).

Tejido	BoHV-1 LA	BoHV-1ΔgEβgal
Mucosa olfatoria	-	-
Mucosa nasal	+	-
Mucosa orofaríngea	+	+
Linfonódulo retrofaríngeo	+	-
Linfonódulo mandibular	+	+

Tabla 8. Resultados de la inmunohistoquímica de tejidos provenientes de animales infectados con BoHV-1 LA y BoHV-1ΔgEβgal al día 9 pi. (+): Resultado positivo. (-): Resultado negativo.

Las imágenes de las inmunohistoquímicas realizadas sobre los linfonódulos de los animales infectados con BoHV-1 LA y BoHV-1ΔgEβgal muestran que las células positivas resultaron morfológicamente compatibles con linfocitos y presentaron tinción específica con localización nuclear. El análisis de la localización de las células positivas en este tejido mostró una distribución similar de antígenos virales para ambas cepas, con una mayor concentración en los centros germinales (Figura 5B, E y H). La cantidad de células reactivas por campo estuvo en el mismo orden para ambos virus (Figura 5C, F e I). Los controles negativos no mostraron reacciones inespecíficas (Figura 5J-L).

Con respecto a las imágenes correspondientes a la mucosa orofaríngea, se observaron células positivas tanto en la mucosa (Figura 6F) como en la submucosa (Figura 6B, F, H e I), y en los acinos glandulares (Figura 6C). Si bien se observó una leve tinción inespecífica en el citoplasma de las células epiteliales de la mucosa debido al alto contenido de sustancias reactivas (Figura 6F y L), esto no interfirió en la discriminación entre células positivas para antígenos virales con tinción nuclear intensa y células negativas.

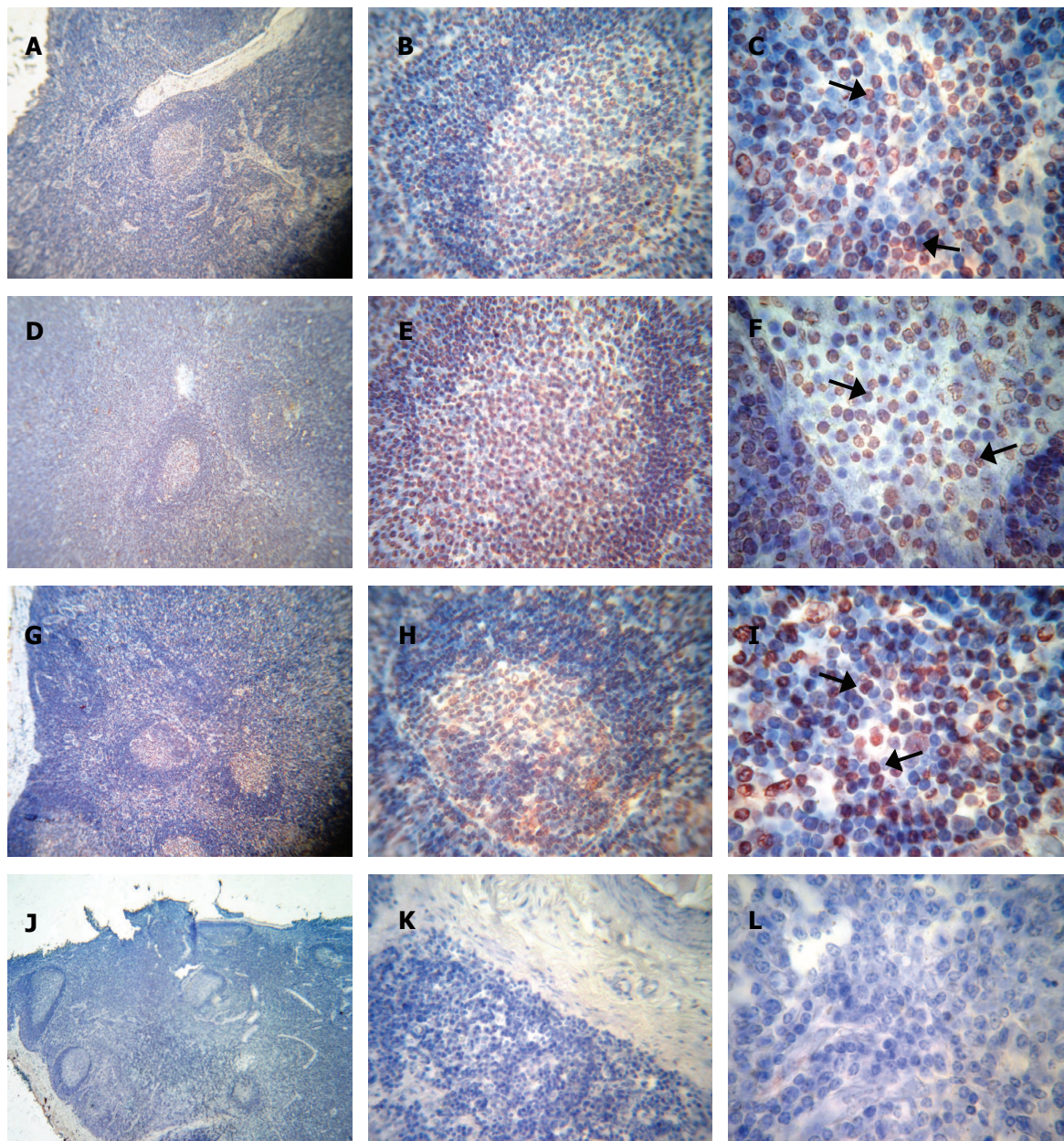


Figura 5. Inmunohistoquímica de secciones de linfonódulo mandibular correspondientes a animales infectados con el virus BoHV-1 LA y sacrificados a los 5 dpi (A-C), 9 dpi (D-F) o infectados con la cepa BoHV-1 Δ gE β gal y sacrificado a los 9 dpi (G-I). J-L: control negativo. Aumento: A, D, G y J 100x; B, E, H y K 400x; C, G, I y L 1000x. Las flechas señalan células positivas.

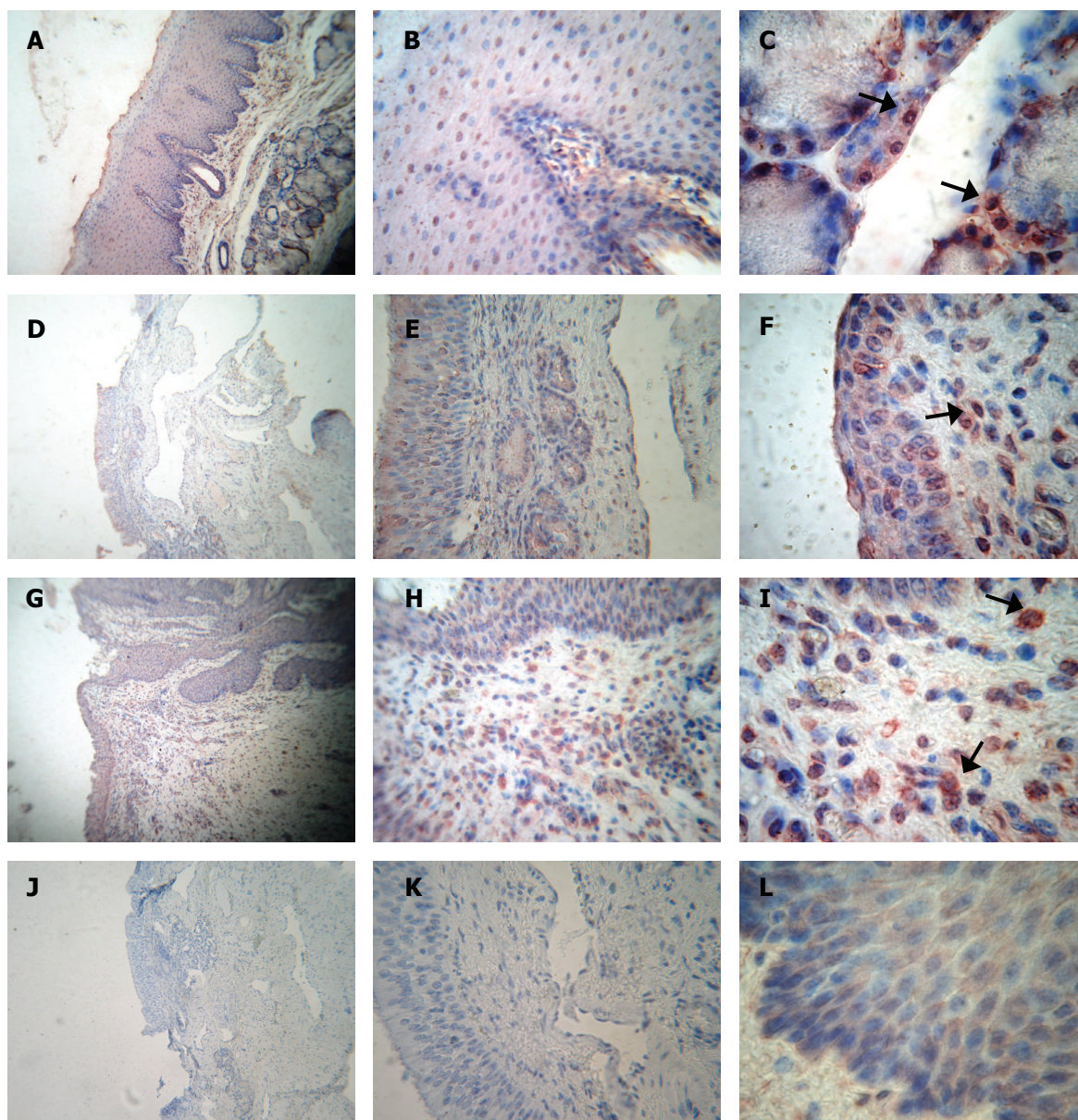


Figura 6. Inmunohistoquímica de secciones de mucosa orofaríngea correspondiente a animales infectados con el virus BoHV-1 LA y sacrificados a los 5 dpi (A-C), 9 dpi (D-F) o infectados con la cepa BoHV-1 Δ gE β gal y sacrificado a los 9 dpi (G-I). J-L: control negativo. Aumento: A, D, G y J 100x; B, E, H y K 400x; C, G, I y L 1000x. Las flechas señalan células positivas.

De acuerdo a los resultados obtenidos del análisis de los tejidos de los animales infectados, se sugiere que el virus BoHV-1 Δ gE β gal infecta un menor número de tejidos en comparación con la cepa parental LA.

Conjuntamente, los resultados de la experiencia de infección aguda sugieren que la cepa BoHV-1 Δ gE β gal infecta al bovino, detectándose la presencia de genoma viral en las secreciones nasales y células que expresan antígenos virales en órganos próximos a la puerta de entrada. Asimismo, la infección con esta cepa indujo una respuesta inmune específica tanto en suero como en mucosas. Sin embargo, la ausencia de signos clínicos y excreción viral indicarían que la cepa BoHV-1 Δ gE β gal estaría atenuada en su virulencia.

2. ESTUDIO DE LA LATENCIA DE BoHV-1 Δ gE β gal EN BOVINOS

El estudio de la latencia de BoHV-1 Δ gE β gal en bovinos se abordó en primer término mediante la inducción experimental de la reactivación viral a través de un tratamiento inmunosupresor. Posteriormente, se analizaron los tejidos propuestos en la bibliografía como sitios de establecimiento de la infección latente.

Con el objetivo de contar con los parámetros de excreción viral, signos clínicos y respuesta inmune asociados a la reactivación de BoHV-1 LA y la cepa BoHV-1 Δ gE β gal, se realizó el tratamiento inmunosupresor experimental a dos animales de cada grupo a los días 48 y 74 pi.

2.A. Reactivación de los animales infectados con la cepa BoHV-1 LA

Dos animales (N° 22 y 21) previamente infectados con el virus BoHV-1 LA fueron inoculados durante 5 días consecutivos con dexametasona endovenosa (0,1 mg/kg) para inducir la reactivación viral.

2.A.1. Excreción viral y signología clínica

El animal que recibió el tratamiento con dexametasona a partir del día 48 pi (N° 22), no excretó partículas infectivas en secreciones nasales durante el período post tratamiento (pt) evaluado. Asimismo, las muestras fueron negativas al realizarse tres pasajes ciegos como al analizar la presencia de ADN viral mediante reacciones de amplificación por PCR. Respecto a la signología clínica, el animal 22 no mostró signos ni presentó registros de temperatura rectal elevada.

El animal N°21 que comenzó el tratamiento el día 74 pi presentó excreción viral a partir del cuarto día pt, la cual se prolongó durante 6 días y alcanzó un valor máximo de $10^{6.5}$ DICT₅₀/ml al día 5 pt (Figura 7).

Los resultados de la excreción viral del animal 21 durante el período de reactivación viral, en términos de duración y valores máximos, fueron menores que los detectados durante la infección aguda (cuando excretó virus durante 9 días con un título máximo de $10^{7.5}$ DICT₅₀/ml). El animal 21 tuvo temperatura rectal mayor a 39,5°C durante dos días consecutivos (días 9 y 10 pt). Sin embargo no presentó otros signos clínicos asociados a la enfermedad por BoHV-1 durante todo el período pt examinado.

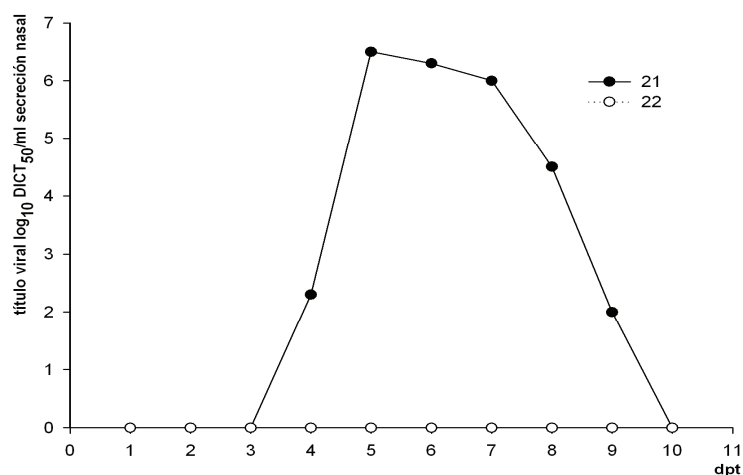


Figura 7. Curva de excreción viral individual de los animales infectados con BoHV-1 LA y tratados con dexametasona. El día 1 pt corresponde al día 48 y 74 pi para los animales 22 y 21, respectivamente.

2.A.2. Respuesta inmune

Para determinar la presencia de anticuerpos anti-BoHV en suero y secreciones nasales se realizaron los ensayos de ELISA detallados en Materiales y Métodos.

En el animal 22 el título de anticuerpos séricos no presentó variaciones entre las muestras anteriores y posteriores al tratamiento inmunosupresor, manteniéndose en un valor de 2,2 (\log_{10}). Sin embargo se observó un incremento en los anticuerpos de ambos isotipos estudiados en secreciones nasales, de 0 a 1,5 (\log_{10}) en ambos casos. Para el animal 21 se verificó un aumento en el título de anticuerpos en suero después del tratamiento inmunosupresor, de 2,2 a 3,4 (\log_{10}), así como incrementos en los anticuerpos de clase IgA e IgG1 en secreciones nasales, alcanzando valores de 3,3 y 3,9 (\log_{10}), respectivamente (Tabla 9).

Animal	Pre TD			Post TD		
	Suero	Secreciones nasales		Suero	Secreciones nasales	
	Ig totales	IgA	IgG1	Ig totales	IgA	IgG1
22^a	2.2	0	0	2.2	1,5	1,5
21^b	2.2	0,9	1,5	3.4	3,3	3,9

Tabla 9: Respuesta de anticuerpos en suero y en secreciones nasales antes y después del tratamiento inmunosupresor, medidos por ELISA, expresado como título \log_{10} . TD: tratamiento con dexametasona.

^a Pre TD y post TD corresponden a los días 48 y 65 pi, respectivamente.

^b Pre TD y post TD corresponden a los días 74 y 91 pi, respectivamente.

Los datos de excreción viral y respuesta inmune sugieren que el animal número 21 reactivó la infección con BoHV-1 experimentalmente. Respecto al animal 22, no se detectó variación en los niveles de anticuerpos séricos ni excreción de partículas infectivas. Asimismo, el día de la necropsia se extrajo una muestra de sangre y un hisopado nasal siendo los resultados negativos. Sin embargo, se produjo un incremento en los anticuerpos en secreciones nasales entre las muestras previas y posteriores al tratamiento inmunosupresor. Por lo tanto, no podemos descartar que dicho animal haya reactivado la infección latente.

2.B. Reactivación de los animales infectados con la cepa BoHV-1 Δ gE β gal

Dos animales infectados con la cepa BoHV-1 Δ gE β gal fueron inoculados durante 5 días consecutivos con dexametasona endovenosa (0,1 mg/kg) a los días 48 y 74 pi para inducir la reactivación viral.

2.B.1. Excreción viral y signología clínica

No se detectó virus infeccioso de las secreciones nasales de ninguno de los dos animales infectados con la cepa BoHV-1 Δ gE β gal y tratados con dexametasona, aún después de realizar tres pasajes ciegos. Asimismo, las reacciones de amplificación por PCR a partir de las secreciones nasales de estos animales durante y después del tratamiento inmunosupresor fueron negativas.

No se observaron signos clínicos compatibles con enfermedad producida por BoHV-1 en ninguno de los dos animales durante todo el período pt examinado.

2.B.2. Respuesta inmune

Para estudiar la respuesta inmune de mucosas, se analizaron las secreciones nasales de los animales tratados con dexametasona. No se detectaron anticuerpos de clase IgA o IgG1 en las secreciones nasales correspondientes tanto al comienzo del tratamiento inmunosupresor como a los días posteriores al mismo.

En el animal N° 509 se verificó un aumento en el título de anticuerpos después del tratamiento inmunosupresor, de 1,6 a 2,2 (\log_{10}). El otro animal (N° 1016) no presentó variaciones en el título de anticuerpos séricos entre las muestras anteriores y posteriores al tratamiento, manteniéndose en un valor de 2,2 (\log_{10}). Asimismo, los ensayos de seroneutralización fueron positivos para las muestras de sueros anteriores y posteriores al tratamiento para ambos animales.

Los datos de excreción viral, signos clínicos y respuesta inmune presentados en esta sección sugieren que los animales infectados con la cepa BoHV-1 Δ gE β gal no reactivaron la putativa infección latente.

2.C. Evaluación de los sitios de establecimiento de latencia

Se estudió la distribución de antígenos y ADN viral en los tejidos propuestos como sitios de establecimiento de latencia de BoHV-1, provenientes de los animales infectados con los virus BoHV-1 Δ gE β gal y BoHV-1 LA. La técnica de inmunohistoquímica a partir de órganos fijados e incluidos en parafina permitió evaluar la infección productiva que ocurre a tiempos tempranos en estos órganos, previo al establecimiento del estado de latencia. Asimismo, se estudió la presencia de genoma viral en muestras de todos los animales infectados durante las experiencias.

2.C.1. Detección de antígenos virales

El ganglio trigémino (GT) es el sitio de latencia más importante en los alfa herpesvirus. Por ello se estudió la presencia de antígenos virales en los GT de los animales infectados con los virus BoHV-1 Δ gE β gal y BoHV-1 LA mediante la técnica de inmunohistoquímica.

En las muestras del animal infectado con la cepa BoHV-1 LA correspondientes al día 5 pi encontramos células no-neurales positivas mientras que las neuronas fueron negativas (Figura 8A-C). A los 9 dpi, se observaron tanto neuronas como células no neurales con antígenos virales (Figura 8D-F). Asimismo, se observó un infiltrado de células mononucleares en las muestras de GT de ambos días (Figura 8B y E). Sin embargo, en el GT del animal infectado con la cepa BoHV-1 Δ gE β gal del día 9 pi no se encontraron células reactivas (Figura 8G-I).

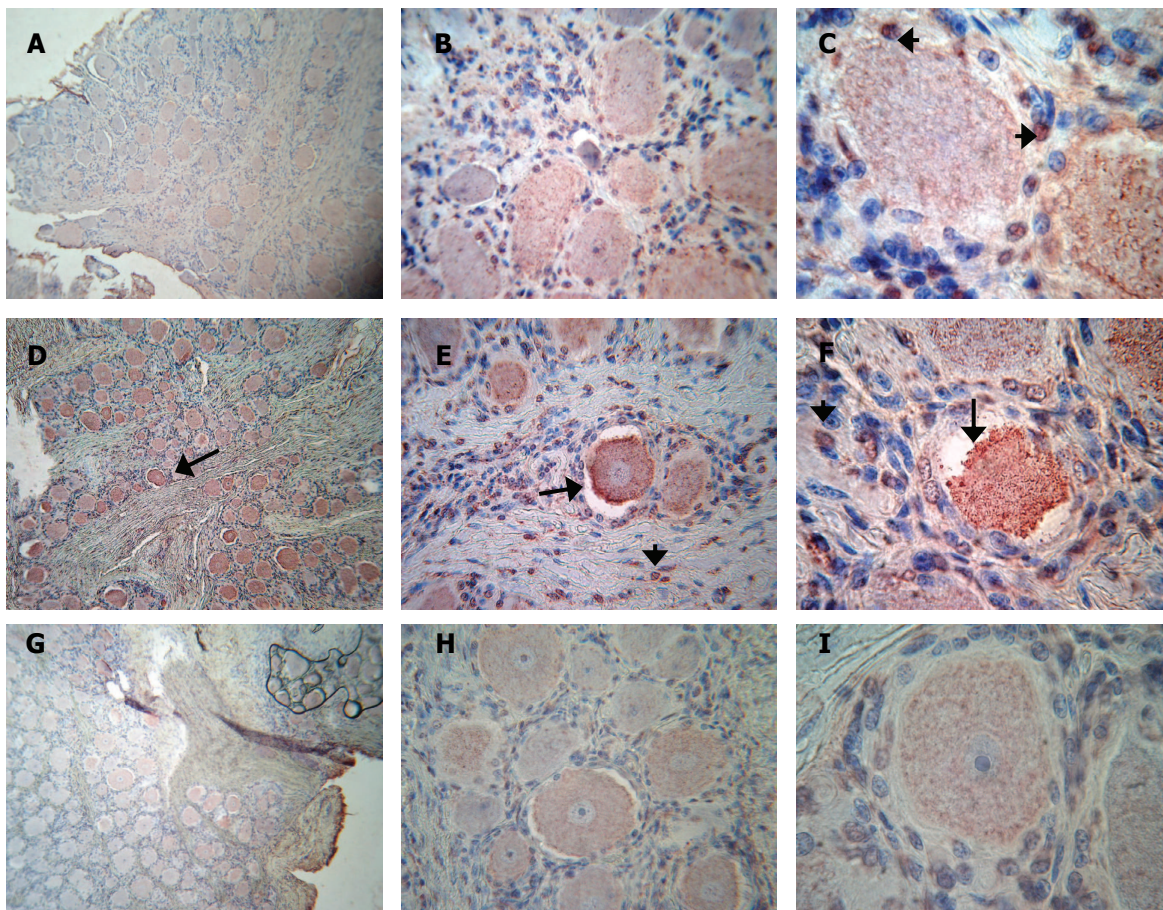


Figura 8: Inmunohistoquímica de GT de animales infectados con BoHV-1 LA y eutanasiados a los 5 dpi (A-C) o 9 dpi (D-F). G-I: GT de un animal infectado con la cepa BoHV-1 Δ gE β gal y eutanasiado a los 9 dpi. Aumento: A, D y G 100x; B, E y H 400x; C, G e I 1000x. Las flechas indican cuerpos neuronales positivos y las puntas de flecha muestran células no neurales reactivas. Nótese en B y E el infiltrado de células mononucleares.

Asimismo se analizaron muestras de tonsilas de animales infectados con BoHV-1 LA o BoHV-1 Δ gE β gal sacrificados el día 9 pi. Se encontraron células positivas en los cortes de tonsila del animal infectado con el virus BoHV-1 LA (Figura 9A-C) pero no en el tejido del animal infectado con la cepa BoHV-1 Δ gE β gal (Figura 9D-E).

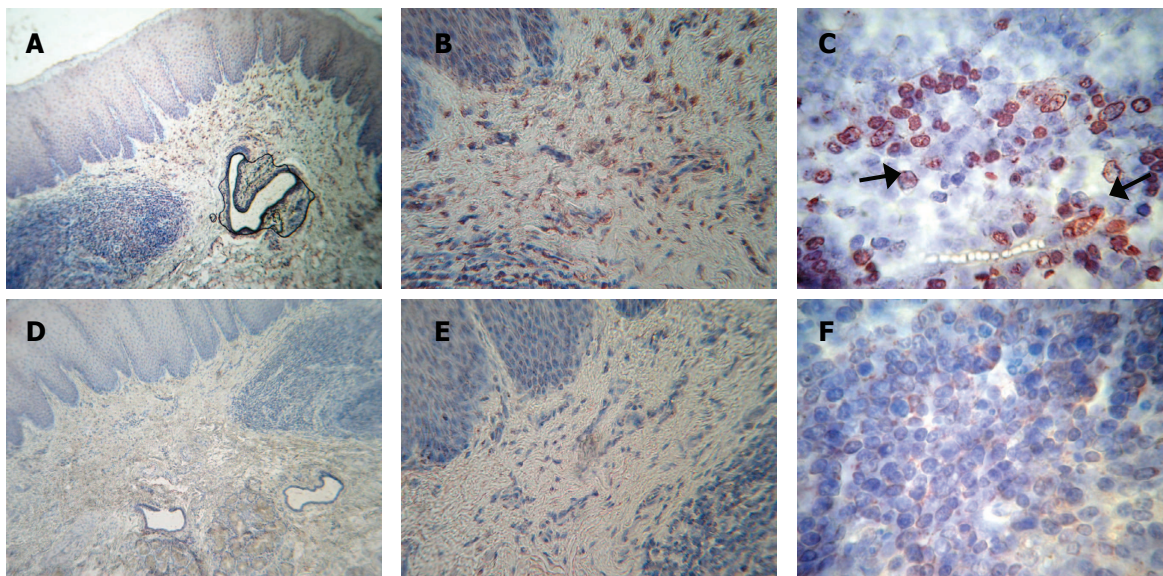


Figura 9: Inmunohistoquímica de tonsilas de animales infectados con BoHV-1 LA (A-C) o BoHV-1 Δ gE β gal (D-F), eutanasiados a los 9 dpi. Aumento: A y D 100x; B y E 400x; C y G 1000x. Las flechas señalan células positivas.

En un corte de mucosa nasal del animal infectado con la cepa BoHV-1 LA y sacrificado al día 5 pi se encontró una célula morfológicamente compatible con un cuerpo neuronal positivo a la marcación con el anticuerpo anti-BoHV-1 (Figura 10A-C).

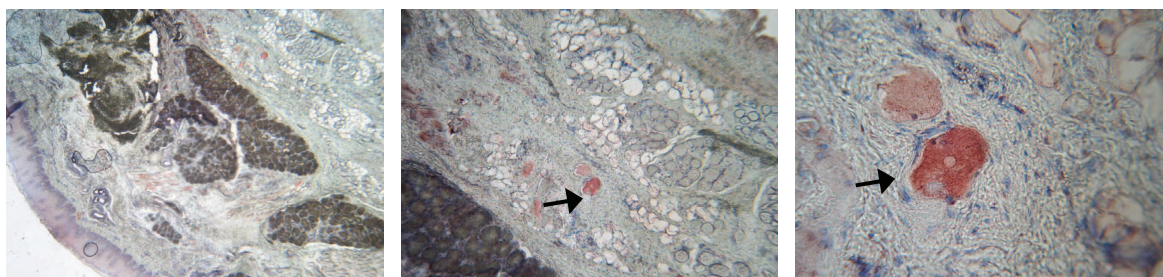


Figura 10: Inmunohistoquímica de mucosa nasal de animal infectado con BoHV-1 LA, eutanasiado a los 9 dpi. Aumento: A 100x; B 400x; C 1000x. Las flechas señalan células positivas.

La detección de antígenos virales en GT y tonsila en los animales infectados con el virus BoHV-1 LA sugiere la infección de estos tejidos, de acuerdo a lo esperado para una cepa salvaje de BoHV-1. El hallazgo de una célula reactiva con morfología neuronal en la mucosa nasal del bovino eutanasiado al día 5 pi podría indicar una de las vías de acceso del virus a los sitios de latencia.

Los datos de las muestras procesadas por inmunohistoquímica sugieren que la cepa BoHV-1 Δ gE β gal no produce una infección productiva en los sitios de latencia propuestos para BoHV-1 en el bovino luego de la infección experimental por vía intranasal a la dosis utilizada en este estudio.

2.C.2. Detección de ADN viral

Para profundizar el estudio del establecimiento de latencia en estos tejidos, se investigó la presencia de ADN viral en ganglio trigémino (GT) y tonsilas (T) mediante amplificación por PCR.

La extracción de ADN de las muestras se confirmó en todos los casos mediante la amplificación por PCR de un fragmento de 250 pb del gen celular bovino *gapdh* (Figura 11).

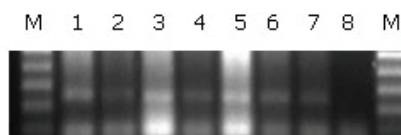


Figura 11: Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación por PCR a partir de ADN extraído de GT y T de animales infectados con la cepa BoHV-1 Δ gE β gal (calles 1-3) y BoHV-1 LA (calles 4-7). Se observa un producto de amplificación de 246 pb correspondiente a un fragmento del gen *gapdh* bovino. Calle 8: Control negativo. M: Marcador de peso molecular.

Todas las muestras de GT provenientes de animales infectados con la cepa BoHV-1 Δ gE β gal fueron negativas para las reacciones de amplificación por PCR utilizando oligonucleótidos específicos para BoHV-1. Sin embargo, todas las muestras de animales infectados con la cepa BoHV-1 LA fueron positivas, observándose una banda específica de 390 pb correspondiente a un fragmento del gen *gC* y otra banda de 281 pb de un fragmento del gen *gE* (Figura 12).

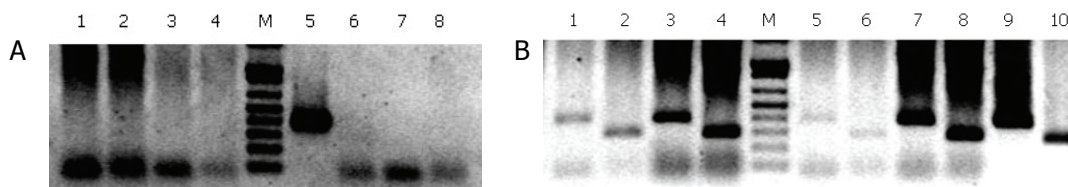


Figura 12: Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación por PCR a partir de ADN extraído de GT de animales infectados con la cepa BoHV-1 Δ gE β gal y BoHV-1 LA. Para cada muestra, el producto de amplificación en la calle de la izquierda corresponde a un fragmento de 390 pb del gen *gC* y en la calle de la derecha, a un fragmento de 281 pb del gen *gE*. **A:** GT de animales infectados con la cepa BoHV-1 Δ gE β gal. Calles 1 y 2: día 15 pi, Calles 3 y 4: día 91 pi, Calles 5 y 6: control positivo BoHV-1 Δ gE β gal. Calles 7 y 8: control negativo. **B:** GT de animales infectados con la cepa BoHV-1 LA. Calles 1 y 2: día 9 pi, Calles 3 y 4: día 21 pi, Calles 5 y 6: día 42 pi, Calles 7 y 8: día 91 pi, Calles 9 y 10: control positivo BoHV-1 LA. M: Marcador de peso molecular.

La amplificación por PCR a partir de tonsilas de animales infectados la cepa BoHV-1 Δ gE β gal y eutanasiados a los días 9 y 42 pi fue negativa, mientras que las tonsilas de los animales infectados con BoHV-1 LA sacrificados a los 9 y 42 dpi fueron positivas. En las muestras positivas se observa una banda de 354 pb correspondiente a un fragmento del gen *gC* (Figura 13).

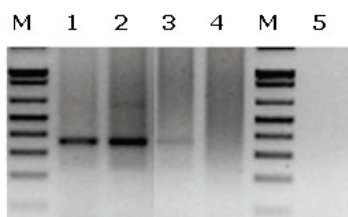


Figura 13: Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación por PCR a partir de ADN extraído de tonsilas de animales infectados con la cepa BoHV-1 Δ gE β gal y BoHV-1 LA. En las muestras positivas se observa un producto de amplificación que corresponde a un fragmento de 354 pb del gen *gC*. Calles 1: Control positivo. Calles 2 y 3: T de animales infectados con la cepa BoHV-1 LA (día 9 pi), Calle 4: T de animal infectado con la cepa BoHV-1 Δ gE β gal (día 9 pi), Calle 5: control negativo. M: Marcador de peso molecular.

Los datos de amplificación por PCR indicarían la ausencia de ADN del virus BoHV-1 Δ gE β gal en los sitios de latencia propuestos para BoHV-1. La detección de ADN viral en las muestras de todos los animales infectados con la cepa BoHV-1 LA confirma el acceso de esta cepa al GT y tonsilas.

Conjuntamente, los resultados de la experiencia de reactivación y el estudio de los GT y tonsilas sugieren que la cepa BoHV-1 Δ gE β gal no alcanzaría estos sitios de latencia, y por ende, no establecería una infección latente. En consecuencia, la reactivación no sería posible, tal como sugieren los resultados obtenidos luego del tratamiento inmunosupresor.

3. ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO *in vitro* DE LA CEPA BoHV-1 Δ gE β gal

Los datos obtenidos en los experimentos *in vivo* indican que la cepa BoHV-1 Δ gE β gal se encuentra altamente atenuada en bovinos. Los animales infectados con esta cepa no presentaron excreción viral ni signos clínicos de la enfermedad. A pesar de que no siempre se encuentra una correlación entre las observaciones *in vivo* e *in vitro*, mediante la caracterización *in vitro* del virus BoHV-1 Δ gE β gal podrían obtenerse resultados que contribuyan a comprender cuáles son los mecanismos alterados en este virus, ya que deficiencias en el crecimiento *in vitro* podrían afectar el comportamiento *in vivo*. Con fines comparativos, se estudió en simultáneo a la cepa parental BoHV-1 LA.

Asimismo, el virus BoHV-1 LA mostró ser una cepa virulenta en el bovino, con niveles de excreción similares a los reportados para otras cepas salvajes de BoHV-1. Sin embargo, los signos clínicos fueron moderados. En este contexto, se decidió estudiar esta cepa *in vitro* en comparación con otras cepas salvajes de BoHV-1, a fin de establecer el comportamiento de la misma contribuyendo al conocimiento del virus BoHV-1 Δ gE β gal que fue desarrollado a partir de ella.

3.A. Estudio del efecto citopático

Para obtener información acerca del efecto citopático producido en las células infectadas con los virus BoHV-1 LA y BoHV-1 Δ gE β gal, a fin de establecer posibles diferencias, se infectaron monocapas de células MDBK a una multiplicidad de infección (moi) de 1. A las 48 horas post infección (hpi) las células se observaron al microscopio óptico y se fotografiaron (Figura 14).

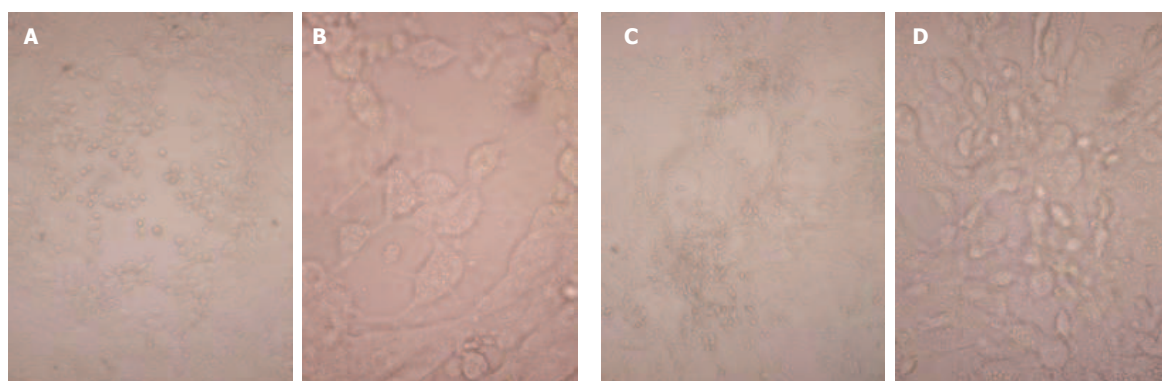


Figura 14. Células MDBK infectadas con BoHV-1 LA (A y B) o con BoHV-1 Δ gE β gal (C y D) a una moi de 1 y fotografiadas a las 48 hpi. A y C: 100x. B y D: 1000x

Las células infectadas con el virus BoHV-1 LA evidenciaron los cambios morfológicos típicos de la infección por herpesvirus, mostrando la monocapa un extendido efecto citopático a las 24

hpi. Las células se observaron de mayor tamaño, redondeadas, se tornaron refringentes, perdiendo la cohesión entre ellas. Se observaron grandes espacios vacíos en la monocapa (placas de lisis) debido al desprendimiento de las células (Figura 14A). A mayor aumento (Figura 14B) se evidenció la presencia de extensos y abundantes puentes intercelulares.

En las células infectadas con la cepa BoHV-1 Δ gE β gal (Figura 14C y D) el desarrollo del efecto citopático se encontró retrasado 24 horas respecto de la cepa LA. Las células se mantuvieron unidas y con tendencia a "apilarse" unas sobre otras. La presencia de puentes intercelulares no fue evidente y las células permanecieron sin desprenderse de la monocapa. Asimismo, si bien las células infectadas se volvieron redondeadas y refringentes, presentaron menor tamaño que las células infectadas con el virus BoHV-1 LA.

El análisis detallado de la morfología de células MDBK infectadas, pone de manifiesto diferencias en el efecto citopático resultante de la acción de los virus bajo estudio. El fenotipo alterado de las células MDBK luego de la infección da cuenta de posibles diferencias en el comportamiento *in vitro* de ambos virus, cuyo estudio fue abordado mediante distintas estrategias, como se detalla a continuación.

3.B. Estudio del ingreso viral a las células

Para evaluar el pegado e ingreso del virus BoHV-1 Δ gE β gal a las células, con el objetivo de detectar posibles alteraciones en este paso del ciclo de replicación viral, se determinó su cinética de penetración en comparación con la de la cepa BoHV-1 LA (Figura 15).

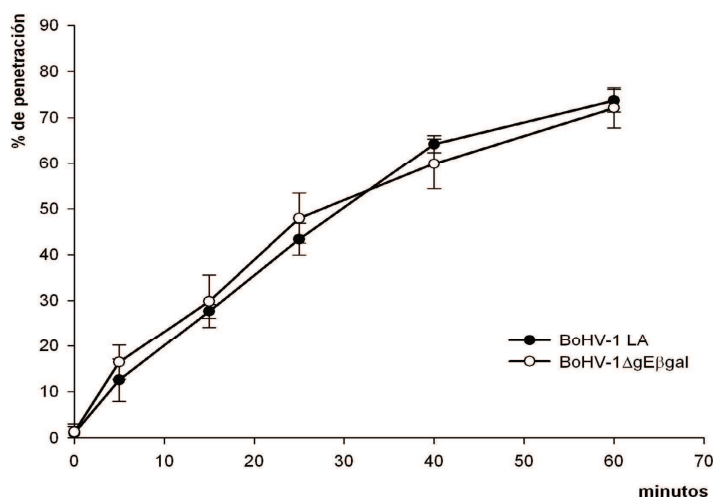


Figura 15. Cinética de penetración de los virus BoHV-1 Δ gE β gal y BoHV-1 LA. El pegado de virus a las células se sincronizó mediante incubación a 4°C. La penetración se realizó a 37°C. A diferentes tiempos Las partículas virales que no penetraron fueron inactivadas mediante un tratamiento a pH ácido y se cubrieron con un medio semisólido. Se grafica el cociente entre la cantidad de placas de lisis por pocillo tratadas con pH ácido y tratadas con PBS a cada tiempo. Las barras de error corresponden a los desvíos estándar de dos experimentos independientes.

Este experimento muestra que no habría diferencias en la tasa de penetración entre el virus BoHV-1 Δ gE β gal y BoHV-1 LA en células MDBK, indicando que las variaciones en el ciclo replicativo del virus BoHV-1 Δ gE β gal no estarían relacionadas con diferencias en la capacidad de infección mediante adsorción a las células.

3.C. Estudio del pasaje célula a célula

3.C.1 Cinética de crecimiento de múltiples pasos

Para estudiar la replicación de la cepa BoHV-1 Δ gE β gal en relación al virus parental BoHV-1 LA, se determinaron las cinéticas de crecimiento de múltiples pasos para ambos virus en medio líquido. La moi utilizada fue de 0,1, permitiendo evaluar la dispersión del virus desde las células infectadas a las células vecinas.

Mediante el análisis de la fracción extracelular se detectó hasta 150 veces menos partículas virales infectivas para el virus BoHV-1 Δ gE β gal que para el BoHV-1 LA ($10^{2,925}$ y $10^{5,075}$ DICT₅₀/ml para BoHV-1 Δ gE β gal y BoHV-1 LA respectivamente a las 24 hpi) durante todo el período ensayado. Recién a las 72 hpi ambos virus alcanzaron los mismos títulos ($10^{7,75}$ y $10^{7,95}$ DICT₅₀/ml para BoHV-1 Δ gE β gal y BoHV-1 LA, respectivamente) (Figura 16A).

La producción de partículas virales medida en la fracción intracelular se demoró en la cepa BoHV-1 Δ gE β gal respecto de la cepa LA, registrándose entre 10 y 100 veces menos virus infeccioso entre las 3 y las 36 hpi ($10^{0,35}$ y $10^{2,25}$ DICT₅₀/ml para BoHV-1 Δ gE β gal y BoHV-1 LA, respectivamente a las 6 hpi). A las 36 hpi los títulos de ambos virus se igualaron ($10^{7,65}$ y $10^{7,6}$ DICT₅₀/ml para BoHV-1 Δ gE β gal y BoHV-1 LA, respectivamente) y permanecieron así hasta las 72 hpi, manteniendo el virus BoHV-1 Δ gE β gal un valor de $10^{7,65}$ DICT₅₀/ml mientras que el virus BoHV-1 LA disminuyó a $10^{7,125}$ DICT₅₀/ml (Figura 16B).

Comparando ambas curvas se observó que a partir del momento en que la producción viral se equiparó entre ambas cepas (36 hpi) persiste aún una diferencia significativa en el título de partículas virales infectivas en el espacio extracelular ($10^{5,57}$ y $10^{7,45}$ DICT₅₀/ml para BoHV-1 Δ gE β gal y BoHV-1 LA, respectivamente).

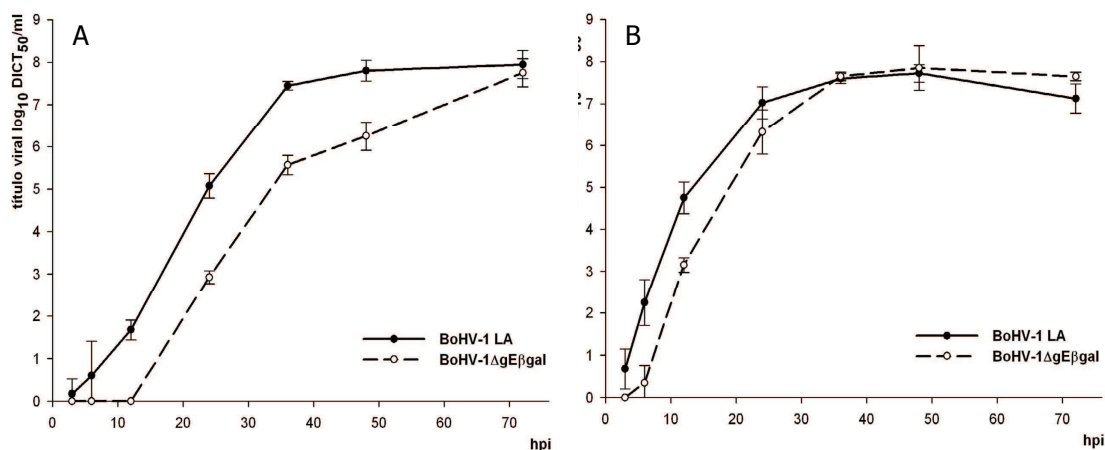


Figura 16. Cinética de múltiples pasos del virus BoHV-1 LA y BoHV-1ΔgEβgal. Las partículas virales que no penetraron a las células fueron inactivadas mediante un tratamiento a pH ácido. A las distintas hpi indicadas se tomaron alícuotas de la fracción extracelular (A) e intracelular (B). El título viral de cada fracción se determinó mediante titulación en células MDBK y están expresados como \log_{10} DICT₅₀/ml. Se graficaron los valores promedios y los desvíos estándar correspondientes a cuatro experimentos.

El egreso de partículas virales infectivas al espacio extracelular se graficó en una curva de egreso viral, donde se establecieron los porcentaje de salida del virus de las células en relación a la cantidad de virus total producido (Figura 17). Independientemente de la producción viral total, la proporción de partículas que salen al espacio extracelular es menor para el virus BoHV-1ΔgEβgal que para el virus LA, en todos los tiempos ensayados, siendo más pronunciada esta diferencia hasta las 24 hpi (0% y 26% de salida para BoHV-1ΔgEβgal y BoHV-1 LA, respectivamente a las 12 hpi).

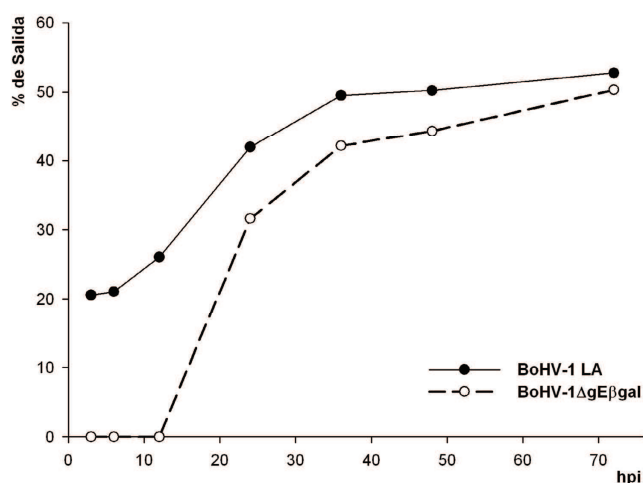


Figura 17. Porcentaje de salida de los virus BoHV-1 LA y BoHV-1ΔgEβgal. Cada punto representa el cociente entre la cantidad de virus en el espacio extracelular y la suma de la cantidad de virus del espacio intra y extracelular para cada tiempo ensayado.

Con el objetivo de determinar si la cinética de crecimiento de la cepa BoHV-1 LA es comparable a la de otras cepas salvaje de BoHV-1, se realizó el ensayo de cinética de replicación utilizando dicho virus y la cepa de referencia BoHV-1 Colorado (Cooper) (Figura 18).

Las títulos correspondientes a la fracción extracelular (Figura 18A) e intracelular (Figura 18B) fueron similares entre ambos virus. Los valores máximos alcanzados en la fracción extracelular fueron $10^{7,375}$ DICT₅₀/ml a las 48 hpi y $10^{7,55}$ DICT₅₀/ml a las 36 hpi, mientras que en la fracción intracelular fueron de 10^8 DICT₅₀/ml a las 36 hpi y $10^{7,45}$ DICT₅₀/ml a las 24 hpi, para los virus BoHV-1 LA y Colorado respectivamente. No se encontraron diferencias en los títulos finales alcanzados entre ambos virus ($10^{7,375\pm 0,3}$ DICT₅₀/ml y $10^{6,825\pm 0,6}$ DICT₅₀/ml en la fracción extracelular y $10^{7,9\pm 0,5}$ DICT₅₀/ml y $10^{7,175\pm 0,4}$ DICT₅₀/ml en la fracción intracelular para los virus BoHV-1 LA y Colorado, respectivamente)

La detección de virus infeccioso en la fracción extracelular comenzó a las 12 hpi para ambos virus, siendo menor para BoHV-1 LA que para BoHV-1 Colorado ($10^{2,2}$ y $10^{3,05}$ DICT₅₀/ml, respectivamente). Sin embargo, a partir de ese punto y hasta el final del ensayo, los valores fueron similares.

La producción de partículas virales infectivas medidas en la fracción intracelular se detectó desde las 3 hpi para el virus BoHV-1 LA ($10^{1,7}$ DICT₅₀/ml) mientras que para BoHV-1 Colorado comenzó a las 6 hpi, pero con un título igual al que presentó BoHV-1 LA en ese tiempo ($10^{3,4}$ y $10^{3,45}$ DICT₅₀/ml para BoHV-1 LA y Colorado respectivamente).

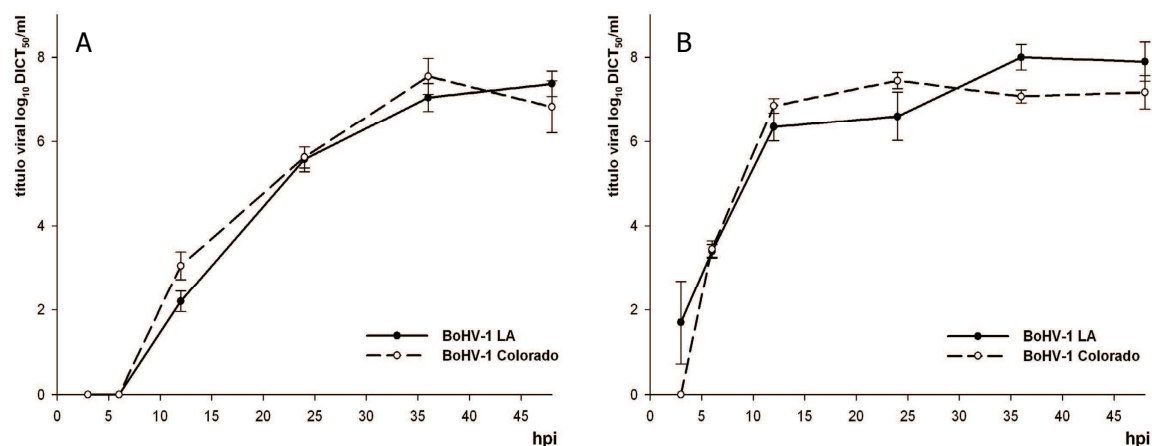


Figura 18. Cinética de múltiples pasos del virus BoHV-1 LA y BoHV-1 Colorado. Las partículas virales que no penetraron a las células fueron inactivadas mediante un tratamiento a pH ácido. A las distintas hpi indicadas se tomaron alícuotas de la fracción extracelular (A) e intracelular (B). El título viral de cada fracción se determinó mediante titulación en células MDBK y están expresados como log₁₀DICT₅₀/ml. Se graficaron los valores promedios y los desvíos estándar correspondientes a dos experimentos.

Los porcentajes de liberación fueron similares para ambos virus a lo largo de todos los tiempos ensayados, con valores máximos entre 46 y 52% entre las 36 y 48 hpi (Figura 19).

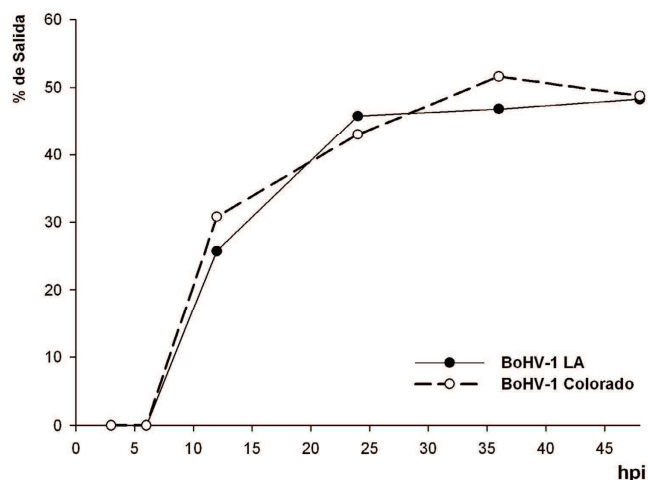


Figura 19. Porcentaje de salida de los virus BoHV-1 LA y BoHV-1 Colorado. Cada punto representa el cociente entre la cantidad de virus en el espacio extracelular y la suma de la cantidad de virus del espacio intra y extracelular para cada tiempo ensayado.

De estos resultados se desprende que el comportamiento de la cepa BoHV-1 LA no difiere del de otra cepa de referencia de BoHV-1 (Colorado) extensamente estudiada. De esta forma, las diferencias encontradas entre BoHV-1 LA y el virus BoHV-1 Δ gE β gal son parte del fenotipo alterado de la cepa deletada. En conclusión, se produce una menor liberación de partículas virales al espacio extracelular y el pasaje célula a célula está comprometido en la cepa BoHV-1 Δ gE β gal.

3.C.2. Ensayo de tamaño de placas de infección

Para estudiar fenotípicamente la posible dificultad en el pasaje célula a célula del virus BoHV-1 Δ gE β gal, detectada en el ensayo de cinética de replicación de múltiples pasos, se analizaron las placas generadas por la infección de células con los virus BoHV-1 Δ gE β gal y BoHV-1 LA y para obtener datos de sus tamaños.

Para estudiar el pasaje célula a célula, se utilizaron monocapas de células MDBK y un medio semisólido, con el fin de obstaculizar la difusión viral, dificultando la liberación de viriones al medio y su adsorción a las células vecinas no infectadas. A las 72 hpi las células se fijaron, se marcaron con un conjugado policlonal anti-BoHV-1 y se fotografiaron bajo un microscopio de epifluorescencia (Figura 20).

La morfología de las áreas de infección fue distinta entre ambos virus. Las placas inducidas por el virus BoHV-1 Δ gE β gal (Figura 20B) fueron marcadamente de menor tamaño que las resultantes de la infección por BoHV-1 LA, y se observó que en el centro de las mismas no hubo desprendimiento de células.

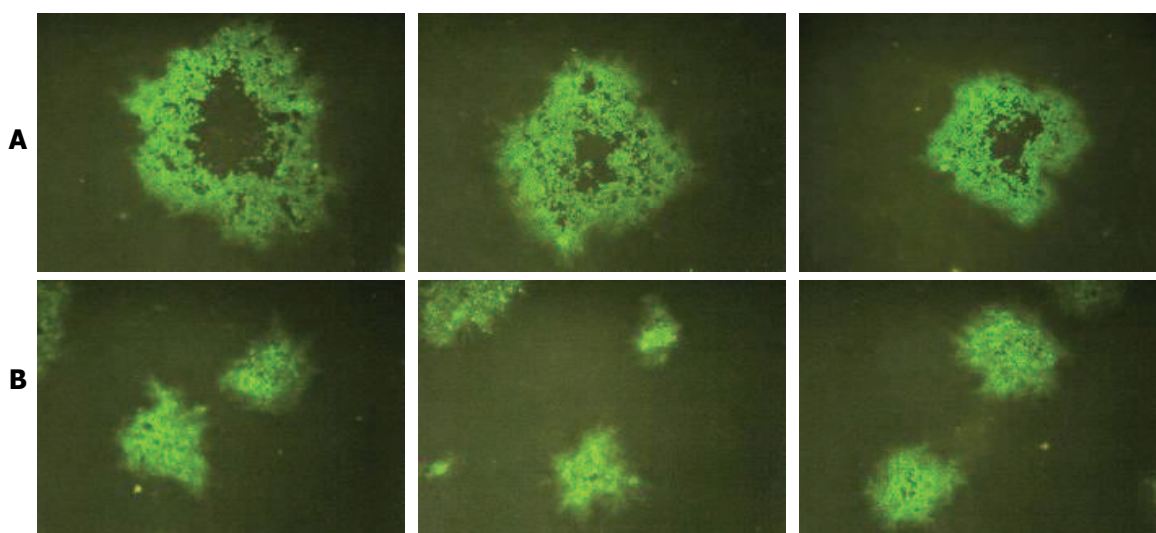


Figura 20. Placas de infección producidas por la infección con el virus BoHV-1 LA (A) y BoHV-1ΔgEβgal (B) sobre células MDBK. Luego de la infección, las células se incubaron bajo un medio semisólido. A las 72 hpi se fijaron y marcaron con un conjugado policlonal anti-BoHV-1.

Seguidamente, las placas reactivas (como medida de la infección) se midieron y se calcularon las áreas medias de infección utilizando un *software* de análisis de imágenes. Los valores para la cepa BoHV-1 LA se establecieron como el 100% y las áreas medias para el virus BoHV-1ΔgEβgal se expresaron respecto a este valor.

Se observó una reducción en el área de infección del 72% para el virus BoHV-1ΔgEβgal. Es decir que este virus forma placas que contienen sólo un 28% de células respecto del número de células involucradas en las placas de infección inducidas por el virus parental (Figura 21).

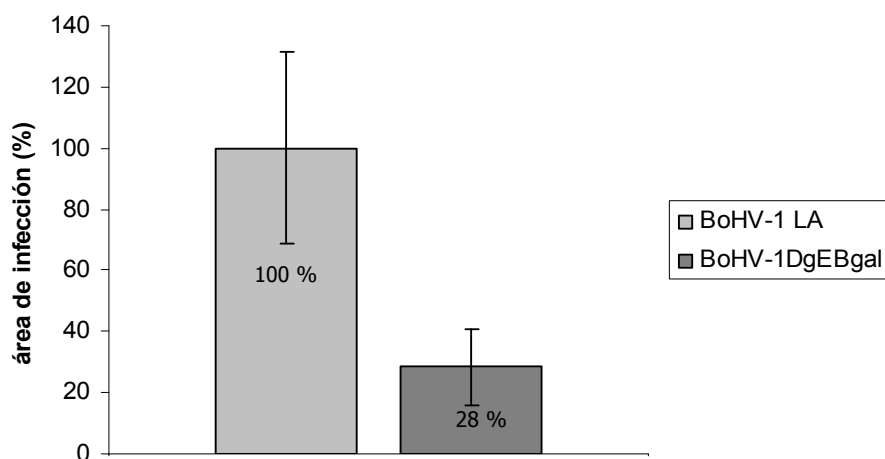


Figura 21. Tamaño de placa de infección relativo de la cepa BoHV-1ΔgEβgal. Las áreas medias de las placas formadas por el virus BoHV-1 LA se establecieron como el 100%. Las barras de error indican el desvío estándar correspondiente a 20 placas.

Las placas de infección inducidas por el virus BoHV-1ΔgEβgal son marcadamente menores a las producidas por BoHV-1 LA. Asimismo, no muestran la extensa formación de sincicios

observada en las placas inducidas por el virus parental. Estos resultados demuestran una menor diseminación mediante transmisión de célula a célula del virus BoHV-1 Δ gE β gal.

3.D. Estudio del egreso viral

3.D.1. Ensayo de tamaños de placas de lisis

En las imágenes anteriores se observó que las áreas de lisis producidas por el virus BoHV-1 Δ gE β gal son mucho menores que las producidas por el virus parental (Figura 20). Para estudiar cuantitativamente estas diferencias y evaluar las propiedades líticas de del virus BoHV-1 Δ gE β gal, asociado al egreso viral de las células, se analizaron las placas de lisis generadas por la infección de células con los virus BoHV-1 Δ gE β gal y BoHV-1 LA.

Se utilizaron monocapas de células MDBK y un medio semisólido. A las 72 hpi las células se fijaron, se colorearon y se fotografiaron bajo un microscopio óptico. Se observó que la morfología de las áreas de lisis fue muy distinta entre ambos virus (Figura 22). El tamaño de las placas inducidas por el virus BoHV-1 Δ gE β gal (Figura 22B) fue marcadamente menor que el resultante de la infección por BoHV-1 LA. Asimismo, las placas formadas por el primero no mostraron la extensa formación de sincicios encontrada en aquellas placas inducidas por el virus BoHV-1 LA.

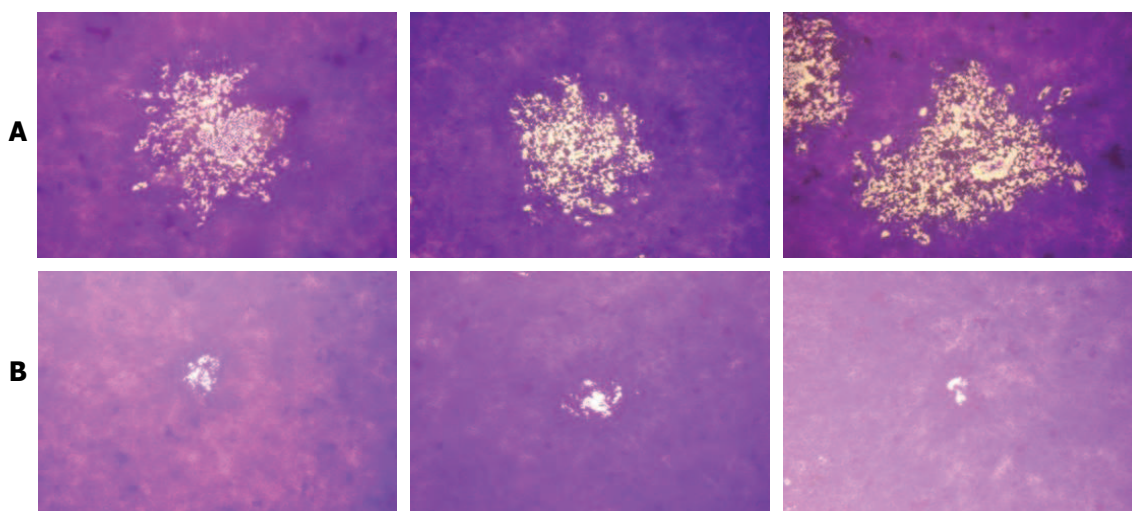


Figura 22. Placas de lisis producidas por el virus BoHV-1 LA (A) y BoHV-1 Δ gE β gal (B) sobre células MDBK. Luego de la infección, las células se incubaron bajo un medio semisólido. A las 72 hpi se fijaron y se tiñeron con cristal violeta.

Finalmente, se midieron las áreas de lisis y se calcularon las superficies medias como se indicó en el ensayo anterior. Las áreas contenidas en cada perímetro se obtuvieron mediante el uso de un sistema de análisis de imágenes. Este método permite la medición exacta de las áreas, incluso en los casos en que las placas presentan formas irregulares. El tamaño de placa producida por la cepa BoHV-1 LA fue consistentemente mayor que el tamaño inducido por la cepa BoHV-1 Δ gE β gal. La reducción en el área de lisis fue del 91% (figura 23).

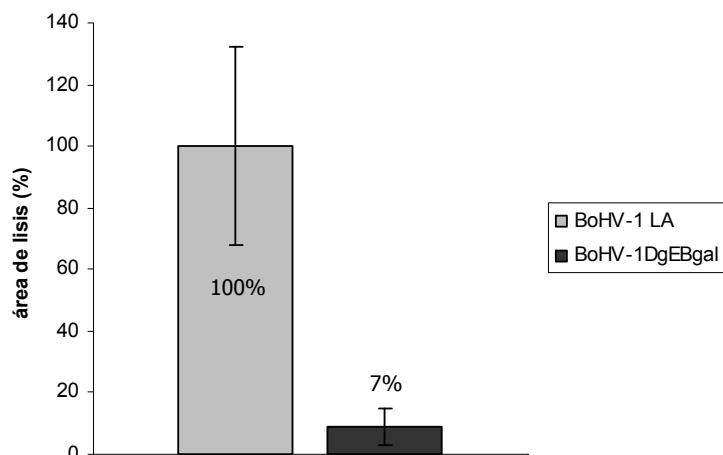


Figura 23. Tamaño de placa de lisis de la cepa BoHV-1ΔgEβgal relativos a la cepa BoHV-1 LA. Las áreas medias de las placas formadas por el virus BoHV-1 LA se establecieron como el 100%. Las barras de error indican el desvío estándar correspondiente a 60 placas.

Con el objetivo de estudiar si la disminución en las áreas de lisis observada en las células infectadas con el virus BoHV-1ΔgEβgal está asociada a la delección del gen gE, se realizó el mismo ensayo utilizando una cepa recombinante con delección del gen gE, denominada Difivac. Asimismo, se incluyó en el análisis al virus salvaje BoHV-1 Lam para establecer si el comportamiento del mismo es comparable al de la cepa BoHV-1 LA.

Al observar la morfología de las placas de lisis producidas por los virus BoHV-1 Lam y Difivac se apreció una menor diferencia entre ellos (Figura 24) que la observada entre BoHV-1 LA y BoHV-1ΔgEβgal (Figura 22).

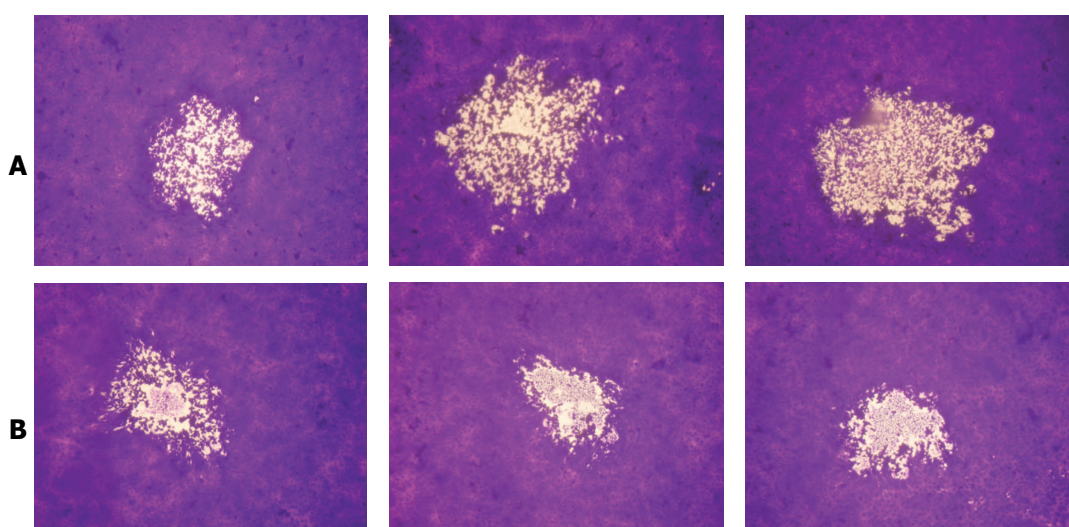


Figura 24. Placas de lisis producidas por el virus BoHV-1 Lam (A) y Difivac (B) sobre células MDBK. Luego de la infección, las células se incubaron bajo un medio semisólido. A las 72 hpi se fijaron y se tiñeron con cristal violeta.

Al comparar los datos de los cuatro virus se observó que ambas cepas salvajes producen placas de tamaños similares y de mayor tamaño que las producidas por los virus con deleciones en el gen *gE*, siendo más variables las correspondientes al virus BoHV-1 Lam. En cuanto a las cepas con deleciones en el gen *gE*, se observó que las placas producidas por la cepa BoHV-1ΔgEβgal son 7,5 veces menores que las producidas por la cepa Difivac (Figura 25).

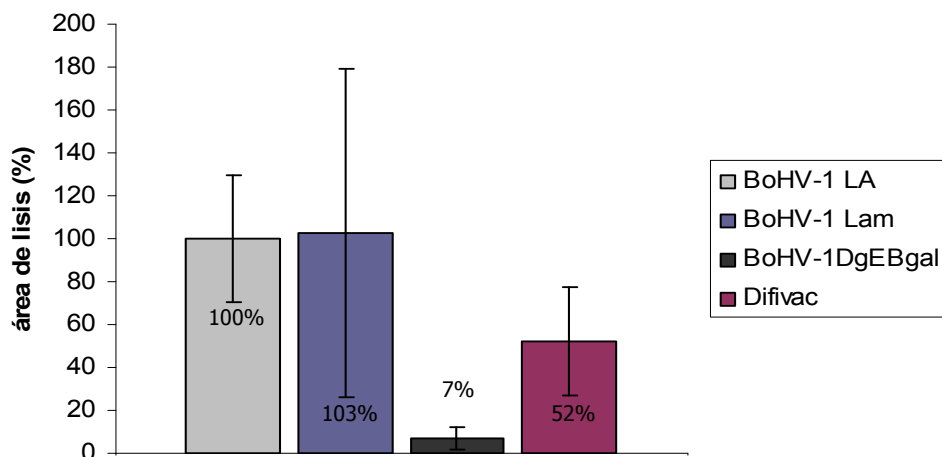


Figura 25. Tamaño de placa de lisis de la cepa BoHV-1ΔgEβgal, BoHV-1 Lam y Difivac relativos a la cepa BoHV-1 LA. Las áreas medias de las placas formadas por el virus BoHV-1 LA se establecieron como el 100%. Las barras de error indican el desvío estándar correspondiente a 60 placas.

Respecto al virus BoHV-1 LA, la comparación de los resultados obtenidos con la cepa Lam permite concluir que la capacidad de producir placas de lisis y su tamaño es el esperado para una cepa salvaje de BoHV-1. Sin embargo, la diferencia entre las cepas deleteadas fue significativa y refleja una alteración en el comportamiento de la cepa BoHV-1ΔgEβgal.

Al analizar los resultados de los ensayos de tamaños de placas se observó que la diferencia entre BoHV-1 LA y BoHV-1ΔgEβgal es mayor en el caso de las placas de lisis (Figura 23) que en las placas de infección (Figura 21). Por lo tanto, además del pasaje célula a célula, la capacidad lítica en el virus BoHV-1ΔgEβgal se encuentra alterada. Dado que esta propiedad se encuentra vinculada al egreso de los viriones de las células, se realizaron ensayos de cinética de un paso para abordar este aspecto.

3.D.2. Cinética de crecimiento de un paso

El estudio de la salida de virus de las células de la cepa BoHV-1ΔgEβgal se realizó mediante el establecimiento de su cinética de replicación de un único paso y la comparación con la cepa BoHV-1 LA. Para ello se infectaron células MDBK con una moi de 5, lo cual garantiza que se produzca la infección viral de todas las células con el inóculo viral. Esto permite evaluar tanto la producción viral como la salida de virus de la célula, mientras que las diferencias en el pasaje célula a célula no alteran los resultados.

Al analizar la fracción extracelular de las células infectadas con el virus BoHV-1ΔgEβgal se observó un retraso en la aparición de partículas virales, que comenzaron a detectarse a las 9 hpi con un título de $10^{0,175}$ DICT₅₀/ml, mientras que para el virus BoHV-1 LA se detectó virus infeccioso desde las 3 hpi. Asimismo, se encontraron hasta 140 veces menos partículas virales infectivas del virus BoHV-1ΔgEβgal que de BoHV-1 LA durante el período ensayado ($10^{4,8}$ y $10^{6,15}$ DICT₅₀/ml para BoHV-1ΔgEβgal y BoHV-1 LA, respectivamente a las 18 hpi). Esta diferencia se mantuvo a lo largo del tiempo, alcanzando el virus deletado títulos menores que la cepa parental ($10^{5,725}$ y $10^{6,725}$ DICT₅₀/ml para BoHV-1ΔgEβgal y BoHV-1 LA respectivamente) (Figura 26A).

La producción viral de la cepa BoHV-1ΔgEβgal, medida en la fracción intracelular, se observó un retraso en el tiempo ya que se detectaron hasta 1800 veces más partículas virales hasta las 12 hpi ($10^{0,6}$ y $10^{3,875}$ DICT₅₀/ml para las cepas BoHV-1ΔgEβgal y BoHV-1 LA respectivamente a las 6 hpi). A las 12 hpi los títulos de ambos virus se igualaron ($10^{6,775}$ y $10^{7,125}$ DICT₅₀/ml para BoHV-1ΔgEβgal y BoHV-1 LA respectivamente) y permanecieron así hasta las 24 hpi, alcanzando finalmente valores de $10^{7,66}$ y $10^{7,3}$ DICT₅₀/ml para la cepa BoHV-1ΔgEβgal y BoHV-1 LA respectivamente (Figura 26B).

El análisis de los gráficos correspondientes a ambas fracciones indica que la menor cantidad de partículas infectivas en la fracción intracelular de las células infectadas con la cepa BoHV-1ΔgEβgal, en comparación con la cepa BoHV-1 LA entre las 3 y las 12 hpi, no se correspondió con un aumento en la fracción extracelular, ya que ésta fue también menor para BoHV-1ΔgEβgal durante ese intervalo. Asimismo, a partir de las 12 hpi, cuando la producción intracelular de la cepa BoHV-1ΔgEβgal alcanzó la de su parental, y hasta el último tiempo ensayado, se detectó una menor cantidad de partículas virales infectivas en la fracción extracelular para el virus BoHV-1ΔgEβgal ($10^{2,9}$ y 10^4 DICT₅₀/ml para BoHV-1ΔgEβgal y BoHV-1 LA respectivamente a las 12 hpi).

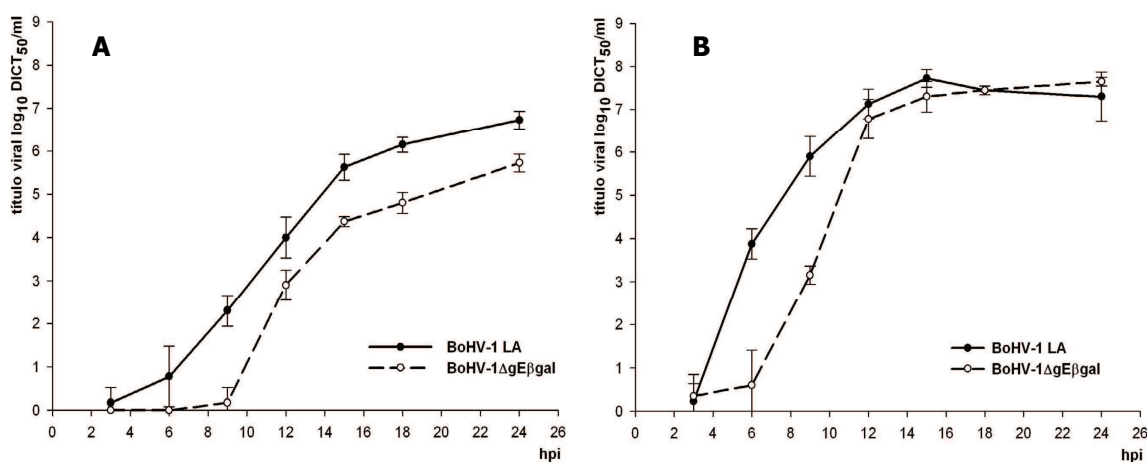


Figura 26. Cinética de un único paso del virus BoHV-1 LA y BoHV-1ΔgEβgal. Las partículas virales que no penetraron a las células fueron inactivadas mediante un tratamiento a pH ácido. A las distintas hpi indicadas se tomaron alícuotas de la fracción extracelular (A) e intracelular (B). El título viral de cada fracción se determinó mediante titulación en células MDBK y están expresados como \log_{10} DICT₅₀/ml. Se graficaron los valores promedios y los desvíos estándar correspondientes a cuatro experimentos.

El egreso de partículas virales infectivas al espacio extracelular se graficó en una curva de salida viral, donde se establecieron los porcentajes de salida de virus de las células en relación a la cantidad de virus total producido (Figura 27). Independientemente de la producción viral total, la proporción de partículas que salen al espacio extracelular fue menor para el virus BoHV-1ΔgEβgal en todos los tiempos ensayados, siendo esta diferencia más pronunciada hasta las 12 hpi (5% y 28% para BoHV-1ΔgEβgal y BoHV-1 LA respectivamente a las 9 hpi).

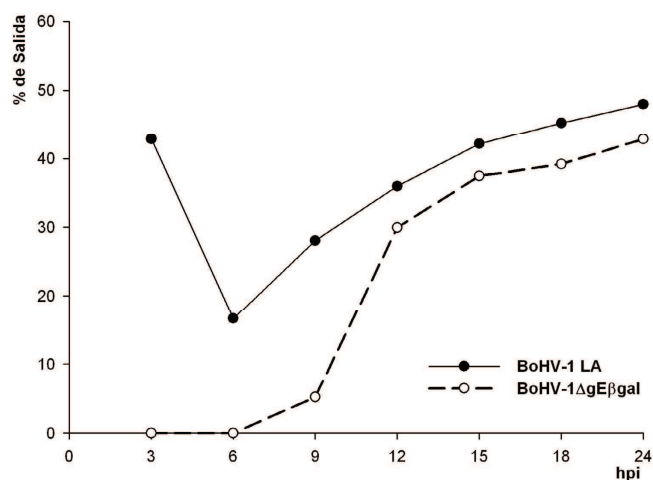


Figura 27. Porcentaje de salida de los virus BoHV-1 LA y BoHV-1ΔgEβgal. Cada punto representa el cociente entre la cantidad de virus en el espacio extracelular y la suma de la cantidad de virus del espacio intra y extracelular para cada tiempo ensayado.

Con el objetivo de determinar si la cinética de replicación de un único paso de la cepa BoHV-1 LA es equivalente a la de otras cepas salvajes de BoHV-1, se realizó el mismo ensayo utilizando la cepa BoHV-1 LA y la cepa de referencia BoHV-1 Colorado (Cooper) (Figura 28).

Los valores máximos alcanzados en la fracción extracelular (Figura 14A) fueron $10^{6,375}$ DICT₅₀/ml y $10^{6,225}$ DICT₅₀/ml a las 24 hpi, mientras que en la intracelular (Figura 28B) fueron de 10^8 DICT₅₀/ml a las 18 hpi y $10^{7,3}$ DICT₅₀/ml a las 24 hpi, para los virus BoHV-1 LA y Colorado, respectivamente.

Ambas cepas de referencia se comportaron de manera similar, con diferencias entre las 15 y 18 hpi, donde se detectaron 10 veces más partículas infectivas de virus LA en la fracción intracelular que para la cepa Colorado ($10^{7,95}$ DICT₅₀/ml y 10^7 DICT₅₀/ml, respectivamente) (Figura 14A). Esta diferencia también se observó en la fracción extracelular ($10^{6,225}$ DICT₅₀/ml y $10^{5,325}$ DICT₅₀/ml, para BoHV-1 LA y Colorado, respectivamente) (Figura 28B).

No se observaron diferencias en los títulos finales alcanzados en las dos fracciones estudiadas de ambos virus ($10^{6,325\pm 0,3}$ DICT₅₀/ml y $10^{6,225\pm 0,15}$ DICT₅₀/ml en la fracción extracelular y $10^{7,55\pm 0,1}$ DICT₅₀/ml y $10^{7,3\pm 0}$ DICT₅₀/ml en la fracción intracelular para los virus BoHV-1 LA y Colorado respectivamente).

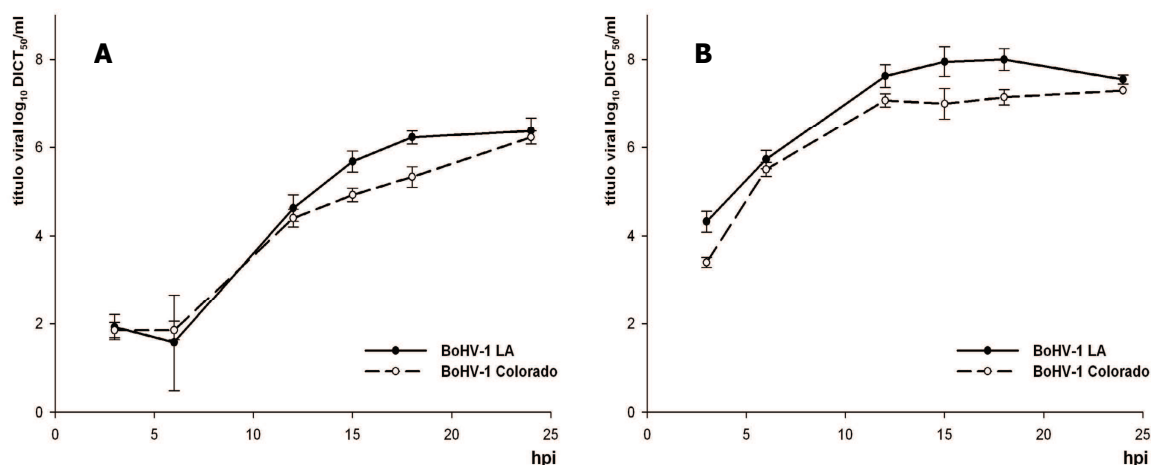


Figura 28. Cinética de un único paso de los virus BoHV-1 LA y BoHV-1 Colorado. Las partículas virales que no penetraron a las células fueron inactivadas mediante un tratamiento a pH ácido. A las distintas hpi indicadas se tomaron alícuotas de la fracción extracelular (A) e intracelular (B). El título viral de cada fracción se determinó mediante titulación en células MDBK y están expresados como \log_{10} DICT₅₀/ml. Se graficaron los valores promedios y los desvíos estándar correspondientes a cuatro experimentos.

A pesar de las diferencias encontradas a las 12 y 15 hpi entre las cepas salvajes en ambas fracciones, los porcentajes de liberación fueron similares para BoHV-1 LA y BoHV-1 Colorado a lo largo de todo el ensayo, alcanzándose valores máximos de alrededor del 45% a las 24 hpi (Figura 29).

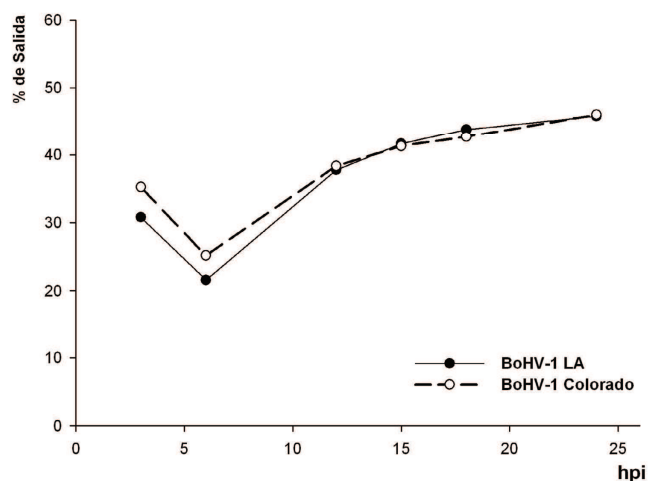


Figura 29. Porcentaje de salida de los virus BoHV-1 LA y BoHV-1 Colorado. Cada punto representa el cociente entre la cantidad de virus en el espacio extracelular y la suma de la cantidad de virus del espacio intra y extracelular para cada tiempo ensayado.

Estos datos muestran que la cepa BoHV-1 LA se comporta de manera similar a otras cepas salvajes. Respecto a la cepa BoHV-1 Δ gE β gal los resultados sugieren que, además del retraso en la producción de partículas virales infectivas, la salida de virus de la célula se encuentra marcadamente alterada.

3.D.3. Ensayos ultraestructurales

Para evaluar fenotípicamente la dificultad en la salida de viriones en el virus BoHV-1 Δ gE β gal se infectaron células MDBK con BoHV-1 Δ gE β gal o BoHV-1 LA a una moi de 10, se incubaron durante 16 horas, se procesaron y observaron al microscopio electrónico de transmisión.

Los estudios ultraestructurales muestran que, en las células infectadas con el virus BoHV-1 Δ gE β gal, se producen acúmulos de partículas compatibles en tamaño y morfología con cápsides virales en el núcleo celular (figura 30 A-D). Estos agregados se encuentran asociados a un material electrodenso. En contraste, las microfotografías de las células infectadas con el virus BoHV-1 LA no evidencian la presencia de dichas estructuras.

Estos resultados sugieren que, en el ciclo de replicación del virus BoHV-1 Δ gE β gal, algún mecanismo de morfogénesis viral se encuentra alterado, produciendo la retención de cápsides en el núcleo de la célula.

En resumen, los datos del estudio *in vitro* de la cepa BoHV-1 Δ gE β gal sugieren que el pasaje célula a célula está comprometido, así como la capacidad lítica. Además hay un retraso en la producción de partículas virales infectivas y en la salida de virus de la célula, mientras que en el ciclo de replicación la alteración en algún mecanismo de morfogénesis viral produce la retención de cápsides en el núcleo de la célula. Por otra parte, los resultados obtenidos respecto a la cepa BoHV-1 LA indicarían que el comportamiento *in vitro* de la cepa parental de BoHV-1 Δ gE β gal no difiere del de otras cepas de referencia de BoHV-1. Por lo tanto, las alteraciones encontradas en la cepa BoHV-1 Δ gE β gal podrían deberse a los cambios producidos en el proceso de obtención de la misma.

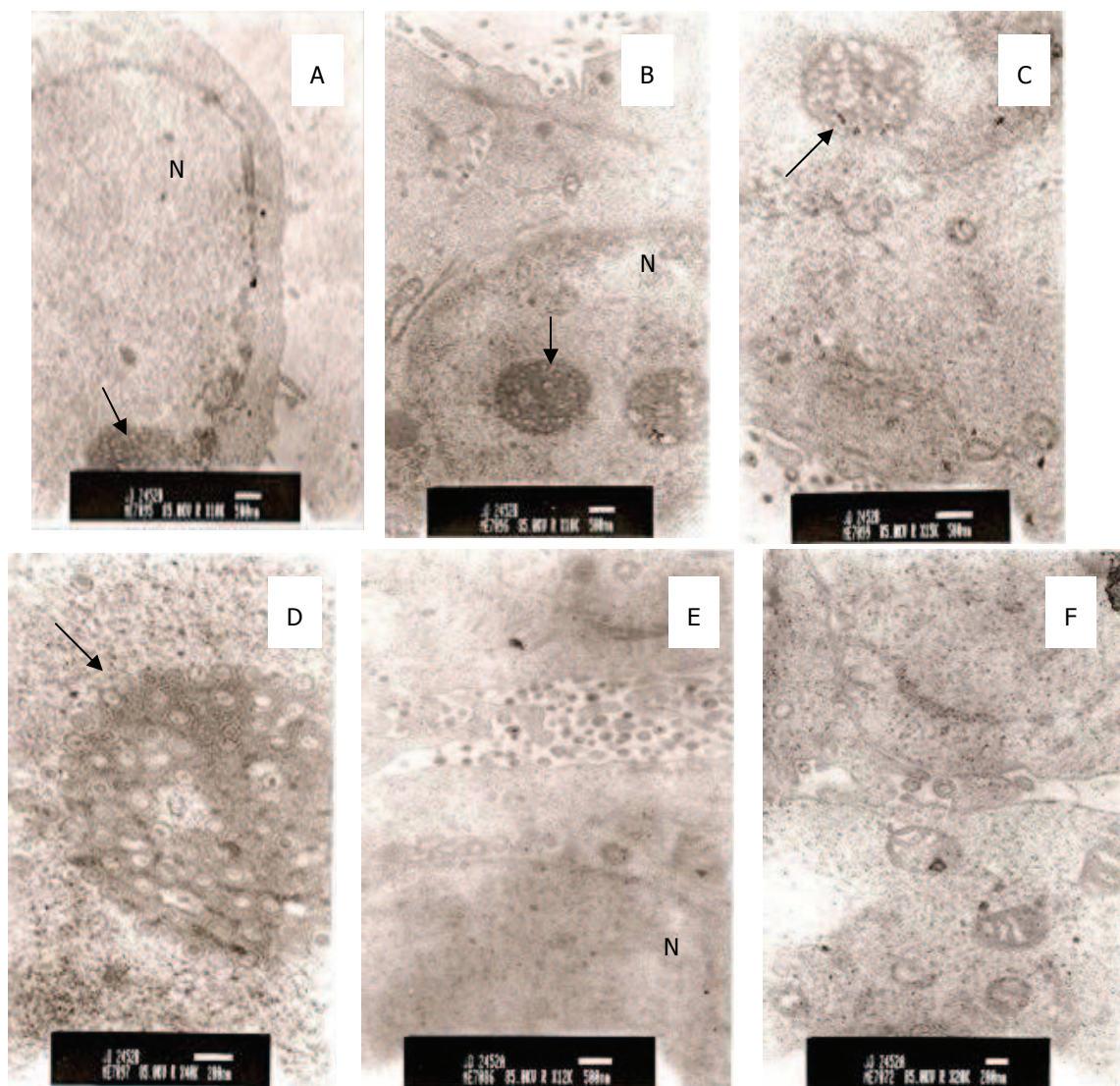


Figura 30. Microscopía electrónica. Microfotografías de células MDBK infectadas con BoHV-1 Δ gE β gal (A-D) y BoHV-1 LA (E y F) y analizadas 16 hpi. Las barras representan 500 nm en los cuadros A, B, C y E y 200 nm en D y F. N: núcleo. Las flechas indican los agregados de partículas compatibles con cápsides virales.

4. CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DEL VIRUS BoHV-1ΔgEβgal

Para determinar si las propiedades biológicas observadas en el virus BoHV-1ΔgEβgal se debían sólo a la falta de expresión de la glicoproteína E se decidió obtener el virus revertante. Para ello se realizaron tres intentos (por recombinación homóloga entre ADN genómico viral y un vector de transferencia portando el gen *gE*), que resultaron infructuosos ya que se obtuvieron virus que no expresaban el gen marcador *lac z* pero que sin embargo no poseían el gen de interés (gen *gE*) según se determinó por amplificación por PCR y *Southern blot* (resultados no mostrados). Por ello se abordaron estrategias alternativas para estudiar el *background* genético del virus BoHV-1ΔgEβgal.

4.A. Análisis de la zona de recombinación del genoma de BoHV-1ΔgEβgal

La cepa BoHV-1ΔgEβgal se originó a partir de un evento de recombinación homóloga entre el genoma del virus BoHV-1 LA y el vector de recombinación construido con las secuencias flanqueantes al gen *gE* y el *cassette* de expresión para el gen *lac z* (Puntel, 2002a). Con el objetivo de identificar si se produjeron otros cambios en la zona de recombinación, se realizó la secuenciación directa sobre el genoma viral de las regiones cercanas al sitio de recombinación. Se secuenció cada región en tres ensayos independientes y se analizaron las zonas flanqueantes al gen *gE* de BoHV-1ΔgEβgal y BoHV-1 LA utilizando oligonucleótidos específicos y ADN genómico viral de ambas cepas como templado.

Tanto en la zona correspondiente al extremo 5' como a la del 3' del gen *gE* no se observaron cambios en la secuencia del virus BoHV-1ΔgEβgal (Figura 31). De acuerdo a lo esperado, se identificaron 11 y 58 nucleótidos remanentes del gen *gE* río abajo y arriba con respecto al codón de inicio y terminación de la transcripción, respectivamente (Recuadro rojo. Figura 31A y B, respectivamente). Asimismo se verificó la introducción, producto de la amplificación con oligonucleótidos degenerados, de cambios en la secuencia (Recuadro azul. Figura 31A y B, respectivamente) y se corroboró la presencia del inicio y terminación del *cassette* de expresión para *lac z* (Recuadro verde. Figura 31A y B, respectivamente).

Los datos de la secuenciación de las zonas de recombinación sugieren que la recombinación homóloga se produjo en las zonas esperadas de acuerdo al diseño del vector de transferencia y que el intercambio alélico (entre el gen *gE* y el gen *lac z*) no produjo cambios en las secuencias flanqueantes al gen *gE* del virus BoHV-1ΔgEβgal.

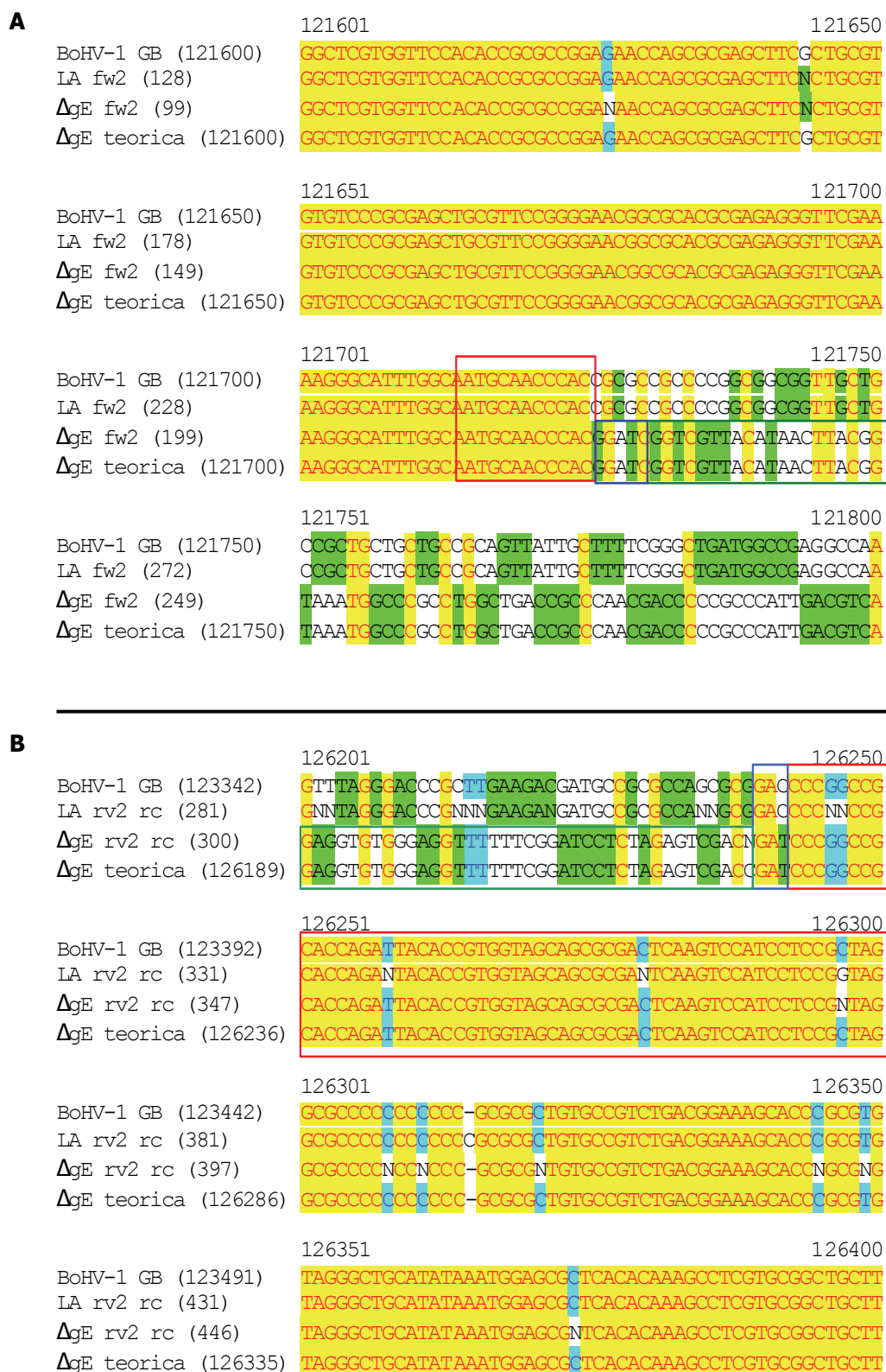


Figura 31: Comparación de las secuencias nucleotídicas del extremo 5' (A) y 3' (B) del gen *gE* de los virus BoHV-1 LA (LA) y BoHV-1 $\Delta gE\beta$ al (ΔgE), y su alineamiento con la secuencia de BoHV-1 del GenBank (número de acceso: NC_001847.1) (BoHV-1 GB) y la secuencia teórica de virus BoHV-1 $\Delta gE\beta$ al (ΔgE teórica). Recuadro rojo: extremos del gen *gE*. Recuadro verde: extremos del cassette del gen *lac z*. Recuadro azul: modificación introducida en el virus BoHV-1 $\Delta gE\beta$ al.

4.B. Mapeo del genoma de BoHV-1 Δ gE β gal mediante secuenciación de productos de amplificación por PCR

Mediante la amplificación por PCR de pequeños fragmentos de genes definidos, separados aproximadamente por 8-15 kpb, y la secuenciación de los mismos, se realizó un mapeo exploratorio del genoma de los virus BoHV-1 LA y BoHV-1 Δ gE β gal con el fin de determinar la existencia de mutaciones simples a largo del genoma.

Se amplificaron por PCR fragmentos correspondientes a los genes US6, UL11, UL27, UL29, UL31, UL34, UL36, UL40, UL41, UL43 y UL57 de las cepas BoHV-1 LA y BoHV-1 Δ gE β gal utilizando ADN genómico viral como templado y oligonucleótidos específicos. Los amplicones obtenidos se resolvieron mediante electroforesis en geles de agarosa y luego se purificaron.

Las secuencias nucleotídicas obtenidas luego de la secuenciación automática de ambas hebras fueron alineadas utilizando el programa Vector NTI. Un ejemplo de esto se muestra en la Figura 32.

		1		50
UL40 LA	(1)	GCAGCTGGATAGCAGCGAGCAGGCGGTCCGCGCTGTA		
UL40 Δ gE	(1)	GCAGCTGGATAGCAGCGAGCAGGCGGTCCGCGCTGTA		
		51		100
UL40 LA	(51)	GAAATAGCCTCCACGTCAAGTATATGACTGCCGCGGGCGCGCGTGACCA		
UL40 Δ gE	(51)	GAAATAGCCTCCACGTCAAGTATATGACTGCCGCGGGCGCGCGTGACCA		
		101		150
UL40 LA	(101)	AATAAACTCGCGCTCAATTTCCACAGCTTCGCGGAACAGCTCGTAGATGC		
UL40 Δ gE	(101)	AATAAACTCGCGCTCAATTTCCACAGCTTCGCGGAACAGCTCGTAGATGC		
		151		200
UL40 LA	(151)	GGGCCGGCGGGCGCCGCTCCCCGCCGAGGTAGTTGTTGAAGATGCAGCAC		
UL40 Δ gE	(151)	GGGCCGGCGGGCGCCGCTCCCCGCCGAGGTAGTTGTTGAAGATGCAGCAC		
		201		250
UL40 LA	(201)	GACGCGGCCGTGTGCACGGCTTCGTTCGCGGGCTGATGAGGTCGTTGGTTTG		
UL40 Δ gE	(201)	GACGCGGCCGTGTGCACGGCTTCGTTCGCGGGCTGATGAGGTCGTTGGTTTG		
		251		300
UL40 LA	(251)	GCACGTCACGACGAAAAGGTTGTGGGTGCGCAGGTAGGCAATCGCCGCAA		
UL40 Δ gE	(251)	GCACGTCACGACGAAAAGGTTGTGGGTGCGCAGGTAGGCAATCGCCGCAA		
		301		323
UL40 LA	(301)	ACGAGGAGGAGAAAAAATGCC		
UL40 Δ gE	(301)	ACGAGGAGGAGAAAAAATGCC		

Figura 32: Comparación de la secuencia nucleotídica de un fragmento del gen UL40 de los virus BoHV-1 LA (LA) y BoHV-1 Δ gE β gal (Δ gE).

Asimismo, se calculó para cada fragmento el porcentaje de identidad utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de identidad (\%)} = \frac{\text{Número de nucleótidos idénticos}}{\text{Número de nucleótidos resueltos}} \times 100$$

De este modo, al comparar los distintos fragmentos de las cepas BoHV-1 LA y BoHV-1ΔgEβgal se observó que el porcentaje de identidad a nivel de nucleótidos fue del 100% en todos los casos (Tabla 10). Estos resultados muestran que las secuencias nucleotídicas de los fragmentos secuenciados para ambas cepas son idénticas y no se encontraron cambios entre la cepa BoHV-1ΔgEβgal y el virus BoHV-1 LA.

Secuencia blanco	Posición en genoma *	Tamaño del fragmento secuenciado	Nucleótidos resueltos	Nucleótidos no determinados	% identidad
UL52	6413 - 6636	224	223	1	100
UL43	18230 - 18433	205	204	1	100
UL41	21069 - 21306	238	237	1	100
UL40	22691 - 23010	323	323	0	100
UL36	31188 - 31474	287	287	0	100
UL34	41252 - 41764	235	235	0	100
UL31	44410 - 44564	155	154	1	100
UL30	46579 - 47495	914	907	7	100
UL29	49277 - 49506	226	226	0	100
UL27	56631 - 55954	678	677	1	100
UL11	84521 - 84191	332	332	0	100
US6	119013 - 119607	595	592	3	100

* Posición del fragmento amplificado en el genoma de BoHV-1 basados en las secuencias disponibles en GenBank (acceso: NC_001847).

Tabla 10: Porcentaje de identidad nucleotídica entre las secuencias de los fragmentos amplificados a partir de los virus BoHV-1 LA y BoHV-1ΔgEβgal.

Las secuencias obtenidas a partir de la cepa BoHV-1 LA se compararon con la única secuencia genómica de BoHV-1 publicada (NCBI Reference Sequence: NC_001847.1), realizada a partir de cinco cepas de BoHV-1: K22, Cooper, P8-2, 34 y Jura (Figura 33). Como ejemplo, se muestra el alineamiento correspondiente al fragmento del gen UL40 (Figura 32). De la misma manera se analizaron las secuencias de todos los fragmentos amplificados. De este modo, se identificaron las diferencias y se calcularon los porcentajes de identidad para las secuencias comparadas (Tabla 11).

	22651		22700
BoHV-1 GB (22651)	GGAAAATCGGTCCCAGGAGGCGGGGTGCCAAACAGAGGAG	GCAGCTGGAT	
UL40 LA (1)	-----	GCAGCTGGAT	
	22701		22750
BoHV-1 GB (22701)	AGCAGCGAGCAGGCGGTCCGCGCTGTACTCG	ACGTACGCAGAAATAGCCT	
UL40 LA (11)	AGCAGCGAGCAGGCGGTCCGCGCTGTACTCA	ACGTACGCAGAAATAGCCT	
	22751		22800
BoHV-1 GB (22751)	CCACGTCAAGTATATGACTGCCGCGCGGCGCGCA--	ACCAAATAAACTCG	
UL40 LA (61)	CCACGTCAAGTATATGACTGCCGCGCGGCGCGCGTG	ACCAAATAAACTCG	
	22801		22850
BoHV-1 GB (22799)	CGCTCAATTTCCAC--GCTTCGCGGAACAGCTCGTAGATGCGGGCCGGCGG		
UL40 LA (111)	CGCTCAATTTCCACAGCTTCGCGGAACAGCTCGTAGATGCGGGCCGGCGG		
	22851		22900
BoHV-1 GB (22848)	CGGCCGCTCCCCGCCGAGGTAGTTGTC	GAAGATGCAGCACGACGCGGCCG	
UL40 LA (161)	CGGCCGCTCCCCGCCGAGGTAGTTGTT	GAAGATGCAGCACGACGCGGCCG	
	22901		22950
BoHV-1 GB (22898)	TGTGCACGGCTTCGTCGCGGCTGATGAGGTCGTTGGTTTGGCACGTCACG		
UL40 LA (211)	TGTGCACGGCTTCGTCGCGGCTGATGAGGTCGTTGGTTTGGCACGTCACG		
	22951		23000
BoHV-1 GB (22948)	ACGAAAAGGTTGTGGGTGCGCAGGTAGGCAATCGCCGCAAACGAGGAGGA		
UL40 LA (261)	ACGAAAAGGTTGTGGGTGCGCAGGTAGGCAATCGCCGCAAACGAGGAGGA		
	23001		23050
BoHV-1 GB (22998)	GAAAAAATGCCCTCGATTAGAATCATGAGCACGTACTTTTCGGCCACCG		
UL40 LA (311)	GAAAAAATGCCCT-----		

Figura 33: Comparación de la secuencia nucleotídica de un fragmento del gen UL40 obtenida en el virus BoHV-1 LA (LA) con la secuencia publicada en GenBank (BoHV-1 GB).

Secuencia blanco	% identidad
UL52	100
UL43	99
UL41	100
UL40	98,1
UL36	100
UL34	100
UL31	100
UL30	99,2
UL29	99,1
UL27	100
UL11	99,7
US6	100

Tabla 11: Porcentajes de identidad (% identidad) para los fragmentos amplificados a partir de BoHV-1 LA en relación a la secuencia publicada de BoHV-1 (NC_001847.1).

Estos resultados muestran que las regiones secuenciadas, distribuidas al azar a lo largo del genoma, se encuentran conservadas entre la cepa BoHV-1 LA y la secuencia de BoHV-1 publicada. Asimismo, esto sugeriría que la cepa BoHV-1 LA presenta un alto grado de homología con las cepas a partir de las cuales se secuenció el genoma completo de BoHV-1.

4.C. Análisis de los patrones de restricción del genoma de BoHV-1ΔgEβgal

El estudio de la variabilidad genética del virus BoHV-1ΔgEβgal se continuó mediante el análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, *Restriction Fragments Length Polymorphism*). Para esto, el ADN genómico de los virus BoHV-1 LA y BoHV-1ΔgEβgal se digirió, separadamente, con nueve endonucleasas de restricción diferentes y se analizó el patrón de bandas obtenido luego de la electroforesis en geles de agarosa (Figura 34). Considerando que la enzima *HindIII* se utiliza en la subtipificación de BoHV-1, resultó de interés corroborar el patrón obtenido luego de la digestión del genoma de BoHV-1ΔgEβgal. Por ello, se incluyó en el análisis a la enzima *HindIII* debido a que el gen *gE* presenta un sitio de corte para dicha enzima, el cual se perdería en el virus BoHV-1ΔgEβgal, generando un nuevo patrón de fragmentos.

Los patrones de restricción obtenidos para la cepa BoHV-1 LA fueron comparados con los esperados, que se calcularon mediante análisis *in silico* de la secuencia publicada de BoHV-1. Del mismo modo, los fragmentos producto de las digestiones del virus BoHV-1ΔgEβgal se analizaron por comparación con el patrón esperado, establecido considerando los cambios introducidos en el genoma. En la figura 35 se esquematizaron las calles en las cuales se verificaron diferencias con los patrones esperados y se identificaron las diferencias encontradas, las cuales fueron corroborados en dos reacciones de digestión independientes (no mostrado).

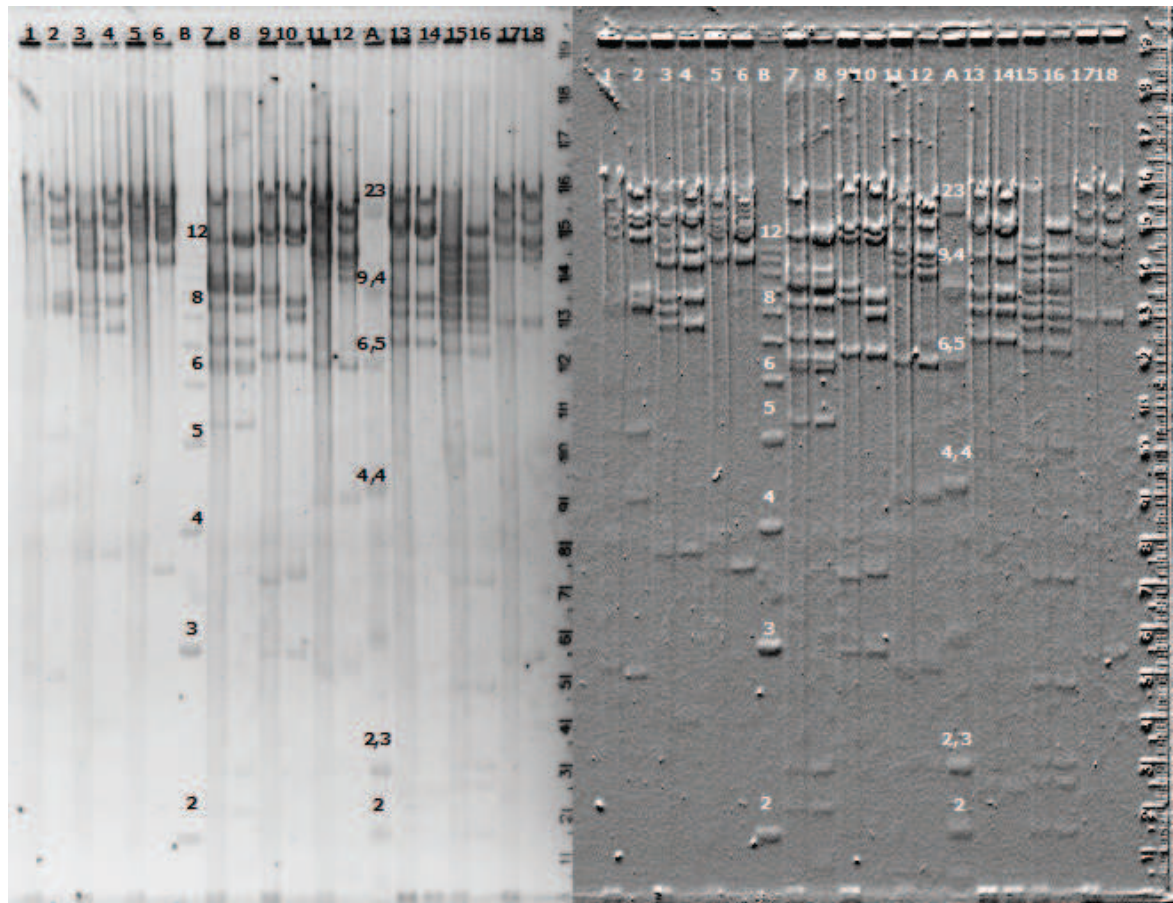


Figura 34: Fragmentos de restricción de los genomas de BoHV-1 LA (calles 1, 3, 5, 7, 9, 13, 15 y 17) y BoHV-1ΔgEβgal (calles 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 y 18). Las cepas fueron digeridas con *AvrII* (1 y 2), *HindIII* (3 y 4), *BamHI* (5 y 6), *StuI* (7 y 8), *DraI* (9 y 10), *KpnI* (11 y 12), *BglII* (13 y 14), *SphI* (15 y 16) y *EcoRI* (17 y 18). B: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus (Invitrogen). A: Marcador de peso molecular Lambda DNA/*HindIII* (Promega). A la izquierda se muestra la fotografía tomada bajo luz UV del gel de agarosa teñido con bromuro de etidio (BrEt) y a la derecha la misma toma en opción bajorrelieve (*Adobe Photoshop CS3*).

Los patrones correspondientes a las digestiones con las enzimas *BglII*, *EcoRI* y *HindIII* son iguales a los esperados para ambos virus. La digestión con *HindIII* resulta de importancia ya que es la enzima que se utiliza en la subtipificación de BoHV-1 y de acuerdo a lo esperado se observa la desaparición de un fragmento de 8,2 Kbp y de otro de 12,4 Kbp para el virus BoHV-1ΔgEβgal. La zona por encima de 12 Kbp no se logró resolver en la fotografía del gel; lo mismo ocurre en el caso de *BglII*.

A continuación se describen los cambios observados en los patrones de restricción de acuerdo a las referencias de la Figura 5.

-*AvrII* (1 y 2):

- Aparición de un fragmento en el virus BoHV-1ΔgEβgal entre 4,4 y 4 Kbp (a).
- Se corrobora la pérdida de una banda de 6 Kbp (b) y la aparición de una de 8,8 Kbp (c) en el virus BoHV-1ΔgEβgal.

-*BamHI* (5 y 6):

- En el virus BoHV-1ΔgEβgal no observa la banda esperada en 7,8 Kbp (d) pero si se ve una no esperada de aproximadamente 9 Kbp (e).
- Se corrobora la aparición de una banda de 11,9 (f) y de otra de 3,6 Kbp (g) BoHV-1ΔgEβgal de acuerdo a lo esperado

-*StuI* (7 y 8):

- Para ambas cepas aparece una banda entre 2 y 2,3 Kbp (h) mientras que no se observan las bandas esperadas de 3,4 Kbp (i) y 11,8 Kbp (j).
- Se corrobora la aparición de una banda de 15,7 Kbp BoHV-1ΔgEβgal en el virus BoHV-1ΔgEβgal (k).

-*DraI* (9 y 10):

- Para ambos virus desaparece la banda de 3,1 Kbp (l) y aparece una mayor a 4 Kbp (m).
- En el virus BoHV-1ΔgEβgal se observa la aparición no esperada de una banda en 8 Kbp (n) así como la pérdida de una banda de 10,7 (o).
- Se corrobora la ausencia esperada de una banda de 9,5 Kbp (p).

-*KpnI* (11 y 12):

- Aparece en ambos virus una banda entre 2,3 y 3 Kbp (q).
- No se observa fragmentos esperados de 1,8 Kbp en ambos virus (r)

-*SphI* (15 y 16):

- Aparece en ambas cepas una banda de aproximadamente 12 Kbp (s) mientras que se pierde una de 5,5 Kbp (t) y otra de 4,2 (u).
- Se corrobora en el virus LA una banda de 14 Kbp (v) y en BoHV-1ΔgEβgal una de 17 Kbp (w)

Los resultados del estudio de RFLP indican que la cepa BoHV-1 LA no presenta exactamente el mismo patrón de restricción que el genoma de BoHV-1 publicado. Asimismo, se encontró en algunos casos, para la cepa BoHV-1 Δ gE β gal, un patrón diferente al esperado, indicando posibles modificaciones de ciertos sitios de restricción. Algunas de estas modificaciones podrían ser consecuencia de los cambios observados en el patrón de la cepa parental BoHV-1 LA.

Discusión

El herpesvirus bovino 1 es un alfa herpesvirus que infecta al ganado bovino. Es un virus neurotrópico, por lo que establece latencia en ganglios sensoriales, e induce un conjunto de cuadros clínicos (respiratorios, genitales y/o reproductivos) de variada severidad dependiendo de la virulencia de la cepa (Kaashoek et al., 1996b), factores del hospedador y del ambiente y manejo. La perpetuación de este agente en los rodeos bovinos se produce mediante la reactivación y reexcreción de las infecciones latentes ante distintos estímulos.

Las infecciones con BoHV-1 presentan una distribución mundial (Ackermann y Engels, 2006). En Argentina los índices de seroprevalencia de BoHV-1 promedian el 60 % del ganado bovino (entre 24,8 y 84,1 % según la región, la edad de los animales y el tipo de cría que se realiza) (Odeón et al., 2001). Frente a estos niveles de prevalencia, la vacunación es la estrategia utilizada para el control de las infecciones con BoHV-1. En nuestro laboratorio se ha demostrado que diferentes vacunas convencionales contra BoHV-1 inducen una buena respuesta humoral y celular y que confieren protección contra los signos clínicos (Romera et al., 2000a). Sin embargo, la respuesta de anticuerpos es indistinguible de la inducida por exposición al virus circulante en el campo en una infección natural.

En este contexto, en el año 1999 se desarrolló una vacuna marcadora que permite diferenciar animales vacunados de infectados porque carece del gen que codifica para la glicoproteína E (gen *gE*). Esta cepa marcadora, denominada BoHV-1Δ*gE*βgal, se obtuvo por reemplazo alélico del gen *gE* por el gen *lac z*, utilizando la cepa BoHV-1.1 Los Angeles (LA) como parental (Puntel et al., 1999; 2001; Romera et al., 2000b).

A la fecha, en la mayor parte de los países de la Unión Europea se comercializan y utilizan vacunas marcadoras vivas, luego de que fuera recomendada su inclusión en distintos esquemas de inmunización de planes de control. Actualmente, en nuestro país está siendo evaluada este tipo de estrategia, y la cepa BoHV-1Δ*gE*βgal podría ser una candidata a incorporarse en futuros planes de control. Sin embargo, es necesario conocer el comportamiento *in vivo* e *in vitro* de esta cepa para evaluar el impacto que tendría su empleo como inmunógeno vivo. Asimismo, el estudio del *background* genómico es importante para corroborar las modificaciones introducidas experimentalmente en la cepa BoHV-1Δ*gE*βgal.

La cepa parental BoHV-1 LA, a partir de la cual se desarrolló la cepa BoHV-1Δ*gE*βgal, ha sido escasamente estudiada hasta el momento. El efecto producido por la delección del gen *gE* puede variar entre los diferentes virus recombinantes dependiendo de la cepa parental a partir de la cual fue construido. Por otra parte, la cepa BoHV-1 LA se utiliza frecuentemente en las experiencias de desafío viral con BoHV-1. En este contexto, el conocimiento de aspectos de su patogénesis contribuirá en el futuro a mejorar la evaluación de vacunas contra BoHV-1.

Estudio del *background* genómico de la cepa BoHV-1ΔgEβgal

De acuerdo a la información que existe respecto a cepas de alfa herpesvirus con deleciones en el gen *gE* (cepas gE⁻), los resultados de las experiencias *in vivo* y los experimentos *in vitro* de la cepa BoHV-1ΔgEβgal descritos en este trabajo no encontrarían explicación únicamente en la deleción del gen *gE*. Los estudios de otras mutantes gE⁻ construidas a partir de distintas cepas salvajes de BoHV-1 y otros alfa herpesvirus no describen los mismos cambios cuali o cuantitativos que se observaron en la cepa BoHV-1ΔgEβgal. Una forma de corroborar que la falta de expresión de la gE fuera responsable exclusivamente de las diferencias observadas en la cepa BoHV-1ΔgEβgal hubiera sido la obtención de un virus revertante, reintroduciendo el gen *gE* en la cepa BoHV-1ΔgEβgal.

De todas maneras, en el contexto de este trabajo de Tesis, se construyó y caracterizó genéticamente el vector de transferencia (VT) para obtener el virus revertante. El VT se construyó a partir de la amplificación por PCR del gen *gE* y dos fragmentos flanqueantes, a partir de ADN genómico de la cepa BoHV-1 LA, y su secuencia se corroboró mediante secuenciación sobre las dos hebras utilizando 4 pares de oligonucleótidos específicos. Se realizaron varios experimentos de recombinación homóloga ensayando distintas condiciones experimentales de transfección (cotransfección del VT con y sin bICP0, transfección con el VT linealizado, etc). Se obtuvieron clones virales que producían placas de lisis blancas utilizando la selección por color que permite la expresión del gen *lac z* del virus BoHV-1ΔgEβgal al incorporar el sustrato de la enzima β-galactosidasa en el medio agarizado. Luego de analizar dichos clones mediante amplificación por PCR utilizando oligonucleótidos específicos para el gen *gE* así como *Southern blot* mediante hibridación con una sonda del gen *gE* se verificó que si bien los clones no tenían el gen *lac z*, tampoco habían incorporado el gen *gE*.

Teniendo en cuenta que la frecuencia de recombinación homóloga es baja (en general es del 0,04%) cuando no se adquieren genes que aumenten el *fitness* (por ej. gen de resistencia a antibiótico) y que el virus receptor replica normalmente, resulta muy complejo en la práctica seleccionar placas de lisis blancas en el *background* de un virus que forma placas de lisis azules. De esta manera, es necesario realizar diluciones altas del producto de cotransfección, lo cual disminuye la posibilidad de encontrar el virus revertante. Esto es opuesto a lo que ocurre en el proceso de obtención de un virus deletado, donde se buscan placas de lisis azules (ganancia del gen *lac z*) en el *background* de un virus salvaje que produce placas de lisis blancas, permitiendo la identificación del recombinante aún en presencia de alto porcentaje de virus salvaje. En este trabajo de Tesis, aunque la metodología empleada (recombinación homóloga) permitió aislar un stock viral que producía placas de lisis blancas, su posterior análisis molecular determinó que no poseía ninguno de los genes involucrados en el intercambio alélico (gen *lac z* o gen *gE*).

De esta forma, podría ser que el putativo virus revertante aislado al trabajar con diluciones altas del extracto de cotransfección (1/100.000) no se haya producido por recombinación homóloga entre el VT y el genoma viral sino que haya estado presente en la población viral original (en muy baja proporción) y/o que sea producto de una recombinación no homóloga o incompleta entre VT y genoma.

Si bien los virus recombinantes pueden ser generados por eventos de simple o doble recombinación, el primero ocurre con mayor frecuencia. Los eventos de simple recombinación pueden ocurrir entre los fragmentos del extremo 5' o 3' de las secuencias virales no esenciales y resultar en la aparición inicial de virus recombinantes intermediarios inestables que contienen una o más copias del VT entero (Spyropoulos et al., 1988). Una segunda recombinación homóloga intramolecular entre las regiones invertidas repetidas de los virus recombinantes intermediarios producirá virus recombinantes estables o virus no recombinantes salvajes, según en dónde se haya producido la recombinación (Falkner y Moss, 1990). Un virus recombinante estable se genera luego de que ocurran dos eventos de recombinación homóloga que conducen al intercambio alélico entre el ADN viral y el VT. Se ha sugerido que ambos eventos de recombinación pueden no ocurrir en simultáneo, de forma que luego de un sólo evento de recombinación se genera un intermediario inestable donde el genoma viral tiene inserto el VT de transferencia completo. Finalmente, en un paso posterior, existe igual probabilidad de que este recombinante se resuelva hacia la incorporación del gen de interés y en consecuencia se elimine el gen marcador, o que se resuelva hacia el genotipo original, eliminándose el VT completo. En nuestro caso, podría haber ocurrido que el evento de recombinación homóloga haya sido exitoso en la eliminación del gen *lac z* pero que al momento de resolverse el proceso no se haya incorporado el gen *gE*.

Debido a que se realizaron varios intentos de obtención del revertante según la metodología previamente implementada para la obtención del BoHV-1ΔgEβgal y que la readquisición del gen *gE* sería beneficiosa para este virus (debido a su mejor replicación *in vitro*) es posible que el método de *screening* mediante identificación de placas de lisis blancas no haya sido eficiente por las diluciones de infección a utilizar en cada paso. Teniendo en cuenta que cada proceso de aislamiento demandó un año y su análisis molecular determinó que no se trataba del virus revertante esperado, la caracterización de la población obtenida y su posible origen constituyen un estudio aparte que escapa a los objetivos de este trabajo y serán abordado en el futuro.

Se abordaron otras estrategias para caracterizar el *background* genómico del virus BoHV-1ΔgEβgal. En primera instancia, se secuenciaron las zonas de recombinación, las cuales no fueron secuenciadas al momento de la construcción de la cepa recombinante. Así, no sólo se verificó la ausencia de cambios en las regiones flanqueantes al gen *gE* sino que se identificaron específicamente los sitios donde ocurrió el intercambio alélico. Esto cobra importancia debido a que

confirma mediante secuenciación que la inserción del gen *lac z* fue por doble recombinación homóloga, descartando que haya ocurrido recombinación en un sólo sitio originando recombinantes inestables. Asimismo, se elimina la posibilidad de que hubiera ocurrido inserción al azar del VT, y se corrobora que el gen *gE* se encuentra completamente deletado por lo que no existiría posibilidad de reversión al genotipo salvaje. La confirmación de la secuencia de interés fue realizada directamente sobre el genoma viral recombinante, lo cual constituye un resultado más robusto que el predicho por la técnica de *Southern blot*.

Seguidamente, utilizando las herramientas puestas a punto en nuestro laboratorio para el estudio de virus recombinantes entre BoHV-1 y BoHV-5 (Del Médico Zajac et al., 2009b), se realizó un mapeo del genoma de BoHV-1ΔgEβgal mediante la amplificación por PCR de pequeños fragmentos de genes definidos, separados por aproximadamente 8-15 kpb. La identidad entre las secuencias obtenidas, distribuidas a lo largo de todo el genoma, a partir de la amplificación sobre el ADN de BoHV-1ΔgEβgal y BoHV-1 LA fue en todos los casos del 100%. La comparación entre las secuencias nucleotídicas de la cepa BoHV-1 LA y la cepa publicada en la base de datos de GenBank mostró modificaciones puntuales en cinco de los fragmentos secuenciados, indicando cierto grado de variabilidad nucleotídica entre las secuencias de la base de datos de BoHV-1 y la cepa BoHV-1 LA.

Posteriormente, se continuó el estudio de la variabilidad genética del virus BoHV-1ΔgEβgal mediante el análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP). Para ello se utilizaron 9 endonucleasas de restricción diferentes que tuvieran sitios de reconocimiento a lo largo de todo el genoma viral y que el número de fragmentos obtenidos pudiera ser resuelto mediante electroforesis en geles de agarosa. Asimismo, se consideró que la cantidad de sitios de corte en el gen marcador fuera baja para minimizar la cantidad de fragmentos diferentes entre el genoma del virus parental y el recombinante, y así poder identificar diferencias adicionales a los generados por la sustitución alélica.

De esta manera, se compararon los patrones obtenidos a partir de la cepa BoHV-1 LA con los predichos *in silico* a partir de la secuencia publicada de BoHV-1. En primera instancia, se verificó que el patrón correspondiente a la digestión con la enzima *HindIII* obtenido en ambas cepas, que se utiliza para subtipificar los aislamientos de BoHV-1, era el esperado para las cepas BoHV 1.1 (Mayfield et al., 1983). Sin embargo, se encontraron discrepancias entre la cepa BoHV-1 LA y la secuencia publicada en los patrones obtenidos con las enzimas *StuI*, *DraI*, *KpnI* y *SphI*. Se han reportado diferencias en los resultados entre distintas cepas correspondientes a un mismo subtipo, aunque no se han ensayado un gran número de enzimas ni se ha estudiado la relevancia de dichas diferencias. Por ejemplo, Seal et al (1985) realizó un trabajo meticuloso utilizando distintos aislamientos de BoHV-1 y describió un patrón de digestión con *HindIII* para BoHV-1 LA distinto al de la cepa Cooper (Mayfield et al., 1983; Seal et al., 1985). Los análisis de las

secuencias nucleotídicas completas de las distintas cepas (aún no disponibles) podrán establecer si tal vez existe una relación entre estos cambios y la virulencia u otros aspectos de la patogénesis de las distintas cepas de BoHV-1.

Los resultados obtenidos a partir de la cepa BoHV-1 Δ gE β gal mostraron que algunos de los cambios en el patrón de digestión respecto a la cepa BoHV-1 LA eran los esperados considerando el reemplazo alélico que tiene el virus recombinante. Por ejemplo, a causa de la delección del gen *gE* se pierde un sitio de reconocimiento de la enzima *HindIII* originando la pérdida de dos fragmentos (8,2 y 12,5 Kpb) y la aparición de un fragmento de 23,5 Kpb. Teniendo en cuenta que la caracterización de los aislamientos de campo se realiza mediante el análisis de los patrones de *HindIII*, esta diferencia constituye un marcador adicional útil para la identificación de la cepa BoHV-1 Δ gE β gal en estudios epidemiológicos. Sin embargo, los patrones observados luego de la digestión con *AvrII*, *BamHI* y *DraI* no encontrarían explicación en el cambio alélico de esta cepa. De esta manera, se sugeriría que la cepa BoHV-1 Δ gE β gal podría tener algunas diferencias adicionales en su secuencia nucleotídica. En este trabajo no se pudieron identificar cualitativamente estos cambios. Sería muy interesante poder secuenciar completamente tanto este recombinante como su cepa parental y así poder establecer de manera más precisa la constitución genómica de estos virus y su relación con el fenotipo atenuado de la cepa BoHV-1 Δ gE β gal.

Estudio de las propiedades replicativas *in vitro* de las cepas BoHV-1 Δ gE β gal y BoHV-1 LA

Los ensayos de caracterización de la replicación viral *in vitro* de la cepa BoHV-1 Δ gE β gal realizados en esta Tesis fueron también llevados a cabo con la cepa BoHV-1 LA. La realización simultánea de los ensayos con ambas cepas facilitó el mantenimiento de las condiciones experimentales y permitió realizar comparaciones entre las mismas. Para enriquecer el análisis comparativo, se incluyeron en los análisis otras cepas salvajes de BoHV-1 así como otra cepa deletada en el gen *gE*.

Se realizó la caracterización *in vitro* mediante cinéticas de penetración viral, crecimiento viral de uno y múltiples pasos y ensayos de tamaño de placa de lisis y de foco de infección, permitiendo evaluar el ingreso a la célula, la producción de partículas virales, la capacidad lítica y la dispersión célula a célula de las cepas BoHV-1 LA y BoHV-1 Δ gE β gal. Para estos ensayos se utilizó la línea celular MDBK que, a pesar de ser una línea celular transformada, mantiene tanto características epiteliales como el contenido de uniones estrechas. Siendo que los alfa herpesvirus tienen tropismo por este tipo de células y las uniones estrechas son estructuras involucradas en el pasaje célula a célula, ésta línea celular es un buen modelo para el estudio de la replicación viral *in vitro* (Nakamichi et al., 2002).

Si bien no se ha reportado que la glicoproteína E participe en el mecanismo de adsorción y penetración a las células, este ensayo fue realizado para excluir que dichos mecanismos fueran responsables de las variaciones en otros parámetros correspondientes a etapas posteriores del ciclo replicativo del virus BoHV-1ΔgEβgal. Las cinéticas de penetración correspondientes a los virus BoHV-1ΔgEβgal y BoHV-1 LA no mostraron diferencias entre sí y estuvieron en concordancia con datos publicados para otras cepas gE- de BoHV-1 (Spilki et al., 2004; Mettenleiter et al., 1989; Rebordosa et al., 1996).

Continuando con el ciclo de infección viral, se estudió la dispersión viral a otras células. Las cinéticas de replicación de múltiples pasos se realizan a baja multiplicidad de infección (moi), lo cual permite evaluar la diseminación del virus desde las células infectadas hacia las células vecinas, ya sea por la salida de la progenie viral al medio extracelular e infección de células adyacentes, o por el mecanismo de pasaje célula a célula. Asimismo, los títulos de las fracciones intra y extracelular son indicativos del crecimiento viral.

Las diferencias en los títulos obtenidos en la fracción extracelular revelan que la dispersión de la cepa BoHV-1ΔgEβgal es mucho menor que la del parental BoHV-1 LA. Contribuirían a esto la menor capacidad de pasaje célula a célula así como la disminución de viriones liberados al espacio extracelular, como se observa a lo largo de todo el ensayo en la curva de egreso. Este menor porcentaje en el egreso viral de la cepa BoHV-1ΔgEβgal podría ser atribuido a la menor cantidad de células infectadas (fracción intracelular) que hay en cada tiempo. Sin embargo, para el momento en que la cantidad de virus en el espacio intracelular se equipara entre ambas cepas, aún se observa un menor título de virus BoHV-1ΔgEβgal en el espacio extracelular. Por lo tanto, independientemente de los niveles de producción viral, la dispersión viral se encuentra alterada en la cepa BoHV-1ΔgEβgal.

Las diferencias en el título de virus en la fracción intracelular a tiempos tempranos, cuando aún no se encuentra actividad en la fracción extracelular, podrían sugerir una deficiencia del virus BoHV-1ΔgEβgal en el pasaje célula a célula. Luego, la producción de partículas virales se demora en la cepa BoHV-1ΔgEβgal hasta las 36 hpi, posiblemente debido a la alteración en los mecanismos de dispersión que mantendría a una mayor proporción de la monocapa sin infectar. Estos datos indican que el crecimiento de la población viral es menor para la cepa BoHV-1ΔgEβgal durante todo el ensayo y a las 72 hpi, cuando se verifica un extenso efecto citopático, se iguala la producción viral a la cepa BoHV-1 LA.

Los resultados de la cinética de múltiples pasos de la cepa BoHV-1ΔgEβgal no concuerdan con otros trabajos publicados en los cuales no encuentran diferencias entre cepas salvajes y mutantes gE- (Kalthoff et al., 2008; Trapp et al., 2003). En este trabajo detectamos una importante alteración en la dispersión viral de la cepa BoHV-1ΔgEβgal, al que contribuyen tanto el pasaje célula a célula como la liberación al medio extracelular.

Para estudiar estos dos mecanismos por separado se determinó por inmunofluorescencia directa el tamaño de las placas de infección generadas por las cepas BoHV-1ΔgEβgal y BoHV-1 LA

luego de la infección de monocapas de células MDBK utilizando un medio semisólido. Este medio presenta un obstáculo para la difusión viral, dificultando a los viriones liberarse al medio, alcanzar y adsorber a las células vecinas no infectadas. Adicionalmente, con esta técnica se elimina el componente poblacional característico de la cinética de múltiples pasos pudiendo realizar una observación directa del fenómeno del pasaje célula a célula.

Se observó que las placas de infección producidas por la cepa BoHV-1 Δ gE β gal involucraron un 28% de células en relación a las placas generadas por la cepa BoHV-1 LA (establecida arbitrariamente como el 100%), lo cual confirma que la dispersión célula a célula se encuentra disminuida más de tres veces en la cepa deletada respecto de la cepa salvaje.

Este trabajo presenta el primer reporte de estudio del pasaje célula a célula mediante inmunofluorescencia, ya que otros autores abordan este mecanismo mediante el análisis de los focos de lisis; por lo tanto, no es posible comparar los resultados de este trabajo con otros de la literatura. Sin embargo, este método sería el más adecuado para evaluar el pasaje célula a célula ya que mediante la detección de focos de células infectadas a una baja *moi* se identifica de manera más precisa la propagación viral a través de este mecanismo.

Considerando los datos de la cinética de múltiples pasos y el ensayo anterior, que sugerían una alteración en el egreso directo del virus BoHV-1 Δ gE β gal y en el pasaje célula a célula, respectivamente, se realizó el ensayo de tamaño de placas de lisis, cuyos resultados contribuyen con el estudio del pasaje célula a célula y permiten estudiar fenotípicamente la capacidad lítica de las cepas BoHV-1 Δ gE β gal y BoHV-1 LA.

La observación al microscopio de las placas generadas por ambas cepas virales sobre monocapas de células MDBK reveló que aquellas generadas por la cepa BoHV-1 LA resultaron más de 10 veces mayores que las generadas por la cepa BoHV-1 Δ gE β gal.

La reducción del tamaño de placa de lisis observado en las células infectadas con el virus BoHV-1 Δ gE β gal en relación a la cepa parental es mucho mayor que la reportada para otros virus deletados en el gen *gE* obtenidos a partir de distintas cepas salvajes de BoHV-1, donde encuentran reducciones de aproximadamente el 50% (Rebordosa et al., 1996; Spilki et al., 2004; Brum et al., 2009; Trapp et al., 2003; Kalthoff et al., 2008). Por esto, se repitió el ensayo incorporando una cepa de BoHV-1 deletada en el gen *gE* (Difivac) para determinar si la drástica disminución del tamaño de placas de lisis observado en la cepa BoHV-1 Δ gE β gal era producto de las condiciones experimentales utilizadas en esta Tesis o una característica de esta cepa. El tamaño de placas obtenidas luego de la infección con la cepa Difivac estuvo de acuerdo a lo reportado para otras cepas mutantes *gE*-. Para descartar que las observaciones se debieran al comportamiento de la cepa parental, se incorporó otra cepa salvaje de BoHV-1 (Lam). Dado que los tamaños de placa de lisis de la cepa Lam y LA fueron similares, puede sugerirse que la disminución en los valores correspondientes a la cepa BoHV-1 Δ gE β gal no es debida a las características inherentes a la cepa

parental. Por lo tanto, la diferencia entre las cepas deleteadas refleja una alteración en el comportamiento de la cepa BoHV-1 Δ gE β gal.

En este contexto, es posible sugerir que en el caso del virus BoHV-1 Δ gE β gal bajo estudio exista tal vez una modificación adicional a la delección del gen *gE*, responsable del fenotipo observado. En este sentido, diversos estudios con cepas BoHV-1 gE- que además portan otras delecciones encuentran reducciones en el tamaño de placa de lisis en el mismo orden que en este trabajo. Por ejemplo, una mutante BoHV-1 gE- y UL49- produjo placas de lisis 83% más pequeñas que el virus salvaje (Kalthoff et al., 2008). Asimismo, un estudio utilizando un recombinante BoHV-1 gE- y gG- encontró que la gG sería necesaria para la localización de gE en las uniones intercelulares, indispensable para el mecanismo de pasaje célula a célula (Nakamichi et al., 2002).

La diferencia entre las cepas BoHV-1 Δ gE β gal y BoHV-1 LA en los tamaños de placas de lisis fue mucho mayor que la obtenida en el ensayo de las placas de infección, confirmando que, además de la reducción en el pasaje célula a célula, la capacidad lítica se encontraba disminuida en la cepa BoHV-1 Δ gE β gal respecto de la parental, tal como se sugirió al analizar la cinética de múltiples pasos. Dado que esta propiedad se encuentra vinculada al egreso de los viriones de las células, se realizaron ensayos de cinética de un paso para abordar este aspecto.

Las cinéticas de replicación de un único paso se realizan a alta multiplicidad de infección. Debido a que todas las células se infectan con el inóculo viral, ni el pasaje célula a célula ni la infección de células vecinas a partir de la progenie viral están siendo evaluadas. De esta forma se mide la producción de partículas virales infectivas, indicada por el título viral de la fracción total (intracelular y extracelular) a un tiempo dado y la salida de partículas virales al medio exterior (fracción extracelular). Esta última fracción aporta información tanto sobre el tiempo necesario para que el virus complete su ciclo de replicación (tiempo π al cual se detecta en el medio extracelular), así como acerca de la capacidad lítica del virus (títulos en la fracción extracelular).

La comparación de las cinéticas de un único paso entre las cepas BoHV-1 Δ gE β gal y BoHV-1 LA mostró que la producción viral es menor para la cepa BoHV-1 Δ gE β gal durante todo el ensayo. La cantidad de virus en la fracción extracelular es menor, confirmando que la salida y la capacidad lítica de BoHV-1 Δ gE β gal se encuentra reducida. Asimismo, la detección de virus en la fracción extracelular se observa al menos 3 horas más tarde en relación a la cepa parental, indicando que la duración del ciclo de replicación sería mayor para la cepa BoHV-1 Δ gE β gal.

Nuevamente, estos resultados no concuerdan con los reportados para otras cepas gE- en las cuales no encuentran diferencias en la producción viral entre recombinantes y parentales. Diversos trabajos coinciden en que a las 12 hpi se encuentra más virus gE- que parental en la fracción extracelular y sugieren que la salida al espacio extracelular sería un mecanismo de compensación que realizan las mutantes dado que poseen limitado el pasaje célula a célula está limitado (Chowdhury et al., 1999; Spilki et al., 2004; Rebordosa et al., 1996; Rijsewijk et al., 1999b; Muylkens et al., 2006a). Este fenómeno también se reporta en el caso de mutantes

deleteadas en gE de EHV-1 (Tsujiyama et al., 2006) y HSV-1 (Balan et al., 1994). Para el caso de la cepa gE- estudiada en esta Tesis se puede sugerir que, además del pasaje célula a célula, el egreso al espacio extracelular se encuentra marcadamente disminuido.

Para evaluar fenotípicamente al virus BoHV-1ΔgEβgal e intentar explicar la dificultad en la salida de viriones del mismo se observaron al microscopio electrónico de transmisión células MDBK infectadas con BoHV-1ΔgEβgal o BoHV-1 LA. Se detectaron acúmulos asociados a un material electrodenso de partículas compatibles en tamaño y morfología con cápsides virales en el núcleo celular de las células infectadas con el virus BoHV-1ΔgEβgal. Estos resultados sugieren que, en el ciclo de replicación del virus BoHV-1ΔgEβgal, algún mecanismo de morfogénesis viral se encontraría alterado, produciendo la retención de cápsides en el núcleo de la célula. La producción de estos acúmulos podría explicar los menores títulos de virus intracelular que se describen en las cinéticas de replicación de la cepa BoHV-1ΔgEβgal. De todas maneras, esto no impide completamente la producción de partículas infectivas y los retrasos en la producción viral son compensados en los últimos tiempos ensayados. Otra consecuencia de estas observaciones podría ser la demora que se observa en la salida de virus en comparación a la cepa BoHV-1 LA, aún cuando la producción viral alcanza los valores de la cepa parental.

El estudio ultraestructural de cepas gE- de BoHV-1 no ha sido abordado hasta el momento por otros grupos. Sin embargo, se han reportado alteraciones en la morfogénesis viral en cepas de otros alfa herpesvirus deleteadas en gE. La delección simultánea de las colas citoplasmáticas de gM y gE resultó en un drástico impedimento en la maduración y egreso viral en células infectadas con PRV, aboliéndose la adquisición de la envoltura secundaria en el *Trans* Golgi y observando la presencia de agregados de cápsides con material electrodenso en el citoplasma (Brack et al., 2000). Luego, se definió que el material electrodenso contenía proteínas del tegumento, entre ellas UL49 (Fuchs et al., 2002). Asimismo, una cepa de PRV deleteada en los genes gM y UL11 produjo el mismo tipo de agregados (Kopp et al., 2004). En HSV, mutantes deleteadas en los genes gD y gE producen agregados similares de cápsides con tegumento en el citoplasma (Farnworth et al., 2003). Sin embargo, estos trabajos no describen estructuras nucleares sino citoplasmáticas. Por lo tanto, es posible que en el caso del virus BoHV-1ΔgEβgal bajo estudio un paso previo en la morfogénesis viral se encuentre alterado, sugiriendo que tal vez exista una modificación en otro elemento viral responsable del fenotipo observado. Los productos de los genes US3, UL31, UL34, gB y gH serían candidatos a estudiar en esta cepa ya que participan en la salida de las cápsides virales del núcleo, tal como se describió para PRV (Mou et al., 2009; Klupp et al., 2001) y HSV-1 (Wisner et al., 2009).

Los resultados obtenidos con la cepa BoHV-1 LA indicarían que el comportamiento *in vitro* de la cepa parental de BoHV-1ΔgEβgal no difiere del de otras cepas de referencia de BoHV-1. Las cinéticas de replicación incorporando la cepa Colorado de BoHV-1 mostraron una similitud entre los valores de ambas cepas salvajes. Asimismo, los tamaños de placa de lisis fueron similares a la cepa

Lam. De este modo, las diferencias encontradas en el virus BoHV-1ΔgEβgal serían parte del fenotipo alterado de esta cepa deleteada.

En conjunto, el análisis de los datos de replicación viral *in vitro* indica que la dispersión viral, en términos de pasaje célula a célula como de liberación de partículas virales infectivas al medio extracelular, es menor en la cepa BoHV-1ΔgEβgal que en la cepa BoHV-1 LA, lo mismo que la producción total de partículas virales infectivas. Asimismo, se sugiere una deficiencia en la morfogénesis viral. Por lo tanto, las alteraciones encontradas en la cepa BoHV-1ΔgEβgal podrían deberse a modificaciones adicionales a la delección del gen *gE*.

Respecto al impacto de los resultados obtenidos de los ensayos *in vitro* en la producción a gran escala de la cepa BoHV-1ΔgEβgal como antígeno vacunal, los datos de este trabajo sugieren que para obtener títulos virales comparables a los de una cepa salvaje, se deberían realizar infecciones a baja *moi* y cosechar el virus no antes de las 72 hpi.

El comportamiento *in vitro* e *in vivo* de una cepa viral puede estar modificado por numerosas variables experimentales. En este trabajo encontramos una severa alteración en el comportamiento *in vitro* así como una importante atenuación *in vivo*. Uno de los mecanismos que podría alterar la virulencia de la cepa BoHV-1ΔgEβgal es el número de pasajes de los virus utilizados en los ensayos. La atenuación del fenotipo *in vivo* causada por pasajes previos por células del agente infeccioso ha sido demostrada para otros alfa herpesvirus (Dudnikova et al., 2009). Cuanto mayor sea el número de pasajes, mejor adaptado estará un virus a la línea celular en la que se realiza el pasaje. Esta adaptación podría manifestarse, por ejemplo, en el tamaño de placa de lisis, por ser éste un parámetro relacionado con la replicación viral. En este trabajo, tanto para los ensayos *in vitro* como para los experiencias *in vivo* se utilizó una cepa BoHV-1ΔgEβgal con un bajo número de pasajes (11^{vo}). Asimismo, el número de pasajes fue igual en todas las cepas utilizadas, lo cual descartó la posibilidad de que las diferencias observadas se deban a variaciones en el número de pasajes por líneas celulares, evidenciando que las características observadas son inherentes a las cepas BoHV-1ΔgEβgal y BoHV-1 LA.

Como ya se mencionó, no siempre es posible establecer una correlación entre las observaciones *in vivo* e *in vitro*. Sin embargo, del estudio *in vitro* de la cepa BoHV-1ΔgEβgal se obtuvieron resultados que podrían ayudar a comprender su comportamiento *in vivo*. Así, la baja dispersión observada en los ensayos *in vitro* podría explicar que durante la infección aguda de bovinos con la cepa BoHV-1ΔgEβgal, se vea disminuida la dispersión y por lo tanto la cantidad de tejidos infectados sea menor que para el caso de BoHV-1 LA. En consecuencia, la posibilidad de acceder a las terminaciones nerviosas de las neuronas sensitivas que inervan la puerta de entrada sería menor, y por ende, no se produciría el acceso a los sitios de latencia. Si bien se ha

establecido que la gE de distintos alfa herpesvirus es necesaria para el transporte retrógrado y anterógrado del virus entre el sistema nervioso y la mucosa oronasal (Brum et al., 2009; Liu et al., 2008), creemos que en este caso el impedimento en la llegada al GT es consecuencia de la baja dispersión del virus BoHV-1ΔgEβgal en la puerta de entrada.

La ausencia de signos clínicos en los animales luego de la infección podría ser producto de la disminución en la capacidad lítica de la cepa BoHV-1ΔgEβgal *in vitro*. La lesión primaria por BoHV-1 es el resultado de la lisis de las células infectadas que origina necrosis focal de las mucosas nasal, laríngea, traqueal o genital, una secuela directa de la replicación viral y el efecto citopático producido.

Finalmente, la disminución en la producción total *in vitro* de partículas virales infectivas de BoHV-1ΔgEβgal podría explicar la ausencia de excreción de partículas virales luego de la infección intranasal de animales con la cepa recombinante.

Estudio de la infección aguda y reactivación viral de la cepa BoHV-1ΔgEβgal y BoHV-1 LA en el hospedador natural

Para caracterizar el comportamiento de la cepa BoHV-1ΔgEβgal en el hospedador natural, en este trabajo de Tesis se evaluó la virulencia *in vivo*, en términos de signología clínica, excreción viral y reactivación de animales infectados con el virus BoHV-1ΔgEβgal y la cepa parental BoHV-1 LA. Asimismo, estos datos contribuirán en la evaluación del impacto que podría producir el uso de esta cepa como vacuna viva.

La cepa BoHV-1ΔgEβgal evaluada en este trabajo de Tesis no produjo ningún signo clínico en los terneros infectados luego de la administración de una alta dosis de la misma por vía intranasal. El efecto que produce la utilización de cepas deleteadas en el gen *gE* en la inducción de signos clínicos no es consistente entre trabajos previos publicados. Así, mutantes deleteadas en el gen *gE* (*gE*-) producidas a partir de la cepa Lam (van Engelenburg et al., 1994, 1995a; Kaashoek et al., 1996b, 1998; Schynts et al., 2003a), una cepa brasilera subtipo 1.2 (Franco et al., 2002b) o la cepa Za (Kaashoek et al., 1994) producen signos clínicos leves, tales como secreción nasal seromucosa o erosiones restringidas en la cavidad nasal e hipertermia de corta duración, mientras que un virus *gE*- construido a partir de la cepa Cooper, si bien se utilizó una dosis de virus total por animal 10 veces menor que en este trabajo, no produjo signos clínicos en los animales infectados (Chowdhury et al., 1999).

La ausencia de signos clínicos podría ser una característica ventajosa de la cepa recombinante ya que BoHV-1, como ya se mencionó, participa en el desarrollo de enfermedad

respiratoria bovina. En ésta, la infección viral predispone a los animales a la infección bacteriana, generalmente de bacterias que son comensales del aparato respiratorio bovino (Duff y Galyan, 2007). Si bien los factores virales que favorecen la progresión de la enfermedad respiratoria severa son objeto de estudio, se ha establecido que la disminución de la inmunidad mediada por células luego de la infección con BoHV-1 y la lesión viral sobre las estructuras que forman parte de la inmunidad innata son facilitadoras de la lesión bacteriana (Carter et al., 1989; Griebel et al., 1987). El epitelio nasal contiene uniones estrechas que impiden el tráfico paracelular de agentes, y lesiones en el mismo disrumpen esta barrera anatómica. Así, lesiones inducidas por vacunas virales, que en ambientes experimentales controlados ocurren de manera benigna, podrían ocasionar cuadros más severos en condiciones de explotaciones ganaderas intensivas.

De esta manera, los resultados de nuestro trabajo indicarían que la capacidad patogénica, o sea de producir lesiones, de la cepa BoHV-1 Δ gE β gal es baja. Asimismo, la ausencia de signos y lesiones sugiere que esta cepa es segura para su uso en animales.

En este trabajo se pudo reproducir la enfermedad en bovinos estableciendo los parámetros de virulencia de la cepa parental BoHV-1 LA. Así se comprobó que la cepa BoHV-1 LA induce signos clínicos moderados, con leve hipertermia y secreción nasal pero sin el desarrollo de lesiones en la mucosa nasal como se reporta para otras cepas salvajes de BoHV-1 (Tikoo et al., 1995).

La virulencia de distintas cepas de BoHV-1 puede presentar variaciones respecto a factores tanto del hospedador, del ambiente como del agente infeccioso (Nandi et al., 2009). Entre los primeros, la edad constituye un factor de riesgo, siendo los animales más jóvenes más susceptibles al desarrollo de enfermedad (Boelaert et al., 2005; Solis-Calderón et al., 2003). Sin embargo, en este trabajo se utilizaron terneros jóvenes que desarrollaron sólo signos leves. Factores relacionados al ambiente y al manejo de los animales, tales como la carga animal, el ingreso de animales y su participación en ferias han sido asociados a la severidad de la enfermedad pero son difíciles de aplicar a condiciones experimentales como las utilizadas en este trabajo (Vonk Noordegraaf et al., 2004; van Schaik et al., 2002, 2003).

Finalmente, la severidad de la enfermedad causada por este virus está influenciada por la virulencia de la cepa (Kaashoek et al., 1996b). Así, las infecciones subclínicas con BoHV-1 son bastante frecuentes. Diversas cepas de BoHV-1 poseen una baja capacidad de inducir signos clínicos y se han clasificado como cepas de baja virulencia (Kaashoek et al., 1996b, Nandi et al., 2009). Sin embargo, la cepa BoHV-1 LA no ha sido estudiada por otros grupos.

El cuadro de signos leves inducido por un virus puede ser atribuido a la inmunidad pasiva adquirida por los animales, especialmente en áreas endémicas. En efecto, se ha demostrado que los anticuerpos calostrales son eficientes en la protección contra los signos clínicos de BoHV-1 (Lemaire et al., 2000b). Sin embargo, esta hipótesis no podría aplicarse a este trabajo ya que se

utilizaron animales seronegativos. En conclusión, la cepa BoHV-1 LA sería una cepa de virulencia intermedia.

En conjunto, la ausencia de signos clínicos observada en los animales infectados con la cepa BoHV-1ΔgEβgal podría deberse, en parte, a la deleción del gen *gE*, como se ha reportado en los otros casos mencionados. Asimismo, la moderada virulencia de la cepa parental podría influir en la atenuación observada para la cepa deleteada, siendo que se ha propuesto que la virulencia de la cepa a partir de la cual se origina una mutante de deleción en el gen *gE* podría determinar la virulencia del mismo (Muylkens et al., 2006b).

La ausencia de signos clínicos tiene su impacto en el potencial uso de esta cepa recombinante como vacuna viva. Los países que incluyen en los programas de erradicación el uso de vacunas marcadoras permiten su aplicación como vacuna viva o inactivada. Se ha comprobado que las vacunas gE- vivas generan mayor protección frente al desafío viral en animales seronegativos (Bosch et al., 1996; van Drunen Littel-van den Hurk, 2006). Por lo tanto, cobra importancia el estudio del comportamiento *in vivo* de esta cepa para evaluar su uso en futuros planes de erradicación.

Mientras que la cepa parental BoHV-1 LA se excretó durante 12 días con títulos máximos de $10^{7.5}$ DICT₅₀/ml, luego de la infección intranasal con la cepa BoHV-1ΔgEβgal no se detectó virus infectivo en las secreciones nasales de los animales infectados, tal como ya había sido observado cuando se utilizó esta cepa experimentalmente como vacuna viva (Romera et al., 2004, 2005; Puntel et al., 2001). Esto es una característica distintiva a lo reportado para las cepas de BoHV-1 deleteadas en el gen *gE* ya mencionadas, las cuales se excretaron en todos los casos luego de administrarse a animales por vía intranasal. La cepa Za (gE-), comercializada y utilizada en Europa en los programas de erradicación de BoHV-1, ha sido extensamente estudiada y luego de la administración intranasal se excreta con altos títulos en todas las experiencias (Kaashoek et al., 1994; Strube et al., 1996; Mars et al 2000a, b). Asimismo, en uno de los trabajos donde se inoculó dicha cepa por vía intramuscular a animales jóvenes, también se detectó excreción nasal post infección (Strube et al., 1996). La cepa Lam gE- se excretó en algunos casos durante el mismo período de tiempo que su parental (van Engelenburg et al., 1995a; Kaashoek et al., 1998; Schynts et al., 2003a) o durante dos días menos (van Engelenburg et al., 1994; Kaashoek et al., 1994), pero en todos los casos con títulos similares a la cepa Lam salvaje. Asimismo, en algunas oportunidades se detectó excreción viral en las secreciones oculares (Kaashoek et al., 1998; van Engelenburg et al., 1995a). Finalmente, la cepa Cooper gE- y BoHV-1.2 gE- se excretaron en secreciones nasales y oculares luego de la inoculación intranasal aunque durante menos días que la cepa parental (Chowdhury et al., 1999; Franco et al., 2002b).

Continuando con el estudio de las secreciones nasales, se detectó ADN viral en las muestras de los animales infectados con la cepa BoHV-1 Δ gE β gal. En este sentido, en un trabajo donde infectan ratones con una mutante de HSV-2 no replicativa observan que no hay persistencia de ADN en el sitio de inoculación más allá del día 3 pi (Jones et al., 2000). La cinética de *clearance* en la mucosa nasal por células dendríticas que no disrumpen la barrera epitelial es muy alta y en 30 minutos se observa su llegada llevando antígenos vacunales a los linfonódulos regionales luego de infección nasal con bacterias muertas (Jahnsen et al., 2006). Podríamos sugerir entonces, que para la cepa BoHV-1 Δ gE β gal el genoma viral detectado en las secreciones nasales no sería un residuo de la inoculación sino el producto de la replicación viral, que ocurriría en la mucosa nasal del bovino en niveles tan bajos y/o durante tan poco tiempo que impedirían recuperar virus infeccioso mediante aislamiento en cultivo de tejidos, pero lo suficiente para detectar genoma viral mediante amplificación por PCR.

La ausencia de excreción de virus infeccioso en las secreciones de animales infectados con la cepa BoHV-1 Δ gE β gal, sumada a la evidencia de replicación viral en la mucosa nasal, ponen de manifiesto la polarización del epitelio de la puerta de entrada. Los dominios apicales y basolaterales de las membranas plasmáticas se encuentran separados por uniones estrechas. El estudio de la distribución subcelular luego de la infección con BoHV-1 indica que la gE se localiza en las zonas de contacto entre células infectadas, y no en las membranas apicales o basales. El patrón de localización coincide con el de la β -catenina, una proteína celular presente en las uniones entre células (Nakamichi et al., 2002). Se ha demostrado para HSV-1 que el transporte de los viriones hacia las zonas de contacto entre células, así como el pasaje a través de las uniones intercelulares durante la infección productiva está mediado por la gE (Johnson et al., 2001). Así, se propone que los virus que carecen del gen *gE* tendrían alterado este mecanismo de dispersión y por lo tanto saldrían de las células a través de las membranas apicales. Esto podría explicar el comportamiento de las cepas gE- en las cuales se encuentra mayor cantidad de virus en el espacio extracelular a tiempos tempranos y se detecta virus en las secreciones nasales (Muylkens et al., 2006a). Mientras que la cepa recombinante BoHV-1 Δ gE β gal bajo estudio no ha mostrado alteraciones en su cinética de penetración *in vitro*, sí se ha comprobado la dificultad en el pasaje entre células. Sin embargo, BoHV-1 Δ gE β gal pareciera poseer alterado otro mecanismo de salida de las células que *in vitro* podría ser compensado parcialmente pero, en los epitelios respiratorios del bovino, altamente polarizados, se haría más evidente, disminuyendo la excreción viral hacia la cavidad nasal.

La ausencia de excreción de virus infeccioso en secreciones nasales constituye una ventaja de la cepa BoHV-1 Δ gE β gal ya que permitiría su uso como vacuna viva sin los riesgos de diseminación a otros animales. A pesar de considerarse la difusión al ambiente de virus vacunal como de bajo riesgo (Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare, European Commission, 2000), se ha reportado la infección de animales seronegativos al ubicarlos en contacto con animales

inoculados con una vacuna viva gE- (Mars et al., 2000b). Solo se ha conseguido evitar la excreción nasal de virus gE- administrándolo como vacuna viva por vía intramuscular (Mars et al., 2000b; Makoschey et al., 2007).

Asimismo, la reducción de la posibilidad de dispersión de la cepa BoHV-1 Δ gE β gal adquiere una importancia epidemiológica adicional respecto a la transmisión a otros rumiantes. Hasta el momento, ninguna enfermedad severa proveniente de una infección por BoHV-1 ha sido identificada en las especies de rumiantes distintas del vacuno. Sin embargo, varias especies de rumiantes domésticos y salvajes son sensibles a la infección por BoHV-1 y podrían ser responsables de brotes esporádicos. Estas infecciones podrían contribuir a mantener el BoHV-1 en una región específica y en el seno de una población de rumiantes que podría convertirse en un reservorio de virus para los vacunos domésticos, poniendo en riesgo el desarrollo de los programas de control y erradicación (revisado por Thiry et al., 2008)

La baja replicación del virus BoHV-1 Δ gE β gal en la puerta de entrada disminuiría los riesgos de recombinación y reversión. El estudio *in vivo* de varias cepas virales con fenotipo gE-, producto de la coinfección de células con una cepa vacunal gE- atenuada y distintas cepas salvajes, sugirió que la introducción de la delección del gen *gE* en un contexto genómico salvaje restablece la virulencia conservando el fenotipo gE- (Muylkens et al., 2006b). La coinfección de bovinos por vía intranasal con dos cepas de BoHV-1, una de ellas gE-, resultó en la aparición *in vivo* de mutantes producto de la recombinación que se reexcretaron experimentalmente (Schynts et al., 2003a). Asimismo, En un trabajo realizado en nuestro laboratorio se evaluó la virulencia en bovinos de recombinantes entre BoHV-1 y BoHV-5 obtenidos *in vitro* y se determinó que establecían una infección latente en GT (Del Médico Zajac, 2009c). Existen evidencias que sugieren que la recombinación genética no está restringida a situaciones experimentales ya que recientemente se han reportado cepas recombinantes naturales. El análisis de muestras de casos clínicos de infecciones con HSV-1 (Norberg et al., 2004; Bowden et al., 2004) revelaron la presencia de cepas recombinantes intraespecíficas en poblaciones naturales. Asimismo, luego de estudiar diversos aislamientos de campo de EHV-1, se identificó un virus recombinante interespecífico el cual contenía el gen ICP4 de EHV-4 en el contexto genómico de EHV-1 (Pagamjav et al., 2005). Para que ocurran eventos de recombinación es necesario que las moléculas de ADN se encuentren en el seno de una misma célula. En condiciones naturales, para que dos o más moléculas de ADN viral coexistan en una célula es necesario que ocurran infecciones simultáneas (coinfecciones), reactivación de un virus latente acoplada a una infección o reactivación de dos virus latentes (Thiry et al., 2005, 2006). En este sentido, un estudio reciente en Brasil ha reportado que un 76% de bovinos se encuentran latentemente infectados de manera simultánea con BoHV-1 y BoHV-5 (Campos et al., 2009). Por todo lo anterior, la baja replicación de la cepa BoHV-1 Δ gE β gal en la puerta de entrada constituye una característica ventajosa en relación al riesgo de recombinación en condiciones naturales, permitiendo su uso como vacuna viva.

Los resultados de excreción viral y signología clínica discutidos aquí permiten concluir que se logró reproducir experimentalmente el cuadro asociado a las infecciones con BoHV-1, indicando que la cepa LA se excreta en títulos similares a otras cepas salvajes aunque su virulencia sería moderada ya que indujo signos clínicos leves (Kaashoek et al., 1996b). El comportamiento *in vivo* de la cepa BoHV-1 Δ gE β gal difiere notablemente de lo reportado para otras cepas gE- de BoHV-1.

Los datos indican que esta cepa es avirulenta en terneros ya que no se registraron signos clínicos ni excreción nasal de partículas infectivas luego de la infección intranasal, disminuyendo de esta manera tanto el riesgo de diseminación del virus, los posibles eventos de recombinación o reversión así como la incidencia de enfermedades asociadas a la infección.

El estudio de la dispersión del virus desde el sitio de inoculación durante la infección aguda se profundizó a través del análisis de los tejidos de los animales infectados. La inoculación se realizó por vía intranasal mediante nebulización para reproducir la vía de ingreso más común de BoHV-1 (Romera et al., 2000a). Se colectaron distintas muestras de cabeza y cuello y se realizó el aislamiento viral e inmunohistoquímica para BoHV-1.

Una vez en el hospedador, el virus se adsorbe a las células epiteliales de la puerta de entrada y comienza el ciclo de infección lítica. Desde allí se dispersa hacia otros tejidos mediante mecanismos de pasaje célula a célula o mediante el egreso desde células infectadas y adsorción a células no infectadas desde el espacio extracelular.

En este trabajo de Tesis se aisló BoHV-1 Δ gE β gal a los 9 dpi de la mucosa orofaríngea, mientras que se detectaron antígenos virales en mucosa orofaríngea y linfonódulo mandibular. Esto concuerda con el trabajo de van Engelenburg et al (1995a), donde utilizando una cepa Lam gE- encuentran a los 7 y 8 dpi virus infeccioso solamente en dos tejidos, aunque la distribución de antígenos virales no fue evaluada en esa oportunidad (van Engelenburg et al., 1995a). De esta manera se comprobó la limitada dispersión del virus BoHV-1 Δ gE β gal en los tejidos bovinos.

El hallazgo de células de linfonódulo mandibular expresando antígenos del virus BoHV-1 Δ gE β gal podría tener impacto en la reexcreción de esta cepa ya que los tejidos linfoides asociados a la mucosa de la puerta de entrada así como las tonsilas y los linfonódulos han sido propuestos como posibles sitios de latencia de BoHV-1 (Winkler et al., 2000, Perez et al., 2005).

Respecto a la distribución del virus parental, en este trabajo de Tesis se detectó virus BoHV-1 LA a los 5 dpi en mucosa nasal, olfatoria, orofaríngea y traqueal, así como en linfonódulos de cabeza y cuello, glándula parótida y bulbo olfatorio. Los tejidos positivos correspondientes al día 9 pi fueron mucosa nasal y orofaríngea, linfonódulo retrofaríngeo y tonsila. Para ambos dpi, los resultados concuerdan con los del trabajo de van Engelenburg et al (2005a) ya mencionado. Asimismo, en tiempos posteriores, no se aísla virus, tal como en el trabajo de Mweene et al (1996) donde no detectan virus en ningún tejido de animales sacrificados el día 22 pi luego de la infección con la cepa LA (Mweene et al, 1996).

Los datos de la distribución de antígenos virales y virus infeccioso en tejidos bovinos sugieren que la cepa BoHV-1 Δ gE β gal infectaría un menor número de tejidos que la cepa parental, tal como se observa a los 9 días pi, o infectaría los mismos tejidos pero por menos tiempo, como se determinó para el caso de la mutante de Lam. Esto será investigado a través del análisis de muestras del día 5 pi de tejidos animales infectados con la cepa recombinante, que no pudieron estudiarse en el contexto de esta Tesis debido a problemas técnicos durante las experiencias con bovinos. Sin embargo, dado que la cepa BoHV-1 Δ gE β gal bajo estudio demostró poseer muy alterada la habilidad de pasaje entre células, sería esperable una menor dispersión viral en los tejidos epiteliales.

El modelo de reactivación experimental mediante el uso de corticosteroides exógenos ya ha sido establecido y se utiliza frecuentemente para estudiar la patogénesis de diferentes cepas de BoHV-1 (Sheffy y Davies, 1972). El estudio del establecimiento y la reactivación de una infección latente en la caracterización de una cepa candidata para ser utilizada como vacuna en bovinos resulta indispensable para evaluar el impacto que tendría su eventual administración como vacuna viva. Para ello, dos animales pertenecientes a cada grupo, infectados con los virus bajo estudio, fueron inoculados por vía endovenosa con dexametasona. Se determinó la reexcreción viral, la signología clínica asociada, la respuesta inmune y la presencia de virus y antígenos virales en los sitios asociados a la latencia.

El resultado del tratamiento inmunosupresor no fue el mismo en los dos animales infectados con la cepa BoHV-1 LA. El animal 21 reexcretó virus salvaje durante 5 días con un título viral máximo de $10^{6.5}$ DICT₅₀/ml, o sea, un período de tiempo menor y un pico de excreción inferior al observado durante la infección aguda (pico de excreción: $10^{7.5}$ DICT₅₀/ml, período de excreción: 9 días). Sin embargo, no se manifestaron signos clínicos durante todo el período de reexcreción viral, lo cual está en concordancia con trabajos anteriores en los cuales la reactivación de una infección latente bajo condiciones experimentales no siempre está asociada a signología clínica (Meyer et al., 2001, van Engelenburg et al., 1995a; Kaashoek et al., 1996b). La disminución en el tiempo y título viral excretado así como la ausencia de signos clínicos podría deberse a la respuesta inmune de memoria que controla la infección en el epitelio de manera mas rápida que durante la primoinfección en un animal seronegativo, protegiéndolo de la enfermedad (Pastoret et al., 1980). Asimismo, se comprobó un aumento en los títulos de anticuerpos en secreciones nasales y suero entre las muestras anteriores y posteriores al tratamiento. Esto indicaría que la replicación en la puerta de entrada luego de la reexcreción fue suficiente para producir una nueva estimulación del sistema inmune. Estos datos nos permiten concluir que en dicho animal se produjo la reactivación viral desde los sitios de latencia del virus, a los 74 dpi.

La reexcreción viral de cepas de BoHV-1 en condiciones naturales ha sido verificada previamente (Thiry et al., 1985b, 1987), incluso en cepas vacunales deletadas en el gen *gE* (Dispas et al., 2003). Este fenómeno tiene un serio impacto en la epidemiología de esta

enfermedad por dos motivos: en primera instancia, produce la dispersión del virus manteniendo al agente en el ambiente e infectando al rodeo (Kutish et al., 1990; Tikoo et al., 1995); en segunda instancia, la reactivación en condiciones naturales luego de un estímulo estresante mediante la liberación de cortisol endógeno, podría desencadenar un cuadro respiratorio severo (Jones y Chowdhury, 2007). El cortisol estimularía a los receptores *toll-like* (TLR) y sería el factor desencadenante del desarrollo de enfermedad respiratoria, en general neumonía, como se ha propuesto desde los modelos de sinergia virus-bacteria en el complejo respiratorio bovino (Hodson et al., 2005). Si esto ocurriese en un grupo de animales bajo estrés, existe la posibilidad que se produzca la infección o reinfección de los animales y la aparición de un brote de enfermedad respiratoria (Babiuk et al., 1988).

En el otro animal infectado con la cepa BoHV-1 LA y sometido al tratamiento inmunosupresor (N° 22) no se detectó reexcreción viral luego del tratamiento con dexametasona. Asimismo, el título de anticuerpos séricos no mostró variaciones entre las muestras anteriores y posteriores al tratamiento. Esto ha sido reportado en otros trabajos, en los cuales se postula que la reactivación experimental es un fenómeno que depende de otros factores, además del estímulo con corticosteroides exógeno (Meyer et al., 2001; van Engelenburg et al., 1995a). Los términos reactivación y reexcreción se han utilizado en la literatura como sinónimos, donde animales que no reexcretan virus luego de un tratamiento inmunosupresor se considera que no reactivan la infección latente. Sin embargo, la reactivación viral involucra una secuencia de acontecimientos en las neuronas sensoriales que puede culminar o no en la reexcreción viral y esto último depende de factores entre los cuales se han sugerido la respuesta inmune luego de la infección o vacunación y la cepa viral utilizada (Muylkens et al., 2007). La respuesta inmune inducida luego de la infección podría prevenir la reexcreción viral (Pastoret et al., 1980), como es el caso de animales con altos títulos de anticuerpos previos al tratamiento experimental (Bosch et al., 1998). Se ha sugerido que hasta los 60 dpi la reexcreción puede no producirse (Muylkens et al., 2007). En este caso, el animal 22 fue sometido al tratamiento a los 48 dpi, por lo tanto, la cercanía entre las fechas de infección y administración de dexametasona podría explicar la ausencia de reexcreción. Respecto a la cepa viral, se ha establecido que las diferentes cepas de BoHV-1 poseen distinta capacidad de reexcretarse. Así, luego de inducir la reactivación en animales infectados con distintas cepas salvajes, la reexcreción no se verificó en todas ellas (Kaashoek et al., 1996b; Madic et al., 1995b). Este trabajo de Tesis constituye el primer reporte de reactivación experimental de la cepa BoHV-1 LA, por lo tanto no disponemos de información adicional acerca de cómo se comporta esta cepa en relación al tratamiento inmunosupresor.

Por todo lo anterior, podemos concluir que en el animal 22 no se produjo la reexcreción, aunque la reactivación viral pudo haber tenido lugar. En este sentido, se registró un leve incremento en los títulos de anticuerpos en secreciones nasales en las muestras posteriores al tratamiento. Es posible que se haya producido la reactivación viral y una reexcreción viral transitoria y/o intermitente que no haya sido detectada en secreciones pero que haya estimulado

la respuesta inmune de mucosas, ocasionando un incremento en los títulos de IgA e IgG1, pero sin inducir variaciones en los títulos séricos.

En todos los animales infectados con la cepa BoHV-1 LA se detectó la presencia de ADN viral en GT. Mediante IHQ se comprobó la expresión de antígenos virales en el mismo. En las muestras correspondientes al día 5 pi del animal infectado con la cepa BoHV-1 LA encontramos células no-neurales positivas, pero no neuronas. A los 9 dpi, se observaron tanto neuronas como células no-neurales expresando antígenos virales. En las muestras de estos dos días (5 y 9 dpi) se detectaron infiltrados de células no neurales con tinción específica para BoHV-1. Esto está en concordancia con lo que se ha reportado respecto a la patogénesis de BoHV-1 en GT (Winkler et al., 2002). Las primeras células en infectarse son las no-neurales (gliales y mononucleares infiltrantes) mientras que a medida que la infección progresa, se infectan las neuronas. Los focos de infiltración mononuclear en los GT de animales cursando la infección aguda, en los cuales se distinguen células productoras de IFN- γ en contacto cercano con cuerpos neuronales, podrían estar involucrados en el establecimiento de la infección latente (Winkler et al., 2002).

La muestra de mucosa nasal del animal infectado con la cepa BoHV-1 LA y eutanasiado a los 5 dpi presentó un hallazgo interesante. En la IHQ se pudo observar una célula compatible con un cuerpo neuronal con una marca intensa para antígenos virales. Los cuerpos neuronales de las neuronas de primer orden de la ruta más importante (vía del trigémino) se encuentran en el GT. Por esto, es posible que se trate de una neurona de primer orden correspondiente al sistema olfatorio que tiene el cuerpo neuronal en la mucosa y hace sinapsis con la neurona de segundo orden en el bulbo olfatorio, como ha sido descrito para PRV en tejidos porcinos (Mulder et al., 1994). Asimismo, en dicho animal se encontró virus infeccioso en el bulbo olfatorio, indicando a ésta como una posible vía de acceso del virus BoHV-1 LA al sistema nervioso.

Los resultados correspondientes al tratamiento inmunosupresor de los animales infectados con la cepa LA indican que al menos uno de los dos reactivó la infección viral con reexcreción de virus al ambiente, mientras que el otro podría haber reactivado la infección latente pero con muy baja reexcreción viral. La detección de antígenos virales así como de genoma viral en todos los GT de los animales infectados indica que la cepa LA es capaz de producir latencia luego de la infección y reactivarse mediante la administración de corticoides.

En el caso de los animales infectados con la cepa BoHV-1 Δ gE β gal, no se detectó reexcreción viral ni signos clínicos en ninguno de los dos casos luego de la administración de glucocorticoides. Hasta el momento, no se ha reportado que la gE esté involucrada en el acceso al SNP o en el establecimiento de la infección latente. Asimismo, el genoma de las cepas gE- ha sido detectado en GT en todos los casos. Se ha sugerido que la gE sería necesaria para el transporte anterógrado, o

sea la reexcreción viral, en una cepa Cooper gE⁻ (Brum et al., 2009; Liu et al., 2008). Si bien todas las cepas gE⁻ descritas previamente establecen latencia en GT, la reexcreción de las mismas es controversial. En este sentido, en varios ensayos utilizando la cepa Lam gE⁻ no se observó reactivación viral (van Engelenburg et al., 1995a; Kaashoek et al., 1996a, 1998), mientras que en un estudio más reciente usando la misma cepa reactivaron 4 de los 5 animales tratados con dexametasona (Schynts et al., 2003a). La cepa brasilera BoHV-1.2 gE⁻ utilizada como vacuna viva en bovinos no fue aislada de las secreciones nasales de los animales tratados con dexametasona (Franco et al., 2002b). Respecto a la cepa Za, diversos trabajos reportaron la ausencia de excreción viral luego de inducir la reactivación experimentalmente en bovinos adultos (Kaashoek et al., 1994; Mars et al., 2000a), mientras que se detectó reexcreción en terneros (Lemaire et al., 2001) y reexcreción espontánea de esta cepa 8 meses después de haber sido administrada como vacuna viva (Dispas et al., 2003). Un aislamiento natural de BoHV-1 con deleciones puntuales en el gen *gE* se reactivó experimentalmente (Egyed et al., 2000). La característica de no reexcretarse de la cepa BoHV-1ΔgEβgal constituye una importante ventaja ya que implica menor dispersión de virus vacunal así como disminución en el riesgo de desarrollar enfermedad respiratoria severa. Asimismo, cuanto menos replique la cepa en el bovino, menores serán las probabilidades de recombinación que pudiesen alterar su fenotipo.

Otro aspecto importante de la cepa BoHV-1ΔgEβgal es que no ocurriría la infección productiva en GT, ya que no se encontraron células positivas para antígenos virales en este tejido. Asimismo, no pudo detectarse genoma viral en ninguna de las muestras de los seis animales infectados con BoHV-1ΔgEβgal. Todos estos datos sugerirían que la cepa BoHV-1ΔgEβgal no podría establecer una infección latente en GT, constituyendo este trabajo el primer reporte de una cepa replicativa de BoHV-1 que no establece una infección latente en el hospedador natural. Una posible explicación a este fenómeno estaría fundamentada en la limitada capacidad de dispersión de esta cepa de modo que no logra acceder a los sitios de latencia.

Finalmente, se han reportado como posibles sitios adicionales de latencia para BoHV-1 los tejidos linfoides, tonsilas y linfonódulos. La importancia biológica de dichos tejidos en el ciclo de latencia-reactivación en el bovino no ha sido aun establecida. En este trabajo, la amplificación por PCR a partir de tonsilas del día 9 pi fue positiva para el animal infectado con la cepa BoHV-1 LA y negativa para el animal infectado con la cepa BoHV-1ΔgEβgal. Esto esta en concordancia con los resultados del aislamiento viral a partir de esas mismas muestras. Asimismo, las tonsilas correspondientes a los animales sacrificados el día 42 pi indican la latencia de genoma viral de la cepa parental mientras que la cepa BoHV-1ΔgEβgal no alcanzaría este órgano, posiblemente debido a la baja dispersión viral. De esta manera, el rol putativo que pudieran tener estos sitios extraneurales en la reactivación de BoHV-1 no presentaría una desventaja para el caso de BoHV-1ΔgEβgal. El rol de la infección de las tonsilas como de los linfonódulos en la reactivación y reexcreción de estos virus será abordado en futuros trabajos.

Los anticuerpos séricos anti BoHV-1 aparecen tardíamente en una infección (alrededor del día 10 pi), por lo que son considerados de mayor importancia en las infecciones secundarias previniendo la reinfección y participando en el *clearance* viral por diversos mecanismos (Babiuk et al., 1996; Romera et al., 2000a). En este trabajo de Tesis, la respuesta inmune humoral en suero desarrollada por los animales infectados con la cepa BoHV-1ΔgEβgal fue similar en todos los terneros tanto para los niveles de anticuerpos totales, como para los anticuerpos neutralizantes, manteniendo niveles elevados hasta el momento de la eutanasia. El título de anticuerpos totales osciló entre 1,6 y 2,2 (\log_{10}). Estos resultados confirmarían la infección de estos animales.

Por su parte, los animales infectados con la cepa BoHV-1 LA presentaron mayores títulos de anticuerpos totales en suero que los animales infectados con la cepa gE-. Este resultado es consistente con los de numerosos trabajos que comparan el desarrollo de anticuerpos neutralizantes entre cepas gE- y cepas salvajes de BoHV-1, aunque esta diferencia no se asocia a la capacidad protectora de las cepas deleteadas (Chowdhury et al., 1999; Kaashoek et al., 1994, 1996a, 1998; van Engelenburg et al., 1995a; Belknap et al., 1999). En el caso de la cepa BoHV-1ΔgEβgal, su inmunogenicidad y *performance* como vacuna viva o inactivada frente al desafío viral ya ha sido estudiada con anterioridad y demostró ser protectora (Romera et al., 2004; 2005; Puntel et al., 2001).

La inmunoglobulina G1 (IgG1) presente en secreciones nasales también podría colaborar en los mecanismos involucrados en la protección frente a infecciones virales secundarias neutralizando las partículas virales presentes en la mucosa nasal (Madic et al., 1995a, b; Haan et al., 2001). Dado que hasta el momento no existen reportes sobre la presencia de células productoras de IgG1 en la mucosa nasal de bovinos, se ha sugerido que este anticuerpo es transportado selectivamente desde el suero a la superficie mucosa (Madic et al., 1995a, b). Se ha reportado la presencia del receptor neonatal heterodimérico de Fc (*heterodimeric neonatal Fc receptor*, FcRn) en las células epiteliales de las vías respiratorias inferiores y en los alvéolos pulmonares, el cual mediaría el transporte de los anticuerpos IgG a través de la barrera mucosa (Mayer et al., 2004). En esta Tesis, ambos virus indujeron la secreción de IgG1 en el período post infección. En los animales infectados con la cepa BoHV-1ΔgEβgal este isotipo se detectó en un sólo animal (Nº 506) durante dos días (días 9 y 12 pi) con un título de 0,9 (\log_{10}), mientras que en los animales infectados con la cepa BoHV-1 LA se encontraron títulos altos (hasta 3,3 \log_{10}) a los días 9 y 12 pi, similares a los reportados luego de una infección con BoHV-1 salvaje (Madic et al., 1995a). Estos resultados serían coherentes con la teoría del transporte selectivo de este isotipo desde el suero, considerando que se detectaron títulos mayores de anticuerpos séricos en los animales infectados con la cepa BoHV-1 LA que con la cepa BoHV-1ΔgEβgal.

Posteriormente, se detectó una rápida y elevada respuesta secundaria luego del tratamiento inmunosupresor de los animales infectados con la cepa BoHV-1 LA, incluso mayor en el animal 21

que presentó reexcreción viral alcanzando títulos de 3,9 (\log_{10}). En los animales infectados con la cepa BoHV-1 Δ gE β gal no se detectaron anticuerpos en secreciones nasales luego de la administración de dexametasona, aportando evidencias de que en estos animales la reactivación viral no parece haber sucedido.

En numerosas ocasiones se ha reportado que los anticuerpos IgA presentes en la mucosa nasal son efectivos en la protección frente a infecciones virales respiratorias (Haan et al., 2001; Israel et al., 1992; Nedrud et al., 1987; Renegar et al., 1991a, b), y previenen la diseminación viral a hospedadores susceptibles. La inducción de IgA depende del inmunógeno, la ruta de inmunización y el adyuvante utilizado (Gao et al., 1995). Varios trabajos han reportado la presencia de IgA en mucosas de bovinos inmunizados con diversas vacunas de BoHV-1 (Gao et al., 1994, 1995; Israel et al., 1992; Zhu et al., 1996) y luego de la infección con este virus (Madic et al., 1995a). Sin embargo, no existe hasta el momento información publicada sobre la evaluación de anticuerpos en secreciones nasales de animales infectados con una cepa de BoHV-1 que porte deleciones en el gen *gE*.

En esta Tesis, se detectaron anticuerpos de isotipo IgA en las secreciones nasales de los animales infectados con la cepa BoHV-1 Δ gE β gal durante la infección aguda a partir del día 7 pi, alcanzando un título de 1,5 (\log_{10}) a los 12 dpi. Esto constituye el primer reporte de la respuesta inmune en mucosas de una cepa gE- y reafirma el hecho de que esta cepa es inmunogénica a pesar de replicarse en bajos niveles. Asimismo se detectó este isotipo en las secreciones de animales infectados con la cepa BoHV-1 LA a partir del día 7 pi. Al día 9 pi todos los animales desarrollaron IgA, alcanzando valores de 2,1 (\log_{10}) a los 12 dpi. Estos resultados coinciden con los reportados por Madic et al. (1995a) obtenidos luego de la infección de varios grupos de bovinos con ocho cepas diferentes de BoHV-1 por vía intranasal, aunque en esa oportunidad el título obtenido fue menor y la detección se demoró hasta el día 10 pi.

Previo a la realización del tratamiento inmunosupresor se detectó la presencia de IgA en las secreciones de uno de los dos animales latentemente infectados con la cepa BoHV-1 LA, coincidiendo con el trabajo de Madic et al. (1995a), mientras que en los dos animales infectados con la cepa BoHV-1 Δ gE β gal no se detectó este isotipo.

Luego de la administración de dexametasona se observó una rápida respuesta de IgA en ambos animales infectados con la cepa BoHV-1 LA, siendo mayor el título alcanzado por el animal que reexcretó virus (N° 21), indicando la existencia de respuesta de memoria en las mucosas. En el trabajo de Madic et al. (1995b), el número de animales que desarrolla una respuesta de IgA es incluso mayor que la cantidad de animales que reexcreta virus o presenta incrementos en anticuerpos de tipo IgG en suero, sugiriendo que la respuesta de IgA sería el indicador más sensible de reactivación viral (Madic et al., 1995b). En este sentido, el animal infectado con la cepa BoHV-1 que no reexcretó virus (N° 22) mostró un incremento en el título de IgA, por lo que posiblemente haya reactivado la infección latente sin que se detecte reexcreción viral.

Por su parte, los animales infectados con la cepa BoHV-1 Δ gE β gal no desarrollaron IgA luego de la administración de dexametasona. La ausencia de una infección latente y por ende de reactivación podría explicar esto, y por ello no puede descartarse la existencia de memoria de mucosas hasta evaluar la respuesta inmune luego de un desafío viral.

En resumen, el conjunto de los resultados obtenidos en las experiencias *in vivo* utilizando la cepa BoHV-1 Δ gE β gal y discutidos aquí sugieren que la alteración en la dispersión que presenta esta cepa produce la ausencia de excreción viral, lesiones y signos clínicos en el bovino luego de la infección bajo las condiciones experimentales ensayadas en este trabajo de Tesis. No se encontraron evidencias de que esta cepa alcance e infecte tonsilas o GT, constituyendo éste el primer reporte de una cepa replicativa de BoHV-1 que no establecería una infección latente ni reactivación/reexcreción viral. Todo esto tendría importantes implicancias en la estabilidad de esta cepa, disminuyendo los riesgos de dispersión del virus en los rodeos y de recombinación, así como reduciendo la incidencia de enfermedad respiratoria bovina. Asimismo, este trabajo constituye la primera descripción de los niveles de anticuerpos e isotipos en secreciones nasales de bovinos infectados con una cepa BoHV-1 gE-.

Adicionalmente, la experiencia de infección viral con BoHV-1 y la metodología desarrollada en este trabajo aplicada al análisis de muestras provenientes de animales infectados, constituyen una valiosa herramienta para el estudio de la patogenia de virus genéticamente modificados, virus recombinantes y aislamientos de campo. Por otro lado, resulta una contribución al conocimiento de la cepa parental BoHV-1 LA que se utiliza en las experiencias de desafío viral llevadas a cabo por nuestro laboratorio.

Los resultados de este trabajo de Tesis, conjuntamente con los antecedentes de inmunogenicidad, protección frente al desafío viral e inocuidad de la cepa BoHV-1 Δ gE β gal y la creciente tendencia mundial al uso de vacunas marcadoras en el control de la enfermedad causada por BoHV-1, indican que la cepa BoHV-1 Δ gE β gal podría incorporarse como inmunógeno vivo en los esquemas de vacunación de futuros planes de control y erradicación de BoHV-1 en nuestro país.

Conclusiones

- La cepa BoHV-1 Δ gE β gal es menos eficiente en la dispersión viral respecto a la cepa parental BoHV-1 LA y a otras cepas gE-, tanto en el mecanismo de pasaje célula a célula como en el de liberación de partículas virales infectivas al medio extracelular.
- La cepa BoHV-1 Δ gE β gal produce menos partículas virales infectivas que la cepa BoHV-1 LA y que otras cepas gE-.
- El comportamiento *in vitro* de la cepa BoHV-1 LA no difiere del de otras cepas de referencia de BoHV-1.
- El virus BoHV-1 Δ gE β gal se encuentra atenuado en su virulencia en el hospedador natural, y esta atenuación es mayor que la descrita para otras cepas gE-.
- El virus BoHV-1 LA es una cepa de virulencia moderada.
- La cepa BoHV-1 Δ gE β gal induce una respuesta inmune humoral sérica y de mucosas.
- El virus BoHV-1 Δ gE β gal no establece una infección latente en los tejidos asociados a la latencia ni se reactiva experimentalmente.
- La cepa BoHV-1 Δ gE β gal podría ser utilizada como vacuna viva en un plan de control de BoHV-1 sin riesgos de producir enfermedad ni diseminarse a otros animales.

Bibliografía

- Abril C, Engels M, Liman A, Hilbe M, Albini S, Franchini M, Suter M and Ackermann M (2004) Both viral and host factors contribute to neurovirulence of bovine herpesviruses 1 and 5 in interferon receptor-deficient mice. *J Virol* 78:3644-3653.
- Achour HA and Moussa A (1996) Serological and virological studies on the infectious bovine rhinotracheitis in Algeria. *Zentralbl Veterinarmed B* 43:251-256.
- Ackermann M, Metzler AE, McDonagh H, Bruckner L, Muller HK and Kihm U (1986) Are non-bovine Artiodactyla IBR virus reservoirs? I. BHV-1 and CapHV-1 infection and reactivation studies to show virus type specificity of humoral antibodies and characterization of viral antigens. *Schweiz Arch Tierheilkd* 128:557-573.
- Ackermann M and Engels M (2006) Pro and contra IBR-eradication. *Vet Microbiol* 113:293-302.
- Alconada A, Bauer U and Hoflack B (1996) A tyrosine-based motif and a casein kinase II phosphorylation site regulate the intracellular trafficking of the varicella-zoster virus glycoprotein I, a protein localized in the trans-Golgi network. *Embo J* 15:6096-6110.
- Alconada A, Bauer U, Sodeik B and Hoflack B (1999) Intracellular traffic of herpes simplex virus glycoprotein gE: characterization of the sorting signals required for its trans-Golgi network localization. *J Virol* 73:377-387.
- Ambagala AP, Hinkley S and Srikumaran S (2000) An early pseudorabies virus protein down-regulates porcine MHC class I expression by inhibition of transporter associated with antigen processing (TAP). *J Immunol* 164:93-99.
- Ambagala AP, Gopinath RS and Srikumaran S (2003) Inhibition of TAP by pseudorabies virus is independent of its vhs activity. *Virus Res* 96:37-48.
- Antinone SE, Shubeita GT, Coller KE, Lee JI, Haverlock-Moyns S, Gross SP and Smith GA (2006) The Herpesvirus capsid surface protein, VP26, and the majority of the tegument proteins are dispensable for capsid transport toward the nucleus. *J Virol* 80:5494-5498.
- Audonnet JC, Winslow J, Allen G and Paoletti E (1990) Equine herpesvirus type 1 unique short fragment encodes glycoproteins with homology to herpes simplex virus type 1 gD, gI and gE. *J Gen Virol* 71:2969-2978.
- Babiuk LA, L'Italien J, van Drunen Littel-van den Hurk S, Zamb T, Lawman JP, Hughes G and Gifford GA (1987) Protection of cattle from bovine herpesvirus type I (BHV-1) infection by immunization with individual viral glycoproteins. *Virology* 159:57-66.
- Babiuk LA, Lawman MJ and Ohmann HB (1988) Viral-bacterial synergistic interaction in respiratory disease. *Adv Virus Res* 35:219-249.
- Babiuk LA, van Drunen Littel-van den Hurk S and Tikoo SK (1996) Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. *Vet Microbiol* 53:31-42.
- Balan P, Davis-Poynter N, Bell S, Atkinson H, Browne H and Minson T (1994) An analysis of the in vitro and in vivo phenotypes of mutants of herpes simplex virus type 1 lacking glycoproteins gG, gE, gI or the putative gJ. *J Gen Virol* 75:1245-1258.
- Baranowski E, Keil G, Lyaku J, Rijsewijk FA, van Oirschot JT, Pastoret PP and Thiry E (1996) Structural and functional analysis of bovine herpesvirus 1 minor glycoproteins. *Vet Microbiol* 53:91-101.
- Bartha A, Juhasz M and Liebermann H (1966) Isolation of a bovine herpesvirus from calves with respiratory disease and keratoconjunctivitis. A preliminary report. *Acta Vet Acad Sci Hung* 16:357-358.
- Beer M and Koenig P (2008) Pitfalls in IBR diagnosis in the field, in: *IBR Workshop - World Buiatrics Congress*, Budapest, Hungary.
- Belknap EB, Walters LM, Kelling C, Ayers VK, Norris J, McMillen J, Hayhow C, Cochran M, Reddy DN, Wright J and Collins JK (1999) Immunogenicity and protective efficacy of a gE, gG and US2 gene-deleted bovine herpesvirus-1 (BHV-1) vaccine. *Vaccine* 17:2297-2305.

- Betancur CH, M.T. G and Lázaro Reza TG (2006) Seroepidemiología de la rinotraqueitis infecciosa bovina en el municipio de Montería, Colombia. *Rev MDZ Cordob* 11:830-836.
- Bielefeldt Ohmann H, Babiuk LA and Harland R (1991) Cytokine synergy with viral cytopathic effects and bacterial products during the patogénesis of respiratory tract infection. *Clin Immunol Immunopathol* 60:153-157.
- Boelaert F, Speybroeck N, de Kruif A, Aerts M, Burzykowski T, Molenberghs G and Berkvens DL (2005) Risk factors for bovine herpesvirus-1 seropositivity. *Prev. Vet. Med.* 69:285-295.
- Bosch JC, Kaashoek MJ, Kroese AH and van Oirschot JT (1996) An attenuated bovine herpesvirus 1 marker vaccine induces a better protection than two inactivated marker vaccines. *Vet Microbiol* 52:223-234.
- Bosch JC, Kaashoek MJ and van Oirschot JT (1997) Inactivated bovine herpesvirus 1 marker vaccines are more efficacious in reducing virus excretion after reactivation than a live marker vaccine. *Vaccine* 15:1512-1517.
- Bosch JC, De Jong MC, Franken P, Frankena K, Hage JJ, Kaashoek MJ, Maris-Veldhuis MA, Noordhuizen JP, Van der Poel WH, Verhoeff J, Weerdmeester K, Zimmer GM and Van Oirschot JT (1998) An inactivated gE-negative marker vaccine and an experimental gD-subunit vaccine reduce the incidence of bovine herpesvirus 1 infections in the field. *Vaccine* 16:265-271.
- Bowden R, Sakaoka H, Donnelly P and Ward R (2004) High recombination rate in herpes simplex virus type 1 natural populations suggests significant co-infection. *Infect Genet Evol* 4:115-123.
- Brack AR, Dijkstra JM, Granzow H, Klupp BG and Mettenleiter TC (1999) Inhibition of virion maturation by simultaneous deletion of glycoproteins E, I, and M of pseudorabies virus. *J Virol* 73:5364-5372.
- Brack AR, Klupp BG, Granzow H, Tirabassi R, Enquist LW and Mettenleiter TC (2000) Role of the cytoplasmic tail of pseudorabies virus glycoprotein E in virion formation. *J Virol* 74:4004-4016.
- Bradshaw BJ and Edwards S (1996) Antibody isotype responses to experimental infection with bovine herpesvirus 1 in calves with colostrally derived antibody. *Vet. Microbiol.* 53.
- Bratanich AC and Jones CJ (1992a) Localization of cis-acting sequences in the latency-related promoter of bovine herpesvirus 1 which are regulated by neuronal cell type factors and immediate-early genes. *J Virol* 66:6099-6106.
- Bratanich AC, Hanson ND and Jones CJ (1992b) The latency-related gene of bovine herpesvirus 1 inhibits the activity of immediate-early transcription unit 1. *Virology* 191:988-991.
- Brideau AD, Card JP and Enquist LW (2000) Role of pseudorabies virus Us9, a type II membrane protein, in infection of tissue culture cells and the rat nervous system. *J Virol* 74:834-845.
- Brower A, Homb KM, Bochsler P, Porter R, Woods K, Ubl S, Krueger D, Cigel F and Toohey-Kurth K (2008) Encephalitis in aborted bovine fetuses associated with Bovine herpesvirus 1 infection. *J Vet Diagn Invest* 20:297-303.
- Brown TT, Jr. and Ananaba G (1988) Effect of respiratory infections caused by bovine herpesvirus-1 or parainfluenza-3 virus on bovine alveolar macrophage functions. *Am J Vet Res* 49:1447-1451.
- Brum MC, Coats C, Sangena RB, Doster A, Jones C and Chowdhury SI (2009) Bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) anterograde neuronal transport from trigeminal ganglia to nose and eye requires glycoprotein E. *J Neurovirol* 15:196-201.
- Bryan LA, Fenton RA, Misra V and Haines DM (1994) Fatal, generalized bovine herpesvirus type-1 infection associated with a modified-live infectious bovine rhinotracheitis parainfluenza-3 vaccine administered to neonatal calves. *Can Vet J* 35:223-228.

- Bryant NA, Davis-Poynter N, Vanderplasschen A and Alcami A (2003) Glycoprotein G isoforms from some alphaherpesviruses function as broad-spectrum chemokine binding proteins. *Embo J* 22:833-846.
- Butchi NB, Jones C, Perez S, Doster A and Chowdhury SI (2007) Envelope protein Us9 is required for the anterograde transport of bovine herpesvirus type 1 from trigeminal ganglia to nose and eye upon reactivation. *J Neurovirol* 13:384-388.
- Bystricka M and Russ G (2005) Immunity in latent Herpes simplex virus infection. *Acta Virol* 49:159-167.
- Campadelli-Fiume G, Farabegoli F, Di Gaeta S and Roizman B (1991) Origin of unenveloped capsids in the cytoplasm of cells infected with herpes simplex virus 1. *J Virol Methods* 65:1589-1595.
- Campadelli-Fiume G, Cocchi F, Menotti L and Lopez M (2000) The novel receptors that mediate the entry of herpes simplex viruses and animal alphaherpesviruses into cells. *Rev Med Virol* 10:305-319.
- Campos FS, Franco AC, Hubner SO, Oliveira MT, Silva AD, Esteves PA, Roehe PM and Rijsewijk FA (2009) High prevalence of co-infections with bovine herpesvirus 1 and 5 found in cattle in southern Brazil. *Vet Microbiol* 139:67-73.
- Campos M, Godson DL, Hughes HPA and Babiuk LA (1994) Cytokine applications in infectious diseases, in: *Cell-mediated immunity in ruminants* (Morrison BGI ed), pp 229-240, CRC Press, Boca Raton.
- Card JP, Whealy ME, Robbins AK and Enquist LW (1992) Pseudorabies virus envelope glycoprotein gI influences both neurotropism and virulence during infection of the rat visual system. *J Virol* 66:3032-3041.
- Carpenter DE and Misra V (1991) The most abundant protein in bovine herpes 1 virions is a homologue of herpes simplex virus type 1 UL47. *J Gen Virol* 72:3077-3084.
- Carter JJ, Weinberg AD, Pollard A, Reeves R, Magnuson JA and Magnuson NS (1989) Inhibition of T-lymphocyte mitogenic responses and effects on cell functions by bovine herpesvirus 1. *J Virol* 63:1525-1530.
- Cassady KA, Gross M and Roizman B (1998) The herpes simplex virus US11 protein effectively compensates for the gamma1(34.5) gene if present before activation of protein kinase R by precluding its phosphorylation and that of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. *J Virol Methods* 72:8620-8626.
- Castrucci G, Frigeri F, Salvatori D, Ferrari M, Dico ML, Rotola A, Sardonini Q, Petrini S and Cassai E (2002a) A study on latency in calves by five vaccines against bovine herpesvirus-1 infection. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 25:205-215.
- Castrucci G, Frigeri F, Salvatori D, Ferrari M, Sardonini Q, Cassai E, Lo DM, Rotola A and Angelini R (2002b) Vaccination of calves against bovine herpesvirus-1: assessment of the protective value of eight vaccines. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 25:29-41.
- Cavirani S (2008) An update on IBR control in Italy, in: *IBR Workshop - World Buiatrics Congress*, Budapest, Hungary.
- Cerqueira RB, Carminati R, Silva JM, Campos SG, Meyer R and S. S (2000) Serological survey for bovine herpesvirus 1 in cattle from different regions in the state of Bahia, Brazil, in: *Braz J Vet Res Anim Sci* 37(6)online.
- Ch'ng TH and Enquist LW (2005) Efficient axonal localization of alphaherpesvirus structural proteins in cultured sympathetic neurons requires viral glycoprotein E. *J Virol* 79:8835-8846.
- Chow TL, Molello JA and Owen NV (1964) Abortion Experimentally Induced in Cattle by Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus. *J Am Vet Med Assoc* 144:1005-1007.

- Chowdhury SI, Ross CS, Lee BJ, Hall V and Chu HJ (1999) Construction and characterization of a glycoprotein E gene-deleted bovine herpesvirus type 1 recombinant. *Am J Vet Res* 60:227-232.
- Chowdhury SI (1996) Construction and characterization of an attenuated bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) recombinant virus. *Vet Microbiol* 52:13-23.
- Chowdhury SI, Lee BJ, Ozkul A and Weiss ML (2000) Bovine herpesvirus 5 glycoprotein E is important for neuroinvasiveness and neurovirulence in the olfactory pathway of the rabbit. *J Virol* 74:2094-2106.
- Chowdhury SI, Onderci M, Bhattacharjee PS, Al-Mubarak A, Weiss ML and Zhou Y (2002) Bovine herpesvirus 5 (BHV-5) Us9 is essential for BHV-5 neuropathogenesis. *J Virol* 76:3839-3851.
- Ciacchi-Zanella J, Stone M, Henderson G and Jones C (1999) The latency-related gene of bovine herpesvirus 1 inhibits programmed cell death. *J Virol* 73:9734-9740.
- Claus MP, Alfieri AF, Folgueras-Flatschart AV, Wosiacki SR, Medici KC and Alfieri AA (2005) Rapid detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 glycoprotein C gene in clinical specimens by multiplex-PCR. *J Virol Methods* 128:183-188.
- Collins WJ and Johnson DC (2003) Herpes simplex virus gE/gI expressed in epithelial cells interferes with cell-to-cell spread. *J Virol* 77:2686-2695.
- Costes B, Thirion M, Dewals B, Mast J, Ackermann M, Markine-Goriaynoff N, Gillet L and Vanderplasschen A (2006) Felid herpesvirus 1 glycoprotein G is a structural protein that mediates the binding of chemokines on the viral envelope. *Microbes Infect* 8:2657-2667.
- Crook T, Benavides Silvan J, Maley M, Gilray J and Willoughby K (2009) Evidence for an haematogenous route of transplacental infection of BHV-1, in: *3rd ESVV Veterinary Herpesvirus Symposium*, Friedrich Loeffler Institut. Greifswald, Insel Riems.
- D'Arce RC, Almeida RS, Silva TC, Franco AC, Spilki F, Roehe PM and Arns CW (2002) Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5. *Vet Microbiol* 88:315-324.
- Davison AJ (2002) Evolution of the herpesviruses. *Vet Microbiol* 86:69-88.
- de Wind N, Berns A, Gielkens A and Kimman T (1993) Ribonucleotide reductase-deficient mutants of pseudorabies virus are avirulent for pigs and induce partial protective immunity. *J Gen Virol* 74:351-359.
- Deim Z, Szeredi L and Egyed L (2007) Detection of bovine herpesvirus 4 DNA in aborted bovine fetuses. *Can J Vet Res* 71:226-229.
- Del Medico Zajac MP, Puntel M, Zamorano PI, Sadir AM and Romera SA (2006) BHV-1 vaccine induces cross-protection against BHV-5 disease in cattle. *Res Vet Sci* 81:327-334.
- Del Medico Zajac MP, Ladelfa MF, Kotsias F, Muylkens B, Thiry J, Thiry E and Romera SA (2009a) Biology of bovine herpesvirus 5. *Vet J*. doi:10.1016/j.tvjl.2009.03.035
- Del Medico Zajac MP, Romera SA, Ladelfa MF, Kotsias F, Thiry J, Ziant D, Meurens F, Keil GM, Thiry E and Muylkens B (2009b) Characterization of interspecific recombinants generated from closely related bovine herpesviruses 1 and 5 through multiple PCR sequencing assays. *J Virol Methods* 161:75-83.
- Del Medico Zajac MP, Romera SA, Ladelfa MF, Kotsias F, Keil G, Meurens F, Thiry J, Thiry E and Muylkens B (2009c) In vivo behaviour of two interspecific recombinant viruses generated from two bovine alphaherpesviruses in the natural host. *Submitted for publication*.
- Delhon G, Moraes MP, Lu Z, Afonso CL, Flores EF, Weiblen R, Kutish GF and Rock DL (2003) Genome of bovine herpesvirus 5. *J Virol* 77:10339-10347.
- Denis M, Kaashoek MJ, van Oirschot JT, Pastoret PP and Thiry E (1994) Quantitative assessment of the specific CD4+ lymphocyte proliferative response in bovine herpesvirus 1 immune cattle. *Vet Immunol Immunopathol*. 42:275-86.

- Denis M, Hanon E, Rijsewijk FA, Kaashoek MJ, van Oirschot JT, Thiry E and Pastoret PP (1996) The role of glycoproteins gC, gE, gI, and gG in the induction of cell-mediated immune responses to bovine herpesvirus 1. *Vet Microbiol* 53:121-132.
- Deregt D, Tessaro SV and Gilbert SA (2005) Serological evidence of latency in cattle experimentally infected with elk herpesvirus. *Vet Rec* 156:610-611.
- Deruelle MJ, Nauwynck HJ and Favoreel HW (2009) Pseudorabies virus (PRV) US3- and UL49.5-dependent and -independent downregulation of MHC I cell surface expression in different cell types, in: *3rd ESVV Veterinary Herpesvirus Symposium*, Friedrich Loeffler Institut. Greifswald, Insel Riems.
- Deshmane SL and Fraser NW (1989) During latency, herpes simplex virus type 1 DNA is associated with nucleosomes in a chromatin structure. *J. Virol.* 63:943-7.
- Desplanques AS, Nauwynck HJ, Tillemans K, Deforce D and Favoreel HW (2007) Tyrosine phosphorylation and lipid raft association of pseudorabies virus glycoprotein E during antibody-mediated capping. *Virology* 362:60-66.
- Devireddy LR and Jones C (1998) Alternative splicing of the latency-related transcript of bovine herpesvirus 1 yields RNAs containing unique open reading frames. *J Virol* 72:7294-7301.
- Devireddy LR and Jones CJ (1999) Activation of caspases and p53 by bovine herpesvirus 1 infection results in programmed cell death and efficient virus release. *J Virol* 73:3778-3788.
- Devireddy LR, Zhang Y and Jones CJ (2003) Cloning and initial characterization of an alternatively spliced transcript encoded by the bovine herpes virus 1 latency-related gene. *J Neurovirol* 9:612-622.
- Dias JA, Alfieri AF, Ferreira Neto JS, Muller EE and Alfieri AA (2008) Prevalence and risk factors for bovine herpesvirus 1 infection in cattle herds from Parana state, Brazil, in: *IBR Workshop - World Buiatrics Congress*, Budapest, Hungary.
- Dingwell KS, Brunetti CR, Hendricks RL, Tang Q, Tang M, Rainbow AJ and Johnson DC (1994) Herpes simplex virus glycoproteins E and I facilitate cell-to-cell spread in vivo and across junctions of cultured cells. *J Virol* 68:834-845.
- Dingwell KS, Doering LC and Johnson DC (1995) Glycoproteins E and I facilitate neuron-to-neuron spread of herpes simplex virus. *J Virol* 69:7087-7098.
- Dingwell KS and Johnson DC (1998) The herpes simplex virus gE-gI complex facilitates cell-to-cell spread and binds to components of cell junctions. *J Virol* 72:8933-8942.
- Dispas M, Schynts F, Lemaire M, Letellier C, Vanopdenbosch E, Thiry E and Kerkhofs P (2003) Isolation of a glycoprotein E-deleted bovine herpesvirus type 1 strain in the field. *Vet Rec* 153:209-212.
- Divito S, Cherpes TL and Hendricks RL (2006) A triple entente: virus, neurons, and CD8+ T cells maintain HSV-1 latency. *Immunol Res* 36:119-126.
- Dohner K, Wolfstein A, Prank U, Echeverri C, Dujardin D, Vallee R and Sodeik B (2002) Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport. *Mol Biol Cell* 13:2795-2809.
- Donnelly M, Verhagen J and Elliott G (2007) RNA binding by the herpes simplex virus type 1 nucleocytoplasmic shuttling protein UL47 is mediated by an N-terminal arginine-rich domain that also functions as its nuclear localization signal. *J Virol* 81:2283-2296.
- Dudnikova E, Vlasov A, Norkina S, Kireev D and Witter RL (2009) Factors influencing the attenuation of serotype 1 Marek's disease virus by serial cell culture passage and evaluation of attenuated strains for protection and replication. *Avian Dis* 53:63-72.
- Duff GC and Galyean ML (2007) Board-invited review: recent advances in management of highly stressed, newly received feedlot cattle. *J Anim Sci* 85:823-840.
- Eaglesome MD and Garcia MM (1997) Disease risks to animal health from artificial insemination with bovine semen. *Rev Sci Tech* 16:215-225.

- Edwards S (1988) Changing trends in infectious bovine rhinotracheitis in Great Britain. *Vet Rec* 123:614-618.
- Edwards S, White H and Nixon P (1990) A study of the predominant genotypes of bovid herpesvirus 1 found in the U.K. *Vet Microbiol* 22:213-223.
- Edwards S, Newman RH and White H (1991) The virulence of British isolates of bovid herpesvirus 1 in relationship to viral genotype. *Br Vet J* 147:216-231.
- Egyed L, Ros C and Belak S (2000) Genomic and pathogenic studies on a glycoprotein E variant field isolate of bovine herpesvirus 1. *Vet Res Commun* 24:423-431.
- Eidson KM, Hobbs WE, Manning BJ, Carlson P and DeLuca NA (2002) Expression of herpes simplex virus ICPO inhibits the induction of interferon-stimulated genes by viral infection. *J Virol Methods* 76:2180-2191.
- Engels M, Giuliani C, Wild P, Beck TM, Loepfe E and Wyler R (1986) The genome of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) strains exhibiting a neuropathogenic potential compared to known BHV-1 strains by restriction site mapping and cross-hybridization. *Virus Res* 6:57-73.
- Engels M, Palatini M, Metzler AE, Probst U, Kihm U and Ackermann M (1992) Interactions of bovine and caprine herpesviruses with the natural and the foreign hosts. *Vet Microbiol* 33:69-78.
- Enquist LW, Husak PJ, Banfield BW and Smith GA (1998) Infection and spread of alphaherpesviruses in the nervous system. *Adv Virus Res*:237-347.
- Enquist LW, Tomishima MJ, Gross S and Smith GA (2002) Directional spread of an alpha-herpesvirus in the nervous system. *Vet Microbiol* 86:5-16.
- ESV (2009) Book of Abstracts, in: *3rd ESVV Veterinary Herpesvirus Symposium* (Mettenleiter T ed, Friedrich Loeffler Institut. Greifswald, Insel Riems.
- Falkner FG and Moss B (1990) Transient dominant selection of recombinant vaccinia viruses. *J Virol* 64:3108-3111.
- Farnsworth A, Goldsmith K and Johnson DC (2003) Herpes simplex virus glycoproteins gD and gE/gI serve essential but redundant functions during acquisition of the virion envelope in the cytoplasm. *J Virol* 77:8481-8494.
- Farnsworth A and Johnson DC (2006) Herpes simplex virus gE/gI must accumulate in the trans-Golgi network at early times and then redistribute to cell junctions to promote cell-cell spread. *J Virol* 80:3167-3179.
- Farnsworth A, Wisner TW and Johnson DC (2007) Cytoplasmic residues of herpes simplex virus glycoprotein gE required for secondary envelopment and binding of tegument proteins VP22 and UL11 to gE and gD. *J Virol* 81:319-331.
- Favoreel HW, Nauwynck HJ and Pensaert MB (1999) Role of the cytoplasmic tail of gE in antibody-induced redistribution of viral glycoproteins expressed on pseudorabies-virus-infected cells. *Virology* 259:141-147.
- Favoreel HW, Nauwynck HJ, Van Oostveldt P, Mettenleiter TC and Pensaert MB (1997) Antibody-induced and cytoskeleton-mediated redistribution and shedding of viral glycoproteins, expressed on pseudorabies virus-infected cells. *J Virol* 71:8254-8261.
- Favoreel HW, Van de Walle GR, Nauwynck HJ and Pensaert MB (2003) Virus complement evasion strategies. *J Gen Virol* 84:1-15.
- Favoreel HW, Van Minnebruggen G, Adriaensen D and Nauwynck HJ (2005) Cytoskeletal rearrangements and cell extensions induced by US3 kinase of an alphaherpesvirus are associated with enhanced spread. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 102:8990-5.
- Favoreel HW, Van Minnebruggen G, Van de Walle GR, Ficinska J and Nauwynck HJ (2006) Herpesvirus interference with virus-specific antibodies: bridging antibodies, internalizing antibodies, and hiding from antibodies. *Vet Microbiol* 113:257-263.

- Favoreel HW, Enquist LW and Feierbach B (2007) Actin and Rho GTPases in herpesvirus biology. *Trends Microbiol* 15:426-433.
- Favoreel HW (2008) Immune evasion of alphaherpesviruses. *Verh K Acad Geneesk Belg* 70:47-65.
- Ferrari M, Mettenleiter TC, Romanelli MG, Cabassi E, Corradi A, Dal Mas N and Silini R (2000) A comparative study of pseudorabies virus (PRV) strains with defects in thymidine kinase and glycoprotein genes. *J Comp Pathol* 123:152-163.
- Field HJ, Biswas S and Mohammad IT (2006) Herpesvirus latency and therapy--from a veterinary perspective. *Antiviral Res* 71:127-133.
- Fraefel C, Wirth UV, Vogt B and Schwyzer M (1993) Immediate-early transcription over covalently joined genome ends of bovine herpesvirus 1: the circ gene. *J Virol* 67:1328-1333.
- Fraefel C, Ackermann M and Schwyzer M (1994) Identification of the bovine herpesvirus 1 circ protein, a myristylated and virion-associated polypeptide which is not essential for virus replication in cell culture. *J Virol* 68:8082-8088.
- Franco AC, Rijsewijk FAM, Furtado Flores E, Weiblen R and Roehe PM (2002a) Construction and characterization of a glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus type 1.2 strain isolated in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 33:274-278.
- Franco AC, Spilki FR, Esteves PE, de Lima M, Weiblen R, Furtado Flores E, Rijsewijk FAM and Roehe PM (2002b) A Brazilian glycoprotein E-negative bovine herpesvirus type 1.2a (BHV-1.2a) mutant is attenuated for cattle and induces protection against wild-type virus challenge. *Pesq. Vet. Bras.* 22:135-140.
- Frank I and Friedman HM (1989) A novel function of the herpes simplex virus type 1 Fc receptor: participation in bipolar bridging of antiviral immunoglobulin G. *J Virol* 63:4479-4488.
- Franken P (2008) The present and the future of IBR control, in: *IBR Workshop - World Buiatrics Congress*, Budapest, Hungary.
- Friedman HM, Cohen GH, Eisenberg RJ, Seidel CA and Cines DB (1984) Glycoprotein C of herpes simplex virus 1 acts as a receptor for the C3b complement component on infected cells. *Nature* 309:633-635.
- Fries LF, Friedman HM, Cohen GH, Eisenberg RJ, Hammer CH and Frank MM (1986) Glycoprotein C of herpes simplex virus 1 is an inhibitor of the complement cascade. *J Immunol* 137:1636-1641.
- Fuchs W, Klupp BG, Granzow H and Mettenleiter TC (1997) The UL20 gene product of pseudorabies virus functions in virus egress. *J Virol* 71:5639-5646.
- Fuchs M, Hubert P, Detterer J and Rziha HJ (1999) Detection of bovine herpesvirus type 1 in blood from naturally infected cattle by using a sensitive PCR that discriminates between wild-type virus and virus lacking glycoprotein E. *J Clin Microbiol* 37:2498-2507.
- Fuchs W, Klupp BG, Granzow H, Hengartner C, Brack A, Mundt A, Enquist LW and Mettenleiter TC (2002) Physical interaction between envelope glycoproteins E and M of pseudorabies virus and the major tegument protein UL49. *J Virol* 76:8208-8217.
- Fuchs W, Granzow H, Klupp BG, Karger A, Michael K, Maresch C, Klopffleisch R and Mettenleiter TC (2007) Relevance of the interaction between alphaherpesvirus UL3.5 and UL48 proteins for virion maturation and neuroinvasion. *J Virol* 81:9307-9318.
- Fulton RW, Blood KS, Panciera RJ, Payton ME, Ridpath JF, Confer AW, Saliki JT, Burge LT, Welsh RD, Johnson BJ and Reck A (2009) Lung pathology and infectious agents in fatal feedlot pneumonias and relationship with mortality, disease onset, and treatments. *J Vet Diagn Invest* 21:464-477.
- Furth JJ, Whitbeck JC, Lawrence WC and Bello LJ (1997) Construction of a viable BHV1 mutant lacking most of the short unique region. *Arch Virol* 142:2373-2387.

- Gao Y, Leary TP, Eskra L and Splitter GA (1994) Truncated bovine herpesvirus-1 glycoprotein I (gpI) initiates a protective local immune response in its natural host. *Vaccine* 12:145-152.
- Gao Y, Daley MJ and Splitter GA (1995) BHV-1 glycoprotein 1 and recombinant interleukin 1 beta efficiently elicit mucosal IgA response. *Vaccine* 13:871-877.
- Garber DA, Beverley SM and Coen DM (1993) Demonstration of circularization of herpes simplex virus DNA following infection using pulsed field gel electrophoresis. *Virology* 197: 459-462.
- Geiser V, Inman M, Zhang Y and Jones C (2002) The latency-related gene of bovine herpesvirus-1 can inhibit the ability of bICP0 to activate productive infection. *J Gen Virol* 83: 2965-2971.
- Geiser V and Jones C (2005) Localization of sequences within the latency-related gene of bovine herpesvirus 1 that inhibit mammalian cell growth. *J Neurovirol* 11:563-570.
- Gerber SI, Belval BJ and Herold BC (1995) Differences in the role of glycoprotein C of HSV-1 and HSV-2 in viral binding may contribute to serotype differences in cell tropism. *Virology* 214:29-39.
- Gerdts V, Beyer J, Lomniczi B and Mettenleiter TC (2000) Pseudorabies virus expressing bovine herpesvirus 1 glycoprotein B exhibits altered neurotropism and increased neurovirulence. *J Virol* 74:817-827.
- Gibbs EP and Rweyemamu MM (1977) Bovine herpesviruses. Part I. Bovine herpesvirus 1. *The veterinary bulletin* 47:317-343.
- Gil A, Cernicchiaro N, Nuñez A, Piaggio J, Zaffaroni R, Huertas S and Scarsi R (2003) Serological prevalence of infectious rinotracheitis and bovine diarrhea in holstein calves in the principal uruguayan dairy region, in: *XI International Congress ISAH (International Society for Animal Hygiene)*, Mexico DF, Mexico.
- Góngora A, Villamil LC, Ver V, Ramirez G and Parra J (1995) Diagnóstico de las principales enfermedades reproductivas en toros de la Sabana de Bogotá. Énfasis en RIB. *Rev Med Vet Zoot* 43:37-41.
- Gopinath RS, Ambagala AP, Hinkley S and Srikumaran S (2002) Effects of virion host shut-off activity of bovine herpesvirus 1 on MHC class I expression. *Viral Immunol* 15:595-608.
- Granzow H, Klupp BG, Fuchs W, Veits J, Osterrieder N and Mettenleiter TC (2001) Egress of alphaherpesviruses: comparative ultrastructural study. *J Virol* 75:3675-3684.
- Granzow H, Klupp BG and Mettenleiter TC (2004) The pseudorabies virus US3 protein is a component of primary and of mature virions. *J Virol* 78:1314-1323.
- Granzow H, Klupp BG and Mettenleiter TC (2005) Entry of pseudorabies virus: an immunogold-labeling study. *J Virol* 79:3200-3205.
- Griebel PJ, Qualtiere L, Davis WC, Lawman MJ and Babiuk LA (1987) Bovine peripheral blood leukocyte subpopulation dynamics following a primary bovine herpesvirus-1 infection. *Viral Immunol* 1:267-286.
- Griebel PJ, Gee AP, Qualtiere L, Lawman MJ and Babiuk LA (1989) Negative enrichment of bovine T lymphocytes with monoclonal antibodies and magnetic microspheres. *Vet Immunol Immunopathol* 22 2:161-173.
- Grom J, Hostnik P, Toplak I and Barlic-Maganja D (2006) Molecular detection of BHV-1 in artificially inoculated semen and in the semen of a latently infected bull treated with dexamethasone. *Vet J* 171:539-544.
- Gross ST, Harley CA and Wilson DW (2003) The cytoplasmic tail of Herpes simplex virus glycoprotein H binds to the tegument protein VP16 in vitro and in vivo. *Virology* 317:1-12.
- Guiarte Quincozes C (2005) Prevalencia e fatores de risco associados as infeccoes pelos herpesvirus bovino tipo 1 e 5 (BHV-1 e 5) e pelo virus da diarréia viral bovina (BVDV) nos rebanhos dos municipios de Santa Vitoria do Palmar e Chui, *Tesis Doctoral*, Rio Grande do Sul, Brasil.

- Haan L, Verweij WR, Holtrop M, Brands R, van Scharrenburg GJ, Palache AM, Agsteribbe E and Wilschut J (2001) Nasal or intramuscular immunization of mice with influenza subunit antigen and the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile toxin induces IgA- or IgG-mediated protective mucosal immunity. *Vaccine* 19:2898-2907.
- Hage JJ, Vellema P, Schukken YH, Barkema HW, Rijsewijk FA, van Oirschot JT and Wentink GH (1997) Sheep do not have a major role in bovine herpesvirus 1 transmission. *Vet Microbiol* 57:41-54.
- Hage JJ, Schukken YH, Dijkstra T, Barkema HW, van Valkengoed PH and Wentink GH (1998) Milk production and reproduction during a subclinical bovine herpesvirus 1 infection on a dairy farm. *Prev Vet Med* 34:97-106.
- Hanon E, Vanderplasschen A, Lyaku S, Keil G, Denis M and Pastoret PP (1996) Inactivated bovine herpesvirus 1 induces apoptotic cell death of mitogen-stimulated bovine peripheral blood mononuclear cells. *J Virol* 70:4116-4120.
- Henderson G, Perng GC, Nesburn AB, Wechsler SL and Jones C (2004) The latency-related gene encoded by bovine herpesvirus 1 can suppress caspase 3 and caspase 9 cleavage during productive infection. *J Neurovirol* 10:64-70.
- Henderson G, Zhang Y and Jones C (2005) The Bovine herpesvirus 1 gene encoding infected cell protein 0 (bICP0) can inhibit interferon-dependent transcription in the absence of other viral genes. *J Gen Virol* 86:2697-2702.
- Higgins RJ and Edwards S (1986) Systemic neonatal infectious bovine rhinotracheitis virus infection in suckler calves. *Vet Rec* 119:177-178.
- Hinkley S, Ambagala AP, Jones CJ and Srikumaran S (2000) A vhs-like activity of bovine herpesvirus-1. *Arch Virol* 145:2027-2046.
- Hodgson PD, Aich P, Manuja A, Hokamp K, Roche FM, Brinkman FS, Potter A, Babiuk LA and Griebel PJ (2005) Effect of stress on viral-bacterial synergy in bovine respiratory disease: novel mechanisms to regulate inflammation. *Comp Funct Genomics* 6:244-250.
- Homa FL and Brown JC (1997) Capsid assembly and DNA packaging in herpes simplex virus. *Rev Med Virol* 7:107-122.
- Horiuchi M, Yamazaki N, Furuoka H, Matsui T, Nakagawa M, Ishiguro N and Shinagawa M (1995) Restriction endonuclease analysis of bovine herpesvirus type 1 isolates from calves with fatal encephalitis: comparison with vaccine virus. *J Vet Med Sci* 57:577-580.
- Hossain A, Schang LM and Jones C (1995) Identification of gene products encoded by the latency-related gene of bovine herpesvirus 1. *J Virol* 69:5345-5352.
- Huemer HP, Larcher C, Dierich MP and Falke D (1992) Factors influencing the interaction of herpes simplex virus glycoprotein C with the third component of complement. *Arch Virol* 127:291-303.
- Huemer HP, Wang Y, Garred P, Koistinen V and Oppermann S (1993) Herpes simplex virus glycoprotein C: molecular mimicry of complement regulatory proteins by a viral protein. *Immunology* 79:639-647.
- Huemer HP, Nowotny N, Crabb BS, Meyer H and Hubert PH (1995) gp13 (EHV-gC): a complement receptor induced by equine herpesviruses. *Virus Res* 37:113-126.
- Hughes JP, Olander HJ and Wada M (1964) Keratoconjunctivitis Associated with Infectious Bovine Rhinotracheitis. *J Am Vet Med Assoc* 145:32-39.
- Hung SL, Peng C, Kostavasili I, Friedman HM, Lambris JD, Eisenberg RJ and Cohen GH (1994) The interaction of glycoprotein C of herpes simplex virus types 1 and 2 with the alternative complement pathway. *Virology* 203:299-312.
- Inman M, Lovato L, Doster A and Jones C (2001) A mutation in the latency-related gene of bovine herpesvirus 1 leads to impaired ocular shedding in acutely infected calves. *J Virol* 75:8507-8515.

- Inman M, Lovato L, Doster A and Jones C (2002) A mutation in the latency-related gene of bovine herpesvirus 1 disrupts the latency reactivation cycle in calves. *J Virol* 76:6771-6779.
- Inman M, Zhou J, Webb H and Jones C (2004) Identification of a novel bovine herpesvirus 1 transcript containing a small open reading frame that is expressed in trigeminal ganglia of latently infected cattle. *J Virol* 78:5438-5447.
- Israel BA, Herber R, Gao Y and Letchworth GJ, 3rd (1992) Induction of a mucosal barrier to bovine herpesvirus 1 replication in cattle. *Virology* 188:256-264.
- Jacobs L (1994) Glycoprotein E of pseudorabies virus and homologous proteins in other alphaherpesvirinae. *Arch Virol* 137:209-228.
- Jahnsen FL, Strickland DH, Thomas JA, Tobagus IT, Napoli S, Zosky GR, Turner DJ, Sly PD, Stumbles PA and Holt PG (2006) Accelerated antigen sampling and transport by airway mucosal dendritic cells following inhalation of a bacterial stimulus. *J Immunol* 177:5861-5867.
- Jiang Y, Hossain A, Winkler MT, Holt T, Doster A and Jones C (1998) A protein encoded by the latency-related gene of bovine herpesvirus 1 is expressed in trigeminal ganglionic neurons of latently infected cattle and interacts with cyclin-dependent kinase 2 during productive infection. *J Virol* 72:8133-8142.
- Jiang Y, Inman M, Zhang Y, Posadas NA and Jones C (2004) A mutation in the latency-related gene of bovine herpesvirus 1 inhibits protein expression from open reading frame 2 and an adjacent reading frame during productive infection. *J Virol* 78:3184-3189.
- Johnson DC and Feenstra V (1987) Identification of a novel herpes simplex virus type 1-induced glycoprotein which complexes with gE and binds immunoglobulin. *J Virol* 61:2208-2216.
- Johnson DC, Frame MC, Ligas MW, Cross AM and Stow ND (1988) Herpes simplex virus immunoglobulin G Fc receptor activity depends on a complex of two viral glycoproteins, gE and gI. *J Virol* 62:1347-1354.
- Johnson DC, Webb M, Wisner TW and Brunetti C (2001) Herpes simplex virus gE/gI sorts nascent virions to epithelial cell junctions, promoting virus spread. *J Virol* 75:821-833.
- Johnson DC and Huber MT (2002) Directed egress of animal viruses promotes cell-to-cell spread. *J Virol* 76:1-8.
- Jones C (2003) Herpes simplex virus type 1 and bovine herpesvirus 1 latency. *Clin Microbiol Rev* 16:79-95.
- Jones C and Chowdhury S (2007) A review of the biology of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines. *Anim Health Res Rev* 8:187-205.
- Jones CA, Taylor TJ and Knipe DM (2000) Biological properties of herpes simplex virus 2 replication-defective mutant strains in a murine nasal infection model. *Virology* 278:137-150.
- Jons A, Dijkstra JM and Mettenleiter TC (1998) Glycoproteins M and N of pseudorabies virus form a disulfide-linked complex. *J Virol* 72:550-557.
- Kaashoek MJ, Moerman A, Madic J, Rijsewijk FA, Quak J, Gielkens AL and van Oirschot JT (1994) A conventionally attenuated glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus type 1 is an efficacious and safe vaccine. *Vaccine* 12:439-444.
- Kaashoek MJ, van Engelenburg FA, Moerman A, Gielkens AL, Rijsewijk FA and van Oirschot JT (1996a) Virulence and immunogenicity in calves of thymidine kinase- and glycoprotein E-negative bovine herpesvirus 1 mutants. *Vet Microbiol* 48:143-153.
- Kaashoek MJ, Straver PH, Van Rooij EM, Quak J and Van Oirschot JT (1996b) Virulence, immunogenicity and reactivation of seven bovine herpesvirus 1.1 strains: clinical and virological aspects. *Vet Rec* 139:416-421.

- Kaashoek MJ, Rijsewijk FA, Ruuls RC, Keil GM, Thiry E, Pastoret PP and Van Oirschot JT (1998) Virulence, immunogenicity and reactivation of bovine herpesvirus 1 mutants with a deletion in the gC, gG, gI, gE, or in both the gI and gE gene. *Vaccine* 16:802-809.
- Kalthoff D, Granzow H, Trapp S and Beer M (2008) The UL49 gene product of BoHV-1: a major factor in efficient cell-to-cell spread. *J Gen Virol* 89:2269-2274.
- Kamiyoshi T, Murakami K, Konishi M, Izumi Y and Sentsui H (2008) The presence of a deletion sequence in the BHV-1 UL49 homolog in a live attenuated vaccine for infectious bovine rhinotracheitis (IBR). *Vaccine* 26:477-485.
- Kendrick JW and Straub OC (1967) Infectious bovine rhinotracheitis-infectious pustular vulvovaginitis virus infection in pregnant cows. *Am J Vet Res* 28:1269-1282.
- Kendrick JW and Osburn BI (1973) Immunologic response of the bovine fetus to inactivated infectious bovine rhinotracheitis-infectious pustular vulvovaginitis virus. *Am J Vet Res* 34:1567-1571.
- Klopfleisch R, Klupp BG, Fuchs W, Kopp M, Teifke JP and Mettenleiter TC (2006) Influence of pseudorabies virus proteins on neuroinvasion and neurovirulence in mice. *J Virol* 80:5571-5576.
- Klupp BG, Granzow H and Mettenleiter TC (2001) Effect of the pseudorabies virus US3 protein on nuclear membrane localization of the UL34 protein and virus egress from the nucleus. *J Gen Virol* 82:2363-2371.
- Klupp BG, Granzow H, Keil GM and Mettenleiter TC (2006) The capsid-associated UL25 protein of the alphaherpesvirus pseudorabies virus is nonessential for cleavage and encapsidation of genomic DNA but is required for nuclear egress of capsids. *J Virol* 80:6235-6246.
- Knapp AC, Husak PJ and Enquist LW (1997) The gE and gI homologs from two alphaherpesviruses have conserved and divergent neuroinvasive properties. *J Virol* 71:5820-5827.
- Kopp M, Granzow H, Fuchs W, Klupp B and Mettenleiter TC (2004) Simultaneous deletion of pseudorabies virus tegument protein UL11 and glycoprotein M severely impairs secondary envelopment. *J Virol* 78:3024-3034.
- Koppers-Lalic D, Rijsewijk FA, Verschuren SB, van Gaans-Van den Brink JA, Neisig A, Rensing ME, Neefjes J and Wiertz EJ (2001) The UL41-encoded virion host shutoff (vhs) protein and vhs-independent mechanisms are responsible for down-regulation of MHC class I molecules by bovine herpesvirus 1. *J Gen Virol* 82:2071-2081.
- Koppers-Lalic D, Reits EA, Rensing ME, Lipinska AD, Abele R, Koch, J., Marcondes Rezende M, Admiraal P, van Leeuwen D, K. B-S, Mettenleiter TC, Rijsewijk FA, Tampe R, Neefjes J and Wiertz EJ (2005) Varicelloviruses avoid T cell recognition by UL49.5-mediated inactivation of the transporter associated with antigen processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:5144-5149.
- Koppers-Lalic D, Verweij MC, Lipinska AD, Wang Y, Quinten E, Reits EA, Koch J, Loch S, Marcondes Rezende M, Daus F, Bienkowska-Szewczyk K, Osterrieder N, Mettenleiter TC, Heemskerk MH, Tampe R, Neefjes JJ, Chowdhury SI, Rensing ME, Rijsewijk FA and Wiertz EJ (2008) Varicellovirus UL 49.5 proteins differentially affect the function of the transporter associated with antigen processing, TAP. *PLoS Pathog* doi: 10.1371/journal.ppat.1000080.
- Kramps JA, Perrin B, Edwards S and van Oirschot JT (1996) A European inter-laboratory trial to evaluate the reliability of serological diagnosis of bovine herpesvirus 1 infections. *Vet Microbiol* 53:153-161.
- Kritas SK, Nauwynck HJ and Pensaert MB (1995) Dissemination of wild-type and gC-, gE- and gI-deleted mutants of Aujeszky's disease virus in the maxillary nerve and trigeminal ganglion of pigs after intranasal inoculation. *J Gen Virol* 76:2063-2066.
- Kutish G, Mainprize T and Rock D (1990) Characterization of the latency-related transcriptionally active region of the bovine herpesvirus 1 genome. *J Virol* 64:5730-5737.

- Lam N and Letchworth GJ (2000) Bovine herpesvirus 1 U(L)3.5 interacts with bovine herpesvirus 1 alpha-transinducing factor. *J Virol* 74:2876-2884.
- Lam N and Letchworth G (2004) A derivative of bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) UL3.5 lacking the last forty amino acids inhibits replication of BoHV-1. *Arch Virol* 149:2295-2306.
- Lee HC, Chouljenko VN, Chouljenko DV, Boudreaux MJ and Kousoulas KG (2009) The herpes simplex virus type 1 glycoprotein D (gD) cytoplasmic terminus and full-length gE are not essential and do not function in a redundant manner for cytoplasmic virion envelopment and egress. *J Virol* 83:6115-6124.
- Leege T, Fuchs W, Granzow H, Kopp M, Klupp BG and Mettenleiter TC (2009) Effects of simultaneous deletion of pUL11 and glycoprotein M on virion maturation of herpes simplex virus type 1. *J Virol* 83:896-907.
- Lehmkuhl HD and Cutlip RC (1985) Protection from parainfluenza-3 virus and persistence of infectious bovine rhinotracheitis virus in sheep vaccinated with a modified live IBR-PI-3 vaccine. *Can J Comp Med* 49:58-62.
- Leite F, O'Brien S, Sylte MJ, Page T, Atapattu D and Czuprynski CJ (2002) Inflammatory cytokines enhance the interaction of Mannheimia haemolytica leukotoxin with bovine peripheral blood neutrophils in vitro. *Infect Immun* 70:4336-4343.
- Leite F, Kuckleburg C, Atapattu D, Schultz R and Czuprynski CJ (2004) BHV-1 infection and inflammatory cytokines amplify the interaction of Mannheimia haemolytica leukotoxin with bovine peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Vet Immunol Immunopathol* 99:193-202.
- Leite F, Atapattu D, Kuckleburg C, Schultz R and Czuprynski CJ (2005) Incubation of bovine PMNs with conditioned medium from BHV-1 infected peripheral blood mononuclear cells increases their susceptibility to Mannheimia haemolytica leukotoxin. *Vet Immunol Immunopathol* 103:187-193.
- Lemaire M, Meyer G, Ernst E, Vanherreweghe V, Limbourg B, Pastoret PP and Thiry E (1995) Latent bovine herpesvirus 1 infection in calves protected by colostral immunity. *Vet Rec* 137:70-71.
- Lemaire M, Meyer G, Baranowski E, Schynts F, Wellemans G, Kerkhofs P and Thiry E (2000a) Production of bovine herpesvirus type 1-seronegative latent carriers by administration of a live-attenuated vaccine in passively immunized calves. *J Clin Microbiol* 38:4233-4238.
- Lemaire M, Weynants V, Godfroid J, Schynts F, Meyer G, Letesson JJ and Thiry E (2000b) Effects of bovine herpesvirus type 1 infection in calves with maternal antibodies on immune response and virus latency. *J Clin Microbiol* 38:1885-1894.
- Lemaire M, Hanon E, Schynts F, Meyer G and Thiry E (2000c) Specific passive immunity reduces the excretion of glycoprotein E-negative bovine herpesvirus type 1 vaccine strain in calves. *Vaccine* 19:1013-1017.
- Lemaire M, Schynts F, Meyer G, Georgin JP, Baranowski E, Gabriel A, Ros C, Belak S and Thiry E (2001) Latency and reactivation of a glycoprotein E negative bovine herpesvirus type 1 vaccine: influence of virus load and effect of specific maternal antibodies. *Vaccine* 19:4795-4804.
- Leung-Tack P, Audonnet JC and Riviere M (1994) The complete DNA sequence and the genetic organization of the short unique region (US) of the bovine herpesvirus type 1 (ST strain). *Virology* 199:409-421.
- Leuzinger H, Ziegler U, Schraner EM, Fraefel C, Glauser DL, Heid I, Ackermann M, Mueller M and Wild P (2005) Herpes simplex virus 1 envelopment follows two diverse pathways. *J Virol* 79:13047-13059.

- Li Y, van Drunen Littel-van den Hurk S, Babiuk LA and Liang X (1995) Characterization of cell-binding properties of bovine herpesvirus 1 glycoproteins B, C, and D: identification of a dual cell-binding function of gB. *J Virol* 69:4758-4768.
- Liang X, Babiuk LA and Zamb TJ (1992) An in vivo study of a glycoprotein gIII-negative bovine herpesvirus 1 (BHV-1) mutant expressing beta-galactosidase: evaluation of the role of gIII in virus infectivity and its use as a vector for mucosal immunization. *Virology* 189:629-639.
- Liang X, Babiuk LA and Zamb TJ (1993) Mapping of heparin-binding structures on bovine herpesvirus 1 and pseudorabies virus gIII glycoproteins. *Virology* 194:233-243.
- Liang X, Pyne C, Li Y, Babiuk LA and Kowalski J (1995) Delineation of the essential function of bovine herpesvirus 1 gD: an indication for the modulatory role of gD in virus entry. *Virology* 207:429-441.
- Liang X, Chow B, Raggo C and Babiuk LA (1996) Bovine herpesvirus 1 UL49.5 homolog gene encodes a novel viral envelope protein that forms a disulfide-linked complex with a second virion structural protein. *J Virol* 70:1448-1454.
- Liang X, Chow B and Babiuk LA (1997) Study of immunogenicity and virulence of bovine herpesvirus 1 mutants deficient in the UL49 homolog, UL49.5 homolog and dUTPase genes in cattle. *Vaccine* 15:1057-1064.
- Lin R, Noyce RS, Collins SE, Everett RD and Mossman KL (2004) The herpes simplex virus ICP0 RING finger domain inhibits IRF3- and IRF7-mediated activation of interferon-stimulated genes. *J Virol Methods* 78:1675-1684.
- Lipinska AD, Koppers-Lalic D, Rychlowski M, Admiraal P, Rijsewijk FA, Bienkowska-Szewczyk K and Wiertz EJ (2006) Bovine herpesvirus 1 UL49.5 protein inhibits the transporter associated with antigen processing despite complex formation with glycoprotein M. *J Virol* 80:5822-5832.
- Lipinska AD, Verweij MC, Koppers-Lalic D, Wiertz EJ and Bienkowska-Szewczyk K (2009) The effect of cytoplasmic serine and lysine substitution in the BHV-1-encoded UL49.5 protein on the inhibition of the transporter associated with antigen processing (TAP), in: *3rd ESVV Veterinary Herpesvirus Symposium*, Friedrich Loeffler Institut. Greifswald, Insel Riems.
- Litwin V, Jackson W and Grose C (1992) Receptor properties of two varicella-zoster virus glycoproteins, gpI and gpIV, homologous to herpes simplex virus gE and gI. *J Virol* 66:3643-3651.
- Liu ZF, Brum MC, Doster A, Jones C and Chowdhury SI (2008) A bovine herpesvirus type 1 mutant virus specifying a carboxyl-terminal truncation of glycoprotein E is defective in anterograde neuronal transport in rabbits and calves. *J Virol* 82:7432-7442.
- Lojkic I, Cac Z, Bedekovic T, Roic B, Cvetnic Z and Lojkic M (2009) Detection, isolation and partial sequencing of bovine herpesvirus-1 from an outbreak of infectious bovine rhinotracheitis, in: *3rd ESVV Veterinary Herpesvirus Symposium*, Friedrich Loeffler Institut. Greifswald, Insel Riems.
- Lovato L, Inman M, Henderson G, Doster A and Jones C (2003) Infection of cattle with a bovine herpesvirus 1 strain that contains a mutation in the latency-related gene leads to increased apoptosis in trigeminal ganglia during the transition from acute infection to latency. *J Virol* 77:4848-4857.
- Madic J, Magdalena J, Quak J and van Oirschot JT (1995a) Isotype-specific antibody responses in sera and mucosal secretions of calves experimentally infected with bovine herpesvirus 1. *Vet Immunol Immunopathol* 46:267-283.
- Madic J, Magdalena J, Quak J and van Oirschot JT (1995b) Isotype-specific antibody responses to bovine herpesvirus 1 in sera and mucosal secretions of calves after experimental reinfection and after reactivation. *Vet Immunol Immunopathol* 47:81-92.

- Magaña Urbíña A, Solorio Rivera JL and Segura Correa JC (2005) Rinotraqueitis infecciosa bovina en hatos lecheros de la región Cotzio-Téjaro, Michoacán, México. *Tec Pecu Mex* 43:127-137.
- Makoschey B and Beer M (2007) A live bovine herpesvirus-1 marker vaccine is not shed after intramuscular vaccination. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 120:480-482.
- Mars MH, de Jong MC and van Oirschot JT (2000a) A gE-negative bovine herpesvirus 1 vaccine strain is not re-excreted nor transmitted in an experimental cattle population after corticosteroid treatments. *Vaccine* 18:1975-1981.
- Mars MH, de Jong MC and van Oirschot JT (2000b) A gE-negative BHV1 vaccine virus strain cannot perpetuate in cattle populations. *Vaccine* 18:2120-2124.
- Mayer B, Kis Z, Kajan G, Frenyo LV, Hammarstrom L and Kacskovics I (2004) The neonatal Fc receptor (FcRn) is expressed in the bovine lung. *Vet Immunol Immunopathol* 98:85-89.
- Mayfield JE, Good PJ, VanOort HJ, Campbell AR and Reed DE (1983) Cloning and cleavage site mapping of DNA from bovine herpesvirus 1 (Cooper strain). *J Virol* 47:259-264.
- McGraw HM, Awasthi S, Wojcechowskyj JA and Friedman HM (2009) Anterograde spread of herpes simplex virus type 1 requires glycoprotein E and glycoprotein I but not Us9. *J Virol* 83:8315-8326.
- McGraw HM and Friedman HM (2009) Herpes simplex virus type 1 glycoprotein E mediates retrograde spread from epithelial cells to neurites. *J Virol* 83:4791-4799.
- McMillan TN and Johnson DC (2001) Cytoplasmic domain of herpes simplex virus gE causes accumulation in the trans-Golgi network, a site of virus envelopment and sorting of virions to cell junctions. *J Virol* 75:1928-1940.
- Mechor GD, Rousseaux CG, Radostits OM, Babiuk LA and Petrie L (1987) Protection of newborn calves against fatal multisystemic infectious bovine rhinotracheitis by feeding colostrum from vaccinated cows. *Can J Vet Res* 51:452-459.
- Melancon JM, Fulmer PA and Kousoulas KG (2007) The herpes simplex virus UL20 protein functions in glycoprotein K (gK) intracellular transport and virus-induced cell fusion are independent of UL20 functions in cytoplasmic virion envelopment. *Virology* 364:114-120.
- Mettenleiter TC (1989) Glycoprotein gIII deletion mutants of pseudorabies virus are impaired in virus entry. *Virology* 171:623-625.
- Mettenleiter TC (2002) Herpesvirus assembly and egress. *J Virol* 76:1537-1547.
- Mettenleiter TC (2003) Pathogenesis of neurotropic herpesviruses: role of viral glycoproteins in neuroinvasion and transneuronal spread. *Virus Res* 92:197-206.
- Mettenleiter TC (2004) Budding events in herpesvirus morphogenesis. *Virus Res* 106:167-180.
- Mettenleiter TC (2006a) Intriguing interplay between viral proteins during herpesvirus assembly or: the herpesvirus assembly puzzle. *Vet Microbiol* 113:163-169.
- Mettenleiter TC, Klupp BG and Granzow H (2006b) Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. *Curr Opin Microbiol* 9:423-429.
- Metzler AE, Matile H, Gassmann U, Engels M and Wyler R (1985) European isolates of bovine herpesvirus 1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides, and reactivity with monoclonal antibodies. *Arch Virol* 85:57-69.
- Metzler AE, Schudel AA and Engels M (1986) Bovine herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. *Arch Virol* 87:205-217.
- Meyer F, Perez S, Jiang Y, Zhou Y, Henderson G and Jones C (2007a) Identification of a novel protein encoded by the latency-related gene of bovine herpesvirus 1. *J Neurovirol* 13:569-578.

- Meyer F, Perez S, Geiser V, Sintek M, Inman M and Jones C (2007b) A protein encoded by the bovine herpesvirus 1 latency-related gene interacts with specific cellular regulatory proteins, including CCAAT enhancer binding protein alpha. *J Virol* 81:59-67.
- Meyer F and Jones C (2009) The cellular transcription factor, CCAAT enhancer-binding protein alpha (C/EBP-alpha), has the potential to activate the bovine herpesvirus 1 immediate-early transcription unit 1 promoter. *J Neurovirol* 15:123-130.
- Meyer G, Lemaire M, Lyaku J, Pastoret PP and Thiry E (1996) Establishment of a rabbit model for bovine herpesvirus type 5 neurological acute infection. *Vet Microbiol* 51:27-40.
- Meyer G, Hanon E, Georgette D, Pastoret PP and Thiry E (1998) Bovine herpesvirus type 1 glycoprotein H is essential for penetration and propagation in cell culture. *J Gen Virol* 79:1983-1987.
- Meyer G, Lemaire M, Ros C, Belak K, Gabriel A, Cassart D, Coignoul F, Belak S and Thiry E (2001) Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5. *Arch Virol* 146:633-652.
- Miller JM and van der Maaten MJ (1984) Reproductive tract lesions in heifers after intrauterine inoculation with infectious bovine rhinotracheitis virus. *Am J Vet Res* 45:790-794.
- Miller JM and Van der Maaten MJ (1986) Experimentally induced infectious bovine rhinotracheitis virus infection during early pregnancy: effect on the bovine corpus luteum and conceptus. *Am J Vet Res* 47:223-228.
- Miller JM, Whetstone CA and Van der Maaten MJ (1991) Abortifacient property of bovine herpesvirus type 1 isolates that represent three subtypes determined by restriction endonuclease analysis of viral DNA. *Am. J. Vet. Res.* 52.
- Misra V, Bratanich AC, Carpenter D and O'Hare P (1994) Protein and DNA elements involved in transactivation of the promoter of the bovine herpesvirus (BHV) 1 IE-1 transcription unit by the BHV alpha gene trans-inducing factor. *J Virol* 68:4898-4909.
- Misra V, Walker S, Hayes S and O'Hare P (1995) The bovine herpesvirus alpha gene trans-inducing factor activates transcription by mechanisms different from those of its herpes simplex virus type 1 counterpart VP16. *J Virol* 69:5209-5216.
- Molello JA, Chow TL, Owen N and Jensen R (1966) Placental pathology. V. Placental lesions of cattle experimentally infected with infectious bovine rhinotracheitis virus. *Am J Vet Res* 27:907-915.
- Mossman KL and Smiley JR (2002) Herpes simplex virus ICP0 and ICP34.5 counteract distinct interferon-induced barriers to virus replication. *J Virol Methods* 76:1995-1998.
- Mou F, Wills E and Baines JD (2009) Phosphorylation of the U(L)31 protein of herpes simplex virus 1 by the U(S)3-encoded kinase regulates localization of the nuclear envelopment complex and egress of nucleocapsids. *J Virol* 83:5181-5191.
- Mulder WA, Jacobs L, Priem J, Kok GL, Wagenaar F, Kimman TG and Pol JM (1994) Glycoprotein gE-negative pseudorabies virus has a reduced capability to infect second- and third-order neurons of the olfactory and trigeminal routes in the porcine central nervous system. *J Gen Virol* 75:3095-3106.
- Muylkens B, Meurens F, Schynts F and Thiry E (2003) Les facteurs de virulence des alphaherpèsvirus. *Virologie* 7:401-415.
- Muylkens B, Meurens F, Schynts F, de Fays K, Pourchet A, Thiry J, Vanderplasschen A, Antoine N and Thiry E (2006a) Biological characterization of bovine herpesvirus 1 recombinants possessing the vaccine glycoprotein E negative phenotype. *Vet Microbiol* 113:283-291.
- Muylkens B, Meurens F, Schynts F, Farnir F, Pourchet A, Bardiau M, Gogev S, Thiry J, Cuisenaire A, Vanderplasschen A and Thiry E (2006b) Intraspecific bovine herpesvirus 1 recombinants carrying glycoprotein E deletion as a vaccine marker are virulent in cattle. *J Gen Virol* 87:2149-2154.

- Muylkens B, Thiry J, Kirten P, Schynts F and Thiry E (2007) Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Vet Res* 38:181-209.
- Mweene AS, Okazaki K and Kida H (1996) Detection of viral genome in non-neural tissues of cattle experimentally infected with bovine herpesvirus 1. *Jpn J Vet Res* 44:165-174.
- Nagashunmugam T, Lubinski J, Wang L, Goldstein LT, Weeks BS, Sundaresan P, Kang EH, Dubin G and Friedman HM (1998) In vivo immune evasion mediated by the herpes simplex virus type 1 immunoglobulin G Fc receptor. *J Virol* 72:5351-5359.
- Nakamichi K, Ohara K, Kuroki D and Otsuka H (2000) Bovine herpesvirus 1 glycoprotein G is required for viral growth by cell-to-cell infection. *Virus Res* 68:175-181.
- Nakamichi K, Matsumoto Y and Otsuka H (2002) Bovine herpesvirus 1 glycoprotein G is necessary for maintaining cell-to-cell junctional adherence among infected cells. *Virology* 294:22-30.
- Nandi S, Kumar M, Manohar M and Chauhan RS (2009) Bovine herpes virus infections in cattle. *Anim Health Res Rev* 10:85-98.
- Nedrud JG, Mazanec MB, Liang X, Hague N and Lamm ME (1987) Induction and expression of respiratory IgA immunity against Sendai virus in mice. *Adv Exp Med Biol* 216B:1847-1854.
- Neubauer A, Braun B, Brandmuller C, Kaaden OR and Osterrieder N (1997) Analysis of the contributions of the equine herpesvirus 1 glycoprotein gB homolog to virus entry and direct cell-to-cell spread. *Virology* 227:281-294.
- Nixdorf R, Klupp BG and Mettenleiter TC (2001) Role of the cytoplasmic tails of pseudorabies virus glycoproteins B, E and M in intracellular localization and virion incorporation. *J Gen Virol* 82:215-226.
- Norberg P, Bergstrom T, Rekabdar E, Lindh M and Liljeqvist JA (2004) Phylogenetic analysis of clinical herpes simplex virus type 1 isolates identified three genetic groups and recombinant viruses. *J Virol* 78:10755-10764.
- Odeón AC, Späth EJA, Paloma EJ, Leunda MR, Fernández Sainz IJ, Pérez SE, Kaiser GG, Draghi MG, Cetrá BM and Cano A (2001) Seroprevalencia de la Diarrea Viral Bovina, Herpesvirus Bovino y Virus Sincicial Respiratorio en Argentina. *Revista de Medicina Veterinaria* 82:216-220.
- Okazaki K, Matsuzaki T, Sugahara Y, Okada J, Hasebe M, Iwamura Y, Ohnishi M, Kanno T, Shimizu M, Honda E and et al. (1991) BHV-1 adsorption is mediated by the interaction of glycoprotein gIII with heparinlike moiety on the cell surface. *Virology* 181:666-670.
- Okazaki K, Kanno T, Kiriya S, Honda E and Kono Y (1993) Hemadsorptive activity of transfected COS-7 cells expressing BHV-1 glycoprotein gIII. *Virology* 193:1024-1027.
- Okazaki K, Honda E and Kono Y (1994) Heparin-binding domain of bovid herpesvirus 1 glycoprotein gIII. *Arch Virol* 134:413-419.
- Osterrieder N, Neubauer A, Brandmuller C, Braun B, Kaaden OR and Baines JD (1996) The equine herpesvirus 1 glycoprotein gp21/22a, the herpes simplex virus type 1 gM homolog, is involved in virus penetration and cell-to-cell spread of virions. *J Virol* 70:4110-4115.
- Owen NV, Chow TL and Molello JA (1964) Bovine Fetal Lesions Experimentally Produced by Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus. *Am J Vet Res* 25:1617-1626.
- Pagamjav O, Sakata T, Matsumura T, Yamaguchi T and Fukushi H (2005) Natural recombinant between equine herpesviruses 1 and 4 in the ICP4 gene. *Microbiol Immunol* 49:167-179.
- Parsonson IM and Snowdon WA (1975) The effect of natural and artificial breeding using bulls infected with, or semen contaminated with, infectious bovine rhinotracheitis virus. *Aust Vet J* 51:365-369.
- Pastoret PP, Babiuk LA, Misra V and Griebel P (1980) Reactivation of temperature-sensitive and non-temperature-sensitive infectious bovine rhinotracheitis vaccine virus with dexamethasone. *Infect Immun* 29:483-488.

- Patel JR (2005) Characteristics of live bovine herpesvirus-1 vaccines. *Vet J* 169:404-416.
- Pellet PE and Roizman B (2007) The Family Herpesviridae: A brief introduction, in: *Fields Virology* (Knipe DM, Howley P, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B and Straus SE eds), pp 2479-2499, Lippincott-Williams and Wilkins, New York, USA.
- Perez S, Inman M, Doster A and Jones C (2005) Latency-related gene encoded by bovine herpesvirus 1 promotes virus growth and reactivation from latency in tonsils of infected calves. *J Clin Microbiol* 43:393-401.
- Perez S, Lovato L, Zhou J, Doster A and Jones C (2006) Comparison of inflammatory infiltrates in trigeminal ganglia of cattle infected with wild-type Bovine herpesvirus 1 versus a virus strain containing a mutation in the LR (latency-related) gene. *J Neurovirol* 12:392-397.
- Perez S, Meyer F, Henderson G, Jiang Y, Sherman S, Doster A, Inman M and Jones C (2007) A protein encoded by the bovine herpesvirus 1 open reading frame E gene induces neurite-like morphological changes in mouse neuroblastoma cells and is expressed in trigeminal ganglionic neurons. *J Neurovirol* 13:139-149.
- Perrin B, Perrin M, Moussa A and Coudert M (1996) Evaluation of a commercial gE blocking ELISA test for detection of antibodies to infectious bovine rhinotracheitis virus. *Vet Rec* 138:520.
- Pidone CL, Galosi CM, Echeverria MG, Nosetto EO and Etcheverrigaray ME (1999) Restriction endonuclease analysis of BHV-1 and BHV-5 strains isolated in Argentina. *Zentralbl Veterinarmed B* 46:453-6.
- Polcicova K, Goldsmith K, Rainish BL, Wisner TW and Johnson DC (2005) The extracellular domain of herpes simplex virus gE is indispensable for efficient cell-to-cell spread: evidence for gE/gI receptors. *J Virol* 79:11990-12001.
- Pugh GW, Jr., Hughes DE and Packer RA (1970) Bovine infectious keratoconjunctivitis: interactions of *Moraxella bovis* and infectious bovine rhinotracheitis virus. *Am J Vet Res* 31:653-662.
- Puntel M, Romera SA, Alcon VL, Zamorano PI, Carrillo C, Borca MV and Sadir AM (1999) Obtención de una cepa deleteada de HVB-1 para su utilización en vacunas de última generación, in: *VI Congreso Argentino de Virología*, Buenos Aires, Argentina.
- Puntel M, Romera SA, Palermo L, Zamorano PI, Dominguez M, Blanco Viera J, Chowdhury S, Borca MV and Sadir AM (2001) Development and evaluation of an attenuated vaccine (gE deleted) against Bovine Herpesvirus-1, in: *82nd Conference of research workers in animal diseases*, St. Louis, USA.
- Puntel M (2002a). Desarrollo de una cepa recombinante de BHV-1 deleteada en el gen de gE. Evaluación de la misma como vacuna inactivada y viva, *Tesis Doctoral*, FCEN-UBA.
- Puntel M, Romera SA, Zamorano PI, Dominguez M, Del Medico Zajac MP, Quattrocchi V, Blanco Viera J, Borca MV and Sadir AM (2002b) Respuesta inmune diferencial inducida en bovinos por vacunas marcadoras contra herpesvirus bovino 1, in: *VII Congreso Argentino de Virología*, Buenos Aires, Argentina.
- Rebordosa X, Pinol J, Perez-Pons JA, Lloberas J, Naval J and Querol E (1994) Mapping, cloning and sequencing of a glycoprotein-encoding gene from bovine herpesvirus type 1 homologous to the gE gene from HSV-1. *Gene* 149:203-209.
- Rebordosa X, Pinol J, Perez-Pons JA, Lloberas J, Naval J, Serra-Hartmann X, Espuna E and Querol E (1996) Glycoprotein E of bovine herpesvirus type 1 is involved in virus transmission by direct cell-to-cell spread. *Virus Res* 45:59-68.
- Reed CJ and Muench HA (1938) A simple method of estimating fifty per cent end points. *Am J Hyg* 27:493.
- Reid HW, Nettleton PF, Pow I and Sinclair JA (1986) Experimental infection of red deer (*Cervus elaphus*) and cattle with a herpesvirus isolated from red deer. *Vet Rec* 118:156-158.
- Renegar KB and Small PA, Jr. (1991a) Passive transfer of local immunity to influenza virus infection by IgA antibody. *J Immunol* 146:1972-1978.

- Renegar KB and Small PA, Jr. (1991b) Immunoglobulin A mediation of murine nasal anti-influenza virus immunity. *J Virol* 65:2146-2148.
- Reske A, Pollara G, Krummenacher C, Chain BM and Katz DR (2007) Understanding HSV-1 entry glycoproteins. *Rev Med Virol* 17:205-215.
- Reynolds AE, Wills EG, Roller RJ, Ryckman BJ and Baines JD (2002) Ultrastructural localization of the herpes simplex virus type 1 UL31, UL34, and US3 proteins suggests specific roles in primary envelopment and egress of nucleocapsids. *J Virol* 76:8939-8952.
- Reynolds AE, Liang L and Baines JD (2004) Conformational changes in the nuclear lamina induced by herpes simplex virus type 1 require genes U(L)31 and U(L)34. *J Virol* 78:5564-5575.
- Rijsewijk FA, Kaashoek MJ, Langeveld JP, Meloen R, Judek J, Bienkowska-Szewczyk K, Maris-Veldhuis MA and van Oirschot JT (1999a) Epitopes on glycoprotein C of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) that allow differentiation between BHV-1.1 and BHV-1.2 strains. *J Gen Virol* 80:1477-1483.
- Rijsewijk FA, Verschuren SB, Madic J, Ruuls RC, Renaud P and van Oirschot JT (1999b) Spontaneous BHV1 recombinants in which the gI/gE/US9 region is replaced by a duplication/inversion of the US1.5/US2 region. *Arch Virol* 144:1527-1537.
- Robinson KE, Meers J, Gravel JL, McCarthy FM and Mahony TJ (2008) The essential and non-essential genes of Bovine herpesvirus 1. *J Gen Virol* 89:2851-2863.
- Rock DL and Fraser NW (1983) Detection of HSV-1 genome in central nervous system of latently infected mice. *Nature* 302:523-525.
- Rock DL and Fraser NW (1985) Latent herpes simplex virus type 1 DNA contains two copies of the virion DNA joint region. *J Virol* 55:849-852.
- Rock DL, Nesburn AB, Ghiasi H, Ong J, Lewis TL, Lokensgard JR and Wechsler SL (1987) Detection of latency-related viral RNAs in trigeminal ganglia of rabbits latently infected with herpes simplex virus type 1. *J Virol* 61:3820-3826.
- Rock D, Lokensgard J, Lewis T and Kutish G (1992) Characterization of dexamethasone-induced reactivation of latent bovine herpesvirus 1. *J Virol* 66:2484-2490.
- Rodger SM, Murray J, Underwood C and Buxton D (2007) Microscopical lesions and antigen distribution in bovine fetal tissues and placentae following experimental infection with bovine herpesvirus-1 during pregnancy. *J Comp Pathol* 137:94-101.
- Roizman B and Pellet PE (2001) The family herpesviridae: a brief introduction. in: *Fields Virology* (Knipe DM, Howley P eds), pp 2479-2499, Lippincott-Raven, Philadelphia, USA.
- Rola J, Polak MP and Zmudzinski JF (2009) Prevalence of BHV-1 infection in cattle in Poland, in: *3rd ESVV Veterinary Herpesvirus Symposium*, Friedrich Loeffler Institut. Greifswald, Insel Riems.
- Romera SA, Hilgers LA, Puntel M, Zamorano PI, Alcon VL, Dus Santos MJ, Blanco Viera J, Borca MV and Sadir AM (2000a) Adjuvant effects of sulfolipo-cyclodextrin in a squalane-in-water and water-in-mineral oil emulsions for BHV-1 vaccines in cattle. *Vaccine* 19:132-141.
- Romera SA, Puntel M, Carrillo C, Palermo L, Zamorano PI, Dominguez M, Blanco Viera J, Chowdhury S, Borca MV and Sadir AM (2000b) Development and evaluation of a deleted gE- Bovine Herpesvirus-1 vaccine, in: *2nd International Veterinary Vaccines and Diagnosis Conference*, Oxford, Reino Unido.
- Romera SA, Puntel M, Del Medico Zajac MP, Zamorano PI, Maliandi P, Mattion N and Sadir AM (2002) Evaluation of a new marker BHV-1 vaccine to induce protection against virus infection in cattle when administered subcutaneously, in: *6th Latin American Congress of Immunology*, Habana, Cuba.

- Romera SA, Puntel M, Del Medico Zajac MP, Zamorano PI, Vena MM, Maliandi P and Sadir AM (2004) The recombinant strain BHV-1DgEBgal results protective against BHV-1 infections when used in inactivated, attenuated and combined vaccines in cattle, in: *OIE Labs International Conference on the Control of Animal Infectious Diseases by Vaccination*, Buenos Aires, Argentina.
- Romera SA, Del Medico Zajac MP, Kotsias F, Ladelfa MF, Puntel M, Maliandi P, Vena MM and Sadir AM (2005) Assessment of the immune response and virological protection of calves against bovine herpesvirus type 1 with an attenuated gE-deleted vaccine, in: *Marker Vaccine and Differential Diagnostic Tests in Disease Control and Eradication Meeting*, Ames, USA.
- Roos WH, Radtke K, Kniesmeijer E, Geertsema H, Sodeik B and Wuite GJ (2009) Scaffold expulsion and genome packaging trigger stabilization of herpes simplex virus capsids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:9673-9678.
- Ros C, Riquelme ME, Forslund KO and Belak S (1999) Improved detection of five closely related ruminant alphaherpesviruses by specific amplification of viral genomic sequences. *J Virol Methods* 83:55-65.
- Rouse BT, Wardley RC and Babiuk LA (1976) The role of antibody dependent cytotoxicity in recovery from herpesvirus infections. *Cell Immunol* 22:182-186.
- Sánchez T. G, Benito Z. A and Rivera G. H (2003) Seroprevalencia del virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina en ganado lechero del Valle de Lima. *Rev Inv Vet Perú* 14 54-60.
- Schang LM, Hossain A and Jones C (1996) The latency-related gene of bovine herpesvirus 1 encodes a product which inhibits cell cycle progression. *J Virol* 70:3807-3814.
- Schang LM and Jones C (1997) Analysis of bovine herpesvirus 1 transcripts during a primary infection of trigeminal ganglia of cattle. *J Virol* 71:6786-6795.
- Schröder C and Keil GM (1999) Bovine herpesvirus 1 requires glycoprotein H for infectivity and direct spreading and glycoproteins gH(W450) and gB for glycoprotein D- independent cell-to-cell spread. *J. Gen. Virol.* 80:57-61.
- Schwzyer M, Vlcek C, Menekse O, Fraefel C and Paces V (1993) Promoter, spliced leader, and coding sequence for BICP4, the largest of the immediate-early proteins of bovine herpesvirus 1. *Virology* 197:349-357.
- Schwzyer M and Ackermann M (1996) Molecular virology of ruminant herpesviruses. *Vet Microbiol* 53:17-29.
- Schynts F, Baranowski E, Lemaire M and Thiry E (1999) A specific PCR to differentiate between gE negative vaccine and wildtype bovine herpesvirus type 1 strains. *Vet Microbiol* 66:187-195.
- Schynts F, Meurens F, Muylkens B, Epstein A, McVoy M and E. T (2002) Réplication, clivage-encapsidation et recombinaison de l'ADN des herpesvirus. *Virologie* 6:343-352.
- Schynts F, Meurens F, Detry B, Vanderplasschen A and Thiry E (2003a) Rise and survival of bovine herpesvirus 1 recombinants after primary infection and reactivation from latency. *J Virol* 77:12535-12542.
- Schynts F, McVoy MA, Meurens F, Detry B, Epstein AL and Thiry E (2003b) The structures of bovine herpesvirus 1 virion and concatemeric DNA: implications for cleavage and packaging of herpesvirus genomes. *Virology* 314:326-335.
- Scicluna M, Caprioli A, Manna G, Saralli G, Bruni G, Barone A, Letizia E, Condoleo RU and Autorino G (2009) Should the domestic buffalo (*Bubalus bubalis*) be considered in the epidemiology of Bovine Herpes Virus 1 (BoHV-1) infection?, in: *3rd ESVV Veterinary Herpesvirus Symposium*, Friedrich Loeffler Institut. Greifswald, Insel Riems.

- Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare (2000) Report on Bovine Herpesvirus 1 (BHV1) marker vaccines and the accompanying diagnostic tests, European Commission.
- Seal BS, St Jeor SC and Taylor RE (1985) Restriction endonuclease analysis of bovine herpesvirus 1 DNA and nucleic acid homology between isolates. *J Gen Virol* 66:2787-2792.
- Shaw AM, Braun L, Frew T, Hurley DJ, Rowland RR and Chase CC (2000) A role for bovine herpesvirus 1 (BHV-1) glycoprotein E (gE) tyrosine phosphorylation in replication of BHV-1 wild-type virus but not BHV-1 gE deletion mutant virus. *Virology* 268:159-166.
- Sheffy BE and Davies DH (1972) Reactivation of a bovine herpesvirus after corticosteroid treatment. *Proc Soc Exp Biol Med* 140:974-976.
- Sheffy B and Rodman S (1973) Activation of latent infectious bovine rhinotracheitis infection. *J Am Vet Med Assoc* 163:850-851.
- Shen W and Jones C (2008) Open reading frame 2, encoded by the latency-related gene of bovine herpesvirus 1, has antiapoptotic activity in transiently transfected neuroblastoma cells. *J Virol* 82:10940-10945.
- Six A, Banks M, Engels M, Bascunana CR and Ackermann M (2001) Latency and reactivation of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) in goats and of caprine herpesvirus 1 (CaphV-1) in calves. *Arch Virol* 146:1325-1335.
- Smith VW, Coakley W and Maker D (1980) Transmission of a genital isolate of bovine herpesvirus 1 to calves by the respiratory route. *Aust Vet J* 56:302-304.
- Snyder A, Polcicova K and Johnson DC (2008) Herpes simplex virus gE/gI and US9 proteins promote transport of both capsids and virion glycoproteins in neuronal axons. *J Virol* 82:10613-10624.
- Sodeik B, Ebersold MW and Helenius A (1997) Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J Cell Biol* 136:1007-1021.
- Solis-Calderon JJ, Segura-Correa VM, Segura-Correa JC and Alvarado-Islas A (2003) Seroprevalence of and risk factors for infectious bovine rhinotracheitis in beef cattle herds of Yucatan, Mexico. *Prev. Vet. Med.* 57:199-208.
- Spear PG and Longnecker R (2003) Herpesvirus entry: an update. *J Virol* 77:10179-10185.
- Spear PG, Manoj S, Yoon M, Jogger CR, Zago A and Myscofski D (2006) Different receptors binding to distinct interfaces on herpes simplex virus gD can trigger events leading to cell fusion and viral entry. *Virology* 344:17-24.
- Spilki FR, Esteves PA, Franco AC, Lima M, Holz CL, Batista HB, Driemeier D, Flores EF, Weiblen R and Roehe PM (2002) Neurovirulência e neuroinvasividade de herpesvírus bovinos tipos 1 e 5 em coelhos. *Pesq. Vet. Bras.* 22:58-63.
- Spilki FR, Franco AC, Rijsewijk FAM, Weiblen R, Furtado Flores E and Roehe PM (2004) In Vitro characterization of gE negative Bovine Herpesvirus types 1.1 (BHV-1.1) and 1.2A (BHV-1.2A). *Brazilian Journal of Microbiology* 35:264-268.
- Spilki FR, Esteves PA, da Silva AD, Franco AC, Rijsewijk FA and Roehe PM (2005) A monoclonal antibody-based ELISA allows discrimination between responses induced by bovine herpesvirus subtypes 1 (BoHV-1.1) and 2 (BoHV-1.2). *J Virol Methods* 129:191-193.
- Spyropoulos DD, Roberts BE, Panicali DL and Cohen LK (1988) Delineation of the viral products of recombination in vaccinia virus-infected cells. *J Virol* 62:1046-1054.
- Strube W, Auer S, Block W, Heinen E, Kretzdorn D, Rodenbach C and Schmeer N (1996) A gE deleted infectious bovine rhinotracheitis marker vaccine for use in improved bovine herpesvirus 1 control programs. *Vet Microbiol* 53:181-189.
- Theil D, Paripovic I, Derfuss T, Herberger S, Strupp M, Arbusow V and Brandt T (2003) Dually infected (HSV-1/VZV) single neurons in human trigeminal ganglia. *Ann Neurol* 54:678-682.

- Thiry E, Saliki J, Schwers A and Pastoret PP (1985a) Parturition as a stimulus of IBR virus reactivation. *Vet Rec* 116:599-600.
- Thiry E, Brochier B, Saliki J, Pirak M and Pastoret PP (1985b) Excretion and reexcretion of thermosensitive and wild-type strains of infectious bovine rhinotracheitis virus after co-infection or two successive infections. *Vet Microbiol* 10:371-380.
- Thiry E, Saliki J, Bublot M and Pastoret PP (1987) Reactivation of infectious bovine rhinotracheitis virus by transport. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 10:59-63.
- Thiry E, Meurens F, Muylkens B, McVoy M, Gogev S, Thiry J, Vanderplasschen A, Epstein A, Keil G and Schynts F (2005) Recombination in alphaherpesviruses. *Rev Med Virol* 15:89-103.
- Thiry E, Muylkens B, Meurens F, Gogev S, Thiry J, Vanderplasschen A and Schynts F (2006) Recombination in the alphaherpesvirus bovine herpesvirus 1. *Vet Microbiol* 113:171-177.
- Thiry J, Keuser V, Muylkens B, Meurens F, Gogev S, Vanderplasschen A and Thiry E (2006) Ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1. *Vet Res Commun* 37:169-190.
- Thiry J, Muylkens B and Thiry E (2008) The epidemiological role of the other ruminant species, in: *IBR Workshop - World Buiatrics Congress*, Budapest, Hungary.
- Tikoo SK, Campos M and Babiuk LA (1995) Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): biology, pathogenesis, and control. *Adv Virus Res* 45:191-223.
- Tirabassi RS and Enquist LW (1998) Role of envelope protein gE endocytosis in the pseudorabies virus life cycle. *J Virol* 72:4571-4579.
- Tirabassi RS and Enquist LW (2000) Role of the pseudorabies virus gI cytoplasmic domain in neuroinvasion, virulence, and posttranslational N-linked glycosylation. *J Virol* 74:3505-3516.
- Tolari F, White H and Nixon P (1990) Isolation and reactivation of bovid herpesvirus 1 in goats. *Microbiologica* 13:67-71.
- Trapp S, Osterrieder N, Keil GM and Beer M (2003) Mutagenesis of a bovine herpesvirus type 1 genome cloned as an infectious bacterial artificial chromosome: analysis of glycoprotein E and G double deletion mutants. *J. Gen. Virol.* 84:301-306
- Tsujimura K, Yamanaka T, Kondo T, Fukushi H and Matsumura T (2006) Pathogenicity and immunogenicity of equine herpesvirus type 1 mutants defective in either gI or gE gene in murine and hamster models. *J Vet Med Sci* 68:1029-1038.
- Turner A, Bruun B, Minson T and Browne H (1998) Glycoproteins gB, gD, and gHgL of herpes simplex virus type 1 are necessary and sufficient to mediate membrane fusion in a Cos cell transfection system. *J Virol* 72:873-875.
- Tyborowska J, Bienkowska-Szewczyk K, Rychlowski M, Van Oirschot JT and Rijsewijk FA (2000) The extracellular part of glycoprotein E of bovine herpesvirus 1 is sufficient for complex formation with glycoprotein I but not for cell-to-cell spread. *Arch Virol* 145:333-351.
- Valera AR, Pidone CL, Massone AR, Quiroga MA, Riganti JG, Corva SG and Galosi CM (2008) A simple method of infecting rabbits with Bovine herpesvirus 1 and 5. *J Virol Methods* 150:77-9.
- Van de Walle GR, Favoreel HW, Nauwynck HJ and Pensaert MB (2003) Antibody-induced internalization of viral glycoproteins and gE-gI Fc receptor activity protect pseudorabies virus-infected monocytes from efficient complement-mediated lysis. *J Gen Virol* 84:939-948.
- Van de Walle GR, Kaufer BB, Chbab N and Osterrieder N (2009) Analysis of the herpesvirus chemokine-binding glycoprotein G residues essential for chemokine binding and biological activity, in: *3rd ESVV Veterinary Herpesvirus Symposium*, Friedrich Loeffler Institut. Greifswald, Insel Riems.

- van Drunen Littel-van den Hurk S, Garzon S, van den Hurk JV, Babiuk LA and Tijssen P (1995) The role of the major tegument protein VP8 of bovine herpesvirus-1 in infection and immunity. *Virology* 206:413-425.
- van Drunen Littel-van den Hurk S (2006) Rationale and perspectives on the success of vaccination against bovine herpesvirus-1. *Vet Microbiol* 113:275-282.
- van Drunen Littel-van den Hurk S, Tikoo SK, van den Hurk JV, Babiuk LA and Van Donkersgoed J (1997) Protective immunity in cattle following vaccination with conventional and marker bovine herpesvirus-1 (BHV1) vaccines. *Vaccine* 15:36-44.
- van Drunen Littel-van den Hurk S, Gifford GA and Babiuk LA (1990) Epitope specificity of the protective immune response induced by individual bovine herpesvirus-1 glycoproteins. *Vaccine* 8:358-368.
- van Engelenburg FA, Kaashoek MJ, Rijsewijk FA, van den Burg L, Moerman A, Gielkens AL and van Oirschot JT (1994) A glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus 1 is avirulent in calves. *J Gen Virol* 75 (Pt 9):2311-2318.
- van Engelenburg FA, Kaashoek MJ, van Oirschot JT and Rijsewijk FA (1995a) A glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus 1 infects the same limited number of tissues in calves as wild-type virus, but for a shorter period. *J Gen Virol* 76 (Pt 9):2387-2392.
- van Engelenburg FA, Van Schie FW, Rijsewijk FA and Van Oirschot JT (1995b) Excretion of bovine herpesvirus 1 in semen is detected much longer by PCR than by virus isolation. *J Clin Microbiol* 33:308-312.
- van Oirschot JT (1995) Bovine herpesvirus 1 in semen of bulls and the risk of transmission: a brief review. *Vet Q* 17:29-33.
- van Oirschot JT, Kaashoek MJ, Maris-Veldhuis MA, Weerdmeester K and Rijsewijk FA (1997) An enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against glycoprotein gE of bovine herpesvirus 1 allows differentiation between infected and vaccinated cattle. *J Virol Methods* 67:23-34.
- van Oirschot JT (1999) Diva vaccines that reduce virus transmission. *J Biotechnol* 73:195-205.
- van Schaik G, Shoukri M, Martin SW, Schukken YH, Nielen M, Hage JJ and Dijkhuizen AA (1999) Modeling the effect of an outbreak of bovine herpesvirus type 1 on herd-level milk production of Dutch dairy farms. *J Dairy Sci* 82:944-952.
- van Schaik G, Schukken YH, Nielen M, Dijkhuizen AA, Barkema HW and G. B (2002) Probability of and risk factors for introduction of infectious diseases into Dutch SPF dairy farms: a cohort study. *Prev. Vet. Med.* 54:279-289.
- van Schaik G, Schukken YH, Nielen M, Dijkhuizen AA and Benedictus G (2003) Risk factors for introduction of BHV1 into BHV1-free Dutch dairy farms: a case-control study. *Vet. Q.* 23:71-76.
- Van Wuyckhuise L, Bosch J, Franken P, Hage J, Verhoeff J, Zimmer G, Van Wuyckhuise L and Trenti F (1994) The prevalence of infectious bovine rhinotracheitis (IBR) in the Netherlands, in: *XVIII World Buiatrics Congress*, Bologna, Italy.
- Varady E, Tuboly T and Derbyshire JB (1994) Restriction endonuclease analysis of a porcine isolate of bovine herpesvirus type 1. *Can J Vet Res* 58:65-66.
- Verweij MC, Koppers-Lalic D, Lipinska AD, Quinten E, Koch J, Loch S, Rijsewijk FA, Bienkowska-Szewczyk K, Osterrieder N, Mettenleiter TC, Knitter MR, Tampe R, Rensing ME and Wiertz EJ (2009) The interplay between the varicellovirus-encoded TAP inhibitor UL49.5 and its target, in: *3rd ESVV Veterinary Herpesvirus Symposium*, Friedrich Loeffler Institut. Greifswald, Insel Riems.
- Vogel FS, Caron L, Flores EF, Weiblen R, Winkelmann ER, Mayer SV and Bastos RG (2003) Distribution of bovine herpesvirus type 5 DNA in the central nervous systems of latently, experimentally infected calves. *J Clin Microbiol* 41:4512-4520.

- Vonk Noordegraaf A, Labrovic A, Frankena K, Pfeiffer DU and M. N (2004) Simulated hazards of loosing infection-free status in a Dutch BHV1 model. *Prev. Vet. Med.* 62:51-58.
- Vossen MT, Westerhout EM, Soderberg-Naucler C and Wiertz EJ (2002) Viral immune evasion: a masterpiece of evolution. *Immunogenetics* 54:527-542.
- Wafula JS, Mushi EZ and Wamwayi H (1985) Reaction of goats to infection with infectious bovine rhinotracheitis virus. *Res Vet Sci* 39:84-86.
- Warren LM, Babiuk LA and Campos M (1996) Effects of BHV-1 on PMN adhesion to bovine lung endothelial cells. *Vet Immunol Immunopathol* 55:73-82.
- Whetstone CA, y Miller, J. M. (1989) Two different strains of an alphaherpesvirus can establish latency in the same tissue of the host animal: evidence from bovine herpesvirus 1. *Arch Virol* 107:27-34.
- Whetstone CA, Miller JM, Seal BS, Bello LJ and Lawrence WC (1992) Latency and reactivation of a thymidine kinase-negative bovine herpesvirus 1 deletion mutant. *Arch Virol* 122:207-214.
- Whitbeck JC, Knapp AC, Enquist LW, Lawrence WC and Bello LJ (1996) Synthesis, processing, and oligomerization of bovine herpesvirus 1 gE and gI membrane proteins. *J Virol* 70:7878-7884.
- Wild P, Schraner EM, Peter J, Loepfe E and Engels M (1998) Novel entry pathway of bovine herpesvirus 1 and 5. *J Virol* 72:9561-9566.
- Wild P, Engels M, Senn C, Tobler K, Ziegler U, Schraner EM, Loepfe E, Ackermann M, Mueller M and Walther P (2005) Impairment of nuclear pores in bovine herpesvirus 1-infected MDBK cells. *J Virol* 79:1071-1083.
- Winkler MT, Doster A and Jones C (1999) Bovine herpesvirus 1 can infect CD4(+) T lymphocytes and induce programmed cell death during acute infection of cattle. *J Virol* 73:8657-8668.
- Winkler MT, Doster A and Jones C (2000) Persistence and reactivation of bovine herpesvirus 1 in the tonsils of latently infected calves. *J Virol* 74:5337-5346.
- Winkler MT, Doster A, Sur JH and Jones C (2002) Analysis of bovine trigeminal ganglia following infection with bovine herpesvirus 1. *Vet Microbiol* 86:139-155.
- Wirth UV, Gunkel K, Engels M and Schwyzer M (1989) Spatial and temporal distribution of bovine herpesvirus 1 transcripts. *J Virol* 63:4882-4889.
- Wirth UV, Vogt B and Schwyzer M (1991) The three major immediate-early transcripts of bovine herpesvirus 1 arise from two divergent and spliced transcription units. *J Virol* 65:195-205.
- Wisner T, Brunetti C, Dingwell K and Johnson DC (2000) The extracellular domain of herpes simplex virus gE is sufficient for accumulation at cell junctions but not for cell-to-cell spread. *J Virol.* 74:2278-87.
- Wisner TW and Johnson DC (2004) Redistribution of cellular and herpes simplex virus proteins from the trans-golgi network to cell junctions without enveloped capsids. *J Virol* 78:11519-11535.
- Wisner TW, Wright CC, Kato A, Kawaguchi Y, Mou F, Baines JD, Roller RJ and Johnson DC (2009) Herpesvirus gB-induced fusion between the virion envelope and outer nuclear membrane during virus egress is regulated by the viral US3 kinase. *J Virol* 83:3115-3126.
- Workman A, Perez S, Doster A and Jones C (2009) Dexamethasone treatment of calves latently infected with bovine herpesvirus 1 leads to activation of the bICP0 early promoter, in part by the cellular transcription factor C/EBP-alpha. *J Virol* 83:8800-8809.
- Wylar R, Engels M and Schwyzer M (1989) Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis BHV-1, in: *Herpesvirus diseases of cattle, horses and pigs. Developments in veterinary virology* (Wytzman G and Becker I eds), pp 1±72, Kluwer, Boston, USA.
- Yates WD (1982) A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle. *Can J Comp Med* 46:225-263.

- Ye GJ, Vaughan KT, Vallee RB and Roizman B (2000) The herpes simplex virus 1 U(L)34 protein interacts with a cytoplasmic dynein intermediate chain and targets nuclear membrane. *J Virol Methods* 74:1355-1363.
- Yoshitake N, Xuan X and Otsuka H (1997) Identification and characterization of bovine herpesvirus-1 glycoproteins E and I. *J Gen Virol* 78:1399-1403.
- Zacarías ER, Benito AZ and H.G. R (2002) Seroprevalencia del virus de la rinotraqueitis infecciosa en bovinos criollos de Paranicochas, Ayacucho. *Rev Inv Vet Perú* 13:61-65.
- Zhang Y, Zhou J and Jones C (2005) Identification of functional domains within the bICP0 protein encoded by bovine herpesvirus 1. *J Gen Virol* 86:879-886.
- Zheng C, Brownlie R, Babiuk LA and van Drunen Littel-van den Hurk S (2004) Characterization of nuclear localization and export signals of the major tegument protein VP8 of bovine herpesvirus-1. *Virology* 324:327-339.
- Zhu X and Letchworth GJ, 3rd (1996) Mucosal and systemic immunity to bovine herpesvirus-1 glycoprotein D confer resistance to viral replication and latency in cattle. *Vaccine* 14:61-69.
- Zsak L, Zuckermann F, Sugg N and Ben-Porat T (1992) Glycoprotein gI of pseudorabies virus promotes cell fusion and virus spread via direct cell-to-cell transmission. *J Virol* 66:2316-2325.