

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES



Facultad de Farmacia y Bioquímica

Instituto de Virología e Instituto de Biotecnología, Centro de
Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas,
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

“Estudio epidemiológico del virus respiratorio sincicial bovino y desarrollo de un candidato vacunal basado en el vector viral MVA”

Lic. Alejandra Ferella

Directora: Dra. Marina Mozgovoij

Directora Adjunta: Dra. María Paula Del Médico Zajac

Consejera de estudios: Dra. Viviana Mbayed

Tesis presentada por la Lic. Alejandra Ferella para optar al título de Doctora de la
Universidad de Buenos Aires.

V°B°

Lic. Alejandra Ferella

V°B°

Dra. Marina Mozgovoj

V°B°

Dra. M. Paula Del Médico Zajac

V°B°

Dra. Viviana Mbayed

**Consejo Nacional de Investigaciones
Científicas y Técnicas (CONICET)**



Instituto de Virología.

Instituto de Biotecnología.



CICVYA

CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN CIENCIAS VETERINARIAS Y AGRONÓMICAS

**Centro de Investigación de Ciencias Veterinarias Agronómicas,
INTA Castelar.**

*“Después de escalar una montaña muy alta,
descubrimos que hay muchas otras montañas por escalar.”*

Nelson Mandela.

A mi mamá y a mi papá.

A Lu.

A mi nonna.

Parte de los resultados de esta tesis fueron presentados en:

- World Buiatrics Congress 2016. Dublin, Irlanda.

Ferella, A; Margineda, C; Sammarruco, A; Romera, A; Maidana, S; Perez Aguirreburualde, S; Zielinski, G; Dus Santos, MJ; Mozgovej, M. “Bovine respiratory syncytial virus seroprevalence study in bovine and non-bovine species of agricultural importance in Argentina”.

- XI Congreso Brasileiro e XVII Congreso Latinoamericano de Buiatría. São Paulo, Brasil, 2015.

Ferella, A; Perez Aguirreburualde, MS; Sammarruco, A; González, DD; Dus Santos, MJ; Mozgovej, M. “Estudio de la dinámica de anticuerpos neutralizantes para el virus respiratorio sincicial bovino en un tambo de la provincia de Santa Fe.”

- XI Congreso Argentino de Virología, II Congreso Latinoamericano de Virología, IV Simposio de Virología Clínica, II Simposio de Virología Veterinaria, Buenos Aires, Argentina, 2015.

Ferella, A; Dus Santos, MJ; Mozgovej, M; Calamante, G; Del Médico Zajac, MP. “Obtención y caracterización molecular de virus vaccinia ankara modificado que expresan la proteína F del virus respiratorio sincicial bovino.”

- II Congreso de la Sociedad Iberoamericana de Epidemiología y Medicina Preventiva. Buenos Aires, Argentina, 2014.

Ferella, A; Margineda, C.; Sammarruco, A.; Pérez Aguirreburualde, M.S.; Gonzalez, D.; Aznar, N.; Dus Santos, M.J.; Piscitelli, H.; Zielinski, G.; Mozgovej, M. “Estudio de seroprevalencia y factores de riesgo para el virus respiratorio sincicial bovino en feedlots de las provincias de Santa Fé y Córdoba.”

- XXVIII World Buiatrics Congress. Cairns, Australia, 2014.

Ferella, A; Margineda, C; Sammarruco, A; Gonzalez, D; Toledo, G; Zielinski, G; Pecora, A; Dus Santos, MJ; Mozgovej M. “Passive transfer of neutralizing antibodies against bovine respiratory syncytial virus after vaccination of pregnant cows with inactivated bRSV.”

- XXXIII Reunión Científica Anual- Sociedad Argentina de Virología. Buenos Aires, 2013.

Ferella A, Del Médico Zajac MP, Dus Santos MJ, Mozgovej M, Calamante G. “Construcción de vectores de transferencia para la obtención de poxvirus recombinantes que expresan antígenos del virus respiratorio sincicial bovino”.

- VI Jornadas y Reunión Anual de la Asociación Argentina de Inmunología Veterinaria. Santa Fe, 2013.

Ferella A, Margineda C, Sammarruco A, Aznar N, Gonzalez D, Dus Santos MJ, Toledo G, Zielinski G, Mozgovej M. "Seroprevalencia del virus respiratorio sincicial bovino en rodeos de cría, tambos y engordes a corral de argentina. Estudio preliminar".

- XXXII Reunión Científica Anual, Sociedad Argentina de virología. Buenos Aires, 2012.

Ferella, A; Margineda, C; Sammarruco, A; Aznar, N; Gonzalez, D; Dus Santos, MJ; Piscitelli, H; Zielinski, G; Mozgovej, M. "Seroprevalencia del virus respiratorio sincicial bovino un bovinos de engorde a corral".

Resumen

El virus respiratorio sincicial bovino (BRSV) es la principal causa de infección del tracto respiratorio bajo causando bronquiolitis y neumonía en terneros de temprana edad. Este virus afecta también a otras especies animales. Teniendo en cuenta el impacto sanitario y económico que genera esta enfermedad a nivel productivo en bovinos y dado que Argentina es uno de los principales países productores de carne y leche, es importante disponer de estudios epidemiológicos actualizados del BRSV en animales susceptibles, con el objetivo final de diseñar estrategias de prevención y control de la enfermedad.

Los resultados obtenidos en este trabajo evidenciaron una elevada seroprevalencia con porcentajes mayores al 70 % en todos los sistemas productivos evaluados. Asimismo, se estudió la circulación del BRSV en bovinos de tambo y establecimientos de engorde a corral, mediante seroconversión. Los resultados mostraron que la infección por BRSV está ampliamente distribuida en la población bovina, sugiriendo que, probablemente, el papel del BRSV en la presentación de la enfermedad respiratoria en nuestro país, particularmente en la región estudiada, haya sido subestimado. A su vez, fue posible detectar la presencia de genoma viral en hisopados nasales de animales de engordes a corral que presentaron seroconversión para este agente viral y en pulmones de animales con lesiones compatibles con enfermedad respiratoria, reforzando la evidencia de circulación de este agente viral.

Por otra parte, se detectó la presencia de AN contra BRSV en búfalos, camélidos, caprinos y ovinos de Argentina, evidenciando la circulación del virus en esas especies y abriendo el interrogante de su importancia como reservorios del BRSV.

El control de la infección por el BRSV puede lograrse, por un lado, mejorando las medidas de bioseguridad y, por el otro, mediante la vacunación. Si bien existen numerosas vacunas disponibles en el mercado destinadas a la prevención de la infección por BRSV, aun, no se ha logrado controlar su circulación en animales de producción. En este sentido, el diseño de vacunas más eficientes es una de las necesidades que presenta el sector productivo.

En este trabajo de tesis se obtuvo un candidato vacunal basado en el virus Vaccinia Ankara modificado (MVA) que porta en la secuencia codificante del gen de la proteína F de BRSV (MVA-F). Esta proteína está altamente conservada entre las distintas cepas de BRSV y es la principal inductora de anticuerpos neutralizantes.

La capacidad inmunogénica de MVA-F se confirmó en el modelo murino, empleando esquemas de vacunación *prime-boost* homólogos o heterólogos. Los resultados mostraron que tanto la vacunación homóloga (dos dosis de MVA-F) como la heteróloga (combinando el *prime* con MVA-F y el *boost* con una vacuna a subunidad que contiene

la proteína F) indujeron tanto la producción de anticuerpos neutralizantes de BRSV como secreción específica de IFN- γ , evidenciando una respuesta balanceada Th1-Th2.

Los aportes de este trabajo de tesis permitieron actualizar los estudios epidemiológicos de BRSV en Argentina y evidenciar circulación viral. En base a estos resultados proponemos mejoras estratégicas en los cronogramas de vacunación actualmente utilizados contra BRSV, teniendo en cuenta los puntos críticos de infección dentro de los establecimientos y los momentos específicos de manejo según cada sistema productivo.

Además, se obtuvo un nuevo inmunógeno recombinante capaz de inducir una respuesta inmunitaria (humoral y celular) específica contra BRSV en ratones, cuya eficacia deberá ser evaluada en el hospedador natural.

Índice

1. Introducción	1
1.1 Complejo respiratorio bovino (CRB)	1
1.2 Virus Respiratorio Sincicial Bovino (BRSV)	1
1.2.1 Signos clínicos de la enfermedad	5
1.2.2 Patogénesis y respuesta inmunitaria del BRSV	5
1.2.3 Epidemiología	7
1.2.4 Estrategias de prevención y control del BRSV	11
1.3 Vacunas	11
1.3.1 Vacunas para BRSV	11
1.3.2 Vacunas basadas en poxvirus recombinantes	16
1.3.2.1 El virus vaccinia Ankara modificado y su uso como vector de expresión	17
1.3.2.2 Vectores virales basados en poxvirus como vacunas contra BRSV	22
Hipótesis	24
Objetivos generales	24
Objetivos específicos	24
CAPÍTULO 1: Estudio epidemiológico del BRSV en Argentina	25
2.1 Materiales y Métodos	25
2.1.1 Células y virus	25
2.1.1.1 Células	25
2.1.1.2 Virus	25
2.1.2 Titulación viral	25
2.1.3 Seroneutralización viral (SN)	26
2.1.4 Aislamiento viral	27
2.1.4.1 Obtención y procesamiento de muestras	27
2.1.4.2 Muestras de pulmón	27
2.1.4.3 Hisopados nasales	27
2.1.4.4 Aislamiento en cultivo de células	27
2.1.5 Detección del genoma viral del BRSV mediante PCR	28
2.1.5.1 Extracción de ARN	28
2.1.5.2 Oligonucleótidos iniciadores	28
2.1.5.3 Síntesis de ADNc	29
2.1.5.4 <i>Nested</i> PCR	29
2.1.5.5 Electroforesis en gel de agarosa	30
2.1.6 Estudios epidemiológicos	30
2.1.6.1 Estudio de prevalencia	30
2.1.6.2 Estudio de circulación viral	32
2.1.6.3 Análisis estadísticos de los datos	32
2.2 Resultados	34
2.2.1 Estudio epidemiológico de BRSV en bovinos de Argentina	34

2.2.1.1 Obtención de las muestras	34
2.2.1.2 Seroprevalencia de BRSV en bovinos de rodeos de cría, tambos y engordes a corral.....	34
2.2.1.3 Seroprevalencia en rodeos de cría	35
2.2.1.4 Seroprevalencia en tambos	35
2.2.1.5 Seroprevalencia en engordes a corral.....	35
2.2.2 Estudio de prevalencia en otras especies animales de interés agropecuario	38
2.2.3 Estudios longitudinales para evaluar la dinámica de infección y la circulación de BRSV	39
2.2.3.1 Estudio de dinámica de la infección en un tambo	39
2.2.3.2 Estudio longitudinal de circulación viral de BRSV en establecimientos de engordes a corral.....	42
CAPÍTULO 2. Desarrollo de un candidato vacunal basado en MVA.	46
3.1 Materiales y Métodos	46
3.1.1 Células y virus.	46
3.1.1.1 Células.....	46
3.1.1.2 Virus.....	46
3.1.2 Animales.....	47
3.1.3 Obtención del vector de transferencia para MVA.....	47
3.1.3.2 Clonado del producto de amplificación del gen codificante de la proteína F en el plásmido pGEM-T <i>Easy</i>	47
3.1.3.3 Clonado del gen de la proteína F de BRSV en el vector de transferencia para MVA.....	50
3.1.4 Técnicas para la obtención de virus MVA recombinantes	51
3.1.4.1 Preparación de <i>stock</i> viral de MVA recombinantes.....	52
3.1.4.2 Titulación de los <i>stocks</i> de MVA recombinantes	52
3.1.4.3 Obtención de los virus MVA-F	53
3.1.4.4 Purificación de los <i>stocks</i> virales MVA recombinantes	54
3.1.5. Caracterización molecular de los virus MVA-F recombinantes.....	55
3.1.5.1 Análisis de los MVA recombinantes mediante PCR.....	55
3.1.5.2 Evaluación de la transcripción del gen <i>F</i> mediante RT-PCR.....	57
3.1.6 Evaluación de la respuesta inmunitaria inducida por la vacuna recombinante MVA-F en un modelo animal de ratón.	59
3.1.6.1 Evaluación de la respuesta inmunitaria inducida por MVA-F en ratones utilizando una vía de inmunización de mucosas (Experimento n°1).....	59
3.1.6.2 Evaluación de la respuesta inmunitaria en ratones utilizando una vía de inmunización sistémica.	60
3.1.7 Obtención de la vacuna génica pTT5-F.....	62
3.1.8 Infección experimental de ratones con BRSV	64
3.1.9 Evaluación de anticuerpos contra el BRSV mediante ELISA	64
3.1.9.1 ELISA de isotipos basado en BRSV purificado	64

3.1.9.2 ELISA comercial <i>INgezim BRSV Compac</i>	65
3.1.9.3 Análisis estadístico de los resultados de ELISA.....	66
3.1.10. Evaluación de la respuesta inmunitaria celular	66
3.1.10.1 Obtención de esplenocitos de ratón para cultivo <i>in vitro</i>	66
3.1.10.2 Cuantificación de IFN- γ , IL-12 e IL-4 en sobrenadantes de esplenocitos estimulados <i>in vitro</i>	66
3.2 Resultados.....	68
3.2.1 Obtención del vector de transferencia VT-MTK-F	68
3.2.2 Obtención y caracterización de virus MVA-F	70
3.2.3 Evaluación de la inmunogenicidad de MVA-F en ratones por vía de mucosas y sistémica.	73
3.2.3.1 Inmunogenicidad de los MVA-F en ratones inoculados por vía intranasal.	73
3.2.3.2 Inmunogenicidad de los MVA-F en ratones inoculados por vía sistémica.....	75
Discusión	81
Conclusiones generales	105
Referencias bibliográficas	106
ANEXO: Infección experimental con BRSV en ratones	140

Abreviaciones

°C	Grados Celsius
µg	microgramos
µl	microlitros
µM	micromolar
ABTS	[2.2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate)]
Ab	Anticuerpo/s
Abs	Absorbancia
Ad	Adenovirus
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
Ag	Antígeno/s
AN	Anticuerpos neutralizantes
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico doble cadena
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
BAL	Lavados broncoalveolares
BHK	Del inglés <i>Baby hámster kidney</i> .
BRSV	Del inglés <i>Bovine respiratory syncytial virus</i> . Virus respiratorio sincicial bovino.
BVDV	del inglés <i>Bovine viral diarrhea virus</i> . Virus de la diarrea viral bovina.
CD	del inglés <i>Cluster of differentiation</i> . Cúmulo de diferenciación
CNPV	Virus Canarypox
CRB	Complejo respiratorio bovino
DEPC	Dietilpirocarbonato
DICT	Dosis infecciosas en cultivo de tejidos
dNTPs	del inglés deoxyribonucleotides triphosphate" Desoxirribonucleótidos trifosfato
DO	Densidad óptica
dpd	Días post desafío
dpi	Días post inmunización
DTT	Ditiotreitol
ECP	Efecto citopático
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	del inglés " <i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> " Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
ERB	Enfermedad respiratoria bovina
FEP	Fibroblastos de embrión de pollo
Fig	Figura
Ft	Proteína F de BRSV truncada recombinante (sin sitio de anclaje a membrana ni péptido señal obtenida de sobrenadante de células de insecto.
GUS	enzima marcadora beta-glucuronidasa
h	Hora/s
HRP	Del inglés " <i>horseradish peroxidase</i> ". Peroxidasa del rábano picante
HRSV	Del inglés " <i>Human respiratory syncytial virus</i> ". Virus respiratorio sincicial humano.
H&E	tinción de hematoxilina y eosina.
IFN	interferón
Ig/Igs	Inmunoglobulina/s
IC	Intervalo de confianza

IL	interleuquina
IPTG	Isopropil-D-tiogalactopiranosido
Kpb	Kilo pares de bases
KDa	Kilo Dalton
LB	del inglés "Luria-Bertani broth"
MDBK	línea celular de riñón bovino Mardin Darby
MEM-D	Medio Mínimo de Dulbecco
MEM-E	Medio Mínimo esencial de Eagle
mg	miligramos
Min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
MO	Microscopio óptico
M.O.I	Multiplicidad de infección
MVA	Virus vaccinia Ankara modificado
MVA-bgal	MVA que carece del gen $\Delta 008$ y porta el gen codificante de β -galactosidasa
MVA-F	MVA que carece del gen $\Delta 008$ y que porta el gen F de BRSV
MyM	Materiales y Métodos
ng	nanogramos
nm	nanometros
Obj.	Aumento total del microscopio
P6	Placa de cultivo de 6 pocillos
P60	Placa de cultivo de 60 cm ²
P96	Placa de cultivo de 96 pocillos
PAS	tinción de ácido peryodico schiff
pb	Pares de bases
PBS	del inglés "Phosphate buffered solution" Solución tampon fosfatada
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PEG	Polietilenglicol
pH	Potencial hidrógeno
pi	Post inmunización/inoculación
PR	Razón de prevalencia
pTT5-F	Plasmido pTT5 que codifica para el gen F de BRSV
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa
RT-nPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa anidada
rVV	Virus vaccinia recombinantes
S	Segundos
SAP	enzima fosfatasa alcalina de camarón
SFB	Suero fetal bovino
SN	Seroneutralización
TA	Temperatura Ambiente
TAE	Solución tampón a base de Tris, Acetato y EDTA
TK	Timidina Kinasa
TMB	Tetrametilbenzidina
UV	Ultra violeta
VT	Vector de transferencia

VT-MTK-F VT que porta el gen F de BRSV
VV Virus vaccinia
X-gluc Sustrato (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido) para β -glucuronidasa

1. Introducción

1.1 Complejo respiratorio bovino (CRB)

El complejo respiratorio bovino (CRB), también conocido como Enfermedad Respiratoria Bovina (ERB) o “fiebre de embarque”, es un conjunto de enfermedades respiratorias infecciosas del ganado bovino que provoca importantes pérdidas económicas (R. W. Fulton y col. 2002).

La presentación de CRB se ve favorecida por varios factores que predisponen y contribuyen a la infección, tales como el estrés debido al hacinamiento, mezcla de animales de diferentes edades y orígenes, el destete, el transporte de los mismos, el cambio de alimentación y las variaciones bruscas de temperatura y humedad. Estos factores provocan la inmunodepresión de los animales haciéndolos susceptibles a la infección por los agentes del CRB. A su vez, la mezcla de animales de diferente *status* sanitario e inmunitario favorece la diseminación de los agentes infecciosos involucrados (Bowland y Shewen 2000; Schneider y col. 2009; Babcock y col. 2008).

La ERB, es un síndrome de etiología multifactorial, causado por diversos patógenos entre los que se incluyen: agentes virales tales como el virus respiratorio sincicial bovino (BRSV), el virus parainfluenza 3 (PI-3), el adenovirus, el virus de la diarrea viral bovina (BVDV) y el herpes virus bovino tipo 1 (BoHV-1); agentes bacterianos, como *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Histophilus somni* y *Mycoplasma bovis*; agentes parasitarios (vermes pulmonares) y agentes fúngicos (*Aspergillus*), que pueden interactuar entre ellos para desencadenar la presentación clínica del síndrome.

La etiopatogenia más frecuente de este síndrome, está caracterizada por una infección viral primaria que predispone a una infección bacteriana secundaria, la cual empeora el cuadro respiratorio. En este sentido, el BRSV juega un rol preponderante dentro del componente viral de la enfermedad.

1.2 Virus Respiratorio Sincicial Bovino (BRSV)

El BRSV pertenece al género *Pneumovirus*, subfamilia *Pneumovirinae*, familia *Paramyxoviridae*, orden *Mononegavirales* y es una de las causas más importantes de enfermedad respiratoria aguda en bovinos y otras especies animales (Alm y col. 2009; Duncan y Potgieter 1993).

Filogenéticamente, está estrechamente relacionado con el virus respiratorio sincicial humano (HRSV) el cual es la principal causa de enfermedad respiratoria en niños menores al año de edad (Easton, Domachowske, y Rosenberg 2004).

Partícula viral

El BRSV es un virus envuelto, de genoma no segmentado, de cadena simple de ARN de polaridad negativa. El ARN genómico es el molde para la replicación y transcripción, el cual, se transcribe en 10 ARN mensajeros (ARNm) que luego se traducen a 11 proteínas virales. El virión posee una envoltura lipídica a través de la cual emergen tres glicoproteínas de transmembrana: la proteína grande (G), la proteína de fusión (F) y la proteína pequeña hidrofóbica (SH) (Figura 1). Las proteínas G y F son cruciales para la infectividad y patogénesis del virus y contienen los principales epitopes neutralizantes y protectores (P. L. Collins, Chanock, y Murphy 2001). La proteína G interviene en la adsorción del virus a la célula huésped, mientras que la proteína F facilita la entrada del virus a la célula, permitiendo la fusión de las membranas virales y celulares. Además, permite la inserción del ARN en la célula huésped y es la responsable de la formación de los sincicios característicos (G. Meyer, Deplanche, y Schelcher 2008). La envoltura viral encierra a la nucleocápside helicoidal, formada por la nucleoproteína (N), la fosfoproteína (P), la polimerasa viral-ARN dependiente (L) y el ARN genómico de 15000 nucleótidos, aproximadamente. Contiene también la proteína de la matriz (M) y el factor transcripcional anti-terminación M2-1. El genoma codifica también para una proteína reguladora de ARN (M2-2) y para dos proteínas no estructurales, NS1 y NS2.

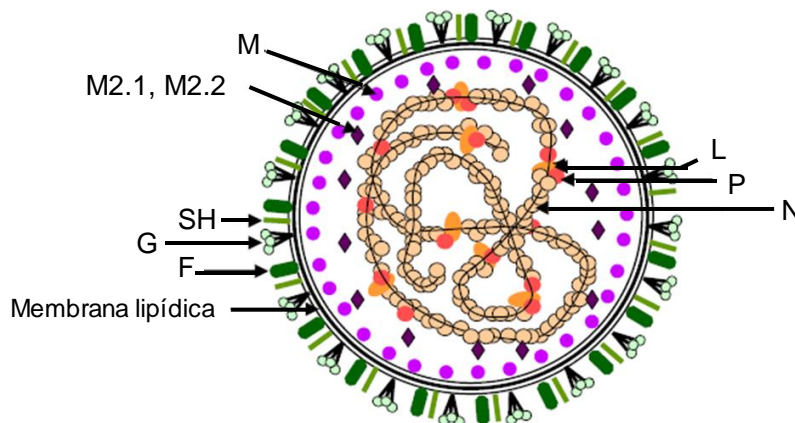


Figura 1: Esquema del BRSV. El virión se encuentra envuelto en una bicapa lipídica. Presenta tres glicoproteínas ancladas a su membrana: la proteína de fusión (F); la proteína grande (G) y la proteína pequeña hidrofóbica (SH). La ribonucleoproteína está formada por el genoma viral (ARN monocatenario de polaridad negativa) y las proteínas virales nucleoproteína (N), fosfoproteína (P) y ARN polimerasa dependiente de ARN (L). Adaptado de Meyer y colaboradores (2008).

Replicación viral.

La transcripción y replicación del genoma viral ocurre en el citoplasma por acción de la enzima viral ARN polimerasa dependiente de ARN (Figura 2).

La infección se inicia con la unión de la proteína G al receptor de la superficie celular, seguida por la fusión promovida por la proteína F de la membrana viral a la membrana

plasmática del huésped (El Najjar, Schmitt, y Dutch 2014). Luego de la fusión de la envoltura viral y la membrana celular, el complejo de la ribonucleoproteína (RNP) se libera dentro del citoplasma, en donde ocurren todos los pasos del ciclo de replicación. La transcripción de la cadena negativa de ARN genómico involucra un mecanismo de secuencias de comienzo y fin (*start-stop*) que produce los ARN subgenómicos. Esto está guiado por señales cortas, conservadas, que flanquean cada unidad codificante de ARNm, denominadas señal de comienzo de transcripción (GS: *gene-start*) y señal de terminación/poliadenilación (GE: *gene-end*). Luego, ocurre un gradiente de transcripción polar en el que los genes próximos al promotor son transcritos de manera más frecuente que los genes ubicados río abajo. La replicación del ARN ocurre cuando la polimerasa cambia a un modo de lectura que da como resultado la síntesis de un intermediario replicativo de sentido positivo que actúa como un molde para replicar el ARN genómico de polaridad negativa. Tanto el ARN genómico como el ARN antígenómico están empaquetados. Las nucleocápsides (o RNPs) se ensamblan en el citoplasma y luego migran con la proteína M hacia la membrana celular en donde ocurre la interacción con las glicoproteínas integrales de transmembrana. Finalmente, se produce el ensamblaje final y la salida de partículas virales infecciosas de la célula infectada hacia la matriz extracelular. La incorporación de las RNPs y las proteínas de la envoltura a las partículas virales infecciosas es un proceso altamente complejo y coordinado que requiere la cooperación de los tres componentes estructurales principales: las glicoproteínas de superficie, las RNPs y las proteínas de la matriz. Sin embargo, se desconoce cómo ocurre su movimiento desde el citoplasma hacia la membrana plasmática (Shahriari, Gordon, y Ghildyal 2016). No está claro si la salida del virus de la célula ocurre directamente en la superficie de la membrana celular o por medio de vesículas citoplasmáticas. En las células epiteliales de las vías respiratorias, el brote de BRSV ocurre en la superficie apical (J.-F. Valarcher y Taylor 2007).

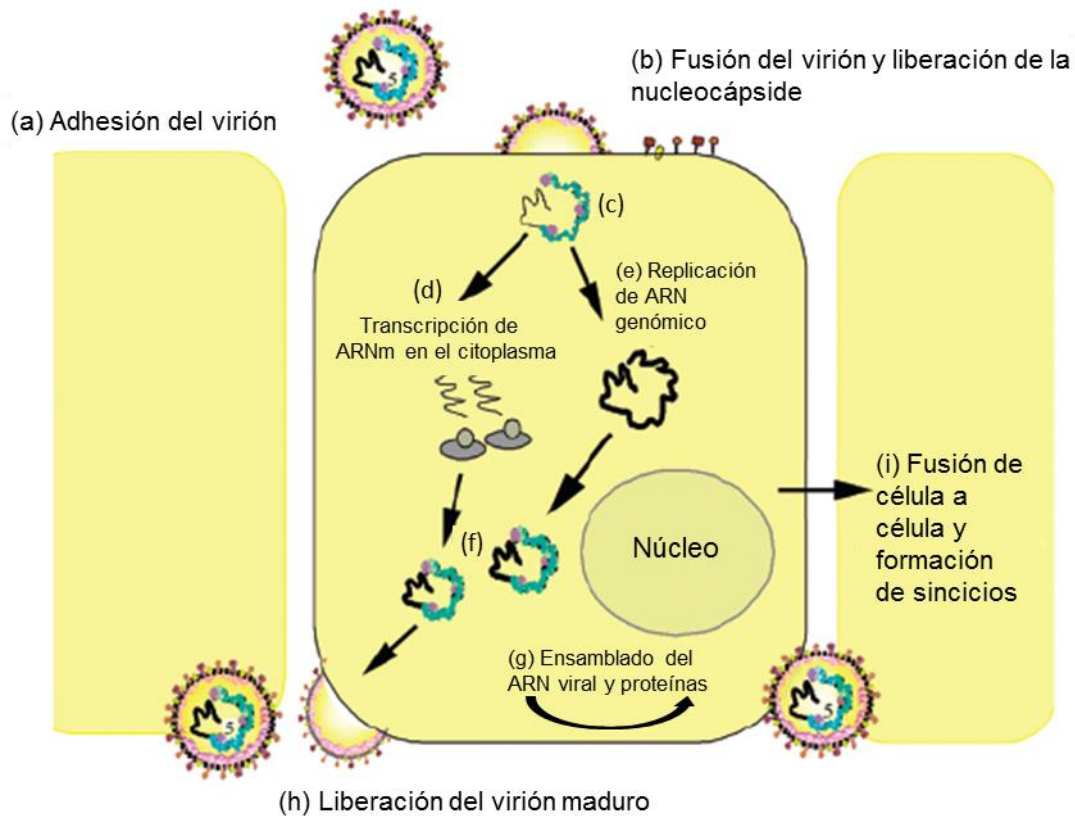


Figura 2: Representación esquemática del ciclo replicativo del virus respiratorio sincicial (RSV). La unión del RSV a la célula ocurre mediante la proteína G (a), seguida por la fusión mediante la proteína F (b), lo cual resulta en la incorporación de la envoltura viral dentro de la membrana celular y la subsecuente liberación de la nucleocápside dentro del citosol para permitir el ingreso del ARN a la célula (c). Luego se produce la transcripción del ARNm (d) y la replicación de ARN (e). Las proteínas M, F y G forman complejos con la membrana plasmática mientras que las proteínas N, P, L y M2-1 forman inclusiones en el citoplasma (f). A través de una serie de interacciones, la proteína M coordina el ensamblado de las proteínas de la envoltura con las proteínas de la nucleocápside (g) previo a la liberación del virión maduro (h). La dispersión célula a célula de la infección viral mediante la fusión de membranas plasmáticas cercanas mediante la proteína F induce la formación de grandes sincicios, generando lesiones epiteliales en el hospedador (i). Adaptado de Ghildyal y colaboradores (Ghildyal, Ho, y Jans 2006).

Clasificación antigénica y genética de BRSV

El BRSV se clasifica en 4 subgrupos antigénicos, utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína G: A, B, AB y sin tipificar (Furze y col. 1994; Schrijver y col. 1996).

A pesar de ser un virus genéticamente estable se identificaron algunos cambios en la secuencia de los genes codificantes de las proteínas N, G y F. El grado de variación genética de BRSV es menor al 15%, y se describió que esta evolución está dirigida por la presión selectiva inducida por la vacunación (J.-F. Valarcher y Taylor 2007).

Las secuencias nucleotídicas parciales de la proteína G de un conjunto de aislamientos, junto con el patrón de reconocimiento por anticuerpos monoclonales contra las proteínas G, F, N y P del BRSV, mostraron diferencias antigénicas aleatorias entre los aislamientos, aunque se observó una reactividad cruzada con los epítopos de

la proteína viral, particularmente con la proteína F. Además, se observaron diferencias estructurales entre las proteínas F y P. La proteína P presentó diversos patrones, debido a diferencias en el tamaño molecular, cuando se sometió a análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida. Sin embargo, las diferencias estructurales a lo largo de la proteína P no se correlacionaron con las diferencias antigénicas observadas en las proteínas F y N. En general, la identidad de la secuencia de nucleótidos en la proteína G varió de 94,1% a 99,9%. En comparación, la similitud de secuencia de aminoácidos predicha varió de 89,9% a 99,6%, sosteniendo la teoría de que BRSV pertenecía a un grupo monofilogenético (Stine, Hoppe, y Kelling 1997).

1.2.1 Signos clínicos de la enfermedad

El período de incubación del BRSV es de dos a cinco días. La infección causada por este virus puede ser asintomática, limitada a las vías respiratorias altas o involucrar tanto el tracto respiratorio superior, como el inferior. Los signos al inicio de la enfermedad consisten en aumento de la temperatura, tos, descarga nasal y ocular serosa y depresión. En los cursos más graves de la enfermedad se observa un cuadro neumónico acompañado de anorexia, taquipnea y disnea, que puede desencadenar en una neumonía fatal (J.-F. Valarcher y Taylor 2007). Los animales pueden desarrollar dificultad respiratoria grave presentando enfisema pulmonar, edema y/o enfisema subcutáneo (Belknap 1993; D. E. Bryson 1993).

Las lesiones microscópicas se caracterizan por una bronquiolitis proliferativa y exudativa presentando también colapso alveolar e infiltración peribronquiolar (L H Thomas y Stott 1984). También puede observarse necrosis del epitelio y células epiteliales apoptóticas, además de la formación de células gigantes o sincicios característicos en el lumen del bronquio, en el epitelio bronquiolar o en las paredes de los alvéolos (Birgitte Viuff y col. 2002).

1.2.2 Patogénesis y respuesta inmunitaria del BRSV

La enfermedad causada por el BRSV se presenta principalmente durante el otoño y el invierno, lo que conlleva a una mayor proporción de animales seropositivos debido a que, por las condiciones climáticas, los animales deben permanecer en ambientes cerrados en los cuales se encuentran en contacto directo, favoreciendo una rápida dispersión viral (Stott y col. 1980; Hägglund y col. 2006a). Sin embargo, pueden ocurrir episodios de reinfección durante el verano, período durante el cual los problemas respiratorios en el ganado vacuno suelen ser menos graves (Stott y col. 1980; Elvander 1996).

El BRSV se transmite en forma horizontal por contacto directo entre animales, mediante aerosoles y secreciones respiratorias, por lo que la infección está favorecida cuando existe contacto estrecho entre los animales, como sucede durante el ordeño, en los engordes a corral o en las aguadas. Asimismo, el uso de instalaciones inadecuadas, el hacinamiento de los animales, el ingreso al establecimiento de animales de distinto origen con estado inmunológico desconocido, la influencia de factores climáticos y el manejo inadecuado, predisponen la aparición de enfermedades respiratorias.

El virus respiratorio sincicial (RSV) infecta células del epitelio respiratorio activando la respuesta inmunitaria innata resultando en la inducción de citoquinas y quemoquinas proinflamatorias (Guzman y Taylor 2015). El interferón (IFN) de tipo I es una citoquina especializada liberada por las células del hospedador en respuesta a los patógenos, inducido por diversos receptores de reconocimiento de patrones (PRRs). Estos PRR detectan la infección por RSV e inducen la producción de IFN tipo I, produciendo un efecto antiviral en las células vecinas no infectadas (Guzman y Taylor 2015). Sin embargo, el RSV es más resistente que otros paramixovirus a los efectos antivirales de los IFN de tipo I (Atreya y Kulkarni 1999; Schlender y col. 2000). Esto podría correlacionarse con la supresión de la inducción de IFN de tipo I inducida *in vitro* por las proteínas NS1 y NS2 de los virus HRSV y BRSV (Bossert, Marozin, y Conzelmann 2003; Schlender y col. 2000).

La infección con BRSV no induce inmunidad duradera y los terneros pueden reinfectarse durante toda su vida, incluso, con la misma cepa. Sin embargo, la reinfección suele ser subclínica o causar un cuadro clínico de enfermedad leve (W. H. Van Der Poel, Oirschot., y Van 1994).

Luego de una infección en terneros que poseen anticuerpos maternos, las respuestas inmunitarias son débiles y transitorias (Guzman y Taylor 2015). Esta respuesta relativamente pobre puede deberse a una variedad de factores tales como los efectos inhibitorios de los anticuerpos maternos, la inmadurez inmunológica y el tropismo limitado de la infección con RSV (Guzman y Taylor 2015). Sin embargo, Ellis y colaboradores demostraron que aunque las respuestas inmunitarias efectoras son débiles, la infección con BRSV induce memoria inmunológica (J. A. Ellis y col. 1996).

La mayor incidencia de enfermedad grave ocurre durante los primeros 3 meses de vida, cuando los anticuerpos maternos están presentes. Sin embargo, la incidencia y gravedad de la enfermedad respiratoria en terneros esta inversamente relacionada al nivel de anticuerpos maternos específicos contra BRSV presentes en suero (Kimman y Westenbrink 1990). Los terneros adquieren los anticuerpos maternos mediante la ingesta de calostro durante las primeras 36 h de vida y no por vía intraplacentaria.

Además, se ha descrito que la presencia de elevados títulos de anticuerpos neutralizantes (AN) contra BRSV disminuye significativamente la gravedad clínica de la enfermedad (Kimman y Westenbrink 1990). Los AN de la infección están dirigidos contra las proteínas de superficie F y G. En particular, se demostró que anticuerpos monoclonales dirigidos contra epítopes de la proteína F, transferidos de forma pasiva, intratraquealmente, protegen contra la infección causada por BRSV en terneros gnotobióticos (Lewis H Thomas y col. 1998).

Luego de una infección con BRSV, se produce un aumento de células T CD4+ y CD8+ en los pulmones y en la linfa que drena a los mismos y se pueden detectar células citotóxicas específicas contra BRSV en pulmones y en sangre periférica entre los 7 y 10 días post-infección (Antonis y col. 2006; Laurel J. Gershwin y col. 2011; Gaddum y col. 1996; B. Viuff y col. 1996). Se ha demostrado el aumento de IL-4 e IL-13 en células linfoides a los 3 o 4 días posteriores a la infección y luego un aumento de la expresión de IFN- γ a los 5 a 8 días post infección (Laurel J. Gershwin y col. 2011).

En relación a la respuesta celular, se demostró la importancia de las células T CD8+ en la eliminación de BRSV del tracto respiratorio superior e inferior (G Taylor y col. 1995). Las células T CD8+ específicas para BRSV reconocen a las proteínas N, F, M, P, G y M2 (Antonis y col. 2006; Gaddum y col. 2003).

En bovinos depletados de células T CD8+ y en menor medida en aquellos depletados de células T CD4+, se observó un *clearance* viral retrasado que se asoció a una exacerbación de la patología pulmonar (G Taylor y col. 1995; Gaddum y col. 1996). Estos resultados son similares a los obtenidos en niños con respuestas de células T defectivas e individuos inmunosuprimidos infectados con RSV, en los que se observó una prolongada excreción viral y exacerbación de la enfermedad (Fishaut, Tubergen, y McIntosh 1980; Hall y col. 1986).

1.2.3 Epidemiología

En el año 1968, Doggett y colaboradores (Doggett, Taylor-Robinson, y Gallop 1968) demostraron la presencia de un anticuerpo en el suero bovino capaz de neutralizar HRSV y que el título de dichos anticuerpos aumentaba particularmente en el caso de 3 bovinos con enfermedad respiratoria, indicando que un virus similar a HRSV pudo haber causado enfermedad respiratoria en bovinos. El BRSV se reportó por primera vez en Europa en 1970 y luego en Estados Unidos, en 1974 (Paccaud y Jacquier 1970; Smith, Frey, y Dierks 1975).

En la actualidad se considera que la infección causada por este agente está ampliamente distribuida alrededor del mundo.

BRSV se transmite principalmente por contacto directo entre animales infectados o mediante aerosoles. Las tasas de infectividad son usualmente elevadas y la transmisión de este virus intra-rodeo está ampliamente descripta (Sarmiento-Silva, Nakamura-Lopez, y Vaughan 2012). No está claro aún si BRSV puede persistir en las poblaciones de bovinos o si, previo a un brote, es introducido al rodeo a partir de otras fuentes (De Jong y col. 1996; L H Thomas y Stott 1984; W. H. M. van der Poel y col. 1995; Baker, Ames, y Markham 1986). Tal como ocurre con HRSV, las reinfecciones en bovinos son comunes e incluso animales adultos son susceptibles a enfermarse por BRSV (Harrison y Pursell 1985). Es importante destacar que los bovinos pueden infectarse aun en presencia de anticuerpos maternos (Kimman y col. 1988). Sin embargo, se ha descripto que altos títulos de AN son considerados protectores ya que reducen la gravedad de la enfermedad (Kimman y Westenbrink 1990).

La aplicación de herramientas de epidemiología molecular es esencial para poder entender la evolución, dispersión y transmisión de BRSV. A pesar de que la caracterización molecular del BRSV ha evolucionado, todavía quedan muchos interrogantes por resolver que requieren nuevos y mejores estudios que involucren el genoma viral completo para asegurar una caracterización más precisa de las cepas virales circulantes en todo el mundo. Tal como se describe en otros trabajos, la región del gen G del BRSV es más variable que la del gen F (Elvander y col. 1998). Se ha reportado una gran tasa de cambios aminoacídicos en la secuencia codificante de la proteína G que son antigénicamente importantes y que seguramente son responsables de proveerle al virus la forma de escape ante una inmunidad previamente establecida (J. F. Valarcher, Schelcher, y Bourhy 2000; Lerch, Anderson, y Wertz 1990). En cambio, los aislamientos de BRSV mostraron escasa variabilidad genética en el fragmento del gen F (Lerch, Anderson, y Wertz 1990).

Un estudio que incluyó secuencias de aislamientos europeos y norteamericanos evaluó la diversidad de las secuencias codificantes de las proteínas G, F y N, y su relación filogenética. La variación nucleotídica de la secuencia codificante de G divide a BRSV en 6 subgrupos genéticos mientras que la F o la N lo divide en 5 subgrupos (G. Meyer, Deplanche, y Schelcher 2008).

En lo que respecta al diagnóstico virológico, es importante destacar que el aislamiento del BRSV es un procedimiento laborioso debido a la naturaleza sumamente lábil del virus (Arns y col. 2003; Tannock 1987). Por este motivo, los estudios epidemiológicos se realizan de manera indirecta mediante el empleo de técnicas serológicas (Hazari y col. 2002).

La presencia de anticuerpos contra BRSV ha sido demostrada mundialmente con prevalencias elevadas en animales de todas las edades, incluso en aquellos que no han

presentado signología respiratoria. La seroprevalencia del BRSV está directamente relacionada con la densidad de animales presentes en la región y la edad los mismos. Debido a que los animales que han sido expuestos previamente al virus pueden reinfectarse, tanto el número de animales seropositivos como el título de anticuerpos contra el BRSV es superior en animales de mayor edad (Hägglund y col. 2006a; Bidokhti y col. 2009). Es importante mencionar que la infección natural afecta a rodeos de cría, tambos y establecimientos de engorde a corral y que las buenas prácticas de manejo podrían reducir las tasas de infección (Sarmiento-Silva, Nakamura-Lopez, y Vaughan 2012).

Como se mencionó previamente, el BRSV está ampliamente distribuido en todo el mundo. Ha sido aislado en bovinos con signología respiratoria en diferentes países de Europa, Asia y América (Inaba y col. 1972; Paccaud y Jacquier 1970; Hägglund y col. 2006a; A Ohlson y col. 2013; Uttenthal y col. 2000; Klem y col. 2013; Pardon y col. 2011).

Distintos estudios han descrito la presencia del BRSV y su implicancia en la enfermedad respiratoria bovina en Europa. Hägglund y colaboradores reportaron que el BRSV está distribuido en tambos de Suecia y que existe una dispersión horizontal del virus con una presencia constante de animales seropositivos lo cual permite una circulación viral a lo largo del año (Hägglund y col. 2006a). Un estudio longitudinal de la dinámica de infección del BRSV en tambos en el mismo país, demostró que la infección viral es mayor en la zona sur, lo cual podría deberse, según los autores, a la mayor densidad de animales comparada con las regiones del norte (A Ohlson y col. 2013). Van der Poel y colaboradores por su parte, estudiaron la epidemiología del BRSV en tambos durante un año en Holanda, demostrando que las mayores incidencias aparecen en otoño o en invierno pero que pueden ocurrir durante todo el año (W. H. M. V Van Der Poel y col. 1993). En Bélgica, Pardon y colaboradores reportaron que durante un brote respiratorio el 40% de las terneras mostraron seroconversión para BRSV, sugiriendo a este virus como el principal agente causal del CRB en ese país (Pardon y col. 2011). El BRSV ha sido reportado también en Inglaterra en donde todos los rodeos evaluados resultaron seropositivos para este virus (Paton y col. 1998).

La circulación de BRSV ha sido descrita en bovinos africanos, en donde los porcentajes de anticuerpos específicos para este virus fueron de 92,5% (Woldemeskel y col. 2000). Reportes previos habían reportado seroprevalencias de 43% para este agente viral en bovinos de engordes a corral de Sudáfrica.

En Estados Unidos, Rossi y Kiesel reportaron que el 67% de los bovinos adultos sanos presentaban anticuerpos contra BRSV y que la seroconversión alcanzaba al 100% de los rodeos con brotes de enfermedad respiratoria (Rossi y Kiesel 1974). Otros trabajos en el mismo país demostraron elevada seroprevalencia del virus en animales

adultos (Baker y Frey 1985; Smith, Frey, y Dierks 1975). Se ha reportado que la mortalidad en dicho país puede alcanzar porcentajes de hasta un 13% en los rodeos que presentan enfermedad respiratoria (R. W. Fulton y col. 2000). En Canadá se ha descrito al BRSV como el principal agente responsable de enfermedad respiratoria en terneros (Martin y col. 1989; Gagea y col. 2006).

Haciendo referencia a Sudamérica, la circulación de BRSV también ha sido ampliamente reportada. En Venezuela, se ha descrito una alta seroprevalencia en bovinos de engordes a corral (Obando y col. 1999). En Brasil, el primer reporte de BRSV fue en bovinos de Río Grande do Sul en el año 1993 (Gonçalves y col. 1993). Desde ese momento, diferentes estudios demostraron la alta seroprevalencia de este virus tanto en tambos como en establecimientos de engorde a corral (Campalans y Arns 1997; Affonso y col. 2011). En Uruguay, la presencia de anticuerpos contra BRSV en bovinos de diferentes regiones geográficas resultó ser de 95%. En Ecuador, por otra parte, la seroprevalencia contra BRSV en rodeos no vacunados fue del 80,48% y la prevalencia a nivel rodeo fue de 91,3% (Saa y col. 2012).

Los datos de prevalencia del virus en Argentina, son escasos. Un reporte llevado a cabo en bovinos de cría de diferentes edades provenientes de la provincia de Buenos Aires, Corrientes y La Rioja, sugirió que la seroprevalencia está asociada al sistema productivo. Dicho estudio reveló la presencia de anticuerpos contra BRSV fundamentalmente en bovinos menores de 12 meses observándose una mayor difusión del virus en distritos con mayor movimiento de animales (Odeón y col. 2001).

En nuestro país existe un único aislamiento realizado por Bagnis G y col., en el año 1998, a partir de terneros de tambo con serología positiva para BRSV (Bagnis y col. 1999). Sin embargo, dicho virus no pudo ser caracterizado genéticamente, ni se dispone de su secuencia.

El BRSV afecta al ganado de todas las edades, especialmente a terneros de tres a doce meses de edad causando neumonías severas presentando una morbilidad elevada (entre 60 y 80%) y en algunos casos la mortalidad alcanza el 20% (J.-F. Valarcher y Taylor 2007). Este virus, junto con otros virus involucrados en el CRB, favorece la infección con bacterias secundarias, lo cual exacerba los signos clínicos y complica más aún el cuadro respiratorio del animal. Si bien los bovinos son los hospedadores naturales del BRSV, este virus puede infectar a otras especies tales como ovinos, caprinos, camélidos y búfalos (Citterio y col. 2003; Dunbar y col. 1985; Sausker y Dyer 2002; Rivera, Madewell, y Ameghino 1987; W. H. M. Van der Poel y col. 1995).

Se detectaron anticuerpos en búfalos en Turquía con 28% de seroprevalencia (Akca y col. 2001). Otro estudio llevado a cabo en rebecos y ovejas en los Alpes de Italia mostró rangos de prevalencias de medianos a altos contra este virus (Gaffuri y col.

2006a). El hecho de que el RSV afecte a especies no bovinas que se encuentran en contacto cercano con bovinos es un factor potencial importante a tener en cuenta en la transmisión de este virus. Algunos estudios sugieren que los búfalos serían reservorios naturales de virus respiratorios contribuyendo a la transmisión de la enfermedad, particularmente, en rodeos mixtos (Maidana y col. 2012). Por otra parte, está reportada la circulación de RSV ovino y caprino (ORSV y CRSV) en distintos países, entre ellos, Estados Unidos (Grubbs, Kania, y Potgieter 2001), Perú (Manchego, Rivera, y Rosadio 1998) e Italia (Gaffuri y col. 2006a).

1.2.4 Estrategias de prevención y control del BRSV

En los últimos 20 años la ganadería vacuna argentina ha visto reducida su superficie a causa de la importante expansión de la agricultura. Como consecuencia de este fenómeno, los productores han adoptado distintos sistemas intensivos como alternativa para enfrentar la baja de los precios y la suba de los costos. En este nuevo sistema, donde la densidad de animales es superior a la del rodeo extensivo, los bovinos se encuentran en condiciones sanitarias que favorecen el desarrollo de enfermedades respiratorias en las que el BRSV juega un rol fundamental.

Las enfermedades respiratorias del bovino constituyen uno de los problemas más importantes en los engordes a corral por las muertes que ocasionan, los costos de los tratamientos y la reducción en la ganancia de peso de los animales afectados. Está reportado que terneros que contraen neumonía, evidencian una importante disminución en la ganancia de peso (Virtala y col. 1996). Por otra parte, en lo que respecta a lechería, ha sido reportado que los animales que padecen de enfermedad respiratoria causada por BRSV, producen cantidades significativamente menores de leche que las vacas que están protegidas frente a dicho virus (Ferguson, Galligan, y Cortese 1997).

1.3 Vacunas

1.3.1 Vacunas para BRSV

Como se describió previamente, a pesar de que la infección por BRSV ocurre principalmente en otoño y en invierno, también se ha demostrado su circulación en los periodos de verano. El hecho de que el virus esté presente en el rodeo durante todo el año fue demostrado por Bidokhti y colaboradores (Bidokhti y col. 2012). Estos descubrimientos demuestran la importancia de conocer la dinámica de circulación de BRSV de manera tal de desarrollar estrategias de prevención y control de la infección mediante, principalmente, las medidas de manejo productivo y la vacunación.

Si bien en los sistemas productivos se aplican esquemas de control basados en medidas de manejo adecuado, estos no son suficientes para prevenir la infección. De

esta manera, la vacunación de animales adultos y de terneros resulta ser una opción interesante para controlar la enfermedad (Hägglund y col. 2006a).

A diferencia de HRSV, para prevenir la infección por BRSV existen diversas vacunas disponibles comercialmente, atenuadas o inactivadas, monovalentes o en combinación con otros agentes del CRB.

Las vacunas a virus completo, inactivadas, son las más utilizadas. Sin embargo, estas vacunas, particularmente las inactivadas con formol, deberían ser evaluadas exhaustivamente debido a que podrían inducir una respuesta adversa a la infección polarizando hacia un perfil de respuesta de tipo Th2 (Laurel J. Gershwin 2012). Existen reportes que demuestran la exacerbación de la enfermedad respiratoria en terneros que habían sido inoculados con vacunas vivas modificadas o inactivadas (Westenbrink, Kimman, y Brinkhof 1989; Schreiber y col. 2000). Esto coincide con la exacerbación de la enfermedad producida en niños inoculados con una vacuna conteniendo RSV inactivado con formalina (FI-RSV) reportada por Kim y colaboradores (Kim y col. 1969).

Estos antecedentes indican que existe una necesidad constante de desarrollar vacunas más seguras que sean capaces de inducir protección efectiva y duradera (G. Meyer, Deplanche, y Schelcher 2008). Una vacuna efectiva para BRSV debe ser capaz de inducir una respuesta inmunitaria fuerte en presencia de anticuerpos maternos debido a que la enfermedad es grave durante los primeros meses de vida. Esta respuesta también debe ser duradera y no debe inducir una exacerbación de la enfermedad (Sacco y col. 2012).

Al momento de diseñar una vacuna efectiva contra BRSV deben tenerse en cuenta las siguientes características:

- Frenar la infección en el sitio de entrada: la infección causada por BRSV ocurre en el tracto respiratorio, por este motivo, una vacuna eficiente tendría que inducir una fuerte respuesta inmunitaria de mucosas en los terneros susceptibles.
- Sortear la inmunidad materna: el momento de mayor susceptibilidad a la infección en los terneros coincide con la presencia de anticuerpos colostrales, los cuales, ejercen un efecto inhibitorio de la respuesta inmunitaria del animal inducida por la vacunación con virus completo o subunidades proteicas.
- Capacidad de inducir anticuerpos neutralizantes (AN): la presencia de elevados títulos de AN disminuye significativamente la gravedad clínica de la enfermedad.
- Inducción de respuesta inmune humoral y celular.
- Protección contra todas las cepas circulantes: elección de una proteína inmunogénica altamente conservada.
- Respuesta inmune balanceada Th1-Th2: una vacuna debe tener la capacidad de inducir una respuesta inmunitaria balanceada, evitando la exacerbación de la

enfermedad frente a la infección (fenómeno que puede ocurrir luego de la vacunación y, posterior infección, generando una respuesta inmune aberrante, polarizada a Th2)

Para el caso particular del BRSV, numerosos esfuerzos se han realizado a fin de desarrollar una vacuna segura y eficaz para prevenir la infección por el virus.

La tecnología de ADN recombinante permite el desarrollo racional de inmunógenos que podrían, teóricamente, superar las desventajas presentes en las vacunas convencionales. Además, esta es una tecnología versátil en términos tanto de antígenos de BRSV como la expresión o sistemas de *delivery* mediante los cuales el antígeno induce una respuesta inmune efectiva.

Estos desarrollos incluyen vacunas vivas modificadas genéticamente, vacunas a subunidad, vacunas génicas y vacunas vectorizadas por otros virus.

Teniendo en cuenta que los terneros son más susceptibles a la infección por BRSV en las primeras etapas de vida, la vacunación debería realizarse preferentemente a una edad temprana cuando aún circulan niveles heterogéneos de anticuerpos maternos contra BRSV (R. Fulton y col. 2004). Este primer obstáculo podría ser superado utilizando una vía de inmunización de mucosas o a través del desarrollo de vacunas capaces de sobrepasar la inmunidad materna (por ej. utilizando vacunas vectorizadas que porten en su secuencia genes codificantes para las proteínas de BRSV).

Debido a que el efecto inhibitorio de los anticuerpos maternos predomina en el tracto respiratorio bajo, una estrategia es la inmunización en mucosas, especialmente con virus vivos atenuados (Murphy y col. 1989). Para BRSV, se observó protección frente a la inmunización con virus vivo por la vía intranasal en terneros con y sin anticuerpos maternos (Kimman, Westenbrink, y Straver 1989).

Aunque la infección puede ocurrir en presencia de anticuerpos neutralizantes, éstos se consideran protectores debido a que los síntomas de la enfermedad disminuyen cuando los títulos de anticuerpos frente a BRSV son elevados (Kimman y col. 1988). De esta manera, sería interesante mejorar el nivel de anticuerpos específicos presentes en el calostro materno mediante la inmunización de las vacas en el último tercio del periodo de gestación, ofreciendo así una estrategia prometedora que logre proteger de la infección a los terneros recién nacidos (J. A. Ellis y col. 1996).

Se ha demostrado que el IFN- γ bovino induce una respuesta de tipo Th1 y la producción de IgG2. En este sentido, numerosos trabajos demostraron que la reducción tanto de la patología pulmonar como en la replicación viral en ratones y terneros resultó estar fuertemente asociada a la producción de IFN- γ , de manera que la secreción de

dicha citoquina parece tener un correlato consistente de protección (Letellier y col. 2008; Mapletoft y col. 2006; Oumouna, Karvonen, y Babiuk 2005; West y col. 1999).

Los principales antígenos blanco para el desarrollo de vacunas recombinantes son las glicoproteínas F y G y, en menor grado, las proteínas N y M. Estas proteínas se utilizan solas o en combinación. Se ha descrito que estas proteínas son capaces de inducir anticuerpos neutralizantes y respuestas de células T. A su vez, las glicoproteínas F y G y la proteína N son los antígenos protectores principales de BRSV (G Taylor y col. 1997).

Si bien se ha demostrado que los anticuerpos neutralizantes pueden mediar la protección contra BRSV (Lewis H Thomas y col. 1998), la inmunidad mediada por células también se asocia con protección (Letellier y col. 2008; G Taylor y col. 1995).

Las proteínas F, P, G, M2 y N constituyen antígenos diana para las células T CD8 +. Esto es particularmente relevante ya que dicha subpoblación de linfocitos es responsable de la recuperación de la infección por BRSV en el tracto respiratorio de los terneros (Gaddum y col. 1996; McInnes y col. 1996; G Taylor y col. 1995).

La mayor desventaja de las vacunas a subunidad es su baja inmunogenicidad, por lo que es necesario desarrollar nuevos adyuvantes que potencien la respuesta inmunitaria y sean capaces de promover un perfil de tipo Th1 o que induzcan una respuesta inmunitaria balanceada Th1-Th2 contra BRSV.

Teniendo en cuenta que la inmunidad inducida por la infección no es capaz de prevenir nuevas infecciones por el mismo virus, Gershwin y colaboradores postularon que el diseño de una vacuna contra BRSV no debe imitar la respuesta inducida por la infección con este agente viral, por el contrario, debe ser diferente y mejor (Laurel J. Gershwin 2012).

En este contexto, el diseño racional de vectores virales que expresan proteínas heterólogas constituye una estrategia útil para el desarrollo de una vacuna contra BRSV. Potencialmente, todos los virus podrían utilizarse como vectores para la expresión de proteínas foráneas, sin embargo, diferentes virus se utilizan con distintos objetivos, por ej. la integración al genoma puede ser importante en el área de terapia génica, pero se evita para el desarrollo de vacunas.

En el caso particular de BRSV, existen algunos ejemplos de evaluación de nuevos candidatos vacunales basados en vectores virales. Las vacunas basadas en virus Vaccinia Ankara modificado (MVA) recombinantes son capaces de inducir respuestas inmunes con un perfil de tipo Th1 y proporcionar un contexto más favorable de presentación para los antígenos foráneos (Gherardi y Esteban 2005). Antonis y colaboradores reportaron que los MVA recombinantes que expresan la secuencia codificante de la proteína F, sola o en combinación con la proteína G, indujeron

respuestas de IgG y de células T CD8 + específicas contra BRSV y protección parcial después del desafío (Antonis y col. 2007). Otro ejemplo de vector viral es el Herpes Virus bovino tipo 1 (BoHV-1), en el cual se insertó un gen G sintético río abajo del promotor gE de BoHV-1 para obtener un virus recombinante BoHV-1/G (gE negativo). Esta vacuna, evaluada en terneros gnotobióticos, fue capaz de inducir anticuerpos específicos de BRSV, pero no neutralizantes, y protección parcial contra el desafío de BRSV. No hubo evidencia de activación de células T citotóxicas específicas para BRSV. Además, la expresión de la proteína G de BRSV aumentó la virulencia de BoHV-1 en terneros (G. Taylor y col. 1998).

Por otro lado, la vacunación con el virus vaccinia recombinante (rVV) que expresa diferentes proteínas de BRSV (F, G, N y M2) indujo una mayor producción de anticuerpos neutralizantes cuando expresa la proteína F en comparación con la expresión de la proteína G. Las proteínas F y N indujeron respuestas proliferativas de linfocitos específicos de BRSV en terneros. A pesar de que hubo diferencias en la respuesta inmune inducida por los rVV, las proteínas F, G y N, pero no M2, indujeron una protección significativa contra la infección por BRSV (G Taylor y col. 1997).

Otra estrategia abordada es el uso de vacunas de ADN. Para la prevención frente a BRSV, las características más importantes de este tipo de vacunas son la posibilidad de evadir los efectos inhibitorios de los anticuerpos maternos y de inducir una respuesta inmunitaria mediada por células Th1.

Se ha informado que la vacunación de ratones con ADN plasmídico que expresa las glicoproteínas F o G indujo una respuesta mediada por células Th1 y redujo la propagación de virus en los pulmones después del desafío viral (Bembridge y col. 2000; Brady, Topliff, y Kelling 2004). En cambio, la inmunización de terneros con una vacuna génica que codifica para la proteína F por vía intramuscular o intradérmica, indujo niveles de protección más bajos que los evocados por la infección previa con BRSV (Geraldine Taylor y col. 2005).

La estrategia de *prime-boost* estudiada por varios autores ha resultado ser superior a la vacunación con ADN o con vacunas a subunidad, ya que permitió lograr un mayor grado de protección. Terneros vacunados con ADN plasmídico y revacunados con proteína evidenciaron protección, sin observarse el desarrollo de lesiones neumónicas ni replicación de BRSV en los líquidos de lavado broncoalveolar (BAL) y en los pulmones. La protección se correlacionó con la inmunidad mediada por células y no con la respuesta de anticuerpos (Letellier y col. 2008).

1.3.2 Vacunas basadas en poxvirus recombinantes

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

La expresión genética viral se divide en 3 etapas: temprana, intermedia y tardía. En la etapa temprana, el aparato transcripcional empaquetado dentro del *core* de las partículas permite la síntesis de ARNm virales (J Kates y Beeson 1970; JR Kates y McAuslan 1967; Munyon, Paoletti, y Grace 1967; Wei y Moss 1975). Luego de su síntesis son extruidos a través de los poros presentes en la superficie del *core* hacia el citoplasma de la célula infectada (JR Kates y McAuslan 1967; Munyon, Paoletti, y Grace 1967). La transcripción de los genes intermedios y tardíos ocurre en el citoplasma de la célula sólo después de la replicación del ADN viral. Luego de una infección sincronizada, los ARNm pueden detectarse por aproximadamente 48 h.

En un sentido amplio, un vector se define como un vehículo que se usa para movilizar la información genética entre células. Algunos vectores virales son virus modificados que llevan genes foráneos o secuencias integradas en posiciones que no son esenciales para la replicación viral ni para la infectividad. Estos virus recombinantes han sido desarrollados utilizando sistemas tales como adenovirus (Berkner y Sharp 1982), herpesvirus (Post y col. 1982), retrovirus (Wei y col. 1981) o poxvirus (Mackett, Smith, y Moss 1982; Panicali y Paoletti 1992), entre otros.

En general, los virus pueden clasificarse según la interacción virus-célula en: a) virus replicativos, si se produce una infección productiva; o b) virus no replicativos, cuando no hay producción de una progenie viral. Esta característica es de suma importancia a fin de seleccionar el tipo de virus adecuado para el desarrollo de vacunas.

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

- la vacuna obtenida es extremadamente estable y no requiere cadena de frío para su almacenamiento, lo cual podría disminuir los costos de campañas de vacunación masivas;
- la posibilidad de inserción de 2 genes en 1 ó 2 *loci* no esenciales, permitiendo su uso como vacuna bivalente;
- la posibilidad de utilización de los promotores poxvirales que permiten una expresión fuerte y temprana del antígeno de interés.

- la síntesis *de novo* del antígeno de interés desencadena respuestas inmunes protectoras de tipo celular y humoral
- la vacuna es efectiva al ser administrada por diferentes vías;
- la vacuna recombinante expresa un determinado conjunto de antígenos del patógeno permitiendo la discriminación entre animales naturalmente infectados y animales vacunados.

1.3.2.1 El virus vaccinia Ankara modificado y su uso como vector de expresión

El virus vaccinia Ankara modificado (MVA) es un poxvirus perteneciente al género *Orthopoxviridae*. Su genoma viral está totalmente secuenciado y posee 178 kpb (G Antoine y col. 1998; Gerhard Antoine y col. 1996)).

El MVA es un virus altamente atenuado obtenido luego de más de 570 pasajes de la cepa corioalantoidea del virus Vaccinia Ankara (CVA) en cultivos primarios de fibroblastos de embrión de pollo (FEP) (Gerd Sutter y Staib 2003). El fenotipo atenuado del MVA es el resultado de la delección de grandes porciones del genoma y numerosas mutaciones que afectaron particularmente a las proteínas que interactúan con el hospedador, a los genes con motivos tipo anquirina y a algunas proteínas estructurales (G Antoine y col. 1998; Blanchard y col. 1998). El virus MVA solo replica productivamente en cultivos de FEP, QT35d (células de embrión de codorniz) y BHK-21 (*Baby Hamster Kidney*) (Carroll y Moss 1997).

La metodología utilizada en la generación de poxvirus recombinantes es la recombinación homóloga *in vivo* entre el genoma viral y un ADN plasmídico que porta el gen de interés bajo regulación de un promotor temprano del virus vaccinia flanqueado por regiones virales no esenciales para la replicación viral *in vitro* (figura 3). Para la obtención de MVA recombinantes, los sitios banco de inserción más utilizados son los genes *MVA086R* y *MVA165R* que codifican para la enzima timidina quinasa viral (TK) y la proteína viral hemaglutinina (HA), respectivamente (Gerhard Antoine y col. 1996; Scheiflinger, Falkner, y Dorner 1996).

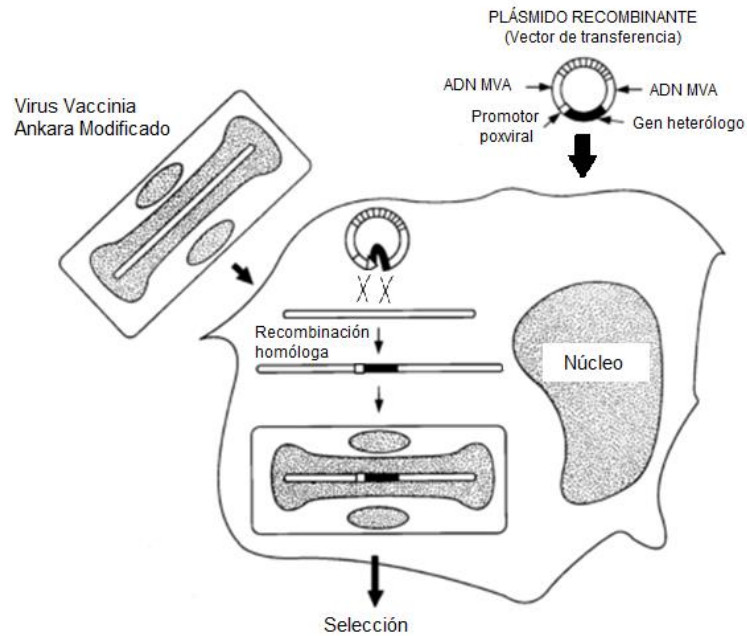


Figura 3. Construcción de MVA recombinantes. El proceso de recombinación homóloga *in vivo* ocurre entre el genoma viral y un plásmido de transferencia que lleva el gen de interés río abajo de un promotor poxviral y flanqueado por secuencias génicas poxvirales no esenciales que serán el sitio blanco de recombinación. Los virus recombinantes pueden ser identificados por una variedad de métodos. Adaptado de Moss y colaboradores (Moss 2013).

En la mayoría de las células de mamífero, el ciclo replicativo del virus MVA se encuentra bloqueado en una etapa tardía de la morfogénesis viral, impidiendo la síntesis de proteínas virales necesarias para la formación del virión (G Sutter y Moss 1992; Gallego-Gomez y col. 2003). Experimentos realizados con genes marcadores indican que para que ocurra una replicación eficiente del virus MVA en células de mamífero es necesario corregir múltiples defectos genéticos (Carroll y Moss 1997).

La ausencia de ensamblado del virus MVA en la mayoría de las células de mamífero otorga un perfil de seguridad porque permite que la inmunización se consiga en ausencia de replicación viral, lo cual disminuye considerablemente la posibilidad de una diseminación del vector en los animales vacunados y por consiguiente no es posible la dispersión por contacto hacia animales no vacunados o hacia el ambiente en general. Por otro lado, la seguridad del uso de MVA se demostró cuando se administró a 120.000 personas durante la campaña de erradicación de la viruela (como vacuna licenciada en Alemania en 1977; (H. Meyer y Paul-Ehrlich 2013) o en animales inmunodeficientes (Stittelaar y col. 2001). Los resultados obtenidos demostraron que MVA no es un virus patogénico y que puede usarse en animales e individuos inmunocomprometidos, a diferencia de otros poxvirus de tipo replicativo como VV.

Además, en la bibliografía se encuentran reportes que estudian la distribución tisular de distintos orthopoxvirus evidenciando la diferencia entre los poxvirus replicativos como

los virus VV (cepa *Western Reserve*) y aquellos de tipo no replicativo como los virus MVA y NYVAC (Ramirez y col. 2003; Gomez y col. 2008; Gómez y col. 2007). En conclusión, el virus MVA es considerado un vector no replicativo con probada seguridad y puede ser manipulado bajo condiciones de bioseguridad de nivel 1.

Existen numerosos ejemplos donde se demostró la eficacia de los esquemas de inmunización *prime-boost* heterólogos combinando vacunas vectorizadas recombinantes con otros vectores virales, con vacunas a subunidades proteicas, con vacunas génicas o con vacunas convencionales, en estudios de cáncer, HIV, tuberculosis, malaria y otros patógenos (Munseri y col. 2015; Hodgson y col. 2015; Vordermeier y col. 2004; Chapman y col. 2017; Betts y col. 2012; Lindsey y col. 2006; Santra y col. 2007; Rodriguez y Lemckert 2009; McShane 2002; Goonetilleke y col. 2003; Walther y col. 2006; Reyes-Sandoval y col. 2010; Calvo-Pinilla y col. 2012). Esta estrategia aumenta los niveles de protección y, según los vectores utilizados, contribuye a sobrepasar la inmunidad materna o la inmunidad anti-vector como la inducida por las vacunas vectorizadas por VV o adenovirus. Este esquema de *prime-boost* se basa en la inoculación secuencial de inmunógenos basados en diferentes vectores (inmunización heteróloga) para generar respuestas inmunes potentes y de gran avidez (Ramsay y col. 1999). El primer inmunógeno prima o inicia las células de memoria y el segundo inmunógeno expande la respuesta de memoria. Como los inmunógenos son diferentes (aunque expresan alguna proteína en común) no se generan respuestas de uno contra el otro por lo cual se minimiza la interferencia anti-vector.

Si bien la inmunogenicidad de los vectores virales es lo suficientemente elevada para ser eficaz, se ha demostrado que los MVA recombinantes son más potentes cuando son usados en regímenes de *prime-boost* heterólogos (Cottingham y Carroll 2013). En cuanto al desarrollo de vacunas humanas, en un ensayo clínico se demostró que el régimen de vacunación *prime-boost* combinando una primera dosis de vacuna de ADN con un refuerzo con un MVA recombinante induce una respuesta inmune efectiva, mediada por células T contra un antígeno de la malaria (McConkey y col. 2003).

La administración de MVA utilizando una vía inductora de inmunidad en mucosas fue descrita, por primera vez, en 1976 por Hochstein-Mintzel y colaboradores, observándose protección frente al desafío con poxvirus (Hochstein-Mintzel, Stickl, y Huber 1976). En el trabajo publicado por Gherardi y Esteban, los autores presentan una revisión detallada sobre la bibliografía existente acerca de la utilización de los poxvirus recombinantes como vectores virales inductores de inmunidad en mucosas demostrando la capacidad de éstos de despertar respuestas inmunes específicas en la superficie de distintos tipos de mucosas (Gherardi y Esteban 2005).

Bender y colaboradores demostraron que la inoculación intragástrica con virus MVA-H₁N₁ recombinantes resultó capaz de generar respuestas inmunes de mucosas protectoras contra el virus de influenza H₁N₁ (Bender y col. 1996). Luego, se demostró que la inmunización por vía intranasal e intramuscular con virus MVA recombinantes que expresaban las proteínas F o G del RSV confirió protección frente al desafío en un modelo murino (Wyatt y col. 2000).

Hasta el momento de la realización del presente trabajo de Tesis, se han desarrollado numerosos virus recombinantes basados en MVA, los cuales fueron evaluados como inmunógenos en sus respectivos modelos. La tablas 1 y 2 muestran algunos de los ejemplos de vacunas basadas en virus MVA recombinantes para combatir enfermedades causadas por distintos patógenos como virus, bacterias y parásitos (Gomez y col. 2008; Moss 2013). Además, en la actualidad se encuentran reportados numerosos ensayos clínicos que evalúan vacunas basadas en virus MVA recombinantes para diversos antígenos tumorales (Moss 2013; National Library of Medicine y National Institute of Health 2017).

Enfermedades virales	Vacuna	Seguridad/ inmunogenicidad	Referencia
Rabia	MVA-RG	Protección (Ratones)	(Weyer y col. 2007)
SARS	MVA-S	Protección (Ratones)	(Bisht y col. 2004)
Dengue	MVA-DEN2	Protección (Monos Rhesus)	(Men y col. 2000)
Influenza	MVA-HA-NP	Protección (Ratones)	(Bender y col. 1996)
HIV	Diversos antígenos (Env, Nef, gag, pol) simples o combinados	Ensayos clínicos en diversas fases	(García-Arriaza y col. 2011; Munseri y col. 2015; Bakari y col. 2011; Currier y col. 2010)
Hepatitis B	MVA-HBV-S	Ensayos clínicos en fase I	(Cavanaugh y col. 2011)
Influenza	MVA-NP y MVA-M1	Ensayos clínicos en fase I y II	(Berthoud y col. 2011; Antrobus y col. 2012)
Viruela	MVA solo	Ensayos clínicos en diversas fases	(Wilck y col. 2010; Seaman y col. 2010; Frey y col. 2007)

Tabla 1. Ejemplos de MVA recombinantes desarrollados contra enfermedades virales evaluados en estudios pre-clínicos.

Enfermedades bacterianas y parasitarias	Vacuna	Seguridad/ inmunogenicidad	Referencia
Malaria	Diversos antígenos (AMA1, poliproteína, MSP-1, /me-trap)	Ensayos clínicos en diversas fases	(Porter y col. 2011; Bejon y col. 2007; Dunachie y col. 2006)
	<i>Prime</i> : AdCh63-ME.TRAP / <i>Boost</i> : MVA-ME.TRAP	Protección (Ratones)	(Reyes-Sandoval y col. 2010)
Tuberculosis	MVA-85A	Ensayos clínicos en diversas fases	(Tameris y col. 2013; Hawkrigde y col. 2008)
	<i>Prime</i> BCG/ <i>Boost</i> MVA85A	Protección (Ratones)	(Goonetilleke y col. 2003)
		Respuesta celular sin protección (bovinos)	(Vordermeier y col. 2004)
<i>Leishmania</i>	<i>Prime</i> DNA-TRYP/ <i>Boost</i> MVA-TRYP	Protección (ratones)	(Stober y col. 2007)

Tabla 2. Ejemplos de MVA recombinantes desarrollados contra enfermedades bacterianas y parasitarias evaluados en estudios pre-clínicos.

Si bien los resultados obtenidos utilizando MVA como vector vacunal son alentadores, existe un fuerte interés en continuar optimizándolos a fin de inducir mejores respuestas protectoras. A pesar de la gran pérdida de regiones genómicas ocasionada durante los procesos de atenuación, en el genoma de MVA se conservan los genes involucrados en la estrategia de evasión de respuesta inmune del hospedador. Por lo tanto, una nueva generación de vectores, con inmunogenicidad mejorada, podría obtenerse mediante la delección dirigida de dichos genes involucrados en evasión de respuesta inmune. Ejemplos de esta estrategia son: el aumento en la inmunogenicidad de virus MVA luego de la eliminación del gen que codifica para la proteína de unión a la interleuquina 1 β (IL-1 β), la cual es secretada por las células infectadas (Staib y col. 2005); el aumento de la eficacia luego de la eliminación del gen *A41L* que codifica para una proteína de unión a quemoquinas (Clark y col. 2006); y la eliminación del gen *C6L* que codifica para un inhibidor de la inducción de IFN- β (García-Sastre 2004).

Se ha descrito que la expresión de la proteína de unión a interleuquina 18 (IL-18bp) resulta importante como mecanismo de evasión de la respuesta inmune durante una infección, bloqueando la expresión de IL-18 y, de esta manera, la expresión de IFN- γ , principal citoquina presente en las respuestas antivirales. La IL-18 por su parte tiene un papel fundamental en la regulación de las respuestas inmunitarias tanto innatas como específicas. Esta citoquina es un mediador importante en la respuesta de tipo Th1

mediante la inducción de la secreción de IFN- γ por parte de las células T y las NK (*Natural Killer*) (Dinarelli 1999). La IL-18 también favorece la maduración de células T y NK, la producción de citoquinas y la citotoxicidad (Yoshimoto y col. 1998; Gracie, Robertson, y McInnes 2003; Okamura y col. 1995). Además, la IL-12 y la IL-18 actúan de manera sinérgica para promover una respuesta inmunitaria polarizada hacia Th1, las cuales juegan un rol crítico en la defensa contra patógenos intracelulares mediante la producción de IFN- γ (Yoshimoto y col. 1998). Un estudio realizado por Dai y colaboradores describió los efectos ocasionados por la delección del gen IL-18bp del genoma del vector viral Vaccinia Tiantan (TV), observando una disminución en la virulencia del virus parental sin afectar su inmunogenicidad (Dai y col. 2008).

En nuestro laboratorio se obtuvo un virus MVA que carece del gen *008L* que codifica para IL-18bp (MVA Δ 008). Se demostró que MVA Δ 008 indujo un aumento en la respuesta celular T CD4+ y CD8+ respecto del vector viral convencional, tanto frente a antígenos del propio vector como frente a la proteína Nef de HIV (Falivene y col. 2012). Estos resultados sugieren que el vector optimizado MVA Δ 008 constituye una interesante herramienta a utilizar al momento de diseñar vacunas de nueva generación, especialmente por el rol que IL-18 presenta en la producción de IFN- γ y en el desarrollo de una respuesta inmunitaria de tipo Th1 (Shoda y col. 1999; Muneta y col. 2005; Moss 1996).

1.3.2.2 Vectores virales basados en poxvirus como vacunas contra BRSV

Existe una amplia variedad de vectores virales utilizados como plataforma para el desarrollo de vacunas recombinantes. Entre ellos se destacan los poxvirus de replicación limitada (MVA, NYVAC, canarypox y fowlpox), los adenovirus (Ad) con replicación deficiente, el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), el virus Parainfluenza tipo 3 (PIV-3) y el Herpes Virus Bovino tipo 1 (BoHV-1).

Particularmente, y como se mencionó previamente, se obtuvieron numerosos vectores virales que portan genes codificantes de las proteínas F, G, M2 o N del BRSV:

- rVV-F, rVV-G, rVV-N, rVV-M2 (G Taylor y col. 1997)
- BoHV-1-G (G. Taylor y col. 1998)
- rMVA-F y rMVA-F/G (Antonis y col. 2007)
- MVA-RSV y PanAd3-RSV conteniendo las secuencias de las proteínas F, M2-1 y N de HRSV evaluados en un modelo de desafío contra BRSV (Geraldine Taylor y col. 2015).

Como se describió previamente, los principales antígenos blanco para el desarrollo de vacunas recombinantes son las glicoproteínas F y G y, en menor grado, las proteínas N y M (G Taylor y col. 1997). Particularmente, la proteína F madura de los paramixovirus

es un homotrímero de las subunidades F1 + F2. Ese trímero se ensambla en la partícula viral en una estructura metaestable llamada pre-fusión F. Una vez que el virus se une a la superficie de la célula blanco, la proteína F es activada para iniciar la fusión del virus con la membrana celular (Lamb 1993). Durante este proceso, la proteína F experimenta una serie de cambios conformacionales que terminan en una estructura altamente estable llamada de post-fusión. McLellan y colaboradores reportaron que la forma estabilizada soluble de la proteína F de pre-fusión era capaz de inducir mayores niveles de anticuerpos neutralizantes que la forma soluble de la proteína de post-fusión (McLellan y col. 2013).

En este sentido la proteína F de pre-fusión se posiciona como el inmunógeno más promisorio para ser utilizado en candidatos vacunales (Melero y Mas 2015).

Una desventaja de esta estructura de pre-fusión es su inestabilidad. Sin embargo, se ha reportado que la inmunización de conejos con rVV que expresan la proteína F completa induce anticuerpos específicos contra la proteína de pre-fusión (Magro y col. 2012). En ese sentido, es posible que las vacunas vivas basadas en cepas atenuadas de BRSV (Karron, Buchholz, y Collins 2013) o vacunas basadas en vectores virales (Morrison y Walsh 2013) sean también capaces de inducir altos títulos de anticuerpos neutralizantes específicos debido a su capacidad de expresar la forma de pre-fusión de la proteína F.

En base a estos antecedentes, en el desarrollo de vacunas vectorizadas, la proteína F de BRSV sería el antígeno de elección con el propósito de inducir una respuesta inmunitaria humoral capaz de neutralizar a BRSV.

Teniendo en cuenta el impacto económico que genera la enfermedad causada por el BRSV a nivel mundial en los distintos sistemas productivos, dada la falta de información actualizada en Argentina y la importancia que tiene en nuestro país la producción ganadera, este trabajo de Tesis está dirigido a actualizar los estudios de seroprevalencia de BRSV en bovinos y otras especies de interés productivo para contribuir al diseño de estrategias de prevención y control de la enfermedad.

Además, con el propósito de disponer de inmunógenos capaces de inducir respuestas inmunitarias humorales y celulares contra BRSV nos proponemos desarrollar y evaluar un virus MVA que porte la secuencia codificante de la proteína F del BRSV como una herramienta prometedora para mejorar las vacunas utilizadas para la prevención de la infección por dicho virus.

Hipótesis

- El BRSV está ampliamente distribuido en bovinos de tambo, cría y engorde a corral de Argentina y también se encuentra presente en otras especies no bovinas de interés productivo.
- En un modelo murino, la vacuna experimental MVA-F induce una respuesta inmunitaria más eficiente, en términos de perfil de respuesta (humoral y celular) que una vacuna convencional a virus BRSV completo.

Objetivos generales

- Actualizar los estudios epidemiológicos del BRSV en la región.
- Obtener un candidato vacunal basado en el virus vaccinia Ankara modificado (MVA) que expresa la proteína F de BRSV.

Este trabajo pretende generar nuevos conocimientos y herramientas que permitan optimizar las estrategias de prevención y control del BRSV con el objetivo final de contribuir con el sector productivo de nuestro país mediante la mejora del *status* sanitario de los rodeos.

Objetivos específicos

1. Evaluar la seroprevalencia de BRSV en bovinos de distintos sistemas productivos y estudiar la presencia de anticuerpos contra BRSV en otras especies animales de interés agropecuario.
2. Describir la dinámica de circulación del BRSV en sistemas de cría, tambos y engordes a corral.
3. Obtener virus MVA recombinantes que porten y expresen la secuencia codificante de la proteína F de BRSV.
4. Evaluar la inmunogenicidad del vector recombinante en esquemas de *prime-boost* homólogo o heterólogo en un modelo murino.

CAPÍTULO 1: Estudio epidemiológico del BRSV en Argentina

2.1 Materiales y Métodos

2.1.1 Células y virus

2.1.1.1 Células

Las células utilizadas, tanto para los ensayos de seroneutralización como para las producciones de virus BRSV fueron las *Madin Darby bovine kidney* (MDBK), dada su susceptibilidad a la infección por BRSV. Estas células fueron suministradas por la sección de Cultivo de Tejidos del Instituto de Virología del INTA Castelar. Se utilizó como medio de mantenimiento una mezcla (1:1) de MEM-E (*Eagle's minimal essential medium*) y MEM-D (*Dulbecco's minimal essential medium*) (GIBCO BRL), suplementado con 2 % de suero fetal bovino (Internegocios) y antibiótico/antimicótico (100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 0,25 µg/ml de anfotericina B, (Invitrogen)).

2.1.1.2 Virus

Para todos los ensayos descritos se utilizó la cepa A51908 de BRSV, adquirida de ATCC, cedida por la Dra. Karina Trono del Laboratorio de Virus Adventicios de INTA, Castelar.

La cepa de referencia de BRSV fue multiplicada en células MDBK. Se infectaron monocapas con una confluencia del 90 % en frascos T175 a una MOI = 0,1. Luego de la adsorción viral, se agregó medio de mantenimiento y se incubó a 37 °C en atmósfera de 5 % CO₂. A los 5 días posteriores a la infección, luego de alcanzar un efecto citopático (ECP) mayor al 80 %, los frascos fueron sometidos a un ciclo de congelado-descongelado, para luego realizar la cosecha del virus, seguida por un paso de clarificación por centrifugación a 3250 x g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante obtenido fue alicuotado y almacenado a -70 °C hasta su utilización.

2.1.2 Titulación viral

El título infeccioso de las producciones virales fue determinado por ECP mediante la metodología de Reed y Muench (1938) (Reed y Muench 1938).

La titulación se realizó en monocapa de células MDBK, por cuadruplicado en placas de cultivo de 96 pocillos (NUNC). Se inoculó la monocapa celular con 100 µl de BRSV en 7 diluciones seriadas en base 10 en medio de cultivo MEM-E:MEM-D (1:1) y se dejó

una fila de pocillos sin inocular como control de toxicidad celular. La placa se incubó a 37 °C en atmósfera de 5 % CO₂ durante 5 días. La lectura se realizó por observación de ECP al microscopio óptico (MO) y se consideró positivo a aquel pocillo que presentó al menos un foco de ECP. Los títulos infecciosos se expresaron como Dosis Infecciosa de Cultivo de Tejidos 50 %/ml (DICT50/ml), definido como aquella dilución de una suspensión viral necesaria para infectar el 50 % de un número dado de pocillos de la placa.

2.1.3 Seroneutralización viral (SN)

El ensayo de seroneutralización para la detección de anticuerpos contra el BRSV se basó en la técnica descrita por Samal y colaboradores (Samal y Pastey 1993). Se empleó el método suero variable-virus fijo, en el cual diluciones variables de sueros problema (seriadas base 4) se enfrentaron a una cantidad establecida y fija de virus (100 DICT50/ml). Brevemente, los sueros provenientes de distintas especies se inactivaron a 56 °C durante 30 minutos. Las diluciones de las muestras se realizaron en MEM-E: MEM-D (1:1). Las muestras se sembraron por triplicado en placas de 96 pocillos, en las diluciones apropiadas en medio de mantenimiento. Luego, en las primeras 2 réplicas de cada dilución de suero se agregó un volumen de la dilución del virus de trabajo en una proporción 1:1. Como control de toxicidad de la muestra, a la tercera réplica se le agregó sólo medio de mantenimiento. Las placas con la mezcla suero-virus se incubaron a 37 °C en atmósfera de 5 % CO₂ durante 1 hora y luego se trasvasaron 100 µl de dicha mezcla sobre una monocapa preformada de células MDBK (25000 células/pocillo) en placas de 96 pocillos. La lectura del ensayo se realizó por observación del ECP al MO entre los 4-5 días posteriores a la infección. En cada ensayo se incluyeron los siguientes controles: un control positivo fuerte (Cf+: suero hiperinmune anti-BRSV de cobayo o suero positivo de bovino infectado naturalmente, un control positivo débil (Cd+: suero hiperinmune de cobayo o suero positivo de bovino) y un control negativo (C-: suero normal de cobayo o suero de bovino negativo). Asimismo, se incluyeron un control de células sin infectar y el control de la dilución del virus de trabajo (control 100 DICT).

Las muestras se consideraron positivas cuando se observó la inhibición del ECP característico en una dilución determinada (título igual o mayor a 4). El título de anticuerpos se expresó como la inversa de la máxima dilución en la que no se observa ECP.

2.1.4 Aislamiento viral

2.1.4.1 Obtención y procesamiento de muestras

Las muestras analizadas se obtuvieron a partir de animales con signología respiratoria o de animales que murieron durante los muestreos y presentaban lesiones compatibles con la enfermedad respiratoria. Se analizaron muestras de pulmón e hisopados nasofaríngeos.

2.1.4.2 Muestras de pulmón

Una vez realizada la necropsia, se recolectó una muestra de 5 cm² de pulmón de los lóbulos pulmonares cráneo-ventrales, se envolvió en papel de aluminio y se colocó en un termo con nitrógeno líquido hasta su procesamiento. Posteriormente, en condiciones de esterilidad, se cortó un cubo de aproximadamente 1 cm³ y se colocó en un mortero estéril, luego se agregó arena estéril y 1 ml de MEM-D: MEM-E (1:1) conteniendo 5 % de SFB y se procedió al macerado del órgano. Una vez disgregado completamente el tejido, el contenido se transfirió a un tubo de centrifuga.

El material obtenido se centrifugó a 6000 x g durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante obtenido se procesó a través de la técnica de aislamiento viral en cultivo de células y detección de genoma viral por PCR. Una alícuota del mismo se conservó a -70 °C.

2.1.4.3 Hisopados nasales

Para la obtención de estas muestras de bovinos, el hisopo fue introducido profundamente en cavidad nasal y posteriormente sumergido en medio de transporte (MEM-D: MEM-E (1:1), 5 % de SFB, 1 % de antibióticos (estreptomicina, gentamicina y ampicilina) y 0,2 % de fungizona. Las muestras se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su procesamiento. Para la siembra de las mismas los hisopados se descongelaron y se homogeneizaron mediante vortex; luego se prosiguió con el protocolo para aislamiento viral en cultivo de células y detección de genoma viral por PCR (ver apartado 2.1.4.4 y 2.1.5). Una alícuota de los mismos se reservó a -70 °C.

2.1.4.4 Aislamiento en cultivo de células

A partir de muestras mencionadas en el punto 2.1.6.2.1 de materiales y métodos (hisopados nasales y pulmones de bovinos de establecimientos de engorde a corral) se realizaron pasajes seriados en células MDBK. Para esto, se sembraron 50 µl de cada muestra por cuadruplicado en placas de 96 pocillos conteniendo una monocapa de células con una confluencia del 80 %. Para favorecer la absorción viral se incubó una hora a 37 °C en atmósfera con 5 % CO₂. Finalmente, se agregaron 50 µl de medio de

mantenimiento a cada pocillo, y se incubó durante 5 días en las condiciones descriptas anteriormente. La aparición de ECP se chequeó diariamente. Transcurridos los 5 dpi, las placas se congelaron a -70°C . Para los siguientes pasajes, las muestras se descongelaron y centrifugaron a $1000 \times g$ durante 20 minutos. El sobrenadante se sembró sobre una monocapa de células MDBK en placas de 96 pocillos. Se continuó el procedimiento detallado anteriormente hasta la aparición de ECP. En caso de no observarse ECP, se realizaron hasta 7 pasajes ciegos.

2.1.5 Detección del genoma viral del BRSV mediante PCR

Con el fin de diagnosticar la infección por el BRSV mediante la detección del genoma viral, se llevó a cabo un ensayo de RT- *nested* PCR (RT-nPCR) según el protocolo descrito por Vilcek y colaboradores (Vilcek y col. 1994).

2.1.5.1 Extracción de ARN

Se realizó la extracción de ARN a partir de un lote viral (10^5 DICT50/ml) y de cada una de las muestras provenientes de animales con sintomatología respiratoria. Brevemente, se agregó 1 ml de TRIzol® (Invitrogen™) a 200 μl del lote viral/muestra, se homogeneizó mediante vortex y se dejó reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregaron 200 μl de cloroformo. Nuevamente se mezcló mediante vortex, se dejó reposar durante 3 minutos y se centrifugó a $8500 \times g$ durante 10 minutos a temperatura ambiente. La fase acuosa y se le agregó 10 μl de glicógeno 5 mg/ml (Ambion) y 500 μl de isopropanol y se mezcló por inversión. Se dejó reposar durante 3 minutos y luego se centrifugó a $21000 \times g$ durante 20 minutos a 4°C . El sobrenadante se descartó mientras que el *pellet* se lavó con 200 μl de etanol 75 %. Nuevamente se centrifugó 2 minutos en iguales condiciones y el etanol fue descartado. El *pellet* se secó en baño seco a 65°C y finalmente se resuspendió en 20 μl de agua DEPC (dietilpirocarbonato) agregando 1 μl de RNAsin® (Promega). Una vez extraído, el ARN se guardó a -70°C hasta su utilización.

2.1.5.2 Oligonucleótidos iniciadores

Se utilizaron los oligonucleótidos descriptos por Vilcek y colaboradores que amplifican una secuencia conservada de la proteína F del BRSV (Vilcek y col. 1994).

Los oligonucleótidos externos, denominados B1 y B2A, amplifican una región de ADN de 711 pares de bases (pb) y los oligonucleótidos internos, denominados B3 y B4A amplifican una región de 481 pb (Tabla 3).

Oligonucleótido	Secuencia nucleotídica	Posición	Producto	Fuente
B1	AATCAACATGCAGTGCAGT TAG	114-135	711 pb	(Vilcek y col. 1994)
B2A	TTTGGTCATTCGTTATAGG CAT	824-803		
B3	GTGCAGTTAGTAGAGGTTA TCTTAGT	126-151	481 pb	(Vilcek y col. 1994)
B4A	TAGTTCTTTAGATCAAGTA CTTTGCT	606-581		

Tabla 3: Oligonucleótidos internos y externos utilizados: Secuencia de oligonucleótidos internos y externos en orientación 5'→3', utilizados en la técnica de RT-nPCR.

2.1.5.3 Síntesis de ADNc

Para la obtención de ADN complementario (ADNc) a partir del ARN extraído, se llevó a cabo una transcripción reversa (RT-PCR). Se utilizó la enzima M-MLV RT (*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*, Promega). Primeramente, se colocaron 1,5 pmol de cada uno de los oligonucleótidos específicos (B1 y B2A), 6,25 µl de agua DEPC y 6,25 µl de ARN en un tubo de reacción para PCR. Se le agregó 13 µl de una mezcla conteniendo 5 µl de M-MLV buffer 5X (Promega), 0,25 µl de RNAsin® (Promega), 1 µl de DTT (ditiotreitól) 0,1 M, 1 µl de dNTPs (Promega), 0,5 µl de M-MLV RT (Promega) y 10,25 µl de agua DEPC (Sigma). Una vez preparada la mezcla de reacción, se llevó a cabo la transcripción reversa según el siguiente programa: se incubó la mezcla a 42 °C durante 60 minutos y luego la enzima fue inactivada mediante una incubación de 5 minutos a 95 °C. Una vez obtenido, el ADNc se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

2.1.5.4 Nested PCR

El primer *round* se llevó a cabo en 25 µl de mezcla de reacción conteniendo 5 µl de *GoTaq buffer* 5X (Promega), 1,5 µl de MgCl₂ 25 mM, 0,5 µl de dNTPs 10mM (Promega), 1,5 pmol de cada oligonucleótido externo (B1 y B2A), 0,25 µl de *GoTaq Polymerase* 5U/µl (Promega), 5 µl de ADNc y 11,75 µl de agua DEPC (Sigma). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (T-18 IVEMA) con un perfil de ciclado como se detalla a continuación:

94 °C	5 min	35 ciclos
94 °C	45 seg	
50 °C	45 seg	
72 °C	1 min 30 seg	

72 °C 7 min

El segundo *round* se llevó a cabo amplificando 1 µl del producto de PCR del primer *round*, en las mismas condiciones de reacción, pero utilizando en este caso 15 pmol de los oligonucleótidos internos (B3 y B4A). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (T-18 IVEMA) con un perfil de ciclado como el descrito para el primer *round*.

2.1.5.5 Electroforesis en gel de agarosa

A fin de observar los productos de amplificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa. El gel se preparó con buffer TAE 1X (0,484 % m/v Tris/ 0,1142 % v/v Ácido acético 99.7 %, 0,05M EDTA 0,5 M, pH 8) y 1 % p/v de agarosa y luego se agregó bromuro de etidio en una concentración de 0,5 µg/ml de gel. Para sembrar las muestras se utilizó un *buffer* de siembra de concentración 10X (glicerol 50 %, TAE 5X, azul de bromofenol 1 %). La separación electroforética fue llevada a cabo en buffer TAE 1X y aplicando un voltaje constante de 100 V, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Terminada la corrida, se verificó la amplificación mediante la visualización de las bandas de ADN en el gel en un transiluminador de luz UV.

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

2.1.6 Estudios epidemiológicos

2.1.6.1 Estudio de prevalencia

2.1.6.1.1 Diseño estadístico del muestreo para el estudio de seroprevalencia en bovinos

Para determinar la prevalencia de BRSV en la región pampeana, se diseñó un muestreo aleatorio en dos etapas. En la primera etapa se seleccionaron los establecimientos (unidades primarias de muestreo) y en la segunda los animales (unidades secundaria de muestreo) a incluir en el muestreo. Se seleccionaron entonces establecimientos de cría, tambos y engordes a corral con una cantidad mayor o igual a 200 animales. De los establecimientos seleccionados sólo animales mayores a 6 meses de edad se incluyeron en el estudio, para evitar la detección de anticuerpos calostrales. Se evaluó la presencia de AN contra BRSV mediante la técnica de SN.

Las muestras para el estudio provinieron de las provincias de Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe, las cuales concentran el 54.7% de las existencias del país (Indicadores Ganaderos 2016, SENASA (SENASA 2017)). Los muestreos se hicieron durante el

período junio 2011- junio 2016 y todos ellos se realizaron con el consentimiento de los propietarios de los establecimientos.

Para determinar el tamaño de la muestra se consideró un nivel de confianza del 95 %, un error relativo máximo aceptable del 20% dependiendo de la categoría de bovinos y del sistema productivo. La prevalencia esperada “*a priori*”, fue establecida en base a datos bibliográficos.

Para los cálculos del tamaño de muestra fue utilizado el *software* CSurveyVersion 2.0, desarrollado por el Departamento de Epidemiología de la Universidad de California, (UCLA).

Las siguientes tablas resumen el diseño del muestreo en los tres sistemas productivos analizados (Tablas 4 y 5).

Los muestreos realizados en rodeos de cría y tambos se hicieron en dos rangos etarios distintos mientras que los realizados en establecimientos de engorde a corral, sólo abarcaron animales mayores a 6 meses. Esto es así debido al propio manejo productivo dentro de cada sistema, resultando imposible hacer una división etaria en establecimientos de engorde a corral ya que estos van a faena a los 14-15 meses de edad (Costa y col. 2003; Robert y col. 2009; Pordomingo 2004).

Edad	Rodeo de cría y tambo		
	n° establecimientos	n° bovinos/establecimiento	Total
6-18 meses	25	10	250
>18 meses	25	5	125
Total	50	15	375

Tabla 4. Diseño de la toma de muestras para animales de rodeos de cría y tambos. Se muestrearon animales de dos rangos etarios.

Edad	Engorde a corral		
	n° establecimientos	n° bovinos/establecimiento	Total
> 6 meses	10	180	180

Tabla 5. Diseño de la toma de muestras para animales de establecimientos de engorde a corral. Se muestrearon animales mayores a 6 meses.

2.1.6.1.2 Evaluación de la presencia de AN contra BRSV en otras especies animales de interés agropecuario

Se obtuvieron muestras de especies no bovinas (caprinos, camélidos, ovinos y bubalinos) de interés productivo de las provincias de Corrientes, Chaco, Salta y de la región de la Patagonia, a través de muestreos no aleatorios por conveniencia, aportados por varios grupos de trabajo de las EEA (Estación Experimental Agropecuaria, INTA) con los que se han implementado colaboraciones técnicas de diagnóstico (Tabla 6). Se evaluó la presencia de AN contra BRSV mediante la técnica de SN.

	Región	n
Caprinos	Patagonia	130
	Salta	89
Ovinos	Patagonia	14
	Corrientes	36
Camélidos	Corrientes	10
Búfalos	Corrientes - Chaco	309

Tabla 6. Muestras obtenidas de especies no bovinas.

2.1.6.2 Estudio de circulación viral

2.1.6.2.1 Diseño de estudios longitudinales para la evaluación de la circulación de BRSV

Toma de muestras en establecimientos de engorde a corral.

Se tomaron muestras de sangre de 30 bovinos al tiempo 0 (ingreso al establecimiento), 30 y 60, en establecimientos de la provincia de Buenos Aires en dos años consecutivos (2014 y 2015). Además, se tomaron muestras de hisopados a los tiempos 0, 15 y 30.

En estos establecimientos, también se tomaron muestras de pulmón de aquellos animales que murieron durante los muestreos y que presentaban lesiones compatibles con enfermedad respiratoria.

Toma de muestras en tambos.

Se evaluaron los niveles de anticuerpos neutralizantes contra el BRSV en bovinos de un tambo cerrado (rodeo de reposición propia, es decir, que no incorporan animales de otros orígenes) de la provincia de Santa Fe. Se tomaron muestras de sangre de 60 animales desde su nacimiento hasta los 36 meses de edad, cada tres meses.

Se evaluó la presencia de AN contra BRSV mediante la técnica de SN.

2.1.6.3 Análisis estadísticos de los datos

La prevalencia aparente de AN contra BRSV y los intervalos de confianza analizados para cada uno de los sistemas productivos evaluados se calcularon utilizando el programa PROMESA para diseños de muestreo en dos etapas.

Para el análisis del muestreo con diseño transversal de engordes a corral, a proporción de animales seropositivos entre grupos se comparó mediante el *test* Chi-cuadrado y la comparación del título de AN entre grupos se llevó a cabo mediante el *test* Kruskal-Wallis *All-Pairwise Comparisons*.

Los datos epidemiológicos se colectaron mediante entrevistas a los productores de cada establecimiento de engorde a corral muestreado. Se incluyeron las variables edad, raza (Holstein, Aberdeen Angus, Hereford) y el peso de cada animal muestreado. También se recopilaron datos del origen de los animales, el tamaño de la tropa, el tamaño del establecimiento al cual la tropa fue introducida y el tiempo de permanencia (número de días desde el ingreso) y la presencia de signos de enfermedad respiratoria de cada muestra.

Las asociaciones entre las variables independientes (obtenidas a partir del cuestionario) y el estado serológico de BRSV se llevaron a cabo utilizando el *test* Chi-cuadrado y se expresó como razón de prevalencia (PR). Se evaluaron además, dos variables dependientes: seropositividad (positivo/negativo) y positivo con títulos de AN mayores a 32 (Sí/No). Para homogeneizar las escalas de las variables explicatorias, todas las variables cuantitativas se transformaron en cualitativas con dos categorías, tomando la mediana como el punto de corte.

2.2 Resultados

2.2.1 Estudio epidemiológico de BRSV en bovinos de Argentina

2.2.1.1 Obtención de las muestras

El diseño de obtención de las muestras se encuentra detallado en la sección 2.1.6.1.1 de materiales y métodos de este capítulo.

2.2.1.2 Seroprevalencia de BRSV en bovinos de rodeos de cría, tambos y engordes a corral.

Se obtuvieron 856 muestras de bovinos, tal como se describe en el apartado materiales y métodos, pertenecientes a los 3 sistemas productivos. La evaluación de las mismas por SN mostró una seropositividad del 84,11 %.

En la figura 4 se detallan los porcentajes de seroprevalencia y el promedio de AN de los animales seropositivos para cada uno de los sistemas productivos y sus respectivos subgrupos.

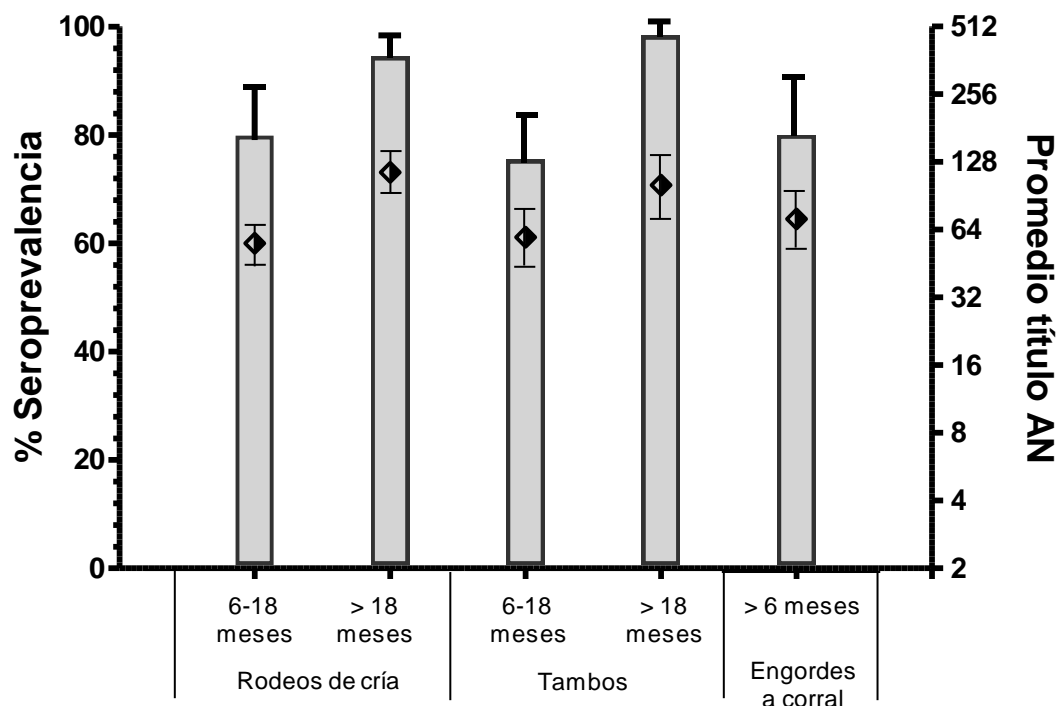


Figura 4. Prevalencias de BRSV en rodeos de cría, tambos y establecimientos de engorde a corral. Se muestran en el eje X los sistemas productivos con sus respectivos rangos etarios. En el **eje Y de la izquierda** se graficó el porcentaje de seroprevalencia (barras) y en el **eje Y de la derecha** el promedio del título de AN de los animales seropositivos (rombos).

2.2.1.3 Seroprevalencia en rodeos de cría

Se evaluaron rodeos de cría de las provincias de Buenos Aires, Santa Fe y Córdoba. En este caso, para cada grupo etario se muestrearon 25 establecimientos, obteniéndose entre 10-20 muestras y entre 5-25 muestras, de suero, por establecimiento, respectivamente.

Se analizaron en total 303 muestras para el grupo 6-18 meses. Se detectaron AN específicos contra BRSV en 242 de las mismas, siendo la prevalencia individual aparente igual a 79,9 % (intervalo de confianza 95 % (IC= 70,1-89,7 %)).

En el caso del grupo etario de animales mayores a 18 meses se analizaron en total 197 muestras de las cuales 186 resultaron ser seropositivas. La prevalencia individual aparente fue de 94,42 % (IC = 89,9-98,7 %).

La mediana de las prevalencias intrapredio resultó ser del 85,7 % (rango= 0-100 %) para el primer rango etario y de 100 % (rango= 66,7-100 %) para el segundo grupo.

2.2.1.4 Seroprevalencia en tambos

El muestreo de tambos presentó conflictos logísticos, debido a la dificultad para encontrar tambos en los que no se vacunara para BRSV.

Debido a ello, sólo se pudieron analizar en total 59 muestras para el grupo 6-18 meses y se detectaron AN específicos contra BRSV en 44 de esas muestras de suero analizadas para dicho rango etario. La prevalencia individual aparente fue de 74,4 % (IC= 58,1-92,6 %).

En el caso del grupo de animales mayores a 18 meses se analizaron en total 57 muestras de las cuales 56 resultaron ser seropositivas, siendo la prevalencia individual aparente igual a 98,25 % para el grupo de 6-18 meses (IC= 94,1-100 %).

Las medianas de las prevalencias intrapredio resultaron ser de 90 % (rango= 30-100 %) para el primer rango etario y de 100 % (rango= 90-100 %) para el segundo grupo.

2.2.1.5 Seroprevalencia en engordes a corral

Se detectaron AN específicos contra BRSV en 160 de 230 muestras de suero obtenidas. La prevalencia individual aparente de BRSV fue de 78.64 % (IC= 66.55-90.75 %).

La mediana de la prevalencia intrapredio resultó ser de 83,33 % (rango= 31,6-100 %).

2.2.1.5.1 Análisis de factores asociados a la seroprevalencia para BRSV en engordes a corral

Con el objetivo de identificar potenciales factores asociados a la seropositividad a BRSV, junto al muestreo de los establecimientos de las provincias de Santa Fe y Córdoba para evaluar la prevalencia se llevó a cabo un cuestionario a los encargados de dichos establecimientos a fin de registrar parámetros considerados de relevancia para la infección por BRSV. Los factores que se registraron fueron elegidos a partir de una búsqueda bibliográfica: edad, peso y raza de los animales, tamaño de la tropa, tiempo de estadía en el establecimiento (número de días desde la llegada), origen de los animales, presencia/ausencia de signos de enfermedad respiratoria durante el muestreo y temporada en la que se realizó el muestreo.

Las asociaciones entre variables independientes (factores obtenidos a partir del cuestionario) y el estado serológico de BRSV se analizaron usando el test Chi-cuadrado y expresadas como razón de prevalencia (PR). Se llevaron a cabo 2 análisis independientes, utilizando como variables dependientes: seropositividad (Positivo/Negativo) y positividad con título de AN >32 (Si/No), debido a que, en base a datos bibliográficos, títulos mayores a 32 se consideran elevados. Con el objetivo de homogeneizar las escalas de las variables explicatorias, todas las variables cuantitativas se transformaron a variables cualitativas con dos categorías, tomando las medianas como el punto de corte.

Los establecimientos de engorde a corral en Argentina suelen comprar animales de diferentes fuentes, algunos provienen por compra directa de rodeos de cría mientras que otros provienen por compra indirecta en ferias o remates. Debido a esto, la mezcla de animales de distintos orígenes es común. En muchos trabajos, esta práctica ha sido altamente asociada con una mayor frecuencia de ERB, como una consecuencia evidente de mezclar animales con diferentes estados inmunológicos o infecciosos (Hilton 2014; Martin y col. 1982; Martin 1983).

Mediante un análisis preliminar en un test Chi-cuadrado se observó asociación de la edad y el origen de los animales con la presencia de AN contra BRSV en el análisis univariable. El resto de las variables ensayadas (raza, temporada de muestreo, presencia de signos clínicos y tamaño de la tropa) no mostraron asociación significativa con la seropositividad.

Con respecto a la segunda variable analizada, es decir positividad a título de AN >32 (Si/No), el test Chi-cuadrado preliminar mostró asociación ($p < 0,10$) entre la presencia de altos títulos de AN contra BRSV y los factores de riesgo: edad, origen de los animales, presencia de signos clínicos y tamaño de la tropa (Tabla 7).

VARIABLES	Categorías	PR	95% IC
Edad (meses)	≤ 9 *	1,39	[1,07-1,79]
	> 9		
Origen	Compra directa*	2,27	[1,45-3,56]
	Compra indirecta		
Tamaño de la tropa	≤ 2000 *	2,09	[1,21-3,58]
	> 2000		
Signos clínicos	No *	1,79	[1,17-2,74]
	Si		

Tabla 7. Variables asociadas a nivel individual ($p < 0,1$) con presencia de altos títulos de AN (>32) en establecimientos de engorde a corral de Argentina. *Categoría de referencia

A su vez, como los animales de dicho relevamiento fueron muestreados en diferentes períodos de días luego de su llegada al establecimiento, (Mediana de 35 días; rango= 4-70) resultó de nuestro interés evaluar la asociación entre los títulos de AN y el tiempo de permanencia en el engorde a corral. Para ello, el total de animales se dividió en dos grupos: animales que habían pasado menos de 35 días (Grupo A: ≤ 35) o animales que habían superado los 35 días de estadía en el establecimiento (Grupo B: > 35) al momento del sangrado.

Los porcentajes de prevalencia de animales seropositivos en los dos grupos variaron de 70,2 % a 89,6 %, siendo esta diferencia significativa ($\chi^2 = 13,64$, $p < 0,0002$). Además, el grupo B mostró una media de títulos de NA (igual a 64) significativamente mayor que el grupo A (igual a 8) ($p < 0,05$) (Figura 5).

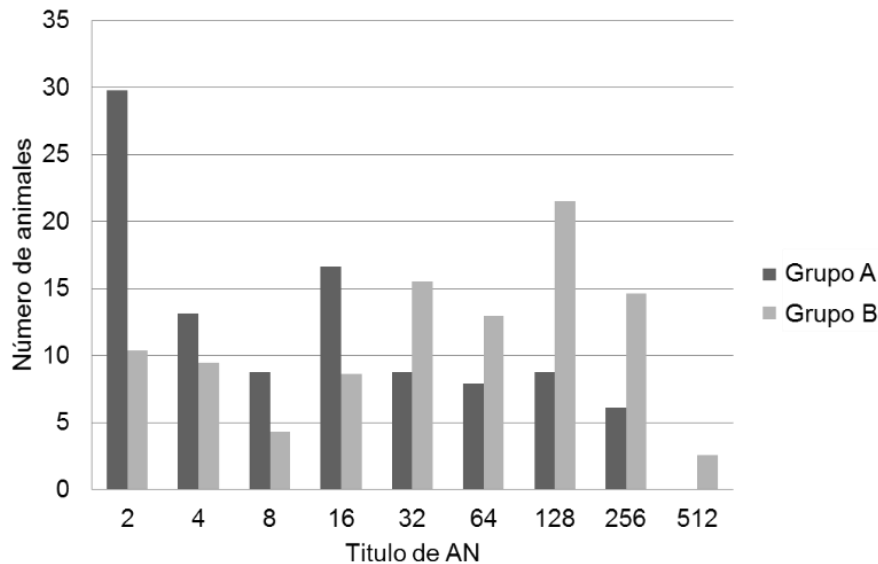


Figura 5: Frecuencia de los títulos de AN en los grupos definidos de acuerdo al tiempo de permanencia en el establecimiento de engorde a corral. Las barras negras representan a aquellos animales que permanecieron ≤ 35 días en el establecimiento mientras que las barras grises representan a aquellos que permanecieron por más de 35 días.

Estos resultados representan una evidencia indirecta de la circulación activa del agente en el sistema productivo. Por lo que posteriormente, se propuso realizar ensayos longitudinales en el sistema de engorde a corral, para poder, por un lado, corroborar circulación del virus y, por el otro, intentar la identificación del agente.

2.2.2 Estudio de prevalencia en otras especies animales de interés agropecuario

En paralelo a los estudios de prevalencia descriptos anteriormente, a través de muestreos no aleatorios por conveniencia, se evaluó la presencia de AN en cabras, ovejas, búfalos y llamas de distintas regiones de Argentina. En la siguiente figura se detallan los resultados obtenidos (figura 6).

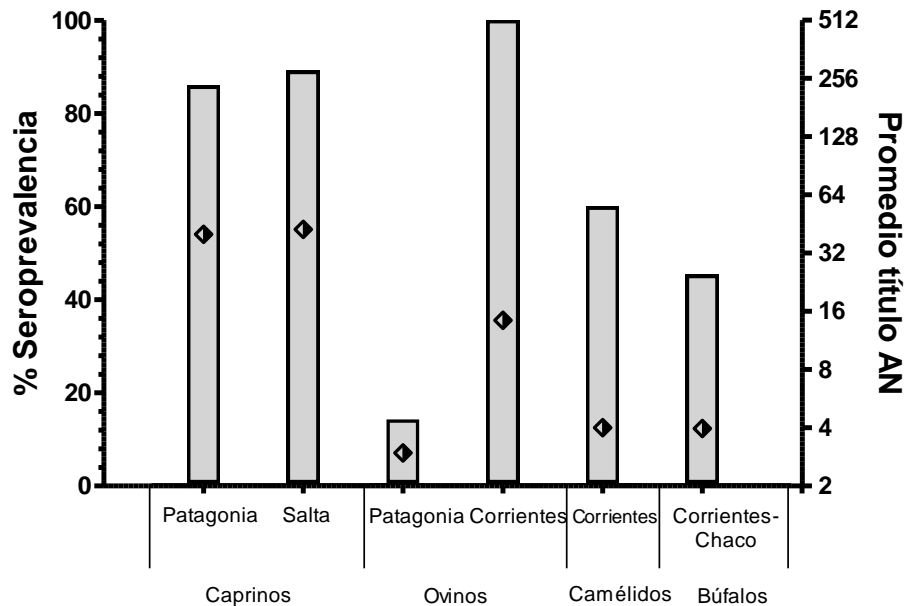


Figura 6. Prevalencias del BRSV en otras especies de interés agropecuario. Se muestran en el eje X las especies analizadas con sus distintos orígenes. En el **eje Y de la izquierda** se graficó el porcentaje de seroprevalencia (barras) y en el **eje Y de la derecha** el promedio del título de AN de los animales seropositivos (rombos).

En todas las especies evaluadas se pudo detectar AN contra el BRSV. Aunque el muestreo no tuvo un diseño estadístico, los valores observados entre las distintas especies y regiones evaluadas podrían sugerir diferencias tanto en la prevalencia de AN contra BRSV como en el título de los mismos.

2.2.3 Estudios longitudinales para evaluar la dinámica de infección y la circulación de BRSV

2.2.3.1 Estudio de dinámica de la infección en un tambo

Durante el muestreo llevado a cabo para el estudio de prevalencia, surgió la oportunidad de diseñar y llevar a cabo un estudio longitudinal en un tambo cerrado de la provincia de Santa Fe, con el objeto de evaluar la circulación viral y estudiar la dinámica de AN contra este virus. Para esto, se tomaron muestras de sangre de 60 animales desde su nacimiento hasta los 36 meses de edad a intervalos de 3 meses. Ninguno de los animales ni las madres de los mismos recibieron vacunación para BRSV durante el ensayo. La detección de anticuerpos contra BRSV se realizó mediante la técnica de seroneutralización viral.

En la figura 7 se esquematizan las etapas del el manejo productivo dentro del tambo.

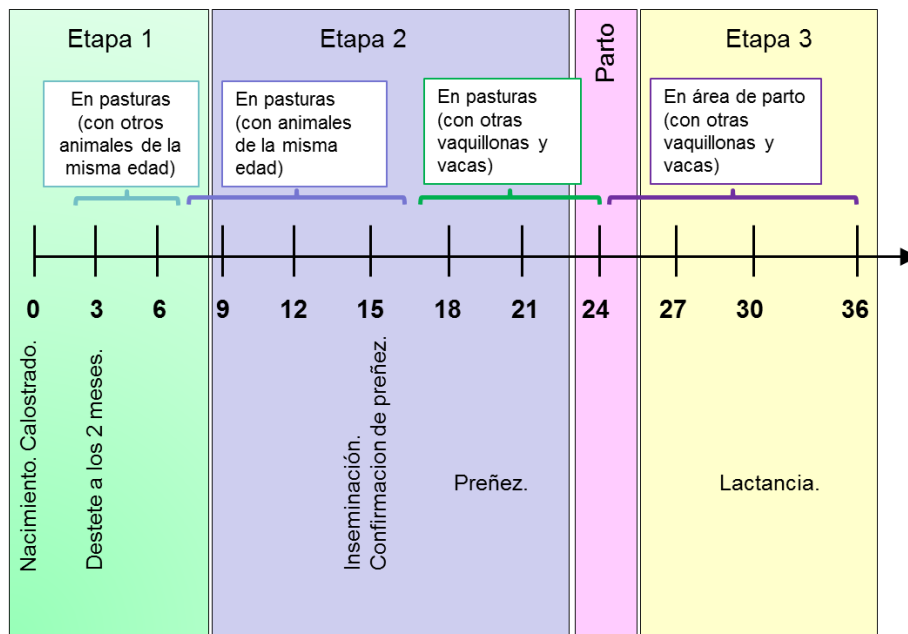


Figura 7. Manejo productivo dentro del tambo. Se muestran las distintas etapas que atraviesan los animales dentro de un ciclo productivo, desde que nacen hasta los 3 años de edad.

Con el fin de determinar la dinámica de infección y el título de AN, se analizó entonces la seroprevalencia y el promedio del título de AN contra BRSV a lo largo del tiempo (figura 8).

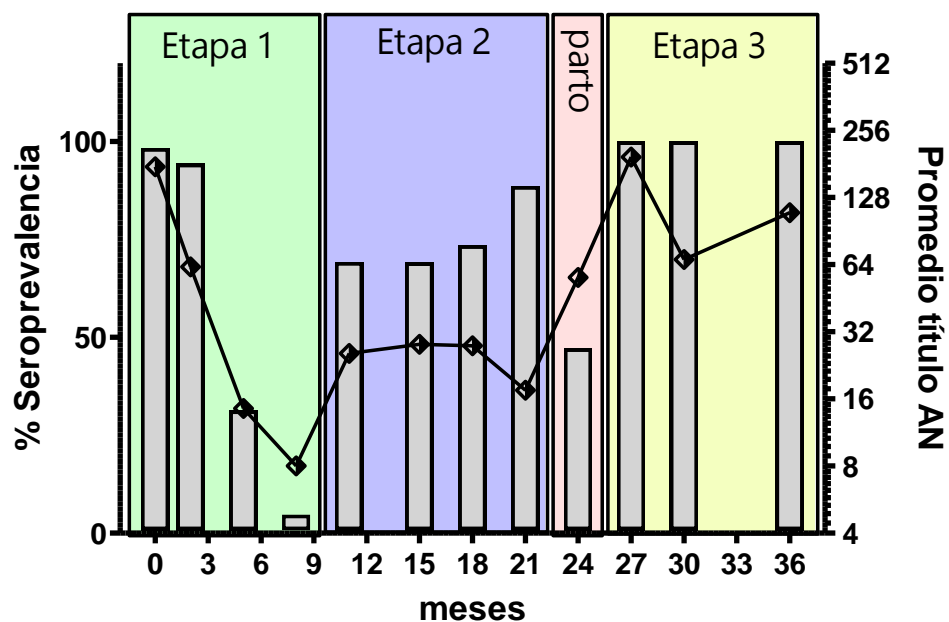


Figura 8. Seroprevalencia y promedio del título de AN contra BRSV a lo largo del tiempo. Las barras representan el porcentaje de seroprevalencia de cada tiempo evaluado y la curva del promedio de AN de los animales seropositivos en cada tiempo.

En la etapa 1, se observaron altos niveles de AN calostrales al momento del nacimiento, lo que sugiere la transferencia pasiva calostrada y la infección de las madres. Luego estos niveles descendieron abruptamente resultando en su mayoría (95 %) seronegativos al mes 8.

En la etapa 2, cuando ocurre el primer movimiento de los animales hacia pasturas con otros animales de su misma edad, se observó que al mes 11 ocurrió la primo-infección, evidenciada por el aumento del título de AN que luego se mantuvo constante con valores de seroprevalencia de 60 %.

En la etapa del parto, se produjo un descenso significativo del porcentaje de seroprevalencia.

Por último, en la etapa 3, una vez ocurrido el parto y con el ingreso de los animales al ciclo productivo (rodeo de ordeño), se observó un aumento del valor de seroprevalencia alcanzando una prevalencia del 100 % en el mes 27 conjuntamente con un aumento del promedio del título de AN significativamente superior a los títulos obtenidos durante la etapa 2.

Se analizaron también, los porcentajes de seroconversión en cada uno de los tiempos. Se consideró que un animal seroconvirtió cuando el título de AN había variado en un total de 4 diluciones en base 2 (figura 9).

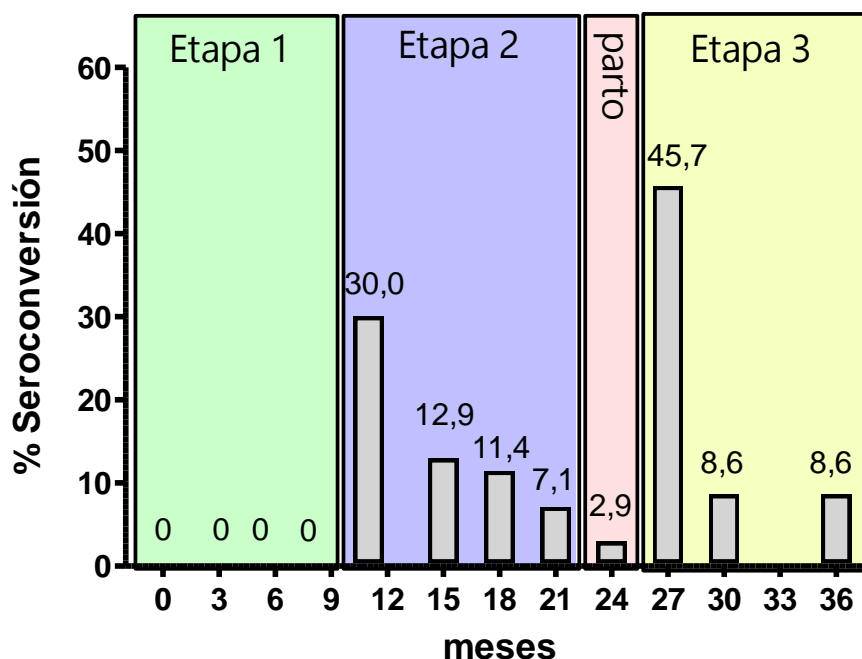


Figura 9. Porcentajes de seroconversión en un tambo en función de la edad de los animales. Las barras representan el porcentaje de animales que presentaron seroconversión en cada tiempo evaluado.

Se detectaron dos puntos críticos de infección y reinfección a los meses 11 y 27 con porcentajes de seroconversión de 30 % y 45,7 %, respectivamente.

2.2.3.2 Estudio longitudinal de circulación viral de BRSV en establecimientos de engordes a corral

A partir de los resultados descriptos en la sección 3.1.2.3 en colaboración con el grupo de Patología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de La Plata (Dr. Luis Fazio y Vet. Nicolás Streitenberger) se llevaron a cabo dos ensayos longitudinales en engordes a corral (denominados, de ahora en más, engorde a corral 1 y engorde a corral 2) de la provincia de Buenos Aires.

En ambos ensayos se tomaron muestras de sangre de 30 bovinos de entre 6 y 9 meses al comienzo del ensayo (t0) y a los 30 y 60 días posteriores (t30 y t60). Estos animales no habían recibido vacunación previa para BRSV. Se midieron AN contra BRSV mediante seroneutralización viral.

En el caso del engorde a corral 1, se observó que el 76,6 % (n=23) de los animales seroconvirtieron al tiempo 30 (Figura 10).

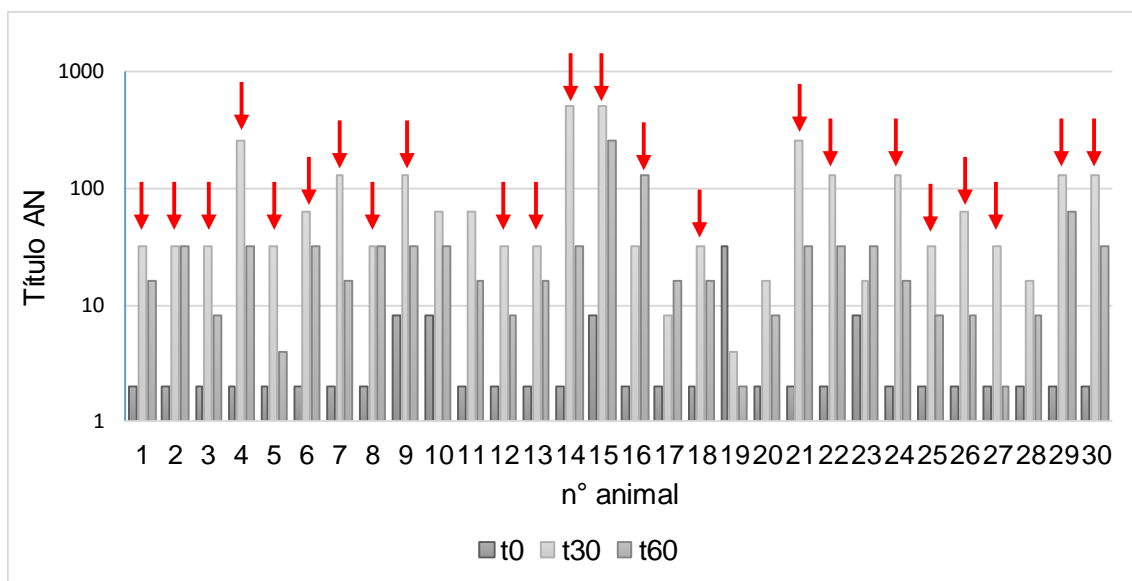


Figura 10. Título de AN de cada uno de los animales del establecimiento de engorde a corral 1 a los tiempos 0, 30 y 60. Se expresa el título de AN en el eje Y en escala logarítmica. Las flechas indican los animales que seroconvirtieron durante la experiencia.

Para el caso del engorde a corral 2, se observó un 43,3 % de seroconversión al t30 (n= 13) tal como se observa en la figura 11. Además, 1 animal evidenció seroconversión al t60.

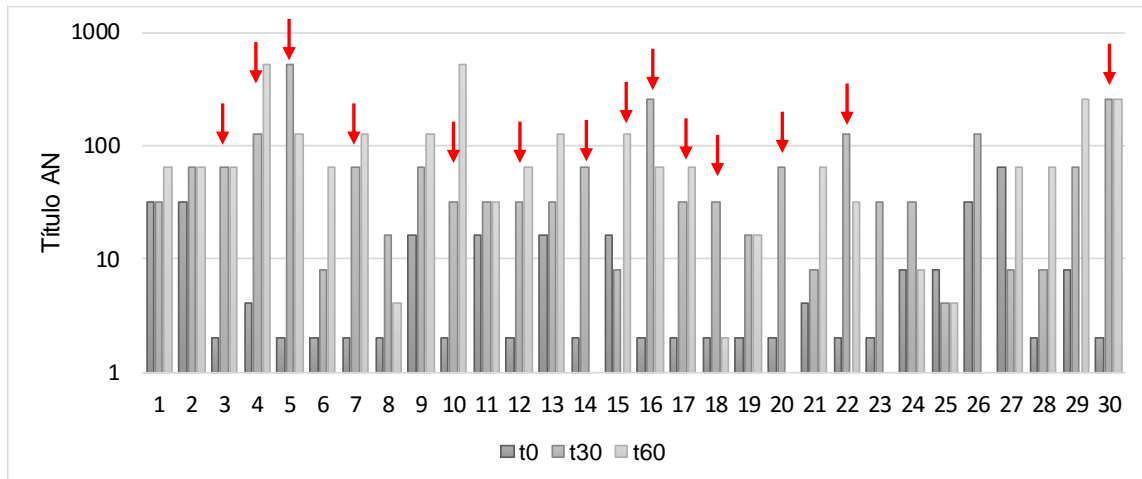


Figura 11. Título de AN de cada uno de los animales del establecimiento de engorde a corral 2 a los tiempos 0 y 60. Se expresa el título de AN en el eje Y en escala logarítmica. Las flechas indican los animales que seroconvirtieron durante la experiencia.

2.2.3.1.1 Detección de ARN viral en muestras de casos clínicos

Durante los muestreos en los dos engordes a corral, se tomaron además, muestras de hisopados nasales al inicio del muestreo y a los días 14 y 30, así como también, se realizaron necropsias de los animales de esas tropas, que murieron por enfermedad respiratoria, tomando muestras de pulmón para detección de ARN y aislamiento viral.

Hisopados nasales:

Se seleccionaron las muestras de los animales que presentaron seroconversión, y se realizó el procesado de los hisopados nasales, tal como se describió en la sección 2.1.4.3 de materiales y métodos de este capítulo.

Se detectó la presencia de ARN viral, en dos hisopos pertenecientes a los animales n° 26 y n° 29 del primer ensayo longitudinal realizado (engorde a corral n°1) (figura 12).

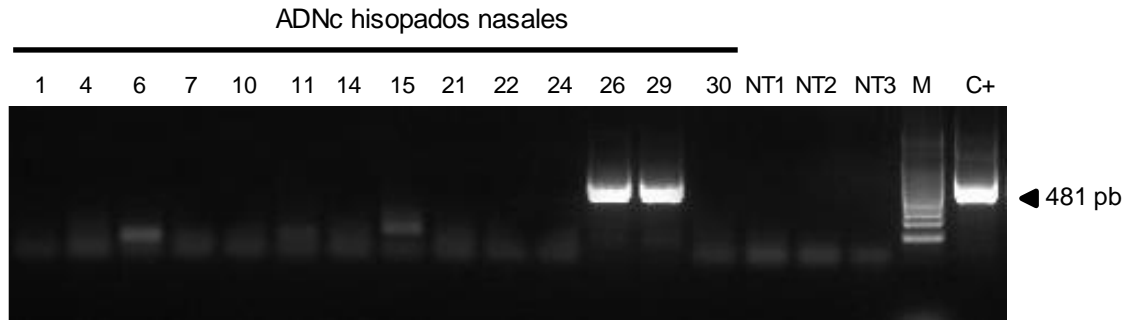


Figura 12. RT- *Nested* -PCR a partir de ARN viral de hisopados nasales. A partir del ARN viral extraído de las muestras número 1, 4, 6, 10, 11, 14, 15, 21, 22, 24, 26, 29 y 30 se realizó una RT-nested PCR utilizando un par de oligonucleótidos que amplifican específicamente un fragmento interno de 481 pb del gen F. NT1, NT2, NT3: controles sin templado de cada uno de los pasos de la RT-*Nested*-PCR; C+: control positivo (ARN extraído de células infectadas con BRSV); M: L100 kpb *DNA Ladder* (PB-L Productos Bio-Lógicos®).

Muestras de pulmón:

Tal como se mencionó previamente, durante los muestreos de los ensayos longitudinales en engordes a corral, se realizaron también las necropsias de todos los animales que murieron durante el ensayo, tomándose muestras de pulmón en los casos que presentaban lesiones compatibles con enfermedad respiratoria. Se analizó un total 18 pulmones, y se logró detectar la presencia de ARN viral en 5 de esas muestras (figura 13).

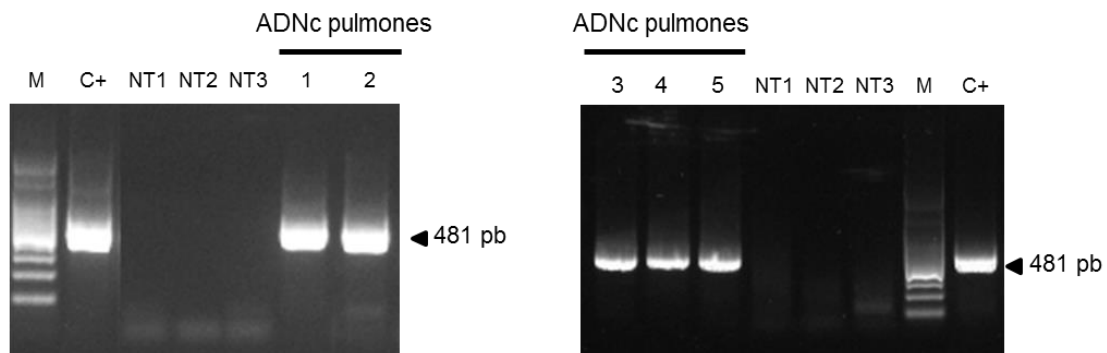


Figura 13. RT- *Nested* -PCR a partir de ARN viral de pulmones. A partir del ARN viral extraído de las muestras número 1, 2,3,4 y 5 se realizó una RT-nested PCR utilizando un par de oligonucleótidos que amplifican específicamente un fragmento interno de 481 pb del gen F. NT1, NT2, NT3: controles sin templado de cada uno de los pasos de la RT-*Nested*-PCR; C+: control positivo (ARN extraído de células infectadas con BRSV); M: L100 kpb *DNA Ladder* (PB-L Productos Bio-Lógicos®).

A su vez, luego de realizar los análisis bacteriológicos correspondientes, se determinó que dos de los 5 pulmones positivos por RT-*n*PCR, presentaron aislamiento positivo para *Manhemmia haemolytica*, bacteria perteneciente al CRB.

Posteriormente, se llevó a cabo el aislamiento viral en células MDBK (ver apartado 2.1.4.4 de materiales y métodos de este capítulo) a partir de los extractos de los pulmones e hisopados nasales en los que se detectó la presencia de genoma viral. Sin embargo, aun habiendo realizado un total de 5 pasajes ciegos no se obtuvieron resultados favorables.

CAPÍTULO 2. Desarrollo de un candidato vacunal basado en MVA.

3.1 Materiales y Métodos

3.1.1 Células y virus.

3.1.1.1 Células

Se emplearon cultivos primarios de fibroblastos de embrión de pollo (FEP) preparados a partir de huevos embrionados de 10-11 días, provistos por la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Pergamino del INTA, de acuerdo al protocolo descrito por Staib y colaboradores (Staib, Drexler, y Sutter 2004). Las monocapas celulares se sembraron en los recipientes de cultivo como se indica en la Tabla 8 y se incubó durante 24 h a 37 °C en estufa gaseada conteniendo 5 % de CO₂.

Recipiente de cultivo plástico	Superficie (cm ²)	Volumen sembrado (ml)	Densidad celular sembrada (cél/ml)
P60: Placa de Petri de 60 mm (NUNC)	21	5	1 x 10 ⁶
Frasco T25 (GBO)	25	7	1 x 10 ⁶
Frasco T75 (GBO)	75	30	1 x 10 ⁶
Frasco T175 (GBO)	175	50	1 x 10 ⁶
Placa de 6 pocillos (NUNC)*	10	3	1 x 10 ⁶
Placa de 24 pocillos (NUNC)*	2	1	7,5 x 10 ⁵

Tabla 8. Cantidad de fibroblastos de embrión de pollo sembrados en recipientes de cultivos plásticos. *se indican las cantidades por pocillo.

3.1.1.2 Virus

En este trabajo se utilizó el virus MVA Δ 008- β gal (mencionado de ahora en adelante como MVA-bgal) obtenido previamente en el Instituto de Biotecnología, INTA Castelar (Falivene y col. 2012). Este virus carece del gen *MVA008L* (que codifica para la proteína de unión a interleuquina 18) y se obtuvo por reemplazo alélico con un *cassette* para la expresión de la enzima marcadora β -galactosidasa (gen *lacZ* río abajo del promotor del gen *H6* del virus Vaccinia).

La multiplicación de los virus MVA recombinantes se realizó en cultivos primarios de FEP.

Para los ensayos de inmunización, se utilizó, además, virus BRSV producido como se describió en el punto 2.1.2.2 de Materiales y métodos del Capítulo 1. Para el desafío viral, se preparó BRSV según lo descrito en el apartado 1.1 del anexo.

3.1.2 Animales

Para los ensayos de evaluación de la vacuna experimental se utilizaron ratones hembras de la cepa BALB/c de 5 semanas de edad certificados como libres de patógenos específicos (SPF). Los animales se adquirieron en el Bioterio de la Fundación Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

3.1.3 Obtención del vector de transferencia para MVA

3.1.3.2 Clonado del producto de amplificación del gen codificante de la proteína F en el plásmido pGEM-T Easy

3.1.3.2.1 Amplificación del gen codificante de la proteína F mediante RT-PCR

Para la obtención de ADN complementario (ADNc) del gen que codifica para la proteína F se llevó a cabo una reacción de transcripción reversa y PCR (RT-PCR) a partir del ARN extraído de virus BRSV cepa A51908 (ver apartado 2.1.5.1 de materiales y métodos del capítulo 1) y los oligonucleótidos sentido y antisentido (Ffw y Frev), diseñados para amplificar el gen completo de la proteína F (desde el ATG hasta el codón STOP, indicados en negrita), que además aportan sitios de reconocimiento para enzimas de restricción (*Nhe* I y *Nco* I, subrayados) que permitirán el clonado direccionado del amplicon en el vector de transferencia para MVA:

- F Fw (sentido): **GCTAGCATG**GCGACAACAGCCATGAGGATG
- F rev (antisentido): **AGGCCTTTATAT**GGAGGTGTGTTGTTAG

La reacción de transcripción reversa se realizó de manera similar a la descrita en el apartado 2.1.5.3 de materiales y métodos del capítulo 1 pero utilizando 0,1 µg de cada uno de los oligonucleótidos F Fw y Frev. Una vez obtenido, el ADNc se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

Luego, la reacción de amplificación por PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: para 25 µl finales se utilizaron 1-3 ng de ADNc; 2,5 µl de *buffer* de la enzima *Taq* ADN polimerasa 10X; 1,5 µl de MgCl₂ 25 mM; 0,5 µl de dNTPs 10 mM (Invitrogen); 0,01 µg de cada oligonucleótido (F fw y F rev); 0,5 µl (2U) de *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen) y agua DEPC (Sigma) c.s.p 25 µl. Como control negativo para asegurar la ausencia de contaminantes se preparó un tubo de reacción sin templado.

El perfil de ciclado se detalla a continuación:

94 °C	5 min	35 ciclos
94 °C	1 min	
55 °C	1 min	
72 °C	1 min 30 seg	
72 °C	7 min	

La separación electroforética de los productos de amplificación se llevó a cabo tal como se describió previamente en el punto 2.1.5.5 de materiales y métodos del capítulo 1.

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

3.1.3.2.2 Reacciones de ligado molecular

Para el ligado molecular del producto de amplificación correspondiente al gen F en el plásmido pGEM-T *Easy* (Promega) se utilizaron 50 ng de vector y diferentes cantidades de inserto para las relaciones molares de vector: inserto (1:1, 1:3 y 1:5). La reacción se llevó a cabo en un volumen de 10 µl, en presencia del *buffer* de ligación específico y 0,1 U de la enzima T4 ADN ligasa (Promega). La reacción se incubó a 16 °C durante 16 h. Siempre se realizó un control de ligación con vector y sin inserto para, posteriormente, estimar el aporte de vector sin digerir o religado al número de colonias transformantes.

3.1.3.2.3 Transformación de bacterias *Escherichia coli* DH5α

Las bacterias se hicieron competentes para la transformación mediante el método de Hanahan (Hanahan 1985) y se guardaron congeladas a -70°C hasta su uso.

Las bacterias competentes se descongelaron y se mantuvieron en hielo por 10 min. A 100 µl de bacterias se le agregaron 2,0-2,5 µl del producto de las reacciones de ligado, se mezclaron por pipeteo e incubaron en hielo durante 30 min. Posteriormente, se realizó un choque térmico a 42 °C durante 45 segundos y se dejó en hielo durante 2 min adicionales. Luego, se agregaron 900 µl de medio Luria-Bertani (LB: triptona 5 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l), se incubaron durante 1 h con agitación suave a 37 °C. A continuación, se centrifugaron a 1000 x g durante 10 min. Una vez concluida la centrifugación, se descartaron 800 µl de sobrenadante y los 200 µl restantes se utilizaron para resuspender las bacterias que luego se plaquearon en placas de LB agar

(1,5 g/100 ml) suplementadas con ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml para la selección de las bacterias transformadas con los plásmidos.

En el caso de las colonias bacterianas transformadas con plásmido pGEM-T *Easy* que portan como inserto el amplicon del gen F se realizó la identificación mediante la expresión del gen *lacZ* para lo cual se usaron placas de LB-agar/Ampicilina suplementadas con 40 µl de IPTG (isopropil-1-tio-β-D-galactósido, 0,1 mM) y 60 µl de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido, 20 mg/ml). De esta forma, se identificaron las colonias blancas o azules que corresponden a bacterias transformadas con el plásmido con inserto o sin inserto, respectivamente.

Las placas se incubaron a 37 °C toda la noche. Las colonias obtenidas se picaron e inocularon en tubos conteniendo 3-5 ml de LB/ampicilina, los cuales se incubaron a 37 °C con agitación durante toda la noche. Una alícuota de estos cultivos se mezcló en una relación 1:1 con glicerol 50 % para su conservación a – 80 °C y el resto se utilizó para extraer el ADN plasmídico.

3.1.3.2.4 Purificación rápida de ADN plasmídico y análisis de clones recombinantes

Se utilizó el método de laboratorio denominado “*boiling method*”. Para ello se partió de 1,5 ml de cultivo de bacterias crecidas durante toda la noche a 37 °C en presencia del antibiótico de selección. Brevemente, el cultivo bacteriano se cosechó por centrifugación a 16000 x g en una microcentrífuga durante 2 min a temperatura ambiente. Luego de descartar el sobrenadante, el *pellet* se resuspendió con 400 µl de solución STET-Sacarosa (sacarosa 8 %, Tris HCl 50mM, EDTA 50 mM, pH 8, Triton X-100 5%) adicionada con lisozima (1 mg/ml). Las muestras se hirvieron durante 1 min y se centrifugaron a 16000 x g durante 15 min a temperatura ambiente. Se recuperó el sobrenadante en un microtubo nuevo, se agregaron 400 µl de isopropanol y se mezcló por inversión. Luego, las muestras se centrifugaron a 16000 x g durante 15 min a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y se secó el pellet. Finalmente, se resuspendió el pellet en 20 µl de *buffer* TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM, pH: 7,6).

Para corroborar la presencia del inserto correspondiente al gen de interés, los plásmidos se digirieron con las enzimas de restricción *Nhe* I y *Nco* I y se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa (punto 2.1.5.5 de materiales y métodos del capítulo 1), identificando los plásmidos recombinantes por la presencia de un fragmento de aproximadamente 1700 pb.

3.1.3.2.5 Preparación de ADN plasmídico de alta calidad

Para la obtención de ADN plasmídico de alta calidad para secuenciación se utilizaron los *kits* comerciales *Wizard Minipreps* (Promega), *Wizard Midipreps* (Promega) y *Plasmid Purification Mini Kit* (Qiagen) según especificaciones del fabricante. En general, el ADN se resuspendió en 50-100 μ l de agua bidestilada estéril y el rendimiento promedio fue de 200-400 ng/ μ l.

Para purificar ADN plasmídico de alta calidad para la transfección de células eucariotas y para las inoculaciones en ratones, se emplearon los *kits* comerciales *Plasmid Purification Midi Kit* (Qiagen) y *Plasmid Purification Mega Kit* (Qiagen) respectivamente. La concentración de ADN se determinó a 260 nm en un Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific). El rendimiento promedio de las midi preparaciones de ADN fue de 500-600 ng/ μ l y el de las mega preparaciones de ADN fue de 3-4 μ g/ μ l.

3.1.3.2.6 Secuenciación de ADN

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

3.1.3.3 Clonado del gen de la proteína F de BRSV en el vector de transferencia para MVA.

El gen de la proteína F de BRSV (A51908) se obtuvo a partir del plásmido pGEM-T-F obtenido en este trabajo.

Se utilizó el vector de transferencia denominado VT-MTK-GUS-EL (figura 14) (María Florencia Ferrer y col. 2011), el cual permitió la inserción del gen de interés dentro del genoma de MVA interrumpiendo en el gen viral *MVA086R* que codifica para la enzima timidina quinasa (TK) viral. Este vector de transferencia posee el *cassette* de expresión de la enzima marcadora β -glucuronidasa (GUS, codificada por el gen *uid A*) río abajo del promotor del gen H6 del virus vaccinia. Por la estrategia de clonado la expresión del gen foráneo está dirigida por el promotor temprano/tardío sintético pE/L de poxvirus.

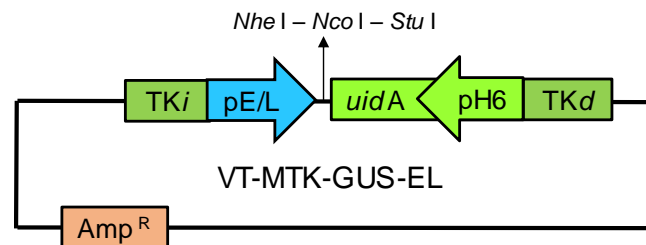


Figura 14. Esquema del vector de transferencia VT-MTK-GUS-EL.

El vector (VT-MTK-GUS-EL) y el inserto (pGEM-T-F) se digirieron con las enzimas de restricción *Nco* I y *Nhe* I. Brevemente, se utilizaron 1-10 µg del ADN, 5 U de cada enzima, *buffer* de restricción apropiado en un volumen final de 20-50 µl. Las reacciones se incubaron de 2 a 3 h a 37 °C y las enzimas se inactivaron durante 30 min a 70°C. El fragmento F digerido se purificó en geles de agarosa como se describió previamente. Para evitar la religación del plásmido, se realizó la remoción de los grupos fosfato de los extremos 5' del vector digerido tratando el ADN plasmídico purificado a partir de geles de agarosa con 5 U de la enzima fosfatasa alcalina de camarón (SAP, Promega) por 15 min a 37 °C. La inactivación de la enzima SAP se realizó por calor y se procedió a realizar la reacción de ligado molecular sin necesidad de pasos adicionales de purificación del ADN.

Para el ligado molecular del inserto F al plásmido VT-MTK-GUS-EL, se utilizaron entre 35 y 50 ng de vector y diferentes cantidades de inserto para las relaciones molares de vector: inserto (1:1, 1:3 y 1:5). La reacción se llevó a cabo en un volumen de 10 µl, en presencia de *buffer* de ligación específico y 0,1 U de T4 ADN ligasa (Promega). La reacción se incubó a 16 °C durante 16 horas. Se realizó un control de ligación con vector y sin inserto para, posteriormente, estimar el aporte de vector sin digerir o religado al número de colonias transformantes.

Posteriormente, se utilizaron 2-5 µl de la reacción de ligado molecular para transformar bacterias *Escherichia coli* DH5α competentes (según lo descrito en apartado 3.1.3.2.3 de materiales y métodos de este capítulo). A partir de las colonias bacterianas transformantes se purificó el ADN plasmídico, se realizó el análisis de los clones por digestión con enzimas de restricción y posterior secuenciación de los clones positivos, denominados VT-MTK-F, según la metodología descrita en los apartados 3.1.3.2.4 a 3.1.3.2.6 de materiales y métodos de este capítulo.

3.1.4 Técnicas para la obtención de virus MVA recombinantes

Todos los procedimientos se llevaron a cabo en flujos laminares verticales, utilizando medios y sueros estériles precalentados a 37 °C y *tips* con filtro.

Los medios utilizados fueron:

Medio de crecimiento: medio mínimo esencial modificado por Dulbecco (MEM-D; Gibco) suplementado con 0,3 mg/ml de L-glutamina, 3,7 mg/ml de bicarbonato de sodio (ICN), 10 % de suero fetal bovino irradiado (Internegocios), 50 µg/ml de gentamicina, 66 µg/ml de estreptomina y 100 U/ml de penicilina.

Medio de mantenimiento: medio de crecimiento pero conteniendo 2 % de suero fetal bovino y suplementado con antibiótico/antimicótico 1X (100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y 0,25 µg/ml de antimicótico Fungizone®, Gibco), Hepes (ácido 4-(2-hidroximetil) 1-piperazin-etán-sulfónico, Sigma) 25 mM pH 7,5.

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

Medio de placa semisólido con sustrato: medio de placa semisólido suplementado con 0,35 mg/ml de Bluo-gal (5-bromo-3-indolil-β-D-galactopiranosido) para β-galactosidasa o 0,2 mg/ml de X-gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucuronido) para β-glucuronidasa.

3.1.4.1 Preparación de *stock* viral de MVA recombinantes

Monocapas de FEP 80-90 % confluentes, crecidas en botellas plásticas de 25, 75 o 175 cm² se lavaron con PBS y se infectaron con 0,5-1 ml de virus a una multiplicidad de infección (MOI) [unidad formadora de placa (ufp)/célula] de 0,01-0,05. Se incubaron durante 45 min a 37 °C, CO₂ 5 % y posteriormente se agregaron 5-30 ml de medio de mantenimiento. Las células se incubaron durante 3-4 días hasta la observación de efecto citopático. Finalmente las células y los sobrenadantes de infección se juntaron y se congelaron a -70 °C. Con el propósito de lisar las células y favorecer la liberación del virus, se realizaron 3 ciclos de congelado (-70 °C) y descongelado (37 °C).

3.1.4.2 Titulación de los *stocks* de MVA recombinantes

Se realizaron diluciones seriadas al décimo de la suspensión viral. Las monocapas de FEP 90% confluentes, crecidas en placas de 6 pocillos (P6) o en placas de 60 mm de diámetro (P60), se lavaron con PBS y se infectaron con 300-500 µl de las diluciones virales correspondientes. Luego de 45 min de adsorción a 37 °C, con agitación cada 15 min, los inóculos se descartaron y las monocapas se lavaron nuevamente. Posteriormente, se agregaron 3 ml de medio de placa semisólido. Se dejó solidificar a temperatura ambiente durante 20 min y luego se incubó en estufa gaseada hasta la visualización de las placas de lisis (aproximadamente 5 días posteriores a la infección). En ese momento, se agregaron 2 ml de medio de placa semisólido con el sustrato

correspondiente para cada enzima marcadora (Bluo-gal para el virus MVA-bgal o X-gluc para el virus MVA-F) y las células se incubaron hasta la visualización de placas de lisis azules.

El título del *stock* viral se expresó como unidades formadoras de placas de lisis (ufp) por ml, eligiendo la dilución viral donde se pudieran contar 30-100 placas de lisis / P60 o 10-50 placas de lisis/ pocillo de P6.

3.1.4.3 Obtención de los virus MVA-F

Se utilizó el protocolo implementado previamente en el Instituto de Biotecnología. Se infectó una monocapa de FEP (60-70 % de confluencia) crecida en una botella plástica de 25 cm² con 0,8 ml de virus MVA-bgal a una multiplicidad de infección de 0,01. Para permitir la adsorción y entrada del virus se incubó durante 2 h (con agitación cada 15 min) a 37°C, con 5 % de CO₂. Posteriormente, se agregaron 5 ml de medio de mantenimiento y se incubó por 1-2 horas en las mismas condiciones.

Mientras tanto, se preparó la mezcla ADN/lipofectamina y para ello, en 2 tubos de microcentrífuga se incubaron por separado 6,25 µl de lipofectamina (*Lipofectamine 2000*, Invitrogen) y 10 µg de ADN plasmídico VT-MTK-F, diluidos en 120 µl de MEM-D, durante 30 min a temperatura ambiente. Los complejos ADN-lipofectamina se prepararon mezclando los 120 µl de ADN con los 120 µl de lipofectamina en un tubo plástico de 5 ml e incubando durante 15 min a temperatura ambiente.

Transcurrido el tiempo de incubación, a los complejos se les agregó 2 ml de MEM-D. Las monocapas se lavaron dos veces con PBS, se agregó la mezcla ADN/lipofectamina lentamente y se incubó durante al menos 1 h a 37°C, CO₂ 5 %. Posteriormente, se agregaron 3 ml de medio de mantenimiento y se incubó durante 16 horas a 37 °C, CO₂ 5 %. Al día siguiente, se descartó el medio y se agregaron 5 ml de medio de mantenimiento. Se incubó hasta la visualización de efecto citopático generalizado, se colectaron juntos el sobrenadante y las células, y se conservaron a -70 °C.

Luego de 3 ciclos de congelado (-70 °C) y descongelado (37 °C), el virus obtenido se tituló en monocapas de FEP según el protocolo descrito anteriormente. Una vez visualizadas las placas de lisis (4-5 días posteriores a la infección) se realizó el *screening* de los virus recombinantes por su capacidad de producir placas de lisis azules en presencia del sustrato X-gluc. Brevemente, se agregaron 2 ml de medio de placa semisólido con sustrato, las células se incubaron hasta la visualización de placas de lisis azules y utilizando *tips* con filtro se picaron algunas placas de lisis azules en un microtubo conteniendo 500 µl de medio MEM-D. Las suspensiones virales se sometieron a 3 ciclos de congelado (-70 °C) y posterior descongelado (37 °C).

Se repitió el clonado viral once veces hasta obtener un *stock* viral recombinante homogéneo, es decir, que producía 100 % de placas de lisis azules. Finalmente, se amplificó el virus recombinante MVA-F para su posterior caracterización.

3.1.4.4 Purificación de los *stocks* virales MVA recombinantes

Se infectaron FEP con los virus MVA-bgal o MVA-F (10 T175/virus) según el protocolo detallado anteriormente (punto 3.1.4.1 de materiales y métodos de este capítulo).

Con el propósito de lisar las células y favorecer la liberación del virus, se realizaron 3 ciclos de congelado (-70 °C) y descongelado (37 °C). Luego, se realizaron 4 ciclos de sonificado utilizando el equipo *Sonics VCX-750 Vibra Cell Ultra Sonic Processor*. Cada ciclo consistió de 5 pulsos de 2 seg cada uno con 1 seg sin sonicar entre pulso y pulso. El tiempo de pausa entre ciclo y ciclo fue de 30 seg. Se sonicaron 200 ml por ronda, utilizando un *tip* de 13 mm de diámetro (1/2"), a intensidad alta (amplitud=80 %), en hielo. Luego, las muestras se centrifugaron durante 10 min a 2000 rpm en rotor JA-10 (Beckman Coulter), a 4 °C. Los sobrenadantes se filtraron a través de una gasa estéril mientras que los *pellets* se resuspendieron en 10 ml de medio MEM-D, se sonicaron y se centrifugaron de igual manera a la descrita anteriormente. Los sobrenadantes obtenidos luego de las dos centrifugaciones se recuperaron.

Para concentrar las muestras, los sobrenadantes se centrifugaron durante 90 min a 20500 rpm en rotor 45Ti (Beckman Coulter), a 4 °C. Los sobrenadantes se descartaron y los *pellets* obtenidos se resuspendieron en 1 ml de *buffer* TMN (Tris HCl 0,01 M pH 7,5, MgCl₂ 1,5 mM, NaCl 10 mM) por pipeteo y se agitaron con vortex durante varios minutos. Las suspensiones virales obtenidas se sonicaron de manera similar a la descrita anteriormente pero utilizando un *tip* de 3 mm de diámetro (1/8"), a intensidad media (amplitud=30 %).

Las suspensiones virales se clarificaron por centrifugación a 445 x g durante 5 min, a 4 °C. Los *pellets* se descartaron y los sobrenadantes se transfirieron a tubos limpios.

Se procedió al armado de un colchón de 10 ml de sacarosa 25 % v/v (100 g sacarosa/300 ml de *buffer* TMN) y las suspensiones virales se depositaron suavemente sobre el colchón (8 ml por virus). Se ultracentrifugó durante 2,5 h a 39000 rpm en rotor 70Ti (Beckman Coulter), a 4 °C. El *pellet* final obtenido se resuspendió en *buffer* TMN (entre 0,75 y 1,5 ml totales) y se agitó con vortex vigorosamente. Por último, la suspensión viral purificada se alícuotó en tubos de microcentrífuga y se almacenó a -70 °C.

Una alícuota de los virus purificados se utilizó para infectar FEP y calcular el título de los *stocks* virales (ver apartado 3.1.4.2 de materiales y métodos de este capítulo).

3.1.5. Caracterización molecular de los virus MVA-F recombinantes

3.1.5.1 Análisis de los MVA recombinantes mediante PCR

Se infectaron FEP crecidos en placas P60 con 500 μ l del virus MVA-F (diferentes clones) o MVA-bgal. Para permitir la adsorción y entrada del virus las placas se incubaron durante 45 min a 37 °C y, posteriormente, se agregaron 3 ml de medio de mantenimiento. Las placas se incubaron en estufa a 37 °C y a los 5 días posteriores a la infección (dpi) se descartó el medio de cultivo. Las monocapas se lavaron dos veces con PBS y los extractos celulares se cosecharon en 1 ml de PBS. Se realizaron 3 ciclos de congelado (-70 °C) y descongelado (37 °C).

Para la extracción del ADN se utilizaron 350 μ l de los extractos celulares, a los cuales se les agregaron 350 μ l de *buffer* de extracción 2X (Tris 200 mM pH 8, EDTA 20 mM, NaCl 200mM, SDS 2 % y β -mercaptoetanol 20mM; (Dellaporta, Wood, y Hicks 1983). La mezcla se agitó mediante vortex durante 5 segundos. Se incubó a 65 °C durante 10 min. Luego se agregaron 250 μ l de acetato de potasio 5 M, mezclando por inversión 20 veces y se incubó en hielo durante 20 min. Luego se centrifugó a 10000 x g durante 5 min en microcentrífuga a 4 °C. La fase acuosa (700 μ l aproximadamente) se recuperó en un tubo de microcentrífuga limpio. Se agregaron 700 μ l de isopropanol absoluto y se mezcló por inversión durante 30 seg. Se centrifugó en microcentrífuga a 12000 rpm durante 20 min a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* se lavó 2 veces con 500 μ l de etanol 70 % y se centrifugó durante 15 min a 10000 rpm. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* final, previamente secado a 50 °C, se resuspendió en 40 μ l de agua bidestilada incubando a 50 °C durante 10-20 min.

Para la caracterización de los MVA recombinantes se realizaron amplificaciones por PCR para confirmar la presencia del genoma de MVA (gen *MVA165R*, no relacionado con el sitio blanco de inserción del gen de interés) y del gen *F* de BRSV (gen de interés).

En la siguiente tabla se indican las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para cada reacción de amplificación por PCR:

Oligonucleótido	Secuencia nucleotídica	Producto	Región genómica amplificada	Fuente
HA1	TCCCCGCGGATGACAC GATTACCAATA	950 pb	MVA165R	(M F Ferrer, Zanetti, y Calamante 2007)
HA4	GGGGTACCAGAATATTG CCACGGCCG			
B1	AATCAACATGCAGTGCA GTTAG	711 pb	Gen F, nt 114-803	(Vilcek y col. 1994)
B2A	TTTGGTCATTCGTTATAG GCAT			
B3	GTGCAGTTAGTAGAGGT TATCTTAGT	481 pb	Gen F, nt 126-581	(Vilcek y col. 1994)
B4A	TAGTTCTTTAGATCAAGT ACTTTGCT			

Para 12,5 µl de reacción se utilizaron 1,5 µl de templado de ADN total obtenido de células infectadas con los virus MVA o sin infectar (como control), 2,5 µl de *buffer Green* de la enzima *GoTaq* ADN polimerasa 5X (Promega), 1,2 µl de MgCl₂ 25 mM, 0,5 µl de dNTPs 5mM (Promega), 1 µl de cada oligonucleótido (sentido y antisentido, 100 ng/µl), 0,1 µl de *GoTaq* ADN polimerasa (5 U/µl, Promega), y 4,7 µl agua DEPC (Sigma).

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

Los perfiles de ciclado para cada amplificación se detallan a continuación:

MVA165R:

95 °C	5 min	30 ciclos
95 °C	1 min	
56 °C	1 min	
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	

Fragmentos del gen codificante de la proteína F:

94 °C	5 min	35 ciclos
94 °C	45 seg	
50 °C	45 seg	
72 °C	1 min 30 seg	
72 °C	7 min	

Los productos de amplificación por PCR se resolvieron en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio y se visualizaron utilizando luz U.V. como se describió previamente.

3.1.5.2 Evaluación de la transcripción del gen *F* mediante RT-PCR

Se infectaron FEP crecidos en placas P60 con 500 μ l de los virus MVA-F o MVA-bgal como se describió en el punto anterior. A las 16 h post infección se descartó el medio de cultivo, las monocapas se lavaron dos veces con PBS y los extractos celulares se cosecharon en 0,3 ml de TRIzol® (Invitrogen™). Luego se almacenaron a 4 °C hasta su utilización. La extracción del ARN total se realizó según las instrucciones del fabricante.

Luego, las muestras de ARN se trataron con la enzima *DNAsa I* (Invitrogen) para eliminar los restos de ADN contaminante. Brevemente, se preparó una mezcla con 1 μ l de *buffer* 10X, 1 μ l de *DNAsa I* y 1 μ l de agua DEPC libre de nucleasas y se agregaron 8 μ l de la muestra de ARN. Se incubó 15 min a temperatura ambiente y luego se agregó 1 μ l de EDTA 25mM para inactivar a la enzima incubando a 65 °C durante 15 min. El ARN tratado se guardó a -70 °C hasta su utilización.

Para la obtención de ADN complementario (ADNc) a partir del ARN extraído, se realizó la reacción de transcripción reversa (RT) utilizando la enzima M-MLV RT (*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*, Promega). Primeramente, una mezcla conteniendo 50 ng de oligonucleótidos al azar (6-mer), 2,5 μ l de agua DEPC y 2 μ l de ARN se colocó en un baño seco a 72°C durante 10 minutos. Luego, se enfrió 5 min a 4°C y se agregó a dicho tubo una mezcla conteniendo 2 μ l de *M-MLV buffer* 5X (Promega), 1 μ l de DTT (ditiotreitól) 0,1 M y 1 μ l de dNTPs 5mM (Promega). Se incubó durante 2 min a 42 °C y luego se agregaron 0,5 μ l de M-MLV RT, dejando proceder la reacción durante 70 min a 42 °C. Posteriormente, la enzima fue inactivada mediante una incubación de 10 min a 72 °C y el ADNc se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

Las amplificaciones por PCR se realizaron utilizando como templado los ADNc o los ARN tratados con *DNAsa I* (como control para verificar la ausencia de ADN contaminante). Se realizaron amplificaciones para determinar la expresión de: a) gen *aviar* que codifica la subunidad 16S del ARNr (control positivo de expresión celular) b) gen *MVA157L* (control positivo de expresión de genes virales) y c) gen *F* de BRSV (gen de interés).

Se utilizaron los oligonucleótidos iniciadores que se indican en la siguiente tabla:

Oligonucleótido	Secuencia nucleotídica	Producto	Región amplificada	Fuente
AF	MMCAAGTATTGAAGG TGA	500pb	ARNr 16S aviar	(Roellig y col. 2013)
AR	CTGATCCAACATCGAG GTCGT			
157int F	GGAAATGCTTACTTTT GCTA	320 pb	<i>MVA157L</i> , nt 724-1041	(Holgad o y col. 2016)
157stop	TTATTCTGATTCTTCTA GCC			
B1	AATCAACATGCAGTGC AGTTAG	711 pb	Gen <i>F</i> , nt. 114-803	(Vilcek y col. 1994)
B2A	TTTGGTCATTCGTTAT AGGCAT			

Las condiciones para 12,5 µl de reacción fueron similares a las descritas en el punto anterior.

Los perfiles de ciclado para cada amplificación se detallan a continuación:

ARNr 16S aviar:

94 °C	2 min 30 seg	35 ciclos
94 °C	45 seg	
52 °C	1 min	
72 °C	1 min 15 seg	
72 °C	1 min	

MVA157L:

95 °C	5 min	30 ciclos
95 °C	1 min	
60 °C	1 min	
72 °C	30 seg	
72 °C	5 min	

Fragmento del gen codificante de la proteína F de BRSV:

94 °C	5 min	35 ciclos
94 °C	45 seg	
50 °C	45 seg	

72 °C 1 min 30 seg |
72 °C 7 min

Los productos de amplificación por PCR se resolvieron en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio y se visualizaron utilizando luz U.V. como se describió previamente.

3.1.6 Evaluación de la respuesta inmunitaria inducida por la vacuna recombinante MVA-F en un modelo animal de ratón.

Todos los experimentos realizados con animales fueron evaluados y aprobados por el comité institucional para el cuidado y uso de animales de experimentación (CICUAE) del INTA Castelar.

3.1.6.1 Evaluación de la respuesta inmunitaria inducida por MVA-F en ratones utilizando una vía de inmunización de mucosas (Experimento n°1)

Grupos de 5 ratones fueron inmunizados 2 veces a los días 0 y 21 por la vía intranasal (i.n.) en un volumen final de 50 µl por ratón según la siguiente tabla:

Grupo experimental (n=5)	Inmunógeno	Dosis
1	MVA-F	5,6 x 10 ⁵ ufp
2	MVA-bgal	5,6 x 10 ⁵ ufp
3	PBS	-

Los virus MVA-bgal o MVA-F se purificaron por ultracentrifugación a través de colchón de sacarosa, como se describió en el apartado 3.1.4.4 de materiales y métodos de este capítulo

Para evaluar la respuesta humoral sistémica anti-BRSV por ELISA y seroneutralización (ver apartados de materiales y métodos 3.1.9.2 de este capítulo y 2.1.3 del capítulo 1) se colectaron muestras de sangre por punción de la vena submandibular antes de cada inmunización (días 0 y 19) y 14 días después de la 2^o inmunización (día 35).

A los 35 días post inoculación (dpi) los animales fueron sacrificados tomándose muestras de lavados nasales y broncoalveolares (BAL), como describieron Ferrer y colaboradores (María Florencia Ferrer y col. 2011). Brevemente, los animales se sacrificaron, se inmovilizaron y se les realizó una traqueotomía. Todos los lavados se

realizaron mediante la inyección de 500 µl de PBS conteniendo el inhibidor de proteasas Aprotinina (Sigma), en una concentración final de 20 µg/ml, con la ayuda de una aguja 20G (diámetro interno 0,9 mm), sin bisel. En el caso de los lavados nasales, se recolectó el fluido saliente por las fosas nasales del animal, mientras que en el caso de los lavados broncoalveolares se inyectó la solución de PBS-Aprotinina y luego dicho fluido fue aspirado y descargado en un tubo colector. Una vez obtenidas todas las muestras, las mismas se centrifugaron durante 10 min a 3000 x g, a 4 °C, con el objetivo de remover los restos celulares presentes. Por último, se colectaron los sobrenadantes obtenidos y se guardaron a -20 °C hasta su posterior análisis por ELISA. Asimismo, se extrajeron los bazos para aislar los esplenocitos y evaluar la respuesta inmunitaria celular específica (ver apartado 3.1.10 de materiales y métodos de este capítulo).

3.1.6.2 Evaluación de la respuesta inmunitaria en ratones utilizando una vía de inmunización sistémica.

3.1.6.2.1 Inmunógenos

- **MVA-bgal y MVA-F:** se utilizaron 3×10^6 ufp/dosis de los virus MVA-bgal o MVA-F, clarificados y sonicados a intensidad media como se describió en el apartado 2.4.5, y se inocularon por la vía intraperitoneal (i.p.) en un volumen de 1 ml por ratón.
- **BRSV:** se utilizaron $4,7 \times 10^4$ dosis infectivas cultivo de tejidos 50 % (DICT50) de BRSV/dosis previamente clarificado (ver apartado 2.1.2.2 de materiales y métodos del capítulo 1). El virus BRSV clarificado se formuló en adyuvante oleoso incompleto (MONTANIDE ISA 50 V2, Seppic) en una relación 40 % de antígeno y 60 % de adyuvante. Para lograr la emulsión se agregó gota a gota la suspensión viral sobre el adyuvante con agitación continua. Este inmunógeno se inoculó por la vía i.p. en un volumen de 300 µl por ratón.
- **Vacuna génica pTT5-F:** se utilizaron 100 µg/dosis del plásmido pTT5 que porta la secuencia codificante de la proteína F del BRSV, purificado con el kit comercial *Plasmid Purification Mega Kit* (Qiagen) (punto 3.1.7 de este capítulo). Esta vacuna génica se inoculó por la vía intradérmica (i.d.) en un volumen de 200 µl por ratón (100 µl en dos puntos de inoculación distintos).
- **Vacuna a subunidad proteica Ft:** se utilizaron 300 ng de proteína Ft/dosis, (cuantificada por *Western Blot* con un anticuerpo anti-histidina (PentaHis, Qiagen) y utilizando una curva de cuantificación con una proteína no relacionada que, al igual que la proteína F, posee el mismo tag de histidinas) *obtenida* a partir de sobrenadante de células H5 infectadas que expresan la proteína Ft formulada en adyuvante oleoso incompleto (MONTANIDE ISA 50 V2, Seppic) en una

relación 40 % de antígeno y 60 % de adyuvante. La proteína Ft, obtenida previamente en nuestro laboratorio (Mozgovoij y col. 2013), es una versión truncada de la proteína F de BRSV que carece de la región de anclaje a membrana. Se expresa mediante el sistema de baculovirus. Este inmunógeno se inoculó por la vía intraperitoneal en un volumen de 300 µl por ratón.

3.1.6.2.2 Diseño experimental:

Experimento n°2

Grupos de 5 ratones fueron inmunizados 3 veces a los días 0, 21 y 44 según la siguiente tabla:

Grupo experimental (n=5)	Inmunógeno dosis 1 (t0)	Inmunógeno dosis 2 (t21)	Inmunógeno dosis 3 (t44)
1	MVA-F	MVA-F	MVA-F
2	MVA-bgal	MVA-bgal	MVA-bgal
3	BRSV	BRSV	BRSV
4	PBS	PBS	PBS

Para evaluar la presencia de anticuerpos específicos anti-BRSV (anticuerpos totales, isotipos de IgG y neutralizantes) se colectaron muestras de sangre por punción en la vena submandibular antes de la primera inmunización y a los 19, 35 y 53 dpi.

Al día 53, los ratones fueron sacrificados y se colectaron los bazo para evaluar la respuesta inmunitaria celular específica (ver apartado 3.1.10 de materiales y métodos de este capítulo).

Experimento n°3:

Grupos de 5 ratones fueron inmunizados con 3 dosis a los días 0, 21 y 44 según la siguiente tabla:

Grupo experimental (n=5)	Inmunógeno dosis 1 (t0)	Inmunógeno dosis 2 (t21)	Inmunógeno dosis 3 (t44)
1	MVA-F	Ft	MVA-F
2	pTT5-F	MVA-F	MVA-F
3	Ft	Ft	Ft
4	MVA-F	MVA-F	MVA-F
5	PBS	PBS	PBS

Se colectaron muestras de sangre por punción en la vena submandibular antes de la primera inmunización y a los 19, 35, 53 y 59 dpi para evaluar la presencia de anticuerpos específicos (totales y neutralizantes) anti-BRSV.

Los animales se desafiaron con BRSV al día 54 (ver anexo) y se sacrificaron a los 5 días post desafío (dpd). Se colectaron los pulmones para el análisis histopatológico (ver anexo), y los bazos para evaluar la respuesta inmunitaria celular específica.

3.1.7 Obtención de la vacuna génica pTT5-F

El gen de la proteína F de BRSV (A51908) se obtuvo a partir del plásmido pGEM-T-F, obtenido en este trabajo de Tesis (apartado 3.1.3.2 de materiales y métodos del capítulo 2). Como vector de destino se utilizó el plásmido pTT5 (Cedido gentilmente por el Dr. Yves Durocher, National Research Council, Canada, figura 15) que permite la expresión de genes de interés en células de mamífero. Este vector posee un sitio de clonado múltiple río abajo del promotor de Citomegalovirus, del *enhancer* transcripcional y de la secuencia intrónica, y río arriba de una secuencia de poliadenilación. Las regiones aportadas por el vector garantizan tanto una fuerte expresión del gen de interés a nivel nuclear, donde ocurre el *splicing* de la secuencia intrónica presente en el transcripto, como la estabilidad del ARNm por estar poliadenilado.

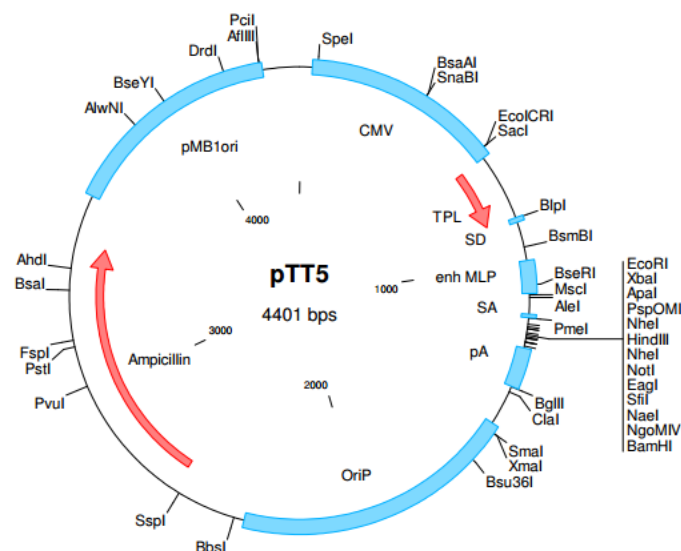


Figura 15. Esquema del plásmido pTT5.

El vector (pTT5) y el plásmido pGEM-T-F se digirieron con las enzimas de restricción *Nhe I* y *Not I*. Brevemente, se utilizaron 1-10 µg del ADN plasmídico, 5 U de cada enzima, *buffer* de restricción apropiado y un volumen final de 20-50 µl. Las reacciones

se incubaron de 2 a 3 h a 37 °C y las enzimas se inactivaron durante 30 min a 70 °C. Los productos de la digestión con enzimas de restricción se resolvieron a través de electroforesis en geles de agarosa y los fragmentos del tamaño esperado se escindieron del gel y procesaron como fue descrito anteriormente (apartados 2.1.5.5 y 3.1.3.2.4 de materiales y métodos de los capítulos 1 y 2, respectivamente).

Para evitar la religación del plásmido, se realizó la remoción de los grupos fosfato de los extremos 5' del vector digerido como se describió previamente.

Para el ligado molecular del inserto F con el plásmido pTT5, se utilizaron entre 35 y 45 ng de vector y diferentes cantidades de inserto para las relaciones molares de vector: inserto (1:1, 1:3 y 1:5). La reacción de ligado molecular, transformación de bacterias competentes *Escherichia coli* DH5α y la purificación de ADN plasmídico de los clones recombinantes se realizó como se describió en el apartado 2.3.2 de materiales y métodos del capítulo 2.

El ADN plasmídico purificado de los clones bacterianos transformantes se analizó por digestión con las enzimas de restricción *Nhe* I y *Not* I (figura 16). La secuenciación de los clones recombinantes se realizó según la metodología descrita en el punto 3.1.3.2.6 de materiales y métodos de este capítulo.

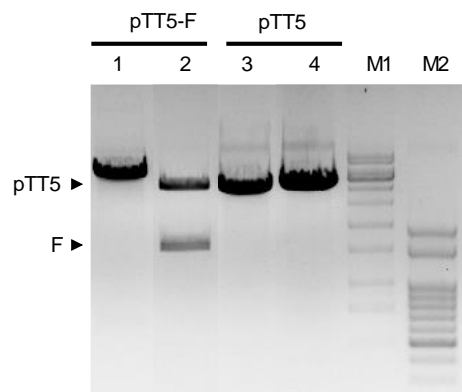


Figura 16. Construcción del vector pTT5-F. Análisis de un clon de pTT5-F (calles 1 y 2) y del plásmido pTT5 (calles 3 y 4) mediante digestión con las enzimas de restricción *Nhe* I y *Not* I. Los productos de la reacción se resolvieron mediante electroforesis en geles de agarosa 1% y tinción con bromuro de etidio. Calles 1 y 3: plásmidos digeridos con la enzima *Nhe* I; calles 2 y 4: plásmidos digeridos con las enzimas *Nhe* I y *Not* I. M1: L1 kpb *plus DNA Ladder*, M2: L100 kpb *DNA Ladder* (PB-L Productos Bio-Lógicos®).

Para corroborar la presencia del inserto específico, los plásmidos de los clones bacterianos transformantes se digirieron con las enzimas de restricción *Nhe* I y *Not* I y se analizaron los fragmentos mediante electroforesis en geles de agarosa 1 %. Se seleccionaron los clones que presentaban un inserto de aproximadamente 1700 pb (tamaño esperado del inserto F). La identidad del inserto clonado se confirmó mediante

secuenciación de manera similar a la descrita en los apartados 3.1.3.2.5 y 3.1.3.2.6 de materiales y métodos de este capítulo.

3.1.8 Infección experimental de ratones con BRSV

Como se describió previamente, en el experimento nº3, a los 10 días luego de la última inoculación se realizó el desafío viral inoculando por vía intranasal el virus BRSV tal como se detalla en el anexo 1.

3.1.9 Evaluación de anticuerpos contra el BRSV mediante ELISA

3.1.9.1 ELISA de isotipos basado en BRSV purificado

Se purificó un stock viral de BRSV utilizando una modificación del protocolo descrito por Domingues y colaboradores (H.G. Domingues y col. 2002). Brevemente, a partir de 500 ml de un *stock* viral (obtenido como se describió en el apartado 2.1.2 de materiales y métodos del capítulo 1) con un título de 1×10^6 DICT50/ml se realizó un ciclo de congelado a -70°C y posterior descongelado a temperatura ambiente. Luego, el lisado celular se clarificó por centrifugación a $1000 \times g$ durante 15 min a 4°C . El sobrenadante se ultracentrifugó a $30000 \times g$ en rotor 45 Ti (Beckman Coulter) durante 2 h a 4°C . El *pellet* se resuspendió en 4,5 ml de *buffer* TC (Tris HCl 0,01 M, CaCl_2 1,5 mM pH 7,4) y se clarificó por centrifugación (4 min, 1000 rpm en rotor 5810 (Eppendorf) a 4°C . El sobrenadante se sembró en un gradiente discontinuo de sacarosa preparado con 1,5 ml y 7,5 ml de sacarosa 55 y 35 % p/p, respectivamente, preparado en *buffer* TC. Se realizó la ultracentrifugación a 17500 rpm en rotor SW41 (Beckman Coulter) durante 1,5 h a 4°C . La suspensión viral se recuperó de la interfase 30-55 %, se diluyó en *buffer* TC y se removió la sacarosa proveniente del gradiente por ultracentrifugación durante 1 h a $30000 \times g$ en rotor SW41 (Beckman Coulter), a 4°C . El *pellet* final se resuspendió en 2 ml de PBS y el virus purificado se almacenó en alícuotas a -70°C

Los anticuerpos anti-BRSV se determinaron mediante un ensayo de ELISA según un protocolo descrito por Kovarcik (Kovarcik 2001). Brevemente, se sensibilizaron placas Immulon 1b (Dynatech Laboratories) con una dilución 1:80 de BRSV purificado preparado en *buffer* carbonato/bicarbonato 50 mM, pH 9,2. Después de la adsorción a 4°C durante 16 h, las placas se bloquearon 1 h a 37°C con *buffer* de bloqueo (PBS conteniendo 0,05% de Tween 20, 5 % de suero normal equino y 5 % de leche descremada). Se prepararon diluciones seriadas de las muestras incógnita (sueros, BAL o lavados nasales de los ratones inmunizados) en *buffer* de bloqueo, se agregaron 50 μl /pocillo y se incubaron durante 1 h a 37°C . Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBST (PBS adicionado con 0,05% de Tween 20) y se incubó durante 1 h a 37°C

con el anticuerpo secundario correspondiente. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti IgG1 de ratón conjugado con biotina (CALTAG) diluido 1/2000, anti IgG2a de ratón conjugado con biotina (CALTAG) diluido 1/2000, anti IgA de ratón hecho en cabra (Bethyl) diluido 1/2000. Luego de una hora de incubación se lavó como se describió previamente y se agregaron los siguientes conjugados: Streptavidina conjugado con HRP (peroxidasa de rabanito picante, *horseradish peroxidase*, (CALTAG)) diluido 1/2000, para la detección de IgG1 e IgG2a; o un anticuerpo anti-cabra hecho en conejo conjugado con HRP (KPL) diluido 1/1000 para la detección de IgA. Finalmente, las placas se lavaron exhaustivamente con PBST y la reacción se reveló mediante el agregado de 50 µl/pocillo de solución reveladora: para el ELISA de IgG1 e IgG2a se utilizaron 10 ml de *buffer* citrato de sodio (ácido cítrico 46 mM, pH 5), 300 µl de una solución de ABTS (ABTS: 2-2'-azino-bis (3-etilbentiazolina-6-sulfónico) (0,01g/0,06 ml de H₂O) y 10 µl de peróxido de hidrógeno 30 volúmenes y para el ELISA para medir IgA se utilizó TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) siguiendo las indicaciones del fabricante (Beckton Dickinson Labware). Se leyó la absorbancia a 405 nm (para ABTS) o 450nm (para TMB) en un espectrofotómetro (Multiskan, Labsystems) a los 30 min. Cada muestra se evaluó por duplicado y el resultado se expresó como el promedio del valor de densidad óptica (D.O.) de las réplicas de cada suero incógnita.

3.1.9.2 ELISA comercial *INgezim BRSV Compac*

Los anticuerpos totales anti-BRSV se determinaron mediante el ELISA comercial de competición *INgezim BRSV Compac* (INGENASA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Todas las soluciones utilizadas son provistas por el fabricante. Brevemente, sobre una placa de 96 pocillos, en donde se encuentra adsorbido el antígeno (BRSV inactivado), se añadieron 50 µl de las muestras de suero a evaluar en una dilución ¼ en simultáneo con 50 µl de un anticuerpo monoclonal (AcM) específico anti- BRSV conjugado con HRP. Posteriormente, se lavaron las placas seis veces con 300 µl de *buffer* de lavado y se reveló tras la adición de la solución de sustrato TMB. Luego de 10 min de incubación, la reacción de revelado se detuvo por el agregado de 50 µl/pocillo de solución *Stop*, se incubó durante 5 min y se leyó la DO a 450 nm en un espectrofotómetro (Multiskan, Labsystems). La presencia de color indica la ausencia de anticuerpos específicos de BRSV en el suero ensayado, mientras que la ausencia o disminución de color corresponde a muestras seropositivas. En cada ensayo se agregó un control positivo (CP) y un control negativo (CN) provistos por el fabricante. El punto de corte se calculó según la siguiente fórmula: $CN - [(CN-CP) \times 0,40]$.

3.1.9.3 Análisis estadístico de los resultados de ELISA

Las diferencias estadísticas entre los grupos experimentales se analizaron de acuerdo a la naturaleza de los datos considerando los supuestos de normalidad y homocedacia, y seleccionando test paramétrico o no paramétrico adecuado para cada caso.

Para estos análisis se empleó el programa *Graph Pad®* versión 6.0 para *Windows* (La Jolla, CA). Los valores de $p < 0.05$ fueron tomados como estadísticamente significativos.

3.1.10. Evaluación de la respuesta inmunitaria celular

3.1.10.1 Obtención de esplenocitos de ratón para cultivo *in vitro*.

Se extrajeron los bazos de ratones y se disgregaron mecánicamente, utilizando portaobjetos esmerilados, en medio de cultivo RPMI (Invitrogen) suplementado con L-glutamina 2 mM (Sigma – Aldrich), penicilina 100 U/ml (GIBCO), estreptomina 100mg/ml (GIBCO), HEPES 10 mM (GIBCO), 2 - mercaptoetanol 50 mM (Sigma – Aldrich), y 10% SFB (Gibco). Se lavaron los esplenocitos, se removieron los glóbulos rojos por lisis osmótica con *buffer* de lisis de NH_4Cl 0,5 M y se realizó el recuento al microscopio en cámara de *Neubauer* de las células viables teñidas con azul de *Trypan* 0,4 % (GIBCO).

3.1.10.2 Cuantificación de IFN- γ , IL-12 e IL-4 en sobrenadantes de esplenocitos estimulados *in vitro*

Para la cuantificación de IFN- γ , IL-12 e IL-4, se cultivaron 1×10^6 esplenocitos por pocillo en placas de 96 pocillos con fondo en U (GBO) y se realizó la estimulación de los linfocitos con 20 μl de un *stock* de BRSV de título 10^6 DICT50/ml producido en células MDBK, clarificado e inactivado mediante exposición a luz UV durante 1 min (se utilizó además, un control *mock*, es decir, células MDBK sometidas al mismo tratamiento que el *stock* de BRSV, a fin de detectar una posible reacción inespecífica con los antígenos celulares). Las placas se incubaron a 37 °C, 5 % CO_2 durante 36 h para la determinación de IL-4 e IL-12 y durante 72 h para la determinación de IFN- γ . Transcurrido ese tiempo se recogieron los sobrenadantes y se preservaron a -80 °C hasta su uso.

Los niveles de IFN- γ , IL-12 e IL-4 secretados se determinaron por ELISA de captura, utilizando los *kits* comerciales OptEIA™ (Beckton Dickinson Labware) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, se sensibilizaron placas Maxisorp de 96 pocillos fondo plano (NUNC) con 100 μl por pocillo de la dilución recomendada por el fabricante del anticuerpo monoclonal de captura correspondiente (anti-*mouse* IFN- γ , anti-*mouse* IL-12 (p70) o anti-*mouse* IL-4) en *buffer* carbonato/bicarbonato, 100 mM, pH:

9.6 y se incubaron toda la noche a 4 °C. Posteriormente se lavaron las placas tres veces con 100 µl de *buffer* de lavado PBST y se bloquearon durante 1 h con 100 µl de PBS 1X - SFB 10% a temperatura ambiente. Luego de realizar cinco lavados, se colocaron los sobrenadantes de los cultivos de esplenocitos estimulados en una dilución 1/10 y los puntos de la curva estándar diluidos en PBS 1X - SFB 10 %. Las placas se incubaron a temperatura ambiente por 2 h (todas las determinaciones se realizaron por duplicado). Luego, se lavaron las placas tres veces y se agregaron 100 µl/pocillo de la mezcla compuesta por el anticuerpo de detección biotinilado (anti-*mouse* IFN-γ, anti-*mouse* IL-12 (p70) o anti-*mouse* IL-4) en una dilución 1:250 y el reactivo enzimático estreptavidina – HRP en una dilución 1:250 y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron las placas cinco veces y se agregó la solución de revelado (TMB en 30 % de H₂O₂). La reacción se detuvo mediante el agregado de 50 µl/pocillo de H₂SO₄ 2 N y la DO se leyó a 450 nm en un espectrofotómetro (Multiskan, Labsystems). La concentración de IFN-γ, IL-12 e IL-4 secretados se calculó con la curva estándar del *kit* y se expresó como ng/ml de citoquina detectada.

3.2 Resultados

3.2.1 Obtención del vector de transferencia VT-MTK-F

Dado que no existen sistemas comerciales para la obtención de virus MVA recombinantes, se utilizó la metodología implementada y las construcciones plasmídicas disponibles en el Instituto de Biotecnología del INTA Castelar (M F Ferrer, Zanetti, y Calamante 2007). El gran tamaño del genoma de los virus MVA (> 130 kpb) impide la manipulación directa del mismo y el ADN foráneo se inserta por recombinación homóloga *in vivo*. Los métodos generales para la obtención de poxvirus recombinantes emplean vectores plasmídicos de transferencia (VT) que llevan secuencias homólogas a las regiones del genoma viral que serán el blanco de inserción de los genes de interés.

En este trabajo de tesis, se utilizó el vector de transferencia VT-MTK-GUS-EL que posee como sitio blanco de inserción el gen *MVA086R*, que codifica para la proteína timidina quinasa (TK) viral. Este gen no es esencial para la replicación del virus MVA *in vitro* (Scheifflinger, Falkner, y Dorner 1996) y ha sido exitosamente usado en el desarrollo de vectores virales (Ramírez, Gherardi, y Esteban 2000; M F Ferrer, Zanetti, y Calamante 2007). Además, este VT posee el *cassette* de expresión de la enzima marcadora beta-glucuronidasa bacteriana (GUS), bajo regulación del promotor poxviral H6, que permite el aislamiento de los clones virales recombinantes por su capacidad de formar placas de lisis azules en presencia del sustrato X-gluc. Por la estrategia de clonado, la expresión del gen foráneo está dirigida por el promotor temprano/tardío sintético de poxvirus (pE/L)

Para la construcción del vector de transferencia VT-MTK-F se amplificó por RT-PCR un fragmento de 1725 pb que comprende las posiciones 5557 a 7458 del genoma viral de BRSV, correspondiente a la secuencia codificante de la proteína de fusión (F). El fragmento de interés se clonó en el vector VT-MTK-GUS-EL utilizando los sitios *Nhe* I y *Nco* I. El primer paso consistió en el clonado del producto de amplificación por RT-PCR en el plásmido pGEM-T® *Easy* (Figura 17). La selección de los clones positivos (n° 2 y 4), se realizó mediante un mapeo por restricción utilizando las enzimas *Nhe* I y *Nco* I. La identidad del inserto se confirmó mediante secuenciación en los dos clones seleccionados y se eligió el clon recombinante n° 4 para realizar la construcción del vector de transferencia VT-MTK-F.

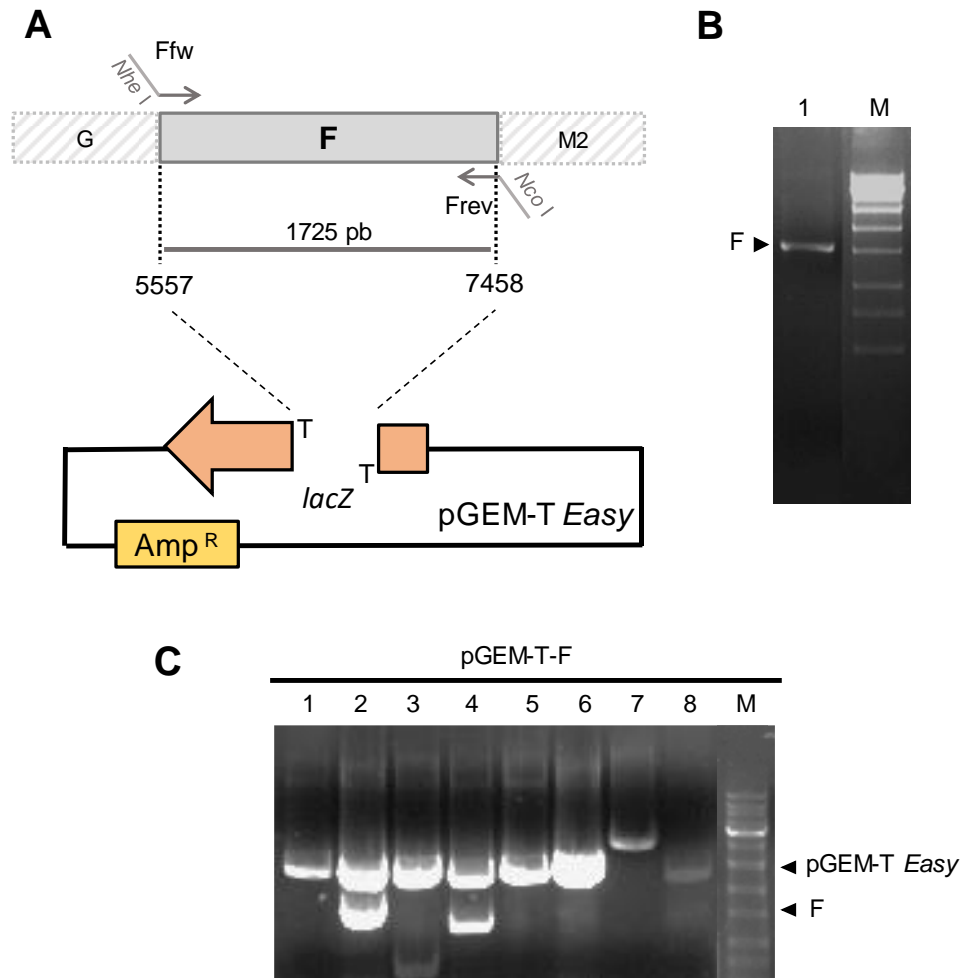


Figura 17. Amplificación del gen codificante para la proteína F y clonado en el plásmido pGEM-T Easy. **A)** Esquema de clonado del gen codificante para la proteína F en el plásmido pGEM-T Easy. **B)** Amplificación por RT-PCR, a partir de ARN viral de BRSV utilizando los oligonucleótidos Ffw y Frev. Calle 1: amplicon del gen codificante de la proteína F. **C)** Análisis de los clones pGEM-T-F recombinantes (n°1 a n°8) mediante digestión con las enzimas de restricción *Nhe* I y *Nco* I. En todos los casos, los tamaños de los fragmentos se confirmaron por electroforesis en geles de agarosa 1% y tinción con bromuro de etidio. M: L1 kpb *plus DNA Ladder* (PB-L Productos Bio-Lógicos®).

Luego, el plásmido pGEM-T-F fue digerido con las enzimas de restricción *Nhe* I y *Nco* I, y el inserto liberado se purificó de gel de agarosa y se subclonó en el plásmido VT-MTK-GUS-EL, previamente digerido con las mismas enzimas de restricción. En la figura 18 se muestra el análisis de los clones recombinantes VT-MTK-F obtenidos, mediante digestión con las enzimas *Nhe* I y *Nco* I. La identidad del inserto de los clones n°5 y n°6 del VT-MTK-F se confirmó mediante secuenciación.

De esta manera, se obtuvo el VT-MTK-F que se utilizó como vector de transferencia para la obtención de los poxvirus recombinantes.

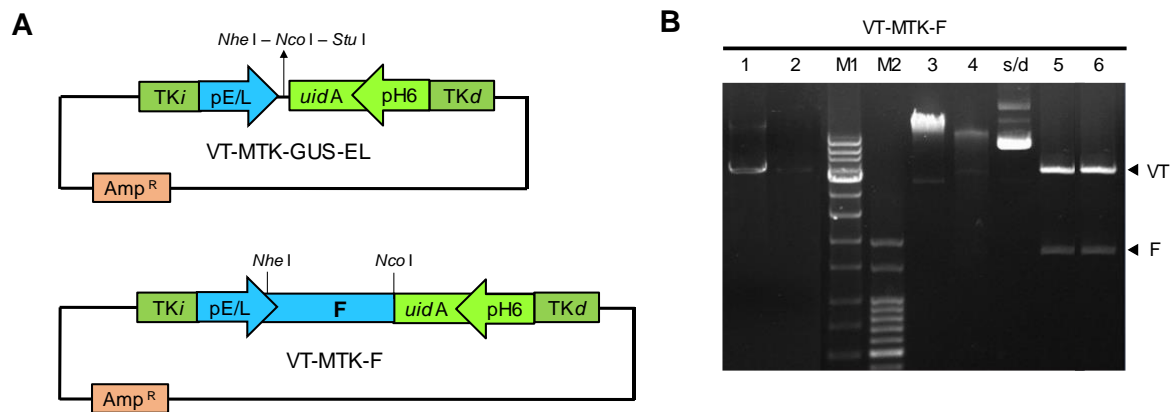


Figura 18. Análisis de los clones VT-MTK-F. **A)** Esquema de los vectores de transferencia VT-MTK-GUS-EL y VT-MTK-F. **B)** El ADN plasmídico de los clones recombinantes (nº 1 al nº 6) se analizó mediante digestión con las enzimas de restricción *Nhe I* y *Nco I*. Los productos de digestión se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa 1% y tinción con bromuro de etidio. 1 al 6: clones recombinantes; s/d: ADN plasmídico de VT-MTK-F nº 5 sin digerir; M1: L1 kpb *plus DNA Ladder*; M2: L100 kpb *DNA Ladder* (PB-L Productos Bio-Lógicos®).

3.2.2 Obtención y caracterización de virus MVA-F

Los virus MVA-F se obtuvieron por recombinación homóloga *in vivo* entre el genoma de MVA-bgal y el VT-MTK-F según el protocolo descrito en materiales y métodos (apartado 3.1.4.3). El *screening* de los virus MVA-F recombinantes se realizó por clonado de las partículas infectivas bajo agar y análisis de la expresión del gen marcador *uidA* (figura 19). Las placas de lisis que presentaban color azul se aislaron y se amplificaron en cultivos de FEP. En total se realizaron once pasajes de clonado viral hasta obtener un *stock* homogéneo que produjo el 100% de placas de lisis azules.

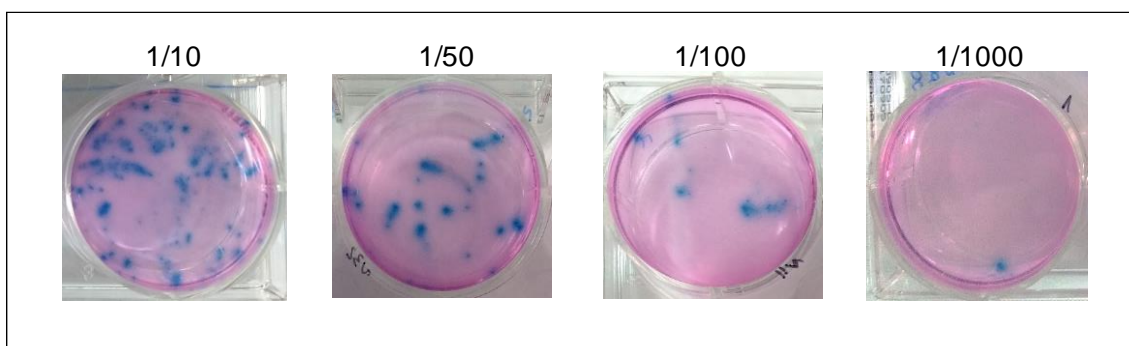


Figura 19. Screening de los virus MVA-F. El *screening* de los virus MVA-F se realizó por clonado de las partículas infectivas bajo agar y análisis de la expresión de la proteína marcadora GUS utilizando el sustrato específico X-gluc. Se muestran 4 pocillos de placas de 6 pocillos (P6) infectadas con las diluciones 1/10, 1/50, 1/100 y 1/1000 de un clon viral. Cada punto azul corresponde a una placa de lisis de virus recombinante.

Debido a que el proceso de aislamiento de MVA-F (clon viral nº 74) se realizó por *screening* de la actividad enzimática de GUS, fue necesario corroborar la presencia y

expresión del gen de interés (gen codificante de la proteína F) mediante las técnicas de PCR y RT-PCR, según se describe en el ver apartado 3.1.5 de materiales y métodos del capítulo 2.

Como se observa en la figura 20 B, se confirmó la presencia de ADN viral en las muestras provenientes de células infectadas con MVA-F y MVA-bgal mediante la amplificación de un fragmento de aproximadamente 950 pb correspondiente al gen viral *MVA165R* (codificante para la proteína viral hemoaglutinina, HA).

Luego, se evaluó la presencia del gen de interés mediante amplificación por PCR utilizando los pares de oligonucleótidos B1-B2A y B3-B4A que amplifican productos de ADN de 711 y 481 pb, respectivamente, correspondientes a fragmentos internos de la secuencia codificante para la proteína F del BRSV (figura 20 C y D). Estos amplicones se detectaron en las muestras provenientes de células infectadas con MVA-F mientras que no se observaron productos de amplificación en las reacciones de PCR realizadas con los ADN extraídos de FEP no infectados o infectados con MVA-bgal.

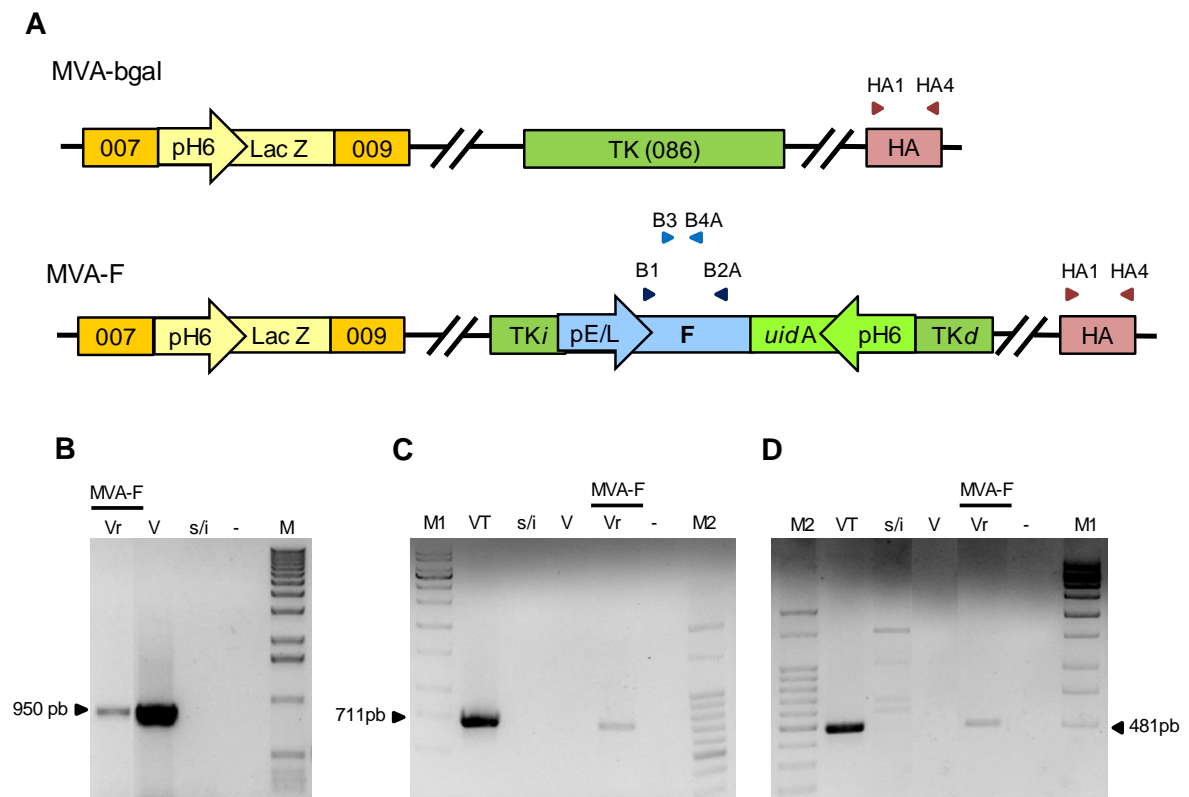


Figura 20. Caracterización molecular de los virus MVA-F por PCR. A) Esquema de los virus MVA-bgal y MVA-F. **B)** Amplificación del gen *MVA165R* (HA) empleando los oligonucleótidos HA1 y HA4. **C y D)** Amplificación de dos fragmentos internos de la secuencia codificante de la proteína F de BRSV empleando los oligonucleótidos B1 - B2A y B3-B4A, respectivamente. En todos los casos, los fragmentos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa 1% y tinción con bromuro de etidio. Las amplificaciones por PCR se realizaron a partir de ADN extraído de células FEP infectadas con MVA-F (Vr), MVA-bgal (V) o sin infectar (s/i). Se incluyeron controles sin ADN (-) o con ADN de VT-MTK-F (VT). M: *1Kb DNA ladder Plus* (Invitrogen), M1: L1 kpb *plus DNA Ladder*, M2: L100 kpb *DNA Ladder* (PB-L Productos Bio-Lógicos®).

Luego de confirmar la presencia del gen que codifica para la proteína F de BRSV se evaluó la transcripción de dicho gen mediante la técnica de RT-PCR según se describe en el apartado 3.1.5.2 del capítulo 2 de materiales y métodos.

En primer lugar, para determinar la correcta purificación del ARN total y la ausencia de inhibidores, se realizó la amplificación por RT-PCR de un fragmento del ARNr 16S, de expresión constitutiva. Solo se observaron productos de amplificación en las muestras provenientes de ADNc obtenidas por RT-PCR, descartando la presencia de ADN celular contaminante en las muestras de ARN y de inhibidores de la reacción (figura 21 A).

Luego, por RT-PCR, se confirmó la presencia de los transcritos del gen viral *MVA157L* en las muestras de ADNc provenientes de cultivos celulares infectados con MVA-F o MVA-bgal. No se observaron productos de amplificación en las muestras provenientes de células sin infectar (Figura 21 B).

Finalmente, se confirmó la expresión del *gen F* de BRSV, a nivel de transcripción, mediante la amplificación por RT-PCR en las muestras de ADNc provenientes de células infectadas con MVA-F (figura 21 C).

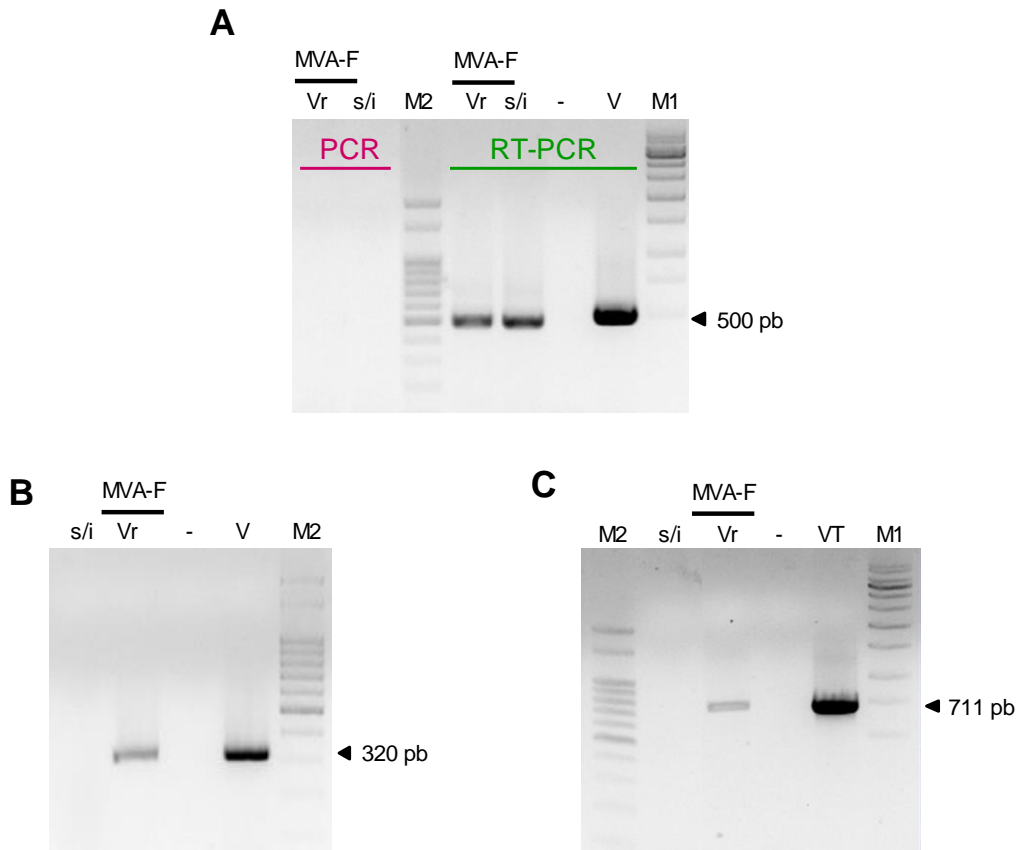


Figura 21. Evaluación de transcripción del *gen F* en células infectadas con el virus MVA-F. A) Amplificación por PCR o RT-PCR del ARNr 16S. **B)** Amplificación por RT-PCR del transcrito del gen viral *MVA157L*. **C)** Amplificación por RT-PCR del transcrito del *gen F*. En todos los casos, los productos de la reacción de amplificación por PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa 1% y tinción con bromuro de etidio. Las amplificaciones por PCR o RT-PCR se realizaron a partir de ARN extraído de células FEP infectadas con MVA-F (Vr), MVA-bgal (V) o sin infectar (s/i). Se incluyó un control de la reacción de PCR sin templado (-) y un control positivo con ADN de VT-MTK-F (VT). M1: L1 kpb *plus DNA Ladder*, M2: L100 kpb *DNA Ladder* (PB-L Productos Bio-Lógicos®).

Por último, una vez confirmada la presencia y expresión del gen de interés mediante PCR y RT-PCR, respectivamente, la identidad del *gen F* incorporado mediante recombinación homóloga *in vivo* al MVA se confirmó mediante secuenciación.

3.2.3 Evaluación de la inmunogenicidad de MVA-F en ratones por vía de mucosas y sistémica.

3.2.3.1 Inmunogenicidad de los MVA-F en ratones inoculados por vía intranasal.

Para evaluar la respuesta inmunitaria inducida por los virus MVA-F por la vía intranasal se llevó a cabo el experimento n°1 en el cual se inocularon ratones con dos dosis del correspondiente inmunógeno a los días 0 y 21.

Los animales se sangraron a los 19 días post inoculación y, luego de las dos inoculaciones, se sacrificaron al día 35, recolectando el bazo para las mediciones de

respuesta celular y muestras de sangre y de lavados nasales y broncoalveolares para evaluación de respuesta humoral sistémica y de mucosas, respectivamente.

La presencia de anticuerpos totales específicos contra BRSV en suero se evaluó por ELISA de competencia. Los grupos control se mantuvieron seronegativos durante todo el experimento. En cambio, en el grupo vacunado con MVA-F se observó el efecto de la dosis refuerzo, ya que luego de la primera dosis no se detectaron anticuerpos específicos contra BRSV, mientras que a los 14 días posteriores a la segunda dosis (t35) se observó una respuesta positiva, (figura 22 A). Sin embargo, en ninguna de las muestras de suero fue posible detectar la presencia de anticuerpos neutralizantes (AN) de la infección de BRSV (resultados no mostrados).

Posteriormente, se llevó a cabo un ELISA para detectar la presencia de IgG1 e IgG2a específicas contra BRSV. Sólo se detectaron diferencias significativas ($p < 0,01$) en los niveles de IgG2a entre el grupo inoculado con MVA-F y los grupos MVA-bgal y PBS (figura 22 B). En cuanto a la presencia de IgG1 específica contra BRSV, en las muestras de los animales inmunizados con MVA-F se observa un leve aumento respecto de los grupos control.

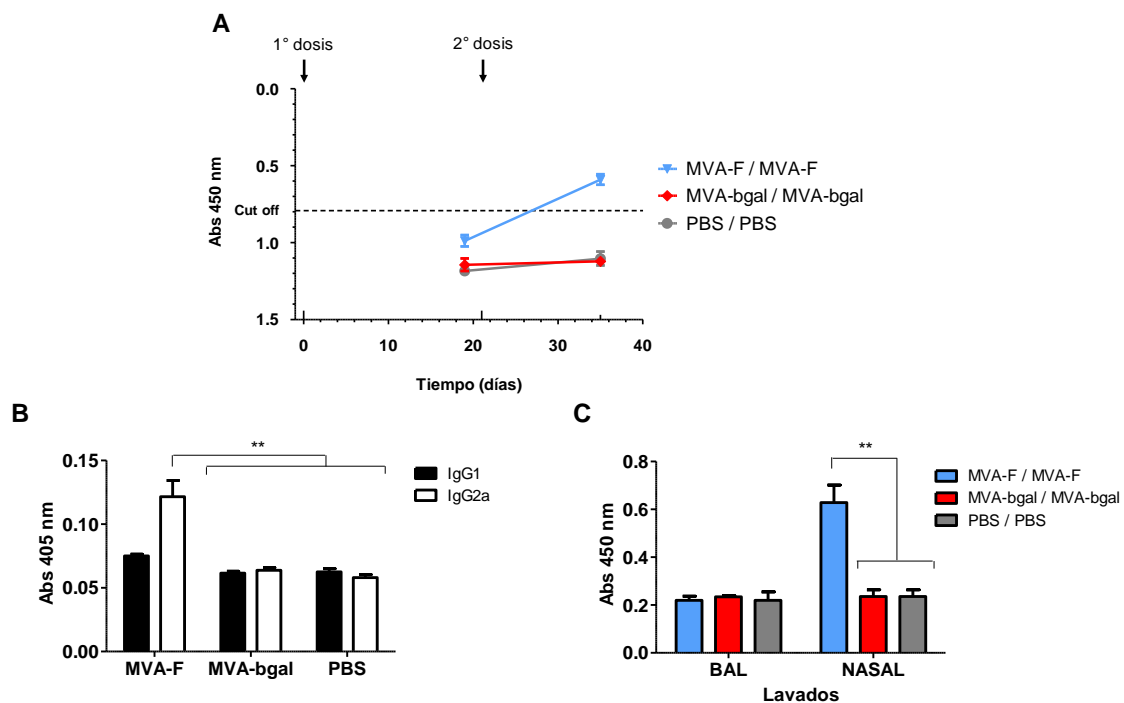


Figura 22. Evaluación de la respuesta inmune humoral inducida por MVA-F inoculado por vía intranasal (experimento n°1). Ratones BALB/c fueron inmunizados por la vía intranasal (i.n.) con $5,6 \times 10^5$ unidades formadoras de placas (ufp) de MVA-F y MVA-bgal. Todos los ratones recibieron dos dosis (a los días 0 y 21). **A)** Cinética de los niveles de anticuerpos totales específicos contra BRSV en respuesta a las inmunizaciones. Los sueros se evaluaron en una dilución $1/4$. **B)** Evaluación de la presencia de isotipos IgG1 e IgG2a en los animales inmunizados a los 35 días. Los sueros se evaluaron en una dilución $1/25$. **C)** Evaluación de la presencia de IgA específica contra BRSV en lavados nasales y broncoalveolares (BAL) a los 35 días. Las muestras se evaluaron sin diluir. ** $p < 0,01$.

Respecto a las muestras de lavados nasales y broncoalveolares (BAL), no fue posible detectar anticuerpos IgA específicos contra BRSV en BAL, pero se observó la presencia de dichos anticuerpos en lavados nasales, obteniéndose diferencias significativas entre el grupo vacunado con MVA-F y los grupos control ($p= 0,0011$; figura 22 C).

Finalmente, se evaluó la presencia de IFN- γ , IL-12 e IL-4 en el sobrenadante de esplenocitos reestimulados *in vitro* utilizando un ELISA comercial (BD OptEIA Team). Si bien todos los sobrenadantes se evaluaron puros, no fue posible detectar las citoquinas mencionadas.

En conjunto, los resultados indican que dos dosis de MVA-F administrado por vía intranasal induce una respuesta inmunitaria humoral específica contra BRSV con presencia de IgG sérica e IgA a nivel del tracto respiratorio superior.

3.2.3.2 Inmunogenicidad de los MVA-F en ratones inoculados por vía sistémica.

3.2.3.2.1 Evaluación de la inmunogenicidad de los MVA-F en esquemas *prime-boost* homólogo

Para evaluar la respuesta inmunitaria inducida por los virus recombinantes por una vía sistémica se inocularon ratones por vía intraperitoneal (experimento n°2) con los inmunógenos detallados en el apartado 3.1.6.2.1 de materiales y métodos de este capítulo.

Primeramente, se evaluó la presencia de anticuerpos específicos contra BRSV en suero mediante un ELISA de competencia. La figura 23 A muestra los niveles de anticuerpos totales inducidos por la vacunación a lo largo del tiempo. Se observó que luego de la primera dosis (19 dpi) solo los ratones del grupo inoculado con MVA-F fueron capaces de inducir anticuerpos contra BRSV, mientras que los otros grupos, se mantuvieron por debajo del punto de corte del ELISA. A los 35 dpi (14 días después de la segunda inmunización) los animales de los grupos inoculados con MVA-F o con BRSV presentaron anticuerpos contra BRSV. Los grupos control se mantuvieron seronegativos durante todo el experimento. Luego de la tercera dosis, no se observaron cambios en los niveles de anticuerpos. Es importante destacar que al ser un ELISA de competencia, una vez que los niveles de anticuerpos alcanzan un nivel al cual se produce un desplazamiento del 100% del anticuerpo de competencia, los niveles de absorbancia alcanzan su punto mínimo, con lo cual un mayor nivel de anticuerpos no sería detectable a la dilución de uso establecida por el fabricante.

Posteriormente, se evaluaron los niveles de AN mediante la técnica de seroneutralización viral. Como se observa en la figura 23 B, una sola dosis no fue suficiente para inducir AN. Sin embargo, luego de la segunda dosis los grupos

inoculados con MVA-F o BRSV presentaron títulos de AN cercanos a 32, que se mantuvieron constantes luego de la tercera dosis.

Con el objetivo de determinar el perfil de respuesta inducido por la vacunación, se llevó a cabo la medición de los isotipos IgG1 e IgG2a, mediante un ELISA indirecto. En la figura 23 C se observa que, para los dos tiempos ensayados, el grupo inoculado con MVA-F indujo una respuesta balanceada, con niveles similares de IgG1 e IgG2a. Por su parte, el grupo de BRSV mostró niveles significativamente superiores de IgG1, indicativos de un perfil de tipo Th2.

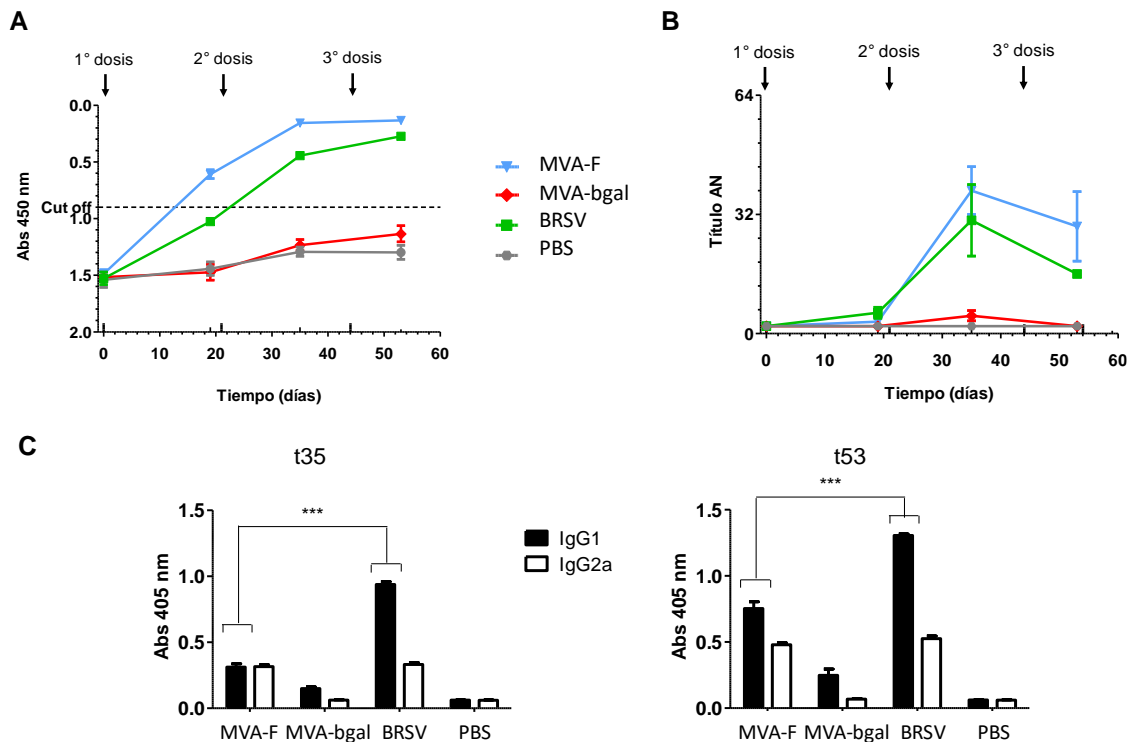


Figura 23. Evaluación de la respuesta inmune humoral de MVA-F inoculado por vía intraperitoneal (experimento n°2). Ratones Balb/c se inmunizaron con 1×10^6 ufp de los MVA y $4,7 \times 10^4$ DICT50 de BRSV a los días 0, 21 y 44. **A)** Cinética de los niveles de anticuerpos totales anti-BRSV en respuesta a las inmunizaciones determinada por ELISA de competencia (Ingezim, INGENASA). **B)** Niveles de AN específicos contra BRSV determinados por seroneutralización viral. **C)** Perfil de isotipos séricos IgG1 (barras negras) e IgG2a (barras blancas) luego de 2 (35 dpi) y 3 (53 dpi) dosis de cada inmunógeno. *** $p < 0,001$.

Posteriormente, se evaluó la secreción de citoquinas por los esplenocitos de los ratones vacunados reestimulados *in vitro* con BRSV (estímulo específico), *mock* (estímulo inespecífico), Concanavalina A (ConA, mitógeno) y medio de cultivo RPMI (estimulación basal). Se colectó el sobrenadante de cultivo y se evaluó la presencia de IL-12, IL-4 e IFN- γ , mediante ELISA (BD OptEIA Team). Si bien no fue posible detectar la presencia de IL-12 ni IL-4 en los sobrenadantes de cultivo, se observó que el grupo inoculado con MVA-F indujo un nivel de IFN- γ (84 ng/ml aproximadamente)

significativamente mayor al inducido por los inmunógenos de los otros grupos experimentales ($p < 0,001$; Figura 24).

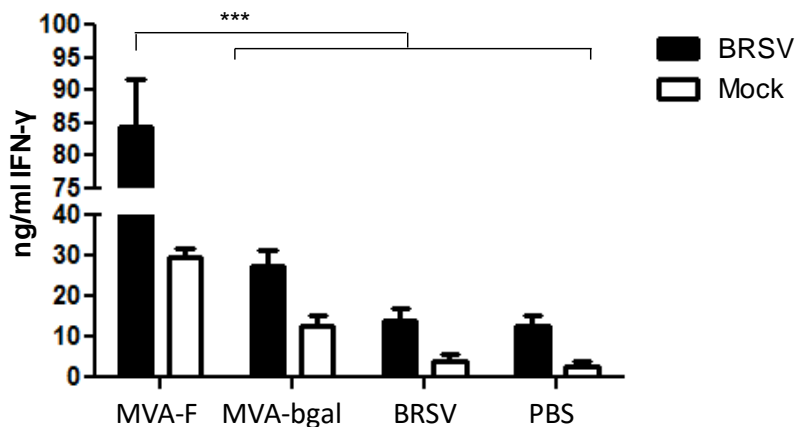


Figura 24. Evaluación de la respuesta inmunitaria celular inducida por MVA-F inoculado por vía intraperitoneal (experimento n°2). Cuantificación por ELISA *sandwich* (OptiEIA, BD) del nivel de IFN- γ (expresado como nanogramos por ml) secretado en los sobrenadantes (dilución de uso 1/50) de cultivo de esplenocitos reestimulados con BRSV (barras negras) o con *mock* (barras blancas). *** $p < 0,001$.

En base a los resultados presentados, se determinó que la vía de inoculación por la que MVA-F otorga un mejor perfil de respuesta inmunitaria específica contra BRSV es la intraperitoneal. Este perfil de respuesta se caracteriza por la presencia de anticuerpos totales específicos contra BRSV, incluso con una sola dosis de MVA-F. Además, luego de dos dosis fue posible detectar AN que se mantuvieron en niveles cercanos a 32 a lo largo del tiempo. Por otra parte, el grupo inoculado con MVA-F indujo niveles de IFN- γ significativamente mayores a los otros grupos ensayados en respuesta al estímulo específico y un perfil de isotipos IgG1 e IgG2a que indicarían una respuesta balanceada Th1/Th2, mientras que el grupo inoculado con BRSV indujo un perfil de tipo Th2.

3.2.3.2.2 Evaluación de la inmunogenicidad de los MVA-F en esquemas *prime-boost* heterólogo.

Una vez elegida la vía de inoculación, se evaluó la respuesta inmunitaria inducida por los MVA-F en combinación con una vacuna a subunidad o con una vacuna génica. Para ello, se llevó a cabo el experimento n°3, en el que se inocularon ratones por vía intraperitoneal (MVA-F o Ft) o intradérmica (pTT5-F) tal como se detalla en el apartado 3.1.6.2.1 de materiales y métodos del capítulo 2.

En primer lugar, se evaluó la presencia de anticuerpos anti BRSV en suero a lo largo del tiempo mediante un ELISA comercial (Ingezim BRSV Compac, Ingenasa) (figura 25A). Como era de esperar, los animales del grupo control inoculado con PBS fueron seronegativos durante todo el experimento. En cambio, luego de la primera dosis (19

dpi), solo los grupos inoculados con MVA-F fueron capaces de inducir anticuerpos contra BRSV, mientras que los otros grupos, se mantuvieron por debajo del punto de corte. Sin embargo, al tiempo 35 (14 días post *booster*), todos los grupos experimentales presentaron anticuerpos contra BRSV y se mantuvieron seropositivos hasta el final del experimento.

Luego, se evaluaron los niveles de AN mediante la técnica de seroneutralización viral (figura 25 B). Tal como se observó en el experimento n°2, una sola dosis de MVA-F no fue suficiente para inducir AN. Sin embargo, luego de la segunda dosis todos los grupos experimentales presentaron títulos de AN anti BRSV que fluctuaron entre 16 y 32, manteniéndose constantes después de la tercer inoculación. Luego del desafío, el grupo inoculado con la combinación MVA-F y Ft, mostró un aumento del título de AN.

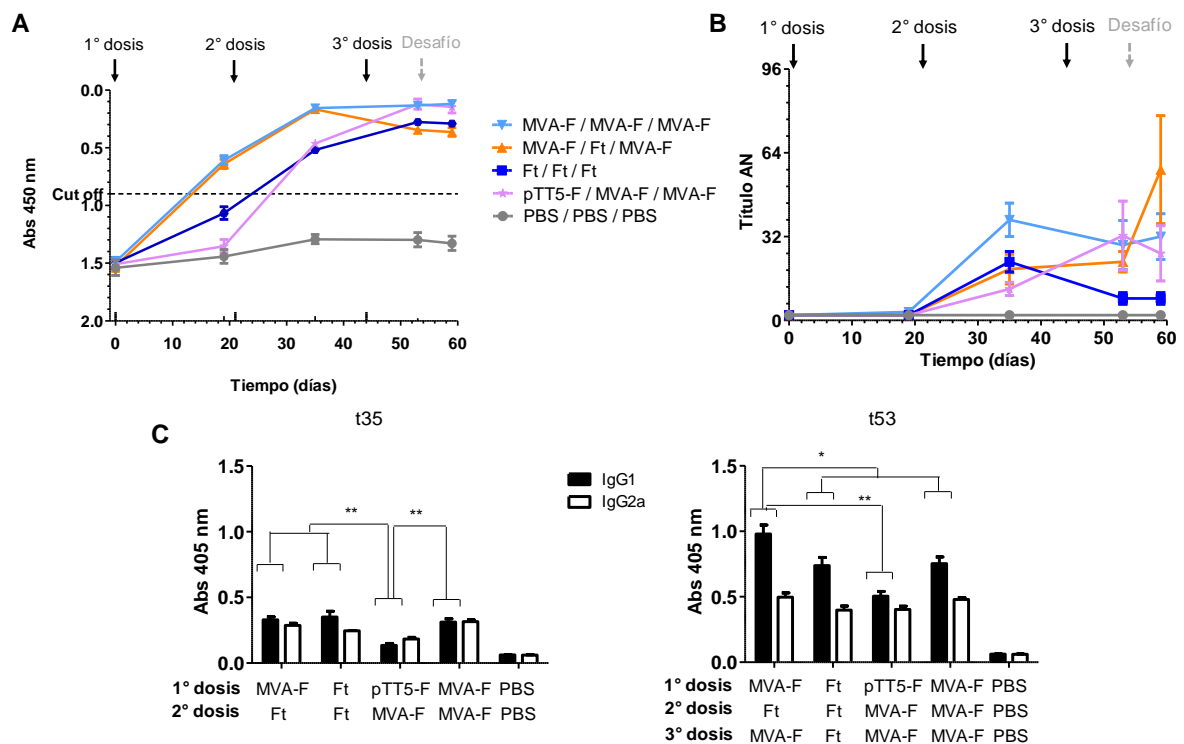


Figura 25. Evaluación de la inmunogenicidad de MVA-F en esquemas de vacunación *prime-boost* heterólogo (experimento n°3). Todos los ratones recibieron tres dosis de inmunógenos (a los días 0, 21 y 44 pi), se desafiaron al día 53 pi y se sacrificaron a los 5 dpd. **A).** Cinética de los niveles de anticuerpos totales anti BRSV determinado por ELISA de competencia (Ingezim BRSV Compac, INGENASA). **B)** Niveles de AN específicos contra BRSV determinados por seroneutralización viral. **C)** Perfil de isotipos séricos IgG1 (barras negras) e IgG2a (barras blancas) luego de 2 (35 dpi) y 3 (53 dpi) dosis de cada inmunógeno. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

Con el objetivo de determinar el perfil de respuesta inducido por la vacunación, se llevó a cabo la medición de los isotipos IgG1 e IgG2a en suero, mediante un ELISA indirecto. Se observó que luego de la segunda dosis de inmunógenos, todos los grupos indujeron una respuesta balanceada Th1/Th2. Luego de la tercera dosis, se observó un aumento en el nivel de anticuerpos específicos contra BRSV. El grupo que recibió el

esquema de *prime-boost* heterólogo MVA/proteína (MVA-F/Ft/MVA-F) presenta una respuesta predominante del isotipo IgG1, significativamente mayor a los otros grupos (figura 25 C).

Luego, se evaluó la presencia de IL-4, IL-2 e INF- γ en el sobrenadante de los esplenocitos de los ratones de todos los grupos reestimulados *in vitro* con BRSV. Si bien no fue posible detectar IL-12 ni IL-4, se observó producción de INF- γ en todos los grupos que recibieron MVA-F (tanto en esquemas de *prime-boost* homólogo como heterólogo) (Figura 26), siendo la respuesta más potente la observada en el grupo que recibió el esquema *prime-boost* homólogo.

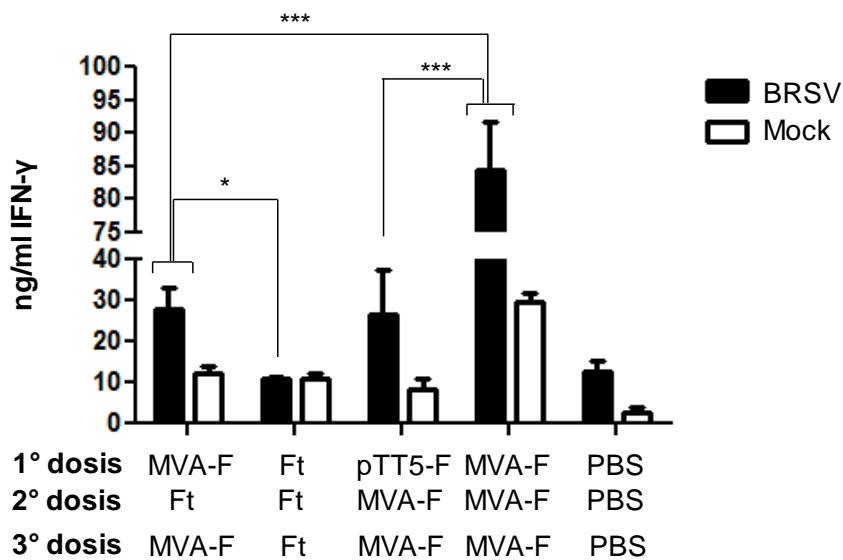


Figura 26. Evaluación de la respuesta inmune celular inducida por MVA-F en esquemas de *prime-boost* heterólogo (experimento n°3). Cuantificación por ELISA *sandwich* (OptiEIA, BD) de los niveles de IFN- γ (expresados como nanogramos por ml) secretado en los sobrenadantes (dilución de uso 1/50) de cultivo de esplenocitos reestimulados con BRSV (barras negras) o con *mock* (barras blancas). *** $p < 0,001$.

Finalmente, con el objetivo de evaluar la protección inducida por la vacunación, a los 54 dpi (10 días después de la tercera inmunización) los animales fueron desafiados con BRSV por vía i.n. A los 5 dpd los animales se sacrificaron y se tomaron las muestras para analizarlas como se describe en el Anexo.

Luego del análisis histopatológico de los pulmones y del establecimiento de un *score* histopatológico por animal (ver detalles en anexo) se observó una alta variabilidad entre los individuos de cada grupo, por lo que, lamentablemente, los resultados del desafío con BRSV no son concluyentes.

Los resultados obtenidos demuestran que la inmunización de ratones con tres dosis de MVA-F fue capaz de inducir una respuesta inmune específica contra BRSV, balanceada Th1/Th2 donde se observó el efecto de cada dosis refuerzo. Si bien los anticuerpos totales contra BRSV eran detectables luego de 1 dosis, la aplicación de la

segunda dosis permitió detectar AN de BRSV y la tercera dosis aumentó significativamente los niveles de IFN- γ .

En cambio, como era de esperar, la aplicación de tres dosis de la vacuna a subunidad Ft indujo solamente una respuesta inmune de tipo humoral. Por último, con respecto al *prime-boost* heterólogo, se observó que la aplicación de vacuna génica no mejoró la respuesta inducida por MVA-F mientras que la combinación de MVA-F/Ft también indujo una respuesta inmune balanceada, detectándose IFN- γ luego de las tres dosis y con presencia de AN, que aumentaron luego del desafío.

Discusión

El complejo respiratorio bovino (CRB) es una de las principales entidades que producen pérdidas productivas en rodeos de cría, tambo y establecimientos de engorde a corral (Hanzlicek y col. 2010) y es considerado la mayor causa de enfermedad respiratoria en terneros. Las pérdidas económicas generadas relacionadas al CRB se deben al aumento de las tasas de morbilidad y mortalidad, al incremento de los costos por tratamientos veterinarios y a la disminución de parámetros productivos tales como la ganancia diaria de peso (Baker y Frey 1985; Brodersen 2010).

El BRSV es uno de los agentes virales involucrado en este complejo y es causal de neumonías severas en terneros de temprana edad. La importancia de BRSV en el contexto del CRB ha sido ampliamente descripta en numerosos estudios (Elvander 1996; Klem y col. 2013; Raaperi y col. 2012; Tuncer y Yeşilbağ 2015; Kimman y col. 1988; Citterio y col. 2003). Su epidemiología también ha sido estudiada, resultando ser endémico en la mayoría de los países. En Argentina, la información acerca de este virus es escasa. La detección del virus fue reportada por primera y única vez por Bagnis y colaboradores en el año 1999 (Bagnis y col. 1999) y, desde entonces, sólo un estudio describió la presencia de anticuerpos contra BRSV en terneros en Argentina (Odeón y col. 2001).

Por ese motivo, el primer objetivo de este trabajo de tesis fue actualizar los datos de seroprevalencia del BRSV en Argentina, de manera de conocer el estatus sanitario de este agente viral. En este sentido, se llevaron a cabo muestreos en rodeos de cría, tambos y establecimientos de engorde a corral de las provincias de Buenos Aires, Santa Fe y Córdoba, las cuales concentran la mayor cantidad de cabezas de ganado vacuno en el país y se evaluó la presencia de AN mediante seroneutralización viral debido a la alta sensibilidad que posee esta técnica para estudios de seroprevalencia, tal como describieron Westenbrink y colaboradores (Westenbrink y col. 1985). Dichos autores demostraron que el ensayo de SN permitió detectar anticuerpos de BRSV en un mayor porcentaje de sueros con enfermedad en fase aguda, en comparación con un ELISA, en muestras de campo y en sueros obtenidos luego de una infección experimental en terneros. El ELISA permite la detección de anticuerpos totales, sin embargo, no necesariamente estos anticuerpos son neutralizantes.

Se ha descripto que el título de anticuerpos y el porcentaje de animales seropositivos aumenta con la edad, ya que el animal puede reinfectarse a lo largo de toda su vida

(Luzzago y col. 2010). Por otro lado, los anticuerpos calostrales contra BRSV decaen siendo indetectables luego de los 5 meses de vida (Baker, Ames, y Markham 1986; Uttenthal y col. 2000). Por todo esto, la evaluación de los porcentajes de seroprevalencia llevada a cabo en este trabajo de Tesis se realizó en animales que no recibieron vacunación para BRSV y mayores a 6 meses de edad. A su vez, se ha descripto que las reinfecciones con BRSV son comunes a lo largo de toda la vida de un bovino incluso con un virus de la misma cepa, debido al descenso del título de AN luego de un período corto luego de la infección (Glezen y col. 1960; Sacco y col. 2014). En este sentido, para los sistemas productivos de cría bovina y tambos, el análisis se realizó en dos rangos etarios: animales de 6 a 18 meses de edad, y animales mayores a 18 meses de edad.

Los resultados obtenidos mostraron porcentajes de seroprevalencia mayores al 70 %, que variaron según el tipo de sistema productivo y edad de los animales muestreados.

En los rodeos de cría analizados, los porcentajes de prevalencia individual resultaron ser significativamente mayores a los detectados en el estudio realizado por Odeón y colaboradores (Odeón y col. 2001). En dicho trabajo, se determinaron porcentajes de seroprevalencia de 10,7 % y 40,7 % en animales de entre uno y dos años y mayores a dos años, respectivamente. Esta discrepancia puede deberse a las diferencias en la sensibilidad de la técnicas empleadas para medir anticuerpos en muestras de suero (Westenbrink y col. 1985).

El estudio realizado en tambos, si bien contó con menor cantidad de animales muestreados de lo que el diseño estadístico requería, también evidenció la presencia de animales con AN contra BRSV en ambos grupos etarios y estas seroprevalencias también resultaron tener porcentajes más elevados en el rango etario de mayor edad. Las prevalencias intrapredio detectadas fueron de 90 y 100 % para cada grupo etario. Estos resultados coinciden con lo observado por Bidokhti y colaboradores, quienes evidenciaron altos niveles de prevalencia intra-predio en tambos y también mostraron una mayor seropositividad cuanto mayor es la edad de los animales (Bidokhti y col. 2009).

Los niveles de prevalencia individual detectados para los sistemas de cría bovina y tambos, resultaron ser similares para cada grupo etario. En los animales de 6 a 18 meses, las prevalencias fueron cercanas al 75 % mientras que para aquellos mayores a 18 meses fueron del 95 % aproximadamente. Estos resultados mostraron porcentajes de seroprevalencia mayores a los detectados por Luzzago y colaboradores quienes evidenciaron 56 % y 81 % de animales seropositivos, para terneras y vacas adultas,

respectivamente (Luzzago y col. 2010). Se observó además, que los animales de mayor rango etario presentaron mayores porcentajes de seroprevalencia. Esto podría explicarse ya que, como se describió previamente, los bovinos pueden reinfectarse a lo largo de toda su vida, incluso con un virus de la misma cepa, por lo que los porcentajes de seroprevalencia parecieran ser función del tiempo de exposición a BRSV (Luzzago y col. 2010).

En este trabajo de tesis el promedio del título de AN para BRSV en los sistemas productivos analizados fue de 64 para el grupo de 6 a 18 meses mientras que este resultó ser aproximadamente 128 para el grupo de animales mayores a 18 meses. A su vez, en ambos tipos de establecimiento, las medianas de las prevalencias intra-predio fueron superiores al 80 %, indicando que la infección es altamente endémica en la mayoría de los rodeos.

En los muestreos realizados en establecimientos de engorde a corral, se evaluaron animales mayores a 6 meses de edad. Si bien la seroprevalencia contra BRSV reportada por Van Vuuren y colaboradores en establecimientos de engorde a corral de Sudáfrica fue menor que las detectadas en este trabajo de tesis (Van Vuuren 1990), nuestros resultados no varían significativamente con los reportados por otros grupos (Edwards 2010; Gulliksen y col. 2009; Anna Ohlson y col. 2010; Paton y col. 1998; Uttenthal y col. 2000).

Los animales de los establecimientos de engorde a corral fueron muestreados en diferentes períodos luego de su llegada al establecimiento (Mediana de 35 días) a fin de evaluar la asociación entre los títulos de AN y el tiempo de permanencia en el rodeo. Para ello, el total de animales se dividió en dos grupos: animales que habían permanecido menos de 35 días (Grupo A) o animales que habían superado los 35 días de estadía en el establecimiento (Grupo B) al momento del muestreo.

La prevalencia entre animales que habían permanecido más de 35 días en establecimientos de engorde a corral fue significativamente mayor a la detectada en aquellos animales que habían permanecido menos tiempo. Más aún, se encontraron diferencias significativas en la mediana de títulos de AN entre grupos ($p < 0,05$). Si bien, nuestro muestreo no tuvo un diseño longitudinal necesario para determinar la incidencia de infección mediante seroconversión, estos resultados mostraron una asociación entre la seroprevalencia y el tiempo de permanencia en el rodeo; esto constituye una evidencia indirecta de circulación viral en establecimientos de engorde a corral.

Los factores predisponentes del CRB fueron descriptos por Taylor y colaboradores. Entre ellos se destacan la edad, el tamaño de la tropa, el tiempo de estadía en el establecimiento, el origen de los animales (compra directa o en ferias) y la temporada

(J. D. Taylor y col. 2010a). En relación a los factores de riesgo asociados al BRSV, cabe mencionar que, como muchas variables pueden actuar como inductoras de otras, los investigadores deben ser cautelosos al momento de definir el rol de los factores de riesgo en el desarrollo o prevención del CRB. En nuestro estudio, la edad de los animales resultó estar significativamente asociada con la seropositividad de BRSV, independientemente al tiempo de permanencia en el rodeo (datos no mostrados). Por otro lado, la prevalencia detectada resultó estar asociada al tiempo de permanencia en el establecimiento de engorde. También se encontró asociación entre la edad y el alto título de AN, en donde la proporción de animales de mayor edad que presentaban altos títulos de AN (PR=11,38, [CI= 1,07-1,79]) fue mayor que en los animales más jóvenes. Esto fue observado también por otros investigadores que describieron que la distribución de AN específicos parece ser una función de la exposición a BRSV (Bidokhti y col. 2009).

Otra característica común en las operaciones de los establecimientos de engorde a corral de Argentina es la mezcla de animales, debido a que muchos animales pertenecientes a pequeños grupos de diferentes orígenes se juntan para completar cada rodeo. En muchos trabajos, esta práctica ha sido altamente asociada con una mayor frecuencia de enfermedad respiratoria, como una consecuencia evidente de mezclar animales con diferentes estados inmunológicos o infecciosos (Hilton 2014; Martin 1983; Martin y Meek 1986b; Martin y col. 1982). Los establecimientos de engorde a corral en Argentina suelen comprar animales de diferentes fuentes. Nuestros resultados coinciden con trabajos previos que muestran una mayor seroprevalencia en animales provenientes de ferias que en aquellos adquiridos por compra directa (Step y col. 2008).

Independientemente de la prevalencia de BRSV en el rodeo de origen, un elevado número de animales por lote, representa altas chances de contacto con múltiples fuentes virales (J. D. Taylor y col. 2010a). Este escenario favorece la dispersión del virus entre animales que están en contacto directo. En este sentido, el tamaño de los rodeos ha sido reportado como un importante factor de riesgo para el CRB. Nuestros resultados coinciden con esta hipótesis, mostrando una asociación significativa entre aquellos rodeos con más de 1000 cabezas de ganado y altos títulos de AN (PR=2,09; [CI=1,2-3,58]). Yesilbag y colaboradores demostraron que los tambos con mayor capacidad de animales presentaban mayores seroprevalencias contra BRSV, entre otros virus respiratorios, que aquellos con menor capacidad (Yeşilbağ y Güngör 2008). Además, Raaperi y colaboradores demostraron que el tamaño del rodeo estaba directamente relacionado con una mayor ocurrencia de enfermedad respiratoria en vaquillonas preñadas y vacas (Raaperi y col. 2012).

Se ha descrito que la infección por BRSV ocurre principalmente durante el invierno (W. H. M. V Van Der Poel y col. 1993). Sin embargo, en este trabajo de tesis, no fue posible detectar asociación entre la seropositividad y estacionalidad. En concordancia con nuestros resultados, otros trabajos evidenciaron que las infecciones ocurren de manera independiente a la estación observándose brotes tanto en las temporadas de invierno como en las de verano (Klem y col. 2013).

En este trabajo de tesis, se mostró una alta seroprevalencia en establecimientos de engorde a corral y una asociación entre los signos clínicos y los animales que presentaron altos títulos de AN específicos contra BRSV. Los resultados de este estudio coinciden con otros reportes que demuestran el rol de BRSV como un agente causal de neumonía en bovinos de este tipo de establecimientos (J. K. Collins y col. 1988; Durham y Hassard 1990; Martin y Meek 1986a).

En base a nuestros resultados, se demostró la presencia de AN contra BRSV con altos porcentajes de seroprevalencia individual en rodeos de cría, tambos y establecimientos de engorde a corral. De esta manera, el estudio epidemiológico realizado en los tres sistemas productivos mencionados permitió cumplimentar el primer objetivo de este trabajo de Tesis.

La interacción entre animales ungulados domésticos y salvajes representa un potencial problema en cuanto al contagio de enfermedades infecciosas por contacto directo entre los mismos. La cohabitación entre especies es común en cierto tipo de establecimientos extensivos de cría, en donde bovinos se encuentran en contacto con otras especies no bovinas. Si bien los bovinos son los hospedadores naturales de BRSV, otras especies como ovejas, cabras, camélidos y búfalos pueden infectarse. (Sausker y Dyer 2002; W. H. Van der Poel y col. 1995; Rivera, Madewell, y Ameghino 1987; Dunbar y col. 1985; Akca y col. 2001; Intisar y col. 2010). Por este motivo, resulta interesante evaluar la presencia de anticuerpos contra BRSV en especies no bovinas, que podrían estar actuando como reservorios potenciales del virus.

En este trabajo de tesis se evidenció un porcentaje de seropositividad de 85,9 % en caprinos de la Patagonia Argentina y de 89,1 % en caprinos de la provincia de Salta. Estos porcentajes son similares a los determinados por Van der Poel y colaboradores en cabras de Países Bajos, quienes determinaron mediante ELISA que el 77% de las cabras muestreadas resultaron ser seropositivas para BRSV (W. H. Van der Poel y col. 1995). De manera interesante, Trudel y colaboradores demostraron que las cepas de RSV bovino y caprino se encuentran altamente relacionadas (Trudel y col. 1989).

El virus respiratorio sincicial ovino (ORSV) ha sido aislado de una oveja de un año de edad con rinitis (Evermann y col. 1985). A su vez, una infección experimental con ORSV en terneros resultó en enfermedad respiratoria moderada (D. G. Bryson y col. 1978). Sin embargo, no se ha descripto su contribución en la enfermedad respiratoria bovina (N. Z. Eleraky, Kania, y Potgieter 2001). La presencia de BRSV se ha descripto en ovejas y terneros de Italia, con porcentajes significativos de prevalencia para dicho agente viral (Gaffuri y col. 2006b). Dicho autor reportó una seroprevalencia de 82 % en ovejas, similar a lo que se detectó en este trabajo en ovinos de la provincia de Corrientes, mientras que en muestras de ovinos de la Patagonia, el porcentaje detectado resultó inferior. Esto podría deberse a las diferencias en cuanto al manejo de los animales implementado en cada rodeo de cada región.

Para el caso de los camélidos, en un trabajo realizado en Sudan, se reportó la presencia de anticuerpos contra RSV en el 27,3 % de las muestras evaluadas y la presencia del genoma de RSV mediante RT-PCR (Intisar y col. 2010). En nuestro trabajo, el 60 % de las muestras de camélidos provenientes de la provincia de Corrientes resultaron seropositivos para BRSV

En este trabajo de tesis, también se detectó la presencia de AN contra BRSV en búfalos de las provincias de Corrientes y Chaco, con un porcentaje de seropositividad del 44 % aproximadamente. Estos resultados superan los valores descriptos por Akça, Y y colaboradores, quienes describieron la presencia de anticuerpos contra BRSV en búfalos de Turquía con 28 % de seropositividad (Akca y col. 2001). El hecho de que el BRSV infecte a otras especies animales de interés productivo, que están en contacto directo con bovinos, es un factor importante a tener en cuenta al momento de estudiar la transmisión y dispersión de este virus en la población. En este sentido, sería interesante evaluar el rol de los búfalos y otras especies no bovinas como reservorios naturales para los virus respiratorios (Maidana y col. 2012).

Trudel y colaboradores demostraron que las cepas de RSV caprino y bovino comparten características morfológicas, polipeptídicas y serológicas (Trudel y col. 1989). A su vez, Oberst y colaboradores evidenciaron que los aislamientos de RSV ovino pueden ser reconocidos por anticuerpos contra aislamientos del RSV caprino, humano y bovino (Oberst y col. 1993). Este reconocimiento antigénico cruzado entre RSV ovino y BRSV puede estar dado por la elevada identidad aminoacídica (94 %) que existe entre la proteína F de ambas cepas (N. Z. Eleraky, Kania, y Potgieter 2001).

En este sentido, es posible que los AN contra RSV detectados en las muestras de especies no bovinas evaluadas en este trabajo de tesis sean contra RSV de cada especie en particular y debido a la reactividad cruzada, hayan podido neutralizar de igual manera al BRSV utilizado en el ensayo de SN.

Con la detección de AN contra BRSV en especies no bovinas de interés agropecuario se logró cumplir el segundo objetivo de este trabajo de Tesis demostrando la presencia de BRSV en camélidos, búfalos, ovinos y caprinos de Argentina. A nuestro entender, este es el primer trabajo que reporta la presencia de AN contra BRSV en dichas especies, en nuestro país.

Los estudios epidemiológicos observacionales se pueden clasificar, de acuerdo a su temporalidad, en transversales y longitudinales. Los primeros estudian la distribución de la enfermedad en un determinado punto, tales como los estudios de prevalencia discutidos previamente, pero no permiten sacar conclusiones acerca de los factores predisponentes, ni acerca de la dinámica de distribución de la enfermedad en la población. A diferencia de los primeros, los estudios longitudinales, tanto retrospectivos como prospectivos, buscan establecer la relación entre variables o posibles factores causales (variables independientes) y el surgimiento y/o evolución de la enfermedad en esa población (variables dependientes).

Hasta el momento, no se han reportado estudios longitudinales caracterizando la epidemiología de BRSV en bovinos en Argentina. Además, la información disponible acerca de la circulación e importancia del BRSV en los diferentes sistemas productivos es prácticamente inexistente. A nivel mundial, Van der Poel y colaboradores demostraron, en un estudio realizado en 6 tambos de Suecia durante un año, la presencia de altos títulos de anticuerpos sin evidenciar seroconversión durante el verano (W. H. M. V Van Der Poel y col. 1993). Como se desconoce la edad de dichos animales, es posible que la ausencia de seroconversión se deba a que dichos animales eran adultos, donde los títulos elevados de anticuerpos no permiten detectar variación significativa en el título de anticuerpos en dichos animales. Hägglund y colaboradores, por su parte, llevaron a cabo un estudio durante un año en Suecia y lograron demostrar la presencia de seroconversión en terneros, principalmente durante el invierno (Hägglund y col. 2006b). Ohlson y colaboradores demostraron que la dinámica de anticuerpos contra BRSV difería según las condiciones climáticas en las que se encontraban los establecimientos y evidenciaron circulación viral durante el verano (A Ohlson y col. 2013).

Como se mencionó anteriormente, en nuestro país, los datos acerca de la circulación del BRSV son muy escasos. Dada la importancia que tiene el conocimiento de la circulación del virus, particularmente, como causa de neumonía en bovinos de diferentes sistemas productivos, en este trabajo de tesis se llevaron a cabo estudios longitudinales

en bovinos, de manera de determinar la dinámica de infección y la circulación de este agente viral.

En primer lugar, se realizó un análisis en un tambo cerrado de la provincia de Santa Fe, en el que se evaluó la presencia de AN contra BRSV en bovinos, desde su nacimiento hasta los 3 años. Se observó que al nacimiento (julio-agosto 2006), la mayoría de los animales eran seropositivos y presentaban altos títulos de AN, evidenciando la correcta transferencia pasiva mediante el calostro. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Tuncer y colaboradores, quienes detectaron la presencia de anticuerpos maternos en el 100 % de los terneros muestreados en tambos de Turquía (Tuncer y Yeşilbağ 2015). En nuestro trabajo, dicho resultado evidenció, también, la infección previa de las madres con BRSV, debido a que éstas tampoco habían sido vacunadas contra este agente viral.

En nuestro estudio, el nivel de AN comenzó a descender paulatinamente a partir del segundo mes, coincidiendo con lo descrito por Tuncer y colaboradores (Tuncer y Yeşilbağ 2015). El título de AN descendió abruptamente al mes 5, hasta el mes 8, en el que el 95 % de los animales muestreados resultó ser seronegativo para BRSV. Estos resultados coinciden con lo descrito por varios autores, quienes postulan que el nivel de anticuerpos resulta indetectable al mes 5 (Baker, Ames, y Markham 1986; Uttenthal y col. 2000).

El 30 % de los animales analizados del tambo evidenció seroconversión al mes 11, indicando, en ese momento, la primera infección con BRSV. Este hecho coincide con el primer movimiento de los animales hacia pasturas con otros animales de su misma edad. Estas prácticas de manejo, sumadas a la ausencia de AN específicos contra BRSV desde el mes 8, aumenta la susceptibilidad de los animales a la infección. Además, es importante destacar que esta primera infección ocurrió en los meses de invierno. Nuestros resultados coinciden con lo descrito por otros autores, quienes postulan que las prácticas de manejo dentro de los establecimientos son factores de riesgo predisponentes para la infección por BRSV (Snowder 2006; J. D. Taylor y col. 2010a) y que la primera infección en tambos ocurre mayormente en períodos de uno o dos meses en otoño o invierno (Baker, Ames, y Markham 1986).

En nuestro estudio, se observó que el título de AN se mantuvo constante con porcentajes de seroprevalencia de 60 % durante los meses subsiguientes. El descenso significativo del porcentaje de seroprevalencia al mes 24 podría estar asociado nuevamente al manejo, ya que en ese momento, los animales habían sido apartados en zonas de parto, aislados del resto de los animales motivo por el cual no hay contacto directo entre los mismos que favorezca la infección.

En este trabajo de tesis se observó un aumento del valor de seroprevalencia (alcanzando valores del 100 %) en el mes 27 (posterior al parto), período en el que los animales reingresan al ciclo productivo (rodeo de ordeño), entrando nuevamente en contacto con otros animales. Además se observó un aumento asociado del promedio del título de AN significativamente superior a los títulos obtenidos durante la etapa 2 (momento en el que los animales se encontraban en pasturas con otras vaquillonas y vacas, previo al parto). En el mes 27, se observó la segunda seroconversión, en el 45 % de los animales. Esto coincide con lo reportado por Van der Poel y colaboradores quienes demostraron reinfecciones y altas seroprevalencias en animales mayores a los 2 años y que dichas reinfecciones pueden causar un aumento significativo de anticuerpos en animales seropositivos (W. H. M. V Van Der Poel y col. 1993). Debido a que el tambo analizado en este trabajo de tesis es cerrado, es decir, que no se produce un ingreso de animales de otros orígenes, existirían bajas probabilidades de que el virus haya sido introducido de otras fuentes. Por este motivo, un aumento en el título de AN y de las seroprevalencias evidencia indirectamente la circulación viral de BRSV, intra-rodeo, en este sistema productivo.

Como ya se mencionó, el BRSV se transmite principalmente por contacto directo entre animales infectados o mediante aerosoles (Mars, Brusckhe, y Van Oirschot 1999) con tasas de infectividad altas (Sarmiento-Silva, Nakamura-Lopez, y Vaughan 2012). Sin embargo, no está claro si el BRSV persiste en los rodeos o si éste es reintroducido de otras fuentes antes de cada brote (De Jong y col. 1996; L H Thomas y Stott 1984; W. H. M. V Van Der Poel y col. 1993; Baker, Ames, y Markham 1986). Las hipótesis acerca de la forma en la que un virus permanece en un rodeo o si es reintroducido son controvertidas. Es posible que factores como latencia y reactivación, bajo nivel de circulación del virus inter o intra-rodeo u hospedadores que actúen como reservorio jueguen un rol en el mantenimiento del BRSV (A Ohlson y col. 2013). Estudios de análisis del genoma viral a partir de aislados indicaron que el virus dentro de los rodeos durante un brote es idéntico, pero varía entre brotes, sugiriendo que éstos son causados probablemente por “nuevos” virus más que por latencia o por la existencia de animales que actúen como *carriers* (Larsen y Tjørnehøj 2000; Bidokhti y col. 2012).

Una de las conclusiones importantes de este estudio en particular es que en el mes 8 posterior al nacimiento de los terneros, todos los animales se seronegativizaron. Este resultado evidencia la necesidad de revisar el cronograma de vacunación de los animales en el tambo a fin de lograr protección frente a la infección mediante la vacunación. Esto es importante ya que, es bien sabido que los anticuerpos maternos pueden fallar en prevenir la infección viral (W. H. M. V Van Der Poel y col. 1993) observándose enfermedad respiratoria en terneros recién nacidos que poseían altos

títulos de anticuerpos maternos (Baker, Ames, y Markham 1986). Aun así, si bien no existen evidencias que demuestren que el nivel de anticuerpos adquiridos protege frente a la infección, se ha demostrado que la gravedad de la enfermedad respiratoria es inversamente proporcional al nivel de anticuerpos maternos (Larsen 2000).

Con el fin de evaluar la infección causada por BRSV en establecimientos de engorde a corral, se llevaron a cabo estudios longitudinales en bovinos de dos establecimientos de la provincia de Buenos Aires. Los porcentajes de seroconversión detectados variaron entre el 60 y el 80 %, evidenciando de manera indirecta la circulación de BRSV en dichos sistemas productivos. Dado que las infecciones con BRSV pueden ocurrir de manera asintomática y que éste sería un mecanismo importante mediante el cual el BRSV se mantiene en el rodeo (Helena Gallicchio Domingues, Spilki, y Arns 2011), resultó relevante evaluar la presencia de genoma viral en los hisopados nasales de los bovinos que presentaron seroconversión. De un total de 42 hisopados analizados, dos de ellos resultaron positivos para BRSV (0,84 %). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Domingues y colaboradores quienes pudieron detectar genoma viral solamente en el 2 % de las muestras de hisopados nasales analizadas (Helena Gallicchio Domingues, Spilki, y Arns 2011). En base a nuestros resultados pudimos establecer una correlación entre seroconversión y presencia de genoma viral, lo cual, constituye una evidencia real de la circulación de BRSV en este sistema productivo.

La enfermedad respiratoria, está caracterizada por una infección viral primaria que predispone a una infección bacteriana secundaria, la cual empeora el cuadro respiratorio y produce, en algunos casos, la muerte de los animales. En este sentido, la detección de BRSV en pulmones de animales con lesiones compatibles con enfermedad respiratoria es un proceso dificultoso, debido a la presencia de patógenos bacterianos que llenan los espacios pulmonares. En este trabajo de tesis fue posible detectar la presencia de BRSV en 5 de los 27 pulmones analizados de los bovinos que murieron durante los ensayos longitudinales en los establecimientos de engorde a corral estudiados y que presentaban lesiones compatibles con enfermedad respiratoria. Además, una vez realizados los estudios bacteriológicos correspondientes, dos de ellos presentaron aislamientos positivos para *Manhemmia haemolytica*, bacteria perteneciente al CRB. Este resultado confirma, por un lado, la circulación del virus en los establecimientos de engorde a corral, y más importante aún, demuestra que el BRSV estaría involucrado en el CRB en terneros de establecimientos de engorde a corral. Si bien el virus sólo pudo detectarse en muestras de pulmones de 5 terneros, el hecho de detectar el genoma viral en hisopados de animales asintomáticos evidencia que el virus

circula y que podría ser el responsable de enfermedad respiratoria en los animales evaluados, coincidiendo con lo descrito por numerosos autores en diferentes países. Este hallazgo es de gran importancia para nuestro país ya que desde el año 1998, no hay estudios que describan la epidemiología del BRSV. Por ello, la mayoría de los establecimientos no vacunan contra el virus y adjudican las infecciones respiratorias a otros agentes del CRB. En este trabajo demostramos que el virus circula y que pudo detectarse en pulmones de terneros que murieron a causa de neumonía, demostrando que el BRSV, en nuestro país, debe ser tenido en cuenta al momento de diseñar estrategias de prevención para el control de la enfermedad respiratoria en terneros.

Los estudios de epidemiología molecular son herramientas importantes para investigar la evolución, dispersión y transmisión del BRSV (Dus Santos y Mozgovej 2016). En este sentido, se han llevado a cabo numerosos estudios moleculares de diversos aislados de BRSV, identificando y caracterizando genéticamente la cepa analizada (Helena Gallicchio Domingues, Spilki, y Arns 2011; Lerch, Anderson, y Wertz 1990; Elvander y col. 1998). Reportes previos mostraron que la secuencia nucleotídica y aminoacídica del gen codificante de la proteína G es la más variable y que los aislados analizados mostraron una variabilidad genética baja del gen F (Lerch, Anderson, y Wertz 1990; Elvander y col. 1998). Por este motivo, nuevos ensayos de PCR deberían llevarse a cabo a partir del ARN de las muestras positivas detectadas en este trabajo de tesis, de manera de amplificar mediante RT-PCR fragmentos del gen G y realizar los análisis filogenéticos que permitan caracterizar molecularmente a la cepa detectada.

A partir de dichas muestras que resultaron positivas para BRSV, tanto de pulmones como de hisopados nasofaríngeos, se realizaron pasajes en cultivos de células. Sin embargo, no fue posible aislar el virus. Tal como se describió previamente, el BRSV es un virus lábil, de manera que su aislamiento es muy dificultoso (Arns y col. 2003; Tannock y col. 1987). Se ha descrito que no necesariamente se obtiene el aislamiento en cultivo celular a partir de muestras de tejidos de animales infectados que contienen altas concentraciones de BRSV (Dubovi 1993). Una posible explicación, es el escaso número de receptores presentes en las líneas celulares necesarios para la adsorción del virus (Arns y col. 2003). Del mismo modo, resulta importante destacar, que al detectar la presencia de bacterias pertenecientes al CRB en las muestras de los animales infectados, es posible que la progresión de la enfermedad respiratoria ya estuviera en un estadio en el que la cantidad de BRSV viable no fuera suficiente para crecer en cultivo. Cabe mencionar, sin embargo que, aunque no se logró el aislamiento, fue posible detectar al virus en las muestras de pulmones de los bovinos de establecimientos de engorde a corral, debido a la elevada sensibilidad de la técnica de

RT-nPCR empleada. De esta manera, logramos confirmar casos positivos para BRSV en bovinos de los establecimientos evaluados.

Nuestros resultados indican que la infección por BRSV está ampliamente distribuida en la población bovina, lo que sugiere que la importancia del BRSV en la presentación de la enfermedad respiratoria, en la región, podría estar subestimada.

Por otra parte, se detectó la presencia de AN contra BRSV en especies no bovinas, como búfalos, camélidos, caprinos y ovinos. Este resultado es interesante ya que, si bien está descrita la circulación del virus a nivel mundial en especies no bovinas, es la primera vez que se reporta la circulación de este agente viral en nuestro país, en esas especies, abriendo el interrogante acerca del rol que cumplirían en la transmisión del BRSV y como reservorio del mismo.

Para nuestro conocimiento, este es el primer estudio epidemiológico que demuestra una elevada seroprevalencia y circulación de BRSV en los distintos sistemas productivos de la Argentina. Estos resultados confirman la presencia del BRSV como agente infeccioso en bovinos de cría, tambos y establecimientos de engorde a corral, aportando datos significativos en cuanto a los momentos críticos de intervención para la prevención de la enfermedad respiratoria.

A su vez, fue posible detectar la presencia de genoma viral en hisopados nasales de animales de establecimientos de engorde a corral que presentaron seroconversión para este agente viral y en pulmones de animales con lesiones compatibles con enfermedad respiratoria. Debido a la cantidad de establecimientos de engorde a corral en Argentina que no vacunan contra BRSV y a que los resultados de este trabajo demuestran la circulación del virus, es importante reevaluar la inclusión del BRSV en los programas de vacunación con el objetivo de controlar la infección. En este aspecto, los estudios longitudinales llevados a cabo, evidenciaron seroconversión durante los primeros 30 días de permanencia en el establecimiento de engorde a corral. En la práctica cotidiana, siguiendo el cronograma de vacunación tradicional recomendado, la primera dosis de vacuna contra el BRSV (monovalente o en combinación con otros agentes virales del CRB) se aplica al momento del ingreso al establecimiento, momento en el cual según los resultados aquí presentados, sería el período de mayor incidencia de la infección por BRSV. Por esta razón, la vacunación contra este agente viral no estaría siendo efectiva ya que los animales se estarían infectando naturalmente, al mismo tiempo que reciben la vacunación. Sin embargo, como se describió previamente, la mayoría de los establecimientos no vacunan para BRSV. De este modo, los resultados aquí descriptos

sugieren que sería necesario rediseñar el cronograma de vacunación de manera que estos animales se encuentren inmunológicamente preparados al momento de ingreso al establecimiento, proponiendo que las inmunizaciones ocurran de manera previa al movimiento de los bovinos hacia los nuevos sistemas, tal como establecen los nuevos cronogramas de pre-acondicionamiento.

Para el caso de tambos, se detectaron dos momentos críticos de infección, los cuales consideramos deberían tenerse en cuenta al momento de organizar el cronograma de vacunación. En este sistema productivo, la primera dosis de vacunación se aplica a las 4-6 semanas de edad, momento en el cual los anticuerpos maternos aún son elevados, de manera que bloquearían la inducción de la respuesta inmunitaria activa de los terneros. En base a nuestros resultados, resultaría interesante realizar la vacunación entre los 3 y 4 meses de edad, momento en el que los anticuerpos colostrales descienden, de modo de lograr que los animales cuenten con un adecuado título de AN frente a la potencial infección con BRSV a partir del mes 6. En este sentido, también resulta interesante el desarrollo de nuevos candidatos vacunales que sean capaces de evadir el efecto inhibitorio de los anticuerpos maternos, de manera de inducir una respuesta inmunitaria adecuada en los terneros.

En conclusión, los resultados de esta tesis demuestran la importancia de contar con información epidemiológica completa y actualizada del BRSV en una región específica, para realizar una revisión crítica de las medidas preventivas a incorporar a fin de mejorar las prácticas de manejo.

La vacunación es el método más efectivo y económico de control y erradicación de enfermedades infecciosas. La búsqueda de vacunas alternativas que aseguren una adecuada protección de la población susceptible y reduzcan los riesgos y costos que implican la producción y uso de vacunas convencionales es prioritaria para las campañas de erradicación de enfermedades de interés veterinario. El control de la infección por el BRSV puede lograrse, por un lado, mejorando las medidas de manejo y, por el otro, mediante la vacunación. Desde hace varios años, existen numerosas vacunas disponibles en el mercado destinadas a la prevención de la enfermedad respiratoria bovina. Sin embargo, está demostrado que, pese a los esfuerzos para prevenir la infección por el BRSV empleando diversas vacunas, no fue posible eliminar la circulación del mismo (G. Meyer, Deplanche, y Schelcher 2008).

La infección por BRSV induce altos títulos de anticuerpos neutralizantes del virus que serían protectores ya que disminuyen la severidad de la enfermedad, y una respuesta T citotóxica transitoria y débil (Antonis y col. 2003). Sin embargo, la reinfección con este

virus ocurre aún en presencia de anticuerpos neutralizantes (Kimman y Westenbrink 1990) y se observó que los anticuerpos maternos presentes en los terneros no confieren 100 % de protección frente a la infección (Kimman y col. 1988).

Esto indica que, a diferencia de otros virus respiratorios, la infección primaria con el BRSV no confiere inmunidad protectora a largo plazo frente a infecciones secundarias por el mismo virus (Glezen y col. 1960), por lo cual, el animal puede sufrir sucesivas infecciones a lo largo de toda su vida, incluso con la misma cepa (Beem 1967).

En base a estos antecedentes se postuló que en el diseño racional de una vacuna contra BRSV no se debe imitar la respuesta inducida por la infección con este agente viral, sino que la respuesta debería ser diferente y, teniendo en cuenta que la respuesta del tipo Th2 inducida por las vacunas inactivadas no es protectora, debería estar dirigida hacia un perfil de respuesta del tipo Th1.

En este contexto, el desarrollo de nuevos candidatos vacunales que sean seguros y eficaces para prevenir la infección por BRSV constituye un nuevo desafío.

Los poxvirus han sido utilizados eficientemente como vectores para la expresión *in vivo* de genes heterólogos y para la construcción de vacunas contra enfermedades infecciosas (Paoletti y col. 1984; Moss 1996; Pastoret y Vanderplasschen 2003). Estos sistemas de vectores virales inducen principalmente una respuesta inmunitaria celular contra el antígeno foráneo sintetizado *de novo* en el hospedador vacunado (M. a Liu 2010; Rollier y col. 2011). A su vez, si la proteína heteróloga se expresa como proteína de membrana o es secretada al espacio extracelular, se inducen respuestas inmunitarias humorales específicas (Lewis y col. 1997; Lewis, van Drunen Littel-van den Hurk, y Babiuk 1999; María Florencia Ferrer y col. 2011; Cottingham y Carroll 2013).

En el mercado existen vacunas basadas en poxvirus recombinantes que están licenciadas para uso veterinario contra patógenos virales (virus de la rabia felina, virus de la enfermedad de Newcastle, influenza equina y aviar, virus *West Nile*, virus distemper canino y virus de la leucemia felina) (Meeusen y col. 2007; Poulet y col. 2007). Estas vacunas utilizan como vectores a cepas vacunales de los virus canarypox y fowlpox.

En cambio, para las vacunas basadas en virus vaccinia Ankara modificado (MVA) existen numerosos reportes de su eficacia en ensayos clínicos de vacunas humanas y veterinarias pero aún no están comercialmente disponibles (Sánchez-Sampedro y col. 2015). En la mayoría de las células de mamíferos la morfogénesis del virus MVA no es completa y esto permite que la inmunización se consiga en ausencia de replicación viral, eliminando la posibilidad de una diseminación del vector en los animales vacunados y, por consiguiente, evitando la dispersión por contacto hacia individuos no vacunados o hacia el ambiente en general. Esta característica le otorga un alto perfil de seguridad

por ser no replicativo en mamíferos, mientras que en el laboratorio se puede amplificar en cultivos de células BHK-21 o FEP.

Los antígenos foráneos insertados en el genoma de MVA pueden ser sintetizados, procesados y presentados en la superficie celular desencadenando respuestas inmunitarias humorales y celulares protectoras (Weidinger y col. 2001; Olszewska y col. 2004; Bisht y col. 2004).

Nuestro grupo de investigación demostró que el vector MVA que carece del gen codificante de la proteína de unión a IL-18 (MVA Δ 008) indujo un aumento en la respuesta celular T CD4+ y CD8+ respecto del vector viral convencional, tanto frente a antígenos del propio vector como frente a la proteína Nef de HIV (Falivene y col. 2012). Estos resultados sugieren que el vector optimizado MVA Δ 008 constituye una interesante herramienta a utilizar al momento de diseñar vacunas de nueva generación, especialmente por el rol que IL-18 presenta en la producción de IFN- γ y en el desarrollo de una respuesta inmune tipo Th1 (Shoda y col. 1999; Muneta y col. 2005).

Para el diseño de una vacuna es necesario escoger un inmunógeno que represente a la población de virus que está circulando a campo. Sin embargo, como hemos descrito previamente, en Argentina hay un único aislamiento de BRSV obtenido por Bagnis y colaboradores, pero dicho virus no ha sido caracterizado ni está descrita su secuencia (Bagnis y col. 1999). Cabe mencionar, además, que el aislamiento no está disponible.

Si bien en este trabajo de tesis fuimos capaces de detectar genoma viral específico para BRSV, los fragmentos amplificados son pequeños y corresponden a una región altamente conservada de la secuencia codificante de la proteína F. Dicha región se amplificó mediante una RT-nPCR, que se utiliza para diagnóstico molecular del BRSV en muestras clínicas (Vilcek y col. 1994). En este sentido, consideramos necesario continuar con el análisis molecular de otros fragmentos del genoma viral de BRSV, y así poder caracterizar a la cepa circulante. Como continuación de este trabajo de tesis nos proponemos amplificar las secuencias completas de las proteínas F y G, las cuales permitirán la realización de estudios filogenéticos y la caracterización del genoma del BRSV circulante en Argentina. Más aún, resulta de gran interés continuar trabajando en la posibilidad de obtener el aislamiento en cultivo celular. Esta tarea es laboriosa, ya que muchas veces se requieren de más de 9 pasajes ciegos para lograr el objetivo deseado. Sin embargo, la posibilidad de contar con un aislamiento nacional, nos permitirá conocer y caracterizar la cepa circulante a fin de poder diseñar mejores inmunógenos para el tratamiento y prevención de la enfermedad causada por este virus.

Como se describió previamente, los principales antígenos blanco para el desarrollo de vacunas recombinantes contra BRSV son las glicoproteínas F y G y, en menor grado, las proteínas N y M (G Taylor y col. 1997). En este sentido, la proteína F es el candidato mayormente elegido, debido a que su secuencia se encuentra altamente conservada dentro de las distintas cepas de RSV, incluso de distintas especies como humano, bovino, ovino y caprino (Trudel y col. 1989; Oberst y col. 1993; N. Eleraky, Kania, y Potgieter 2001; Pastey y Samal 1993). Walravens y colaboradores evidenciaron homologías en las secuencias nucleotídicas de la proteína F de BRSV y HRSV (Walravens y col. 1990). A su vez, Valarcher y colaboradores demostraron que el porcentaje de divergencia entre distintos aislamientos de BRSV es más bajo para los genes N y F (2 %) que para el gen G (8%). Incluso al comparar los genes F y G de BRSV y HRSV, evidenciaron diferencias del 22 % y 48 %, respectivamente (J. F. Valarcher, Schelcher, y Bourhy 2000).

Teniendo en cuenta que en el área de sanidad de los bovinos no existen vacunas eficaces contra el BRSV y que la respuesta inmunitaria protectora debe inducir anticuerpos neutralizantes junto con un perfil Th1, en este trabajo de tesis se propuso desarrollar un inmunógeno basado en el vector viral no replicativo MVA Δ 008 que expresa la glicoproteína F del BRSV. En particular, se utilizó la secuencia codificante de la proteína F de la cepa A51908 (ATCC) ya que, como se describió previamente, encuentra altamente conservada dentro de las distintas cepas de RSV, incluso de distintas especies (Trudel y col. 1989; Oberst y col. 1993; Pastey y Samal 1993; N. Eleraky, Kania, y Potgieter 2001). Las elecciones del vector y antígeno foráneo están relacionadas con el perfil de respuesta inmunitaria (tipo Th1) y la capacidad de inducir anticuerpos seroneutralizantes de BRSV, respectivamente.

De esta manera, en el segundo capítulo de este trabajo de tesis se obtuvo un candidato vacunal basado en MVA. Para ello se construyó el vector de transferencia que portaba el gen que codifica para la proteína F del BRSV, VT-MTK-F. Luego se procedió a la obtención, selección y caracterización molecular de virus MVA-F recombinantes. Se obtuvieron *stocks* virales puros y se confirmó la expresión del gen foráneo a partir de virus MVA-F recombinantes.

La obtención de los virus MVA-F recombinantes y su posterior caracterización molecular permitió cumplimentar el tercer objetivo específico de este trabajo de Tesis.

Posteriormente, se evaluó la capacidad inmunogénica de los virus MVA-F en un modelo murino para determinar el efecto de la vía de inmunización (de mucosas o sistémica) sobre la respuesta inmunitaria inducida.

Como se describió previamente, el BRSV infecta células epiteliales, ingresando por las vías respiratorias, afectando el tracto respiratorio superior y, en casos más graves, el inferior (J.-F. Valarcher y Taylor 2007; Guzman y Taylor 2015). La superficie de las mucosas contiene células del sistema inmunitario, incluyendo linfocitos B y T, plasmocitos y otros elementos celulares involucrados en la inducción de la respuesta inmunitaria (Ogra, Faden, y Welliver 2001). Las respuestas locales de anticuerpos en las mucosas juegan un rol importante en la protección frente a virus respiratorios como RSV (Garg y col. 2016). La función efectora más importante del sistema inmunitario de mucosas es la producción de IgA, ya que esta inmunoglobulina neutraliza a los patógenos en el sitio de entrada. Taylor y colaboradores lograron inducir una inmunidad esterilizante contra BRSV en el modelo de rata, aportando evidencias acerca de la importancia de inducir una buena respuesta inmune en la vía de ingreso del virus para lograr protección frente a la infección (J. D. Taylor y col. 2010b).

En este trabajo mostramos que cuando los ratones se inoculan con dos dosis de MVA-F por la vía intranasal se induce una respuesta inmunitaria local, con presencia de anticuerpos IgA específicos contra BRSV en lavados nasales. Además, se detectaron anticuerpos séricos IgG específicos, con valores de IgG1 e IgG2a que no difirieron significativamente entre sí, indicando que el candidato vacunal indujo un tipo de respuesta balanceada Th1/Th2. Sin embargo, estos anticuerpos no fueron capaces de neutralizar al BRSV *in vitro*. Por otro lado, tampoco fue posible detectar la inducción de ninguna de las citoquinas evaluadas (IFN- γ , IL-2 e IL-4).

Nuestros resultados coinciden con otros trabajos donde se mostró la capacidad de MVA de inducir una respuesta inmunitaria específica a nivel de mucosas al ser inoculado por vía intranasal, expresando antígenos de otros virus respiratorios tales como influenza (Bender y col. 1996), parainfluenza (Durbin y col. 1998) y herpesvirus bovino 1 (María Florencia Ferrer y col. 2011; Del Medico Zajac y col. 2017).

En el caso particular de la proteína F (vacuna a subunidad) de HRSV se mostró que puede inducir niveles significativos de IgA en mucosas sólo cuando se utiliza combinado con adyuvantes (Tebbey 2000; Singh y col. 2007). La capacidad inmunoestimulante de MVA es una gran ventaja ya que elimina los riesgos, y los costos, que representa la utilización de adyuvantes de mucosas.

Diversos autores reportan la inducción de anticuerpos IgA en BAL luego de administrar por vía intranasal vectores de Adenovirus y MVA que expresaban la proteína

F, N y M2-1 de RSV (PanAd3-RSV) o la proteína F como vacuna a subunidad (Garg y col. 2016; Pierantoni y col. 2015). En nuestro trabajo, no logramos detectar anticuerpos IgA específicos contra BRSV en BAL. Si MVA-F se propusiera como inmunógeno de mucosas, es necesario continuar con las investigaciones para determinar si la falta de detección de respuesta local en BAL se debe a características intrínsecas del inmunógeno o a la dificultad que presenta la obtención de las muestras en el modelo ratón.

Los isotipos de los anticuerpos séricos juegan roles diferentes en la inmunidad antiviral. Las vacunas contra influenza que estimulan las subclases IgG1 e IgG2a inducen mejor protección que aquellas que solo inducen IgG1 con actividad neutralizante (Victor C Huber y col. 2006). Diversos autores proponen que los anticuerpos IgG2a son más adecuados para inducir respuestas celulares citotóxicas mediadas por anticuerpos (C. Liu, Workman, y Vignali 2016; Tjiam y col. 2015; Yendo y col. 2016), las cuales demostraron contribuir al *clearance* del virus presente en las células infectadas (V C Huber y col. 2001).

El vector MVA induce principalmente un perfil de respuesta del tipo Th1 debido a que se produce la síntesis *de novo* de los antígenos foráneos que, luego de ser degradados intracelularmente, se presentarán en la superficie celular en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). En el caso particular de MVA-F, se seleccionó como antígeno la proteína F completa del BRSV, por lo cual, al ser sintetizada *de novo*, alcanzará la localización final anclada a la membrana celular de acuerdo a su secuencia aminoacídica. Esta localización permitirá su reconocimiento por células presentadoras de antígeno en el contexto de MCH II, induciendo, finalmente, la producción de anticuerpos (respuesta de perfil Th2). Una forma indirecta de identificar el perfil de respuesta inducida es analizando los isotipos de los anticuerpos séricos. Los ratones inoculados con MVA-F presentaron una respuesta balanceada Th1/Th2. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Wu y colaboradores, quienes demostraron una respuesta mixta Th1/Th2 en ratones inoculados por vía intranasal con una vacuna génica que contenía la secuencia codificante del gen *F* de RSV (Wu y col. 2009).

Una de las mayores ventajas de la vacunación intranasal es que se necesitan dosis relativamente bajas para lograr la inmunidad deseada comparada con otras rutas (Almeida and Alpar, 1996; Olszewska, 2001; Holmgren, 2005). Sin embargo, esta vía de inmunización en ratones es dificultosa ya que se puede administrar sólo un pequeño volumen de inóculo y se producen pérdidas de la dosis por una mala aspiración de los ratones al momento de la inoculación. Estos factores no aseguran la buena absorción de la dosis administrada y por lo tanto la inducción de respuestas específicas por los inmunógenos es muy variable.

En medicina veterinaria existe una vacuna comercial contra BRSV, basada en una cepa naturalmente termosensible (INFORCE™ 3, Zoetis), que se inocula por vía intranasal. En los estudios de eficacia llevados a cabo por la empresa que la comercializa, todos los terneros vacunados sobrevivieron al desafío con BRSV, mientras que el 95 % de los animales no vacunados murieron. Además, los animales vacunados mostraron menos lesiones pulmonares y se observó una reducción de la diseminación viral indicando que los terneros eran menos propensos a sufrir enfermedad crónica por BRSV e incluso a transmitir la enfermedad. Sin embargo, la vacuna debe ser administrada mediante cánulas por los orificios nasales de los animales para lograr una inmunización exitosa. En este sentido, si bien la inmunización por la vía de mucosas es capaz de evadir el efecto inhibitorio de los anticuerpos calostrales y de primar al sistema inmunitario de terneros seropositivos para BRSV (Kimman, Westenbrink, y Straver 1989; J. Ellis y col. 2014), el uso de vacunas por la vía sistémica continua siendo el elegido por veterinarios y productores debido a la practicidad en el modo de inoculación (Stokka 2010; Gorden y Plummer 2010).

En este trabajo de Tesis se evaluó la capacidad inmunogénica de MVA-F por vía intranasal en ratones con el propósito de caracterizar al nuevo inmunógeno desarrollado. Sin embargo, la vía intranasal no sería la de elección para la vacunación de bovinos.

En este contexto, en este trabajo de tesis se continuó la evaluación del candidato vacunal MVA-F inoculado por vía sistémica en el modelo ratón. La administración de una sola dosis de MVA-F por vía intraperitoneal (i.p) fue suficiente para inducir una respuesta de anticuerpos séricos específica contra BRSV. Esta respuesta fue incluso mejor que la inducida por la vacuna que contenía BRSV formulado en adyuvante oleoso, la cual requirió de dos dosis para alcanzar niveles similares de anticuerpos específicos. En el grupo de animales inmunizados con MVA-F se observó el efecto de la dosis refuerzo, que potenció los niveles de anticuerpos específicos contra BRSV, confirmando que la respuesta anti-vector no afectó el efecto de la re-vacunación. Es de destacar que luego de administrar dos dosis de MVA-F por vía i.p. se obtuvieron títulos de AN similares a los inducidos por la vacuna convencional. La vacunación con MVA-F indujo niveles similares de IgG1 e IgG2a, indicando un perfil de respuesta balanceada Th1/Th2. Por otro lado, a diferencia de lo observado en la inmunización intranasal, la inoculación de dos dosis de MVA-F por una vía sistémica fue capaz de inducir una respuesta inmune celular específica, cuantificada como nivel de IFN- γ secretado por esplenocitos estimulados con BRSV *in vitro*. Esta respuesta fue significativamente mayor que la inducida por la inmunización con BRSV. En cambio, la presencia de IL-12 e IL-4 no pudo ser detectada en ninguno de los grupos experimentales.

Olszewska y colaboradores también observaron que una sola dosis de MVA-F (de HRSV) administrado por la vía i.p en ratones era suficiente para inducir anticuerpos IgG totales, pero obtuvieron mayores títulos en los ratones inoculados con HRSV inactivado con formalina (FI-RSV) (Olszewska y col. 2004).

Los resultados obtenidos en cuanto a los niveles de AN inducidos por MVA-F en el modelo murino son alentadores porque coinciden con otros trabajos publicados donde vectores de MVA que expresan antígenos de BRSV o HRSV indujeron AN al ser inoculados en bovinos o macacos, respectivamente (Antonis y col. 2007; de Waal y col. 2004).

En el caso de las vacunas vectorizadas por virus, una estrategia que se utiliza para mejorar la respuesta inmune inducida por la vacunación y para sobrepasar la respuesta anti-vector inducida por la aplicación de múltiples dosis, consiste en utilizar regímenes *prime-boost* heterólogos. Esta estrategia se basa en iniciar (*prime*) la respuesta inmunitaria utilizando un inmunógeno como por ejemplo una vacuna génica que codifique para el antígeno de interés o una vacuna a subunidad, para luego reforzar (*boost*) la respuesta inmune desencadenada inmunizando con un vector viral (como por ejemplo MVA) que exprese el mismo antígeno. Este tipo de estrategia aumenta significativamente la inmunidad celular específica lograda inicialmente, incluso en animales con inmunidad preexistente contra el vector (Zavala y col. 2001; Gherardi y col. 2003; Webster y col. 2005; Gómez y col. 2007).

En este trabajo de tesis se continuó la caracterización de la respuesta inmunitaria inducida por el vector MVA-F utilizando regímenes de *prime-boost* heterólogos, seleccionando la vía i.p que fue la que indujo una mejor respuesta específica. Para ello, se utilizaron una vacuna génica que porta la secuencia de la proteína F de BRSV (pTT5-F, desarrollada en este trabajo), una vacuna a subunidad (proteína F truncada, Ft, desarrollada previamente en nuestro laboratorio) y el vector MVA-F.

Luego de recibir la primera dosis de los inmunógenos, solo los grupos inmunizados con MVA-F presentaron anticuerpos totales específicos contra BRSV.

La vacuna génica pTT5-F no estimuló una respuesta detectable de anticuerpos específicos luego de una única dosis, resultado que coincide con lo publicado por otros autores que evaluaron vacunas génicas que codifican para la proteína F de HRSV o de BRSV (Park y col. 2001; Boxus y col. 2007).

Una única dosis de Ft no indujo una respuesta humoral anti-BRSV detectable. Sin embargo, la aplicación de Ft como dosis refuerzo fue capaz de aumentar los niveles de anticuerpos en animales que recibieron la primera inoculación con MVA-F o Ft.

La presencia de AN específicos pudo ser detectada en todos los regímenes ensayados luego de la aplicación de la segunda dosis. Los niveles más altos de AN se

observaron cuando se aplicó el esquema de inmunización *prime-boost* homólogo de MVA-F, reafirmando la capacidad inmunoestimulante de este vector viral. La aplicación de la tercera dosis no modificó significativamente los niveles de AN.

En cuanto al perfil de respuesta, luego de recibir la segunda dosis de inmunógeno, todos los grupos inoculados con MVA-F indujeron una respuesta mixta Th1/Th2 mientras que el grupo inoculado con Ft evidenció una leve tendencia hacia un perfil de tipo Th2 con mayores niveles de IgG1. Luego de la tercera dosis, los niveles de ambos isotipos aumentaron para todos los grupos. En particular, los mayores niveles de IgG1 se observan en los grupos que recibieron MVA-F combinado con Ft o solamente Ft. Esta respuesta polarizada hacia un perfil Th2 está de acuerdo a lo esperado ya que las vacunas a subunidad inducen este tipo de respuesta y por su parte, dado que MVA-F expresa la proteína anclada a membrana, se favorecería la inducción de respuesta humoral.

Como se indicó anteriormente, para que una vacuna prevenga la infección por BRSV es también necesario que induzca la secreción de IFN- γ . El esquema de inmunización con tres dosis de la proteína Ft no indujo la secreción específica de IFN- γ , resultado que coincide con el perfil de respuesta de tipo Th2 inducido por este tipo de inmunógeno. En cambio, todos los animales que recibieron MVA-F desencadenaron una respuesta inmunitaria celular caracterizada por la secreción de IFN- γ . Es importante destacar que los niveles más elevados de IFN- γ secretado se detectaron en el grupo de animales que recibió tres dosis de MVA-F (esquema *prime-boost* homólogo). En estos animales, los niveles de esta citoquina fueron significativamente mayores que los observados para los ratones inmunizados con el régimen *prime-boost* heterólogo. Teniendo en cuenta que la vacuna génica no fue capaz de iniciar una respuesta inmunitaria específica y que la proteína Ft induce un perfil Th2, consideramos que los niveles de IFN- γ observados en los animales vacunados con los esquemas *prime-boost* heterólogo ADN/MVA o MVA/proteína fueron inducidos exclusivamente por MVA-F.

La caracterización de la capacidad inmunogénica de MVA-F en ratones constituyó el cuarto objetivo específico de este trabajo de Tesis.

Por otro lado, la protección frente al desafío es un parámetro que muchos investigadores incluyen como una medida para evaluar la eficacia de una vacuna (Antonis y col. 2007; Olszewska y col. 2004; Wyatt y col. 2000; Geraldine Taylor y col. 2015; Olmsted y col. 1986; Kohlmann y col. 2009). Frecuentemente se evalúan parámetros relacionados al daño tisular en pulmones, la presencia de determinados tipos celulares, signos clínicos asociados, detección viral en pulmones, BAL y lavados

nasales, entre otros. En este trabajo de Tesis se implementó un modelo de infección con BRSV en ratón, estableciendo la dosis requerida y el tiempo óptimo de sacrificio de los animales luego del desafío viral para detectar daño histopatológico en pulmones. Los grupos de animales que recibieron los regímenes de inmunización *prime-boost* homólogo y heterólogo fueron desafiados con BRSV pero al realizar el análisis histopatológico de los pulmones se obtuvieron *scores* con mucha variabilidad intra-grupo lo cual imposibilitó el análisis de los resultados para determinar la eficacia de los distintos esquemas de vacunación. Cabe mencionar que se necesitan dosis altas de BRSV para inducir los signos clínicos de la enfermedad caracterizados por la pérdida de peso corporal, piel rizada y una postura encorvada (G Taylor y col. 1984; Graham y col. 1988). Teniendo en cuenta lo dificultoso que es obtener *stocks* virales con altos títulos, sería interesante analizar nuevas metodologías de concentración y purificación viral para aumentar el título del mismo y así determinar la dosis de desafío para pruebas de eficacia de vacunas. También, debería evaluarse si la edad de los animales influye en su susceptibilidad frente a la infección por BRSV.

En este contexto, el inmunógeno MVA-F inoculado por vía sistémica indujo el perfil de respuesta inmunitaria asociado con protección frente a BRSV.

En coincidencia con nuestros resultados, Olzewska y colaboradores observaron que los animales inoculados con FI-RSV mostraron respuestas polarizadas a un perfil de citoquinas Th2 mientras que los vectores basados en MVA produjeron respuestas balanceadas Th1/Th2 (Olzewska y col. 2004). Los *subsets* de linfocitos Th1 y Th2 se definen según las citoquinas que producen. El *subset* Th1 se define por la secreción aumentada de IFN- γ y también puede tener una secreción aumentada de IL-2. En cambio, el *subset* Th2 está definido por la secreción aumentada de IL-4 y también puede tener una secreción aumentada de IL-5, IL-6, IL-10, and IL-13 (Leonard 2003). En numerosos modelos de infección de RSV, las respuestas de tipo Th1 resultaron estar asociadas a la resolución de la enfermedad y las de tipo Th2 a la exacerbación de la enfermedad respiratoria (Alwan, Kozłowska, y Openshaw 1994; Mark Connors, Giese, Kulkarni, Firestone, Morse, y Murph 1994; Griffin y col. 1999). Ambos tipos de respuestas pueden estimularse o incluso inhibirse entre sí, pero son complejas y no necesariamente mutuamente antagonistas (Bukreyev y col. 2005).

Por otra parte, numerosos trabajos demostraron que la reducción tanto de la patología pulmonar ocasionada por RSV como de la replicación viral en ratones y terneros está fuertemente asociada con altos niveles de IFN- γ (Letellier y col. 2008; Mapletoft y col. 2006; Oumouna, Karvonen, y Babiuk 2005; West y col. 1999). Además, en el modelo ratón de RSV, la IL-12 promueve la producción de IFN- γ , disminuye la

expresión de IL-4 e IL-5, puede prevenir eosinofilia pulmonar (Hussell, Khan, y Openshaw 1997; Hussell y Openshaw 2000) y eliminar la respuesta exacerbada en las vías aéreas (Gavett y col. 1995).

Se ha descrito que la inducción de anticuerpos de baja afinidad es un factor importante en la exacerbación de la enfermedad respiratoria (Delgado y col. 2010). Diversos estudios en ratones y terneros sugirieron que la exacerbación de la enfermedad resultó de una respuesta inmunitaria polarizada al perfil Th2 mediante la producción aumentada de IL-4, altos niveles de IgG1 e IgE y la falta de linfocitos T CD8+ específicos contra BRSV, resultando en una eosinofilia pulmonar (Bukreyev y col. 2005; Mark Connors, Giese, Kulkarni, Firestone, Morse, y Murphy 1994; L J Gershwin y col. 2000; Hussell y col. 1997; Kalina y col. 2004; Varga y col. 2001; Woolums y col. 1999).

Con respecto a la inducción de AN de BRSV, nuestros resultados coinciden parcialmente con los de Connors y colaboradores quienes observaron que la inmunización de ratas con la proteína quimérica FG expresada en baculovirus (Bac-FG), o con un virus vaccinia o adenovirus que expresaban la proteína F (Vac-F y Ad-F, respectivamente) indujo altos niveles de anticuerpos totales contra HRSV, pero los anticuerpos inducidos por Bac-FG tenían bajos niveles de actividad neutralizante en comparación con los otros inmunógenos (M Connors y col. 1992). En este trabajo de tesis, demostramos que el vector MVA-F y la proteína Ft fueron capaces de inducir AN de BRSV. Las diferencias observadas en cuanto a la capacidad de la proteína F de inducir AN podrían estar relacionadas con la estructura tridimensional o el destino final de la proteína F expresada en ambos sistemas que modificarían la exposición de los epitopes neutralizantes.

En base a los resultados obtenidos, los esquemas de *prime-boost* homólogo o heterólogo, utilizando el inmunógeno MVA-F, combinado con Ft, resultó ser la mejor estrategia ya que logró inducir el perfil de respuesta inmunitaria que correlacionaría con protección frente a una infección con BRSV. A futuro, consideramos de gran utilidad evaluar estas estrategias de vacunación en el hospedador natural.

En base a las distintas estrategias de producción de inmunógenos realizadas en este trabajo de tesis y teniendo en cuenta los resultados epidemiológicos obtenidos, se podrá seleccionar el mejor candidato vacunal, produciendo los MVA que porten las secuencias codificantes de los genes *F* de los virus aislados, de manera de que dichos inmunógenos representen a la población viral circulante en nuestro país. Del mismo modo, podría proponerse la realización del desafío viral con las cepas circulantes aisladas con el objetivo de evaluar la protección y desarrollar a futuro los virus MVA que porten las secuencias del gen *F* previamente caracterizadas.

En conjunto, en este trabajo de tesis se demostró que el BRSV circula en todos los sistemas productivos de Argentina, tanto en especies bovinas como no bovinas de interés agropecuario. De esta manera, resulta importante adecuar los cronogramas de vacunación actuales a las dinámicas de infección de BRSV en los tambos, rodeos de cría y establecimientos de engorde a corral. Asimismo, es relevante el desarrollo de nuevos candidatos vacunales con el objetivo de controlar la infección y mejorar las respuestas inducidas, aun cuando la vacunación sea necesaria en animales jóvenes que posean anticuerpos calostrales.

El inmunógeno MVA-F fue capaz de inducir AN e IFN- γ específicos contra BRSV en el modelo ratón, tanto en esquemas de *prime-boost* homólogo como heterólogo combinado con una vacuna a subunidad. Esto alienta su evaluación como candidato vacunal contra el virus BRSV en bovinos con el objetivo final de prevenir la infección por BRSV.

A nuestro entender, este es el primer trabajo que describe la epidemiología del BRSV en todos los sistemas de producción de carne y leche en nuestro país, evidenciando la necesidad de contar con vacunas más eficientes capaces de prevenir la infección por BRSV. Asimismo, aporta conocimientos en el desarrollo de un candidato vacunal basado en un virus recombinante y su potencial uso en la prevención del CRB.

Conclusiones generales

- Se detectaron prevalencias individuales para BRSV mayores al 70% en los 3 sistemas productivos evaluados.
- En bovinos de establecimientos de engorde a corral, la infección se produjo mayormente durante los 30 días posteriores al ingreso.
- En bovinos de tambo, se detectaron dos puntos críticos de infección y reinfección, que coinciden con el cambio del manejo productivo en dicho sistema productivo.
- Se detectó la presencia de anticuerpos neutralizantes (AN) de BRSV en especies no bovinas de interés productivo.
- Se obtuvo un candidato vacunal basado en MVA que porta el gen codificante de la proteína F del BRSV.
- El inmunógeno MVA-F indujo una respuesta inmune específica contra BRSV balanceada Th1-Th2.

En base a los resultados de este trabajo de tesis sería interesante proponer modificaciones en el cronograma de vacunación actualmente utilizado contra BRSV. En los bovinos de tambo, resultaría interesante realizar la vacunación entre los 3 y 4 meses de edad, momento en el que los anticuerpos calostrales descienden, de modo de lograr que los animales cuenten con un adecuado título de AN frente a la potencial infección con BRSV a partir del mes 6. Por otra parte, para el caso de bovinos de establecimientos de engorde a corral, proponemos que las inmunizaciones ocurran de manera previa al movimiento de los animales hacia los nuevos sistemas, a fin de que se encuentren inmunológicamente preparados al momento de la exposición al BRSV. Asimismo, proponemos evaluar la eficacia del candidato vacunal MVA-F en bovinos ya que en este trabajo de tesis fue capaz de inducir una respuesta inmunitaria específica contra BRSV y, como se ha descrito previamente, sería capaz de evadir el efecto inhibitorio de los anticuerpos maternos.

Referencias bibliográficas

- Affonso, I, S Gatti, B Alexandrino, M Oliveira, A Ramos de Medeiros, M Buzinaro, y S Samara. 2011. «Detection of antibodies against bovine respiratory syncytial virus (BRSV) in dairy cattle with different prevalences of bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) in sao paulo state, Brazil.» *Ciencias Agrarias* 32 (1): 295-300.
- Akca, Y, I Burgu, S Gür, y S Bilge Dagalp. 2001. «A study on investigation of occurrence of some virus infection in buffaloes in Turkey». *Revue Méd Vét* 156 (2): 268-71. http://www.revmedvet.com/2004/RMV155_268_271.pdf.
- Alm, K, E Koskinen, S Vahtiala, y M Andersson. 2009. «Acute BRSV infection in young AI bulls: effect on sperm quality.» *Reproduction in domestic animals Zuchthygiene* 44 (3): 456-59. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19000222>.
- Alwan, W H, W J Kozlowska, y P J Openshaw. 1994. «Distinct types of lung disease caused by functional subsets of antiviral T cells.» *The Journal of experimental medicine* 179 (1): 81-89. doi:10.1084/jem.179.1.81.
- Antoine, G, F Scheifflinger, F Dorner, y F G Falkner. 1998. «The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses.» *Virology* 244 (2): 365-96. doi:10.1006/viro.1998.9123.
- Antoine, Gerhard, Friedrich Scheifflinger, Georg Holzer, Thomas Langmann, Falko G Falkner, y Friedrich Dorner. 1996. «Characterization of the vaccinia MVA hemagglutinin gene locus and its evaluation as an insertion site for foreign genes». *Gene* 177 (1-2): 43-46. doi:10.1016/0378-1119(96)00267-3.
- Antonis, Adriaan F G, Erwin A W Claassen, Evert J. Hensen, Raoul J De Groot, Jolanda D F De Groot-Mijnes, Remco S. Schrijver, y Robbert G. Van Der Most. 2006. «Kinetics of antiviral CD8 T cell responses during primary and post-vaccination secondary bovine respiratory syncytial virus infection». *Vaccine* 24 (10): 1551-61. doi:10.1016/j.vaccine.2005.10.005.
- Antonis, Adriaan F G, Robbert G van der Most, Yasemin Suezer, Norbert Stockhofe-Zurwieden, Franz Daus, Gerd Sutter, y Remco S Schrijver. 2007. «Vaccination with recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing bovine respiratory syncytial virus (bRSV) proteins protects calves against RSV challenge.» *Vaccine* 25 (25): 4818-27. doi:10.1016/j.vaccine.2007.04.002.
- Antonis, Adriaan F G, Remco S Schrijver, Franz Daus, Paul J G M Steverink, Norbert Stockhofe, Evert J Hensen, Johannes P M Langedijk, y Robbert G Van Der Most. 2003. «Vaccine-Induced Immunopathology during Bovine Respiratory Syncytial Virus Infection : Exploring the Parameters of Pathogenesis». *Journal of Virology*

- 77 (22): 12067-73. doi:10.1128/JVI.77.22.12067.
- Antrobus, Richard D., Patrick J. Lillie, Tamara K. Berthoud, Alexandra J. Spencer, James E. McLaren, Kristin Ladell, Teresa Lambe, y col. 2012. «A T Cell-Inducing Influenza Vaccine for the Elderly: Safety and Immunogenicity of MVA-NP+M1 in Adults Aged over 50 Years». Editado por T. Mark Doherty. *PLoS ONE* 7 (10): e48322. doi:10.1371/journal.pone.0048322.
- Arns, C W, J Campalans, S C B Costa, H G Domingues, R C F D 'arce, y R S Almeida. 2003. «Characterization of bovine respiratory syncytial virus isolated in Brazil». *Braz J Med Biol Res* 36 (2). <http://www.scielo.br/pdf/bjmbr/v36n2/4364.pdf>.
- Atreya, Prabha L, y Sandhya Kulkarni. 1999. «Respiratory syncytial virus strain A2 is resistant to the antiviral effects of type I interferons and human MxA.» *Virology* 261 (2): 227-41. doi:10.1006/viro.1999.9835.
- Babcock, A. H., B. J. White, S. S. Dritz, D. U. Thomson, y D. G. Renter. 2008. «Feedlot health and performance effects associated with the timing of respiratory disease treatment». *Journal of Animal Science* 87 (1): 314-27. doi:10.2527/jas.2008-1201.
- Bagnis, G, J Giraudó, S Sutil, C Torres, V Martín, J Roviolo, C Savoretti, y L Sabini. 1999. «Aislamiento y detección antigénica del virus sincicial respiratorio bovino en Argentina.» *Revista de Medicina Veterinaria* 80 (3): 173-77.
- Bakari, Muhammad, Said Aboud, Charlotta Nilsson, Joel Francis, Deus Buma, Candida Moshiro, Eric A Aris, y col. 2011. «Broad and potent immune responses to a low dose intradermal HIV-1 DNA boosted with HIV-1 recombinant MVA among healthy adults in Tanzania.» *Vaccine* 29 (46): 8417-28. doi:10.1016/j.vaccine.2011.08.001.
- Baker, J C, T R Ames, y R J Markham. 1986. «Seroepizootiologic study of bovine respiratory syncytial virus in a dairy herd.» *American Journal Of Veterinary Research* 47 (2): 240-45.
- Baker, J C, y M L Frey. 1985. «Bovine respiratory syncytial virus.» *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1 (2): 259-75. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3907775>.
- Beem, M. 1967. «Repeated infections with respiratory syncytial virus». *The Journal of Immunology* 98 (6): 1115-22.
- Bejon, Philip, Edna Ogada, Tabitha Mwangi, Paul Milligan, Trudie Lang, Greg Fegan, Sarah C Gilbert, Norbert Peshu, Kevin Marsh, y Adrian V S Hill. 2007. «Extended follow-up following a phase 2b randomized trial of the candidate malaria vaccines FP9 ME-TRAP and MVA ME-TRAP among children in Kenya.» Editado por Colin Sutherland. *PloS one* 2 (8): e707. doi:10.1371/journal.pone.0000707.
- Belknap, E.B. 1993. «Recognizing the clinical signs of BRSV infection». *veterinary medicine* 88: 883-887.

- Bembridge, G. P., N. Rodriguez, R. Garcia-Beato, C. Nicolson, J. A. Malero, y G. Taylor. 2000. «DNA encoding the attachment (G) or fusion (F) protein of respiratory syncytial virus induces protection in the absence of pulmonary inflammation». *Journal of General Virology* 81 (10): 2519-23.
- Bender, B S, C A Rowe, S F Taylor, L S Wyatt, B Moss, y P A Small. 1996. «Oral immunization with a replication-deficient recombinant vaccinia virus protects mice against influenza.» *Journal of virology* 70 (9): 6418-24.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8709274>.
- Berkner, K.L., y P.A. Sharp. 1982. «Preparation of adenovirus recombinants using plasmids of viral DNA». En *Eukaryotic viral vectors*, Gluzman, Y., 193-98. New York, USA.
- Berthoud, T. K., M. Hamill, P. J. Lillie, L. Hwenda, K. A. Collins, K. J. Ewer, A. Milicic, y col. 2011. «Potent CD8+ T-Cell Immunogenicity in Humans of a Novel Heterosubtypic Influenza A Vaccine, MVA-NP+M1». *Clinical Infectious Diseases* 52 (1): 1-7. doi:10.1093/cid/ciq015.
- Betts, Gareth, Hazel Poyntz, Elena Stylianou, Arturo Reyes-Sandoval, Matthew Cottingham, Adrian Hill, y Helen McShane. 2012. «Optimising Immunogenicity with Viral Vectors: Mixing MVA and HAAdV-5 Expressing the Mycobacterial Antigen Ag85A in a Single Injection». *PLoS ONE* 7 (12).
doi:10.1371/journal.pone.0050447.
- Bidokhti, Mehdi R. M., Madeleine Tråvén, Anna Ohlson, Behdad Zarnegar, Claudia Baule, Sándor Belák, Stefan Alenius, y Lihong Liu. 2012. «Phylogenetic analysis of bovine respiratory syncytial viruses from recent outbreaks in feedlot and dairy cattle herds». *Archives of Virology* 157 (4): 601-7. doi:10.1007/s00705-011-1209-3.
- Bidokhti, Mehdi R M, Madeleine Tråvén, Nils Fall, Ulf Emanuelson, y Stefan Alenius. 2009. «Reduced likelihood of bovine coronavirus and bovine respiratory syncytial virus infection on organic compared to conventional dairy farms». *Veterinary Journal* 182 (3): 436-40. doi:10.1016/j.tvjl.2008.08.010.
- Bisht, Himani, Anjeanette Roberts, Leatrice Vogel, Alexander Bukreyev, Peter L Collins, Brian R Murphy, Kanta Subbarao, y Bernard Moss. 2004. «Severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein expressed by attenuated vaccinia virus protectively immunizes mice.» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (17): 6641-46.
doi:10.1073/pnas.0401939101.
- Blanchard, T J, a Alcami, P Andrea, y G L Smith. 1998. «Modified vaccinia virus Ankara undergoes limited replication in human cells and lacks several

- immunomodulatory proteins: implications for use as a human vaccine.» *The Journal of general virology* 79 (Pt 5) (mayo): 1159-67.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9603331>.
- Bossert, Birgit, Sabrina Marozin, y Karl-Klaus Conzelmann. 2003. «Nonstructural Proteins NS1 and NS2 of Bovine Respiratory Syncytial Virus Block Activation of Interferon Regulatory Factor 3». *JOURNAL OF VIROLOGY* 77 (16): 8661-68.
doi:10.1128/JVI.77.16.8661-8668.2003.
- Bowland, Sandi L, y Patricia E Shewen. 2000. «Bovine respiratory disease: Commercial vaccines currently available in Canada». *Canadian Veterinary Journal*.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1476343/pdf/canvetj00013-0035.pdf>.
- Boxus, M, M Tignon, S Roels, J.-F. Toussaint, K Walravens, M.-A. Benoit, P Coppe, J.-J. Letesson, C Letellier, y P Kerkhofs. 2007. «DNA Immunization with Plasmids Encoding Fusion and Nucleocapsid Proteins of Bovine Respiratory Syncytial Virus Induces a Strong Cell-Mediated Immunity and Protects Calves against Challenge». *Journal of Virology* 81 (13): 6879-89. doi:10.1128/JVI.00502-07.
- Brady, Ryan P, Christina L Topliff, y Clayton L Kelling. 2004. «In Vitro Expression of Full-Length and Truncated Bovine Respiratory Syncytial Virus G Proteins and Their Antibody Responses in BALB/c Mice».
<http://digitalcommons.unl.edu/virologypub>.
- Brodersen, Bruce W. 2010. «Bovine respiratory syncytial virus». *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* 26 (2). Elsevier Ltd: 323-33.
doi:10.1016/j.cvfa.2010.04.010.
- Bryson, D.E. 1993. «Necroscopy findings associated with BRSV pneumonia». *veterinary medicine* 88: 894-899.
- Bryson, D G, J B McFerran, H J Ball, y S D Neill. 1978. «Observations on outbreaks of respiratory disease in housed calves--(1) Epidemiological, clinical and microbiological findings.» *The Veterinary record* 103 (22): 485-89.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/219582>.
- Bukreyev, Alexander, Igor M Belyakov, Gregory A Prince, Kevin C Yim, Katie K Harris, Jay A Berzofsky, y Peter L Collins. 2005. «Expression of Interleukin-4 by Recombinant Respiratory Syncytial Virus Is Associated with Accelerated Inflammation and a Nonfunctional Cytotoxic T-Lymphocyte Response following Primary Infection but Not following Challenge with Wild-Type Virus». *JOURNAL OF VIROLOGY* 79 (15): 9515-26. doi:10.1128/JVI.79.15.9515-9526.2005.
- Calvo-Pinilla, Eva, Nicolás Navasa, Juan Anguita, y Javier Ortego. 2012.

- «Multiserotype protection elicited by a combinatorial prime-boost vaccination strategy against bluetongue virus». *PLoS ONE* 7 (4): 1-11.
doi:10.1371/journal.pone.0034735.
- Campalans, Jacqueline, y Clarice Weis Arns. 1997. «Serological evidence of bovine respiratory syncytial virus in Brazil». *VIRUS Reviews & Research* 2 (1-2): 50-56.
doi:10.17525/vrrjournal.v2i1-2.162.
- Carroll, M W, y B Moss. 1997. «Host range and cytopathogenicity of the highly attenuated MVA strain of vaccinia virus: propagation and generation of recombinant viruses in a nonhuman mammalian cell line.» *Virology* 238 (2): 198-211. doi:10.1006/viro.1997.8845.
- Cavanaugh, James S, Dorka Awi, Maimuna Mendy, Adrian V S Hill, Hilton Whittle, y Samuel J McConkey. 2011. «Partially randomized, non-blinded trial of DNA and MVA therapeutic vaccines based on hepatitis B virus surface protein for chronic HBV infection.» Editado por Denise L. Doolan. *PloS one* 6 (2): e14626.
doi:10.1371/journal.pone.0014626.
- Chapman, Ros, Tsungai Ivai Jongwe, Nicola Douglass, Gerald Chege, y Anna-Lise Williamson. 2017. «Heterologous prime-boost vaccination with DNA and MVA vaccines, expressing HIV-1 subtype C mosaic Gag virus-like particles, is highly immunogenic in mice». *PLOS ONE* 12 (3): e0173352.
doi:10.1371/journal.pone.0173352.
- Cimolai, Nevio, Glenn P. Taylor, Diana Mah, y Brenda J. Morrison. 1992. «Definition and Application of a Histopathological Scoring Scheme for an Animal Model of Acute Mycoplasma pneumoniae Pulmonary Infection». *Microbiology and Immunology* 36 (5): 465-78. doi:10.1111/j.1348-0421.1992.tb02045.x.
- Citterio, C V, C Luzzago, M Sala, G Sironi, P Gatti, A Gaffuri, y P Lanfranchi. 2003. «Serological study of a population of alpine chamois (*Rupicapra r rupicapra*) affected by an outbreak of respiratory disease.» *The Veterinary record* 153 (19): 592-96. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14640327>.
- Clark, Richard H., Julia C. Kenyon, Nathan W. Bartlett, David C. Tschärke, y Geoffrey L. Smith. 2006. «Detection of gene A41L enhances vaccinia virus immunogenicity and vaccine efficacy». *Journal of General Virology* 87 (1): 29-38.
doi:10.1099/vir.0.81417-0.
- Collins, J K, R M Teegarden, D W MacVean, Salman, G H Smith, y G R Frank. 1988. «Prevalence and specificity of antibodies to bovine respiratory syncytial virus in sera from feedlot and range cattle.» *American journal of veterinary research* 49 (8): 1316-19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3178027>.
- Collins, P. L., R. M. Chanock, y B. R. Murphy. 2001. «Respiratory syncytial virus». En

- Fields Virology*, editado por D. M. Knipe, P. M. Howle, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M.A. Martin, B Roizman, y S.E Straus, 4th ed., 1443-85. Philadelphia, Pa.: Lippincott-Raven.
- Connors, M, P L Collins, C Y Firestone, A V Sotnikov, A Waitze, A R Davis, P P Hung, R M Chanock, y B R Murphy. 1992. «Cotton rats previously immunized with a chimeric RSV FG glycoprotein develop enhanced pulmonary pathology when infected with RSV, a phenomenon not encountered following immunization with vaccinia--RSV recombinants or RSV.» *Vaccine* 10 (7): 475-84.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1609551>.
- Connors, Mark, Natalia A Giese, Arun B Kulkarni, Cai-Yen Firestone, Herbert C Morse, y Brian R Murph. 1994. «Enhanced Pulmonary Histopathology Induced by Respiratory Syncytial Virus (RSV) Challenge of Formalin-Inactivated RSV-Immunized BALB/c Mice Is Abrogated by Depletion of Interleukin-4 (IL-4) and IL-10». *JOURNAL OF VIROLOGY*, 5321-25.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC236482/pdf/jvirol00017-0627.pdf>.
- Connors, Mark, Natalia A Giese, Arun B Kulkarni, C Y Firestone, Herbert C Morse, y B R Murphy. 1994. «Enhanced pulmonary histopathology induced by respiratory syncytial virus (RSV) challenge of formalin-inactivated RSV-immunized BALB/c mice is abrogated by depletion of interleukin-4 (IL-4) and IL-10.» *Journal of virology* 68 (8): 5321-25.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC236482/pdf/jvirol00017-0627.pdf>.
- Costa, E, M Giuliadori, M Dezzilio, y J Romero. 2003. «Mortalidad en un feedlot de La Plata (Buenos Aires, Argentina): causas, distribución mensual e impacto económico.» *Anacleto Veterinaria* 54 (221): 13-19.
- Cottingham, Matthew G, y Miles W Carroll. 2013. «Recombinant MVA vaccines: dispelling the myths.» *Vaccine* 31 (39). Elsevier Ltd: 4247-51.
doi:10.1016/j.vaccine.2013.03.021.
- Currier, Jeffrey R, Viseth Ngauy, Mark S de Souza, Silvia Ratto-Kim, Josephine H Cox, Victoria R Polonis, Patricia Earl, y col. 2010. «Phase I safety and immunogenicity evaluation of MVA-CMDR, a multigenic, recombinant modified vaccinia Ankara-HIV-1 vaccine candidate.» Editado por Esper Georges Kallas. *PloS one* 5 (11): e13983. doi:10.1371/journal.pone.0013983.
- Dai, Kaifan, Ying Liu, Mingjie Liu, Jianqing Xu, Wei Huang, Xianggang Huang, Lianxing Liu, Yanmin Wan, Yanling Hao, y Yiming Shao. 2008. «Pathogenicity and immunogenicity of recombinant Tiantan Vaccinia Virus with deleted C12L and A53R genes». *Vaccine* 26 (39): 5062-71. doi:10.1016/j.vaccine.2008.06.011.
- Delgado, Maria Florencia, Silvina Coviello, a Clara Monsalvo, Guillermina a Melendi,

- Wayne Mitzner, Jeffrey Ravetch, José a Melero, y Pablo M Irusta. 2010. «Lack of antibody affinity maturation due to poor Toll-like receptor stimulation leads to enhanced respiratory syncytial virus disease». *Nat Med* 15 (1): 34-41. doi:10.1038/nm.1894.Lack.
- Dellaporta, Stephen L., Jonathan Wood, y James B. Hicks. 1983. «A plant DNA minipreparation: Version II». *Plant Molecular Biology Reporter* 1 (4). Springer-Verlag: 19-21. doi:10.1007/BF02712670.
- Dinarello, C A. 1999. «IL-18: A Th1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family». *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. doi:10.1016/S0091-6749(99)70518-X.
- Doggett, Jennifer E., D. Taylor-Robinson, y R. G. C. Gallop. 1968. «A study of an inhibitor in bovine serum active against respiratory syncytial virus». *Archiv für die gesamte Virusforschung* 23 (1-2). Springer-Verlag: 126-37. doi:10.1007/BF01242120.
- Domingues, H.G., J. Campalans, R.S. Almeida, L.T. Coswig, y C.W. Arns. 2002. «Dot-enzyme linked immunosorbent assay as an alternative technique for the detection of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) antibodies». *Veterinary research* 33 (4): 397–404. doi:10.1051/vetres.
- Domingues, Helena Gallicchio, Fernando Rosado Spilki, y Clarice Weis Arns. 2011. «Detecção molecular e análise filogenética de vírus respiratório sincicial bovino (BRSV) em swabs e tecido pulmonar de bovinos adultos». *Pesquisa Veterinaria Brasileira* 31 (11): 961-66. doi:10.1590/S0100-736X2011001100004.
- Dubovi, E.J. 1993. «Diagnosing BRSV infection: a laboratory perspective». *Veterinary medicine (USA)*. [Veterinary Medicine Pub.]. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US9424722>.
- Dunachie, S J, M Walther, J E Epstein, S Keating, T Berthoud, L Andrews, R F Andersen, y col. 2006. «A DNA prime-modified vaccinia virus Ankara boost vaccine encoding thrombospondin-related adhesion protein but not circumsporozoite protein partially protects healthy malaria-naive adults against Plasmodium falciparum sporozoite challenge». *Infection and Immunity* 74 (10): 5933-42. doi:10.1128/IAI.00590-06.
- Dunbar, M R, D A Jessup, J F Evermann, y W J Foreyt. 1985. «Seroprevalence of respiratory syncytial virus in free-ranging bighorn sheep.» *Journal of the American Veterinary Medical Association* 187 (11): 1173-74. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3878355>.
- Duncan, R B, y L N Potgieter. 1993. «Antigenic diversity of respiratory syncytial viruses and its implication for immunoprophylaxis in ruminants.» *Veterinary Microbiology*

- 37 (3-4): 319-41.
- Durbin, Anna P, Linda S Wyatt, Jeffrey Siew, Bernard Moss, y Brian R Murphy. 1998. «The immunogenicity and efficacy of intranasally or parenterally administered replication-deficient vaccinia-parainfluenza virus type 3 recombinants in rhesus monkeys». *Vaccine* 16 (13): 1324-30. doi:10.1016/S0264-410X(98)00010-3.
- Durham, P J, y L E Hassard. 1990. «Prevalence of antibodies to infectious bovine rhinotracheitis, parainfluenza 3, bovine respiratory syncytial, and bovine viral diarrhea viruses in cattle in Saskatchewan and Alberta.» *The Canadian veterinary journal. La revue vétérinaire canadienne* 31 (12): 815-20.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1480901&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Dus Santos, M, y M Mozgovoij. 2016. «Bovine respiratory syncytial virus.» En *Mononegaviruses of veterinary importance. Volume 2: molecular epidemiology and control*, editado por M Munir, 114-26. Wallingford: CABI.
doi:10.1079/9781780644172.0114.
- Easton, Andrew J, Joseph B Domachowske, y Helene F Rosenberg. 2004. «Animal Pneumoviruses: Molecular Genetics and Pathogenesis.» *Clinical Microbiology Reviews* 17 (2): 390-412. doi:10.1128/CMR.17.2.390-412.2004.
- Edwards, T. A. 2010. «Control methods for bovine respiratory disease for feedlot cattle.» *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*.
doi:10.1016/j.cvfa.2010.03.005.
- Eleraky, N, S Kania, y L Potgieter. 2001. «The ovine respiratory syncytial virus F gene sequence and its diagnostic application.» *Journal of veterinary diagnosis and investigation* 13: 455-61.
<http://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/104063870101300601>.
- Eleraky, N Z, S a Kania, y L N Potgieter. 2001. «The ovine respiratory syncytial virus F gene sequence and its diagnostic application.» *Journal of veterinary diagnostic investigation* 13 (6): 455-61. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11724134>.
- Ellis, John A, Lori E Hassard, Victor S Cortese, y Paul S Morley. 1996. «Effects of perinatal vaccination on humoral and cellular immune responses in cows and young calves.» *Journal of the American Veterinary Medical Association* 208 (3): 393-400.
- Ellis, John, Sheryl Gow, Michael Bolton, William Burdett, y Scott Nordstrom. 2014. «Inhibition of priming for bovine respiratory syncytial virus-specific protective immune responses following parenteral vaccination of passively immune calves.» *Canadian Veterinary Journal* 55 (12): 1180-85.
- Elvander, M. 1996. «Severe respiratory disease in dairy cows caused by infection with

- bovine respiratory syncytial virus.» *Veterinary Record* 138 (5): 101-5.
- Elvander, M, S Vilcek, C Baule, A Uttenthal, A Ballagi-Pordany, y S Belak. 1998. «Genetic and antigenic analysis of the G attachment protein of bovine respiratory syncytial virus strains». *J Gen Virol* 79 (12): 2939-46. doi:10.1099/0022-1317-79-12-2939.
- Evermann, J F, H D Liggitt, S M Parish, A C Ward, y B R LeaMaster. 1985. «Properties of a respiratory syncytial virus isolated from a sheep with rhinitis.» *American journal of veterinary research* 46 (4): 947-51.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3893243>.
- Falivene, Juliana, María Paula Del Médico Zajac, María Fernanda Pascutti, Ana María Rodríguez, Cynthia Maeto, Beatriz Perdiguero, Carmen E Gómez, Mariano Esteban, Gabriela Calamante, y María Magdalena Gherardi. 2012. «Improving the MVA vaccine potential by deleting the viral gene coding for the IL-18 binding protein.» *PLoS one* 7 (2): e32220. doi:10.1371/journal.pone.0032220.
- Fenner, F. 1996. «Poxviruses.» En *Fields Virology*, editado por P. M. Fields, B. N.; Knipe, D. M. y Howley, 3rd vol 2, 2673-2702. New York, USA.: Lippincott-Raven Press.
- Ferguson, J D, D T Galligan, y V Cortese. 1997. «Milk production and reproductive performance in dairy cows given bovine respiratory syncytial virus vaccine prior to parturition.» *Journal of the American Veterinary Medical Association* 210 (12): 1779-83. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9187730>.
- Ferrer, M F, F A Zanetti, y G Calamante. 2007. «Diseño y construcción de vectores de transferencia para la obtención de virus vaccinia Ankara modificado (MVA) recombinantes». *Revista Argentina de Microbiología* 39 (39): 138-42.
<http://www.scielo.org.ar/pdf/ram/v39n3/v39n3a03.pdf>.
- Ferrer, María Florencia, María Paula Del Médico Zajac, Flavia Adriana Zanetti, Alejandro Rafael Valera, Osvaldo Zabal, y Gabriela Calamante. 2011. «Recombinant MVA expressing secreted glycoprotein D of BoHV-1 induces systemic and mucosal immunity in animal models.» *Viral immunology* 24 (4): 331-39. doi:10.1089/vim.2011.0018.
- Fishaut, M, D Tubergen, y K McIntosh. 1980. «Cellular response to respiratory viruses with particular reference to children with disorders of cell-mediated immunity.» *The Journal of pediatrics* 96 (2): 179-86.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6243354>.
- Frey, Sharon E., Frances K. Newman, Jeffrey S. Kennedy, Vera Sobek, Francis A. Ennis, Heather Hill, Lihan K. Yan, y col. 2007. «Clinical and immunologic responses to multiple doses of IMVAMUNE® (Modified Vaccinia Ankara) followed

- by Dryvax® challenge». *Vaccine* 25 (51): 8562-73.
doi:10.1016/j.vaccine.2007.10.017.
- Fulton, R, R Briggs, M Payton, A Confer, J Saliki, J Ridpath, L Burge, y G Duff. 2004. «Maternally derived humoral immunity to bovine viral diarrhea virus (BVDV) 1a, BVDV1b, BVDV2, bovine herpesvirus-1, parainfluenza-3 virus bovine respiratory syncytial virus, Mannheimia haemolytica and Pasteurella multocida in beef calves, antibody decline». *Vaccine* 22 (5-6): 644-50. doi:10.1016/j.vaccine.2003.08.033.
- Fulton, Robert W, B J Cook, D L Step, Anthony W Confer, J T Saliki, Mark E Payton, Lurinda J Burge, R D Welsh, y K Shawn Blood. 2002. «Evaluation of health status of calves and the impact on feedlot performance: assessment of a retained ownership program for postweaning calves.» *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche vétérinaire* 66 (3): 173-80.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=227001&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Fulton, Robert W, C W Purdy, Anthony W Confer, J T Saliki, Raymond W Loan, Robert E Briggs, y Lurinda J Burge. 2000. «Bovine viral diarrhea viral infections in feeder calves with respiratory disease: Interactions with Pasteurella spp., parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus». *Canadian Journal of Veterinary Research* 64 (3): 151-59.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1189606/pdf/cjvetres00007-0009.pdf>.
- Furze, J, G Wertz, R Lerch, y G Taylor. 1994. «Antigenic heterogeneity of the attachment protein of bovine respiratory syncytial virus.» *The Journal of general virology* 75 (Pt 2) (2): 363-70. doi:10.1099/0022-1317-75-2-363.
- Gaddum, R M, R S Cook, J M Furze, S a Ellis, y G Taylor. 2003. «Recognition of bovine respiratory syncytial virus proteins by bovine CD8+ T lymphocytes». *Immunology* 108 (2): 220-29. doi:1566 [pii].
- Gaddum, R M, R S Cook, L H Thomas, y G Taylor. 1996. «Primary cytotoxic T-cell responses to bovine respiratory syncytial virus in calves». *Immunology* 88: 421-27.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1456355/pdf/immunology00034-0101.pdf>.
- Gaffuri, Alessandra, Marco Giacometti, Vito Massimo Tranquillo, Simone Magnino, Paolo Cordioli, y Paolo Lanfranchi. 2006a. «Serosurvey of roe deer, chamois and domestic sheep in the central Italian Alps». *Journal of Wildlife Diseases* 42 (3): 685-90. doi:10.7589/0090-3558-42.3.685.
- . 2006b. «Serosurvey of roe deer, chamois and domestic sheep in the central

- Italian Alps.» *Journal of Wildlife Diseases* 42 (3): 685-90.
<http://www.bioone.org/doi/abs/10.2193/2005-537>.
- Gagea, Mihai I., Kenneth G. Bateman, Tony van Dreumel, Beverly J. McEwen, Susy Carman, Marie Archambault, Rachel A. Shanahan, y Jeff L. Caswell. 2006. «Diseases and pathogens associated with mortality in Ontario beef feedlots». *J Vet Diagn Invest* 18 (1): 18-28. doi:10.1177/104063870601800104.
- Gallego-Gomez, J. C., Cristina Risco, D. Rodriguez, Pilar Cabezas, Susana Guerra, José L Carrascosa, y Mariano Esteban. 2003. «Differences in Virus-Induced Cell Morphology and in Virus Maturation between MVA and Other Strains (WR, Ankara, and NYCBH) of Vaccinia Virus in Infected Human Cells». *Journal of Virology* 77 (19): 10606-22. doi:10.1128/JVI.77.19.10606-10622.2003.
- García-Arriaza, Juan, José Luis Nájera, Carmen E. Gómez, Nolawit Tewabe, Carlos Oscar S Sorzano, Thierry Calandra, Thierry Roger, y Mariano Esteban. 2011. «A candidate HIV/AIDS vaccine (MVA-B) lacking vaccinia virus gene C6L enhances memory HIV-1-specific T-cell responses». *PLoS ONE* 6 (8). doi:10.1371/journal.pone.0024244.
- García-Sastre, A. 2004. «Identification and characterization of viral antagonists of type I interferon in negative-strand RNA viruses.» *Current topics in microbiology and immunology* 283: 249-80. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15298172>.
- Garg, Ravendra, Michael Theaker, Elisa C. Martinez, y Sylvia van Drunen Littel-van den Hurk. 2016. «A single intranasal immunization with a subunit vaccine formulation induces higher mucosal IgA production than live respiratory syncytial virus». *Virology* 499. Elsevier: 288-97. doi:10.1016/j.virol.2016.09.023.
- Gavett, S H, D J O'Hearn, Xiumin Li, S K Huang, Fred D Finkelman, y M Wills-Karp. 1995. «Interleukin 12 inhibits antigen-induced airway hyperresponsiveness, inflammation, and Th2 cytokine expression in mice.» *The Journal of experimental medicine* 182 (5): 1527-36. doi:10.1084/jem.182.5.1527.
- Gershwin, L J, R A Gunther, M L Anderson, A R Woolums, K McArthur-Vaughan, K E Randel, G A Boyle, K E Friebertshauser, y P S McInturff. 2000. «Bovine respiratory syncytial virus-specific IgE is associated with interleukin-2 and -4, and interferon-gamma expression in pulmonary lymph of experimentally infected calves.» *American journal of veterinary research* 61 (3): 291-98.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10714521>.
- Gershwin, Laurel J. 2012. «Immunology of bovine respiratory syncytial virus infection of cattle». *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 35 (3). Elsevier Ltd: 253-57. doi:10.1016/j.cimid.2012.01.005.
- Gershwin, Laurel J., Mark L. Anderson, Chunbo Wang, Londa J. Berghaus, Thomas P.

- Kenny, y Robert A. Gunther. 2011. «Assessment of IgE response and cytokine gene expression in pulmonary efferent lymph collected after ovalbumin inhalation during experimental infection of calves with bovine respiratory syncytial virus». *American Journal of Veterinary Research* 72 (1): 134-45.
doi:10.2460/ajvr.72.1.134.
- Gherardi, M Magdalena, y Mariano Esteban. 2005. «Recombinant poxviruses as mucosal vaccine vectors.» *Journal of general virology* 86 (Pt 11): 2925-36.
doi:10.1099/vir.0.81181-0.
- Gherardi, M Magdalena, José Luis Nájera, Eva Pérez-Jiménez, Susana Guerra, Adolfo García-Sastre, y Mariano Esteban. 2003. «Prime-boost immunization schedules based on influenza virus and vaccinia virus vectors potentiate cellular immune responses against human immunodeficiency virus Env protein systemically and in the genitoretal draining lymph nodes.» *Journal of virology* 77 (12): 7048-57.
doi:10.1128/JVI.77.12.7048.
- Ghildyal, Reena, Adeline Ho, y David A Jans. 2006. «Central role of the respiratory syncytial virus matrix protein in infection». *FEMS Microbiology Reviews*.
doi:10.1111/j.1574-6976.2006.00025.x.
- Gias, E, y S U Nielsen. 2008. «Purification of human respiratory syncytial virus by ultracentrifugation en iodixanol density gradient». *Journal of Virological Methods* 147 (2-2): 328-32.
- Glezen, W P, L H Taber, A L Frank, y J A Kasel. 1960. «Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus.» *American journal of diseases of children (1960)* 140 (6): 543-46. doi:10.1001/archpedi.1986.02140200053026.
- Gómez, Carmen Elena, José Luis Nájera, Elena Domingo-Gil, Laura Ochoa-Callejero, Gloria González-Asequinolaza, y Mariano Esteban. 2007. «Virus distribution of the attenuated MVA and NYVAC poxvirus strains in mice». *Journal of General Virology* 88 (9): 2473-78. doi:10.1099/vir.0.83018-0.
- Gomez, Carmen, Jose Najera, Magdalena Krupa, y Mariano Esteban. 2008. «The Poxvirus Vectors MVA and NYVAC as Gene Delivery Systems for Vaccination Against Infectious Diseases and Cancer». *Current Gene Therapy* 8 (2): 97-120.
doi:10.2174/156652308784049363.
- Gonçalves, I. P. D., A. T. Simanke, H. C. Jost, I. Hötsel, A. Dal Soglio, y V. Moojen. 1993. «Detection of bovine respiratory syncytial virus in calves of Rio Grande do Sul, Brazil.» *Ciência Rural* 23 (3): 389-90.
- Goonetilleke, N. P., H McShane, C. M. Hannan, R. J. Anderson, R. H. Brookes, y A. V. S. Hill. 2003. «Enhanced Immunogenicity and Protective Efficacy Against Mycobacterium tuberculosis of Bacille Calmette-Guerin Vaccine Using Mucosal

- Administration and Boosting with a Recombinant Modified Vaccinia Virus Ankara». *The Journal of Immunology* 171 (3): 1602-9. doi:10.4049/jimmunol.171.3.1602.
- Gorden, Patrick J., y Paul Plummer. 2010. «Control, management, and prevention of bovine respiratory disease in dairy calves and cows». *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* 26 (2). Elsevier Ltd: 243-59. doi:10.1016/j.cvfa.2010.03.004.
- Gracie, J Alastair, Susan E Robertson, y Iain B McInnes. 2003. «Interleukin-18.» *Journal of leukocyte biology* 73 (2): 213-24. doi:10.1189/jlb.0602313.
- Graham, B S, M D Perkins, P F Wright, y D T Karzon. 1988. «Primary respiratory syncytial virus infection in mice.» *Journal of medical virology* 26 (2): 153-62. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3183639>.
- Griffin, Diane E., Fernando P. Polack, Paul G. Auwaerter, Sok-H. Lee, Hossein C. Nousari, Alexandra Valsamakis, Kristin M. Leiferman, Arwind Diwan, y Robert J. Adams. 1999. «Production of atypical measles in rhesus macaques: Evidence for disease mediated by immune complex formation and eosinophils in the presence of fusion-inhibiting antibody». *Nature Medicine* 5 (6). Nature Publishing Group: 629-34. doi:10.1038/9473.
- Grubbs, S T, S A Kania, y L N Potgieter. 2001. «Prevalence of ovine and bovine respiratory syncytial virus infections in cattle determined with a synthetic peptide-based immunoassay.» *Journal of veterinary diagnostic investigation official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians Inc* 13 (2): 128-32. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11289208>.
- Gulliksen, S M, K I Lie, T. Løken, y O Osterås. 2009. «Calf mortality in Norwegian dairy herds.» *Journal of dairy science* 92 (6): 2782-95. doi:10.3168/jds.2008-1807.
- Guzman, Efrain, y Geraldine Taylor. 2015. «Immunology of bovine respiratory syncytial virus in calves». *Molecular Immunology*. doi:10.1016/j.molimm.2014.12.004.
- Hägglund, S., C. Svensson, U. Emanuelson, J. F. Valarcher, y S. Alenius. 2006a. «Dynamics of virus infections involved in the bovine respiratory disease complex in Swedish dairy herds». *Veterinary Journal* 172 (2): 320-28. doi:10.1016/j.tvjl.2005.04.029.
- Hägglund, S., C. Svensson, U. Emanuelson, J.F. Valarcher, y S. Alenius. 2006b. «Dynamics of virus infections involved in the bovine respiratory disease complex in Swedish dairy herds». *The Veterinary Journal* 172 (2): 320-28. doi:10.1016/j.tvjl.2005.04.029.
- Hall, Caroline Breese, Keith R. Powell, Noni E. MacDonald, Christine L. Gala, Marilyn E. Menegus, Stephen C. Suffin, y Harvey J. Cohen. 1986. «Respiratory Syncytial Viral Infection in Children with Compromised Immune Function». *New England*

- Journal of Medicine* 315 (2): 77-81. doi:10.1056/NEJM198607103150201.
- Hanahan, D. 1985. «Techniques for transformation of Escherichia coli.» En *DNA Cloning: a Practical Approach, Vol. 1*, editado por D.M Glover, 109-35. Oxford. IRL Press.
- Hanzlicek, Gregg A., Brad J. White, David G. Renter, y Dale A. Blasi. 2010. «A field study evaluating health, performance, and behavior differences in crossbred beef calves administered different vaccine-parasiticide product combinations». *Vaccine* 28 (37): 5998-6005. doi:10.1016/j.vaccine.2010.06.096.
- Hardy, RD, H Jafri, K Olsen, M Wordemann, J Hatfield, B Rogers, P Patel, y col. 2001. «Elevated cytokine and chemokine levels and prolonged pulmonary airflow resistance in a murine Mycoplasma pneumoniae Pneumonia model: a microbiologic, histologic, immunologic and respiratory plethysmographic profile.» *Infection and immunity*, 3869-76.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC98411/pdf/ii003869.pdf>.
- Hardy, Robert D, Hasan S Jafri, Kurt Olsen, Janie Iglehart, Beverly B Rogers, Padma Patel, Gail Cassell, George H Mccracken, Octavio Ramilo, y Jeanine Hatfield. 2002. «Mycoplasma pneumoniae Induces Chronic Respiratory Infection , Airway Hyperreactivity , and Pulmonary Inflammation : a Murine Model of Infection-Associated Chronic Reactive Airway Disease Mycoplasma pneumoniae Induces Chronic Respiratory Infection , Airway». *INFECTION AND IMMUNITY* 70 (2): 649-54. doi:10.1128/IAI.70.2.649.
- Hardy, Robert D, Ana Maria Rios, Susana Chavez-Bueno, Hasan S Jafri, Jeanine Hatfield, Beverly B Rogers, George H. McCracken, y Octavio Ramilo. 2003. «Antimicrobial and immunologic activities of clarithromycin in a murine model of Mycoplasma pneumoniae-induced pneumonia». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47 (5): 1614-20. doi:10.1128/AAC.47.5.1614-1620.2003.
- Harrison, L R, y A R Pursell. 1985. «An epizootic of respiratory syncytial virus infection in a dairy herd.» *Journal of the American Veterinary Medical Association* 187 (7): 716-20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4055489>.
- Hawkrige, Tony, Thomas J Scriba, Sebastian Gelderbloem, Erica Smit, Michele Tameris, Sizulu Moyo, Trudie Lang, y col. 2008. «Safety and immunogenicity of a new tuberculosis vaccine, MVA85A, in healthy adults in South Africa.» *The Journal of infectious diseases* 198 (4): 544-52. doi:10.1086/590185.
- Hazari, S., H. K. Panda, B. C. Kar, y B. R. Das. 2002. «Comparative evaluation of indirect and sandwich ELISA for the detection of antibodies to bovine respiratory syncytial virus (BRSV) in dairy cattle». *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 25 (1): 59-68. doi:10.1016/S0147-9571(01)00022-4.

- Hilton, W Mark. 2014. «BRD in 2014: where have we been, where are we now, and where do we want to go?» *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases* 15 (2): 120-22.
doi:10.1017/S1466252314000115.
- Hochstein-Mintzel, V, H Stickl, y H C Huber. 1976. «Oral immunization against smallpox.» *Developments in biological standardization* 33: 260-66.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/182585>.
- Hodgson, Susanne H, Katie J Ewer, Carly M Bliss, Nick J Edwards, Thomas Rampling, Nicholas A Anagnostou, Eoghan De Barra, y col. 2015. «Evaluation of the efficacy of ChAd63-MVA vectored vaccines expressing circumsporozoite protein and ME-TRAP against controlled human malaria infection in malaria-naive individuals». En *Journal of Infectious Diseases*, 211:1076-86. doi:10.1093/infdis/jiu579.
- Holgado, María Pía, Juliana Falivene, Cynthia Maeto, Micaela Amigo, Mar??a Fernanda Pascutti, Mar??a Bel??n Vecchione, Andrea Bruttomesso, Gabriela Calamante, Mar??a Paula Del M??dico-Zajac, y Mar??a Magdalena Gherardi. 2016. «Deletion of A44L, A46R and C12L vaccinia virus genes from the MVA genome improved the vector immunogenicity by modifying the innate immune response generating enhanced and optimized specific T-cell responses». *Viruses* 8 (5). doi:10.3390/v8050139.
- Huber, V C, J M Lynch, D J Bucher, J Le, y D W Metzger. 2001. «Fc receptor-mediated phagocytosis makes a significant contribution to clearance of influenza virus infections.» *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 166 (12): 7381-88.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11390489>.
- Huber, Victor C, Raelene M Mckee, Martha N Brackin, Laura A Miller, Rachael Keating, Scott A Brown, Natalia Makarova, Daniel R Perez, Gene H Macdonald, y Jonathan A Mccullers. 2006. «Distinct Contributions of Vaccine-Induced Immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG2a Antibodies to Protective Immunity against Influenza» 13 (9): 981-90. doi:10.1128/CVI.00156-06.
- Hussell, T, C J Baldwin, A O'Garra, y P J Openshaw. 1997. «CD8+ T cells control Th2-driven pathology during pulmonary respiratory syncytial virus infection.» *European journal of immunology* 27 (12): 3341-49. doi:10.1002/eji.1830271233.
- Hussell, T, U Khan, y P Openshaw. 1997. «IL-12 treatment attenuates T helper cell type 2 and B cell responses but does not improve vaccine-enhanced lung illness.» *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 159 (1): 328-34.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9200470>.
- Hussell, T, y P J Openshaw. 2000. «IL-12-activated NK cells reduce lung eosinophilia to the attachment protein of respiratory syncytial virus but do not enhance the

- severity of illness in CD8 T cell-immunodeficient conditions.» *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 165 (12): 7109-15.
doi:10.4049/jimmunol.165.12.7109.
- Inaba, Y, Y Tanaka, K Sato, T Omori, y M Matumoto. 1972. «Bovine respiratory syncytial virus. Studies on an outbreak in Japan, 1968-1969.» *Japanese journal of microbiology* 16 (5): 373-83. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4345977>.
- Intisar, K.S., Y.H. Ali, A.I. Khalafalla, Mahasin E.A. Rahman, y A.S. Amin. 2010. «Respiratory syncytial virus infection of camels (*Camelus dromedaries*)». *Acta Tropica* 113 (2): 129-33. doi:10.1016/j.actatropica.2009.10.005.
- Jafri, Hasan S, Susana Chavez-Bueno, Asuncion Mejias, Ana M Gomez, Ana M Rios, Shahryar S Nassi, Munira Yusuf, y col. 2004. «Respiratory syncytial virus induces pneumonia, cytokine response, airway obstruction, and chronic inflammatory infiltrates associated with long-term airway hyperresponsiveness in mice.» *The Journal of infectious diseases* 189 (10): 1856-65. doi:10.1086/386372.
- Jong, M C De, W H van der Poel, J A Kramps, A Brand, y J T van Oirschot. 1996. «Quantitative investigation of population persistence and recurrent outbreaks of bovine respiratory syncytial virus on dairy farms.» *American journal of veterinary research* 57 (5): 628-33. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8723872>.
- Kalina, Warren V., Amelia R. Woolums, Roy D. Berghaus, y Laurel J. Gershwin. 2004. «Formalin-inactivated bovine RSV vaccine enhances a Th2 mediated immune response in infected cattle». *Vaccine* 22 (11-12): 1465-74.
doi:10.1016/j.vaccine.2003.10.024.
- Karron, Ruth A, Ursula J Buchholz, y Peter L Collins. 2013. «Live-attenuated respiratory syncytial virus vaccines». *Current Topics in Microbiology and Immunology* 372: 259-84. doi:10.1007/978-3-642-38919-1-13.
- Kates, J, y J Beeson. 1970. «Ribonucleic acid synthesis in vaccinia virus. II. Synthesis of polyriboadenylic acid». *Journal of Molecular Biology* 50 (1): 19-33.
doi:10.1016/0022-2836(70)90101-4.
- Kates, JR, y BR McAuslan. 1967. «Poxvirus DNA-dependent RNA polymerase.» *Proceedings of the National Academy of ...* 58: 134-41.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC335608/>.
- Kim, H W, J G Canchola, C D Brandt, G Pyles, R M Chanock, K Jensen, y R H Parrott. 1969. «Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine.» *American Journal of Epidemiology* 89 (4): 422-34.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4305198>.
- Kimman, T G, y F Westenbrink. 1990. «Immunity to human and bovine respiratory syncytial virus.» *Archives of Virology* 112 (1-2): 1-25.

- Kimman, T G, F Westenbrink, y P J Straver. 1989. «Priming for local and systemic antibody memory responses to bovine respiratory syncytial virus: Effect of amount of virus, virus replication, route of administration and maternal antibodies». *Veterinary Immunology and Immunopathology* 22 (2): 145-60. doi:10.1016/0165-2427(89)90057-3.
- Kimman, T G, G M Zimmer, F Westenbrink, J Mars, y E Van Leeuwen. 1988. «Epidemiological study of bovine respiratory syncytial virus infections in calves: influence of maternal antibodies on the outcome of disease.» *Veterinary Record* 123 (4): 104-9.
- Klem, T B, S M Gulliksen, K-I Lie, T Løken, O Østerås, y M Stokstad. 2013. «Bovine respiratory syncytial virus: infection dynamics within and between herds.» *The Veterinary record* 173 (19): 476. doi:10.1136/vr.101936.
- Kohlmann, Rebekka, Sarah Schwannecke, Bettina Tippler, Nicola Ternette, Vladimir V Temchura, Matthias Tenbusch, Klaus Uberla, y Thomas Grunwald. 2009. «Protective efficacy and immunogenicity of an adenoviral vector vaccine encoding the codon-optimized F protein of respiratory syncytial virus.» *Journal of virology* 83 (23): 12601-10. doi:10.1128/JVI.01036-09.
- Kovarcik, K. 2001. «The development and application of an indirect ELISA test for the detection of antibodies to bovine respiratory syncytial virus in blood serum». *veterinary medicine* 46 (2): 29-34.
- Lamb, R A. 1993. «Paramyxovirus fusion: a hypothesis for changes.» *Virology* 197 (1): 1-11. doi:10.1006/viro.1993.1561.
- Larsen, L E. 2000. «Bovine respiratory syncytial virus (BRSV): a review». *Acta Veterinaria Scandinavica* 41 (1): 1-24.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10920473>.
- Larsen, L E, y K Tjørnehøj. 2000. «Extensive Sequence Divergence among Bovine Respiratory Syncytial Viruses Isolated during Recurrent Outbreaks in Closed Herds». *Journal of clinical microbiology* 38 (11): 4222-27.
- Leonard, W. J. 2003. «Type 1 cytokines and interferons and their receptors.» En *Fundamental immunology*, editado por WE Pau, 5th ed., 701-47. Philadelphia, Pa.: Lippincott-Raven.
- Lerch, R a, K Anderson, y G W Wertz. 1990. «Nucleotide sequence analysis and expression from recombinant vectors demonstrate that the attachment protein G of bovine respiratory syncytial virus is distinct from that of human respiratory syncytial virus.» *Journal of virology* 64 (11): 5559-69.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1994571>.
- Letellier, C, M Boxus, L Rosar, JF Toussaint, K Walravens, S Roels, G Meyer, J

- Letesson, P Kerkhofs, y Kerkhofs Pierre. 2008. «Vaccination of calves using the BRSV nucleocapsid protein in a DNA prime-protein boost strategy stimulates cell-mediated immunity and protects the lungs against BRSV replication and pathology». *Vaccine* 26 (37): 4840-48. doi:10.1016/j.vaccine.2008.06.100.
- Lewis, P J, G J Cox, S van Drunen Littel-van den Hurk, y L A Babiuk. 1997. «Polynucleotide vaccines in animals: enhancing and modulating responses.» *Vaccine* 15 (8): 861-64. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9234534>.
- Lewis, P J, van Drunen Littel-van den Hurk, y L A Babiuk. 1999. «Altering the cellular location of an antigen expressed by a DNA-based vaccine modulates the immune response.» *Journal of virology* 73 (12): 10214-23. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10559338>.
- Lindsey, Kimberly R, Linda Gritz, Richard Sherry, Andrea Abati, Patricia A Fetsch, Lisa C Goldfeder, Monica I Gonzales, y col. 2006. «Evaluation of prime/boost regimens using recombinant poxvirus/tyrosinase vaccines for the treatment of patients with metastatic melanoma». *Clinical Cancer Research* 12 (8): 2526-27. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-2061.
- Liu, Chang, Creg J. Workman, y Dario A A Vignali. 2016. «Targeting regulatory T cells in tumors». *FEBS Journal* 283: 2731-48. doi:10.1111/febs.13656.
- Liu, Margaret a. 2010. «Immunologic basis of vaccine vectors.» *Immunity* 33 (4). Elsevier Inc.: 504-15. doi:10.1016/j.immuni.2010.10.004.
- Luzzago, Camilla, Valerio Bronzo, Stefano Salvetti, Michela Frigerio, y Nicola Ferrari. 2010. «Bovine respiratory syncytial virus seroprevalence and risk factors in endemic dairy cattle herds». *Veterinary Research Communications* 34 (1): 19-24. doi:10.1007/s11259-009-9327-z.
- Mackett, M, Geoffrey L Smith, y Bernard Moss. 1982. «Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector.» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79 (23): 7415-19. doi:10.1073/pnas.79.23.7415.
- Magro, Margarita, Vicente Mas, Keith Chappell, Mónica Vázquez, Olga Cano, Daniel Luque, María C Terrón, José A Melero, y Concepción Palomo. 2012. «Neutralizing antibodies against the preactive form of respiratory syncytial virus fusion protein offer unique possibilities for clinical intervention.» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (8): 3089-94. doi:10.1073/pnas.1115941109.
- Maidana, Silvina S, Patricia M Lomonaco, Gustavo Combessies, María I Craig, Julian Diodati, Daniela Rodriguez, Viviana Parreño, y col. 2012. «Isolation and characterization of bovine parainfluenza virus type 3 from water buffaloes

- (*Bubalus bubalis*) in Argentina.» *BMC veterinary research* 8 (1): 83.
doi:10.1186/1746-6148-8-83.
- Manchego, Alberto, Hermelinda Rivera, y Raúl Rosadio. 1998. «Seroprevalencia de Agentes Virales en Rebaño Mixto de una Comunidad Andina Peruana». *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 9 (2): 1-10.
- Mapletoft, John W, Mustapha Oumouna, Hugh G Townsend, Susantha Gomis, Lorne a Babiuk, y Sylvia van Drunen Littel-van den Hurk. 2006. «Formulation with CpG oligodeoxynucleotides increases cellular immunity and protection induced by vaccination of calves with formalin-inactivated bovine respiratory syncytial virus.» *Virology* 353 (2): 316-23. doi:10.1016/j.virol.2006.06.001.
- Mars, M. H., C. J M Brusckke, y J. T. Van Oirschot. 1999. «Airborne transmission of BHV1, BRSV, and BVDV among cattle is possible under experimental conditions». *Veterinary Microbiology* 66 (3): 197-207. doi:10.1016/S0378-1135(99)00009-7.
- Martin, S W. 1983. «Factors influencing morbidity and mortality in feedlot calves in Ontario.» *The Veterinary clinics of North America. Large animal practice* 5 (1): 73-86. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6612961>.
- Martin, S W, K G Bateman, P E Shewen, S Rosendal, y J E Bohac. 1989. «The frequency, distribution and effects of antibodies, to seven putative respiratory pathogens, on respiratory disease and weight gain in feedlot calves in Ontario.» *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche vétérinaire* 53 (3): 355-62.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1255725&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Martin, S W, y A. H. Meek. 1986a. «A path model of factors influencing morbidity and mortality in Ontario feedlot calves.» *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire* 50 (1): 15-22.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6612961>.
- Martin, S W, y A H Meek. 1986b. «A path model of factors influencing morbidity and mortality in Ontario feedlot calves.» *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire* 50 (1): 15-22.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1255152/pdf/cjvetres00061-0017.pdf>.
- Martin, S W, A H Meek, D G Davis, J A Johnson, y R A Curtis. 1982. «Factors associated with mortality and treatment costs in feedlot calves: the Bruce County Beef Project, years 1978, 1979, 1980». *Can J Comp Med* 46 (October): 341-49.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1320290/pdf/compmed00016->

- 0003.pdf.
- McConkey, Samuel J, William H H Reece, Vasee S Moorthy, Daniel Webster, Susanna Dunachie, Geoff Butcher, Jenni M Vuola, y col. 2003. «Enhanced T-cell immunogenicity of plasmid DNA vaccines boosted by recombinant modified vaccinia virus Ankara in humans». *Nature Medicine* 9 (6): 729-35. doi:10.1038/nm881.
- McInnes, E, P Sopp, C Howard, y G Taylor. 1996. «Phenotypic analysis of local responses in calves infected with bovine respiratory syncytial virus». *Immunology* 96: 396-403. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2326761/pdf/imm0096-0396.pdf>.
- McLellan, Jason S, Man Chen, M Gordon Joyce, Mallika Sastry, Guillaume B E Stewart-Jones, Yongping Yang, Baoshan Zhang, y col. 2013. «Structure-based design of a fusion glycoprotein vaccine for respiratory syncytial virus.» *Science (New York, N.Y.)* 342 (6158): 592-98. doi:10.1126/science.1243283.
- McShane, Helen. 2002. «Prime-boost immunization strategies for infectious diseases.» *Current opinion in molecular therapeutics* 4 (1): 23-27. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11883691>.
- Medico Zajac, María Paula Del, Flavia Adriana Zanetti, María Soledad Esusy, Carlos Rodolfo Federico, Osvaldo Zabal, Alejandro Rafael Valera, y Gabriela Calamante. 2017. «Induction of Both Local Immune Response in Mice and Protection in a Rabbit Model by Intranasal Immunization with Modified Vaccinia Ankara Virus Expressing a Secreted Form of Bovine Herpesvirus 1 Glycoprotein D». *Viral Immunology* 30: 70-76. doi:10.1089/vim.2016.0090.
- Meeusen, Els N T, John Walker, Andrew Peters, Paul Pierre Pastoret, y Gregers Jungersen. 2007. «Current status of veterinary vaccines». *Clinical Microbiology Reviews*. doi:10.1128/CMR.00005-07.
- Melero, José A., y Vicente Mas. 2015. «The Pneumovirinae fusion (F) protein: A common target for vaccines and antivirals». *Virus Research* 209. Elsevier B.V.: 128-35. doi:10.1016/j.virusres.2015.02.024.
- Men, R, L Wyatt, I Tokimatsu, S Arakaki, G Shameem, R Elkins, R Chanock, B Moss, y C J Lai. 2000. «Immunization of rhesus monkeys with a recombinant of modified vaccinia virus Ankara expressing a truncated envelope glycoprotein of dengue type 2 virus induced resistance to dengue type 2 virus challenge.» *Vaccine* 18 (27): 3113-22. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10856791>.
- Meyer, Gilles, Martine Deplanche, y François Schelcher. 2008. «Human and bovine respiratory syncytial virus vaccine research and development.» *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* 31 (2-3): 191-225.

- doi:10.1016/j.cimid.2007.07.008.
- Meyer, H, y Paul-Ehrlich. 2013. «Summary report on first , second and third generation smallpox vaccines». *WHO Report*, n.º August: 33.
http://www.who.int/immunization/sage/meetings/2013/november/2%7B_%7Dsmallpox%7B_%7Dvaccine%7B_%7Dreview%7B_%7Dupdated%7B_%7D11%7B_%7D10%7B_%7D13.pdf.
- Morrison, Trudy G., y Edward E. Walsh. 2013. «Subunit and Virus-Like Particle Vaccine Approaches for Respiratory Syncytial Virus». En , 285-306.
doi:10.1007/978-3-642-38919-1_14.
- Moss, Bernard. 1996. «Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety.» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (21): 11341-48.
doi:10.1073/pnas.93.21.11341.
- . 2013. «Reflections on the early development of poxvirus vectors». *Vaccine* 31 (39). Elsevier Ltd: 4220-22. doi:10.1016/j.vaccine.2013.03.042.
- Mozgovoij, Marina V., Alejandra Ferella, Jose A Margineda, Carlos Wigdorovitz, Andres Martinez Escribano, y Maria Jose José Dus Santos. 2013. «OBTENCIÓN DE UNA VACUNA A SUBUNIDAD PARA EL VIRUS RESPIRATORIO SINCICIAL BOVINO DIRECCIONADA A CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENO.» *Encuentro para Latinoamérica y el Caribe de Biotecnología REDBIO Argentina 2013*.
- Muneta, Yoshihiro, Kazuhiro Yoshihara, Yu Minagawa, Reiko Nagata, Mori Yasuyuki, Takahiro Yamaguchi, y Kazuaki Takehara. 2005. «Bovine IL-18 ELISA: detection of IL-18 in sera of pregnant cow and newborn calf, and in colostrum.» *Journal of immunoassay & immunochemistry* 26 (3): 203-13. doi:10.1081/IAS-200062487.
- Munseri, Patricia J, Arne Kroidl, Charlotta Nilsson, Agricola Joachim, Christof Geldmacher, Philipp Mann, Candida Moshiro, y col. 2015. «Priming with a simplified intradermal HIV-1 DNA vaccine regimen followed by boosting with recombinant HIV-1 MVA vaccine is safe and immunogenic: A phase IIa randomized clinical trial». *PLoS ONE* 10 (4). doi:10.1371/journal.pone.0119629.
- Munyon, William, Enzo Paoletti, y James T Grace. 1967. «RNA polymerase activity in purified infectious vaccinia virus.» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 58 (6): 2280-87.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/164186>.
- Murphy, B R, A Sotnikov, P R Paradiso, S W Hildreth, A B Jenson, R B Baggs, L Lawrence, J J Zubak, R M Chanock, y J A Beeler. 1989. «Immunization of cotton rats with the fusion (F) and large (G) glycoproteins of respiratory syncytial virus

- (RSV) protects against RSV challenge without potentiating RSV disease.» *Vaccine* 7 (6): 533-40. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2692334>.
- Najjar, Farah El, Anthony P. Schmitt, y Rebecca Ellis Dutch. 2014. «Paramyxovirus glycoprotein incorporation, assembly and budding: A three way dance for infectious particle production». *Viruses* 6 (8): 3019-54. doi:10.3390/v6083019.
- National Library of Medicine, y National Institute of Health. 2017. «Clinical Trials». <https://clinicaltrials.gov/>.
- Obando, C, C Baule, C Pedrique, C Veracierta, S Belák, M Merza, y J Moreno-Lopez. 1999. «Serological and molecular diagnosis of bovine viral diarrhoea virus and evidence of other viral infections in dairy calves with respiratory disease in Venezuela.» *Acta veterinaria Scandinavica* 40 (3): 253-62. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10605142>.
- Oberst, R D, M P Hays, J F Evermann, y C L Kelling. 1993. «Characteristic differences in reverse transcription-polymerase chain reaction products of ovine, bovine, and human respiratory syncytial viruses.» *Journal of veterinary diagnostic investigation official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians Inc* 5 (3): 322-28. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8373845>.
- Odeón, A C O, E J A S Páth, E J P Aloma, M R L Eunda, y I J F Hernández S Ainz. 2001. «Seroprevalencia de la Diarrea Viral Bovina , Herpesvirus Bovino y Virus Sincicial Respiratorio en Argentina». *Revista de Medicina Veterinaria* 82 (4): 216-20.
- Ogra, P L, Howard Faden, y R C Welliver. 2001. «Vaccination strategies for mucosal immune responses». *Clin. Microbiol. Rev* 14 (2): 430-45. doi:10.1128/cmr.14.2.430-445.2001.
- Ohlson, A, S Alenius, M Tråvén, y U Emanuelson. 2013. «A longitudinal study of the dynamics of bovine corona virus and respiratory syncytial virus infections in dairy herds». *The Veterinary Journal* 197 (2). Elsevier Ltd: 395-400. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.01.028>.
- Ohlson, Anna, Ulf Emanuelson, Madeleine Tråvén, y Stefan Alenius. 2010. «The relationship between antibody status to bovine corona virus and bovine respiratory syncytial virus and disease incidence, reproduction and herd characteristics in dairy herds.» *Acta veterinaria Scandinavica* 52 (enero): 37. doi:10.1186/1751-0147-52-37.
- Okamura, H, H Tsutsui, T Komatsu, M Yutsudo, A Hakura, T Tanimoto, K Torigoe, y col. 1995. «Cloning of a new cytokine that induces IFN- γ production by T cells». *Nature* 378 (6555): 767-68. doi:10.1038/378088a0.
- Olmsted, R A, N Elango, G A Prince, B R Murphy, P R Johnson, B Moss, R M

- Chanock, y P L Collins. 1986. «Expression of the F glycoprotein of respiratory syncytial virus by a recombinant vaccinia virus: comparison of the individual contributions of the F and G glycoproteins to host immunity.» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (19): 7462-66. doi:10.1073/pnas.83.19.7462.
- Olszewska, Wieslawa, Yasemin Suezter, Gerd Sutter, y Peter J M Openshaw. 2004. «Protective and disease-enhancing immune responses induced by recombinant modified vaccinia Ankara (MVA) expressing respiratory syncytial virus proteins.» *Vaccine* 23 (2): 215-21. doi:10.1016/j.vaccine.2004.05.015.
- Oumouna, M, B C Karvonen, y L A Babiuk. 2005. «Formulation with CpG Oligodeoxynucleotides Prevents Induction of Pulmonary Immunopathology following Priming with Formalin-Inactivated or Commercial Killed Bovine Respiratory Syncytial Virus Vaccine». *Journal of virology* 79 (4): 2024-32. doi:10.1128/JVI.79.4.2024.
- Paccaud, M F, y C Jacquier. 1970. «A respiratory syncytial virus of bovine origin.» *Archiv fur die gesamte Virusforschung* 30 (4): 327-42. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4195627>.
- Panicali, D, y E Paoletti. 1992. «Construction of poxviruses as cloning vectors: insertion of the thymidine kinase gene from herpes simplex virus into the DNA of infectious vaccinia virus. 1982 [classical article]». *Biotechnology* 24 (0740-7378 SB-M): 503-7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1422062>.
- Paoletti, E, B R Lipinkas, C Samsonoff, S Mercer, y D Panicali. 1984. «Construction of live vaccines using genetically engineered poxviruses: biological activity of vaccinia virus recombinants expressing the hepatitis B virus surface antigen and the herpes simplex virus glycoprotein D.» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81 (1): 193-97. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6320164>.
- Pardon, B, K De Bleecker, J Dewulf, J Callens, F Boyen, B Catry, y P Deprez. 2011. «Prevalence of respiratory pathogens in diseased, non-vaccinated, routinely medicated veal calves.» *The Veterinary record* 169 (11): 278. doi:10.1136/vr.d4406.
- Park, E K, B Y Soh, Y S Jang, J H Park, y G H Chung. 2001. «Immune induction and modulation in mice following immunization with DNA encoding F protein of respiratory syncytial virus». *Molecules and Cells* 12 (1): 50-56.
- Pastey, M, y S Samal. 1993. «Structure and sequence comparison of bovine respiratory syncytial virus fusion protein». *Virus Research* 29: 195-202.
- Pastoret, P-P, y a Vanderplasschen. 2003. «Poxviruses as vaccine vectors.»

- Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* 26 (5-6): 343-55.
doi:10.1016/S0147-9571(03)00019-5.
- Paton, D J, K H Christiansen, S Alenius, M P Cranwell, G C Pritchard, y T W Drew. 1998. «Prevalence of antibodies to bovine virus diarrhoea virus and other viruses in bulk tank milk in England and Wales». *Vet Rec.* 142 (15): 385-91.
doi:10.1136/vr.142.15.385.
- Pierantoni, Angiolo, Maria Luisa Esposito, Virginia Ammendola, Federico Napolitano, Fabiana Grazioli, Adele Abbate, Mariarosaria Del Sorbo, y col. 2015. «Mucosal delivery of a vectored RSV vaccine is safe and elicits protective immunity in rodents and nonhuman primates.» *Molecular therapy. Methods & clinical development* 2 (February): 15018. doi:10.1038/mtm.2015.18.
- Poel, W. H. M. Van der, J. P. M. Langedijk, J. A. Kramps, W. G. J. Middel, A. Brand, y J. T. Van Oirschot. 1995. «Bovine respiratory syncytial virus antibodies in non-bovine species». *Archives of Virology* 140 (9): 1549-55. doi:10.1007/BF01322529.
- Poel, W.H.M. van der, M.C.M. Mourits, M. Nielen, K. Frankena, J.T. Van Oirschot, y Y.H. Schukken. 1995. «Bovine respiratory syncytial virus reinfections and decreased milk yield in dairy cattle». *Veterinary Quarterly* 17 (3): 77-81.
doi:10.1080/01652176.1995.9694537.
- Poel, W H M V Van Der, J A Kramps, W G Middel, J T Van Oirschot, y A Brand. 1993. «Dynamics of bovine respiratory syncytial virus infections: a longitudinal epidemiological study in dairy herds». *Archives of Virology* 133: 309-21.
doi:10.1007/BF01313771.
- Poel, W H Van der, J P Langedijk, J A Kramps, W G Middel, A Brand, y J T Van Oirschot. 1995. «Bovine respiratory syncytial virus antibodies in non-bovine species.» *Archives of virology* 140 (9): 1549-55.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7487487>.
- Poel, W H Van Der, J.A. Oirschot., y Kramps. J.T. Van. 1994. «Respiratory syncytial virus infections in human beings and in cattle». *journal of infection*, 215-28.
- Pordomingo, A. 2004. «ENGORDE A CORRAL». *ENGORDE A CORRAL*. Vol. 1.
www.produccion-animal.com.ar.
- Porter, David W, Fiona M Thompson, Tamara K Berthoud, Claire L Hutchings, Laura Andrews, Sumi Biswas, Ian Poulton, y col. 2011. «A human Phase I/IIa malaria challenge trial of a polyprotein malaria vaccine.» *Vaccine* 29 (43): 7514-22.
doi:10.1016/j.vaccine.2011.03.083.
- Post, Leonard E, B Norrild, Terry Simpson, y Bernard Roizmani. 1982. «Chicken Ovalbumin Gene Fused to a Herpes Simplex Virus ot Promoter and Linked to a Thymidine Kinase Gene Is Regulated Like a Viral Gene». *MOLECULAR AND*

- CELLULAR BIOLOGY 2 (3): 233-40.
- Poulet, Hervé, Jules Minke, Maria Camila Pardo, Véronique Juillard, Bob Nordgren, y Jean-Christophe Audonnet. 2007. «Development and registration of recombinant veterinary vaccines. The example of the canarypox vector platform.» *Vaccine* 25 (30): 5606-12. doi:10.1016/j.vaccine.2006.11.066.
- Raaperi, Kerli, Stephanie Bougeard, Anneli Aleksejev, Toomas Orro, y Arvo Viltrop. 2012. «Association of herd BRSV and BHV-1 seroprevalence with respiratory disease and reproductive performance in adult dairy cattle». *Acta Veterinaria Scandinavica* 54 (54): 4. doi:10.1186/1751-0147-54-4.
- Ramirez, J. C., D. Finke, Mariano Esteban, J. P. Kraehenbuhl, y H. Acha-Orbea. 2003. «Tissue distribution of the Ankara strain of vaccinia virus (MVA) after mucosal or systemic administration». *Archives of Virology* 148 (5): 827-39. doi:10.1007/s00705-003-0006-z.
- Ramírez, J C, M Magdalena Gherardi, y Mariano Esteban. 2000. «Biology of attenuated modified vaccinia virus Ankara recombinant vector in mice: virus fate and activation of B- and T-cell immune responses in comparison with the Western Reserve strain and advantages as a vaccine.» *Journal of virology* 74 (2): 923-33. doi:10.1128/JVI.74.2.923-933.2000.
- Ramsay, Alistair J, Stephen J Kent, Richard A Strugnell, Andreas Suhrbier, Scott A Thomson, y Ian A Ramshaw. 1999. «Genetic vaccination strategies for enhanced cellular, humoral and mucosal immunity». *Immunological Reviews*. doi:10.1111/j.1600-065X.1999.tb01341.x.
- Reed, L J, y H Muench. 1938. «A simple method of estimating fifty percent end points». *The American Journal of Hygiene* 27: 493-97.
- Reyes-Sandoval, Arturo, Tamara Berthoud, Nicola Alder, Loredana Siani, Sarah C Gilbert, Alfredo Nicosia, Stefano Colloca, Riccardo Cortese, y Adrian V S Hill. 2010. «Prime-boost immunization with adenoviral and modified vaccinia virus Ankara vectors enhances the durability and polyfunctionality of protective malaria CD8+ T-cell responses». *Infection and Immunity* 78 (1): 145-53. doi:10.1128/IAI.00740-09.
- Rivera, H, B R Madewell, y E Ameghino. 1987. «Serologic survey of viral antibodies in the Peruvian alpaca (Lama pacos).» *American journal of veterinary research* 48 (2): 189-91. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3826854>.
- Robert, Sergio, Federico Santangelo, Ignacio Albornoz, y Gastón Dana. 2009. «Estructura del feedlot en Argentina - Nivel de asociación entre la producción bovina a corral y los titulares de faena ».
- Rodriguez, Ariane, y Angélique Lemckert. 2009. «Heterologous prime – boost

- vaccinations for poverty- related diseases : advantages and future prospects». *Expert reviews*, 577-92.
- Roellig, Dawn M, Luis A Gomez-Puerta, Daniel G Mead, Jesus Pinto, Jenny Ancca-Juarez, Maritza Calderon, Caryn Bern, Robert H Gilman, y Vitaliano A Cama. 2013. «Hemi-nested PCR and RFLP methodologies for identifying blood meals of the Chagas disease vector, *Triatoma infestans*.» *PloS one* 8 (9): e74713. doi:10.1371/journal.pone.0074713.
- Rollier, Christine S, Arturo Reyes-Sandoval, Matthew G Cottingham, Katie Ewer, y Adrian V S Hill. 2011. «Viral vectors as vaccine platforms: deployment in sight.» *Current opinion in immunology* 23 (3). Elsevier Ltd: 377-82. doi:10.1016/j.coi.2011.03.006.
- Rossi, C R, y G K Kiesel. 1974. «Serological evidence for the association of bovine respiratory syncytial virus with respiratory tract disease in Alabama cattle.» *Infection and immunity* 10 (2): 293-98. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=414994&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Saa, Luis Rodrigo, Anselmo Perea, Diego Vinicio Jara, Antonio José Arenas, Ignacio Garcia-Bocanegra, Carmen Borge, y Alfonso Carbonero. 2012. «Prevalence of and risk factors for bovine respiratory syncytial virus (BRSV) infection in non-vaccinated dairy and dual-purpose cattle herds in Ecuador.» *Tropical animal health and production* 44 (7): 1423-27. doi:10.1007/s11250-012-0082-8.
- Sacco, Randy E., Jodi L. McGill, A Pillatzki, M Palmer, y M Ackermann. 2014. «Respiratory syncytial virus infection in Cattle». *Veterinary pathology*. doi:10.1177/0300985813501341.
- Sacco, Randy E, Jodi L. McGill, Mitchell V Palmer, John D Lippolis, Timothy A Reinhardt, y Brian J Nonnecke. 2012. «Neonatal calf infection with respiratory syncytial virus: Drawing parallels to the disease in human infants». *Viruses*. doi:10.3390/v4123731.
- Samal, Siba K., y Manoj K. Pastey. 1993. «Reliable Confirmation of Antibodies to Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV) by Enzime-Linked Immunosorbent Assay Using BRSV Nucleocapsid Protein Expressed in Insect Cells». *Journal of Clinical Microbiology* 31 (12): 3147-52.
- Sánchez-Sampedro, Lucas, Beatriz Perdiguero, Ernesto Mejías-Pérez, Juan García-Arriaza, Mauro Di Pilato, Mariano Esteban, Elliot J Lefkowitz, y Chris Upton. 2015. «The Evolution of Poxvirus Vaccines». *Viruses* 7: 1726-1803. doi:10.3390/v7041726.
- Santra, Sampa, Yue Sun, Jenny G Parvani, Valerie Philippon, Michael S Wyand,

- Kelley Manson, Alicia Gomez-Yafal, y col. 2007. «Heterologous prime/boost immunization of rhesus monkeys by using diverse poxvirus vectors.» *Journal of virology* 81 (16): 8563-70. doi:10.1128/JVI.00744-07.
- Sarmiento-Silva, Rosa Elena, Yuko Nakamura-Lopez, y Gilberto Vaughan. 2012. «Epidemiology, molecular epidemiology and evolution of bovine respiratory syncytial virus». *Viruses* 4 (12): 3452-67. doi:10.3390/v4123452.
- Sausker, Elizabeth A., y Neil W. Dyer. 2002. «Seroprevalence of OHV-2, BVDV, BHV-1, and BRSV in Ranch-Raised Bison (*Bison Bison*)». *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 14 (1): 68-70. doi:10.1177/104063870201400115.
- Scheiflinger, F, F G Falkner, y F Dorner. 1996. «Evaluation of the thymidine kinase (tk) locus as an insertion site in the highly attenuated vaccinia MVA strain.» *Archives of virology* 141 (3-4): 663-69. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8645102>.
- Schlender, J, B Bossert, U Buchholz, y K Conzelmann. 2000. «Bovine respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 cooperatively antagonize alpha/beta interferon-induced antiviral response». *Journal of virology* 74 (18): 8234-42. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC116331/pdf/jv008234.pdf>.
- Schneider, M. J., R. G. Tait, W. D. Busby, y J. M. Reecy. 2009. «An evaluation of bovine respiratory disease complex in feedlot cattle: Impact on performance and carcass traits using treatment records and lung lesion scores». *Journal of Animal Science* 87 (5): 1821-27. doi:10.2527/jas.2008-1283.
- Schreiber, P, J P Matheise, F Dessy, M Heimann, J J Letesson, P Coppe, y a Collard. 2000. «High mortality rate associated with bovine respiratory syncytial virus (BRSV) infection in Belgian white blue calves previously vaccinated with an inactivated BRSV vaccine.» *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health* 47 (7): 535-50. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11048435>.
- Schrijver, R S, J P Langedijk, W H van der Poel, W G Middel, J a Kramps, y J T van Oirschot. 1996. «Antibody responses against the G and F proteins of bovine respiratory syncytial virus after experimental and natural infections.» *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 3 (5): 500-506. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=170396&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Seaman, Michael S., Marissa B. Wilck, Lindsey R. Baden, Stephen R. Walsh, Lauren E. Grandpre, Colleen Devoy, Ayush Giri, y col. 2010. «Effect of Vaccination with Modified Vaccinia Ankara (ACAM3000) on Subsequent Challenge with Dryvax». *The Journal of Infectious Diseases* 201 (9): 1353-60. doi:10.1086/651560.

- SENASA. 2017. «INFORMES Y ESTADÍSTICAS | SENASA». <http://www.senasa.gob.ar/cadena-animal/bovinos-y-bubalinos/informacion/informes-y-estadisticas>.
- Shahriari, Shadi, James Gordon, y Reena Ghildyal. 2016. «Host cytoskeleton in respiratory syncytial virus assembly and budding». *Virology Journal*. *Virology Journal*, 1-11. doi:10.1186/s12985-016-0618-z.
- Shoda, L K, Dante S. Zarlenga, Ayumi Hirano, y Wendy C. Brown. 1999. «Cloning of a cDNA encoding bovine interleukin-18 and analysis of IL-18 expression in macrophages and its IFN-gamma-inducing activity». *J Interferon Cytokine Res* 19 (10): 1169-77. doi:10.1089/107999099313118.
- Singh, Shree R, Vida A Dennis, Christina L Carter, Shreekumar R Pillai, Ayanna Jefferson, Shivendra V Sahi, y Eddie G Moore. 2007. «Immunogenicity and efficacy of recombinant RSV-F vaccine in a mouse model». *Vaccine* 25 (33): 6211-23. doi:10.1016/j.vaccine.2007.05.068.
- Smith, M. H., M. L. Frey, y R. E. Dierks. 1975. «Isolation, characterization, and pathogenicity studies of a bovine respiratory syncytial virus». *Archives of Virology* 47 (3). Springer-Verlag: 237-47. doi:10.1007/BF01317811.
- Snowder, G.G. 2006. «Bovine respiratory disease in feedlot cattle: environmental, genetic and economic factors». *American Society of Animal Science* 84: 1999-2008. http://digitalcommons.unl.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1124&context=animalsci_facpub.
- Staib, Caroline, Ingo Drexler, y Gerd Sutter. 2004. «Construction and isolation of recombinant MVA.» *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 269. Totowa, NJ: Humana Press: 77-100. doi:10.1385/1-59259-789-0:077.
- Staib, Caroline, Sigrid Kisling, Volker Erfle, y Gerd Sutter. 2005. «Inactivation of the viral interleukin 1b receptor improves CD8+ T-cell memory responses elicited upon immunization with modified vaccinia virus Ankara». *Journal of General Virology* 86 (7): 1997-2006. doi:10.1099/vir.0.80646-0.
- Step, D. L., C. R. Krehbiel, H. A. DePra, J. J. Cranston, R. W. Fulton, J. G. Kirkpatrick, D. R. Gill, M. E. Payton, M. A. Montelongo, y A. W. Confer. 2008. «Effects of commingling beef calves from different sources and weaning protocols during a forty-two-day receiving period on performance and bovine respiratory disease». *Journal of Animal Science* 86 (11): 3146-58. doi:10.2527/jas.2008-0883.
- Stine, L C, D K Hoppe, y C L Kelling. 1997. «Sequence conservation in the attachment glycoprotein and antigenic diversity among bovine respiratory syncytial virus isolates.» *Veterinary microbiology* 54 (3-4): 201-21.

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9100323>.
- Stittelaar, K J, T Kuiken, R L de Swart, G van Amerongen, H W Vos, H G Niesters, P van Schalkwijk, y col. 2001. «Safety of modified vaccinia virus Ankara (MVA) in immune-suppressed macaques.» *Vaccine* 19 (27): 3700-3709.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11395204>.
- Stober, Carmel B, Uta G Lange, Mark T M Roberts, Antonio Alcami, y Jenefer M Blackwell. 2007. «Heterologous priming-boosting with DNA and modified vaccinia virus Ankara expressing trypanothione peroxidase promotes long-term memory against *Leishmania major* in susceptible BALB/c Mice.» *Infection and immunity* 75 (2): 852-60. doi:10.1128/IAI.01490-06.
- Stokka, Gerald L. 2010. «Prevention of respiratory disease in cow/calf operations.» *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* 26 (2): 229-41.
doi:10.1016/j.cvfa.2010.04.002.
- Stott, E J, L H Thomas, A P Collins, S Crouch, J Jebbett, G S Smith, P D Luther, y R Caswell. 1980. «A survey of virus infections of the respiratory tract of cattle and their association with disease.» *J Hyg (Lond)* 85 (2): 257-70.
doi:10.1017/S0022172400063294.
- Sutter, G, y Bernard Moss. 1992. «Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes.» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (22): 10847-51. doi:10.1073/pnas.89.22.10847.
- Sutter, Gerd, y Caroline Staib. 2003. «Vaccinia vectors as candidate vaccines: the development of modified vaccinia virus Ankara for antigen delivery.» *Current drug targets. Infectious disorders*. doi:10.2174/1568005033481123.
- Tameris, Michele D, Mark Hatherill, Bernard S Landry, Thomas J Scriba, Margaret Ann Snowden, Stephen Lockhart, Jacqueline E Shea, y col. 2013. «Safety and efficacy of MVA85A, a new tuberculosis vaccine, in infants previously vaccinated with BCG: a randomised, placebo-controlled phase 2b trial.» *The Lancet* 381 (9871): 1021-28. doi:10.1016/S0140-6736(13)60177-4.
- Tannock, Gregory A. 1987. «Freeze-Drying of respiratory Syncytial Viruses for Transportation and Storage.» *Journal of Clinical Microbiology* 25 (9): 1769-71.
- Tannock, Gregory A, John C Hierholzer, Deborah A Bryce, C. F. Chee, y J. A. Paul. 1987. «Freeze-drying of respiratory syncytial viruses for transportation and storage.» *Journal of Clinical Microbiology* 25 (9): 1769-71.
<http://jcm.asm.org/content/25/9/1769.full.pdf>.
- Taylor, G., F. A M Rijsewijk, L. H. Thomas, S. G. Wyld, R. M. Gaddum, R. S. Cook, W. I. Morrison, E. Hensen, J. T. Van Oirschot, y G. Keil. 1998. «Resistance to bovine respiratory syncytial virus (BRSV) induced in calves by a recombinant bovine

- herpesvirus-1 expressing the attachment glycoprotein of BRSV». *Journal of General Virology* 79 (7): 1759-67. doi:10.1099/0022-1317-79-7-1759.
- Taylor, G, E. J. Stott, M Hughes, y A.P Collins. 1984. «Respiratory syncytial virus infection in mice». *Infection and immunity* 43 (2): 649-55. doi:10.1007/BF01310552.
- Taylor, G, L H Thomas, J M Furze, R S Cook, S G Wyld, R Lerch, R Hardy, y G W Wertz. 1997. «Recombinant vaccinia viruses expressing the F, G or N, but not the M2, protein of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) induce resistance to BRSV challenge in the calf and protect against the development of pneumonic lesions.» *The Journal of general virology* 78 (diciembre): 3195-3206. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9400970>.
- Taylor, G, L H Thomas, S G Wyld, J Furze, P Sopp, y C J Howard. 1995. «Role of T-lymphocyte subsets in recovery from respiratory syncytial virus infection in calves.» *Journal of virology* 69 (11). American Society for Microbiology: 6658-64. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7474075>.
- Taylor, Geraldine, Catriona Bruce, Anthony F Barbet, Sara G Wyld, y Lewis H Thomas. 2005. «DNA vaccination against respiratory syncytial virus in young calves.» *Vaccine* 23 (10): 1242-50. doi:10.1016/j.vaccine.2004.09.005.
- Taylor, Geraldine, Michelle Thom, Stefania Capone, Angiolo Pierantoni, Efrain Guzman, Rebecca Herbert, Elisa Scarselli, y col. 2015. «Efficacy of a virus-vectored vaccine against human and bovine respiratory syncytial virus infections». *Sci Transl Med* 7 (300): 1-13.
- Taylor, J.D., R.W. Fulton, T.W. Lehenbauer, D.L. Step, y A.W. Confer. 2010a. «The epidemiology of bovine respiratory disease: What is the evidence for predisposing factors?» *The Canadian veterinary journal. La revue vétérinaire canadienne* 51: 1095-1102. doi:10.1128/CMR.16.1.79.
- . 2010b. «The epidemiology of bovine respiratory disease: What is the evidence for predisposing factors?» *The Canadian veterinary journal. La revue vétérinaire canadienne* 51 (October): 1095-1102. doi:10.1128/CMR.16.1.79.
- Tebbey, P. 2000. «Effective mucosal immunization against respiratory syncytial virus using purified F protein and a genetically detoxified cholera holotoxin, CT-E29H». *Vaccine* 18 (24): 2723-34. doi:10.1016/S0264-410X(00)00058-X.
- Thomas, L H, y E J Stott. 1984. «Virus infections in bovine respiratory disease.» *The Veterinary record* 114 (16): 411. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6328731>.
- Thomas, Lewis H, Roy S. Cook, Sara G. Wyld, Julie Furze, y Geraldine Taylor. 1998. «Passive Protection of Gnotobiotic Calves Using Monoclonal Antibodies Directed at Different Epitopes on the Fusion Protein of Bovine Respiratory Syncytial Virus».

- The Journal of infectious diseases* 177 (4): 874-80.
- Tjiam, M. Christian, James P. A. Taylor, Mazmah A. Morshidi, Lucy Sariputra, Sally Burrows, Jeffrey N. Martin, Steven G. Deeks, y col. 2015. «Viremic HIV Controllers Exhibit High Plasmacytoid Dendritic Cell–Reactive Opsonophagocytic IgG Antibody Responses against HIV-1 p24 Associated with Greater Antibody Isotype Diversification». *The Journal of Immunology* 194 (11): 5320-28. doi:10.4049/jimmunol.1402918.
- Trudel, M, F Nadon, C Simard, F Bélanger, R Alain, C Séguin, y G Lussier. 1989. «Comparison of caprine, human and bovine strains of respiratory syncytial virus.» *Archives of virology* 107 (1-2): 141-49. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2803001>.
- Tuncer, Pelin, y Kadir Yeşilbağ. 2015. «Serological detection of infection dynamics for respiratory viruses among dairy calves». *Veterinary Microbiology* 180 (3-4). Elsevier B.V.: 180-85. doi:10.1016/j.vetmic.2015.08.025.
- Uttenenthal, Åse, Lars Erik Larsen, Jens Stege Philipsen, Kirsten Tjørnehøj, Birgitte Viuff, Knud Herby Nielsen, y Thomas Krogh Nielsen. 2000. «Antibody dynamics in BRSV-infected Danish dairy herds as determined by isotype-specific immunoglobulins». *Veterinary Microbiology* 76 (4): 329-41. doi:10.1016/S0378-1135(00)00261-3.
- Valarcher, J.F., F Schelcher, y H Bourhy. 2000. «Evolution of Bovine Respiratory Syncytial Virus». *JOURNAL OF VIROLOGY* 74 (22): 10714-28. <http://jvi.asm.org/content/74/22/10714.full.pdf>.
- Valarcher, Jean-François, y Geraldine Taylor. 2007. «Bovine respiratory syncytial virus infection». *Veterinary Research* 38: 153-80. doi:10.1051/vetres.
- Varga, Steven M., Xiaoting Wang, Raymond M. Welsh, y Thomas J. Braciale. 2001. «Immunopathology in RSV infection is mediated by a discrete oligoclonal subset of antigen-specific CD4 + T cells». *Immunity* 15 (4): 637-46. doi:10.1016/S1074-7613(01)00209-6.
- Vilcek, S, M Elvander, A Ballagi-Pordány, y S Belák. 1994. «Development of nested PCR assays for detection of bovine respiratory syncytial virus in clinical samples.» *Journal of clinical microbiology* 32 (9): 2225-31. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=263972&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Virtala, A M, G D Mechor, Y T Gröhn, H N Erb, y E J Dubovi. 1996. «Epidemiologic and pathologic characteristics of respiratory tract disease in dairy heifers during the first three months of life.» *Journal of the American Veterinary Medical Association* 208 (12): 2035-42. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8707680>.

- Viuff, B., Å. Uttenthal, C. Tegtmeier, y S. Alexandersen. 1996. «Sites of Replication of Bovine Respiratory Syncytial Virus in Naturally Infected Calves as Determined by In Situ Hybridization». *Veterinary Pathology* 33 (4): 383-90.
doi:10.1177/030098589603300403.
- Viuff, Birgitte, Kirsten Tjørnehøj, Lars E Larsen, Christine M Røntved, Åse Uttenthal, Leif Rønsholt, y Soren Alexandersen. 2002. «Replication and Clearance of Respiratory Syncytial Virus». *The American journal of pathology* 161 (6).
American Society for Investigative Pathology: 2195-2207.
- Vordermeier, H Martin, Shelley G Rhodes, Gillian Dean, Nilu Goonetilleke, Kris Huygen, Adrian V S Hill, R Glyn Hewinson, y Sarah C Gilbert. 2004. «Cellular immune responses induced in cattle by heterologous prime-boost vaccination using recombinant viruses and bacille Calmette-Gu??rin». *Immunology* 112 (3): 461-70. doi:10.1111/j.1365-2567.2004.01903.x.
- Vuuren, M Van. 1990. «Serological studies of bovine respiratory syncytial virus in feedlot cattle in South Africa.» *Journal of the South African Veterinary Association* 61 (4): 168-69. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9022846>.
- Waal, Leon de, Linda S Wyatt, Selma Yüksel, Geert van Amerongen, Bernard Moss, Hubert G M Niesters, Albert D M E Osterhaus, y Rik L de Swart. 2004. «Vaccination of infant macaques with a recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing the respiratory syncytial virus F and G genes does not predispose for immunopathology.» *Vaccine* 22 (8): 923-26.
doi:10.1016/j.vaccine.2003.10.010.
- Walravens, K, R Kettmann, a Collard, P Coppe, y a Burny. 1990. «Sequence comparison between the fusion protein of human and bovine respiratory syncytial viruses.» *The Journal of general virology* 71 (Pt 12 (diciembre): 3009-14.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1703214>.
- Walther, Michael, Fiona M Thompson, Susanna Dunachie, Sheila Keating, Stephen Todryk, Tamara Berthoud, Laura Andrews, y col. 2006. «Safety, immunogenicity, and efficacy of prime-boost immunization with recombinant poxvirus FP9 and modified vaccinia virus Ankara encoding the full-length Plasmodium falciparum circumsporozoite protein». *Infection and Immunity* 74 (5): 2706-16.
doi:10.1128/IAI.74.5.2706-2716.2006.
- Webster, Daniel P, Susanna Dunachie, Jenni M Vuola, Tamara Berthoud, Sheila Keating, Stephen M Laidlaw, Samuel J McConkey, y col. 2005. «Enhanced T cell-mediated protection against malaria in human challenges by using the recombinant poxviruses FP9 and modified vaccinia virus Ankara.» *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (13): 4836-41.

- doi:10.1073/pnas.0406381102.
- Wei, C M, Marylou Gibson, Patricia G Spear, y E M Scolnick. 1981. «Construction and isolation of a transmissible retrovirus containing the src gene of Harvey murine sarcoma virus and the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1.» *Journal of virology* 39 (3): 935-44.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=171327&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Wei, C M, y Bernard Moss. 1975. «Methylated nucleotides block 5'-terminus of vaccinia virus messenger RNA.» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72 (1): 318-22. doi:10.1073/pnas.72.1.318.
- Weidinger, Gerald, Marion Ohlmann, Bernd Schlereth, Gerd Sutter, y Stefan Niewiesk. 2001. «Vaccination with recombinant modified vaccinia virus Ankara protects against measles virus infection in the mouse and cotton rat model». *Vaccine* 19 (20-22): 2764-68. doi:10.1016/S0264-410X(00)00531-4.
- West, K, L Petrie, D M Haines, C Konoby, E G Clark, K Martin, y J a Ellis. 1999. «The effect of formalin-inactivated vaccine on respiratory disease associated with bovine respiratory syncytial virus infection in calves.» *Vaccine* 17 (7-8): 809-20.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10067686>.
- Westenbrink, F, J M Brinkhof, P J Straver, J Quak, y P W De Leeuw. 1985.
«Comparison of a newly developed enzyme-linked immunosorbent assay with complement fixation and neutralisation tests for serology of bovine respiratory syncytial virus infections.» *Research in Veterinary Science* 38 (3): 334-40.
- Westenbrink, F, T G Kimman, y J M Brinkhof. 1989. «Analysis of the antibody response to bovine respiratory syncytial virus proteins in calves.» *The Journal of general virology* 70 (Pt 3) (marzo): 591-601.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2732702>.
- Weyer, Jacqueline, Charles E. Rupprecht, Janet Mans, Gerrit J. Viljoen, y Louis H. Nel. 2007. «Generation and evaluation of a recombinant modified vaccinia virus Ankara vaccine for rabies». *Vaccine* 25 (21): 4213-22.
doi:10.1016/j.vaccine.2007.02.084.
- Wilck, Marissa B., Michael S. Seaman, Lindsey R. Baden, Stephen R. Walsh, Lauren E. Grandpre, Colleen Devoy, Ayush Giri, y col. 2010. «Safety and Immunogenicity of Modified Vaccinia Ankara (ACAM3000): Effect of Dose and Route of Administration». *The Journal of Infectious Diseases* 201 (9): 1361-70.
doi:10.1086/651561.
- Woldemeskel, M, E Kebede, L Yigezu, y L N Potgieter. 2000. «Prevalence of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) and bovine herpesvirus-4 (BHV-4) in cattle from

- Ethiopia.» *DTW. Deutsche tierärztliche Wochenschrift* 107 (11): 464-66.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11153233>.
- Woolums, A R, R S Singer, G A Boyle, y L J Gershwin. 1999. «Interferon gamma production during bovine respiratory syncytial virus (BRSV) infection is diminished in calves vaccinated with formalin-inactivated BRSV.» *Vaccine* 17 (11-12): 1293-97. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10195762>.
- Wu, Hongzhuan, Vida A. Dennis, Shreekumar R. Pillai, y Shree R. Singh. 2009. «RSV fusion (F) protein DNA vaccine provides partial protection against viral infection». *Virus Research* 145 (1): 39-47. doi:10.1016/j.virusres.2009.06.012.
- Wubbel, L, H S Jafri, K Olsen, S Shelton, B Barton Rogers, G Gambill, P Patel, E Keyser, G Cassell, y G H McCracken. 1998. «Mycoplasma pneumoniae pneumonia in a mouse model.» *The Journal of infectious diseases* 178 (5): 1526-29. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9780280>.
- Wyatt, L S, S S Whitehead, K a Venanzi, B R Murphy, y B Moss. 2000. «Priming and boosting immunity to respiratory syncytial virus by recombinant replication-defective vaccinia virus MVA.» *Vaccine* 18 (5-6): 392-97.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10519927>.
- Yendo, Anna Carolina A., Fernanda de Costa, Samuel P. Cibulski, Thais F. Teixeira, Luana C. Colling, Mauricio Mastrogiovanni, Silvia Soulé, y col. 2016. «A rabies vaccine adjuvanted with saponins from leaves of the soap tree (Quillaja brasiliensis) induces specific immune responses and protects against lethal challenge». *Vaccine* 34 (20): 2305-11. doi:10.1016/j.vaccine.2016.03.070.
- Yeşilbağ, Kadir, y Burak Güngör. 2008. «Seroprevalence of bovine respiratory viruses in North-Western Turkey». *Tropical Animal Health and Production* 40 (1): 55-60. doi:10.1007/s11250-007-9053-x.
- Yoshimoto, T, K Takeda, T Tanaka, K Ohkusu, S Kashiwamura, H Okamura, S Akira, y K Nakanishi. 1998. «IL-12 Up-Regulates IL-18 Receptor Expression on T Cells, Th1 Cells, and B Cells: Synergism with IL-18 for IFN- γ Production». *The Journal of Immunology* 161 (7): 3400-3407.
<http://www.jimmunol.org/content/161/7/3400.abstract>.
- Zavala, Fidel, Mauricio Rodrigues, Dolores Rodriguez, J R Rodriguez, Ruth S Nussenzweig, y Mariano Esteban. 2001. «A striking property of recombinant poxviruses: efficient inducers of in vivo expansion of primed CD8(+) T cells.» *Virology* 280 (2): 155-59. doi:10.1006/viro.2000.0792.

ANEXO: Infección experimental con BRSV en ratones

1. Implementación del protocolo de infección experimental con BRSV en el modelo murino

1.1 Producción del *stock* viral de BRSV

La producción del BRSV para los ensayos de infección experimental en ratones BALB/c se llevó a cabo mediante el protocolo de concentración de virus por precipitación con polietilenglicol (PEG) 6000 según Gias y colaboradores (Gias y Nielsen 2008).

Brevemente, monocapas de células MDBK se infectaron como se describió en el apartado 2.1.2 de materiales y métodos del capítulo 1. La suspensión de virus clarificado se llevó a una concentración final de MgSO_4 100 mM y Tris-HCl 50 mM (pH 7,5). Una alícuota se conservó a -70°C para determinar el título viral inicial. Posteriormente, se agregó PEG 6000 (50 % p/v) preparado en *buffer* NT (NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,5) hasta obtener una concentración final de 10 % (v/v). Para favorecer la precipitación del virus se incubó durante 90 min a 4°C con agitación moderada y luego se centrifugó a $3250 \times g$ durante 20 min a 4°C . El sobrenadante se descartó y el *pellet* se resuspendió en un volumen de *buffer* NT frío igual al 2 % del volumen inicial de virus empleado.

Como control negativo se realizó el mismo procedimiento con células MDBK sin infectar (*mock*). Se tomó una alícuota para determinar el título viral final y se congeló a -70°C hasta su utilización.

La alícuota se tituló como se describió en la sección de materiales y métodos del capítulo 1 (2.2). Se obtuvo un stock viral de 10^6 DICT50/ml.

1.2 Protocolo de infección viral

Con el propósito de implementar un modelo de desafío con BRSV para evaluar el candidato vacunal obtenido en este trabajo de tesis, se implementó el protocolo de infección experimental de ratones con BRSV y se establecieron los parámetros histopatológicos que correlacionaron con dicha infección. Esta actividad se realizó en colaboración con el grupo de Patología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de La Plata (Vet. Nicolás.Streitenberger).

Se evaluaron distintas dosis de BRSV y el tiempo óptimo de sacrificio que permitiera observar daño histopatológico cuantificable en los tejidos blanco del virus y detectar la presencia de BRSV en pulmón.

Brevemente, se administraron 50 μl de BRSV por vía i.n. (5×10^3 o 5×10^4 DICT50). A distintos tiempos (4, 5 o 7 días) los animales se sacrificaron, se procedió a la apertura del tórax y posterior extracción de ambos pulmones para evaluar las lesiones histopatológicas

generadas por la infección con BRSV y para detectar la presencia del virus (titulación viral y/o detección del genoma viral por RT-nPCR). Uno de los pulmones se colocó en un tubo conteniendo formol neutro (formaldehído 37-40%, 4,5 g/l de fosfato de sodio monobásico anhidro y 6,5 g/l de fosfato de sodio dibásico anhidro) en un volumen por lo menos 10 veces mayor que el volumen del pulmón, durante 24-48 h. Una vez producida la fijación del tejido, se lo conservó en etanol 70%, en un volumen suficiente para cubrir la muestra hasta su evaluación. El otro pulmón se colocó en criotubos (*Corning*) y se conservó a -70°C hasta su procesamiento para la cuantificación del título viral de BRSV (ver punto 2.2 de materiales y métodos del capítulo 1).

1.3 Análisis y score histopatológico

Las muestras de pulmón fijadas en solución de formalina neutra al 10 % y conservadas en etanol 70% fueron posteriormente deshidratadas mediante pasajes en alcoholes de graduación decreciente y, luego, dos pasajes en xilol. A posteriori, el material se incluyó en parafina y se realizaron cortes finos de 3 µm utilizando un micrótopo de deslizamiento. Los cortes obtenidos se montaron en portaobjetos de vidrio y luego se desparafinaron mediante pasajes en alcoholes de graduación decreciente y se rehidrataron con agua destilada. Para su coloración, los preparados fueron inmersos en Hematoxilina de Gill (Hematoxilina “activada”, Biopur) durante 3 min y luego en agua corriente para el viraje del colorante. Posteriormente fueron sumergidos en eosina amarilla en solución acuosa (Eosina Amarilla, Biopur) durante 1 min. Por último, se deshidrataron y se montaron con bálsamo de Canadá para su visualización con microscopio óptico.

Los pulmones se evaluaron microscópicamente, haciendo hincapié en la detección de infiltrado y exudado inflamatorio. La gravedad de lesión fue graduada de acuerdo al esquema descrito por Cimolai y colaboradores, con un score de lesión de 0 a 26 (Cimolai y col. 1992).

El análisis del score se realizó teniendo en cuenta 5 categorías:

- A- Infiltrado peribronquial/ peribronquiolar (0-1-2-3).
- B- Calidad del Infiltrado peribronquial/ peribronquiolar (0-1-2-3).
- C- Exudado en la luz de bronquios/bronquiolos (0-1-2).
- D- Infiltrado perivascular (0-1-2-3).
- E- Pnevmonía del parénquima (0-3-5).

A-Infiltrado peribronquial/ peribronquiolar (%: 0-1-2-3)	0- ninguno
	1- poco (< 25 %)
	2- muchos (25 - 75 %)
	3- todos (> 75 %)
B-Cualidad del Infiltrado peribronquial/ peribronquiolar (0-1-2-3)	0- ninguno
	1- poco
	2- moderado
	3- extenso
C-Exudado en la luz de bronquios/bronquiolos	0- ninguno
	1- mínimo
	2- mucho
D-Infiltrado perivascular (%: 0-1-2-3)*	0- ninguno
	1- poco (< 10 %)
	2- muchos (10 - 50 %)
	3- mayoría (> 50 %)
E-Pneumonía del parénquima (0-3-5)	0- ninguna
	3- mínima
	5- intensa
PAS	Negativo/positivo
SCORE TOTAL: A+3(media B + media C)+D+E	

Tabla A1. Sistema de score histopatológico. según Cimolai y col. (1992)

Este sistema de puntos ha sido validado en otros modelos en ratón, para enfermedad respiratoria causada por RSV y otras enfermedades respiratorias (Jafri y col. 2004; R. Hardy y col. 2001; R. D. Hardy y col. 2002; R. D. Hardy y col. 2003; Wubbel y col. 1998). El sistema de score numérico (de 0 a 26) final se obtuvo a través de la siguiente fórmula:

$$Score\ Total = A + 3 (media\ B + media\ C) + D + E$$

Para la valoración del exudado catarral en luz bronquial/bronquiolar y cuantificación de células productoras de mucus en la pared bronquiolar se realizó la tinción de ácido periódico de Schiff (PAS). Se utilizó la siguiente graduación:

-: Ausencia de exudado y de células PAS positivo en luz y epitelio bronquiolar respectivamente.

+: Escasa cantidad de células PAS positivo en epitelio bronquiolar.

++: Escasa/ moderada cantidad de células PAS positivo en epitelio bronquiolar con exudado catarral PAS positivo que ocluye menos del 25% de la luz bronquiolar.

+++ : Gran cantidad de células PAS positivo en epitelio bronquiolar con exudado catarral PAS positivo que ocluye más del 25% de la luz bronquiolar.

1.4 Cuantificación del título viral de BRSV en pulmón

Los pulmones conservados a -70°C se descongelaron y procesaron de manera similar a la descrita en el apartado 2.4.1.1 de materiales y métodos del capítulo 1.

Los sobrenadantes conteniendo las suspensiones virales se titularon en monocapas de células MDBK, empleando la metodología descrita previamente (ver punto 2.2 de materiales y métodos del capítulo 1).

1.5 Detección del genoma viral en pulmón

Para determinar la presencia de genoma viral en pulmones, se llevó a cabo el macerado de los mismos de manera similar a la descrita en el punto 2.4.1.1 de la sección de materiales y métodos del capítulo 1, utilizando, en este caso, el mismo macerado del pulmón procesado para la cuantificación del título viral. Luego, se realizó la extracción de ARN total y la amplificación por RT-PCR del gen F de BRSV tal como se describió en el punto 2.5 de materiales y métodos del capítulo 1.

1.6 Determinación del tiempo de sacrificio y concentración viral óptima para el desafío con BRSV

1.6.1 Experimento n°A1

Se utilizaron grupos de 5 ratones, inoculados por vía i.n como se detalla a continuación:

Grupo experimental (n=5)	Inóculo	Dosis BRSV
1	<i>mock</i>	-
2	BRSV	5×10^3 DICT50
3	BRSV	5×10^4 DICT50

Se administraron 50 μl de BRSV por vía i.n. conteniendo la dosis correspondiente. A los 7 días post desafío (dpd) los animales se sacrificaron, y se procedió a la obtención de las muestras como se describió previamente.

Los resultados obtenidos del análisis histopatológico mostraron lesiones débiles o nulas, es decir que en aquellos animales en donde se observó lesión, esta no fue significativamente distinta a lo observado en el grupo control (tabla A2).

En cuanto al análisis de la técnica de PAS, si bien en alguno de los animales de los grupos inoculados con BRSV se pudieron detectar células productoras de moco (PAS+), las diferencias respecto al grupo control tampoco resultaron ser significativas.

Es importante mencionar que en los animales de los grupos de BRSV se observó una leve respuesta en septo alveolar de células mononucleares, pero dicha lesión no fue severa ni significativa respecto del grupo *mock*.

Por otra parte, no fue posible detectar la presencia de BRSV en pulmones por ninguna de las técnicas ensayadas.

Estos resultados indican que la dosis de BRSV utilizada o el tiempo de sacrificio al cual se realizaron las mediciones no fue el adecuado para que la infección produzca daño cuantificable en los pulmones.

En este sentido, se decidió realizar un nuevo experimento de infección experimental acortando el tiempo de sacrificio post desafío y utilizando la dosis más alta evaluada en el experimento n°A1.

1.5.2 Experimento n°A2

Se utilizaron grupos de 5 ratones, inoculados por vía i.n con los siguientes antígenos:

Grupo experimental (n=5)	Inóculo	Dosis BRSV	Sacrificio
1	<i>mock</i>	-	4 dpd
2	BRSV	5 x 10 ⁴ DICT50	4 dpd
3	<i>mock</i>	-	5 dpd
4	BRSV	5 x 10 ⁴ DICT50	5 dpd
5	Sin tratar	-	5 dpd

Se administraron 50 µl de BRSV o *mock* por vía i.n. y se agregó un grupo control sin tratar (animales *naïve*). Los animales se sacrificaron a los 4 o 5 dpd y se procedió a la extracción de ambos pulmones para evaluar las lesiones histopatológicas de BRSV y cuantificar el título viral de igual manera que la mencionada en el experimento n°A1.

El objetivo de este experimento fue detectar el tiempo óptimo de sacrificio de manera tal de encontrar diferencias significativas en el daño pulmonar de los animales infectados respecto de su control. Para ello, un grupo inoculado con BRSV y uno con *mock* se sacrificó a los 4 dpd y los otros 3 grupos a los 5 dpd.

Luego de realizar el análisis histopatológico como se describió previamente, se observó que los pulmones de los animales sacrificados a los 4 dpd, no presentaron diferencias entre sí. Sin embargo, a los 5 dpd las diferencias entre el grupo control y el grupo inoculado con BRSV resultaron ser significativas, observando daño pulmonar en este último grupo (Tablas A3 y A4); (Figura A1). El grupo sin tratar no presentó daño pulmonar, validando así el ensayo.

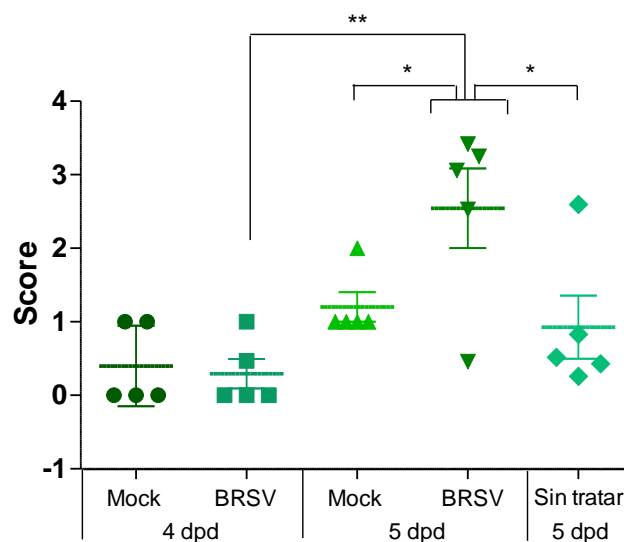


Figura A1. Score histopatológico del experimento n°A2. Se expresan los valores de score clínico según Cimolai y col. (1992) (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$. ANOVA Newman-Keuls Test)

En la figura A2 se representan ejemplos de las lesiones detectadas en los pulmones de los ratones.

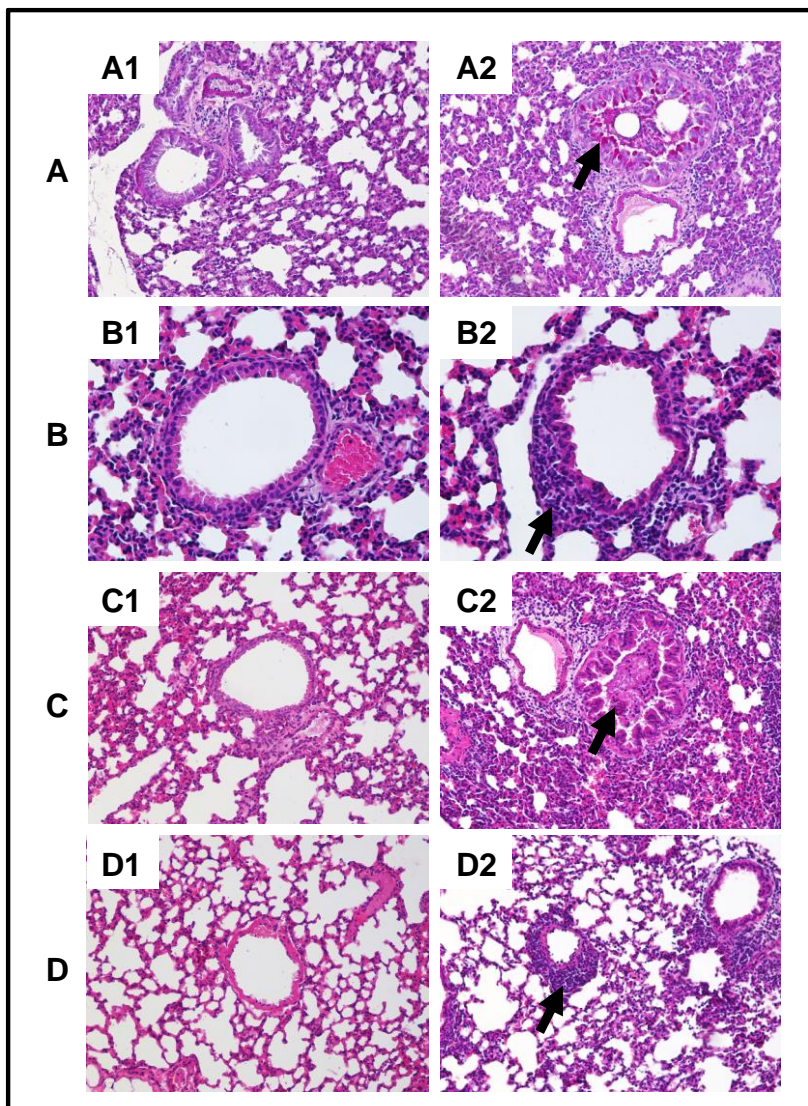


Figura A2. Categorización histopatológica de lesiones pulmonares en ratones. (A) Tinción de PAS. Obj. 20x. A1: Bronquiolos PAS negativos. Se observa además, infiltrado celular mononuclear perivascular leve; A2: Bronquiolo PAS positivo. Exudado intraluminal (flecha) y gran cantidad de células del epitelio bronquiolar PAS positivo. Complementariamente se observa infiltrado inflamatorio mononuclear perivascular y peribronquiolar leve. **(B)** Ejemplos de presencia/ausencia de infiltrado peribronquial/peribronquiolar H&E. Obj. 40x. B1: Bronquiolo y vaso sanguíneo de mediano calibre sin lesión (ausencia de exudado intraluminal e infiltrado celular peribronquiolar y perivascular); B2: presencia de Infiltrado celular mononuclear peribronquiolar leve (flecha). **(C)** Ejemplos de presencia/ausencia exudado en la luz de bronquiolos H&E. Obj. 20x: C1: Bronquiolo normal (ausencia de infiltrado peribronquiolar y exudado intraluminal). Infiltrado celular mononuclear perivascular leve; C2: Abundante exudado catarral en luz bronquiolar. Infiltrado celular mononuclear perivascular (flecha). **(D)** Ejemplos de presencia/ausencia de infiltrado perivascular H&E. Obj. 20x. D1: Pulmón sin lesión. Ausencia de infiltrado celular peribronquiolar, perivascular y exudado; D2: Marcado infiltrado perivascular mononuclear (flecha). Leve infiltrado peribronquiolar mononuclear.

Por otro lado, no fue posible detectar la presencia de BRSV en pulmones por titulación viral ni de genoma viral por RT-PCR en ninguno de los grupos del ensayo.

En base a estos resultados, se definieron las condiciones de desafío con BRSV en ratones: administración intranasal de 5×10^4 DICT50 de BRSV por ratón, sacrificio de los animales a los 5 dpd, análisis histopatológico de los pulmones, asignación de score

apropiado según el daño observado basado en lo descrito por Cimolai y colaboradores (Cimolai y col. 1992).

2. Evaluación de la protección conferida por las formulaciones vacunales frente al desafío con BRSV (correspondiente al Experimento n°3 de Resultados capítulo 2)

Con el objetivo de evaluar la protección inducida por los distintos inmunógenos en esquemas de tipo *prime-boost* heterólogo, los animales fueron desafiados con BRSV por vía i.n a los 53 días post vacunación (9 días después de la 3er dosis). Los animales recibieron una dosis de 5×10^4 DICT50 de BRSV por ratón y se sacrificaron a los 5 dpd. En ese momento, se tomaron muestras de pulmón, para realizar el análisis histopatológico correspondiente.

Como se indica en las tablas A5 y A6, se observó una alta variabilidad de *score* entre los individuos de cada grupo, por lo que los resultados no nos permiten sacar conclusiones respecto a la protección conferida por los inmunógenos frente al desafío con BRSV.

En este trabajo de tesis se implementó el protocolo de infección experimental de ratones con BRSV pero esta metodología no fue útil para evaluar la protección conferida frente al desafío viral.

	IDENTIFICACIÓN															
	Mock					BRSV (5 x 10 ³ DICT50)					BRSV (5 x 10 ⁴ DICT50)					
	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	3.1	3.2	3.3	3.4	3.5	
A-Infiltrado peribronquial/ peribronquiolar (%: 0-1-2-3)	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
B-Cualidad del Infiltrado peribronquial/ peribronquiolar (0- 1-2-3)	0	14	18	16	13	9	17	11	11	10	13	22	16	8	17	26
	1	1		1	1	1	1									
	2															
	3															
C-Exudado en la luz de bronquios/bronquiolos	0	15	18	17	13	10	17	11	10	10	13	22	16	8	17	26
	1				1		1		1							
	2															
D-Infiltrado perivascular (%: 0-1-2-3)*	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
E-Pneumonía del parénquima (0-3-5)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAS	-	-	-	débil +	-	débil +	-	+	-	débil +	-	débil +	débil +	-	0	
SCORE TOTAL: A+3(media B + media C)+D+E	1,198	0	1,174	2,426	1,03	2,33	0	1,272	0	0	1	0	0	0	0	

Tabla A2. Análisis histopatológico de los pulmones de los animales del experimento n° A1. Se expresan los valores de cada una de las variables analizadas según Cimolai y col. (1992) y el score total. *: si bien algunos animales mostraron infiltrado perivascular, el ítem D muestra solo el %.

		IDENTIFICACIÓN									
		Grupo 1: mock sacrificio 4 dpd					Grupo 2: BRSV sacrificio 4 dpd				
A-Infiltrado peribronquial/ peribronquiolar (%: 0-1-2-3)		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B-Cualidad del Infiltrado peribronquial/ peribronquiolar (0-1-2-3)	0	8	16	18	31	22	12	16	19	30	19
	1										
	2										
	3										
C-Exudado en la luz de bronquios/bronquiolo	0	8	16	18	27	22	12	16	19	30	16
	1				4						3
	2										
D-Infiltrado perivascular (%: 0-1-2-3)*		0	1	0	1	0	0	0	0	1	0
E-Pneumonía del parénquima (0-3-5)		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAS		-	débil +	débil +	débil +	débil +	débil +	débil +	débil +	débil +	débil +
SCORE TOTAL: A+3(media B + media C)+D+E		0	1	0	1	0	0	0	0	1	0,47

Tabla A3. Análisis histopatológico de los pulmones de los animales del experimento n° A2. Se expresan los valores de cada una de las variables analizadas según Cimolai y col. (1992) y el score total (parte 1). *: si bien algunos animales mostraron infiltrado perivascular, el ítem D muestra solo el %.

		IDENTIFICACIÓN														
		Grupo 3: mock sacrificio 5 dpd					Grupo 4: BRSV sacrificio 5 dpd					Grupo 5: Control sin tratar				
A-Infiltrado peribronquial/ peribronquiolar (%: 0-1-2-3)		0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0
B-Cualidad del Infiltrado peribronquial/ peribronquiolar (0-1-2-3)	0	14	15	19	35	20	13	23	28	16	28	35	18	13	23	21
	1								3	2				1		
	2									1						
	3															
C-Exudado en la luz de bronquios/bronquiolo	0	14	15	19	35	20	11	19	24	14	23	33	13	12	18	18
	1						2	4	7	5	5	2	5	2	5	3
	2															
D-Infiltrado perivascular (%: 0-1-2-3)*		2	1	1	1	1	0	2	1	1	2	0	0	1	0	0
E-Pneumonía del parénquima (0-3-5)		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PAS		débil +	débil +	débil +	débil +	débil +	++	++	++	+	+	+	+	+	++	+
SCORE TOTAL: A+3(media B + media C)+D+E		2	1	1	1	1	0,46	3,25	3,06	3,42	2,53	0,26	0,83	2,6	0,52	0,43

Tabla A4. Análisis histopatológico de los pulmones de los animales del experimento n° A2. Se expresan los valores de cada una de las variables analizadas según Cimolai y col. (1992) y el score total (parte 2). *: si bien algunos animales mostraron infiltrado perivascular, el ítem D muestra solo el %.

	IDENTIFICACIÓN															
	MVA-F/MVA-F/MVA-F					PBS					MVA-F/Ft/MVA-F					
	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	3.1	3.2	3.3	3.4	3.5	
A-Infiltrado peribronquial/ peribronquiolar (%: 0-1-2-3)	1	1	0	1	0	0	2	0	0	0	1	1	1	2	1	
B-Cualidad del Infiltrado peribronquial/ peribronquiolar (0-1-2-3)	0	17	19	11	11	17	19	9	25	23	25	13	20	7	25	8
	1	1	1	1				2				2	1	1	3	1
	2							1								
	3															
C-Exudado en la luz de bronquios/bronquiolos	0	18	20	11	12	17	19	11	23	23	23	15	21	8	28	9
	1							1	2		2					
	2															
D-Infiltrado perivascular (%: 0-1-2-3)*	2	2	0	0	0	0	3	0	0	0	2	2	2	1	2	
E-Pneumonía del parénquima (0-3-5)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
PAS	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
SCORE TOTAL: A+3(media B + media C)+D+E	3,174	3,15	0	1,249	0	0	6,248	0,24	0	0,24	3,4	3,141	3,375	3,321	3,333	

Tabla A5. Análisis histopatológico de los pulmones de los animales del experimento n° 3. Se expresan los valores de cada una de las variables analizadas según Cimolai y col. (1992) y el score total de los animales vacunados del experimento n°3 de la sección de resultados capítulo 2, desafiados al día 53 y sacrificados 5 dpd (Parte 1). *: si bien algunos animales mostraron infiltrado perivascular, el ítem D muestra solo el %.

	IDENTIFICACIÓN										
	Ft/Ft/Ft					pTT5-F/MVA-F/MVA-F					
	4.1	4.2	4.3	4.4	4.5	5.1	5.2	5.3	5.4	5.5	
A-Infiltrado peribronquial/ peribronquiolar (%: 0-1-2-3)	1	0	2	1	0	0	0	1	2	2	
B-Cualidad del Infiltrado peribronquial/ peribronquiolar (0-1-2-3)	0	27	10	17	27	10	25	14	23	26	17
	1	4		2	4				3	9	8
	2										
	3										
C-Exudado en la luz de bronquios/bronquiolos	0	31	10	17	31	10	25	14	26	35	19
	1			1							3
	2			1							3
D-Infiltrado perivascular (%: 0-1-2-3)*	2	0	2	2	0	0	1	2	2	3	
E-Pneumonía del parénquima (0-3-5)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
PAS	+	-	++	+	-	-	-	-	-	++	
SCORE TOTAL: A+3(media B + media C)+D+E	3,387	0	4,492	3,387	0	0	1	3,346	4,771	6,92	

Tabla A6. Análisis histopatológico de los pulmones de los animales del experimento n° 3. Se expresan los valores de cada una de las variables analizadas según Cimolai y col. (1992) y el score total de los animales vacunados del experimento n°3 de la sección de resultados capítulo 2, desafiados al día 53 y sacrificados 5 dpd (Parte 2). *: si bien algunos animales mostraron infiltrado perivascular, el ítem D muestra solo el %.