



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Aislamiento y Caracterización de Cepas Nativas
del Herpesvirus Bovino-1 (BHV-1) para la
Generación de un Biológico Vacunal Inactivado
y/o Recombinante**

JULIAN RUIZ SAENZ. MV. MSc.

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y DE ZOOTECNIA
DOCTORADO EN CIENCIAS - SALUD ANIMAL
BOGOTÁ – COLOMBIA
2012**

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS
NATIVAS DEL HERPESVIRUS BOVINO-1 (BHV-1) PARA
LA GENERACIÓN DE UN BIOLÓGICO VACUNAL
INACTIVADO Y/O RECOMBINANTE**

JULIAN RUIZ SAENZ. MV. MSc.

Tesis presentada como requisito parcial para obtener el título de Doctor en Ciencias –
Salud Animal

Tutor

Víctor Julio Vera Alfonso. Ph.D.

Comité tutorial

Jairo Jaime Correa. Ph.D.

Gloria Consuelo Ramírez. Ph.D.

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y DE ZOOTECNIA
DOCTORADO EN CIENCIAS - SALUD ANIMAL
BOGOTÁ - COLOMBIA**

2012

Dedicatoria

*A mi esposa, por las largas horas de dedicación
y soportar las horas de mi ausencia
a mis peludos, mis papas y mis hermanos
A Juan, Lolo y a los demás conejos
por su aporte "Vital"*

*"There is an intrinsic simplicity of nature
and the ultimate contribution of Science
resides in the discovery of unifying and simplifying generalization,
rather than in the description of isolated situation
-in the visualization of simple,
overall patterns rather than in the analysis of patchworks"*

Luria's Credo, 1955

Declaratoria de originalidad y reconocimiento

El autor manifiesta que el presente documento es original y se realizó sin violar, transgredir y/o usurpar derechos de autor de unos terceros; por lo tanto es de su exclusiva autoría y detenta su titularidad sobre la misma

Agradecimientos

- Al Dr. Víctor Vera por darme la oportunidad de crecer junto a su grupo de trabajo.
- Al Grupo de Microbiología y Epidemiología de la Universidad Nacional, al posgrado de la Facultad de Medicina Veterinaria y de zootecnia y toda su gente por hacerme amable el tiempo que compartí en Bogotá.
- A COLCIENCIAS por financiar mi proceso doctoral.
- A la DIB por financiar los proyectos que dieron frutos en este proceso.
- A la Universidad Nacional de Colombia por acogerme como un hijo más.

Resumen

El BHV-1, es un virus de genoma ADN perteneciente a la Familia *Herpesviridae* y a la subfamilia *Alfaherpesvinae* y posee múltiples cepas serológicamente indiferenciables. Con base en el análisis genómico se ha clasificado en tres subtipos: BHV-1.1, BHV-1.2a, BHV-1.2b. Es un agente de distribución global causante de graves pérdidas económicas. En nuestro país, ha sido reportado desde comienzos de los años 70 y aunque existe un plan de vacunación y prevención de la enfermedad, se sospecha que es uno de los principales limitantes de las explotaciones ganaderas del país. El objetivo del presente trabajo de tesis fue realizar un estudio sero-epidemiológico que permitiera aislar y posteriormente caracterizar cepas del BHV-1 presentes en hatos ganaderos de diferentes regiones de Colombia, para generar, a partir de éstas, un biológico vacunal inactivado y/o recombinante y realizar una evaluación inicial de su eficiencia como inmunógeno para las condiciones del país. Utilizando la prueba de seroneutralización en cultivo celular, se encontró un 100% de prevalencia serológica por hato para el BHV-1 y una prevalencia general por individuos del 75.63%. Posteriormente, mediante inmunosupresión farmacológica, se realizó aislamiento viral en individuos que presentaron los títulos seroneutralizantes más altos, lográndose aislamientos del virus tanto de toros como de vacas y de diferentes muestras, indicándose un estado de enzootia de la infección. Se lograron 18 aislamientos realizados en 5 zonas del país (Córdoba, Llanos, Bogotá, Antioquia y Valle del Cauca). Todos los virus fueron confirmados por PCR y titulados por Dosis Infecciosa y Unidades formadoras de placa, para posteriormente caracterizar la virulencia *in vitro* de los mismos mediante curvas de crecimiento en monocapas y sobrenadantes, evaluación del fenotipo de placa y análisis del ADN viral con enzimas de restricción y de las glicoproteínas virales mediante western blot. Se encontró que algunas cepas tuvieron un comportamiento altamente virulento *in vitro* con periodos de eclipse más cortos, más rápida liberación de virus al sobrenadante, mayor tamaño de placa y mayor título viral. No se encontraron diferencias entre la expresión de glicoproteínas. La mayoría de los virus fueron confirmados como BHV-1.1 y sólo uno de ellos como BHV-1.2a. Indicándose con estos resultados que algunas cepas

nativas del BHV-1 podrían ser útiles como semilla para el desarrollo de nuevas vacunas. Utilizando la cepa Córdoba 2, la cual se caracterizó como altamente virulenta, se desarrolló una vacuna inactivada con etilenimina binaria y se evaluó su potencial en un modelo de conejo. Los resultados permiten evidenciar que el uso de nuestra cepa nativa como semilla vacunal, permite el desarrollo de una fuerte inmunidad neutralizante con mejor protección ante el reto con virus de referencia aun comparándolo con vacunas comerciales disminuyendo la presentación de fiebre y la excreción viral. Finalmente se presenta el desarrollo técnico de un poxvirus recombinante que expresa la glicoproteína D del BHV-1 como un modelo alternativo para inducir una eficiente respuesta inmune.

Palabras clave: Aislamiento, caracterización molecular, Herpesvirus bovino-1, latencia, virulencia, vacunas.

Abstract

BHV-1 is a DNA virus belonging to the *Herpesviridae* family and *Alfaherpesvinae* subfamily that has multiple strains serologically indistinguishable between them. Based on genomic analysis has been classified in two types and three subtypes BHV-1.1, BHV-1.2a, BHV-1.2b. It has a worldwide distribution causing serious economic losses. In our country, has been reported since early 70's and although there are vaccination and prevention programs, it is suspected as a major constraint of livestock in the country. The aim of this thesis was to conduct a sero-epidemiological study to isolate and subsequently characterize BHV-1 strains found in cattle herds from different regions of Colombia, to generate, from these, one inactivated and / or recombinant vaccine and perform an initial evaluation of its efficiency as immunogen for the country. Using the serum neutralization test in cell culture, we found prevalence by herd of 100% and an overall prevalence of 75.63% by individuals. Subsequently, using pharmacologic immunosuppression, viral isolation was performed in individuals with higher seroneutralizing titers, isolating virus as from bulls as cows and from different samples, indicating an enzootic behavior of the infection. We obtained a total of 18 isolates from 5 areas of the country (Córdoba, Llanos, Bogotá, Antioquia and Valle del Cauca), all viruses were confirmed by PCR and titrated by infectious dose and by plaque-forming units, and later to characterize the virulence *in vitro*, one step growth curves were performed in monolayers and supernatants, we evaluated plaque phenotype and we analyzed viral DNA with restriction enzymes and the viral glycoproteins by Western blot analysis to characterize molecularly the viral isolations. It was found that some strains were highly virulent *in vitro* with shorter eclipse periods, faster release of virus into the supernatant, larger plaque and higher viral titer. No differences were found between the expressions of glycoproteins. Most of the viruses were confirmed as BHV-1.1 and only one as BHV-1.2a. These results indicating that some native strains of BHV-1 could be useful as a seed for the development of new vaccines. Using Córdoba 2 strain, which

was characterized as highly virulent, we developed a binary ethyleneimine inactivated vaccine and evaluated their potential in a rabbit model. The results pointed to the use of our native strain as seed, allowing the development of a strong neutralizing immunity with better protection against virus challenge compared to commercial vaccine, decreasing the presentation of fever and viral excretion. Finally we present the technical development of a recombinant poxvirus expressing the glycoprotein D of BHV-1 as an alternative model to induce an efficient immune response.

Keywords: Bovine herpesvirus-1, isolation, molecular characterization, latency, vaccines, virulence.

Contenido

	Pág.
Dedicatoria	V
Declaratoria de originalidad y reconocimiento	VII
Agradecimientos	IX
Resumen	XI
Abstract	XIII
Lista de figuras y tablas	XVII
Lista de Abreviaturas	XX
Introducción	1
1. Capítulo 1	5
1.1 Latencia del Herpesvirus bovino-1: El papel de los transcritos relacionados con latencia (RL)	6
1.2 Vacunas contra el Herpesvirus Bovino-1: Una mirada desde el pasado hacia el futuro de la inmunización	43
2. Capítulo 2	75
Prevalencia serológica y aislamiento del Herpesvirus Bovino-1 (BHV-1) en hatos ganaderos de Antioquia y del Valle del Cauca (Publicado en 2010).....	75
3. Capítulo 3	95
Molecular and in vitro characterization of field isolates of Bovine Herpesvirus-1	95
4. Capítulo 4	123
Desarrollo de una vacuna inactivada a partir de una cepa nativa del Herpesvirus Bovino-1 (BHV-1) y su eficacia en un modelo de infección en conejos.....	123
5. Capítulo 5	151
Desarrollo de un Poxvirus recombinante que exprese la glicoproteína D del Herpesvirus Bovino-1	151

6. Discusión, conclusiones y recomendaciones	173
6.1 Conclusiones y Discusión.....	173
6.2 Recomendaciones.....	175
A. Anexo A: Presentaciones en eventos	178
B. Anexo B. Instrucciones a los autores revistas	191
B1. ACTA BIOLÓGICA COLOMBIANA (Publindex A2).....	191
B2. REVISTA COLOMBIANA DE CIENCIAS PECUARIAS (Publindex A1).....	199
B3. VIROLOGICA SINICA (Publindex A1)	206
B4. REVISTA ARGENTINA DE MICROBIOLOGÍA (Publindex A1)	208
Bibliografía	219

Lista de figuras y tablas

CAPITULO I

Latencia del herpesvirus bovino-1: El papel de los transcritos relacionados con latencia (RL)

- Figura 1.** Lesiones clínicas causadas por la infección por el BHV-1.
- Figura 2.** Ciclo de replicación del BHV-1.
- Figura 3.** Modelo de transporte axonal del BHV-1.
- Figura 4.** Representación esquemática del genoma del BHV-1 y sus transcritos
- Figura 5.** Mapa parcial de restricción de RL y sitios de inserción de codones de parada en cepa mutante de RL.
- Figura 6.** Representación esquemática del gen LR y el ORF-E.
- Figura 7.** Modelo hipotético que describe los sucesos que ocurren en una neurona infectada con el BHV-1 silvestre y con un mutante de RL.

Vacunas contra el Herpesvirus Bovino-1: Una mirada desde el pasado hacia el futuro de la inmunización

- Tabla 1.** Vacunas comerciales contra el BHV-1 que se encuentran disponibles en Colombia

- Figura 1.** Lesiones clínicas causadas por la infección por el BHV-1.
- Figura 2.** Uso de una vacuna marcadora *DIVA* (gE-) para el BHV-1.
- Figura 3.** Vectores adenovirales que expresan la glicoproteína D del BHV-1.
- Figura 4.** Inmunomarcaje con oro de un baculovirus recombinante el cual expresa la gD del BHV-1 fusionada a una de sus glicoproteínas (gp64).
- Figura 5.** Desarrollo de una vacuna recombinante de subunidades génicas la cual expresa la gD del BHV-1.

CAPÍTULO II.

Prevalencia serológica y aislamiento del Herpesvirus Bovino-1 (BHV-1) en hatos ganaderos de Antioquia y del Valle del Cauca

- Tabla 1.** Distribución porcentual de bovinos muestreados en cada una de las haciendas que participaron en el estudio.
- Figura 1.** Distribución porcentual de los títulos seroneutralizantes.
- Figura 2.** Aislamiento de BHV-1 en cultivos de células MDBK.
- Figure 3.** Visualización de productos de PCR de la gD del BHV-1.

CAPÍTULO III.

MOLECULAR AND *IN VITRO* CHARACTERIZATION OF FIELD ISOLATES OF BOVINE HERPESVIRUS-1

- Table 1.** Monoclonal antibodies used for Western blot analysis of field BoHV-1 isolates
- Table 2.** Origin of BoHV-1 isolated viruses.
- Table 3.** Virus titers by TCID₅₀ and PFUs for different BHV-1 isolates and for the reference IOWA and Colorado strains.
- Figure 1.** BoHV-1 cytopathic effects at different times of infection in MDBK cell culture.
- Figure 2.** Different BHV-1 plaque sizes in MDBK cell culture.
- Figure 3.** One step growth curve of different BoHV-1 isolates.
- Figure 4.** Western blot mapping of different BHV-1 glycoproteins in native BHV-1 isolates.
- Figure 5.** Restriction endonuclease assay of native BHV-1 isolates.

CAPÍTULO IV. Desarrollo de una vacuna inactivada a partir de una cepa nativa del Herpesvirus Bovino-1 (BHV-1) y su eficacia en un modelo de infección en conejos

- Esquema 1.** Esquema vacunal por grupo de animales.
- Figura 1.** Inoculación intranasal en conejos con BHV-1 Iowa.
- Figura 2.** Completa inactivación de la cepa vacunal.

- Figura 3.** Anticuerpos neutralizantes en conejos inoculados con diferentes vacunas.
- Figura 4.** Promedios de temperatura rectal post Inoculación.
- Figura 5.** Excreción viral en individuos vacunados y no vacunados

CAPÍTULO V.

DESARROLLO DE UN POXVIRUS RECOMBINANTE QUE EXPRESE LA GLICOPROTEÍNA D DEL HERPESVIRUS BOVINO-1

- Figura 1.** Desarrollo de un poxvirus recombinante que expresa la gD del BHV-1.
- Figura 2.** Mapa del plásmido de transferencia pTK-IRES-tpa-gD.
- Figura 3.** Visualización de productos de PCR de la gD en plásmidos pTK/IRES/tpa/gD.
- Figura 4.** Presencia de infección por el RCN de tipo silvestre y RCNgD.
- Figura 5.** Visualización de productos de PCR de la gD del RCNgD.

Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Término
BAdv	Adenovirus bovino
BEI	Etilenimina binaria
BHV-1	Herpesvirus Bovino-1
BHV-4	Herpesvirus Bovino-4
BoHV-1	Bovine Herpesvirus-1
BRSV	Virus sincitial respiratorio
cDNA	DNA copia
CPE	Efecto citopático - Cytopathic Effect
DICC ₅₀	Dosis Infecciosa cultivo celular 50
DIVA	Differentiating Infected From Vaccinated Animals
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensayo inmunoenzimático
FBS	Fetal bovine serum
gB	Glicoproteína B
gC	Glicoproteína C
gD	Glicoproteína D
gE	Glicoproteína E
GFP	Proteína verde fluorescente
gH	Glicoproteína H
gK	Glicoproteína K
gL	Glicoproteína L
hAd5	Adenovirus humano 5
hpi	Horas posinfección
hsp70	heat shock protein 70A
HSV-1	Herpesvirus Simplex tipo 1
IBR	Rinotraqueitis Infecciosa bovina
ICA	Instituto Colombiano Agropecuario
IFN	Interferón
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
IPB	balanopostitis pustular infecciosa
IPV	vulvovaginitis pustular infecciosa
IT	Genes Inmediatos tempranos
MDBK	Células Madin Darby Bovine Kidney
MEM	Medio esencial mínimo – minimum essential medium
MOI	Multiplicidad de Infección - multiplicity of infection
MVA	virus de Vaccinia Ankara
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
ORF	Marco abierto de lectura
PBS	Solución buffer fosfato - Phosphate buffered saline
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
PFU	Plaque forming units
PI3	Virus de Parainfluenza tipo 3
RCN	RaccoonPoxvirus – Poxvirus de mapaches
RCNgD	Poxvirus de mapache que expresa la gD del BHV-1
RL	Transcritos relacionados con latencia

RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa coin transcripción inversa
SFB	Suero fetal bovino
TCID ₅₀	Tissue culture infective dose 50
tk	Timidina Kinasa
TNF	Factor de necrosis tumoral
UFP	Unidades formadoras de placa
VDB	Virus de la Diarrea Viral Bovina

Introducción

El Herpesvirus bovino tipo 1 es un virus de distribución mundial, causante de graves pérdidas económicas, debidas además de las pérdidas en el desempeño productivo, a la alta mortalidad embrionaria la cual disminuye la eficiencia de cualquier explotación ganadera; causando un efecto directo sobre los indicadores de salud y productividad de las explotaciones. En nuestro país, el virus fue reportado por primera vez a comienzos de los años 70 por investigadores del Centro Internacional de Agricultura Tropical y sin embargo, a pesar de existir un plan de vacunación y prevención de la enfermedad, hoy en día sigue siendo una de las principales limitantes de las explotaciones ganaderas del país. Análisis serológicos recientes realizados por el Grupo de Investigación en Microbiología y Epidemiología de la Universidad Nacional de Colombia que hacen parte de esta tesis (Capítulo 2) demuestran que hay una alta positividad serológica en bovinos, la cual llega a ser del 100% por hato y más del 75% por animales, tanto en explotaciones lecheras como en ganaderías de producción de carne, corroborando la alta presencia de la entidad en el país y un posible estado de enzootia de la infección en Colombia.

Teniendo en cuenta la capacidad del BHV-1 para establecer un estado de latencia viral durante toda la vida del individuos y como se demuestra en el capítulo 1 de esta tesis la posibilidad de reactivar eficientemente dichas infecciones latentes mediante el uso de inmunosupresión farmacológica, en el capítulo 2 de esta tesis se logra demostrar la presencia del BHV-1 el cual reactiva y es excretado tanto por machos como por hembras y permite eficientemente obtener un “pool” de cepas de campo que consideramos que son representativas de los diferentes sistemas de producción ganadera del país, ya que se obtuvieron cepas de ganaderías intensivas de leche (Antioquia y Sabana de Bogotá), extensivas de carne (Cali y Llanos) y doble propósito (Córdoba).

Poco se conoce acerca de las variantes virales actuantes en las diversas ganaderías del país, hecho que lleva a una falta de medidas efectivas de control que disminuyan la prevalencia de la infección en el país o que ayuden a disminuir el impacto de los brotes

de enfermedad asociada a la infección. En la presente tesis se demostrará como el uso de las técnicas de cultivo celular sumadas a técnicas moleculares como el análisis de genoma con enzimas de restricción y el western blot de glicoproteínas virales permiten obtener una óptima caracterización de los aislamientos virales, encontrándose variaciones sustanciales entre las cepas aisladas en campo, las cuales permiten postular medidas de control y abren la puerta al desarrollo de vacunas a partir de cepas nativas como medida de control de la infección.

Aunque existen múltiples alternativas vacunales y algunas de ellas tienen una alta comercialización en el país, el efecto que dichas vacunas tienen sobre la infección es discutible, pues ninguna formulación incluye el uso de una cepa nacional que asegure que la inmunización lograda es suficiente para proteger los animales contra los virus nativos circulantes; además los efectos de dichas vacunas sobre la latencia y la reactivación son discutibles, pues no se han realizado estudios en el medio que comprueben el impacto de estas vacunas sobre dichos estados biológicos de la infección, estados en los cuales se perpetúa la infección a través del tiempo en los individuos. Tampoco se conocen estudios que demuestren la inmunogenicidad y la protección contra el reto de las vacunas que se comercializan en condiciones locales. El segundo apartado del Capítulo 1, resume las actuales tendencias en el desarrollo de biológicos a nivel mundial y como se encuentra nuestro país frente al reto de lograr una eficiente protección de la población ganadera. Por otro lado el Capítulo 4 de esta tesis presenta el desarrollo de la primera vacuna generada a partir de una cepa nativa en el país y la primera evaluación *in vivo* de dicha vacuna.

También como se expresa en el capítulo 1, el campo de la generación de vacunas recombinantes es un área que ha venido creciendo fuertemente en el mundo y la generación de biológicos recombinantes para el BHV-1 no ha sido la excepción, es así como países como Argentina ya vienen trabajando y adaptando estas tecnología a sus países con el objetivo de conseguir una óptima inmunización y evitar las pérdidas económicas que esta infección genera. El Capítulo 5 de esta tesis demuestra que es una prioridad para el nuestro grupo de Investigación entrar a la vanguardia del desarrollo y mediante el apoyo de la Universidad de Wisconsin permite presentar el desarrollo de un virus recombinante que expresa la mayor proteína inmunogénica del BHV-1. Son pues los estudios de vacunas un aporte científico importante no solo a la investigación de la

enfermedad en Colombia y su prevención, sino que abre las puertas a una nueva era de investigación con miras al desarrollo tecnológico e implementación industrial de la investigación básica, que no solo es útil para el agente viral evaluado durante esta tesis, sino que es extrapolable a múltiples agentes virales de importancia en salud animal y porque no en salud humana.

Es por tanto esta tesis un invitación a la apropiación del conocimiento básico de la infección por el BHV-1, su estatus epidemiológico, sus variante genómicas actuantes y su virulencia, como un mecanismo de fortalecimiento de las bases científicas para el desarrollo de alternativas eficientes y viables de prevención y control de una infección que lleva años en nuestro país y que acarrea grandes pérdidas económicas, disminuciones en la eficiencia productiva y reproductiva y falta de rentabilidad en nuestras ganaderías. Es en un todo, una invitación a lograr una apropiación social del conocimiento obtenido para aplicarlo a la comunidad bovina.

1. Capítulo 1

Latencia del Herpesvirus bovino-1: El papel de los transcritos relacionados con latencia (RL) (Publicado en 2008)

Acta biol. Colomb., Vol. 13 No. 1, 2008 3 - 22

LATENCIA DEL HERPESVIRUS BOVINO-1: EL PAPEL DE LOS TRANSCRITOS RELACIONADOS CON LATENCIA (RL)

Bovine Herpesvirus-1: The Role of Latency-Related Genes

JULIÁN RUIZ^{1,2}, M.Sc.; JAIRO JAIME², Ph. D.; VÍCTOR VERA², Ph. D.

¹Estudiante de Doctorado, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

²Grupo de investigación en Microbiología y Epidemiología Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Carrera 30 No. 45-08. julianruizsaenz@gmail.com

Presentado: 26 de julio de 2007, aceptado 11 de diciembre de 2007, correcciones 9 de febrero de 2008.

Vacunas contra el Herpesvirus Bovino-1: Una mirada desde el pasado hacia el futuro de la inmunización (Publicado en 2009)

Acta biol. Colomb., Vol. 14 No. 2, 2009 3 - 20

VACUNAS CONTRA EL HERPESVIRUS BOVINO-1: UNA MIRADA DESDE EL PASADO HACIA EL FUTURO DE LA INMUNIZACIÓN

Bovine Herpesvirus-1 vaccine's: A look from the past to the immunization future

JULIÁN RUIZ-SAENZ^{1,2}, MV, M.Sc.; JAIRO JAIME², MV, M.Sc., Ph. D.; VÍCTOR VERA², MV, M.Sc., Ph. D.

¹Estudiante de Doctorado, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia.

²Grupo de investigación en Microbiología y Epidemiología Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. julianruizsaenz@gmail.com

1.1 Latencia del Herpesvirus bovino-1: El papel de los transcritos relacionados con latencia (RL)

Julián Ruiz^{1,2}, MV; Jairo Jaime², MV, MSc, PhD; Víctor Vera², MV, MSc, PhD.

¹Estudiante de Doctorado, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia

²Grupo de investigación en Microbiología y Epidemiología

Universidad Nacional de Colombia

Sede Bogotá

julianruizsaenz@gmail.com

Resumen

El Herpesvirus bovino-1 es un virus de distribución mundial causante de graves pérdidas económicas debidas principalmente a la disminución de la eficiencia y en los indicadores de salud y productividad de cualquier hato ganadero infectado. Luego de la infección inicial del tracto respiratorio de los animales, el virus establece un estado de latencia viral en las neuronas sensoriales del ganglio trigémino y en los centros germinales de las tonsilas faríngeas. Periódicamente, el virus es reactivado y excretado en secreciones a través de las cuales puede infectar a otros animales susceptibles. Durante dicho estado de latencia hay disminución dramática de la expresión de genes virales, llevando solo a la expresión de dos transcritos: El RNA codificado por el gen Relacionado con Latencia (RL) y el ORF-E viral. Múltiples estudios demuestran como el RL y el ORF-E están involucrados en la regulación del complejo ciclo de latencia y reactivación de la infección. La presente revisión de literatura se enfocará en describir y analizar los distintos estudios que han llevado a dilucidar el papel jugado por el gen RL y el ORF-E, sus transcritos y sus productos proteicos en el establecimiento, mantenimiento y reactivación de la latencia del BHV-1.

Palabras clave: Herpesvirus, latencia, transcritos, ORF.

Abstract

Bovine herpesvirus-1 is world wide spread viruses that cause significant economic losses due mainly to a decrease in the efficiency and in the health and productivities indicators in all the infected herds. After primary infection in respiratory tract of the animals, the virus establishes viral latency state in sensory neurons of trigeminal ganglia and germinal centers of pharyngeal tonsils. Periodically, the virus reactivates from latency, is shed through secretions, and can infect other susceptible animals. During latency there is a dramatic diminish of viral gen expression; only two transcripts are abundantly expressed: the latency related (LR) RNA and viral ORF-E. Multiple studies have shown the LR and ORF-E role in the regulation of BHV-1 latency-reactivation cycle. This review focus in describe and analyze diverse papers that had lead to incriminate the LR gen and viral ORF-E, its transcripts and its protein products in establish, maintenance and reactivation of BHV-1 latency state.

Key words: Herpesvirus, Latency, transcripts, ORF.

Introducción

El Herpesvirus Bovino-1 (BHV-1) es un virus de genoma ADN perteneciente a la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alfaherpesvirinae* (Wyler y cols 1989); este virus posee una amplia diversidad de cepas, las cuales son serológicamente indistinguibles; sin embargo, con base en el análisis del genoma con endonucleasas de restricción y sus respectivos patrones de migración en gel, se han clasificado en tres tipos y en 5 subtipos: BHV-1.1, BHV-1.2a, BHV-1.2b, BHV-1.3a, y BHV-1.3b (Wyler y cols, 1995). Posteriormente, los subtipos BHV-1.3a y BHV-1.3b fueron reclasificados como BHV-5, el cual presenta un alto potencial neuropatogénico (Büchen-Osmond C 1998).

El BHV-1 afecta naturalmente al bovino, especie en la que provoca un amplio espectro de manifestaciones clínicas: rinitis (IBR), vulvovaginitis pustular infecciosa (IPV), balanopostitis pustular infecciosa (IPB), conjuntivitis, aborto, enteritis y encefalitis (**Figura 1**)

La distribución de la infección es mundial y la prevalencia de reactores serológicos indica que prácticamente todos los bovinos mayores de tres años han estado en contacto con el virus. Se han registrado brotes de la forma respiratoria en EE.UU. y Canadá; la IPV es común en Europa y se han notificado brotes importantes de meningoencefalitis en Argentina, Australia, EE.UU., Canadá, Siria, Hungría, Uruguay, Italia y Brasil (Pidone y cols 1999).

El BHV-1 se transmite fácilmente en forma directa de un animal a otro, pues gran cantidad de virus es eliminado principalmente en las secreciones respiratorias, oculares y reproductivas de animales infectados; sin embargo, la transmisión también puede hacerse en forma indirecta, a través de personas o equipos. El período de incubación varía entre 2 y 6 días, dicha variabilidad depende de la cantidad del inóculo, ruta de inoculación y otros factores inherentes del hospedero (Wylter y cols., 1995). Aunque se acepta que, para el caso de la IBR, el virus se excreta en las secreciones nasales por aproximadamente 12-14 días posinfección, se ha recuperado el virus en forma intermitente por un período de hasta 578 días (Jubb, 1993). Otras fuentes importantes de diseminación son el semen y la transferencia embrionaria (Bielanski A, y cols, 1994). Se ha podido comprobar que toros serológicamente positivos sin sintomatología son portadores del virus, el cual se ha logrado aislar de muestras de semen congelado,

incluso 12 meses después de su almacenamiento a -196° C (Bielanski A, 1988; van Oirschot y cols 1993). El riesgo de transmisión de BHV-1 en hembras fertilizadas con semen de toros seropositivos proveniente de centros de inseminación artificial no se considera muy alto; sin embargo el tratamiento del semen infectado con gammaglobulinas de suero hiperimmune o con una solución de tripsina (Bielanski y col., 1988) puede reducir el riesgo de transmisión de BHV-1 en la inseminación artificial.

El bovino es el principal reservorio del BHV-1; sin embargo, muchas especies de rumiantes tales como: caprinos, ovinos, etc., e incluso el cerdo, son susceptibles a la infección por este virus (Wylter y cols 1989).

En Colombia, se han realizado diferentes estudios seroepidemiológicos, los cuales además de demostrar el alto impacto económico y epidemiológico ocasionado por la infección, han permitido el aislamiento de algunas cepas nativas, las primeras a comienzos de los años 70 (CIAT 1972-1975); otra a mitad de los años noventa a partir de muestras de tomadas en los Llanos orientales (Molano y cols., 1996); y más recientemente una aislada en 2001 en la Sabana de Bogotá (Piedrahita y cols., 2005). Estas dos últimas han sido sujeto de caracterización molecular por el Grupo de Microbiología y Epidemiología de la Universidad Nacional, clasificando los aislamientos como BHV-1.1 a la cepa de los Llanos orientales y BHV-1.2a para la cepa de la sabana de Bogotá (Piedrahita y cols, 2005).

Ciclo de replicación viral

El BHV-1 entra a las células por fusión de su envoltura con la membrana plasmática celular, en un proceso independiente de pH y dependiente de la unión de glicoproteínas virales presentes en la envoltura del virus con los receptores en la membrana celular (Wittels y Spear, 1990). Diversos estudios han demostrado que las diferentes glicoproteínas virales (gB, gC, gD, gE, gH, gK y gL) son requeridas en el proceso de entrada del virus a la célula (Li y cols., 1995; Schroder y Keil 1999; Dasika y Letchworth, III 1999; Hanon y cols., 1999). Los BHV-1.1 y BHV-1.2 difieren en algunos epítopes de la gC, dichos cambios pueden alterar la adhesión viral y pueden ocasionar diferencias en la virulencia del subtipo viral (Rijsewijk y cols., 1999). Aunque la totalidad de las moléculas involucradas en la entrada del BHV-1 a la célula no están completamente dilucidadas, está claramente establecido que el virus se une a las moléculas de heparán sulfato presentes en la membrana celular (Hanon y cols., 1998; Tyler y Nathanson 2001) a través de las glicoproteínas virales gB y gC (Li y cols., 1996). Luego de esta unión inicial, las gB y gD se unen con alta afinidad a sus receptores putativos en la membrana celular (Li y cols., 1995). Estudios más recientes para identificar estos receptores de alta afinidad, han mostrado que la gD de BHV-1 puede unirse débilmente con el HveC (receptor 1 de nectina) o con el receptor humano para el poliovirus (PVR) expresados en células de humano o de hámster (Geraghty y cols., 1998; Connolly y cols., 2001). Ésta unión débil, indica que la entrada del BHV-1 en el hospedero bovino puede estar mediada por la interacción de la gD con receptores diferentes a los homólogos bovinos del HveC o PVR (Geraghty y cols., 1998; Connolly y cols., 2001).

Después de la entrada a las células del hospedero, el BHV-1 es transportado a través de los microtúbulos hasta el núcleo; donde de manera secuencial replica su genoma usando proteínas virales y celulares. Luego, los viriones abandonan el núcleo y se dirigen hacia

la membrana citoplasmática externa por procesos de gemación a partir de membranas intracitoplasmáticas, adquiriendo su envoltura y tegumento; y luego son transportados dentro de vesículas intracelulares a la membrana citoplasmática para su posterior liberación de la célula (Hunter, 2001). La replicación del genoma del BHV-1 comienza dentro de las 2 horas siguientes a la infección inicial en el animal (Meurens y cols., 2004) con la expresión de antígenos en la superficie celular entre las 3 a 4 horas siguientes a la infección y liberación de partículas virales y dispersión a las 8 horas posinfección (Babiuk y cols., 1996) (**Figura 2**)

Latencia

El herpesvirus bovino, al igual que la gran mayoría de miembros de la subfamilia *Alfaherpesvirinae*, establece latencia durante toda la vida del hospedero en neuronas ganglionares del sistema nervioso periférico. Luego de la replicación inicial en el epitelio mucoso, la nucleocápside del virus es direccionada por transporte axonal retrógrado hasta el cuerpo de la neurona sensorial dentro del ganglio trigémino, allí el ADN es insertado en el núcleo de la neurona; entrando en un estado de transcripción restringida, el cual le permite evadir la respuesta inmune del hospedero (**Figura 3**). Tiempo después, durante eventos de estrés, inmunosupresión o uso prolongado de corticoides, el virus puede reactivarse, produciendo partículas virales, las cuales migran en forma centrífuga usando el transporte axonal anterógrado de la misma neurona por la cual ascendieron, alcanzando el sitio inicial de replicación, para poder así dispersarse a otros animales susceptibles (Sheffy y Davies, 1972; Rock y cols., 1992). El sitio primario de establecimiento de latencia son las neuronas sensoriales del ganglio trigémino; sin embargo, existe evidencia que demuestra la persistencia y reactivación viral también

dentro de los centros germinales de las tonsilas faríngeas, teniendo este sitio un papel importante, tanto en la patogénesis como en la transmisión del virus a nuevos hospederos (Winkler y cols., 2000a); similarmente, se ha evidenciado infección latente en los mononucleares de sangre periférica (Fuchs y cols., 1999), en nódulos linfoides y tejidos esplénicos, aun en ausencia de infección productiva (Mweene y cols., 1996). Recientemente, Voguel y cols., (2004) demostraron la presencia de infección latente en la raíz dorsal de ganglios nerviosos sacros, en plexo simpático pélvico y en nódulos linfoides locales luego de la inoculación intraprepucial de toros con una cepa de campo del BHV-1.2 (Voguel y cols., 2004).

La infección inicial del BHV-1 en líneas celulares permisivas (Células MDBK) conduce primordialmente a una rápida muerte celular ocasionada por un estado apoptótico dado por la activación de diferentes caspasas celulares (principalmente caspasa 3) y de la proteína P53 (Devireddy y Jones, 1999; Henderson y cols., 2004b). Similares resultados han sido reportados ante la infección *in vivo* de terneros con la cepa Cooper de BHV-1, llevando a un aumento de los niveles de apoptosis en linfocitos T CD4+ infectados (Winkler y cols., 1999). Durante la expresión génica en la infección primaria, los genes son transcritos en una cascada coordinada, regulada y secuencial, la cual es común a todos los miembros de esta familia viral (Wirth y cols., 1989; Roizman y Pellet, 2001); y dependiendo del momento en que los genes son expresados durante la replicación son clasificados en tres clases: Inmediatos tempranos (IT), tempranos y tardíos. La expresión de los genes IT es regulada por un componente del virión, α TIF, el cual es un transactivador viral de los genes α (Misra y cols., 1995). Adicionalmente, se ha reportado la existencia de dos unidades de transcripción de genes IT; la primera (ITut1) codifica dos homólogos funcionales de los genes IT del Herpesvirus Simplex tipo 1 (HSV-1),

denominados ICP0 e ICP4. Por otra parte, la segunda unidad de transcripción (ITut2) codifica una proteína homóloga a la IT ICP22 de HSV-1 (Wirth y cols., 1991). Subsecuentemente, las proteínas IT activan la expresión de los genes tempranos, asegurando así la replicación del ADN viral. Las proteínas tardías son generalmente sintetizadas en las últimas fases del ciclo de replicación viral; se conoce que bICP0, el principal gen IT, está involucrado en la activación de genes tardíos, llevando al ensamblaje y liberación de los nuevos viriones. bICP0 es importante para la infección, ya que se ha demostrado que es expresado en altos niveles durante la fase productiva y que tiene la capacidad de activar transcripcionalmente todos los demás promotores virales (Fraefel y cols., 1994; Wirth y cols., 1992); además, aunque su expresión, no es requerida para la infección en cultivos celulares, estudios realizados usando un mutante negativo de bICP0 demuestran que éste es necesario para una eficiente replicación y formación de placas (Geiser y cols., 2005) (**Figura 4**).

Los pasos del ciclo de latencia y reactivación han sido operacionalmente divididos en tres pasos mayores: establecimiento, mantenimiento y reactivación. El establecimiento del estado de latencia involucra la entrada del genoma viral en una neurona sensorial y la infección aguda; luego, la expresión de genes virales es suspendida o disminuida drásticamente, y en lugar de los 80 genes virales que se expresan durante la infección lítica, en la fase latente solo se da la expresión de dos transcritos: un transcrito Relacionado con Latencia (RL) y el ORF E viral, que son abundantemente expresados en ganglios trigéminos durante la latencia (Bratanich y Jones, 1992). El mantenimiento de la latencia es un paso que puede durar toda la vida del hospedero; técnicamente, se define como un periodo durante el cual no es posible detectar virus infecciosos mediante los procedimientos estándar de aislamiento viral, y en general tampoco hay expresión de los

genes virales necesarios para el establecimiento de una infección productiva (genes de ciclo lítico). Los mensajeros RL son los únicos transcritos virales que son expresados abundantemente durante esta fase, y la evidencia demuestra que la abundante expresión de RNA de RL en neuronas sensoriales potencialmente inhibe bICP0, bloqueando así la infección productiva, promoviendo el establecimiento y mantenimiento de la latencia (Geiser y cols., 2002). La reactivación del estado de latencia es iniciada principalmente por estímulos externos (estrés o inmunosupresión, glucocorticoides, etc.) los cuales favorecen la expresión de genes IT virales; por tanto después de la reactivación viral es posible evidenciar la expresión de genes virales en neuronas sensoriales infectadas y aislar virus infecciosos de ganglio trigémino y secreciones nasales y/o oculares (Jones C., 2003).

La reactivación del estado de latencia inducida por el tratamiento con glucocorticoides (Dexametasona) está ocasionada por un mecanismo indirecto de supresión de la función de los neutrófilos y los linfocitos, llevando a la re-expresión de los genes virales de ciclo lítico (Schwyzer y Ackerman, 1996). Usando la técnica de Microarreglos, se ha reportado un aumento de la expresión de genes tales como: el receptor de la prostaglandina E2, la ciclina D2, el factor de transcripción AP1 y la proteína kinasa activada por mitógenos (MAP-K) en ganglios trigéminos de ratones infectados por el HSV-1 y tratados con dexametasona; postulando así, un papel importante de estos genes en la reactivación viral inducida por corticoides (Higaki y cols., 2002).

EL gen RL en el ciclo de latencia y reactivación

El RNA del RL es expresado abundantemente en neuronas sensoriales durante la infección latente (Kutish y cols., 1990) y su secuencia es transcrita en anti-sentido con respecto a la secuencia de los genes IT y tempranos que codifican el gen bICP0 (Bratanich y cols., 1992). El gen RL tiene dos marcos abiertos de lectura (ORF1 y ORF2) y dos marcos de lectura (RF-B y RF-C) las cuales carecen del codón de iniciación (Metionina). Estudios realizados utilizando RT-PCR del RNA del RL indican que este es madurado en la región C terminal del ORF2 (Hossain y cols., 1995); adicionalmente un anticuerpo dirigido contra la región N terminal del ORF-2 reconoce una proteína codificada por el gen RL (Jiang y cols., 1998; Jiang y cols., 2004). Una región del RNA del RL es poliadenilada (Hossain y cols., 1995) y estudios realizados por Devireddy y Jones (1998) demostraron que esta región recibe una maduración alternativa (splicing alternativo), la cual resulta en la presentación de isoformas proteicas con funciones biológicas diversas y especializadas, las cuales podrían ser importantes durante la latencia (Devireddy y Jones, 1998) (**Figura 4**). Para evaluar la función de estos transcritos alternativos, Devireddy y cols., (2003) clonaron un cDNA (a partir del RNA completo) identificado en ganglio trigémino de un bovino a los 7 días posinfección y compararon éste cDNA con el gen RL. Como resultado de la maduración alternativa, el cDNA contiene un nuevo ORF el cual posee parte del ORF2 fusionado con el ORF1 viral y la sobreexpresión de este nuevo ORF inhibe el promotor de la unidad de transcripción IT (ITut1) del BHV-1, además este ORF estimula el promotor de RL en células transitoriamente transfectadas, reduciendo así la expresión de genes IT durante el establecimiento y posible mantenimiento de la latencia (Devireddy y cols., 2003).

Hossain y cols (1995) demostraron que el gen RL codifica una proteína de aproximadamente 41 KDa, la cual en estudios de inmunoprecipitación, se ha visto que se

asocia con complejos de ciclinas dependientes de quinasas (cdk2) promoviendo así la supervivencia celular (Jiang y cols., 1998). Similarmente estudios de inmunoprecipitación y estudios *in vivo* en conejos infectados con el BHV-1, demostraron que los productos proteicos del gen RL interactúan también con la ciclina A, inhibiendo la entrada de la célula infectada a fase "S" aumentando así la supervivencia de las células infectadas (Schang y cols., 1996). Ciacci-Zanella y cols (1999) reportaron que los productos del gen RL inhiben o disminuyen considerablemente la muerte celular programada inducida químicamente (tratamiento con Fumonisina B1 o C6-ceramida) en cultivos de células de neuroblastoma (Neuro-2A), células de riñón de mono y fibroblastos humanos transfectados transitoriamente con este gen (Ciacci-Zanella y cols., 1999), sugiriendo que el RNA de RL y el producto proteico de este gen actúan en conjunto inhibiendo la expresión de genes de ciclo lítico y disminuyendo la muerte neuronal durante el establecimiento y mantenimiento de la latencia.

Estudios de cotransfección de bICP0 y ADN genómico de BHV-1 en células bovinas, han mostrado que bICP0 induce la infección lítica del BHV-1 y que la capacidad de bICP0 para activar la expresión génica se correlaciona con la estimulación de dicha fase de la infección (Inman y cols., 2001b). Con el objetivo de evaluar el papel del producto del gen RL sobre la infección productiva, Geiser y cols (2002) realizaron estudios, usando plásmidos que contenían el gen completo de RL, bICP0 y ADN genómico de BHV-1 cotransfectando células epidermales bovinas. Los autores encontraron que el gen RL inhibía la capacidad de bICP0 para estimular la infección productiva en una manera dosis dependiente; interesantemente, la inserción de un codón de parada en la región amino terminal del ORF1 no disminuía la represión sobre bICP0, indicando que no es requerida la expresión de la proteína de RL para inhibir la función de bICP0 (Geiser y cols., 2002).

Un estudio más reciente de este RNA llevó a la introducción de un codón de parada en el fragmento XbaI-PstI, el cual tampoco tuvo efecto represor sobre bICP0; además se encontró que la expresión del RNA de RL tipo silvestre y mutado (con codones de parada) se correlaciona de manera positiva con la inhibición de la replicación viral en fibroblastos bovinos y en células de Neuro-2A (Geiser y Jones, 2005). Teniendo en cuenta que el gen RL se expresa en antisentido de bICP0 este resultado permite postular la existencia de un sistema de silenciamiento del RNA, el cual no ha sido completamente dilucidado hasta el momento.

Para evaluar el papel de la expresión de las proteínas RL en la infección viral en un modelo *In vivo*, Inman y cols en 2001, desarrollaron una cepa de BHV-1 la cual contiene tres codones de parada cerca al comienzo del ORF2 del gen RL (**Figura 5**). Los terneros infectados con dicha cepa mutante de RL presentaron menor sintomatología clínica y disminución de la excreción de partículas virales infecciosas en secreciones oculares comparados con terneros infectados con la cepa silvestre y con una cepa mutante en la cual se revirtió dicha mutación. Usando hibridación *in situ*, también se demostró una mayor cantidad de genoma viral en ganglio trigémino y tonsilas en individuos infectados con la cepa silvestre; hallazgo que fue corroborado al demostrar la presencia del RNA de RL usando RT-PCR semicuantitativo (Inman y cols., 2001a; Inman y cols., 2002; Perez y cols., 2005). Contradictoriamente, aunque el mutante RL posee similares características de crecimiento en células MDBK infectadas y en cavidad nasal de los terneros durante la infección aguda, los virus mutantes RL no reactivan del estado de latencia luego del tratamiento inicial con dexametasona (100mg), ni luego de múltiples dosis de dexametasona (25 mg dos y cuatro días después de la primera dosis); dicha reactivación si se evidenció en los terneros infectados, tanto con la cepas silvestre como con la cepa

en la cual se revirtió la mutación (Inman y cols., 2001a; Inman y cols., 2002), sugiriendo de este modo un importante papel de los RL en el establecimiento y/o mantenimiento del estado de latencia viral. Sin embargo, aunque las cepas con la mutante RL no pueden reactivar del estado de latencia luego del tratamiento con dexametasona en los animales infectados, dichas cepas mutantes pueden reactivarse cuando el tejido de la tonsila es sometido a proceso de explante. Éste tipo de reactivación, es un proceso *ex vivo* en el cual la respuesta inmune del individuo no puede participar como factor limitante del crecimiento y dispersión viral. Estos resultados sugieren que el producto del gen RL interfiere con el sistema inmune del hospedero, evitando el reconocimiento de las células infectadas que están entrando en reactivación (Perez y cols., 2005).

Teniendo en cuenta que los RL favorecen la supervivencia celular por distintas rutas celulares, Lovato y col., (2003) usando la técnica de TUNEL (Terminal dUTP Nick End Labelling) y usando anticuerpos que reconocen el clivaje de la caspasa 3, evaluaron los niveles de apoptosis en neuronas del ganglio trigémino de animales infectados con la cepa mutante de RL y con una cepa silvestre. Luego de 14 días de infección, se encontró que los animales infectados con la cepa mutante presentaban mayores niveles de apoptosis (mayor número de células TUNEL+ y mayor clivaje de caspasa 3) en las células neuronales del ganglio trigémino, comparados con los terneros infectados con la cepa silvestre; por otro lado, los animales infectados con la cepa silvestre tuvieron mayores niveles de ADN viral en ganglio trigémino durante la infección aguda que los infectados con la cepa mutante, confirmando que las propiedades anti-apoptóticas del producto de los genes RL inhiben la muerte celular y consecuentemente promueven el establecimiento de la latencia (Lovato y cols., 2003). Similarmente, Henderson y cols., (2004) utilizando un sistema de infección *in vitro* en células Neuro-2A demostraron que el

producto del gen RL inhibe el clivaje de las caspasas 3 y 9 durante la infección productiva, sugiriendo que durante ésta fase de la infección se da una regulación negativa de las propiedades antiapoptóticas del producto del gen RL (Henderson y cols., 2004a).

Recientes estudios desarrollados por Meyer y cols., (2007) usando un sistema doble híbrido bacteriano permitió identificar que una proteína de fusión RL interactúa con dos proteínas que pueden inducir apoptosis: Bid, la cual une la vía extrínseca con la vía intrínseca de apoptosis y con Cdc42 un miembro de la familia de las Rho-GTPasas, el cual induce apoptosis celular bajo condiciones de estrés, sugiriendo que esta interacción con RL disminuye la muerte celular inducida por vía citotóxica en neuronas infectadas y por el aumento del estrés celular inducido por la infección latente. Adicionalmente, se demostró que la proteína de RL interactúa con C/EBP- β el cual es un potente factor transcripcional encargado de la regulación de ciclo celular y de la diferenciación. Durante la infección productiva, hay una correlación positiva entre la expresión de C/EBP y la expresión de genes virales en ganglio trigémino, 4 y 7 días posinfección cuando la expresión de genes y partículas virales es detectada; además, C/EBP aumenta la formación de placas en cultivos celulares, sugiriendo que C/EBP aumenta la activación de genes del BHV-1 directa o indirectamente. Por tanto, además de inhibir la apoptosis, la interacción de la proteína de RL con C/EBP reprime la infección productiva, promoviendo el establecimiento de latencia (Meyer y cols., 2007).

El gen RL del BHV-1 comparte algunas propiedades tanto estructurales como funcionales con los Transcritos Asociados a Latencia (LATs) del Virus Herpes simplex-1 (HSV-1);

entre ellas está que ambos son transcritos en una secuencia antisentido de bICP0 e ICP0, y ambos son abundantemente expresados durante la latencia (Devireddy y Jones, 1998; Hossain y cols., 1995; Kutish y cols., 1990; Schang y Jones, 1997; Winkler y cols., 2000b); además se sabe que al igual que el RL los LATs tienen una importante función antiapoptótica (Branco y Fraser, 2005), y en general los dos transcritos cumplen importantes funciones en el ciclo de latencia y reactivación viral. Sin embargo, a diferencia del RL del BHV-1, hasta la fecha se considera que los LATs de HSV-1 no codifican ninguna proteína con función conocida.

Papel del ORF-E en la infección latente

El ORF-E es un pequeño ORF de 135 aminoácidos que está presente dentro del promotor del RL; es un transcrito antisentido del transcrito RL y se ubica corriente abajo del gen que codifica el activador transcripcional bICP0 pero no lo sobre lapa. El promotor RL contiene múltiples motivos que actúan en *cis* y tiene un dominio específico de unión neuronal (NBS) (Jones y cols., 1990; Bratanich y Jones, 1992; Delhon y Jones, 1997) **(Figura 6)**.

Usando RT-PCR se demostró la presencia de un transcrito poliadenilado codificado por el ORF-E durante la infección latente en ganglio trigémino de animales, en cultivos celulares con infección productiva y en animales con infección aguda. Luego, la secuencia codificante del ORF-E fue clonada en un vector y se expresó como una proteína de fusión unida a la proteína verde fluorescente (GFP). La proteína de fusión ORF-E/GFP se expresó principalmente en el núcleo de células neuronales murinas o humanas transfectadas; en contraste, esta proteína de fusión se expresa tanto en núcleo

como en citoplasma de células no neuronales (Inman y cols., 2004). Estos estudios indican que un transcrito del ORF-E es consistentemente expresado durante la latencia; además permiten postular que el producto génico codificado por el ORF-E regula en algún aspecto el ciclo de latencia y reactivación. Las últimas aproximaciones experimentales se han enfocado a la expresión de la proteína del ORF-E en un sistema de baculovirus, con el objetivo de producir anticuerpos monoclonales los cuales sean útiles para detectar la expresión de la proteína luego de la infección tanto *in vitro* como *in vivo*.

La respuesta inmune y la latencia del BHV-1

La presencia de infiltrado linfoide en estrecha asociación con neuronas sensoriales en ganglios trigéminos de animales con infección latente, sugiere la participación del sistema inmune del individuo, promoviendo el establecimiento de la latencia probablemente por inducción de un ambiente no permisivo para la replicación viral. Estudios *in vivo* demuestran que luego de que se establece la infección latente en terneros, es común encontrar focos de infiltrados linfocíticos en ganglios trigéminos (Inman y cols., 2001; Perez y cols., 2005); lo cual ha sido corroborado, usando tinción con hematoxilina-eosina demostrando la presencia de una respuesta inmune celular persistente en ganglios trigéminos de estos individuos (Winkler et al., 2002). Se ha postulado que la persistencia de la inmunidad celular es debida a la expresión de proteínas virales en algunas neuronas o en células satélites, en las cuales debido a la mínima tasa de replicación, es común encontrar la presencia de focos de infiltrados leucocitarios. Esta mínima tasa de transcripción se ha denominado “reactivación molecular espontanea” (Feldman y cols.,

2002), y resultados de estudios *in vivo*, permiten postular la existencia de este fenómeno durante la latencia por BHV-1 (Winkler y cols., 2002; Jones y cols., 2006).

Durante la persistencia del sistema inmune en el ganglio trigémino, la expresión de citoquinas puede influir de manera drástica promoviendo tanto la supervivencia como la muerte neuronal, llevando a prevenir la reactivación de la infección en las neuronas infectadas. Algunos estudios de infección por HSV-1 han demostrado que el Interferón- α (IFN- α) y el IFN- β juegan un papel importante previniendo la reactivación y controlando la presentación de lesiones herpéticas recurrentes (Mikloska y Cunningham, 2001); estudios realizados por Winkler y cols., (2002) reportaron la presencia de IFN- α e Interleuquina 2 en ganglios trigéminos durante la infección latente por BHV-1 en bovinos; estos resultados indican que la relación virus-huésped puede tener múltiples funciones y factores virales determinantes durante el ciclo de latencia y reactivación viral (Winkler y cols., 2002).

A diferencia de la regulación negativa del sistema inmune inducida por los LATs de HSV-1, la cual evita la apoptosis de células neuronales infectadas (inducida por las células T CD8+) (Branco y Fraser, 2005), hasta la fecha no se ha dilucidado completamente el papel del gen RL y el ORF-E, sus transcritos o sus productos génicos en la regulación de la infiltración leucocitaria y la muerte de células infectadas mediada por el sistema inmune. Recientemente, Perez y cols., (2006) usando tinción con hematoxilina-eosina evaluaron las diferencias en la infiltración de células inflamatorias en ganglios trigéminos de animales infectados con un virus tipo silvestre y un virus con una mutación en el gen RL (codón de parada mencionado anteriormente); encontrando un mayor infiltrado inflamatorio en los ganglios de animales infectados con la cepa silvestre, comparados con los infectados con la cepa RL mutante; además, usando PCR se encontró una menor cantidad de ADN viral en ganglios de animales infectados con la cepa RL mutante. Estos

resultados sugieren que la infiltración de células inflamatorias es el resultado de la replicación y la expresión de genes virales en el ganglio trigémino de los animales infectados (Perez y cols., 2006). Tomando en cuenta éstos resultados y sabiendo que la infección por la cepa RL mutante induce un aumento de la apoptosis (Lovato y cols., 2003), los autores sugieren que el aumento de la muerte celular inducida por el virus mutante lleva a un aumento de la respuesta inflamatoria al término de la infección aguda; consecuentemente, el número de neuronas infectadas se reduce, ocasionando una disminución considerable de la cantidad de ADN viral en ganglios trigéminos y una dramática disminución en la frecuencia de reactivación viral del estado de latencia. Sin embargo, aunque hay una asociación entre la presencia del gen RL y el infiltrado inflamatorio, los estudios actuales no permiten concluir cual es el mecanismo por el cual el gen RL o sus productos regulan la infiltración leucocitaria (Perez y cols., 2006).

Establecimiento de latencia postvacunación

En la profilaxis y el control de la infección por el BHV-1, el uso de vacunas de virus vivo atenuado se ha constituido en uno de los principales factores de riesgo para el establecimiento de portadores en estado latente. En un estudio realizado por Castrucci y cols., (2002) se evaluó el potencial de cinco vacunas comerciales de virus vivo para establecer infección latente en individuos posvacunación y reactivar luego del tratamiento con dexametasona (0.1 mg/kg, vía intravenosa durante 5 días). En este estudio fue posible aislar el virus vacunal en tres de las cinco vacunas estudiadas, preparadas a partir de virus vivo modificado; sin embargo, ninguno de los animales presentó signos clínicos de la infección luego de la reactivación experimental, o luego de un nuevo reto experimental con una cepa de campo. Además, usando análisis de polimorfismos de

restricción, los autores encontraron que los virus reexcretados diferían ligeramente de la vacunal parental posiblemente debido a un fenómeno de recombinación endógena del virus (Castrucci y cols., 2002).

El uso de vacunas vivas marcadoras (con delección en glicoproteínas, principalmente la gE) se ha extendido en el ámbito internacional, principalmente en países en vía de erradicación de la enfermedad. Sin embargo, múltiples estudios han presentado que dichas cepas vacunales pueden generar latencia en los individuos vacunados (Kaashoek y col., 1998; Mars y cols., 2000; Castrucci y cols., 2002), generando portadores virales latentes seronegativos (Lemaire y cols., 2001) y luego de procesos de recombinación intraespecífica con cepas silvestres del virus se pueden generar cepas que *in vivo*, poseen una virulencia mayor que sus cepas parentales vacunales, demostrando que estos fenómenos de recombinación pueden restaurar la virulencia de las cepas vacunales gE negativas (Muylkens y cols. 2006).

Similarmente, el uso de vacunas atenuadas termosensibles se ha reportado que puede generar infección latente (Hage y cols., 1998). Estudios realizados por Lemaire y cols., (2000a) demuestran que es posible generar infección latente luego de la administración de una cepa vacunal en individuos inmunizados pasivamente o con anticuerpos maternos (Lemaire y cols., 2000a). Además, estos autores reportaron que estos individuos pueden reactivar el virus y ser fuente de infección para otros individuos seronegativos (Lemaire y cols., 2000b). Teniendo en cuenta que toda vacuna de virus vivo es susceptible de inducir estados de latencia, los diferentes países con programas de erradicación han introducido el uso de vacunas recombinantes basadas en subunidades virales, principalmente usando la gD viral, la cual es altamente inmunogénica y siendo solo proteína no es factible el desarrollo de infección y latencia (van Drunen Littel-van den Hurk S, 2006)

Conclusiones

El fenómeno de latencia de la infección por el BHV-1 es el punto más crítico en los planes de prevención, control y erradicación de la infección, ya que la biología propia del virus le permite evadir la respuesta inmune del individuo, permanecer durante toda la vida del animal y reactivar bajo algunas situaciones para alcanzar a los nuevos hospederos. Este fenómeno de latencia se desarrolla principalmente en el ganglio trigémino de los individuos luego de la primoinfección. En estos ganglios infectados hay una abundante expresión del gen RL y el ORF-E los cuales, se postulan como los encargados de regular el complejo ciclo de latencia y reactivación de la infección.

Basado en el conocimiento sobre los genes implicados en este proceso, Jones y cols., (2006) plantearon el siguiente modelo de cómo estos genes regulan el ciclo de reactivación y latencia en el hospedero (**Figura 7**).

Cuando un virus mutante de RL infecta una neurona que tiene todos los factores celulares necesarios para soportar la amplificación del genoma y la expresión de genes virales (neurona permisiva), frecuentemente, esta neurona muere por apoptosis inducida por el daño viral y/o por citotoxicidad mediada por linfocitos. Dicha neurona permisiva, tiene mayor probabilidad de sobrevivir si la infección ocurre por una cepa silvestre del BHV-1 debido a la acción reguladora de las proteínas y quizás de los RNAs expresados por el gen RL y posiblemente del ORF-E. Luego de la interacción con esta neurona permisiva se establece una latencia en la cual es posible encontrar alto número de copias de genoma viral en ellas, y las cuales pueden reactivar de su estado de latencia luego del tratamiento con dexametasona.

Cuando un BHV-1 o una cepa mutante de RL infectan una neurona “No permisiva”, no se genera una eficiente amplificación genómica ni expresión génica; consecutivamente, no se da el daño neuronal y se establece el estado de latencia, aun en ausencia de expresión de las proteínas de RL. Contrario a lo que ocurre en la neurona permisiva, luego del tratamiento con dexametasona, no se da la reactivación de la infección latente en la neurona no permisiva, debido a los bajos niveles de ADN presentes y a que el ambiente neuronal no soporta la expresión de genes necesarios para que se dé la reactivación.

Aunque los productos proteicos del gen RL regulan el ciclo de replicación y latencia, los estudios mencionados en esta revisión sugieren que los RNAs codificados por el gen RL inhiben la expresión de bICP0 y previene la muerte celular, dicha inhibición promueve el establecimiento y mantenimiento de la latencia; además, este gen y sus productos interactúan con ciclinas en neuronas de ganglios trigéminos infectados prolongando la supervivencia de la neurona infectada.

Bibliografía

Babiuk, L.A., van Drunen Littel-van den Hurk S., Tikoo, S.K., 1996. Immunology of Bovine herpesvirus 1 infection. *Vet Microbiol.* 53, 31-42.

Bielanski, A., Loewen, K.G., Hare W.C.D. 1988. Inactivation of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) from in vitro infected bovine semen. *Theriogenology* 30, (4):649-656.

Bielanski, A., Dubuc, C. 1994. In-Vitro Fertilization and Culture of Ova from Heifers Infected with Bovine Herpesvirus-1 (BHV-1). *Theriogenology* 41, 1211-1217.

Branco, F.J., Fraser, N.W., 2005. Herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript expression protects trigeminal ganglion neurons from apoptosis. *J. Virol.* 79, 9019-9025.

Bratanich, A.C., Jones, C. 1992. Localization of cis-acting sequences in the latency-related promoter of bovine herpesvirus 1 which are regulated by neuronal cell type factors and immediate-early genes. *J. Virol.* 68, 6099-6106.

Büchen-Osmond, C., 1995. Alphabetical List of ICTV approved Virus Families and Genera. Última actualización: 8 de abril de 1998. Revisado Febrero de 2007.

Castrucci, G., Frigeri, F., Salvatori, D., Ferrari, M., Lo Dico, M., Rotola, A., Sardomini, Q., Petrini, S., Cassai, E., 2002. A study on latency in calves by five vaccines against bovine herpesvirus-1 infection. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 25, 205-215.

Ciacchi-Zanella, J., Stone, M., Henderson, G., Jones, C., 1999. The latency-related gene of bovine herpesvirus 1 inhibits programmed cell death. *J. Virol.* 73, 9734-9740.

CIAT, Informes de Salud Animal, 1972-1975

Connolly, S.A., Whitbeck, J.J., Rux, A.H. Krummenacher, C., van Drunen Littel-van den Hurk S., Cohen, G.H., Eisenberg, R.J., 2001. Glycoprotein D homologues in herpes simplex virus type 1, pseudorabies virus and bovine herpesvirus-1 bind directly to human HveC (nectin-1) with different affinities. *Virology.* 280, 7-18.

Dasika, D.K., Letchworth, III G.J., 1999. Cellular expression of bovine herpesvirus-1 gD inhibits cell-to-cell spread of two related viruses without blocking their primary infection. *Virology*. 254, 24-36.

Dasika, D.K., Letchworth, III G.J., 2000. Homologous and heterologous interference requires bovine herpesvirus-1 gD on the cell surface during virus entry. *J. Gen. Virol.* 81, 1041-1049.

Delhon, G., Jones, C., 1997. Identification of DNA sequences in the latency related promoter of bovine herpes virus type 1 which are bound by neuronal specific factors. *Virus Res.* 51, 93–103.

Devireddy, L.R., Jones, C., 1998. Alternative splicing of the latency related transcript of bovine herpesvirus 1 yields RNAs containing unique open reading frames. *J. Virol.* 72, 7294–7301.

Devireddy, L.R., Jones, C.J., 1999. Activation of caspases and p53 by bovine herpesvirus 1 infection results in programmed cell death and efficient virus release. *J. Virol.* 73, 3778–378

Devireddy, L.R., Zang, Y., Jones, C., 2003. Cloning and initial characterization of an alternatively spliced transcript encoded by the bovine herpes virus 1 latency-related gene. *J. Neurovirol.* 9, 612-622.

Fraefel, C., Zeng, J., Choffat, Y., Engels, M., Schwyzer, M., Ackermann, M., 1994. Identification and zinc dependence of the bovine herpesvirus 1 transactivator protein BICP0. *J. Virol.* 68, 3154–3162.

Fuchs, M., Hubert, P., Detterer, J., Rziha, H.J., 1999. Detection of bovine herpesvirus type 1 in blood from naturally infected cattle by using a sensitive PCR that discriminates between wild-type virus and virus lacking glycoprotein E. *J. Clin. Microbiol.* 37, 2498–2507.

Geiser, V., Inman, M., Zhang, Y., Jones, C., 2002. The latency-related gene of bovine herpesvirus-1 can inhibit the ability of bICP0 to activate productive infection. *J. Gen. Virol.* 83, 2965-2971.

Geiser, V., Jones, C., 2005. Localization of sequences within the latency-related gene of bovine herpesvirus 1 that inhibit mammalian cell growth. *J Neurovirol.* 11, 563-570.

Geiser, V., Zhang, Y., Jones, C., 2005. Characterization of a BHV-1 strain that does not express the major regulatory protein, bICP0. *J. Gen. Virol.* 86, 1987–1996.

Geraghty, R.J., Krummenacher, C., Cohen, G.H., Eisenberg, R.J., Spear, P.G. 1998. Entry of alphaherpesvirus mediated by poliovirus receptor-related protein-1 and poliovirus receptor. *Science.* 280, 1618-1620.

Hage, J. J., Glas, R.D., Westra, H.H., Maris-Veldhuis, M. A., van Oirschot, J.T., Rijsewijk, F.A., 1998. Reactivation of latent bovine herpesvirus 1 in cattle seronegative to glycoproteins gB and gE. *Vet. Microbiol.* 60, 87–98.

Hanon, E., Keil, G., van Drunen Littel-van den Hurk S., Gabriel, P., Vanderpalsschen, A., Rijsewijk, F.A., Babiuk, L.A., Pastoret, P.P. 1999. Bovine herpesvirus-1-induced apoptotic cell death: role of glycoprotein D. *Virology.* 257, 191-197.

Hanon, E., Meyer, G., Vanderpalsschen, A., Dessy-Doize, C., Thirty, E., Pastoret, P.P. 1998. Attachment but not penetration of bovine herpesvirus-1 is necessary to induce apoptosis in target cells. *J. Virol.* 72, 7638-41.

Henderson, G., Perng, G.C., Nesburn, A.B., Wechsler, S.L., Clinton, C. 2004a. The latency-related gene encoded by bovine herpesvirus 1 can suppress caspase 3 and caspase 9 cleavage during productive infection. *J. Neurovirol,* 10, 64-70.

Henderson, G., Zhang, Y., Inman, M., Jones, D., Jones, C., 2004b. Infected cell protein 0 encoded by bovine herpesvirus 1 can activate caspase 3 when overexpressed in transfected cells. *J. Gen. Virol.* 85, 3511-3516.

Higaki, S., Gebhardt, B.M., Lukiw, W.J., Thompson, H.W., Hill, J.M. 2002. Effect of Immunosuppression on Gene Expression in the HSV-1 Latently Infected Mouse Trigeminal Ganglion. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.,* 43: 1862 – 1869.

Hossain, A., Schang, L.M., Jones, C., 1995. Identification of gene products encoded by the latency-related gene of bovine herpesvirus 1. *J. Virol.* 69, 5345–5352.

Hunter, E., 2001. Virus Assembly. Chapter 8. In: Knipe, DM., Howley, PM., Fields` Virology edition 4th, Vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. Pp 171-197.

Inman, M., Lovato, L., Doster, A., Jones, C., 2001a. A mutation in the latency-related gene of bovine herpesvirus 1 leads to impaired ocular shedding in acutely infected calves. *J. Virol.* 75, 8507–8515.

Inman, M., Zhang, Y., Geiser, V., Jones, C. 2001b. The zinc ring finger in the bICP0 protein encoded by bovine herpes virus-1 mediates toxicity and activates productive infection. *Journal of General Virology* 82, 483-492.

Inman, M., Lovato, L., Doster, A., Jones, C., 2002. A mutation in the latency related gene of bovine herpesvirus 1 interferes with the latency-reactivation cycle of latency in calves. *J. Virol.* 76, 6771–6779.

Inman, M., Zhou, J., Webb, H., Jones, C., 2004. Identification of a novel transcript containing a small open reading frame that is expressed during latency, and is antisense to the latency related gene of bovine herpes virus 1 (BHV-1). *J. Virol.* 78, 5438–5447.

Jiang, Y., Hossain, A., Winkler, M.T., Holt, T., Doster, A., Jones, C., 1998. A protein encoded by the latency-related gene of bovine herpesvirus 1 is expressed in trigeminal ganglionic neurons of latently infected cattle and interacts with cyclin-dependent kinase 2 during productive infection. *J. Virol.* 72, 8133–8142.

Jiang, Y., Inman, M., Zhang, Y., Posadas, N.A., Jones, C., 2004. A mutation in the latency related gene of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) inhibits protein expression of a protein from open reading frame 2 (ORF-2) and an adjacent reading frame during productive infection. *J. Virol.* 78, 3184–3189.

Jones, C., Delhon, G., Bratanich, A., Kutish, G., Rock, D., 1990. Analysis of the transcriptional promoter which regulates the latency-related transcript of bovine herpesvirus 1. *J. Virol.* 64, 1164–1170.

Jones, C., 2003. Herpes Simplex Virus Type 1 and Bovine Herpesvirus 1 Latency. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 79-95.

Jones, C., Geiser, V., Henderson, G., Jiang, Y., Meyer, F., Perez, S., Zhang, Y., 2006. Functional analysis of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) genes expressed during latency. *Vet. Microbiol.* 113, 199-210.

Jubb, K., 1993. *Pathology of domestic animals*. 4th edition. Academic Press Inc. San Diego, California, PP 177-179.

Kaashoek, M.J., Rijsewijk, F.A., Ruuls, R.C., Keil, G.M., Thiry, E., Pastoret, P.P., van Oirschot, J.T. 1998. Virulence, immunogenicity and reactivation of bovine herpesvirus 1 mutants with a deletion in the gC, gG, gI, gE, or in both the gI and gE gene. *Vaccine.* 16, 802-809.

Kutish, G., Mainprize, T., Rock, D., 1990. Characterization of the latency-related transcriptionally active region of the bovine herpesvirus 1 genome. *J. Virol.* 64, 5730–5737.

Lemaire, M., Meyer, G., Branowsky, E., Schynts, F., Wellemans, G., Kerkhofs, P., Thiry, E., 2000a. Production of Bovine Herpesvirus Type 1-Seronegative Latent Carriers by Administration of a Live-Attenuated Vaccine in Passively Immunized Calves. *J. Clin. Microbiol.* 38, 4233-4238.

Lemaire, M., Weynants, V., Godfroid, J., Schynts, F., Meyer, G., Letesson, J.J., Thiry, E., 2000b. Effects of bovine herpesvirus type 1 infection in calves with maternal antibodies on immune response and virus latency. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1885–1894.

Lemaire, M., Schynts, F., Meyer, G., Georgin, G.P., Branowsky, E., Gabriel, A., Ros, C., Belak, S., Thiry, E., 2001. Latency and reactivation of a glycoprotein E negative bovine herpesvirus type 1 vaccine: influence of virus load and effect of specific maternal antibodies. *Vaccine.* 19, 4795-4804.

Li, Y., van Drunen Littel-van den Hurk S., Babiuk, L.A., Liang, X. 1995. Characterization of cell binding properties of bovine herpesvirus-1 glycoprotein B, C and D: Identification of a dual cell binding cell function of gB. *J. Virol.* 69, 4758-4768.

Li, Y., Liang, X., van Drunen Littel-van den Hurk S., Attah-Poku, S., Babiuk, L.A., 1996. Glycoprotein Bb, N-terminal subunit of bovine herpesvirus-1 glycoprotein B, can bind to heparan sulfate on the surfaces of Madin-Darby bovine kidney cells. *J. Virol.* 70, 2032-2037.

Lovato, L., Inman, M., Henderson, G., Doster, A., Jones, C., 2003. Infection of cattle with a bovine herpesvirus 1 (BHV-1) strain that contains a mutation in the latency related gene leads to increased apoptosis in trigeminal ganglia during the transition from acute infection to latency. *J. Virol.* 77, 4848–4857.

Mars, M.H., de Jong, M.C.M., Franken, P., van Oirschot, J.T., 2001. Efficacy of a live glycoprotein E-negative bovine herpesvirus 1 vaccine in cattle in the field. *Vaccine*. 19, 1924-1930.

Meurens, F., Schynts, F., Keil, G.M., Muylkens, B., Vanderplasschen, A., Gallego, P., Thiry, E. 2004. Superinfection prevents recombination of the alphaherpesvirus bovine herpesvirus-1. *J Virol.* 78, 3872-3879.

Meyer, F., Perez, S., Geiser, V., Sintek, M., Inman, M., Jones, C., 2007. A protein encoded by the bovine herpesvirus 1 latency-related gene interacts with specific cellular regulatory proteins, including CCAAT enhancer binding protein alpha. *J. Virol.* 81, 59-67.

Misra, V., Walker, S., Hayes, S., O'Hare, P., 1995. The bovine herpesvirus alpha gene trans-inducing factor activates transcription by mechanisms different from those of its herpes simplex virus type 1 counterpart VP16. *J. Virol.* 69, 5209–5216.

Molano, D., Rodríguez, J.L., Ramírez, G., Villamil, L.C. 1996. Caracterización electroforética e inmunológica de una cepa de campo del virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina y su comparación con cepas de referencia. *Rev Med Vet Zootec.* 44:35-8.

Muylkens, B., Meurens, F., Schynts, F., Farnir, F., Pourchet, A., Bardiau, M., Gogev, S., Thiry, J., Cuisenaire, A., Vanderplasschen, A., Thiry, E., 2006. Intraspecific bovine herpesvirus 1 recombinants carrying glycoprotein E deletion as a vaccine marker are virulent in cattle. *J Gen Virol.* 87, 2149-2154.

Mweene, A.S., Okazaki, K., Kida, H., 1996. Detection of viral genome in non-neural tissues of cattle experimentally infected with bovine herpesvirus 1. *Jpn. J. Vet. Res.* 44, 165–174.

Perez, S., Inman, M., Doster, A., Jones, C., 2005. Latency-related gene encoded by bovine herpesvirus 1 promotes virus growth and reactivation from latency in tonsils of infected calves. *J. Clin. Microbiol.* 43, 393–401.

Perez, S., Lovato, L., Zhou, J., Doster, A., Jones, C., 2006. Comparison of inflammatory infiltrates in trigeminal ganglia of cattle infected with wild-type Bovine herpesvirus 1 versus a virus strain containing a mutation in the LR (latency-related) gene. *J. NeuroVirol.* 12, 392-397.

Pidone, C.L., Galosi, C.M., Etcheverrigaray, E.M., 1999. Herpesvirus Bovinos 1 y 5. *Analecta Veterinaria*; 19, 40-50

Piedrahita, D., Ramírez, G., Vera, V. 2005. Detección y caracterización por métodos moleculares de aislamientos colombianos de Herpesvirus bovino tipo 1. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia.* 52, 122-127.

Rijsewijk, F.A., Kaashoek, M.J., Landeveld, J.P., Melen, R., Judek, J., Bienkowska-Szewczyk, K., Maris-Veldhuis, M.A., van Oirschot, J.T. 1999. Epitopes of glycoprotein C of bovine herpesvirus-1 that allow differentiation between BHV-1.1 and BHV-1.2 strains. *J. Gen. Virol.* 80, 1477-83.

Rock, D., Lokensgard, J., Lewis, T., Kutish, G., 1992. Characterization of dexamethasone-induced reactivation of latent bovine herpesvirus 1. *J. Virol.* 66, 2484–2490.

Roizman, B., Pellett, P.E., 2001. The family herpesviridae: A brief introduction. In *Fields Virology*, Fourth edition. Knipe DM and Howley PM, Editors. Lippincott Williams & Wilkins. USA. pp.2381-2397.

Schang, L.M., Hossain, A., Jones, C., 1996. The latency-related gene of bovine herpesvirus 1 encodes a product which inhibits cell cycle progression. *J. Virol.* 70, 3807–3814.

Schang, L.M., Jones, C., 1997. Analysis of bovine herpesvirus 1 transcripts during a primary infection of trigeminal ganglia of cattle. *J. Virol.* 71, 6786–6795.

Schroder, C., Keil, G.M., 1999. Bovine herpesvirus-1 requires glycoprotein H for infectivity and direct spreading, and glycoproteins gH(W450) and gB for gD-independent cell-to-cell spread. *J. Gen. Virol.* 80, 57-61.

Schwytzer, M., Ackerman, M., 1996. Molecular virology of ruminant herpesviruses. *Vet. Microbiol.* 53, 17-29.

Sheffy, B.E., Davies, D.H., 1972. Reactivation of a bovine herpesvirus after corticosteroid treatment. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 140, 974–976.

Tyler, K.L., Nathanson, N., 2001. Pathogenesis of Viral infections. Chapter 7. In: Knipe, D.M., Howley, P.M., Fields` Virology edition 4th, Vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. Pp 199-243.

van Drunen Littel-van den Hurk S. 2006. Rationale and perspectives on the success of vaccination against bovine herpesvirus-1. *Vet Microbiol.* 113, 275-82.

Voguel, F.S.F., Florez, E.F., Weiblen, R., Winkelmann, R., Moraes, M.P., Bragança, J.F.M., 2004. Intrapreputial infection of young bulls with bovine herpesvirus type 1.2 (BHV-1.2): acute balanoposthitis, latent infection and detection of viral DNA in regional neural and non-neural tissues 50 days after experimental reactivation. *Vet. Microbiol.* 85, 185-196.

Winkler, M.T., Doster, A., Jones, C., 1999. Bovine herpesvirus 1 can infect CD4(+) T lymphocytes and induce programmed cell death during acute infection of cattle. *J. Virol.* 73, 8657–8668.

Winkler, M.T., Schang, L.S., Doster, A., Holt, T., Jones, C., 2000a. Analysis of cyclins in trigeminal ganglia of calves infected with bovine herpesvirus-1. *J. Gen. Virol.* 81, 2993–2998.

Winkler, M.T.C., Doster, A., Jones, C., 2000b. Persistence and reactivation of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) in tonsils of latently infected cattle. *J Virol.* 74, 5337–5346.

Winkler, M.T., Doster, A., Sur, J.H., Jones, C., 2002. Analysis of bovine trigeminal ganglia following infection with bovine herpesvirus 1. *Vet. Microbiol.* 86, 139–155.

Wirth, U.V., Fraefel, C., Vogt, B., Vlcek, C., Paces, V., Schwyzer, M., 1992. Immediate-early RNA 2.9 and early RNA 2.6 of bovine herpesvirus 1 are 3' coterminal and encode a putative zinc finger transactivator protein. *J. Virol.* 66, 2763–2772.

Wirth, U.V., Gunkel, K., Engels, M., Schwyzer, M., 1989. Spatial and temporal distribution of bovine herpesvirus 1 transcripts. *J. Virol.* 63, 4882-4889.

Wirth, U.V., Vogt, B., Schwyzer, M., 1991. The three major immediate-early transcripts of bovine herpesvirus 1 arise from two divergent and spliced transcription units. *J. Virol.* 65, 195–205.

Wittels, M., Spear, G., 1990. Penetration of cells by herpes simplex virus does not require a low pH-dependent endocytic pathway. *Virus Res.* 18, 271–290.

Wylter R., Engels, M., Schwyzer, M. 1989. Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis (BHV1). In: *Herpesvirus Diseases of Cattle, Horses and Pigs*, Wittmann G., ed. Kluwer Academic Publishers, Boston, USA, 1-72.

Wylter, R., Engels, M., Schwyzer, M. 1995. Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis (BHV1) Institute of Virology. University of Zurich p 1-55 1995.

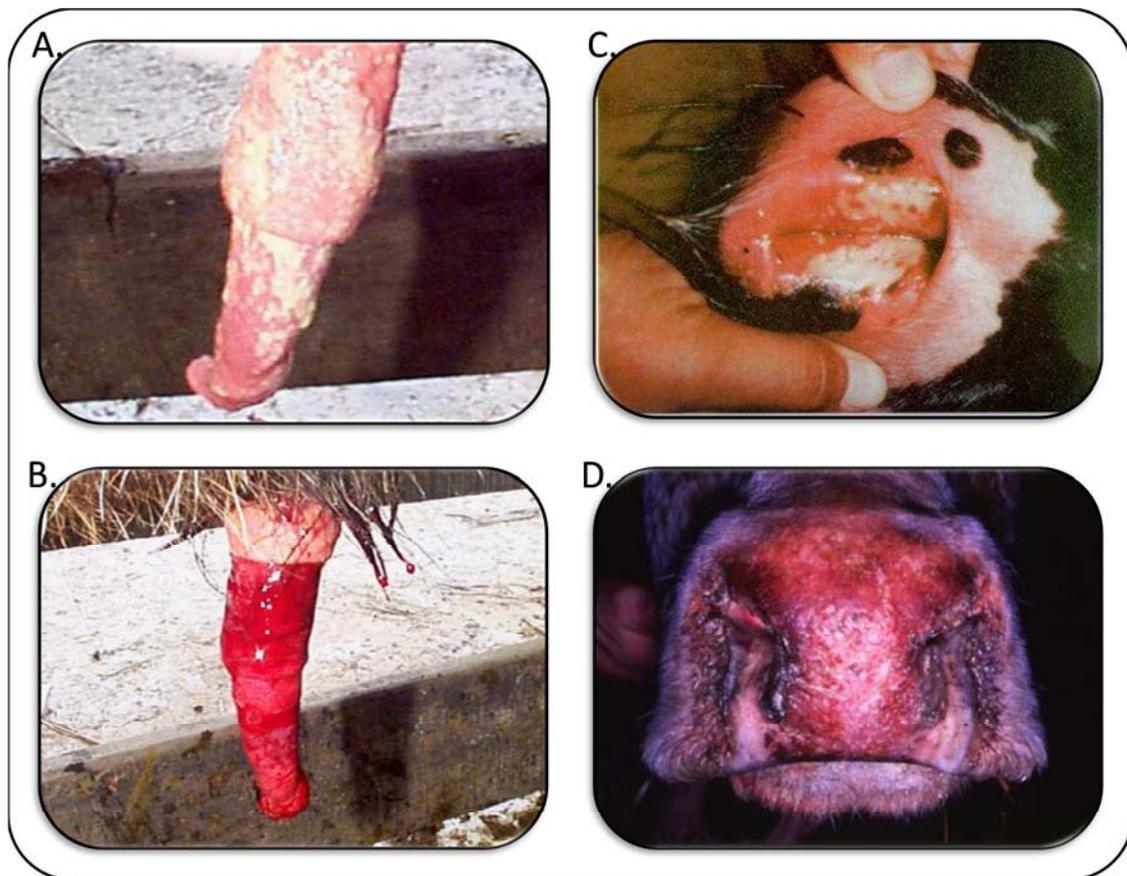


Figura 1. Lesiones clínicas causadas por la infección por el BHV-1. (A) y (B), lesiones en pene y prepucio de un toro (tomado de Voguel y cols., 2004); Nótese la coalescencia de las vesículas y la presencia de exudado fibrinoso a los 4 días posinfección (A); y la extensa hemorragia y ulceración en la mucosa peneana y prepucio del mismo toro a los 9 días posinfección (B). (C), Vulvovaginitis pustular en una hembra causada por el BHV-1; se evidencia la presentación de pústulas y focos hemorrágicos en la mucosa vulvar. (D), Lesiones características y secreción nasal en cavidad nasal de un bovino; la presencia de secreción mucopurulenta y el enrojecimiento del hocico es un signo característico.

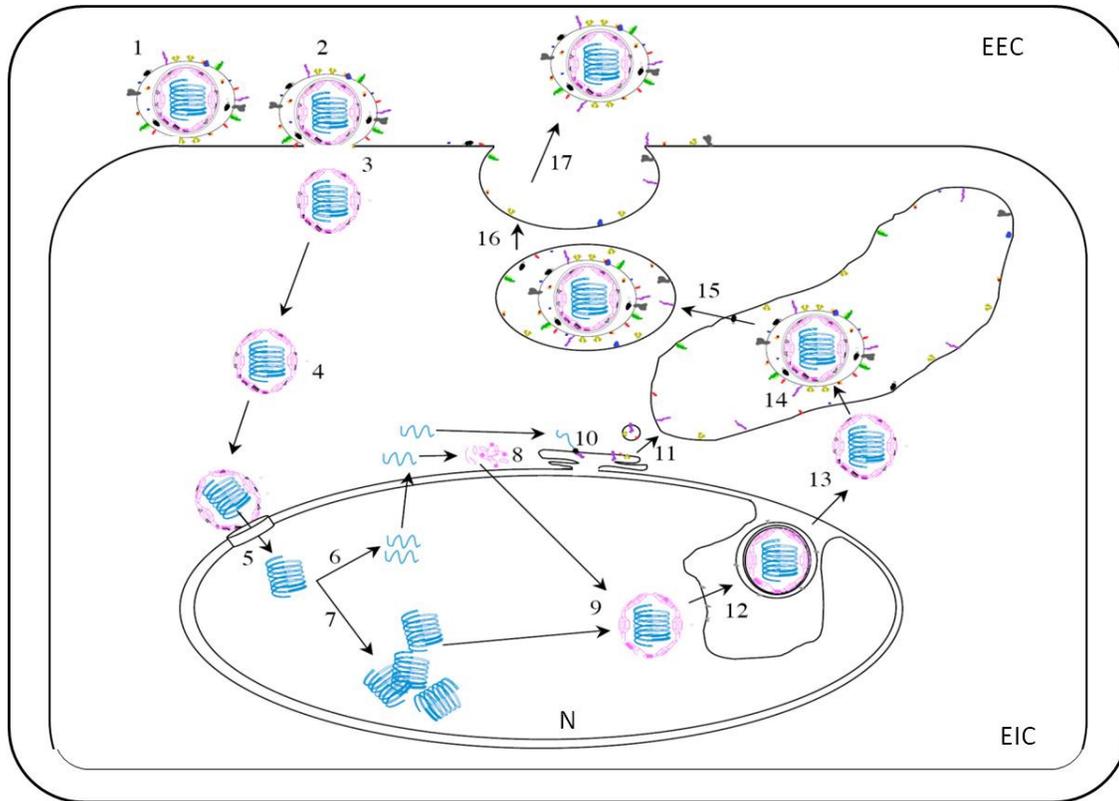


Figura 2. Ciclo de replicación del BHV-1. Adhesión de los viriones del BHV-1 a la membrana celular (1); Fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática (2); Liberación de la nucleocápside en el citoplasma (3); transporte de la nucleocápside hacia el núcleo e interacción con la membrana nuclear (4); Internalización del genoma en el núcleo celular (5); Transcripción del ADN (6); Replicación secuencial del genoma viral (7); Transporte del RNA viral al citoplasma para ser traducido (8); Las proteínas estructurales son redirigidas al núcleo para la encapsidación (9); Las proteínas de la envoltura son transportadas al retículo endoplasmático (10) y son subsiguientemente incorporadas en diferentes membranas celulares, y direccionadas a través de la vía secretoria (11, 15, 16); La nucleocápside deja el núcleo por gemación en la cara interna de la membrana nuclear (12) y fusión con la membrana nuclear externa (13); El virus adquiere su envoltura secundaria y tegumento en el aparato de Golgi (14); el virus abandona la célula hospedera por exocitosis mediada por vesículas (15-17). EEC: Espacio Extracelular, EIC: Espacio Intracelular, N: Núcleo (Adaptado de Roizman y cols., 2001).

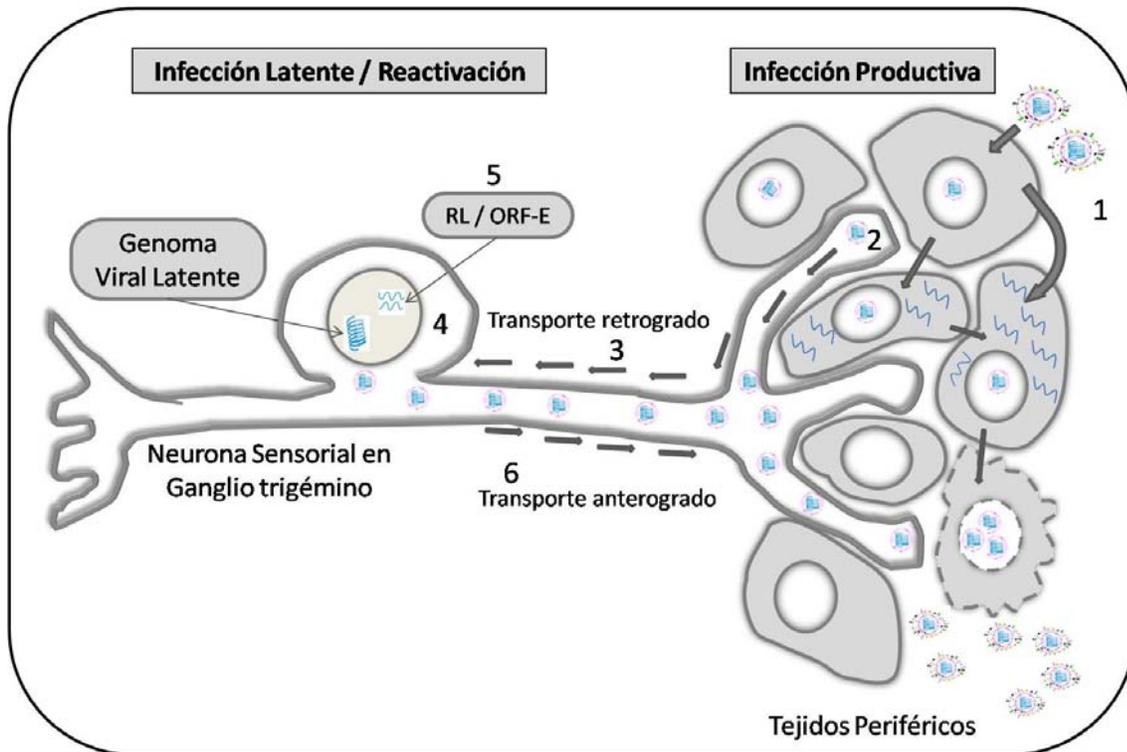


Figura 3. Modelo de transporte axonal del BHV-1. Luego de la infección primaria (1) el virus invade las terminales sensoriales de las neuronas (2), a través de las cuales las nucleocápsidas ascienden por transporte axonal retrogrado (3) al cuerpo celular neuronal dentro del ganglio trigémino (4), en el cual establece su latencia y solo expresa RL y ORF-E (5). Durante episodios de estrés o inmunosupresión, el virus reactivado y transportado de manera anterógrada (6) hasta el sitio inicial de la infección, donde puede producir gran cantidad de partículas virales.

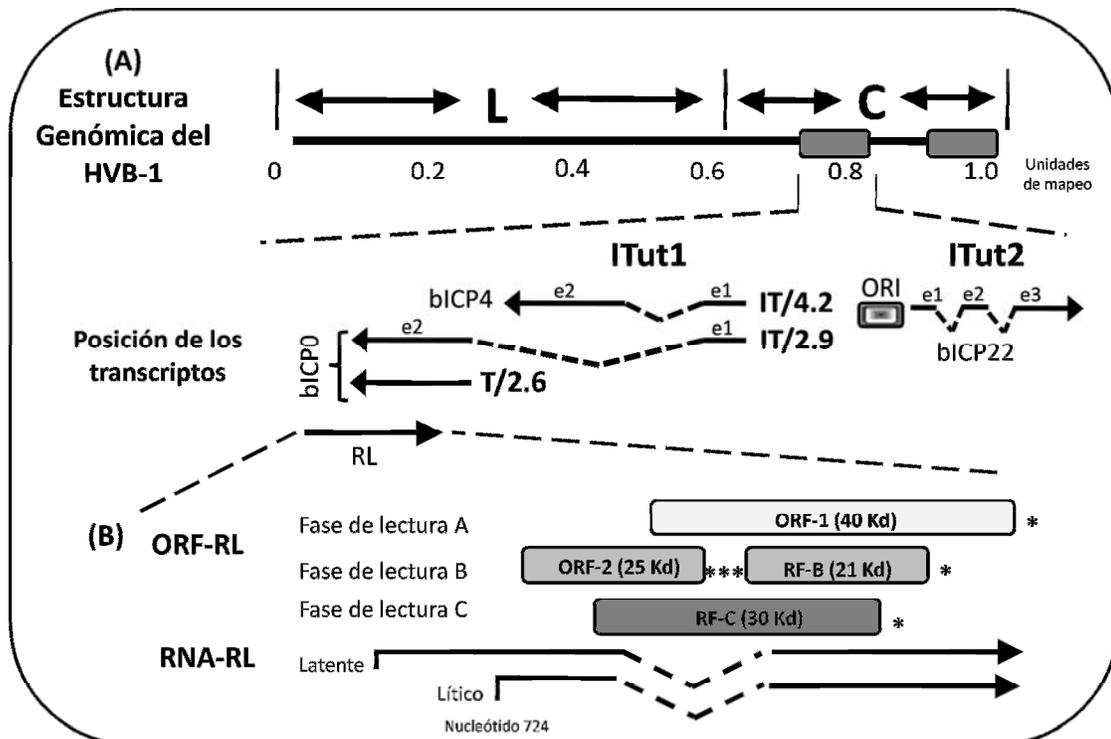


Figura 4. Representación esquemática del genoma del BHV-1 y sus transcritos. (A) L y C indican las regiones única larga (L) y única corta (C); las cajas indican las regiones internas y terminales repetidas. El diagrama presenta la posición de los transcritos inmediatos tempranos (IT), tempranos (T) y relacionados con latencia (RL). IT/4.2 es el transcrito IT que codifica bICP4; IT/2.9 es el transcrito IT que codifica bICP0. IT/4.2 y IT/2.9 son activados por un solo promotor, y esta unidad de transcripción es llamada ITut1. T/2.6 es un transcrito temprano el cual también codifica bICP0. El exón 2 de bICP0 (e2) contiene la secuencia completa que codifica por la proteína de bICP0. El origen de replicación (ORI) separa la unidad ITut1 de la unidad ITut2, la cual codifica para una proteína llamada bICP22, la cual posee tres exones. Nótese que los transcritos RL se ubican en antisentido de bICP0. (B), El diagrama muestra la organización del ORF de RL y la localización del RNA de este; los sitios de Inicio de la Transcripción durante la latencia y ciclo de infección productiva (descritos por Devireddy y Jones, 1998; Hossain y cols., 1995). Como se describe en el texto, la fase de lectura C (RFc) no posee codón de iniciación; los (*) representan la posición de los codones de parada dentro de la fase de lectura de cada ORF (adaptado de Inman y cols., 2001).

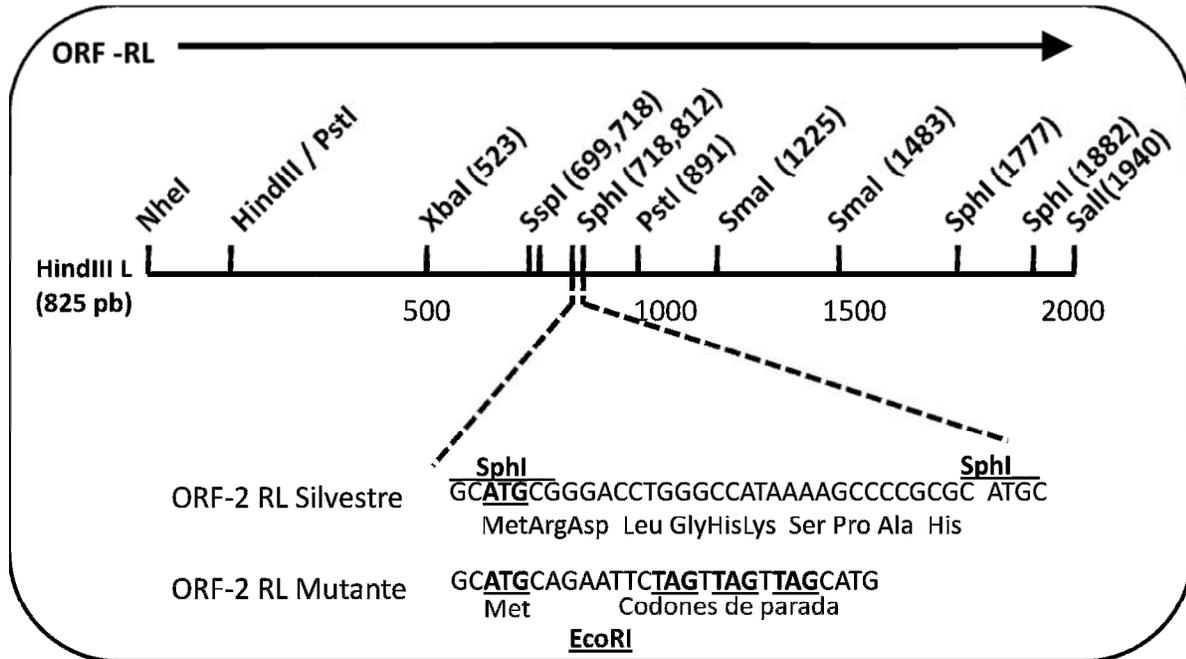


Figura 5. Mapa parcial de restricción de RL y sitios de inserción de codones de parada en cepa mutante de RL. El diagrama muestra la secuencia de ADN del fragmento *SphI* y su modificación en la cepa mutante; El primer codón de iniciación (ATG) en la secuencia silvestre está en la primera fase de lectura del ORF-2 (resaltado). Los codones de parada en la secuencia mutante están ubicados en las tres fases de lectura (negrilla y resaltada). La secuencia mutante posee además un sitio de restricción para la enzima EcoRI (GAATTC) (Adaptado de Inman y col., 2001).

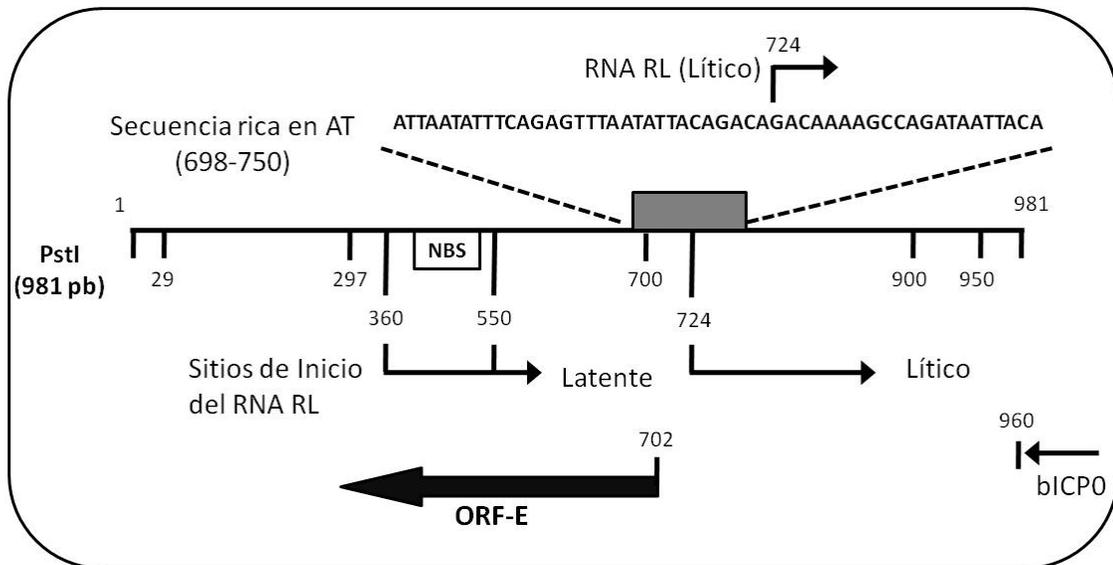


Figura 6. Representación esquemática del gen LR y el ORF-E. El diagrama muestra el mapa extendido del fragmento PstI, el cual contiene el promotor para el RL y para el transcrito del ORF-E. Se postula que las secuencias ricas en AT localizadas cerca del inicio del RNA de RL promueven la transcripción del ORF-E. Las flechas delgadas indican los sitios de inicio para la transcripción del RNA RL lítico y latente (Bratanich y cols., 1992; Hossain y cols., 1995). El recuadro marcado como NBS representa el sitio específico de unión neuronal dentro del promotor para RL (Delhon y Jones, 1997). Se demarca el sitio de terminación de la traducción de bICP0 (960 pb) y en gris el motivo rico en AT presente en el promotor de RL. Note que el ORF-E es transcrito en antisentido con respecto al gen RL. (Adaptado de Inman y col., 2004).

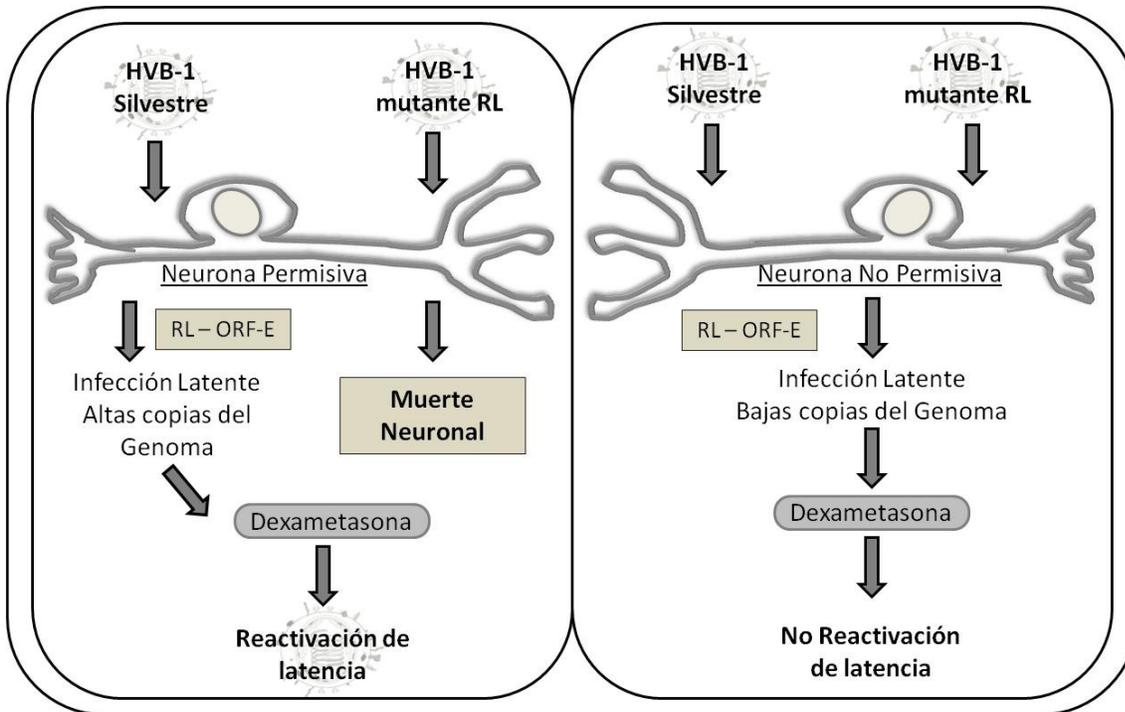


Figura 7. Modelo hipotético que describe los sucesos que ocurren en una neurona infectada con el BHV-1 silvestre y con un mutante de RL. Detalles en el texto (Adaptado de Jones y cols., 2006).

1.2 Vacunas contra el Herpesvirus Bovino-1: Una mirada desde el pasado hacia el futuro de la inmunización

Título breve: Vacunas contra el BHV-1

Julián Ruiz-Saenz^{1,2}, MV, MSc; Jairo Jaime², MV, MSc, PhD; Víctor Vera², MV, MSc, PhD.

¹Estudiante de Doctorado, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia

²Grupo de investigación en Microbiología y Epidemiología

Universidad Nacional de Colombia

Sede Bogotá

julianruizsaenz@gmail.com

RESUMEN

El herpesvirus Bovino-1 (BHV-1) es uno de los principales patógenos que afecta el ganado; la infección primaria se acompaña de varias manifestaciones clínicas tales como la rinotraqueítis, aborto, vulvovaginitis/balanopostitis pustular y en algunos casos, enfermedad neurológica. Luego de la recuperación, la infección persiste durante toda la vida del individuo en un estado de latencia en el ganglio nervioso trigémino o sacro. La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) reporta que la vacunación contra el BHV-1 puede ser efectiva en reducir las manifestaciones clínicas y en consecuencia las pérdidas económicas, pero no logra proteger completamente de la infección. Es por esto que durante los últimos años se han desarrollado gran cantidad de agentes vacunales que van desde las vacunas clásicas inactivadas hasta la tecnología de DNA recombinante. El presente artículo se enfoca en presentar una actualización acerca de las vacunas más usadas desde hace ya varios años y resumir los más importantes avances en generación de nuevas vacunas contra el BHV-1; tratando así de abrir un nuevo panorama para la generación de vacunas en Colombia.

Palabras Clave: Herpesvirus bovino, vacuna, inmunógeno, recombinante

ABSTRACT

Bovine herpesvirus-1 is one of the most important pathogens of cattle; primary infection is characterized by clinical manifestations such as infectious bovine rhinotracheitis, abortion, infectious pustular vulvovaginitis and in some cases, neurological signs. After recovering, the virus establishes viral latency in sensory neurons of trigeminal or sacral ganglia. The World Organization for Animal Health (OIE) reports that vaccination against BHV-1 could be useful to reduce the clinical manifestations and in consequence the economic losses, but it can protect against the infection. In that way, it had been developed a huge amount of vaccines that includes from classic inactivation to recombinant DNA technologies. This paper makes an updated review about the most used vaccines since many years and try to resume the most important advances in BHV-1 vaccine's generation; trying to open a window for new vaccine's generation in Colombia.

Key Words: Bovine herpesvirus, vaccine, immune, recombinant.

INTRODUCCIÓN

El herpesvirus Bovino es un virus de genoma DNA perteneciente a la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alfaherpesvinae* (Wyller *et al.*, 1989); el cual posee una amplia diversidad de cepas, las cuales son serológicamente indiferenciables; sin embargo, con

base en el análisis del genoma con endonucleasas de restricción y sus respectivos patrones de migración, se han clasificado en tres tipos y 5 subtipos: BHV-1.1, BHV-1.2a, BHV-1.2b, BHV-1.3a, y BHV-1.3b (Wyler *et al.*, 1995). Actualmente, los subtipos BHV-1.3a y BHV-1.3b han sido reclasificados como BHV-5, el cual presenta un alto potencial neuropatogénico (Büchen-Osmond C, 1995).

El BHV-1 afecta naturalmente al bovino, especie en la que provoca un amplio espectro de manifestaciones conocidas como rinotraqueitis (IBR), vulvovaginitis pustular infecciosa (IPV), balanopostitis (IPB), conjuntivitis, aborto, enteritis y encefalitis (**Figura 1**). La distribución de la infección es mundial y la prevalencia de reactores serológicos indica que prácticamente todos los bovinos mayores de tres años han estado en contacto con el virus (Pidone *et al.*, 1999). Se han registrado brotes de la forma respiratoria en EE.UU. y Canadá; la IPV es común en Europa y se notificaron importantes brotes de meningoencefalitis en Argentina, Australia, EE.UU., Canadá, Siria, Hungría, Uruguay, Italia y Brasil (OIE, 2004).

El BHV-1 se transmite en forma directa de un animal a otro, dado que gran cantidad de virus se excreta principalmente por secreciones respiratorias, oculares y reproductivas de animales infectados; sin embargo también puede diseminarse en forma indirecta, a través de personas o equipos. El período de incubación varía entre 2 y 6 días, pues depende de la dosis y ruta de inoculación, entre otros. Aunque se acepta que, para el caso de la IBR, el virus se excreta en las secreciones nasales por aproximadamente 12-14 días posinfección, se ha recuperado el virus en forma intermitente por un período de hasta 578 días (Wyler *et al.*, 1989). Otras fuentes importantes de diseminación son el

semen y la transferencia embrionaria (Bielanski A, *et al.*, 1994). Se ha podido comprobar que toros serológicamente positivos sin sintomatología son portadores del virus, el que se ha logrado aislar de muestras de semen congelado (Bielanski A, 1988; van Oirschot *et al.*, 1993), incluso 12 meses después de su almacenamiento a -196° C. El bovino es el principal reservorio del BHV-1; sin embargo, muchas especies de rumiantes, caprinos, ovinos, etc., e incluso el cerdo, son susceptibles a este virus (Wyller *et al.*, 1989).

El diagnóstico de la infección se puede lograr usando técnicas clásicas de virología como son el aislamiento viral en cultivos celulares, pruebas de inmunoperoxidasa e inmunofluorescencia, técnicas serológicas como el ELISA y la seroneutralización, la cual es la técnica recomendada por la OIE como estándar internacional. También es posible realizar un óptimo diagnóstico utilizando las técnicas convencionales de amplificación de regiones específicas del genoma viral como la PCR, las cuales tienen la mayor sensibilidad y especificidad (OIE, 2004).

En Colombia, se han realizado diferentes estudios seroepidemiológicos, los cuales además de demostrar la extensión de la infección, han permitido el aislamiento de algunas cepas nativas, las cuales fueron aisladas a comienzos de los años 70 (CIAT 1972-1975); En la mitad de los años noventa (Molano y Rodríguez, 1995); y más recientemente una aislada en 2001 (Piedrahita *et al.*, 2005). Estas dos últimas han sido sujeto de caracterización molecular por el Grupo de Microbiología y Epidemiología de la Universidad Nacional, clasificando los aislamientos como BHV-1.1 a la cepa de los Llanos orientales y BHV-1.2a para la cepa de la sabana de Bogotá (Piedrahita *et al.*, 2005). Sin embargo, es necesario realizar nuevos aislamientos que permitan evaluar con

actualidad cuales son la(s) cepa(s) que circula(n) en las ganaderías del país; además es necesario, obtener cepas nativas de diferentes regiones epidemiológicas de Colombia, para poder formular vacunas que sean eficientes en la inmunización de bovinos de todo el país.

Vacunas Tradicionales

Desde hace mucho tiempo, existen en el comercio vacunas tradicionales contra el BHV-1 y se utilizan en muchos países en sus distintas variantes: generadas a partir de virus vivo modificado o inactivado, mono o polivalente. Dependiendo de la capacidad del producto de inducir inmunogenicidad, la vacuna puede ser efectiva en reducir las manifestaciones clínicas y en consecuencia las pérdidas económicas, pero no logra proteger completamente de la infección (OIE, 2004). Entre estas vacunas “tradicionales” están las atenuadas y las inactivadas.

Las vacunas atenuadas son aquellas que tienen una capacidad de multiplicación limitada en el organismo, pero suficiente para generar respuesta inmune (similar a la que proporciona la enfermedad). Debido a su atenuación, el virus disminuye la capacidad de causar enfermedad, reduciéndose también su eliminación o contagio por parte de los animales vacunados. Luego de la vacunación, la protección se establece en unas 2 a 3 semanas, obteniendo protección sistémica y en mucosas (oral, nasal, genital, etc.) por períodos prolongados de tiempo, los cuales pueden ir de meses hasta años (Wyler *et al.*, 1989).

En cuanto a la atenuación clásica de agentes virales para vacunas existen varias técnicas; la primera consiste en la atenuación mediante pasajes seriados en cultivos de células para seleccionar las variantes menos virulentas, aunque no se conocen con exactitud los mecanismos por los cuales se introducen las mutaciones durante la replicación viral de los diferentes agentes (Sabin y Boulger, 1973). Otra técnica consiste en generar cepas mutantes virales que son incapaces de crecer a temperaturas superiores a 37°C (temperature-sensitive, ts) o que pueden crecer a temperaturas más bajas [p. ej. 25°C] (cold-adapted, ca). Se asume que los virus ts o ca tienen menor capacidad replicativa y por lo tanto son atenuados. Ésta característica garantiza la replicación estrictamente local y permite que las cepas vacunales puedan ser distinguidas de las cepas de campo gracias al marcador ts o ca (Wyler *et al.*, 1989).

Una de las ventajas más importantes de este tipo de vacunas son su forma de administración y la posibilidad de realizar combinaciones con virus de otras familias, las cuales recientemente, han demostrado generar una inmunidad duradera tanto para el BHV-1 como para los demás agentes virales incluidos en una formulación comercial (Peters *et al.*, 2004).

Aunque las vacunas atenuadas inducen una protección eficiente, poseen algunas desventajas tales como el riesgo de reversión a la virulencia y la imposibilidad de aplicarlas a hembras gestantes, dado el riesgo de inducción de aborto (Miller *et al.*, 1991); Adicionalmente, éste tipo de vacunas pueden inducir latencia de la cepa vacunal, pudiéndose reactivar luego de una inmunosupresión con corticoides, generando así reinfecciones con dicha cepa vacunal (van Drunen Littel-van den Hurk *et al.*, 1993).

Se han desarrollado algunas vacunas atenuadas para aplicación intranasal; estas vacunas confieren una rápida protección local al provocar una infección sistémica con el virus. La gran ventaja de este tipo de vacunas, comparada con las de aplicación parenteral, es su seguridad para las hembras gestantes; sin embargo, se han reportado algunas desventajas como la dificultad para optimizar la vía de administración, la transmisión de virus vacunal a animales no inmunizados y algunas posibles reacciones adversas, como fiebre o descenso temporal de la producción láctea (Wylter *et al.*, 1989).

Los inconvenientes de las vacunas con virus atenuado se han minimizado con el uso de vacunas con virus inactivado, las cuales se desarrollan a partir del virus completo pero inactivado por algún método físico o químico. Hasta la fecha se han utilizado varios agentes inactivantes para la producción de vacunas contra el BHV-1, tales como la formalina, etanol, y la inactivación con calor o luz UV. También se ha empleado la β -propiolactona como agente inactivante; sin embargo, se ha reportado que puede provocar oncogénesis por hidrólisis deficiente o mala dosificación (OMS-OPS, 1976). Uno de los agentes de mayor uso en la actualidad es la etilenimina binaria (BEI), un inactivante de primer orden, que garantiza la completa inactivación del virus. Dado que el agente se encuentra inactivado, no presentan riesgo biológico y son seguras y eficientes en la aplicación en hembras gestantes, ya que no provocan aborto ni diseminación viral luego de la vacunación. El establecimiento de infección latente por la cepa vacunal es imposible, además de permitir la fabricación de vacunas multivalentes, pues no hay interferencia con la producción de anticuerpos contra otro antígeno inactivado (Wylter, 1989).

Sin embargo, la protección que brinda al feto este tipo de vacunas es motivo de controversias, pues por el proceso de inactivación, estas no generan una completa inmunidad en mucosas o inmunidad mediada por células y por tanto requieren adyuvantes y dosis múltiples para inducir una protección óptima. A pesar de esto, algunos investigadores las postulan como altamente efectivas para el control de la infección con BHV-1 (Schudel *et al.*, 1987).

En Colombia el mercado de biológicos es muy amplio y diverso, permitiéndole al productor, a los técnicos y a los veterinarios escoger entre una amplia gama de productos nacionales e importados los cuales pueden ser atenuados o inactivados principalmente dependiendo de la casa manufacturera y del uso recomendado por dicha casa; encontrándose comercialmente en el país el BHV-1 asociado siempre con otros agentes tales como el Virus de la Diarrea Viral Bovina (DVB), el Virus de Parainfluenza tipo 3 (PI3), el Virus sincitial respiratorio (BRSV) y con agentes bacterianos como *Pasteurella spp*, *Leptospira Spp*, entre otros (**Tabla 1**).

Actuales Estrategias Vacunales

Los problemas concernientes tanto a las vacunas atenuadas como a las vacunas inactivadas, impulsaron la producción de nuevas alternativas vacunales que contienen sólo determinados componentes virales los cuales previamente han mostrado ser altamente inmunogénicos, como son las diferentes glicoproteínas virales. Dichas glicoproteínas son las encargadas de la interacción con las células blanco y con el

sistema inmune. En este campo se incluyen las “vacunas Recombinantes”, las cuales pueden ser replicativas o no replicativas de acuerdo a su capacidad de replicar el agente viral en el individuo vacunado. Entre las replicativas se encuentran las vacunas marcadoras, las atenuadas y las portadas por un vector bacteriano o viral. Por las no replicativas están las de sub-unidades proteicas y las de sub-unidades génicas. En la fabricación de vacunas recombinantes, se han logrado grandes avances mediante el uso de células de mamífero e insecto, incorporando a ellas una determinada secuencia codificante del virus para expresarla en estas (van Drunen Littel-van den Hurk S *et al.*, 1990, 1993).

Este tipo de productos biológicos tienen entre sus ventajas, el que no contiene virus vivo (intacto) y por lo tanto no puede ser transmitido a otros animales, causar aborto o establecer infección latente. Estas alternativas incluyen la generación de cepas con deleciones en diferentes regiones del genoma, ya sea con el objetivo de eliminar las regiones inductoras de patogenicidad (atenuadas), con el objetivo de favorecer la inmunogenicidad o generar las comúnmente llamadas DIVA (del inglés: *Differentiating Infected From Vaccinated Animals*), las cuales son vacunas marcadoras que permiten diferenciar los animales infectados naturalmente de los animales vacunados por la presencia o ausencia de anticuerpos contra una región específica del genoma del virus la cual ha sido delectada en la cepa vacunal (Fuchs, *et al.*, 1999)

Vacunas Marcadoras

Para el caso del BHV-1 el uso de las DIVA ha sido una de las alternativas más utilizadas en los planes de vacunación y erradicación de la enfermedad, siempre acompañados del

desarrollo y empleo de pruebas serológicas, permitiendo así la diferenciación de animales vacunados de no vacunados (Chowdhury *et al.* 1999; **Figura 2**). También ha sido posible su aplicación en animales jóvenes aún en presencia de anticuerpos colostrales (Pidone *et al.*, 1999). Bosh *et al.*, en 1998 demostraron que el uso de estas vacunas reducía significativamente la transmisión de la infección en condiciones de campo (Bosh *et al.*, 1998).

Actualmente, la vacuna DIVA con mayor aceptación internacional es la vacuna con delección en la gE (gE-), dado que los animales infectados naturalmente presentan anticuerpos contra dicha glicoproteína mientras que los individuos vacunados no lo hacen (Van Drunen littel van den hurk, 2006); estudios realizados por Mars *et al.*, en 2001, demuestran que una vacuna viva gE- puede ser re-excretada a través de secreciones nasales, luego de una reactivación, llevando a esta a ser uno de los candidatos más útiles en este tipo de vacunas, dado que la re-excreción de podría permitir el establecimiento de una inmunidad de hato (Mars *et al.*, 2001).

Recientemente, el Grupo de Vacunas y Patogenia en Herpesvirus bovino del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - INTA (Buenos Aires, Argentina), desarrolló una vacuna marcadora atenuada contra BHV-1, generada a partir de una delección del marco abierto de lectura completo de la proteína gE; la vacuna atenuada resultó altamente segura en cuanto a los riesgos de generación de abortos y transmisión a animales no vacunados, y completamente inocua en cuanto a la generación de efectos colaterales en el bovino; y a diferencia de lo descrito para otras cepas de BHV-1 negativas para la gE, al

emplear la cepa desarrollada por este grupo como vacuna atenuada, no se detectó el virus vacunal en excreciones nasales durante el período post-vacunación (INTA, 2005).

Sin embargo, recientes estudios desarrollados por Muylkens *et al.*, (2006) demuestran que la infección nasal doble con una cepa vacunal gE negativa y una cepa silvestre del virus puede generar cepas recombinantes intraespecíficas, las cuales *in Vitro* poseen una virulencia inferior a la de las cepas silvestres (Muylkens *et al.*, 2006a); sin embargo *in vivo*, presentan una virulencia mayor que las cepas parentales, confirmando que los fenómenos de recombinación pueden restaurar la virulencia de las cepas vacunales gE negativas (Muylkens *et al.*, 2006b), y ratificando las dificultades para la aplicación de este tipo de recombinantes en campo, o en zonas de alta circulación de cepas silvestres.

Vectores Virales

Recientemente se han desarrollado algunos vectores virales los cuales por sus características biológicas y replicación son óptimos para expresar proteínas foráneas. Entre estos vectores virales se resalta el uso del Herpesvirus Bovino-4 (BHV-4), un miembro de la subfamilia *Gammaherpesvirinae* el cual ha sido aislado de una gran variedad de muestras de bovinos clínicamente sanos y de bovinos con signos clínicos de aborto, metritis, neumonía entre otros, y cuya patogenicidad no ha sido claramente dilucidada (Thiry *et al.*, 1989). A diferencia de otros gammaherpesvirus, no causa efecto citopático, se replica en una amplia gama de líneas celulares bovinas y de otras especies, y no se ha logrado demostrar que tenga algún papel en oncogénesis o transformación celular (Gillet *et al.*, 2005). En estudios realizados por la Universidad de Liege, Belgica, se evidenció que el uso de un recombinante del BHV-4 expresando la gD

del BHV-1 y acompañado de un elemento regulador post-trascricional en la región 3` de la gD es altamente inmunogénico e induce la producción de anticuerpos neutralizantes anti-gD del BHV-1 en un modelo leporino, postulándose como uno de los modelos vectores más interesantes para desarrollar un candidato vacunal. Además, en animales vacunados no se detectaron anticuerpos neutralizantes anti-BHV-4, lo cual ratifica su papel como candidato vacunal pues no habría ningún tipo de interferencia ni competencia en la generación de anticuerpos (Donofrio *et al.*, 2006).

Otra alternativa ampliamente explorada ha sido el uso de vectores adenovirales que expresen glicoproteínas del BHV-1. Estos vectores han sido desarrollados usando como principal modelo el adenovirus humano 5 (hAd5), el cual es un excelente sistema para la expresión de antígenos; desarrollándose dos tipos de vectores de acuerdo a su capacidad replicativa (replicativos y no replicativos). Sin embargo, los no replicativos han sido principalmente usados por ser altamente seguros (**Figura 3**). Papp *et al.*, 1999 usando un modelo de rata algodónera (*Sigmodon hispidus*), evaluaron la respuesta inmunológica inducida por dos tipos de vectores adenovirales previamente desarrollados, los cuales expresaban la gD del BHV-1, uno de ellos replicativo (Mittal *et al.*, 1996) y otro no replicativo (van Drunen Littel van den Hurk *et al.*, 1993), encontrando que los replicativos fueron más eficientes que los no replicativos para inducir presencia de anticuerpos tanto en el suero como en el tracto respiratorio de los individuos inmunizados por vía intranasal. Además, la inmunización intranasal con adenovirus replicativos demostró completa protección ante el reto con el BHV-1, mientras que la inmunización con el adenovirus no replicativo solo indujo una protección parcial.

Contradictoriamente, Gogev *et al.*, en 2002 usando un modelo bovino, encontraron que la mejor respuesta de anticuerpos neutralizantes anti-gD del BHV-1 se lograba al inmunizar terneros con un adenovirus no replicativo el cual expresaba la gD del BHV-1 bajo el control del promotor del citomegalovirus humano, encontrando que los terneros inmunizados con este vector y retados con el virus tres semanas después de una segunda inmunización por vía intranasal; tenían una buena protección clínica luego del reto, altos niveles de anticuerpos neutralizantes, aun mayores que los inducidos por una vacuna comercial atenuada, y una reducción significativa en la excreción de virus luego del reto. Además se evidenció que los individuos inmunizados con este vector desarrollan una muy baja prevalencia de anticuerpos anti adenovirus, postulándose así como una de las alternativas vacunales más prometedoras en el campo veterinario (Gogev *et al.*, 2004b). Sin embargo, recientes estudios utilizando microscopía de inmunofluorescencia, microscopía confocal y RT-PCR, para evaluar la distribución de la gD en tracto respiratorio de terneros luego de la inmunización con el mencionado vector, evidenciaron una transitoria expresión de la proteína (solo 5 días), la cual se limitaba a las células epiteliales localizadas en el epitelio de la mucosa nasal, sugiriendo la necesidad de un adyuvante que mejore la eficiencia del vector para generar una mejor inmunidad y una mejor expresión de la gD del BHV-1 (Gogev *et al.*, 2004a).

Sin embargo, no solo se han utilizado vectores adenovirales de origen humano; también se ha desarrollado un vector adenoviral de origen bovino (BAdv-3); éste es un miembro del género Mastadenovirus de la familia *Adenoviridae*, el cual ha sido involucrado en casos de infecciones subclínicas de tipo respiratorio y entérico (Reddy *et al.*, 1999); el vector desarrollado a partir de este, es un adenovector replicativo y puede expresar la gD del BHV-1, y su evaluación en un modelo de rata algodónera inmunizada por la vía

intranasal demostró que generaba una fuerte respuesta de inmunoglobulinas específicas tipos IgG e IgA anti gD y anti BAdv-3 (Zakhartchouk *et al.*, 1998). Adicionalmente, se ha demostrado que es un buen vector para generar inmunidad anti-gD en bovinos vacunados intranasalmente, llevando a la generación de anticuerpos específicos anti-gD en suero y secreciones nasales de los terneros y reduciendo la excreción de virus y la presentación clínica luego del reto con virus de campo; aun en individuos vacunados y con altos niveles pre-existentes de anticuerpos anti BAdv-3 (Zakhartchouk *et al.*, 1999).

Posteriormente, el mismo grupo de investigación desarrolló un BAdv-3 no replicativo que expresaba la gD del BHV-1; su evaluación en un modelo bovino demostró utilizando inmunización intratraqueal que al compararlo con el BAdv-3 replicativo expresando la misma gD, induce bajos niveles de anticuerpos neutralizantes sistémicos y aunque induce una respuesta anamnésica ante el reto, la tasa de anticuerpos específicos en suero y en secreciones nasales es superior para el BAdv-3 gD replicativo, indicando que posiblemente, este tipo de vector y de vía de administración no sean las más efectivas para conseguir una buena respuesta inmune y controlar el BHV-1 en campo (Reddy *et al.*, 2000).

En 1998, se reportó el desarrollo de un baculovirus (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*) como un sistema de expresión de las gC, gB y gD del BHV-1 *in vitro* en células de insecto, tratando de maximizar los sistemas de expresión de proteínas con objetivos diagnósticos (Abdelmagid *et al.*, 1998a) y como sistemas de producción de subunidades vacunales proteicas (Abdelmagid *et al.*, 1998b). Este adelanto fue aprovechado por el Instituto de Biotecnología del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - INTA

(Castelar, Argentina), para desarrollar Baculovirus recombinantes como inmunógenos que llevan en su superficie moléculas quiméricas entre la glicoproteína de superficie gp64 del baculovirus y la gD derivada del BHV-1; este virus puede ser usado como estructura transportadora de antígenos heterólogos, y es posible formular vacunas con antigenicidad aumentada debido a su naturaleza particulada, a la presentación multimérica de los epítopes y a la adecuada conformación de los antígenos en la superficie del virión (Peralta *et al.*, 2006, **Figura 4**). Este grupo de investigadores logró inducir anticuerpos capaces de neutralizar el virus *in vitro*, luego de inmunizar ratones BALB/c con 5×10^8 unidades formadoras de placa del recombinante. Además, la respuesta humoral medida por la técnica de ELISA fue diez veces mayor que la registrada para los ratones inmunizados con una vacuna inactivada comercial, indicando que la gD expresada en los viriones es altamente inmunogénica. Considerando que los Baculovirus son incapaces de replicarse en células de mamífero, se asume que los mamíferos no tienen una respuesta inmune preexistente a estos vectores, lo cual amplía la seguridad de este vector (Peralta *et al.*, 2007). Actualmente este recombinante se encuentra, en fase de evaluación en terneros; sin embargo la dificultad para obtener un grupo homogéneo de animales seronegativos al BHV-1 en Argentina ha dificultado la evaluación a los investigadores.

Vacunas de Sub-Unidades Génicas Sub-Unidades Proteicas

Paralelamente con estos desarrollos, una fuerte corriente ha crecido en la producción de vacunas recombinantes enfocándose principalmente en la producción de vacunas de sub-unidades, las cuales no poseen potencial de replicación y por tanto no poseen ningún riesgo biológico en su aplicación y se descartan las probabilidades de

recombinación con cepas de campo (**Figura 5**). Estas vacunas deben ser aplicadas por la vía intradérmica, dado que por la vía intramuscular no inducen una eficiente respuesta inmune, pues éstas deben entrar directamente al sitio donde puedan ser conocidas por las células presentadoras de antígenos, principalmente las células dendríticas, las cuales se encuentran mayormente en el espacio intradérmico (van Drunen littel van Den Hurk *et al.*, 1993; 1998). Si bien los primeros ensayos de este tipo de vacunas mostraron poca eficiencia en bovinos (Cox *et al.*, 1993), los últimos ensayos han logrado alcanzar eficientes grados de protección ante un nuevo reto con el virus (van Drunen littel van Den Hurk, 2006). En los comienzos, se logró vacunar los animales con una versión truncada de la gD, la cual estaba truncada en el aminoácido 355, eliminando así el dominio de anclaje de membrana; ésta versión truncada de la proteína fue expresada en células MBDK bajo el control del promotor del gen bovino “heat shock protein 70A (hsp70)” (Kowalski *et al.*, 1993); éste sistema permitió alcanzar niveles óptimos de protección en los bovinos. Casi una década más tarde, Pontarolo *et al.*, (2002) demostraron que el uso de la forma truncada de la gD de BHV-1 en un vector cuyo esqueleto había sido modificado adicionándole un número controlado de oligodeoxinucleótido CpGs aumentaba la generación de una eficiente respuesta inmune celular y humoral en un modelo bovino. Este mismo grupo de investigadores logró demostrar que ésta formulación de sub-unidad génica en combinación con Emulsigen®, un aceite mineral en solución acuosa y un oligodeoxinucleótido CpG, inducían un incremento en la respuesta inmunitaria llegando a la protección completa contra la infección y contra la enfermedad. Recientemente, investigadores de la Universidad de Saskatchewan demostraron que esta formulación, es capaz de inducir anticuerpos neutralizantes protectores aun en presencia de anticuerpos maternos circulantes (Van Drunen Litter-van den Hurk *et al.*, 2008).

Aunque esta aplicación es una referenciada internacionalmente, 10 años atrás se había reportado un método para inmunizar animales con glicoproteínas virales, las cuales generaban una inmunidad sistémica parcial luego de la inyección intramuscular o de la administración intranasal de las tres glicoproteínas mayores gB, gC y gD junto con un adyuvante efectivo (Zhu y Letchworth, 1996). Similarmente, se ha descrito que el uso de recombinantes de gD de BHV-1, utilizando una variante secretora de dicha glicoproteína viral induce una mayor respuesta inmune en bovinos que la versión recombinante que usa la forma completa de la gD; además, se ha descrito que aunque gC del BHV-1 es una de las glicoproteínas mayores, su uso como recombinante en vacunas genera menor título de anticuerpos neutralizantes *in vivo*. Por otra parte, los investigadores han intentado generar vacunas utilizando otros componentes del virus como es la proteína VP8, la cual es el componente más abundante al interior de los viriones y se localiza en el tegumento del BHV-1 entre la nucleocápside y la envoltura y ha demostrado tener un papel importante en la generación de inmunidad celular. Sin embargo, aunque el recombinante de VP8 induce mayor linfoproliferación y producción de INF- β que los recombinantes de gD y gC, los título de anticuerpos neutralizantes *in vivo* no alcanzan a ser significativamente diferentes de los controles sin vacunación y son muy inferiores a los generados por los recombinantes que usan gD (Toussaint *et al.*, 2005). Estos resultados sugieren que el uso de la versión secretora de la gD es el mejor candidato para generación de una respuesta inmune neutralizante de la infección y plantean la necesidad de usar adyuvantes que mejoren la respuesta celular necesaria para proporcionar una protección a largo plazo.

Teniendo en cuenta que las vacunas de sub-unidades génicas inducen predominantemente una respuesta inmune humoral (van Drunen Littel-van den Hurk S *et al.*, 1993), múltiples grupos de investigación han trabajado en el desarrollo nuevos métodos para hacer más efectiva la inmunización con DNA usando diversos adyuvantes, a fin de conseguir la generación de un respuesta óptima tanto a nivel humoral como celular. Teniendo en cuenta que los lipopolisacáridos bacterianos son agentes con un alto potencial inmunomodulador y con propiedades adyuvantes ampliamente descritas, aun cuando son administrados en sitios y tiempos diferentes en los cuales se aplica el antígeno, Zamorano *et al.*, en 2002 reportaron el uso del RN-205, un inmunomodulador generado a partir de fracciones ribosomales y fracciones de membranas ricas en lipopolisacáridos provenientes de una cepa de baja patogenicidad de *E. coli* demostrando un incremento significativo en la respuesta inmune celular, cuando se administra en combinación con plásmidos que codifican para diferentes versiones de la gD de BHV-1, convirtiéndose en uno de los adyuvantes más atractivos para obtener una eficiente inmunidad celular y humoral luego de la vacunación con vacunas de sub-unidades génicas del BHV-1 (Zamorano *et al.*, 2002).

CONCLUSIÓN

La infección por el BHV-1 es una de las más devastadoras en la industria bovina y su prevención y control ha sido fundamental en los procesos de desarrollo de las diferentes ganaderías tanto a nivel nacional como internacional. En este proceso de prevenir la infección se han utilizado todas las herramientas que la virología ha desarrollado, desde la inactivación química de agentes virales hasta el desarrollo de agentes recombinantes

con capacidad para presentar e inmunizar contra productos génicos foráneos introducidos al nivel molecular en su genoma.

Aunque en América latina ha avanzado fuertemente en estos desarrollos vacunales, Colombia en la actualidad, cuenta con vacunas comerciales que podríamos denominar de primera generación (inactivadas y modificadas); ninguna de las vacunas comerciales que se encuentra en el país incluye en su formulación cepas locales y se suma a esto que en el país no se han realizado evaluaciones del grado de inmunogenicidad y de seguridad de las vacunas para el BHV-1 presentes en el país. Teniendo en cuenta que todas las vacunas nacionales para bovinos se encuentran en formulación polivalente (**Tabla 1**), es de vital importancia la evaluación epidemiológica de la presencia e impacto de los demás agentes virales y bacterianos presentes en los biológico de venta nacional, para poder así tener herramientas para decidir si son necesarios los biológicos polivalentes o si debemos proponer la comercialización de biológicos monovalentes útiles a las condiciones de los diferentes tipos de explotaciones ganaderas del país.

Sumado a esta problemática nacional, vemos con gran preocupación la reciente introducción al país de vacunas a virus vivo modificado, las cuales a pesar de inducir una eficiente inmunidad como se mencionó anteriormente, pueden acarrear graves problemas como la inducción de latencia de cepas vacunales, recombinación de cepas vacunales con cepas de campo entre otras, hechos que harán más complicada la epidemiología de esta infección en el país. Es por tanto, el área de la generación y evaluación de vacunas una de las áreas de investigación en las cuales se debe invertir la gran cantidad de esfuerzos, tratando así de prevenir y (en un futuro no muy lejano) pensar en erradicar una de las infecciones virales que genera mayor cantidad de pérdidas económicas al sector pecuario nacional.

BIBLIOGRAFÍA

ABDELMAGID OY, MANSOUR MM, MINOCHA HC, VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK S. Evaluation of baculovirus-expressed bovine herpesvirus-1 (BHV-1) glycoproteins for detection and analysis of BHV-1-specific antibody responses. *Vet Microbiol.* 1998a; 61:249-59.

ABDELMAGID OY, MANSOUR MM, OKWUMABUA O, VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK S. Expression and cellular distribution of baculovirus-expressed bovine herpesvirus 1 (BHV-1) glycoprotein D (gD) sequences. *Arch Virol.* 1998b;143:2173-87.

BIELANSKI A, DUBUC C. In-Vitro Fertilization and Culture of Ova from Heifers Infected with Bovine Herpesvirus-1 (BHV-1). *Theriogenology* 1994; 41(6):1211-1217.

BIELANSKI A, LOEWEN KG AND HARE WCD. Inactivation of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) from in vitro infected bovine semen. *Theriogenology* 1988; 30, (4):649-656.

BOSCH JC, DE JONG MC, FRANKEN P, FRANKENA K, HAGE *et al.*, An inactivated gE-negative marker vaccine and an experimental gD-subunit vaccine reduce the incidence of bovine herpesvirus 1 infections in the field. *Vaccine* 1998; 16: 265-71.

BÜCHEN-OSMOND C. Alphabetical List of ICTV approved Virus Families and Genera. Created April, 1995. Última actualización: 8 de abril de 1998. Revisado Julio de 2009.

CHOWDHURY SI, ROSS CS, LEE BJ, HALL V, CHU HJ. Construction and characterization of a glycoprotein E gene-deleted bovine herpesvirus type 1 recombinant. *Am J Vet Res.* 1999; 60:227-232

CIAT - Centro Internacional de Agricultura Tropical. Informe anual de salud animal; 1972.

CIAT - Centro Internacional de Agricultura Tropical. Informe anual de salud animal; 1975.

COX GJ, ZAMB TJ, BABIUK LA. Bovine herpesvirus 1: immune responses in mice and cattle injected with plasmid DNA. *J Virol.* 1993; 67: 5664-7

DONOFRIO G, CAVIRANI S, VANDERPLASSCHEN A, GILLET L, FLAMMINI CF. Recombinant bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) expressing glycoprotein D of BoHV-1 is immunogenic and elicits serum-neutralizing antibodies against BoHV-1 in a rabbit model. *Clin Vaccine Immunol* 2006; 13: 1246-54

FUCHS M, HUBERT P, DETTERER J, RZIHA HJ. 1999. Detection of bovine herpesvirus type 1 in blood from naturally infected cattle by using a sensitive PCR that discriminates between wild-type virus and virus lacking glycoprotein E. *J. Clin. Microbiol.* 37, 2498–2507.

GILLET L, DAIX V, DONOFRIO G, WAGNER M, KOSZINOWSKI UH, CHINA B, *et al.* Development of bovine herpesvirus 4 as an expression vector using bacterial artificial chromosome cloning. *J Gen Virol.* 2005; 86:907–917

GOGEV S, DE FAYS K, VERSALI MF, GAUTIER S, THIRY E. Glycol chitosan improves the efficacy of intranasally administrated replication defective human adenovirus type 5 expressing glycoprotein D of bovine herpesvirus 1. *Vaccine.* 2004a; 22: 1946-53

GOGEV S, GEORGIN JP, SCHYNTS F, VANDERPLASSCHEN A, THIRY E. Bovine herpesvirus 1 glycoprotein D expression in bovine upper respiratory tract mediated by a human adenovirus type 5. *Vet Res.* 2004b; 35:715-21

GOGEV S, VANDERHEIJDEN N, LEMAIRE M, SCHYNTS F, D'OFFAY J, DEPREZ I, *et al.* Induction of protective immunity to bovine herpesvirus type 1 in cattle by intranasal administration of replication-defective human adenovirus type 5 expressing glycoprotein gC or gD. *Vaccine.* 2002; 20-1451-65

INTA. 2005. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Desarrollo de nuevas tecnologías para estudio de patogenia de virus genéticamente modificados. En: <http://www.inta.gov.ar/virologia/investiga/proyectos/ar1.htm> Revisado en Julio de 2009.

KOWALSKI J, GILBERT SA, VAN DRUNEN-LITTEL-VAN DEN HURK S, VAN DEN HURK J, BABIUK LA, ZAMB TJ. Heat-shock promoter-driven synthesis of secreted bovine herpesvirus glycoproteins in transfected cells. *Vaccine.* 1993; 11:1100-7

MARS M.H., DE JONG M.C.M., FRANKEN P., VAN OIRSCHOT J.T. Efficacy of a live glycoprotein E-negative bovine herpesvirus 1 vaccine in cattle in the field, *Vaccine*, 2001; 19: 1924-1930.

MILLER JM, WHETSTONE CA, BELLO JJ, LAWRENCE WC. Determination of ability of a thymidine kinase-negative deletion mutant of bovine herpesvirus-1 to cause abortion in cattle. *Am. J. Vet.* 1991.52:1038-1043.

MITTAL SK, PAPP Z, TIKOO SK, BACA-ESTRADA ME, YOO D, *et al.* Induction of systemic and mucosal immune responses in cotton rats immunized with human adenovirus type 5 recombinants expressing the full and truncated forms of bovine herpesvirus type 1 glycoprotein gD. *Virology*. 1996; 222: 299-309

MOLANO, D., RODRÍGUEZ, J.L., RAMÍREZ, G., VILLAMIL, L.C. Caracterización electroforética e inmunológica de una cepa de campo del virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina y su comparación con cepas de referencia. *Rev Med Vet Zootec.* 1996. 44:35-8.

MUYLKENS B, MEURENS F, SCHYNTS F, DE FAYS K, POURCHET A, THIRY J, *et al.* Biological characterization of bovine herpesvirus 1 recombinants possessing the vaccine glycoprotein E negative phenotype. *Vet Microbiol.* 2006a; 31;113:283-91

MUYLKENS B, MEURENS F, SCHYNTS F, FARNIR F, POURCHET A, BARDIAU M, *et al.* Intraspecific bovine herpesvirus 1 recombinants carrying glycoprotein E deletion as a vaccine marker are virulent in cattle. *J Gen Virol.* 2006b; 87:2149-54

OIE - ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL (2004). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, 5a edición. OIE, París, 1178 págs.

OMS-OPS. Centro Panamericano de Zoonosis. Primer seminario sobre rabia parálitica de las Américas. Buenos Aires, Argentina. 1976.

PAPP Z, BABIUK LA, BACA-ESTRADA ME. The effect of pre-existing adenovirus-specific immunity on immune responses induced by recombinant adenovirus expressing glycoprotein D of bovine herpesvirus type 1. *Vaccine*. 1999; 17: 933-43

PERALTA A, MOLINARI MP, TABOGA O. Baculovirus recombinantes como inmunogenos. *Rev Argent Microbiol.* 2006; 38:74

PERALTA A, MOLINARI P, CONTE-GRAND D, CALAMANTE, G, TABOGA O.A chimeric baculovirus displaying bovine herpesvirus-1 (BHV-1) glycoprotein D on its surface and their immunological properties. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007; 75: 407-14

PETERS, AR, THEVASAGAYAM SJ, WISEMAN A, SALT JS. Duration of immunity of a quadrivalent vaccine against respiratory diseases caused by BHV-1, PI3V, BVDV, and BRSV in experimentally infected calves. *Prev Vet Med.* 2004; 66:63-77

PIDONE CL., GALOSI CM., ETCHEVERRIGARAY EM. Herpesvirus Bovinos 1 y 5. *Analecta Veterinaria* 1999; 19,1/2: 40-50

PIEDRAHITA D, RAMÍREZ G, VERA V. Detección y caracterización por métodos moleculares de aislamientos colombianos de Herpesvirus bovino tipo 1. *Rev Fac Med Vet Zoo.* 2005;52:122-127.

PONTAROLLO RA, BABIUK LA, HECKER R, VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S. Augmentation of cellular immune responses to bovine herpesvirus-1 glycoprotein D by vaccination with CpG-enhanced plasmid vectors. *J Gen Virol.* 2002; 83: 2973-81

REDDY PS, IDAMAKANTI N, PYNE C, ZAKHARTCHOUK AN, GODSON DL, PAPP Z, *et al.* The immunogenicity and efficacy of replication-defective and replication-competent bovine adenovirus-3 expressing bovine herpesvirus-1 glycoprotein gD in cattle. *Vet Immunol Immunopathol.* 2000; 76: 257-68

REDDY PS, IDAMAKANTI N, ZAKHARTCHOUK AN, BAXI MK, LEE JB, PYNE C, *et al.* Nucleotide sequence, genome organization and transcription map of bovine adenovirus type 3. *J Virol.* 1999; 72:1394–1402.

SABIN AB, BOULGER LR. History of Sabin attenuated poliovirus vaccine. *J. Biol. Stand.* 1973; 1:115-118.

SCHUDEL AA, CARRILLO BJ, WYLER R, METZLER AE. Infections of calves with antigenic variants of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurological disease. *Zentralbl Veterinarmed B.* 1986; 33:303-10

THIRY E, BUBLOT M, DUBUISSON J, PASTORET PP. Bovine herpesvirus-4 (BHV-4) infection in cattle, p. 96–115. In G. Wittmann (ed.), Herpesvirus diseases of cattle, horses and pigs. Boston, 1989.

TOUSSAINT JF, COEN L, LETELLIER C, DISPAS M, GILLET L, VANDERPLASSCHEN A, *et al.* Genetic immunisation of cattle against bovine herpesvirus 1: glycoprotein gD confers higher protection than glycoprotein gC or tegument protein VP8. *Vet Res.* 2005; 36: 529-44

VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK S. Rationale and perspectives on the success of vaccination against bovine herpesvirus-1. *Vet Microbiol* 2006 31;113:275-82.

VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK S, BRAUN RP, LEWIS PJ, KARVONEN BC, BACA-ESTRADA ME, SNIDER M, *et al.* Intradermal immunization with a bovine herpesvirus-1 DNA vaccine induces protective immunity in cattle. *J Gen Virol.* 1998; 79: 831-9

VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK S, GIFFORD GA, BABIUK LA. Epitope specificity of the protective immune response induced by individual bovine herpesvirus-1 glycoproteins. *Vaccine.* 1990; 8: 358-68

VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK S, SNIDER M, THOMPSON P, BABIUK LA. Strategies for induction of protective immunity to bovine herpesvirus-1 in newborn calves with maternal antibodies. *Vaccine.* 2008; 26:3103-11

VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK S, TIKOO SK, LIANG X, BABIUK LA. Bovine herpesvirus-1 vaccines. *Immunol Cell Biol.* 1993; 71: 405-20

VAN OIRSCHOT JT, STRAVER PJ, VAN LIESHOUT JAH, QUAK J, WESTENBRINK F, VAN EXSEL ACA. A subclinical infection of bulls with bovine herpesvirus type 1 at an artificial insemination centre. *The Veterinary Record* 1993; 132:32-35.

WYLER R, ENGELS M, SCHWYZER M. Infectious Bovine Rhinotracheitis/Vulvovaginitis (BHV1). In: Herpesvirus Diseases of Cattle, Horses and Pigs, Wittmann G., ed. Kluwer Academic Publishers, Boston, USA, 1989. p. 1-72.

WYLER R, ENGELS M, SCHWYZER M. Infectious Bovine Rhinotracheitis/Vulvovaginitis (BHV1) Institute of Virology. University of Zurich 1995. p. 1-55.

ZAKHARTCHOUK AN, PYNE C, MUTWIRI GK, PAPP Z, BACA-ESTRADA ME, GRIEBEL P, BABIUK LA, TIKOO SK. Mucosal immunization of calves with recombinant bovine adenovirus-3: induction of protective immunity to bovine herpesvirus-1. *J Gen Virol.* 1999; 80: 1263-69.

ZAKHARTCHOUK AN, REDDY PS, BAXI M, BACA-ESTRADA ME, MEHTALI M, *et al.* Construction and characterization of E3-deleted bovine adenovirus type 3 expressing full-length and truncated form of bovine herpesvirus type 1 glycoprotein gD. *Virology.* 1998; 250: 220-229

ZAMORANO P, TABOGA O, DOMINGUEZ M, ROMERA A, PUNTEL M, TAMI C, *et al.* BHV-1 DNA vaccination: effect of the adjuvant RN-205 on the modulation of the immune response in mice. *Vaccine.* 2002; 20: 21-22

ZHU X, LETCHWORTH GJ. Mucosal and systemic immunity to bovine herpesvirus-1 glycoprotein D confer resistance to viral replication and latency in cattle. *Vaccine.* 1996; 14: 61-9

Tabla 1. Vacunas comerciales contra el BHV-1 que se encuentran disponibles en Colombia

Casa Comercial	Nombre comercial	Tipo IBR-1	Otros Virus	Bacterianas	Adyuvante
VECOL S.A.	VIRA SHIELD 4 + L5	Inactivado	DVB tipo 1; DVB tipo 2; PI3	<i>L. Canicola. L. Grippotyphosa, L. Hardjo, L. Icterohaemorrhagiae, L. Pomona.</i>	Xtend® III
Novartis®	Vira Shield 6 + VL5	Inactivado	DVB Tipo 1 citopático y no citopático DVB Tipo 2 no citopático ; PI3; BRSV	<i>Campylobacter fetus, L. canicola, L. grippotyphosa, L. hardjo, L. icterohaemorrhagiae y L. pomona.</i>	Xtend® SP
Fort Dodge®	PYRAMID 4 MLV	Virus Vivo Modificado	DVB; PI3; BRSV		Meta-Stim
Fort Dodge®	PYRAMID 3 MLV	Virus Vivo Modificado	DVB; PI3; BRSV		Meta-Stim
Fort Dodge®	PYRAMID 9	Virus Vivo Modificado	DVB; PI3; BRSV	<i>L. canicola, L. grippotyphosa, L. hardjo, L. icterohaemorrhagiae y L. pomona</i>	Meta-Stim
Fort Dodge®	Triangle 9 BVD Tipo II	Vacuna virus inactivado	DVB Tipo I cepa Singer, Tipo II cepa 5912, PI3, VRSB	<i>Leptospira canicola, grippotyphosa, hardjo, icterohaemorrhagiae y pomona.</i>	Meta-Stim Immune-Guard®
Fort Dodge®	TRIANGLE 9+HS	Vacuna virus inactivado	DVB Tipo I cepa Singer, Tipo II cepa 5912, PI3, VRSB	<i>Leptospira canicola, grippotyphosa, hardjo, icterohaemorrhagiae y pomona. Haemophilus somnus</i>	Meta-Stim Immune-Guard®
Pfizer®	CattleMaster® 4 + L5	vivo modificado, TS	VRSB; DVB citopático	<i>L. canicola, grippotyphosa, hardjo, icterohaemorrhagiae y pomona.</i>	hidróxido de aluminio

			y no citopático		
Pfizer ®	CattleMaster ® 4	vivo modificado , TS	VRSB; DVB citopático y no citopático		hidróxido de aluminio
TECNOVAX ®	Provideam reproductiva ®	Inactivado	DVB	<i>L. int. serovar Pomona; L. int. serovar Icterohaemorrhagiae; L. int. serovar Canícola; C. foetus foetus; C. foetus venerealis</i> <i>Haemophilus somnus</i>	GHA- HPA500
TECNOVAX ®	Provideam Respiratoria ®	Inactivado	DVB; IP3	<i>P. haemolytica; P. multocida</i> <i>Haemophilus somnus</i>	GHA- HPA500
TECNOVAX ®	Provideam Querato®	Inactivado		<i>Moraxella bovis.</i>	GHA- HPA500
SANTA HELENA	Bovisan Total®	Inactivado	VDB tipo 1; VDB tipo 2; BHV-5	<i>Leptospira: pomona, wolffii, hardjo prajitno, hardjo bovis, tarassovi, icterohaemorrhagiae, canícola y grippotyphosa; Campylobacter fetus subsp. venerealis, Campylobacter fetus subsp. venerealis biotipo intermedius, Campylobacter fetus subsp. fetus.</i>	Hidróxido de aluminio

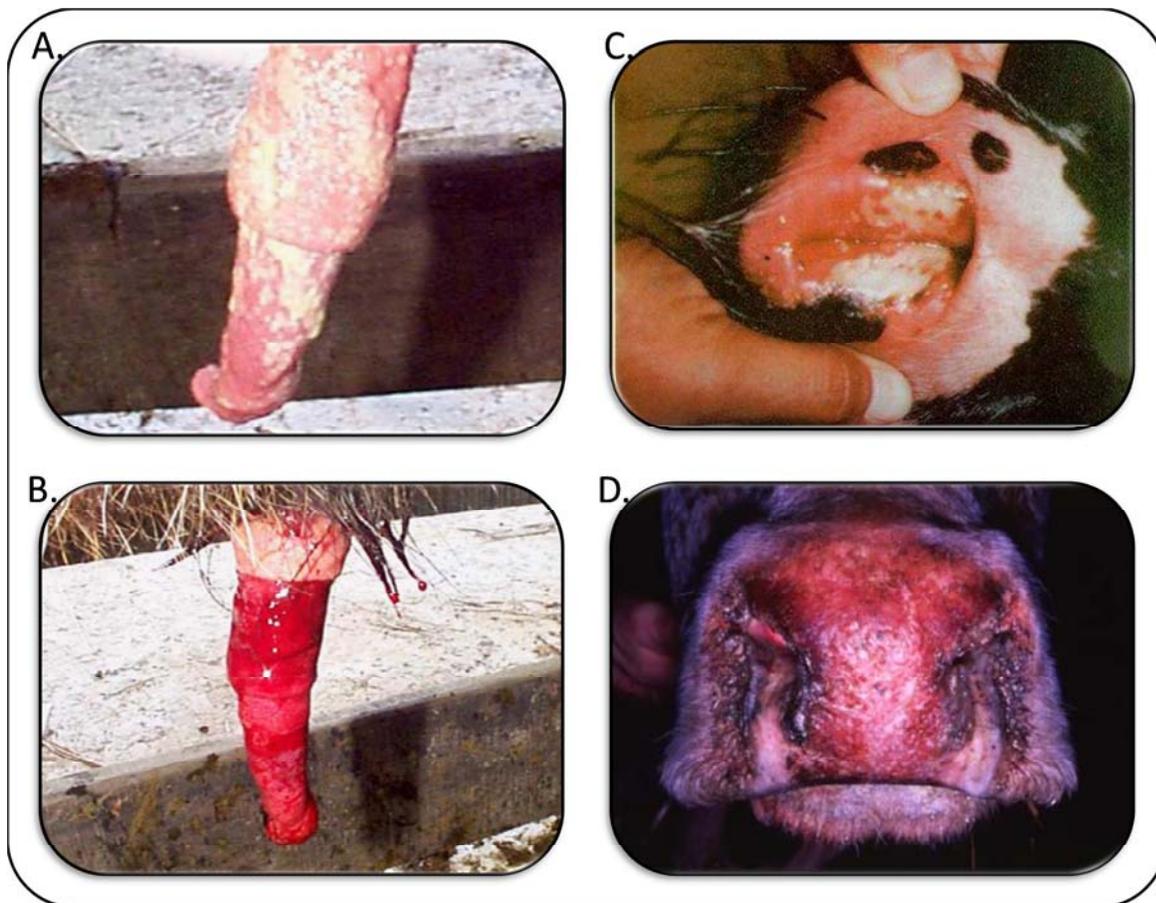


Figura 1. Lesiones clínicas causadas por la infección por el BHV-1. (A) y (B), lesiones en pene y prepucio de un toro (tomado de Vogel *et al.*, 2004); Nótese la coalescencia de las vesículas y la presencia de exudado fibrinoso a los 4 días posinfección (A); y la extensa hemorragia y ulceración en la mucosa peneana y prepucio del mismo toro a los 9 días posinfección (B). (C), Vulvovaginitis pustular en una hembra causada por el BHV-1; se evidencia la presentación de pústulas y focos hemorrágicos en la mucosa vulvar. (D), Lesiones características y secreción nasal en cavidad nasal de un bovino; la presencia de secreción mucopurulenta y el enrojecimiento del hocico es un signo característico.

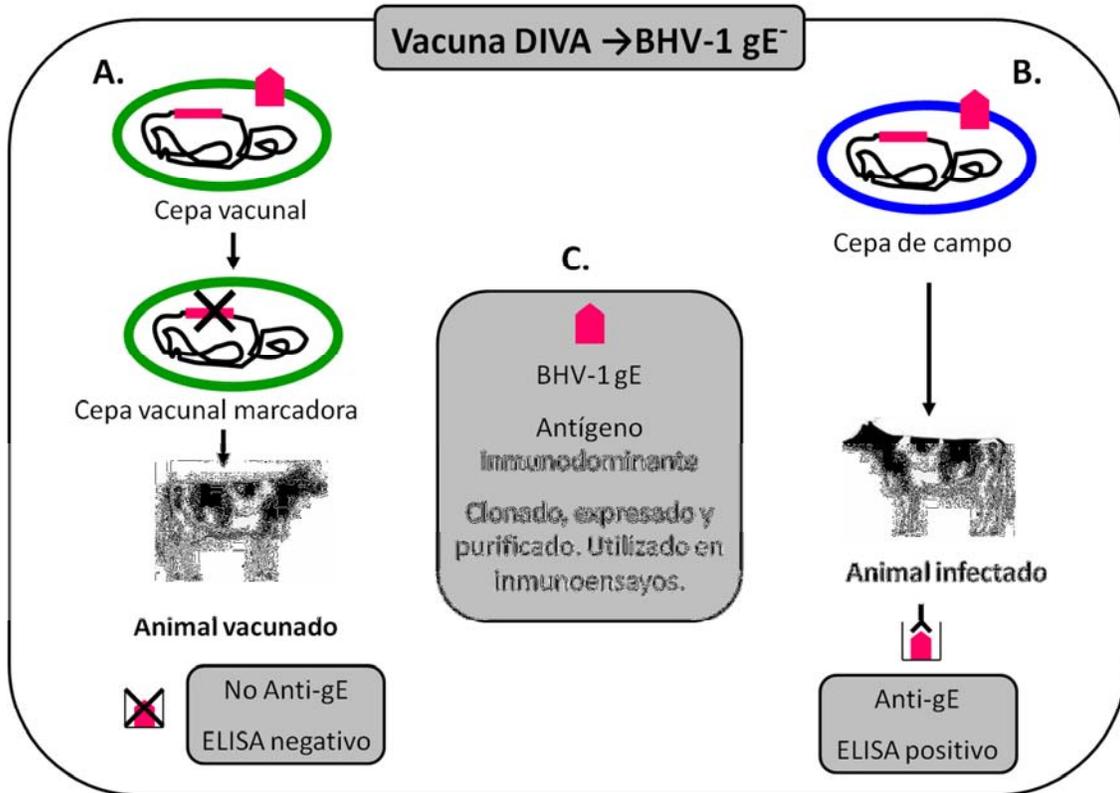


Figura 2. Uso de una vacuna marcadora *DIVA* (gE⁻) para el BHV-1. A. La cepa vacunal posee una delección del gen inmunodominante (gE) y por tanto los individuos vacunados no generan anticuerpos contra esta glicoproteína; B. Los animales infectados si generan anticuerpos contra la gE dado que la cepa de campo si la posee; C. La gE del BHV-1 es usada como antígeno para inmunoensayos.

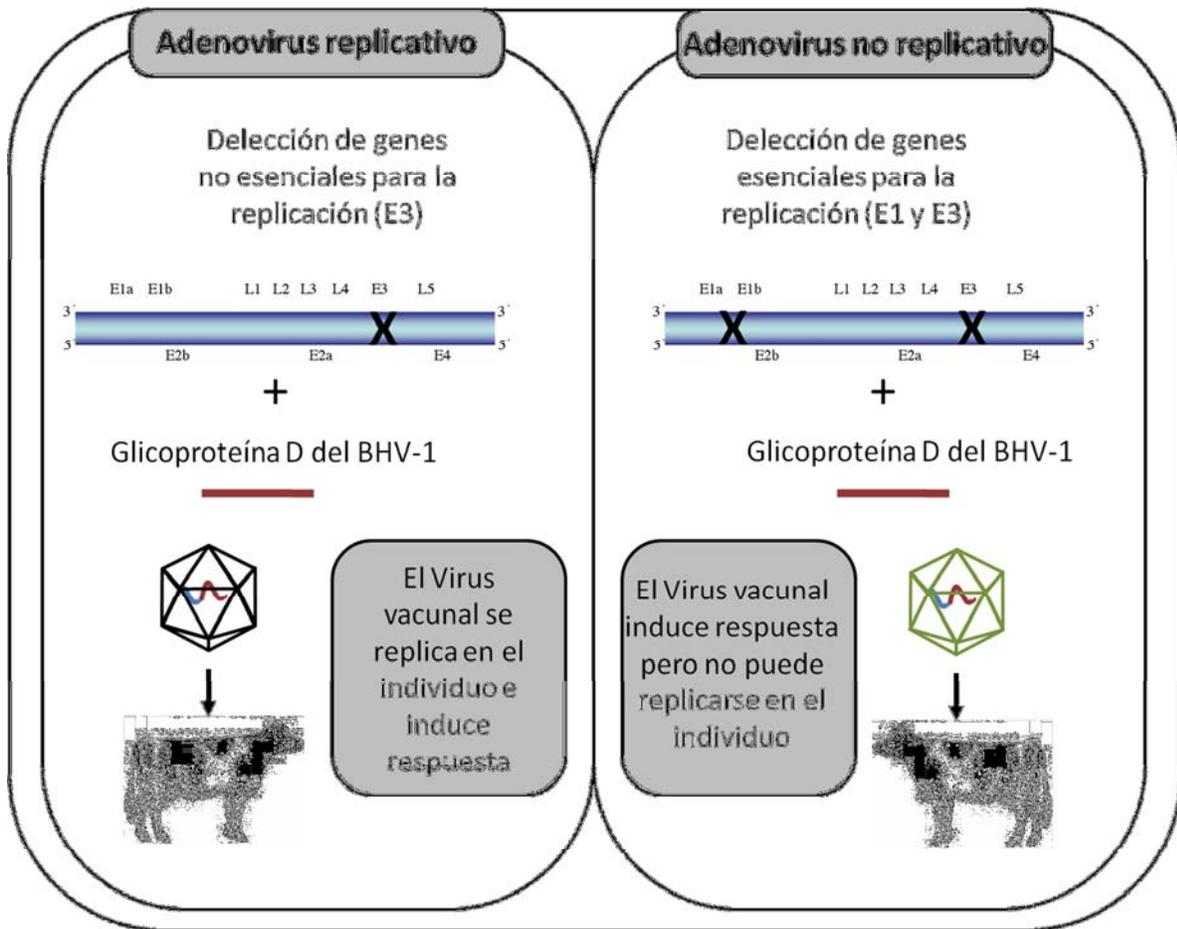


Figura 3. Vectores adenovirales que expresan la glicoproteína D del BHV-1. Los adenovirus replicativos tienen delección de la región temprana de transcripción E3 la cual no es esencial para su replicación. Si el virus recibe además una delección de la región temprana E1, la cual es esencial para su replicación, pierde su capacidad replicativa. Aunque sean incapaces de replicarse *in vivo*, estos adenovirus son capaces de inducir inmunidad para el producto génico insertado (gD del BHV-1) luego de una inmunización sistémica.

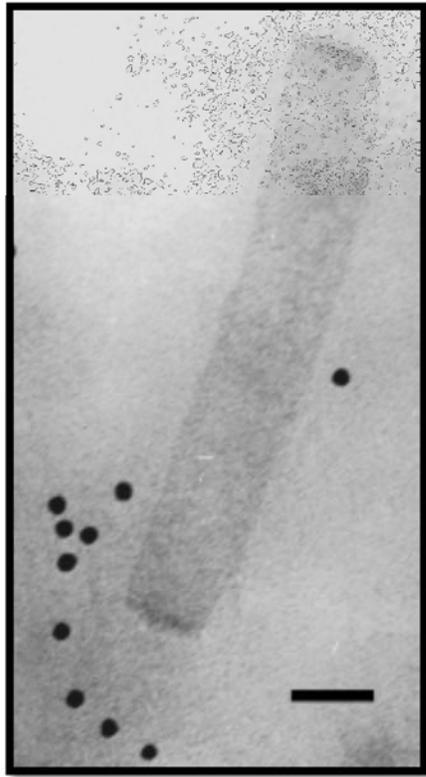


Figura 4. Inmunomarcaje con oro de un baculovirus recombinante el cual expresa la gD del BHV-1 fusionada a una de sus glicoproteínas (gp64). Note la localización de la proteína de fusión gp64/gD en la superficie del virión, la cual se marcó con un anticuerpo monoclonal anti-gD seguido por un anticuerpo IgG conjugado con oro. La barra representa 50 nm. Tomado de Peralta A *et al.*, 2006 (con autorización del Autor).

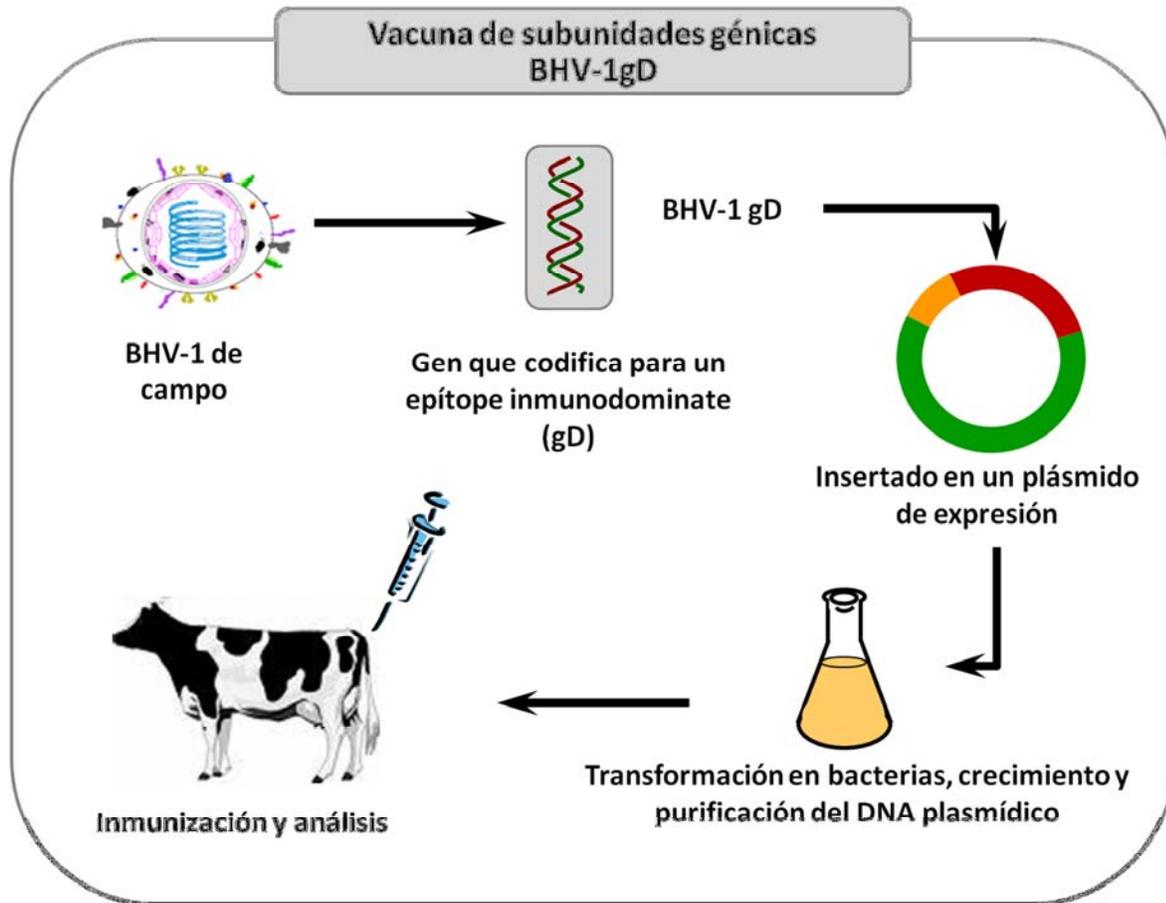


Figura 5. Desarrollo de una vacuna recombinante de subunidades génicas la cual expresa la gD del BHV-1. La glicoproteína viral es amplificada y clonada en un vector plasmídico el cual se amplifica y purifica para ser usado como inmunógeno usando la vía intradérmica.

2. Capítulo 2

Prevalencia serológica y aislamiento del Herpesvirus Bovino-1 (BHV-1) en hatos ganaderos de Antioquia y del Valle del Cauca (Publicado en 2010)

Serological prevalence and isolation of Bovine herpesvirus-1 (BHV-1) in cattle herds from Antioquia and Valle del Cauca

Julián Ruiz-Sáenz,^{1, 2*} MV, MSc; Jairo Jaime,² MV, MSc, PhD; Víctor J. Vera,² MV, MSc, PhD.

¹Estudiante de Doctorado, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia

²Grupo de Microbiología y Epidemiología



**Revista Colombiana de
Ciencias Pecuarias**

<http://rccp.udea.edu.co>

RCCP

Prevalencia serológica y aislamiento del Herpesvirus Bovino-1 (BHV-1) en hatos ganaderos de Antioquia y del Valle del Cauca[†]

Serological prevalence and isolation of Bovine herpesvirus-1 (BHV-1) in cattle herds from Antioquia and Valle del Cauca provinces

Prevalência sorológica e isolamento do Herpesvirus Bovino-1 (BHV-1) em rebanhos bovinos de Antioquia e Valle del Cauca

Julián Ruiz-Sáenz,^{1, 2*} MV, MSc; Jairo Jaime,² MV, MSc, PhD; Víctor J. Vera,² MV, MSc, PhD

[†]Estudiante de Doctorado, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.

²Grupo de Microbiología y Epidemiología. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional

Rev Colomb Cienc Pecu 2010; 23:299-307

Prevalencia serológica y aislamiento del Herpesvirus Bovino-1 (BHV-1) en hatos ganaderos de Antioquia y del Valle del Cauca

Resumen

El BHV-1 es un agente causante de graves pérdidas económicas. En nuestro país, ha sido reportado desde comienzos de los años 70 y aunque existe un plan de vacunación y prevención de la enfermedad, se sospecha que es uno de los principales limitantes de las explotaciones ganaderas del país. El objetivo de la presente investigación fue desarrollar un estudio serológico de la presencia del BHV-1 en dos sistemas de producción ganadera de leche y carne con antecedentes de no vacunación y posterior intento de aislamiento viral. Se realizó un estudio serológico transversal en el cual se muestrearon 316 individuos pertenecientes a 6 diferentes haciendas ganaderas, ubicadas en los departamentos de Antioquia y del Valle del Cauca. Utilizando la prueba de seroneutralización en cultivo celular, se encontró un 100% de prevalencia serológica por hato para el BHV-1 y una prevalencia general por individuos del 75.63%. La prevalencia para los hatos pertenecientes a los departamentos de Antioquia y del Valle fue del 85.51% y 69.84% respectivamente. Posteriormente, mediante inmunosupresión farmacológica, se realizó aislamiento viral en individuos que presentaron los títulos seroneutralizantes más altos, lográndose aislamientos del virus tanto de toros como de vacas y de diferentes muestras, indicando un estado de enzootia de la infección y demostrando que el BHV-1 sigue siendo uno de los agentes de mayor difusión en diferentes ámbitos ganaderos del país.

Palabras Clave: *bovino, rinotraqueítis, virus, vulvovaginitis/balanopostitis.*

Summary

BHV-1 causes severe economic losses. In our country, this virus has been reported since the early 70s and although there are vaccination and prevention plans, it's thought one of the major constraints of the livestock industry. Our goal was to develop a serological survey of the presence of BHV-1 in two livestock production

systems in order to try viral isolations. We performed a cross-sectional serological survey which sampled 316 unvaccinated individuals belonging to 6 different farms located in the departments of Antioquia and Valle del Cauca. Using the serum neutralization test, it was found a 100% sero-prevalence for herd for the BHV-1 and an overall prevalence of 75.63% for individuals. The prevalence for herds in the Antioquia and Valle's departments was 85.51% and 69.84% respectively. Subsequently, using immunosuppressive therapy, viral isolations were attempted from samples of individuals with highest neutralizing titers, obtaining isolates from both bulls and cows and different samples, indicating an enzootic state of infection and demonstrating that BHV-1 remains being one of the most widely dispersed agents in the country.

Key words: *Bovines, rinotracheitis, virus, vulvovaginitis/balanopostitis.*

Introducción

El BHV-1, es un virus de genoma ADN perteneciente a la subfamilia *Alfaherpesvinae* (Wyler *et al.*, 1989) y posee múltiples cepas serológicamente indiferenciables. Con base en el análisis genómico se ha clasificado en dos tipos y tres subtipos: BHV-1.1, BHV-1.2a, BHV-1.2b (Büchen-Osmond, 1995).

El BHV-1 afecta al bovino, en el cual provoca manifestaciones clínicas como rinotraqueítis, vulvovaginitis/balanopostitis pustular infecciosa, conjuntivitis, aborto, enteritis y encefalitis (Pidone *et al.*, 1999). El virus se transmite directamente a través de secreciones respiratorias, oculares y reproductivas o indirectamente través de personas o equipos. También puede diseminarse por semen y embriones (van Oirschot *et al.*, 1993; Bielanski y Dubuc, 1994)

El diagnóstico puede hacerse mediante aislamiento viral, inmunotinción, ELISA y seroneutralización. También es posible utilizar pruebas de PCR, las cuales tienen la mayor sensibilidad y especificidad (OIE, 2004) y pueden diferenciar virus vacunales de virus de campo (Fuchs *et al.*, 1999)

En Colombia, se lograron los primeros aislamientos a comienzos de los años 70 (CIAT, 1972; CIAT, 1975); otros en los 90's (Gongora *et al.*, 1995, Molano *et al.*, 1996); y otro en 2001 (Chaparro *et al.*, 2002). Se ha realizado la caracterización molecular de los últimos dos aislamientos, clasificándolas como BHV-1.1 y BHV-1.2a respectivamente (Piedrahita *et al.*, 2005). La prevalencia de la infección varía del 3.7% a 76% entre 1978 y 2006 en varias regiones del país (Griffiths *et al.*, 1982; Arboleda *et al.*, 1993; Betancur *et al.*, 2006). En 1982, se reportó un 51.7% en la región Caribe, un 21.5% para la región Andina y un 20.6% en pie de monte llanero (Griffiths *et al.*, 1982); en 1991, se reportó un 31.9% de positividad en sueros bovinos de diferentes regiones del país (Orjuela *et al.*, 1991). En Córdoba y Sucre, entre los años 1980 - 1984, se encontró un 29.6% (Otte *et al.*, 1985); en toros de Bogotá se encontró un 15.3% de serorreactividad (Gongora *et al.*, 1995). En 2006, usando la técnica de ELISA se reportó una prevalencia del 74.7% en fincas de Montería (Betancur *et al.*, 2006).

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un estudio serológico del BHV-1 en dos sistemas de producción ganadera de leche y carne, para, mediante inmunosupresión farmacológica, intentar aislamientos virales; con el fin de tener bases para evaluar la epidemiología de la infección por el BHV-1 y poder enfocar racionalmente los sistemas de prevención y control de la infección.

Materiales y métodos

Células y virus

Se utilizó la línea celular MDBK (ATCC CCL-22) obtenida del repositorio de células del laboratorio de Virología del Grupo de Microbiología y Epidemiología de la Universidad Nacional de Colombia, las cuales se mantuvieron a 37°C en una atmósfera del 5% de CO₂ en Medio Esencial Mínimo-MEM (Gibco-Invitrogen, Inc. Grand Island, NY) suplementado con SFB al 10% (Gibco-Invitrogen, Inc. Grand Island, NY), penicilina-estreptomicina (10.000U/ml y 10µg/ml respectivamente) y anfotericina (0.25µg/ml) (Gibco-Invitrogen, Inc. Grand Island, NY). Se utilizó virus de referencia cepa IOWA, la cual fue cosechada, titulada en células MDBK y almacenada a -70°C.

Análisis serológico

Para escoger la población a muestrear al interior de cada hato, se realizó un análisis poblacional para poblaciones finitas con un nivel de seguridad del 95%, un error estándar del 10%, asumiendo una proporción esperada de infección del 50%. Previa certificación de que el hato no había recibido vacunación contra BHV-1, la población escogida, se sangró por punción en la vena coccígea media usando Vacutainer® (Becton-Dickinson, NJ, USA) a fin de evaluar los títulos de anticuerpos seroneutralizantes en cultivo celular. Esta técnica, debido a su alta sensibilidad y especificidad, es la técnica recomendada por la OIE como técnica estándar para autorizar el tráfico internacional de bovinos (OIE, 2004). Las muestras fueron rápidamente llevadas al laboratorio de virología de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia, donde se separaron los sueros por centrifugación a 640 G durante 10 min y se almacenaron a -20 °C para su posterior uso en la técnica mencionada.

Seroneutralización en células MDBK

Para esta técnica, se inactivaron los sueros por incubación a 56 °C durante 30 minutos, luego se hicieron diluciones dobles seriadas desde 1:2 hasta 1:256 de los sueros en placas de cultivo celular de 96 pozos, las cuales se pusieron en contacto con una concentración constante de BHV-1 cepa Iowa (100 dosis infecciosas para cultivo celular) incubándose por 2 horas a 37 °C. Posteriormente se adicionaron 10.000 células MDBK por pozo y se incubó a 37 °C al 5% de CO₂ durante 72 horas, tiempo para el cual se determinó el *Título seroneutralizante*, entendiéndose éste como la mayor dilución del suero con capacidad para inhibir la replicación viral (OIE, 2004).

Inmunosupresión Farmacológica

Se utilizó un protocolo previamente establecido por el Grupo Microbiología y Epidemiología el cual utiliza 1 dosis de 200 mg de dexametasona por vía intravenosa (Chaparro *et al.*, 2002). Este procedimiento se aplicó a mínimo tres individuos por hato que presentaran los títulos seroneutralizantes más altos, a fin de maximizar las posibilidades de obtención del virus (Perez *et al.*, 2005).

Toma de muestras para aislamiento viral

Luego de 4 días post-inmunosupresión, se tomaron muestras de exudados nasales, oculares, vaginales y prepuciales. Las muestras de exudados vaginales, nasales y oculares fueron tomadas por medio de un hisopo estéril de algodón. Luego, el hisopo fue transportado al laboratorio en viales plásticos con 1 ml de medio de transporte (MEM libre de suero suplementado con penicilina-estreptomicina-anfotericina (10.000U/ml-10µg/ml-0.25µg/ml) (Gibco-Invitrogen, Inc. Grand Island, NY). Para el caso de los lavados prepuciales se usaron 50 ml del mismo medio de transporte como solución de lavado, se hicieron masajes en la región prepucial por 1 min y luego se recolectó la solución la cual fue llevada en estado refrigerado para ser procesada. Una vez en el laboratorio, los hisopos se lavaron en el medio, se centrifugaron durante 20 min a 640 G y el sobrenadante fue filtrado con una membrana de 0.45 µm. Posteriormente, 1 ml del filtrado fue puesto en contacto con monocapas de células MDBK previamente cultivadas en platos de 24 pozos con el fin de intentar el aislamiento viral (Gongora *et al.*, 1995; Chaparro *et al.*, 2002).

Aislamiento viral

Los aislamientos virales se desarrollaron en cultivos de células MBDK. Para esto, monocapas confluentes de las células fueron lavadas con PBS y tratadas con 200 µl del filtrado de cada hisopo (dos pozos por muestra). Luego de una hora de incubación a temperatura ambiente, se adicionaron 300 µl de Medio Esencial Mínimo (MEM) enriquecido con 10% de suero fetal bovino y suplementado con penicilina/estreptomicina/anfotericina y se incubaron a 37 °C, en una atmósfera del 5% de CO₂ durante 72 horas. Usando un microscopio invertido de contraste de fases (Olympus® America Inc., Melville, NY) se evaluó diariamente la presencia de efecto citopático. En ausencia de este, las células se desprendieron y se lisaron usando congelación/descongelación por tres veces y el lisado se puso en contacto con una monocapa nueva (pase ciego) por un nuevo periodo de incubación de 72 horas. Este proceso se realizó hasta tres veces, momento en el cual se consideró negativa la presencia del virus en la muestra. En caso de encontrarse efecto citopático positivo, se

espero hasta que éste alcanzara el 70% de la monocapa, se recuperaron las cosechas y luego se almacenaron a -70 °C (Gongora *et al.*, 1995; Chaparro *et al.*, 2002; OIE, 2004).

Extracción de ADN y reacción en cadena de la polimerasa PCR para la glicoproteína D (gD) del BHV-1

Para comprobar que las cepas aisladas correspondían al BHV-1, inicialmente se realizó extracción de ADN de 1 ml del lisado celular usando 0.5 ml de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), seguido por precipitación con 50 µl de acetato de sodio (3M) y 1 ml de isopropanol 100% (previamente enfriado a -20 °C). El ADN fue recolectado por centrifugación, se lavó dos veces con etanol al 70% y se disolvió en 200 µl de solución tampón TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Posteriormente, la amplificación se realizó en un volumen final de 25 µl que contenía: solución tampón PCR 1X (50 mM KCl, 10 mM Tris/HCl, pH 9.0, 0.1% Tritón X-100), 200 µM de cada dinucleótido trifosfatado (dNTP), 2.5 mM MgCl₂, 2.0 µM de cada cebador y 0.5 U de Taq ADN Polimerasa (Fermentas Inc® Cromwell Park Drive, USA). Los cebadores usados fueron: gDF 5'-ATGCAAGGGCCGACATTGGCCGTG-3' y gDR 5'-TTAGGGCGTAGCGGGGGCGGGCG-3', los cuales generan un fragmento de 1180pb aproximadamente. Como control positivo se utilizó ADN extraído de células MDBK infectadas con la cepa IOWA y como control negativo se utilizó agua grado biología molecular (Amresco Inc® Solon, Ohio) en lugar de ADN. La amplificación se realizó en un termociclador (Bio-Rad™ Inc Hercules, CA, USA) con los siguientes parámetros: desnaturalización inicial a 94 °C /10 min, seguida de 35 ciclos de 95 °C/30 seg, 60 °C/1 min y 72 °C/1 min, con una extensión final de 72 °C/10 min. Finalmente, 5 µl del producto de la PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, coloreado con bromuro de etidio (0.5 µM) y visualizados por trans-iluminación con luz UV.

Análisis estadístico

El porcentaje de seropositividad para el BHV-1 se determinó mediante la relación porcentual entre el número de animales que presentaron anticuerpos seroneutralizantes y el número de animales evaluados. Todos los resultados se analizaron mediante estadística descriptiva utilizando el programa Microsoft® Excel® 2007 para Windows®.

Resultados

Muestreo

Se muestrearon un total de 316 individuos no vacunados pertenecientes a seis diferentes haciendas ganaderas (véase Tabla 1); tres de ellas dedicadas a la producción de leche, ubicadas en el norte del departamento de Antioquia y las tres restantes dedicadas a la ceba de ganado destinado al faenado ubicadas en el departamento del Valle del Cauca.

Análisis serológico

Se encontró un 100% de prevalencia serológica por hato para el BHV-1 y una prevalencia general por individuos del 75.63%. La prevalencia para las haciendas ganaderas de los departamentos de Antioquia y del Valle fue del 85.51% y 69.84% respectivamente. Considerándose negativos todos los individuos con títulos $<1:2$. Se encontraron títulos seroneutralizantes entre 1:2 y 1:64, siendo el valor más común 1:4 (véase figura 1).

Inmunosupresión farmacológica

Teniendo en cuenta los títulos seroneutralizantes, se escogieron los individuos con los mayores títulos, seleccionándose cinco animales en cada una de las haciendas del valle del cauca y tres animales en cada una de las de Antioquia (24 en total). Estos, en condiciones de aislamiento al interior de las mismas haciendas, recibieron una dosis única de 200 mg de dexametasona vía intravenosa; cuatro días después los animales se encontraban en buenas condiciones de salud. Mientras en algunas hembras se evidenció una leve presentación de vulvovaginitis, ninguno de los toros tratados mostró balanopostitis y ninguno de los animales tratados mostró signos de enfermedad respiratoria compatible con rinotraqueítis. En ninguna hacienda se reportó incrementos en la temperatura de los animales; sin embargo, en las haciendas productoras de leche se reportó una disminución de la producción láctea de cerca del 80% a las 24 horas post-tratamiento, que se recuperó completamente al quinto día post-tratamiento. Dada la imposibilidad de pesar los animales en las haciendas ganaderas, no fue posible registrar

si hubo una disminución en el peso de los mismos; sin embargo, no hubo disminución evidente en la condición corporal de los individuos.

Aislamiento viral y confirmación por PCR

A cada animal se le tomaron tres muestras: una respiratoria, una ocular y una reproductiva, para un total de 72 muestras, las cuales se llevaron a cultivo celular. Se logró aislar virus tanto de muestras respiratorias como oculares y reproductivas. Adicionalmente, fue posible recuperar virus tanto de toros como de vacas tratadas. En todos los casos, fue necesario realizar como mínimo un pase ciego para poder evidenciar un efecto citopático característico en el cultivo celular. La figura 2 muestra como se evidencia el efecto citopático viral en un cultivo de células MDBK infectado, visualizado en microscopio invertido en un aumento de 20X a diferentes horas post-infección (HPI).

Se recuperaron un total trece cepas virales, ocho de ellas pertenecientes al departamento del Valle del Cauca y las cinco restantes al de Antioquia. De las cepas aisladas, cinco fueron recuperadas de tracto reproductivo y las restantes fueron recuperadas de tracto respiratorio (ocular y nasal). Las muestras que presentaron efecto citopático positivo se confirmaron por prueba de PCR utilizando cebadores específicos para la gD del virus; adicionalmente, se evaluaron algunas de las muestras negativas para confirmar su estatus (véase figura 3).

Discusión

El BHV-1 es uno de los agentes más ampliamente distribuidos en Colombia; y a pesar de que existen múltiples agentes vacunales contra este virus (Ruiz-Saenz *et al.*, 2009), se sospecha que es uno de los mayores generadores de pérdidas económicas en la producción ganadera tanto de carne como de leche a nivel nacional.

El 100% de prevalencia serológica por hato y la prevalencia general por individuos del 75.63% encontrada en el presente estudio, al igual que la prevalencia del 74.6% reportada por Betancur *et al.*, en 2006 en bovinos de Montería nos permiten postular que la infección por el BHV-1 en Colombia se comporta bajo un estatus de enzootia de la infección. Este estado ha sido reportado en algunos países europeos en los cuales se ha demostrado una alta proporción de la población infectada y la presencia de un ciclo estable de infección (Boelaert *et al.*, 2000). Teniendo en cuenta que el BHV-1 permanece latente en los individuos durante toda la vida del animal, es comprensible que se genere una co-existencia del virus con la población causando ciclos de enfermedad debidos a la reactivación del virus latente.

Aunque en esta investigación no se estableció asociación con variables como el sexo o la edad, múltiples estudios han reportado que los toros infectados podrían ser una importante fuente de transmisión de la infección (Gongora *et al.*, 1995; Betancurt *et al.*, 2006). Sin embargo, en el presente estudio, se logró realizar aislamiento de virus tanto de muestras de toros como de vacas, indicando que aunque el toro puede llegar a ser la fuente de diseminación de la infección por vía venérea, las vacas también desempeñan un importante papel epidemiológico, ya que también pueden reactivar y excretar virus con capacidad infecciosa.

Mucho se ha discutido acerca de la dificultad de realizar aislamientos del BHV-1. Zapata *et al.*, en 2002, reportaron el infructuoso intento de aislamiento a partir de 1344 muestras provenientes de 1013 individuos procedentes de diferentes zonas del país, cinco de ellos inmunosuprimidos con dexametasona 40 mg/kg durante cinco días; finalmente, dichos investigadores concluyeron que las cepas virales que circulan en el país eran cepas de

baja virulencia y que la infección no es un problema de gran impacto económico (Zapata *et al.*, 2002)

Sin embargo, en 2003, Chaparro *et al.*, reprodujeron experimentalmente la infección por el BHV-1 en terneros inoculados por vía respiratoria con una cepa aislada de tracto reproductivo de un toro, induciendo el cuadro clínico de tipo respiratorio y hallazgos macro y microscópicos que demostraron la acción patogénica de la cepa de campo estudiada; indicando que el BHV-1 aislado si tiene potencial patogénico (Chaparro, 2003).

Adicionalmente, la dosis de dexametasona reportada por Zapata *et al.*, (2002), 40 mg/kg de peso, es una dosis extremadamente alta, la cual conllevaría a problemas de cetosis u otros problemas de tipo metabólico en el animal con un alto deterioro de la salud y mínimo efecto para la obtención del virus, pues esta dosis generaría una inmunosupresión muy fuerte permitiendo la presentación de múltiples infecciones, principalmente de tipo bacteriano, las cuales dificultan el proceso de aislamiento del virus en el cultivo celular. En el presente estudio, se evidenció que la inmunosupresión farmacológica utilizando una dosis única de 200 mg de dexametasona por animal es un sistema eficiente para lograr aislamientos virales con capacidad infecciosa a partir de animales seropositivos, con un mínimo o nulo deterioro de la salud del animal y un leve detrimento en la productividad del mismo.

Es necesario desarrollar sistemas nacionales de evaluación del riesgo y de las pérdidas económicas inducidas por la presentación enzoótica de la infección, ya que aunque se han desarrollado múltiples modelos de evaluación del riesgo epidemiológico y de las consecuencias económicas de los sistemas de prevención, control y erradicación del BHV-1 (Vonk Noordegraaf *et al.*, 1998; Boelaert *et al.*, 2005), todos estos modelos son útiles solo en situaciones de baja prevalencia de la infección (Ackermann y Engels, 2006). Para los países con altas prevalencias serológicas y enzootia, es recomendable, establecer sistemas de “convivencia con la infección” por medio de programas de vacunación que permitan mantener un “cordón inmune” y disminuir así las pérdidas económicas debidas a las reactivaciones virales (OIE, 2004; Ackermann y Engels, 2006).

Los resultados también descartan la posibilidad de iniciar programas de erradicación de la infección, ya que se ha demostrado que solo es posible eliminar o erradicar la infección en áreas con prevalencias serológicas relativamente bajas (<10%), de la cual estamos muy lejanos (Ackermann y Engels, 2006).

Por tanto, teniendo en cuenta la larga convivencia con la infección en el país, los resultados nos permiten cuestionar la eficacia de los sistemas de prevención y control de la infección en Colombia y hacen necesario que dichos planes se encaminen a: disminuir la prevalencia de la infección mediante sistemas de control apropiados para el estado de enzootia de la infección que se posee en las diferentes regiones evaluadas y establecer los puntos críticos y momentos (ciclos) adecuados de vacunación que permitan mantener un buen estatus inmune y eviten las pérdidas económicas debidas a las reactivaciones y reinfecciones virales. Actualmente se está trabajando en la caracterización *in vitro* y molecular de las cepas a fin de establecer características patogénicas de las mismas y desarrollar un posible biológico vacunal a partir de cepas nativas.

Agradecimientos

Los autores agradecen a los ganaderos así como a la empresa AGROINSUVET por su colaboración en el estudio. Este trabajo fue financiado por la División de Investigación de la Sede Bogotá de la Universidad Nacional, proyecto código 20201007738. Julián Ruiz Sáenz, es becario del programa nacional de formación Doctoral del Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación – COLCIENCIAS.

Referencias

Ackermann M, Engels M. Pro and contra IBR-eradication. *Vet Microbiol.* 2006;113:293-302.

Arboleda J, Bedoya J; Rodas J, Acevedo J, Ossa J. Estudio virológico y epidemiológico de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina en un hato lechero en Antioquia. *Acovez.* 1993;34-35.

Betancur B, González, Reza L. Seroepidemiología de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina en el Municipio de Montería, Colombia. *Rev.MVZ Córdoba* 2006;11:830-836

Bielanski A, Dubuc C. In-Vitro Fertilization and Culture of Ova from Heifers Infected with Bovine Herpesvirus-1 (BHV-1). *Theriogenology* 1994; 41:1211-1217.

Boelaert F, Biront P, Soumare B, Dispas M, Vanopdenbosch E, Vermeersch JP, *et al.*, Prevalence of bovine herpesvirus-1 in the Belgian cattle population. *Prev Vet Med.* 2000;45:285-95.

Boelaert F, Speybroeck N, de Kruif A, Aerts M, Burzykowski T, Molenberghs G, Berkvens DL. Risk factors for bovine herpesvirus-1 seropositivity. *Prev Vet Med.* 2005;69:285-95.

Büchen-Osmond C. Alphabetical List of ICTV approved Virus Families and Genera. Created April, 1995. Última actualización: 8 de abril de 1998. Revisado Agosto de 2009.

Chaparro JJ, Ramirez G, Vera V, Gongora A, Villamil LC. Aislamiento de una cepa de campo del virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina en una explotación de ganado de carne en el departamento del Meta. *Revista Orinoquia*, 2002;6:100-107.

Chaparro JJ. Evaluación de la capacidad infectiva de una cepa de campo del virus de la rinotraqueitis bovina infecciosa en terneros. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 2003.

CIAT - Centro Internacional de Agricultura Tropical. Informe anual de salud animal; Bogotá. 1972.

CIAT - Centro Internacional de Agricultura Tropical. Informe anual de salud animal; Bogotá. 1975.

Fuchs M, Hubert P, Detterer J, Rziha HJ. Detection of bovine herpesvirus type 1 in blood from naturally infected cattle by using a sensitive PCR that discriminates between wild-type virus and virus lacking glycoprotein E. *J Clin Microbiol.* 1999;37:2498-507

Gongora A, Villamil LC, Vera V, Parra JL, Ramirez GC, Lopez G. Aislamiento de un herpesvirus bovino tipo-1 (BHV-1) de secrecion nasal y esmegma prepucial en un toro reproductor. *Rev Med Vet.* 1995; 63:43 – 47.

Góngora A, Villamil LC, Vera V, Ramírez G, Parra J. Diagnóstico de las principales enfermedades reproductivas en toros de la Sabana de Bogotá. Énfasis en RIB. *Rev Med Vet Zoot* 1995; 43: 37-41

Griffiths IB, Gallego MI, Villamil LC. Factores de infertilidad y pérdidas económicas en ganado de leche en Colombia. Publicaciones ICA. 1982; p.168.

Molano D, Rodríguez JL, Ramírez G, Villamil LC. Caracterización electroforética e inmunológica de una cepa de campo del virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina y su comparación con cepas de referencia. *Rev Med Vet Zootec.* 1996;44:35-8.

Orjuela J, Navarrete M, Betancourt A, Roqueme L, Cortez E, Morrison RB. Salud y productividad en bovinos de la costa norte de Colombia. *World Animal Review.* 1991; 69.

Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 5a edición. OIE, París, 2004, 1178 págs.

Otte E, Navarrete M, Orjuela J. Resultados de una encuesta realizada sobre producción y salud animal en Montería-Córdoba, Colombia. 1982-1984: parte II. Proyecto Colombo Alemán ICA-GTZ. Informe técnico. 1985; p.1-125.

Perez, S., Inman, M., Doster, A., Jones, C., Latency-related gene encoded by bovine herpesvirus 1 promotes virus growth and reactivation from latency in tonsils of infected calves. *J. Clin. Microbiol.* 2005;43:393–401.

Pidone CL., Galosi CM., Etcheverrigaray EM., Herpesvirus Bovinos 1 y 5. *Analecta Veterinaria* 1999;19:40-50

Piedrahita D, Ramírez G, Vera V. Detección y caracterización por métodos moleculares de aislamientos colombianos de Herpesvirus bovino tipo 1. *Rev Med Vet Zoot.* 2005; 52:122-127

Ruiz-Sáenz J, Jaime J, Vera V. Vacunas contra el Herpesvirus bovino-1: una mirada desde el pasado hacia el futuro de la inmunización. *Acta biol. Colomb.* 2009;14:3 – 20.

van Oirschot JT, Straver PJ, van Lieshout JAH, Quak J, Westenbrink F, van Exsel ACA. A subclinical infection of bulls with bovine herpesvirus type 1 at an artificial insemination centre. *Vet Rec* 1993;132:32-35.

Vonk Noordegraaf A, Buijtels JA, Dijkhuizen AA, Franken P, Stegeman JA, Verhoeff J. An epidemiological and economic simulation model to evaluate the spread and control of infectious bovine rhinotracheitis in The Netherlands. *Prev Vet Med.* 1998;36:219-38.

Wyller R., Engels M, Schwyzer M. Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis (BHV1). In: *Herpesvirus Diseases of Cattle, Horses and Pigs*, Wittmann G., ed. Kluwer Academic Publishers, Boston, USA, 1989. 1-72.

Zapata JC, Ossa JE, Bedoya G, Zuluaga FN. Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (RIB). Caracterización Molecular de una cepa Colombiana de Herpesvirus Bovino tipo 1. *Rev Colomb Cienc Pecu.* 2002; 15: 92-99.

Tabla 1. Distribución porcentual de bovinos muestreados en cada una de las haciendas que participaron en el estudio.

Departamento	Hacienda	# Muestras	Porcentaje
Antioquia	Hacienda 1	38	12
	Hacienda 2	50	16
	Hacienda 3	55	17
Valle del Cauca	Hacienda 1	56	18
	Hacienda 2	72	23
	Hacienda 3	45	14
Total		316	100%

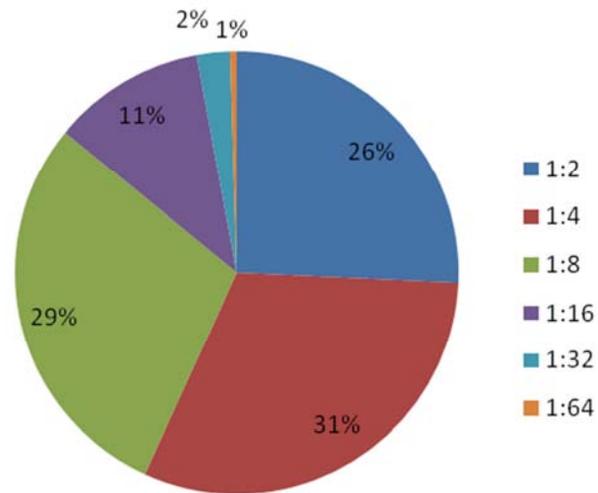


Figura 1. Distribución porcentual de los títulos seroneutralizantes mediante la técnica de seroneutralización en cultivo de células MDBK.

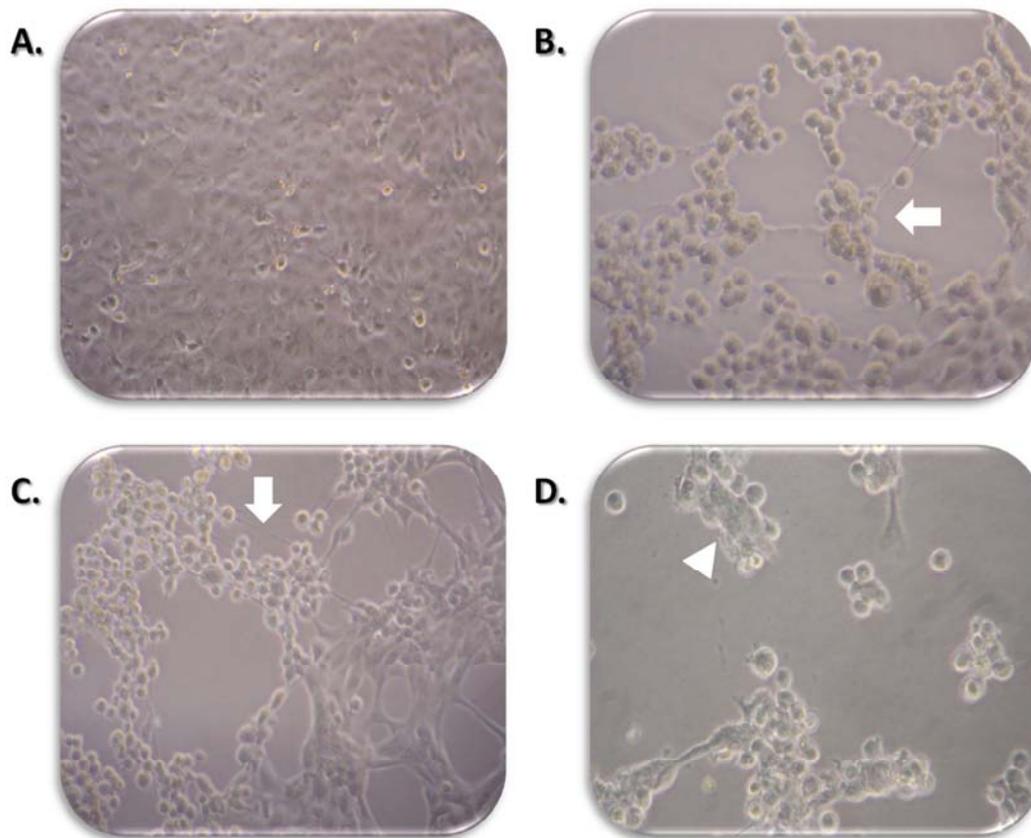


Figura 2. Aislamiento de BHV-1 en cultivos de células MDBK. A. Control negativo; B. Control positivo – cepa Iowa 48 horas post-infección (h.p.i.); C. Muestra de campo 48 h.p.i.; D. Muestra de campo 72 h.p.i. Nótese la presencia del efecto citopático característico conocido como formación de racimos de células (flechas) y formación de sincitios (cabeza de flecha), con posterior desprendimiento de la monocapa celular (B-D).

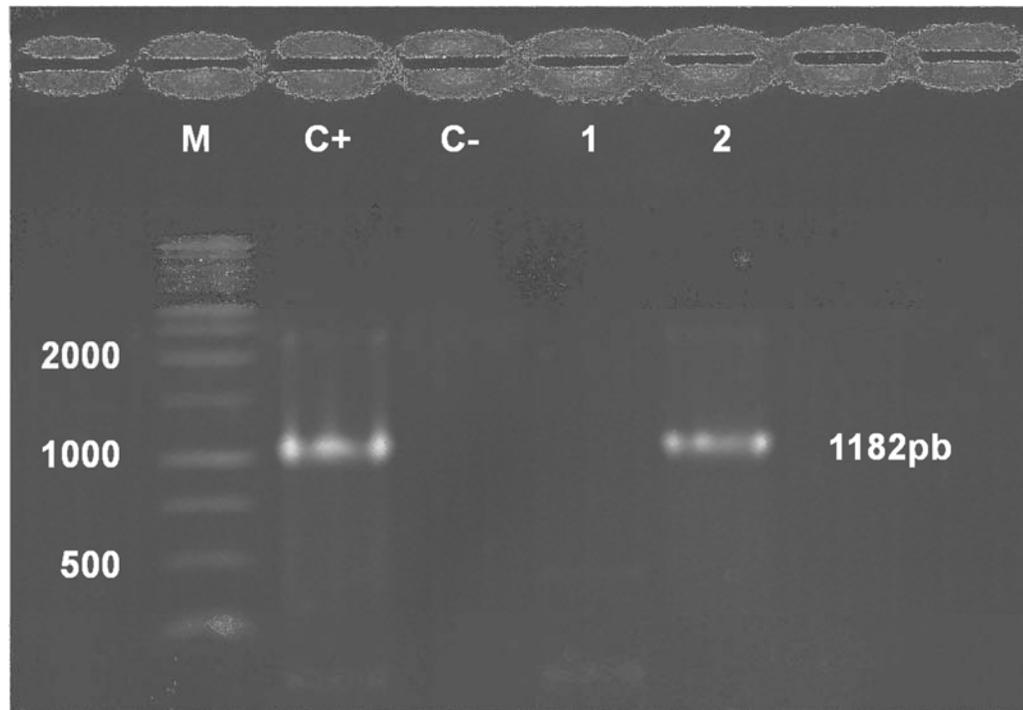


Figura 3. Visualización de productos de PCR de la gD del BHV-1. Gel de electroforesis de agarosa al 0,8% coloreado con bromuro de etidio. M: Marcador de peso molecular (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Fermentas®, Vilnius, Lithuania); C+: control positivo de la reacción (ADN extraído de cepa de cepa IOWA); C-: control Negativo de reacción (H₂O MQ). 1: ADN de células sin infectar; 2: ADN de muestra de aislamiento viral que presentó efecto citopático positivo.

3. Capítulo 3

Molecular and in vitro characterization of field isolates of Bovine Herpesvirus-1

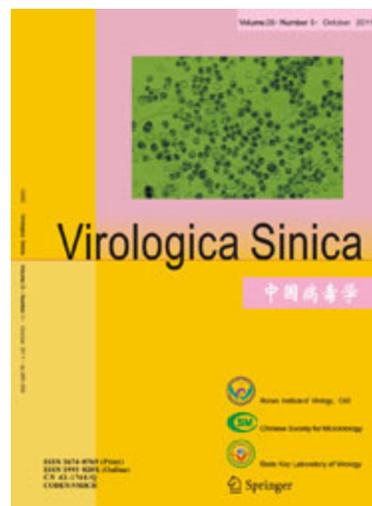
Ruiz-Saenz J^{1,2}, Jaime J¹, Ramirez G¹, Vera VJ^{1*}.

¹Grupo de Microbiología y Epidemiología, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

²Grupo Centauro, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, Medellín.

*Corresponding author: **Víctor Julio Vera A.**, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. Carrera 30 No. 45 - 03 Edificio 516B. Telephone: +571 3165693, Fax: +571 3165693. vjveraa@unal.edu.co

Published in: **VIROLOGICA SINICA**, February 2012, 27 (1):26-37



Molecular and *in vitro* characterization of field isolates of Bovine Herpesvirus-1**Ruiz-Saenz J¹, Jaime J¹, Ramirez G¹, Vera VJ^{1*}.**

Microbiology and Epidemiology Group, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, National University of Colombia, Bogotá.

*Corresponding author: **Víctor Julio Vera A.**, National University of Colombia, Bogotá. Carrera 30 No. 45 - 03 Edificio 516B. Telephone: +571 3165693, Fax: +571 3165693. vjveraa@unal.edu.co

ABSTRACT

Bovine Herpesvirus-1 (BoHV-1) is distributed worldwide and is a major pathogen for cattle, being the causal agent of a variety of clinical syndromes. The aim of this study was to isolate and to characterize (molecular and biological characterization) BoHV-1 from 29 immunosuppressed animals. It was possible to obtain 18 isolates from different animals each, such as from the respiratory and reproductive tracts. In some cases the cytopathic effect was visible 12 hours post-inoculation, and became characteristic after 36-48 hours. Biological characteristics were evaluated and compared with Iowa and Colorado-1 reference strains, and differences were found in plaque size, virus titer measured by TCID₅₀ and PFU/ml, and one step virus curves. These results showed that some isolates had a highly virulent-like behavior *in vitro*, compared to the reference strains, with shorter eclipse periods, faster release of virus into the supernatants, and higher burst size and viral titer. There were no differences in glycoprotein expression of BoHV-1 isolates, measured by western blot on monolayers. Moreover, using restriction endonucleases analysis most of the viruses were confirmed as BoHV-1.1 and just one of them was confirmed as BoHV-1.2a subtype. These findings suggest that some wild-type BoHV-1 isolates could be useful as seed to develop new monovalent vaccines.

Keywords: Bovine herpesvirus 1 (BoHV-1); Genital infection; Respiratory infection; Latent infection.

INTRODUCTION

Bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) is a member of the family *Herpesviridae*, subfamily *Alphaherpesvirinae*^[2]. It is recognized worldwide as a major pathogen for cattle^[28], and is the causal agent of a variety of clinical syndromes with high morbidity and low lethality rates, such as infectious bovine rhinotracheitis (IBR), a severe respiratory tract infection of great economic impact, as well as infectious pustular balanopostitis and infectious pustular vulvovaginitis (IPB/IPV); occasionally, the virus has also been associated with central nervous disorders^[1, 22].

BoHV-1 isolates have been classified into subtypes 1 and 2, based on restriction endonuclease analyses (REA) of the viral DNA after virus isolation^[7], BoHV-1.1 being mainly associated with IBR and BoHV-1.2 with IPB/IPV^[16]. The differentiation between BoHV-1 strains is usually made by the clinical-epidemiological characteristics of outbreaks, usually followed by REA of viral DNA^[20, 26] in which REA profiles have led to the subtyping of viruses apparently belonging to the same type, but associated with specific clinical syndromes. Based on genomic and antigenic differences, BoHV-1.2 could also be subclassified as 2a and 2b without strong association with neither clinical, pathological nor epidemiological parameters^[4]. In addition, it has been possible to characterize BoHV-1 isolates using monoclonal antibodies (MAbs) against antigenically distinct epitopes identified on the viral glycoproteins (g) gB, gC, gE and gD, some of

which are targets for neutralizing antibodies ^[27]. However there is no clarity on which one could be the role of immunodominant epitopes on virus characterization ^[4].

On the other hand, virulence of isolates has long been characterized by one step growth curves, which allow assessing the growth and replicative capacity of isolates compared to a parental or reference strain, demonstrating the presence of attenuated or highly virulent strains *in vitro*^[3, 19], which has been efficiently corroborated with the pathogenicity of the BoHV-1 in its natural host^[12, 13, 17]

In Colombia, BoHV-1 was originally isolated in the 70's; however, there is no clear knowledge about the present BoHV-1 subtypes. The aim of this study was to isolate and characterize field isolates of BoHV-1 obtained from different cattle production systems in the country, to establish which is the acting subtype and to postulate the possible disease mainly associated with it, using also BoHV-1 reference strains to compare the results and correlate REA patterns with monoclonal antibody patterns and in vitro growth kinetics.

MATERIAL AND METHODS

Cells and viruses

The Madin Darby Bovine Kidney (MDBK - ATCC CCL-22) cell line was obtained from the cell repository of the Virology Laboratory of the Microbiology and Epidemiology Group, National University of Colombia; it was maintained at 37°C in 5% CO₂ in minimum essential medium (MEM; Gibco-Invitrogen, Inc. Grand Island, NY) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco-Invitrogen, Inc. Grand Island, NY) and penicillin-streptomycin-amphotericin (10,000 u/ml; 10 µg/ml; 0.25 µg/ml respectively; Gibco-Invitrogen, Inc. Grand Island, NY). The virus strains IOWA and Colorado-1 (cooper-1

ATCC-V864), harvested from MDBK cells and stored at -70°C served as reference strains.

Animal samples

Five days before taking the samples, seropositive animals were intravenously treated with 200 mg dexametasone (Azium®, Intervet/Schering-Plough Animal Health, USA) to facilitate endogenous virus reactivation ^[29]. Samples of nasal, ocular, vaginal and preputial swabs were taken using sterile cotton swabs. The swabs were transported chilled to the laboratory in plastic vials with 1 ml of serum-free transport medium. Animal handling and sampling procedures were carried out in compliance with the recommendations of the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” of the National Research Council (Academy Press, 1996, Washington, USA).

Virus isolation

Once in the laboratory, the swabs were centrifuged for 20 min at $640\times g$ and the supernatants were recovered and filtered through $0.45\ \mu\text{m}$ filters. Subsequently, 200 μl of the filtrate of each swab (two wells per sample) were put in contact with MDBK cell monolayers grown in 24-well plates (USA Scientific, Inc., Ocala, FL) to isolate the virus. After 1 hour (h) of incubation at room temperature, 300 μl of MEM, 10% FBS and penicillin-streptomycin-amphotericin were added and the samples were incubated at 37°C in 5% CO_2 for 72 h. The cultures were examined daily under a light microscopy for cytopathic effects (CPE). Cultures that remained negative for CPE after 72 h were subjected to three additional passages; briefly, cells were detached, freeze/thawed, centrifugated at $1000\times g$ and the supernatants were put on a new monolayer with a new incubation period of 72 h. The viruses were harvested from cytopathic positive samples when the CPE reached 70% of the monolayer and were stored at -70°C .

Virus titration

The tissue culture infective dose 50 (TCID₅₀) for each BoHV-1 field isolate and reference strain were performed twice in MDBK cells seeded onto 96-well microtiter plates (USA Scientific, Inc., Ocala, FL) at 5×10^4 cells per well. The growth media in the 96-well plates were replaced by 10-fold (10^{-1} – 10^{-10}) total virus dilutions made in medium containing 1% FBS with 8 replicas per dilution. After incubation at 37°C in 5% CO₂ for 72 h, the plates were inactivated and fixed with 3.7% formaldehyde in Phosphate buffered saline (PBS) and stained with violet cristal. The infectious dose was calculated following the Sperman Kaerber method [9].

Plaque assays were used to measure infectious virus particles such as in total virus and in viral growth kinetics. MDBK cells were seeded onto 24-well culture plates (USA Scientific, Inc., Ocala, FL) at a concentration of 2×10^5 cells per well. Serial 10-fold dilutions (10^{-1} – 10^{-7}) of viruses, supernatants or cell lysates were performed and added to the cells. After 1 h, the medium was removed and semisolid medium (0.4% agarose prepared in MEM with 2% FBS) was added into each well. Following incubation for 48 h, the plates were inactivated and fixed with 3.7% formaldehyde in PBS and stained with cristal violet. The number of plaques per well was used to calculate the number of plaque forming units (PFU)/ml. Viral plaques were evaluated under a light microscope for each virus isolate.

One step growth kinetics

MDBK cells were infected at a multiplicity of infection (MOI) of 10. After 2 h at 4°C, MEM medium was added and the cells were incubated for 30 min at 37°C to allow virus penetration. The inoculum was then removed, and the cells were washed twice with PBS and incubated with fresh medium. After 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18 and 24 h of incubation at

37°C, supernatants containing extra-cellular progeny viruses were collected, clarified by centrifugation (1500xg) and frozen. Titrations of these supernatants as measured by the plaque assay on MDBK cells, determined the extra-cellular virus production. Simultaneously, infected cell monolayers were washed twice with PBS in 500 µl of MEM and frozen at -80°C. Intra-cellular virus production was obtained from titrations of the cell lysates. The number of plaques per well was counted, and the PFUs in the original inoculum (PFU/ml) were determined. The results are expressed as the average of at least 2 independent assays with 2 replicates for each assay.

Extraction of viral DNA

For PCR confirmation of the strains, 1 ml of supernatant from infected cultures was collected and the DNA was extracted using an equal volume of phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) mixture, mixed and centrifuged at 12 000 xg for 5 min. The upper phase (water phase) was transferred to a new tube, and 2.5 volumes of 96% ethanol and 1/10 volume of 3 M sodium acetate pH 5.2 were added. After mixing, the tubes were incubated overnight at -20°C. The DNA was collected after centrifugation at 12 000 x g at 4°C for 15 min. The DNA pellets were washed with 70% ethanol, dried, dissolved in 50 µl of ultrapure water and kept at -20°C before PCR.

For restriction endonuclease assays, viruses were inoculated in T175 cell culture bottles (175 cm²) with MDBK 80% confluent monolayers, at a multiplicity of infection of 0.01–0.1 and incubated at 37°C. When cytopathic effects reached 80–90% (36–48 h), the culture medium was clarified by low speed centrifugation. Viral DNA was extracted from the supernatants using the commercial kit Blood & Cell Culture DNA Midi Kit® (Qiagen®, Hilden, Germany) according to the manufacturer's recommendations. Briefly, the samples were lysed and proteins simultaneously denatured in the appropriate lysis buffer;

proteinase K was then added, the mixtures incubated at 56°C, and the lysates were loaded onto a QIAGEN Genomic-tip in which DNA binds to the column. A wash step was performed to remove any remaining contaminant, and pure, high-molecular-weight DNA was eluted, precipitated with isopropanol, dissolved in ultrapure water (Amresco Inc ® Solon, Ohio) and kept at –20°C before endonucleases treatment.

PCR confirmation

Amplification was performed in a final volume of 25 µl containing: 1X PCR buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9.0 and 0.1% Triton X-100), 200 mM of each deoxynucleotide triphosphate (dNTP), 2.5 mM MgCl₂, 2.0 mM of each primer and 0.5 U of Taq DNA Polymerase (Fermentas Inc ® Cromwell Park Drive, USA). Forward and reverse primers were respectively: 5'-ATGCAAGGGCCGACATTGGCCGTG-3' and 5'-TTAGGGCGTAGCGGGGGCGGGCG-3', which generate a fragment of approximately 1180 bp. As positive control DNA extracted from IOWA-infected MDBK cells and ultrapure water were used as a negative controls instead of DNA. Amplification was performed in a thermocycler (Bio-Rad™ Inc Hercules, CA, USA) with the following parameters: initial denaturation at 95°C/10 min followed by 35 cycles of 95°C/30 sec, 60°C/1 min and 72°C/1 min, with a final extension of 72°C/10 min. Finally, 5 µl of PCR product were analyzed by 0.8% agarose gel electrophoresis, ethidium bromide stained (0.5 mM) and visualized by trans-illumination with UV light.

Restriction endonuclease analysis

Viral DNA was cleaved with *Hind*III under the conditions recommended by the manufacturer (Fermentas®, Vilnius, Lithuania). The digestion products were separated by electrophoresis in 0.6% agarose gels at 30 V using TAE electrophoresis buffer (4 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA pH 8.0). The products were visualized using EZ-VISION™

(Amresco® Solon, OH, USA) and analyzed using Gel Doc XR® (Bio-Rad, Hercules CA, USA).

Monoclonal antibody analysis

To further define antigenic relationships between the bovine herpesvirus isolates, western blots were performed as reported by Dasika and Letchworth^[5]. Briefly, equal amounts of virus-infected cell lysates or mock-infected lysates were boiled and resolved on 8% SDS-PAGE under reducing conditions^[14], and the proteins transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Hercules CA, USA). The blots were blocked, incubated 1 h at room temperature with each anti-BoHV-1 mAb (Table 1) according to Marshall et al.,^[15] (kindly provided by G. J. Letchworth, Madison, Wisconsin) followed by 1 h incubation with secondary monoclonal antibody HRP-conjugated Anti-Mouse IgG. The signals were visualized after treatment of the membrane with SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate solution for 5 min (Pierce, Rockford, IL, USA) and exposed to an X-ray film (Kodak®, Rochester, NY, USA) from 0.5–3 min as necessary to detect a signal.

Statistical analysis

For one step growth curves statistical analysis was performed using the two-tailed paired student's t tests to determine significance with 95% confidence intervals. A *p value* < 0.05 was considered significant.

RESULTS

Animal samples and virus isolation

From 29 immunosuppressed animals it was possible to isolate 18 virus samples each from different animals (Table 2), most of them (10 samples) from the respiratory tract and eight from the reproductive tract. In most of cases the CPE was initially visible 12 h post-inoculation, and became characteristic by 36-48 h post-inoculation. In 6 out of 8 samples from a town of the Cauca Valley (designated Cali-3 to 8 in Table 2) it was necessary to perform two passages to observe CPE in MDBK cell cultures; Figure 1 presents the CPE of BoHV-1 field strains on MDBK cells at different times post-inoculation. Supernatants from all the MDBK cell cultures with positive CPE were subject to PCR to confirm the presence of the virus (data no shown).

Biological characterization

Different biological characteristics were evaluated and compared with the IOWA and Colorado-1 reference strains. Plaque sizes were measured in MDBK cells; the plaque size was uniform, between 1 and 2 mm in diameter in almost all field isolates. However, plaque size in the virus isolates designated Cali 1-8 presented a strikingly reduced plaque size, of < 1 mm in diameter. Both reference strains produced similar plaque sizes to most field isolates (Figure 2).

The virus titer was evaluated by TCID₅₀ and PFU, in an attempt to highlight differences in virus infectivity compared with the reference strains. The so-called Cordoba and Medellin field isolates had the highest TCID₅₀ titers reaching $1 \times 10^{-8,25}$ infectious doses in the Colorado-2 isolate, while the lowest TCID₅₀ titers were as low as $1 \times 10^{-3,75}$ TCID₅₀ in the Sabana-1 isolate. Highly and mid pathogenic Iowa and Colorado-1 strains had a TCID₅₀ of $1 \times 10^{-7,37}$ and $1 \times 10^{-5,87}$ respectively. However, when analyzing virus yield by PFU, there was no complete correlation with PFU virus titer. The highest titer was 2.4×10^8 PFU/ml

for the Medellin-2 isolate while the lowest was 650 PFU/ml for the Cali-6 isolate. The virus titer for the Iowa and Colorado-1 strains was similar to the Medellin and Cordoba isolates reaching 1.86×10^8 and 2.02×10^7 respectively.

To analyze differences in virus growth, a one step virus curve was performed using a MOI of 10 per MDBK cell, and the virus yields in supernatants or intracellular virus in monolayers were measured. Due to the low PFU virus titer of the Cali and Sabana isolates and the necessity to add 10 viruses per cell, the virus titer was increased by multiple passages in MDBK cells. After 5 cell passages, 2 Cali isolates increased their viral titer to 1.37×10^8 and 5.84×10^7 PFU/ml respectively. Likewise, after 4 passages, the Sabana-1 isolate increased its viral titer to 1.12×10^8 PFU/ml. As seen in Figure 3a, the virus yield of the IOWA strain reached the highest titer at 24 h post-infection (6.88×10^9 PFU/ml) as expected due to its highly virulent presentation. Interestingly, some isolates (Cordoba and Medellin isolates) had a highly virulent-like behavior *in vitro* in comparison to the reference strains, reaching viral titers as high as 6.08×10^8 PFU/ml. Otherwise, the Colorado strain has a medium titer with 1 log less virus yield than the Medellin strain 24 h post-infection. Some strains from Cali had a virus titer as low as 7.42×10^6 PFU/ml (Figure 3a). In the intracellular virion evaluation, the same difference between native isolates was observed. The Cali isolates showed the lowest intracellular virus titer while the Cordoba and Medellin isolates had the highest virus titers; similar result were found in the IOWA and Colorado reference strains that reached a virus titer of 3.65×10^9 and 9.50×10^8 PFU/ml respectively (Figure 3b). Other isolates (Sabana-1, Llano-1) had intracellular and extracellular virus productions close to the mean of the assay, showing a virus titer of 10^7 PFU/ml in both assays (Figures 3a and 3b).

Also, a shorter eclipse period with faster release of virus in the Cordoba and Medellin isolates was observed in comparison to the Cali isolates (Figure 3a) with a higher burst

size and higher viral load (Figures 3a and 3b). The Cali isolates were slightly compromised in replication, with the lowest burst size (Figures 3a and 3b). As expected, there were no difference ($p>0.05$) between virus production in BoHV-1 IOWA compared with Medellín and Córdoba strains; however we found significantly lower virus production ($p<0.05$) in isolates when compare IOWA with Cali and Sabana-1 at 18 and 24 hours.

Restriction endonuclease analysis

The restriction patterns obtained after digestion of each isolate with *HindIII* are shown in Figure 5. The patterns were identical for the reference IOWA and Colorado strains (Figure 5, lines 5 and 9) in most of the isolates indicating that most of the isolates belong to the BoHV-1.1 subtype. Only the Sabana 1 isolate showed a clearly distinguishable pattern in that one DNA fragment had a slightly lower molecular weight, corresponding to the BoHV-1.2a subtype (Figure 5, line 13).

Immunodominant epitope evaluation

To assess the presence of different antigenic viral glycoproteins relevant to natural immune response, western blots were performed using primary antibodies against the BoHV-1 glycoproteins B, C, D and E. These antibodies were developed by Marshall et al.,^[15] and are directed against main antigenic areas relevant to natural infection. As observed in Figure 4, all BoHV-1 isolates presented the same expression for the different glycoproteins in comparison with the IOWA and Colorado reference strains.

DISCUSSION

Many attempts have been made to differentiate strains of BoHV-1 especially those of respiratory and genital origins. Most attempts revealed that different isolates are quite

similar with respect to their biophysical and antigenic properties [4, 18]. In Colombia, considerable numbers of cattle farms have shown serological evidence of BoHV-1 infections; using the viral neutralization test it was shown that more than 75% of the sampled population of cattle herds have neutralizing antibodies against BoHV-1 infection [24]. However, there is as yet no knowledge about the present BoHV-1 subtype and the characteristics of the virus present in cattle herds.

From the present results described here, one of the most important findings is that there is a big difference on the *in vitro* growth behavior of the isolates in MDBK cells. By PFU and TCID_{50%}, the Córdoba and Medellín isolates exhibit a highly virulent-like behavior with virus titers similar to those reached by the IOWA strain (Table 3), which is a highly virulent strain based on its *in vitro* and *in vivo* replication behavior [11, 17]. On the other hand, the Cali isolates had the lowest virus titers, as low as 650 PFU/ml; some of these required a specific cell culture adaptation process to increase their viral titer to perform the one step growth curve at a MOI of 10. Although there were no differences in CPE between the strains, in agreement with differences in viral titers *in vitro*, the plaque size was uniform and bigger for almost all the isolates while the Cali (1-8) isolates had a smaller plaque size (Figure 2). This result could indicate that these strains are naturally attenuated strains in comparison with other BoHV-1 isolates, as reported for other herpesviruses that infect bovines and equines [6, 8, 10], or it could indicate that those isolates behave *in vitro* in an attenuated-like manner.

The one step viral growth curve also shows that the Medellín and Córdoba isolates have a highly virulent-like behavior while in the same experiment Cali isolates presented diminished replication with the lowest burst size compared to other isolates and reference strains, again indicating a possible attenuated-like behavior [6, 8].

However, to confirm that some of the isolates are highly virulent and others are possibly attenuated, it is necessary to perform *in vivo* analyses as were reported by Smith et al., for the highly virulent V592 strain of Equine Herpesvirus-1^[25], or using the classical rabbit or bovine models of pathogenicity of infection as shown previously for BoHV-1^[11].

No differences were found between the isolates of the present study (Figure 4) in the presence of the main immunodominant viral epitopes of glycoproteins, confirming the high degree of homology between these isolates and indicating that there were no differences in antigenicity (Figure 4). As reported previously reported^[4], MAb analyses are not really useful to establish BoHV-1 differences; however as opposed to other studies, on which it was not possible to determine which glycoproteins of the virus were evaluated, on this study a panel of MAbs directed against the main immunodominant epitopes was used. The study of different epitopes is important to evaluate and predict the neutralizing response to those strains *in vivo* and in some cases to differentiate BoHV-1 from BoHV-5 which belongs to the same viral subfamily and was previously grouped as a subtype of the BoHV-1^[21]. Marshall et al.,^[15] developed these antibodies against different epitopes important for natural infection; however, 3 of 5 BoHV-1 gD antibodies could not be evaluated because they are conformational epitopes^[5] and western blots in denaturing conditions were used here.

The restriction pattern found in the native isolates were similar to those described in previous reports^[4, 29], and as reported by other authors^[23] who observed no direct relationship between clinical patterns and restriction endonuclease profiles. In the present study, BoHV-1.1 was isolated from the respiratory or reproductive tracts of bulls as of cows, confirming that any virus subtype can be spread equally from males to females or vice versa and that there is no relationship between the BoHV-1 subtype and clinical presentation.

It is very important to know that the BoHV-1 isolates evaluated in this study may represent for the more prevalent areas in the country and permit predict that some isolates has an highly virulent-like behavior being a high risk for the bovine production in the country.

Taking in account the fact that no monovalent BoHV-1 vaccines exist in Colombia, the pool of our results permit us to initiate a new area of research trying to develop new inactivated vaccines, manufactured with native strains as seed using the strains that grow efficiently in cell culture without the necessity of spent time on the adaptation to the laboratory^[11] or on the other hand, using the strains that have an attenuated-like behavior as live attenuated vaccines.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Geoffrey Letchworth III (Madison, WI) for kindly providing MAbs and Anne-Lise Haenni for revision of the English and critical reading of the manuscript. This work was supported by the *División de Investigación Universidad Nacional de Colombia*, grants N°: 20201007738 and 202010013254. JRS had received a PhD Fellowship from COLCIENCIAS.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest with the ideas put forward in the final version of manuscript.

References

1. **Abril C, Engels M, Liman A, et al.** 2004. Both viral and host factors contribute to neurovirulence of bovine herpesviruses 1 and 5 in interferon receptor deficient mice. **J Virol**, 78 (7), 3644–3653.
2. **Büchen-Osmond C.** Alphabetical List of ICTV approved Virus Families and Genera. Created April, 1995. Last Modified 08-07-2008.
3. **Chowdhury SI.** 1996 Construction and characterization of an attenuated bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) recombinant virus. **Vet Microbiol**, 52(1-2):13-23.
4. **D'Arce RC, Almeida RS, Silva TC, et al.** 2002. Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5. **Vet Microbiol**, 88:315-24.
5. **Dasika GK, Letchworth GJ 3rd.** 1999. Cellular expression of bovine herpesvirus 1 gD inhibits cell-to-cell spread of two closely related viruses without blocking their primary infection. **Virology**, 254(1):24-36.
6. **Dry I, Haig DM, Inglis NF, et al.** 2008. Proteomic analysis of pathogenic and attenuated alcelaphine herpesvirus 1. **J Virol**, 82(11):5390-5397.
7. **Engels M, Giuliani C, Wild P, et al.** 1986. The genome of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) strains exhibiting a neuropathogenic potential compared to known BHV-1 strains by restriction site mapping and cross-hybridization. **Virus Res**, 6(1):57–73.
8. **Galosi CM, Barbeito CG, Vila Roza MV, et al.** 2004. Argentine strain of equine herpesvirus 1 isolated from an aborted foetus shows low virulence in mouse respiratory and abortion models. **Vet Microbiol**, 103:1-12.

9. **Hierholzer JC, Killington RA.** 1996. Virus isolation and quantitation. In: Mahy, B.W.J. and Kangro, H.O. Editors, **Virology methods manual** Academic Press, London, pp. 25–46.
10. **Jacob RJ, Price R, Bouchey D, et al.** 1990. Temperature sensitivity of equine herpesvirus isolates: a brief review. **SAAS Bull Biochem Biotechnol**, 3:124-128.
11. **Kaashoek MJ, Straver PH, Van Rooij EM et al.** 1996. Virulence, immunogenicity and reactivation of seven bovine herpesvirus 1.1 strains: clinical and virological aspects. **Vet Rec**, 139:416-21.
12. **Kaashoek MJ, van Engelenburg FA, Moerman A, et al.** 1996 Virulence and immunogenicity in calves of thymidine kinase- and glycoprotein E-negative bovine herpesvirus 1 mutants. **Vet Microbiol**, 48(1-2):143-53.
13. **Kaashoek MJ, Rijsewijk FA, Ruuls RC, et al.** 1998. Virulence, immunogenicity and reactivation of bovine herpesvirus 1 mutants with a deletion in the gC, gG, gI, gE, or in both the gI and gE gene. **Vaccine**, 16(8):802-9.
14. **Laemli UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227:680-685.
15. **Marshall RL, Israel BA, Letchworth GJ 3rd.** 1988. Monoclonal antibody analysis of bovine herpesvirus-1 glycoprotein antigenic areas relevant to natural infection. **Virology**, 165:338-347.
16. **Miller JM, Whetstone CA, Van der Maaten MM.** 1991. Abortifacient property of bovine herpesvirus type 1 isolates that represent three subtypes determined by restriction endonuclease analysis of viral DNA. **Am J Vet Res**, 52:458-461.

17. **Muylkens B, Meurens F, Schynts F, et al.** 2006. Intraspecific bovine herpesvirus 1 recombinants carrying glycoprotein E deletion as a vaccine marker are virulent in cattle. **J Gen Virol**, 87:2149-54.
18. **Pastoret PP, Burtonboy G, Aguilar-Setiena A, et al.** 1980. Comparison between strains of infectious bovine rhinotracheitis virus (Bovine herpesvirus-1), from respiratory and genital origins, using polyacrylamide gel electrophoresis of structural proteins. **Vet Microbiol**, 5:187-194.
19. **Peterson RB, Goyal SM.** 1988. Propagation and quantitation of animal herpesviruses in eight cell culture systems. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, 11(2):93-8.
20. **Pidone CL, Galosi CM, Echeverria MG, et al.** 1999. Restriction endonuclease analysis of BHV-1 and -5 strains isolated in Argentina. **J Vet Med B**, 46 (7):453-456.
21. **Roehe PM, Silva TC, Nardi NB, et al.** 1997. Diferenciação entre os vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (BHV-1) e herpesvírus da encefalite bovina (BHV-5) com anticorpos monoclonais. **Pesq Vet Bras**, 17:41-44.
22. **Roels S, Charlier G, Lettelier C, et al.** 2000. Natural case of bovine herpesvirus 1 meningoencephalitis in an adult cow. **Vet Rec**, 146:586-588.
23. **Ros C, Belak S.** 1999. Studies of genetic relationships between bovine, caprine, cervine and ruminant alphaherpes viruses and improved molecular methods for virus detection and identification. **J Clin Microbiol**, 37:1247-1253.
24. **Ruiz-Saenz J, Jaime J, Vera V.** 2010. Serological prevalence and isolation of Bovine herpesvirus-1 (BHV-1) in cattle herds from Antioquia and Valle del Cauca provinces. **Rev Colomb Cienc Pecu**, 23:299-307.
25. **Smith KC, Whitwell KE, Mumford JA, et al.** 2000. Virulence of the V592 isolate of equid herpesvirus-1 in ponies. **J Comp Pathol**, 122(4):288-297.

-
26. **Sreenivasa BP, Natarjan C, Rasool TJ.** 1996. Restriction endonuclease analysis of DNA from Indian isolates of bovine herpesvirus 1. **Acta Virol**, 40:315–318.
 27. **van Drunen Littel-van den Hurk S, D Myers, P A Doig, et al.** 2001. Identification of a mutant bovine herpesvirus-1 (BHV-1) in post-arrival outbreaks of IBR in feedlot calves and protection with conventional vaccination. **Can J Vet Res**, 65(2): 81–88.
 28. **Weiblen R, Moraes MP, Rebelatto MC, et al.** 1996. Bovine herpesvirus isolates. **Rev Microbiol**, 27: 208–211.
 29. **Whestone CA, Miller JM, Bortner DM, et al.** 1989. Changes in the bovine herpesvirus 1 genome during acute infection, after reactivation from latency and after superinfection in the host animal. **Arch Virol**, 106:261-279.

Table 1. Monoclonal antibodies used for western blot analysis of field BoHV-1 isolates

Antibody	BoHV-1 Glycoprotein	Epitope group	Isotype
5106	Glycoprotein B	I	IgG2A
1808	Glycoprotein C	I	IgG2A
5006	Glycoprotein D	I	IgG1
3402		V	IgG2A
102102	Glycoprotein E	I	Unknown

Table 2. Origin of BoHV-1 isolated viruses

Virus code	Town	Sex	Sample Origin
Sabana-1	Bogotá DC.	Male	Preputial
Llano-1	Meta	Male	Preputial
Cordoba-1	Córdoba	Female	Vaginal swab
Cordoba-2		Male	Nasal swab
Cordoba-3		Male	Preputial swab
Cali-1	Valle del Cauca	Male	Nasal swab
Cali-2		Male	Preputial
Cali-3		Male	Nasal swab
Cali-4		Female	Nasal swab
Cali-5		Female	Nasal swab
Cali-6		Female	Vaginal swab
Cali-7		Female	Nasal swab
Cali-8		Female	Nasal swab
Medellin-1	Antioquia	Female	Nasal swab
Medellin-2		Female	Nasal swab
Medellin-3		Female	Vaginal swab
Medellin-4		Female	Nasal swab
Medellin-5		Female	Vaginal swab

Table 3. Virus titers by TCID₅₀ and PFUs for different BoHV-1 isolates and for the reference IOWA and Colorado strains. *Lowest viral titers.

Virus code	TCID ₅₀	PFUs/ml
Iowa	$1 \times 10^{-7,37}$	$1,86 \times 10^8$
Colorado	$1 \times 10^{-5,87}$	$2,02 \times 10^7$
Sabana-1	$1 \times 10^{-3,75}$	$1,15 \times 10^5$
Llano-1	$1 \times 10^{-6,13}$	$1,16 \times 10^7$
Cordoba-1	$1 \times 10^{-6,88}$	$5,5 \times 10^6$
Cordoba-2	$1 \times 10^{-8,25}$	$1,38 \times 10^7$
Cordoba-3	$1 \times 10^{-6,88}$	$2,4 \times 10^7$
Cali-1	$1 \times 10^{-5,63}$	$4,3 \times 10^4$
Cali-2	$1 \times 10^{-5,75}$	$2,15 \times 10^4$
Cali-3	$1 \times 10^{-4,63}$	$1,02 \times 10^5$
Cali-4	$1 \times 10^{-5,13}$	$7,3 \times 10^4$
Cali-5	$1 \times 10^{-4,50^*}$	2×10^4
Cali-6	$1 \times 10^{-4,75}$	650*
Cali-7	$1 \times 10^{-5,00}$	7×10^4
Cali-8	$1 \times 10^{-7,63}$	$2,1 \times 10^5$
Medellin-1	$1 \times 10^{-6,36}$	$1,8 \times 10^7$
Medellin-2	$1 \times 10^{-7,13}$	$2,4 \times 10^8$
Medellin-3	$1 \times 10^{-5,00}$	$1,3 \times 10^8$
Medellin-4	$1 \times 10^{-7,00}$	$1,7 \times 10^8$
Medellin-5	$1 \times 10^{-6,50}$	$1,3 \times 10^8$

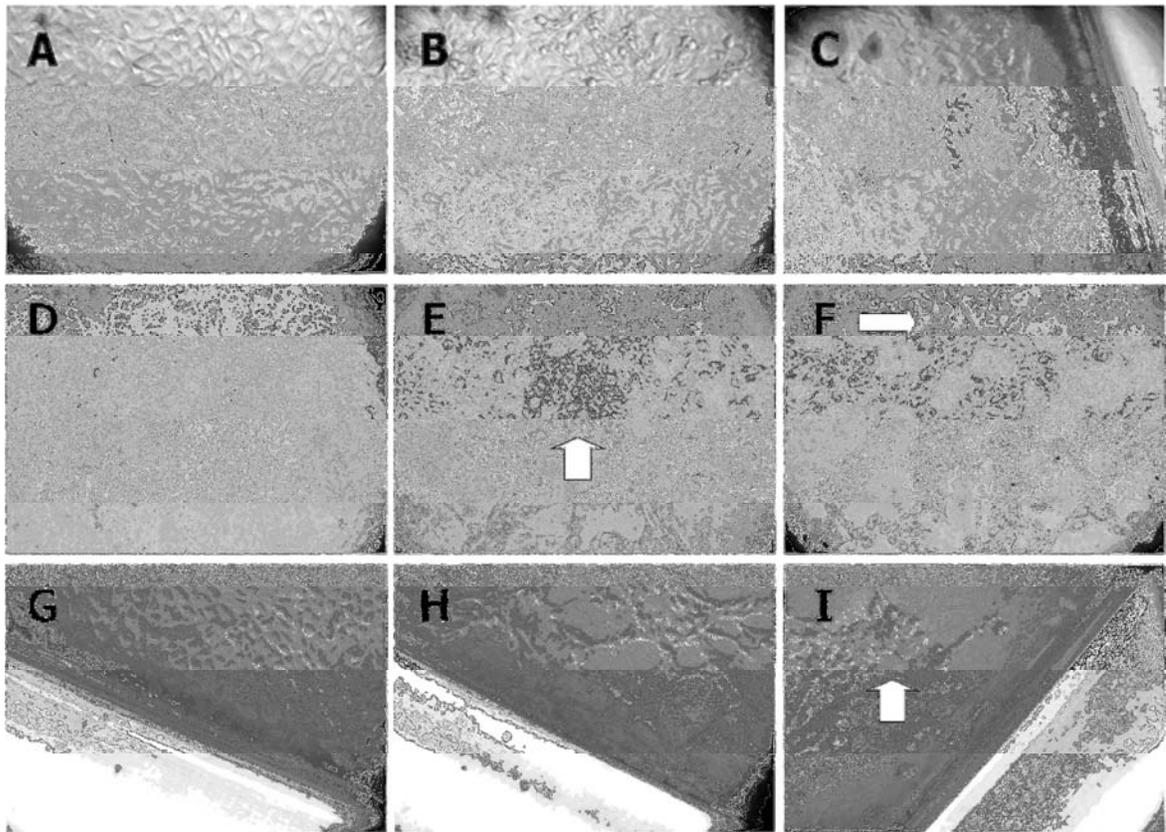


Figure 1. BoHV-1 cytopathic effects at different times of infection in MDBK cell culture. A, D, G: Uninfected controls; B, C: 12 and 24 h.p.i.; E,F: 36 and 48 h.p.i.; H, I: corner of the well at 48 and 60 h.p.i. Original magnification: 25 fold for all samples. Arrows indicate classical CPE, characterized by focal rounding and detachment of cells from the surface of the flask (B), followed by aggregation of the cells into grape-like clusters (E-F, H-I) and by syncytia formation (I).

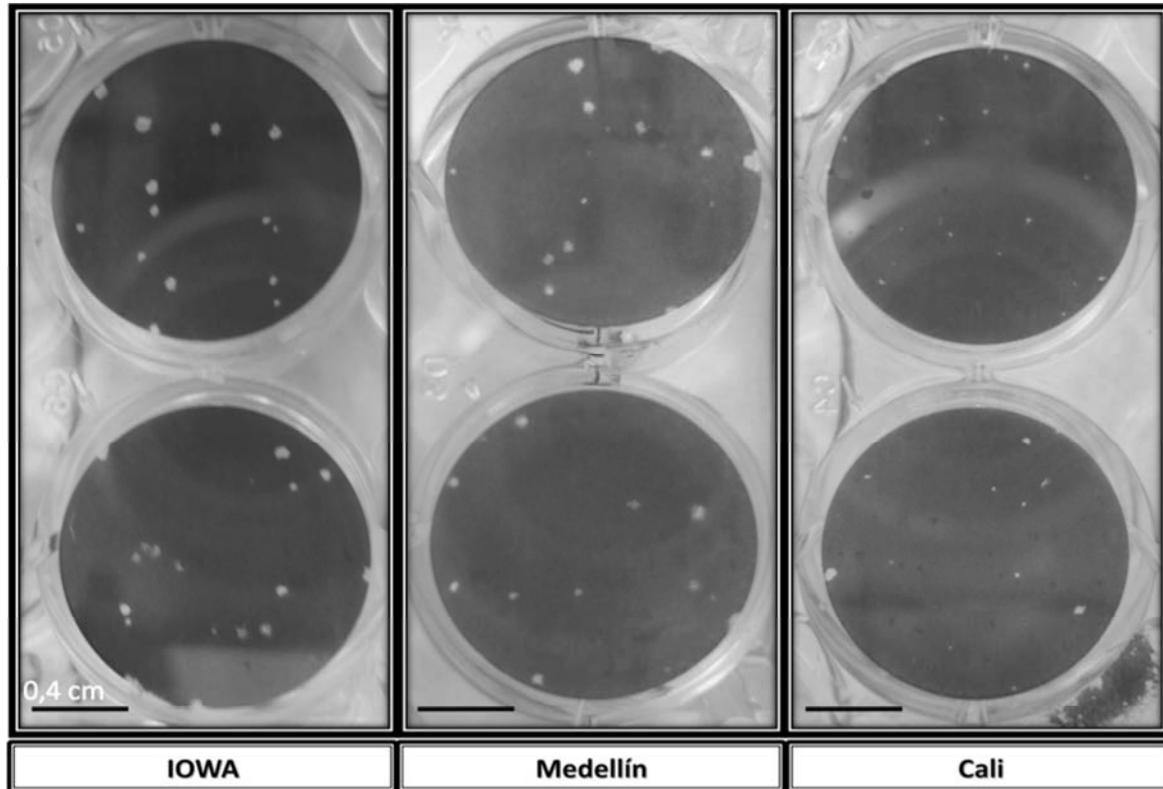


Figure 2. Different BoHV-1 plaque sizes in MDBK cell culture. MDBK cells were seeded on 24-well culture plates at a concentration of 2×10^5 cells per well, infected with each isolate and after 48 h of infection the plates were inactivated, fixed with 3.7% formaldehyde in PBS and stained with crystal violet. A large difference is visible between the IOWA or Medellín plaque sizes and the Cali strains.

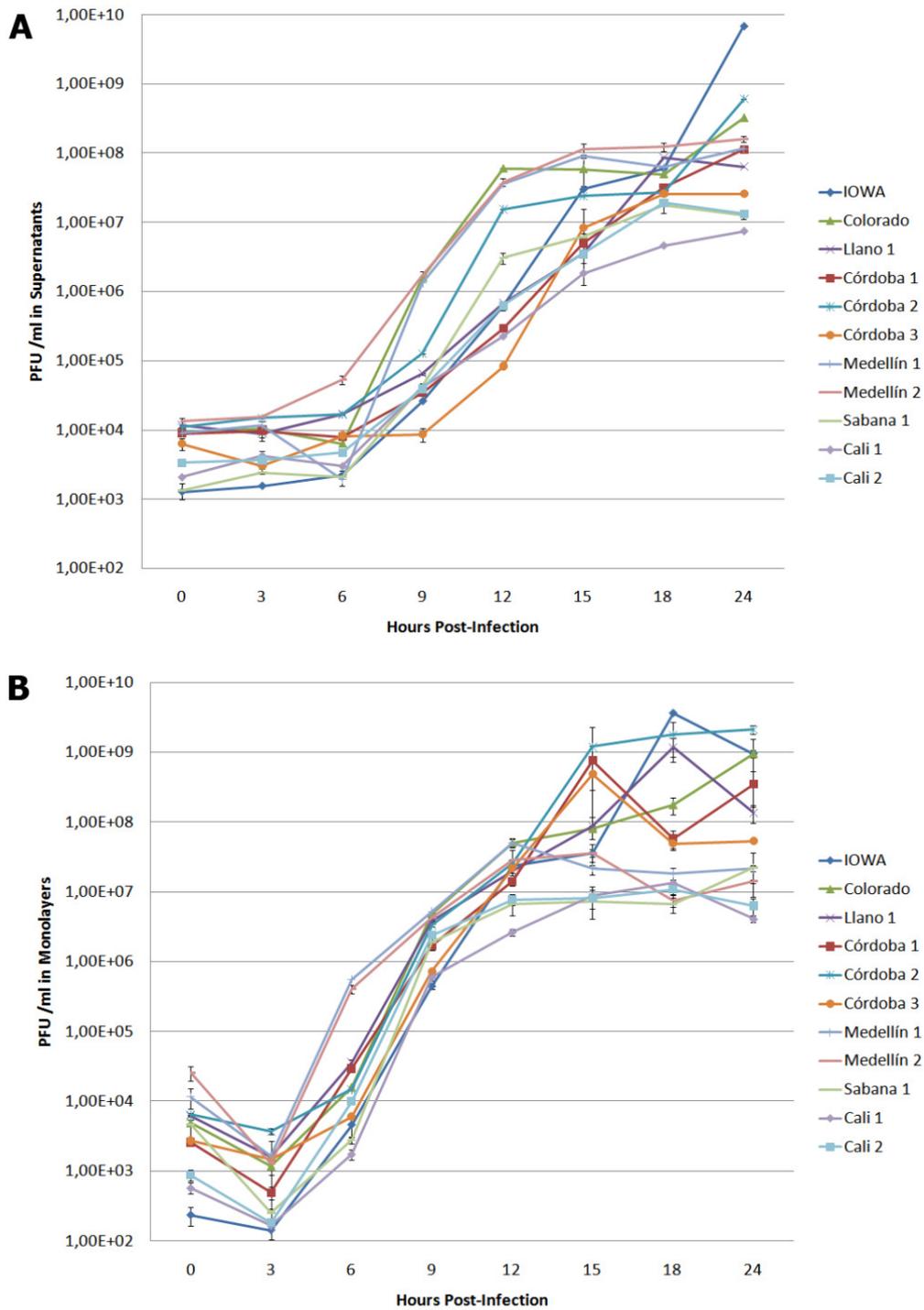


Figure 3. One step growth curve of different BoHV-1 isolates. MDBK cells were infected with different BoHV-1 isolates at a MOI of 10 and the monolayers and supernatants were titrated by the plaque assay at different times after infection to quantify the extracellular virions in supernatants (A) and cell-associated virus on monolayers (B). The values are the means \pm SEM of 2 independent experiments with 3 replicates for each experiment.

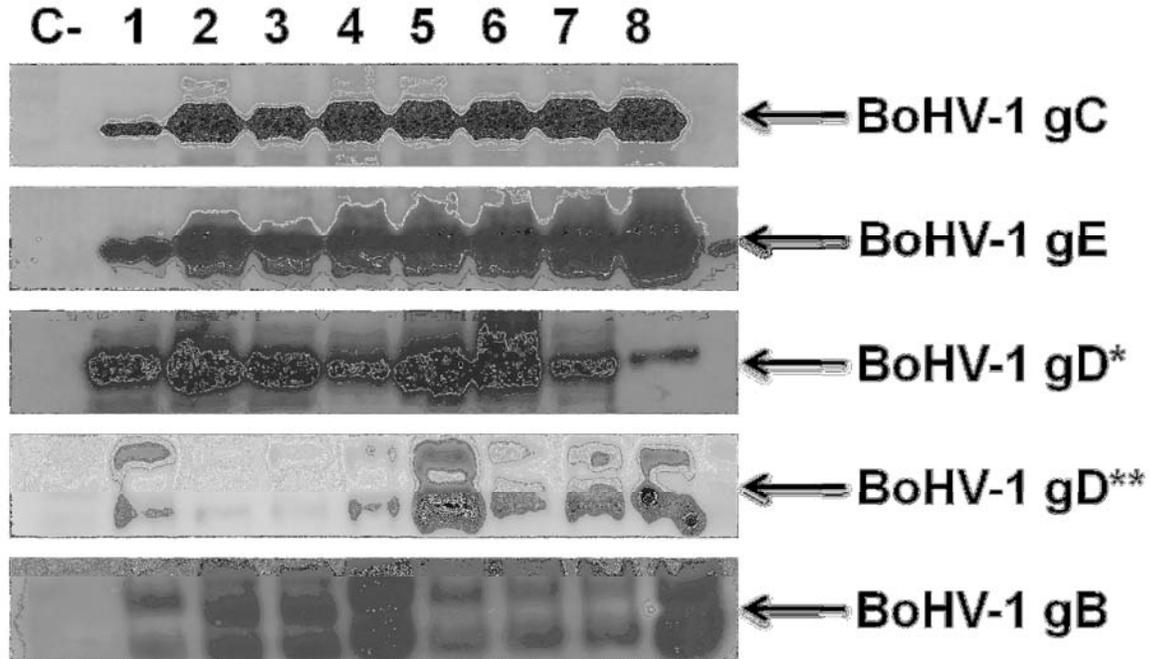


Figure 4. Western blot mapping of different BoHV-1 glycoproteins in native BoHV-1 isolates. Cultures of MDBK cells were infected with different BoHV-1 isolates (MOI = 10). At 24 hours after infection, the cell lysates were prepared as described in Materials and Methods. Anti-BoHV-1 monoclonal antibodies (Table 1) were used according to Marshall et al., [15]. * Epitope group I; ** Epitope group V. Lane 1: BoHV-1 IOWA; lane 2: Cali 1; lane 3: Cali 22; lane 4: Córdoba 1; lane 5: Córdoba 2; lane 6: Medellín 1; lane 7: Medellín 9; lane 8: Sabana; C- Negative control. The image is representative of two experiments for each BoHV-1 isolate.

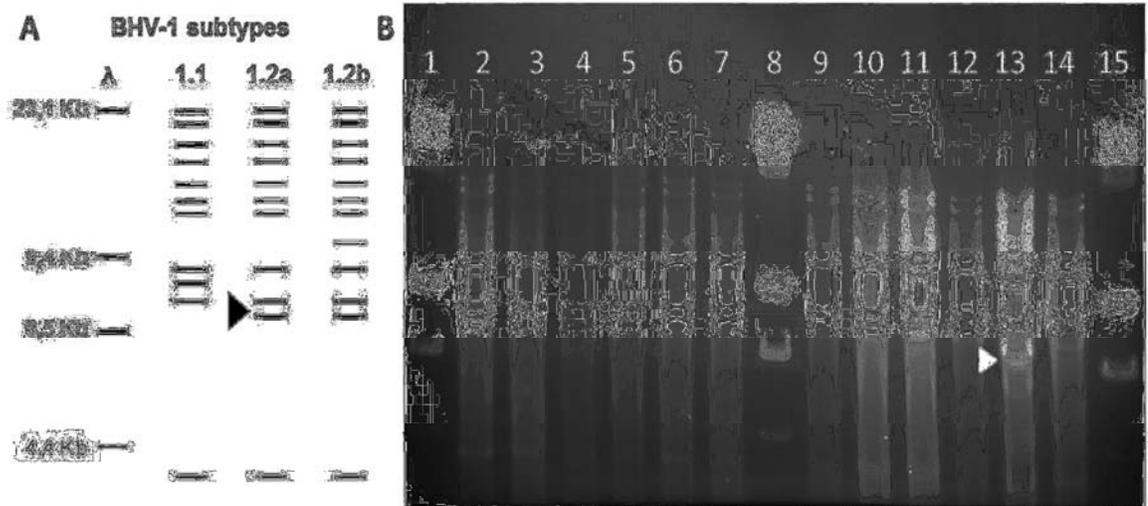


Figure 5. Restriction endonuclease assay of native BoHV-1 isolates. A: Schematic representation of BoHV-1 DNA digested with *Hind*III restriction enzyme showing the pattern of each subtype. B: Restriction endonuclease digestion patterns of BoHV-1 isolates. B. Representative panel of native isolations: Lanes 1, 8 and 15 *Hind*III-digested Lambda Phage; lane 2: Cali 1; lane 3: Cali 21; lane 4: Cali 22; lane 5: Colorado; lane: Cordoba 1; lane 7: Llanos; lane 9: IOWA; lane 10: Med 9; lane 11: Med 12; lane 12: Cordoba 2; lane 13: Sabana; lane 14: Cordoba 3. Arrow-head indicates the difference in BoHV subtype, showing a BoHV-1.2a pattern in the Sabana-1 isolate.

4. Capítulo 4

Desarrollo de una vacuna inactivada a partir de una cepa nativa del Herpesvirus Bovino-1 (BHV-1) y su eficacia en un modelo de infección en conejos

Julián Ruiz-Sáenz,^{1, 2}; Jairo Jaime²; Gloria Ramirez²; Víctor J. Vera,^{2*}

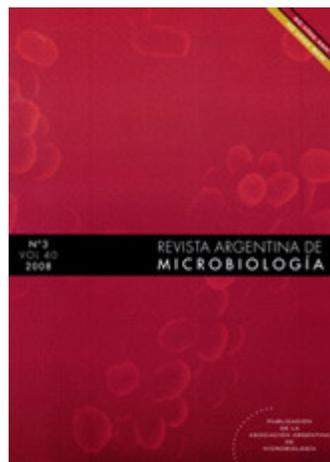
¹Estudiante de Doctorado, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia

²Grupo de Microbiología y Epidemiología. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

*Correspondencia. E-mail: vjveraa@unal.edu.co

Título Abreviado: **Desarrollo y evaluación de una vacuna contra el BHV-1**

Sometido en: Revista Argentina de Microbiología



RESUMEN

El Herpesvirus Bovino-1 (BHV-1) es un virus de genoma DNA perteneciente a la familia Herpesviridae, subfamilia Alphaherpesvirinae, el cual es un patógeno de distribución mundial, causante de graves pérdidas económicas en ganaderías tanto de producción de carne como de leche. En Colombia se han realizado múltiples aislamientos del BHV-1, los cuales han sido sujeto de caracterización molecular, clasificando la mayoría de los aislamientos del país como BHV-1.1. En el presente estudio se desarrolló y evaluó una vacuna inactivada con etilenimina binaria a partir de un aislamiento nativo del BHV-1 denominado Córdoba2 en un modelo de conejo de vacunación e infección. La vacuna se evaluó en dos fases, una de inmunogenicidad siguiendo un esquema de vacunación y refuerzo a los 21 días y una fase de evaluación de protección ante el reto con una cepa de referencia de alta virulencia. Los resultados permitieron evidenciar una óptima seroconversión con títulos de anticuerpos neutralizantes protectores a los 28 días post vacunación y una óptima protección ante el reto con cepa de referencia disminuyendo los signos clínicos de infección, protegiendo contra la aparición de fiebre y disminuyendo la excreción de virus post-reto. En conclusión nuestros resultados presentan el enorme potencial inmunogénico que posee una vacuna inactivada generada a partir de una cepa nativa del BHV-1.1, la cual aporta una gran masa antigénica a la vacuna induciendo una óptima inmunidad y protección y es un fuerte candidato a ser evaluado y usado en las diferentes poblaciones ganaderas de Latinoamérica.

Development of an inactivated vaccine from a native strain of Bovine Herpesvirus-1 (BHV-1) and its efficacy in a rabbit model of infection

ABSTRACT

Bovine Herpesvirus-1 (BHV-1) is a DNA virus belonging to the family Herpesviridae, subfamily Alphaherpesvirinae, which is worldwide a pathogen, causing serious economic losses in livestock production both meat and milk. In Colombia there have been multiple isolates of BHV-1, which have been subjected to molecular characterization, classifying most of the country isolates as BHV-1.1. In the present study we developed and evaluated an ethyleneimine binary inactivated isolation from BHV-1 native strain (Córdoba2) in a rabbit model of vaccination and infection. The vaccine was evaluated in two phases, one of immunogenicity with vaccination and a booster at 21 days and an evaluation phase of protection against challenge with a highly virulent reference strain. The results demonstrate optimum serum-conversion, with protective neutralizing antibody titers at 28 days post vaccination and optimal protection against challenge with reference strain with decreased clinical signs of infection, protecting against the onset of fever and decreasing virus excretion post -challenge. In conclusion, our results show the enormous potential that has immunogenic inactivated vaccine produced from a native strain of BHV-1.1, which gives a high antigen mass to the vaccine to induce optimal immunity and protection, and it is a strong candidate to be evaluated and used in different cattle populations in the Americas.

INTRODUCCIÓN

El Herpesvirus Bovino-1 (BHV-1) es un virus de genoma DNA perteneciente a la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alfaherpesvirinae* (Wyler *et al.*, 1989); el cual posee una amplia diversidad de cepas, las cuales son serológicamente indiferenciables. Sin embargo, con base en el análisis del genoma con endonucleasas de restricción y sus respectivos patrones de migración, se han clasificado en dos tipos y 3 subtipos: BHV-1.1, BHV-1.2a, BHV-1.2b (Wyler *et al.*, 1995). En Colombia se han realizado múltiples aislamientos del

BHV-1, los cuales han sido sujeto de caracterización molecular, clasificando la mayoría de los aislamientos del país como BHV-1.1 y a un aislamiento de la sabana de Bogotá como BHV-1.2a (Piedrahita D, 2005; Ruiz-Saenz *et al.*, 2011; Capítulo 3).

El control del BHV-1 se basa en las medidas higiénicas normales de un hato. Idealmente, se deben establecer períodos de cuarentena de 2–3 semanas para el ganado que entre a cada hato y solo se admite el que sea seronegativo para el BHV-1. Adicionalmente se recomienda el uso de vacunas para el BHV-1, las cuales dependiendo de la capacidad del producto de inducir inmunogenicidad, pueden ser efectivas reduciendo las manifestaciones clínicas asociadas con la infección viral y reducen la liberación del virus después de la infección, llevando así a una reducción de las pérdidas económicas, sin embargo no logran proteger completamente de la infección (OIE, 2004).

En el país, el mercado de vacunas para el BHV-1 es amplio y diverso, permitiéndole al productor, a los técnicos y a los veterinarios escoger entre una amplia gama de productos nacionales e importados, teniendo mayor difusión las vacunas a virus inactivados. Comercialmente el BHV-1 se encuentra en productos polivalentes asociado siempre con otros agentes virales tales como el Virus de la Diarrea Viral Bovina, el Virus de Parainfluenza tipo 3, el Virus Sincitial Respiratorio y con agentes bacterianos como *Pasteurella spp*, *Leptospira Spp*, entre otros, haciendo imposible lograr una inmunización específica para el BHV-1 en zonas donde los demás agentes no tienen importancia epidemiológica o cuando la vacunación se usaría como mecanismo para el control de un brote (Véase Tabla 1, Capítulo 1, Ruiz-Saenz *et al.*, 2009).

Previos estudios de nuestro laboratorio, han permitido aislar y caracterizar una cepa de BHV-1 denominada Córdoba-2, la cual molecularmente pertenece al subtipo BHV-1.1 el cual abarca la mayoría de los aislamientos realizados en Colombia e *in vitro* en curvas de crecimiento ha mostrado tener un comportamiento de alta virulencia replicándose eficientemente y produciendo altos títulos virales; Adicionalmente, en la evaluación por western blot de sus epítopes inmunodominantes se ha demostrado que posee buena expresión de dichos epítopes (Ruiz-Saenz et al., 2011; Capítulo 4), lo cual postula a dicha cepa como un buen candidato para ser usado como semilla base para el desarrollo de una vacuna inactivada con alto potencial inmunogénico (OIE, 2004).

Es por esto que el objetivo del presente trabajo fue desarrollar una vacuna inactivada monovalente a partir de una cepa nativa del BHV-1, y evaluar su potencial eficacia en un modelo de conejo, con miras a proteger la población bovina nacional contra la infección por el BHV-1, llevando así a mejorar la calidad sanitaria de la población ganadera del país.

MATERIALES Y MÉTODOS

Virus y Células

Se utilizó la línea celular MDBK (ATCC CCL-22) obtenida del repositorio de células del laboratorio de Virología del Grupo de Microbiología y Epidemiología de la Universidad Nacional de Colombia, las cuales se mantuvieron a 37°C en una atmósfera del 5% de CO₂ en Medio Esencial Mínimo-MEM (Gibco-Invitrogen, Inc. Grand Island, NY) suplementado con SFB al 10% (Gibco-Invitrogen, Inc. Grand Island, NY), penicilina-estreptomicina (10.000U/ml y 10µg/ml respectivamente) y anfotericina (0.25µg/ml) (Gibco-Invitrogen, Inc. Grand Island, NY). Se utilizaron los virus IOWA como virus de

referencia y el virus nativo denominado "Cordoba-2", el cual fue aislado de un bovino bajo condiciones de inmunosupresión y fue caracterizado como una cepa BHV-1.1; los virus fueron cosechados, titulados en células MDBK y almacenados a -70°C.

Titulación viral

El virus fue titulado por duplicado usando la técnica de dosis infecciosa en cultivo celular 50% (DICC50%) en células MDBK en platos de 96 pozos (USA Scientific, Inc., Ocala, FL). Brevemente, se sembraron 15000 células por pozo, las cuales fueron inoculadas con diluciones decimales del stock original de virus, luego se adicionó medio de mantenimiento al 2% de SFB y se incubó durante 72 horas a 37°C en una atmosfera al 5% de CO₂. A este tiempo las placas fueron inactivados y se fijadas con formaldehido al 3,7% en PBS y coloreadas con cristal violeta. La dosis infecciosa se calculó según el método Sperman Kaerber (Hierholzer y Killington, 1996).

Seroneutralización en células MDBK

Para esta técnica, se inactivaron los sueros por incubación a 56 °C durante 30 minutos, luego se hicieron diluciones dobles seriadas desde 1:2 hasta 1:256 de los sueros en placas de cultivo celular de 96 pozos, las cuales se pusieron en contacto con una concentración constante de BHV-1 cepa Iowa (100 dosis infecciosas para cultivo celular) incubándose por 2 horas a 37 °C. Posteriormente se adicionaron 10.000 células MDBK por pozo y se incubó a 37 °C al 5% de CO₂ durante 72 horas, tiempo para el cual se determinó el *Título seroneutralizante*, entendiéndose éste como la mayor dilución del suero con capacidad para inhibir la replicación viral (OIE, 2004).

ELISA Indirecto para el BHV-1

Se utilizó el estuche comercial SVANOVIR® IBR- Ab ELISA, el cual detecta anticuerpos tipo IgG en suero modificando brevemente su revelado, cambiando el anticuerpo secundario (anti-IgG bovina) incluido en el estuche por un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo. Brevemente, los sueros se diluyeron 1/100 en solución tampón de dilución; se adicionaron 100 µl/pozo de las muestras en los pozos del plato de ELISA sensibilizados con el BHV-1 y se incubó el plato 2 h/temperatura ambiente (t.amb); luego se realizaron cuatro lavados con 200 µl/pozo de una solución tampón, se adicionaron 100 µl del anticuerpo secundario anti IgG de conejo conjugado con peroxidasa (Sigma ®), y se incubó el plato 1 h/t.amb. El procedimiento de lavado se repitió como se indicó anteriormente, se adicionaron 100 µl/pozo de sustrato y se incubó 10 min/t.amb. Finalmente, se adicionaron 50 µl/pozo de solución de parada que contenía ácido sulfúrico y se hizo la lectura por espectrofotometría a una densidad óptica (DO) de 450 nm. Para la interpretación de los resultados se tuvo en cuenta el valor de la DO de los controles positivos, que debía estar por encima de 0.2 y el de los controles negativos, que debía estar por debajo de 0.1. Para determinar la seropositividad de la muestra, al valor de la DO de cada pozo que contenía el antígeno para BHV-1, se le sustrajo el valor de la DO correspondiente al pozo del control negativo.

Inactivación con Etilenimina Binaria (BEI)

Para la inactivación total de la Cepa de campo, se utilizó BEI el cual es un miembro de un grupo de sustancias alquilantes "aziridinas" que reacciona muy poco con las proteínas y por lo tanto, no altera los componentes antigénicos de los virus a Inactivar. La BEI genera una reacción de inactivación que es más específica para el ácido nucleico y produce biológicos con capacidad antigénica superior, conservando la conformación y la accesibilidad de los epítopes en un grado mucho mayor que la formalina y β -

propiolactona (Bahnemann HG, 1990). Brevemente, trabajando siempre bajo condiciones de bioseguridad y esterilidad, se tomó una botella T75 de cultivo de células MDBK infectada con BHV-1 cepa Córdoba-2 a MOI 10 durante 48 horas, luego se cosecho el sobrenadante y monocapa infectada para congelar y descongelar por tres veces a $-70/37$ °C para liberar virus intracelulares y se clarificó por centrifugación a baja velocidad 5.000 rpm por 10 minutos. Previa titulación del virus producido, se mezcló la cosecha viral con la solución de BEI al 3,2% Volumen /Volumen, se incubó a temperatura ambiente (16-20 °C) en constante agitación por 24 horas. Posteriormente se neutralizó la BEI con una solución de Tiosulfato de sodio en proporción del 8,7% con respecto al Volumen de BEI utilizado incubando nuevamente en agitación a temperatura ambiente por 12 horas. Finalmente se tomó una muestra (500 µl) del cultivo y se inoculó en una monocapa de células MDBK para verificar la inactivación del cultivo viral. La cosecha viral inactivada se conservó a 4 °C hasta su uso en el modelo animal. La solución de BEI fue gentilmente donada por la Empresa Colombiana de Productos Veterinarios S.A. - VECOL S.A.

Aislamiento y titulación viral post-reto

Luego del reto con cepa de referencia, se tomaron muestras de exudados nasales y conjuntivales, por medio de un hisopo estéril de algodón. Luego, el hisopo fue transportado al laboratorio en viales plásticos con 1 ml de medio de transporte (MEM libre de suero suplementado con penicilina-estreptomicina-anfotericina (10.000U/ml-10µg/ml-0.25µg/ml)(Gibco-Invitrogen, Inc. Grand Island, NY) y congelados a -70 °C. Posteriormente, los hisopos se lavaron en el medio, se centrifugaron durante 20 min a 640 G y el sobrenadante fue filtrado con una membrana de 0.45 µm. Posteriormente, diluciones decimales del filtrado fueron puestas en contacto con monocapas de células

MDBK previamente cultivadas en platos de 96 pozos con el fin de intentar aislar y titular el virus excretado (Valera et al., 2008).

Animales

Se utilizaron un total de 18 conejos machos blancos de Nueva Zelanda (*Oryctolagus cunicullus*) de 7-8 semanas de edad con un peso de 2-2,5 kg (Caron y cols, 2002), los cuales fueron adquiridos en el “Centro de los Recursos Naturales Renovables La Salada” del SENA (Caldas, Antioquia) y mantenidos en condiciones de aislamiento con alimentación y agua *ad libitum*. El sangrado y muestreo de los animales se realizó por punción de la vena marginal de la oreja, previa inmovilización del animal y desinfección del área. El manejo de los animales y todos los procedimientos experimentales se realizaron en cumplimiento de las recomendaciones de la "Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Academic Press, 1996, Washington, EE.UU.) y del Comité de ética para la experimentación animal de la Universidad Nacional.

Diseño experimental

Los animales fueron divididos en tres grupos, los cuales siguiendo el esquema de vacunación reportado por Parreño y cols (2010), recibieron dos dosis de vacuna intramuscular de 1ml cada una con 21 días de diferencia entre ellas. El grupo 1 recibió la vacuna inactivada nativa (Grupo experimental), el grupo 2 recibió una vacuna comercial inactivada (Grupo control positivo - Vira Shield®6+VL5 HB, Novartis Animal Health US, Inc.) y el grupo 3 actuó como control sin vacunación siendo inoculado con 1 ml de solución buffer fosfato (grupo control negativo) (Esquema 1). Los animales se

muestrearon desde el día cero (prevacunación) y cada siete días hasta el final del experimento.

El día 30 post vacunación, los animales fueron retados con 250µl de suspensión viral ($>10^7$ DICC₅₀/50µl) de virus de referencia IOWA en las fosas nasales (nostrilos) usando el protocolo de “gotero” reportado por Valera y cols en 2008 (Figura 1a). Posterior a la infección los animales fueron evaluados diariamente por 7 días y se tomaron temperaturas rectales utilizando un termómetro digital (Microlife® Widnau, Suiza) e hisopados nasales los cuales se evaluarán usando cultivo celular. Clínicamente se evaluó la presencia de secreción nasal, secreción ocular, dificultad respiratoria y conjuntivitis.

Diseño Estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron mediante estadística descriptiva, determinando promedios, desviación estándar y error estándar de la media. Se realizó un análisis de varianza seguida de un test post-hoc de diferencia mínima significativa (ANOVA-LSD) para comparar los títulos de anticuerpos neutralizantes, las temperaturas y la excreción viral, entre los grupos vacunados (comercial y nativa) y el grupo control (sin vacuna). En todos los casos, una $p < 0,05$ fue considerada estadísticamente significativa.

RESULTADOS

Seguridad de la Vacuna nativa

El título del virus previo a la inactivación de la cepa fue de $1 \times 10^{8.25}$ DICC₅₀. Posterior a la inactivación, 500µl de la solución fueron llevados a cultivo de células MDBK e incubados durante 48 horas a 37 °C con 5% CO₂, tiempo para el cual se confirmó la completa

inactivación del agente dada la ausencia de efecto citopático característico de la Infección. Adicionalmente, no se observó efecto citotóxico en los cultivos celulares inoculados (Figura 2). En los conejos, posterior a la vacunación, no se observó ningún cambio de comportamiento ni desarrollo signos de enfermedad ni cambios de temperatura, indicando la inocuidad de la misma.

Producción de Anticuerpos neutralizantes.

Como se puede evidenciar en la tabla 2 ninguno de los individuos de los grupos tenía anticuerpos previos al inicio del experimento. Dos semanas después de la vacunación, los grupos vacunados tanto con la vacuna nativa como con la vacuna comercial inician la seroconversión con un rango máximo de 1:4 para ambas logrando seroconversión en 4/6 individuos (66%) (Figura 3).

Los títulos seroneutralizantes mostraron un aumento gradual; para el día 21 post-vacunación, previos a la revacunación, todos los individuos lograron seroconvertir con un rango de neutralización entre 1:4 y 1:8.

Luego de la revacunación, se evidenció un pico de neutralización con títulos de 1:32 para la vacuna comercial y de 1:16 para la vacuna preparada con cepa nativa. Todos los individuos del grupo control sin vacunación permanecieron seronegativos durante este tiempo (Figura 3a - b). Se evidenció que aunque la vacuna comercial induce una más rápida generación de anticuerpos neutralizantes, los títulos generados por la vacuna nativa pueden ser mayores en magnitud (Figura 3a) alcanzando los más altos títulos del estudio (1:24 promedio), encontrándose en diferencias estadísticas altamente significativas ($p < 0.01$) en la producción de anticuerpos neutralizantes entre grupo vacunado con la

vacuna nativa y el grupo control sin vacuna. Contrariamente, no se encontraron diferencias estadísticas entre el grupo que recibió la vacuna comercial y el grupo control sin vacuna al finalizar el estudio posterior al reto (día 50-figura 3a).

Protección contra el reto con virus de referencia internacional

Los individuos fueron retados intranasalmente con 250µl de suspensión viral (>10⁷ DICC50/50µl) de virus de referencia IOWA en los nostrilos y fueron evaluados diariamente. Se evidenció un ligero incremento de la temperatura en el grupo control negativo a las 24 horas post infección (hpi), el cual alcanzó un pico máximo a al día 3 pos infección. Los grupos vacunados con la vacuna comercial y con la vacuna nativa, aunque mostraron una ligera tendencia al aumento de la temperatura corporal, no tuvieron diferencias estadísticamente significativas comparadas con la temperatura prevacunación (figura 4).

En la evaluación clínica, el grupo no vacunado mostró fuertes signos de conjuntivitis (figura 1b) con fuerte descarga nasal de tipo mucoseroso (figura 1d), signos de distres respiratorio y aletargamiento. Ninguno de los individuos vacunados mostró signos de enfermedad o secreción respiratoria. Se evidenció leve conjuntivitis en uno de los animales del grupo vacunado con la vacuna nativa (figura 1c).

Aunque con el reto posterior con la cepa de referencia todos los individuos mostraron un aumento de temperatura, interesantemente, el grupo vacunado con la vacuna nativa mostró menor incremento de la temperatura ($p < 0.05$, días 2 y 3) comparado con el grupo vacunado con la vacuna comercial, el cual tuvo gran incremento de la temperatura

comportándose igual que el grupo sin vacuna, alcanzando ambos un pico máximo de fiebre al día 3 post-inoculación con una temperatura de 39,5 °C (Figura 4).

Posterior al reto, fue posible detectar sero-conversión en los individuos pertenecientes al grupo control sin vacuna, lográndose títulos máximos de 1:16 al momento del fin del estudio y se encontró que los títulos de anticuerpos de los individuos vacunados también aumentan, siendo los individuos vacunados con vacuna nativa los que alcanzan los mejores títulos neutralizantes.

Disminución de la excreción viral

Como se aprecia en la figura 5, hubo una reducción de la excreción de virus tanto en el grupo vacunado con la vacuna comercial como en el grupo vacunado con la vacuna nativa. En el grupo control sin vacuna, fue posible recuperar virus por cultivo celular durante todos los días del seguimiento, mientras que en el grupo vacunado con la vacuna comercial solo fue posible hasta el día 3 post-infección; encontrándose diferencias estadísticamente significativas al comparar la excreción viral en el grupo vacunado con la vacuna nativa con el grupo control ($p < 0.05$); De forma similar, en el grupo vacunado con la vacuna comercial solo fue posible recuperar virus infecciosos hasta el día 4 post-infección.

DISCUSIÓN

Es un hecho claro para la OIE que es la vacunación contra el BHV-1 el sistema de control y erradicación más eficaz; sin embargo, se ha reportado que en zonas con altas prevalencias el uso de vacunas atenuadas (vivas) puede favorecer la recombinación viral entre cepas vacunales y cepas de campo generando cepas altamente virulentas

(Muylkens et al., 2006), sumado a otras desventajas ampliamente conocidas como son el riesgo de reversión a la virulencia, la inducción de latencia de la cepa vacunal y la imposibilidad de aplicarlas a hembras gestantes, dado el riesgo de inducción de aborto (Miller et al., 1991).

En las vacunas inactivadas como las evaluadas en el presente estudio, dado que el agente se encuentra inactivado, no presenta riesgo biológico, siendo seguras y eficientes en la aplicación en hembras gestantes, ya que no provocan aborto ni diseminación viral luego de la vacunación; el establecimiento de infección latente por la cepa vacunal es imposible y no hay interferencia con la producción de anticuerpos contra otro antígeno inactivado (Wyler, 1989). Sin embargo, se ha reportado que no generan una completa inmunidad en mucosas o inmunidad mediada por células y por tanto requieren adyuvantes y/o dosis múltiples para inducir una protección óptima. A pesar de esto, algunos investigadores las postulan como altamente efectivas para el control de la infección con BHV-1 (Schudel et al., 1986). Congruente con lo reportado, la vacuna nativa estudiada mostró completa inactivación *in vitro* (figura 2a) siendo imposible detectar la presencia de virus infeccioso en la suspensión, hecho que se corroboró *in vivo* al inocular los conejos y no evidenciar signos locales o sistémico de infección en estos (figura 3a). Cabe resaltar que el uso de un inactivante de primer orden como la BEI, permite la total inactivación del virus vacunal y por lo tanto obtener una producción vacunal libre de virus infeccioso, llevando a “cero” la probabilidad de que se presente el llamado fenómeno de cola o residual, evitando así la persistencia de virus infecciosos en la suspensión como consecuencia de fallas en el ajuste de la concentración de agente inactivante (Bahnemann HG, 1990)..

Se ha reportado que las vacunas contra el BHV-1 producidas comercialmente difieren entre ellas en la calidad de la protección que garantizan, tanto con respecto a la reducción de la diseminación del virus y como frente a la aparición de signos clínicos ante un reto infeccioso (Patel, 2005; DesCôteaux et al., 2003). La vacuna nativa inactivada ensayada en este estudio mostró conferir una buena inmunidad humoral. Si tenemos en cuenta que dicha vacuna no ha sido mezclada con un adyuvante y que la inducción de anticuerpos es similar en magnitud y capacidad neutralizante a la inmunidad generada con la vacuna comercial, la cual ya posee adyuvante, encontramos que nuestra vacuna posee una gran capacidad inmunogénica. Probablemente como ha sido descrita, la inactivación con inactivantes de primer orden como la BEI dado que actúan directamente sobre los ácidos nucleicos permite conservar la conformación y la accesibilidad de los epítopes en un grado mucho mayor que otros inactivantes utilizados comercialmente (Duque et al., 1989; Bahnemann HG, 1990).

Se ha reportado que adicional al método de inactivación utilizado, la masa antigénica de la vacuna es una de las características más importantes a la hora de inducir una buena inmunidad antiviral (Patel, 2004; 2005). Puntualmente, se ha reportado que una vacuna anti-BHV-1 debe poseer como mínimo $1 \times 10^{7.7}$ DICC₅₀% para inducir una aceptable respuesta inmune neutralizante (Kamaraj et al., 2009), dosis que fue superada en casi un logaritmo por la cepa Córdoba-2 utilizada como semilla vacunal en este estudio ($1 \times 10^{8.25}$ DICC₅₀ previa inactivación), lo cual podría estar explicando por que aunque no se utilice un adyuvante en la preparación, se logra una eficiente inducción de inmunidad humoral. Nuestros resultados al igual que lo descrito por otros, soportan la conclusión que la masa antigénica es de vital importancia para la eficiente y eficaz producción de vacunas contra el BHV-1 (Lesko et al., 1993; Kamaraj et al., 2009).

Posterior al reto, se logró evidenciar una disminución en la presentación de fiebre (figura 4) la cual fue mayor en el grupo vacunado con la vacuna nativa, lo cual se correlaciona con los altos títulos de anticuerpos neutralizantes evidenciados en este grupo después de la vacunación y el reto (figura 3) y la disminución de excreción viral evidenciada (figura 5); dicha correlación es parte de la respuesta esperada en una vacuna que se perfile como útil para inducir protección y permita controlar la infección.

Mucho se ha discutido acerca de la utilidad del modelo de conejo de la infección (Duque et al., 1989); sin embargo, la dificultad de establecer lotes de animales seronegativos para la evaluación de vacunas, ha llevado a la utilización de modelos animales de inmunización tanto en conejos (Valera et al., 2008) como cuyes (Parreño et al., 2010), los cuales permiten evaluar la respuesta potencial a una vacuna y tienen una alta correlación con la respuesta inmune esperada en bovinos (Parreño et al., 2010).

Los resultados también demuestran la importancia de la estrategia del uso de refuerzos vacunales como ha sido ampliamente reportado (Ioannou et al., 2002; Toussaint et al., 2005), demostrando en el presente estudio ser útil para lograr un fuerte incremento en los títulos de anticuerpos a los 28 dpi (figura 3) y permite evidenciar que ante un reto con virus de campo o de referencia, la sensibilización inicial hace que se comporte como un refuerzo inmunogénico induciendo un incremento en los títulos de anticuerpos y protegiendo contra la enfermedad clínica.

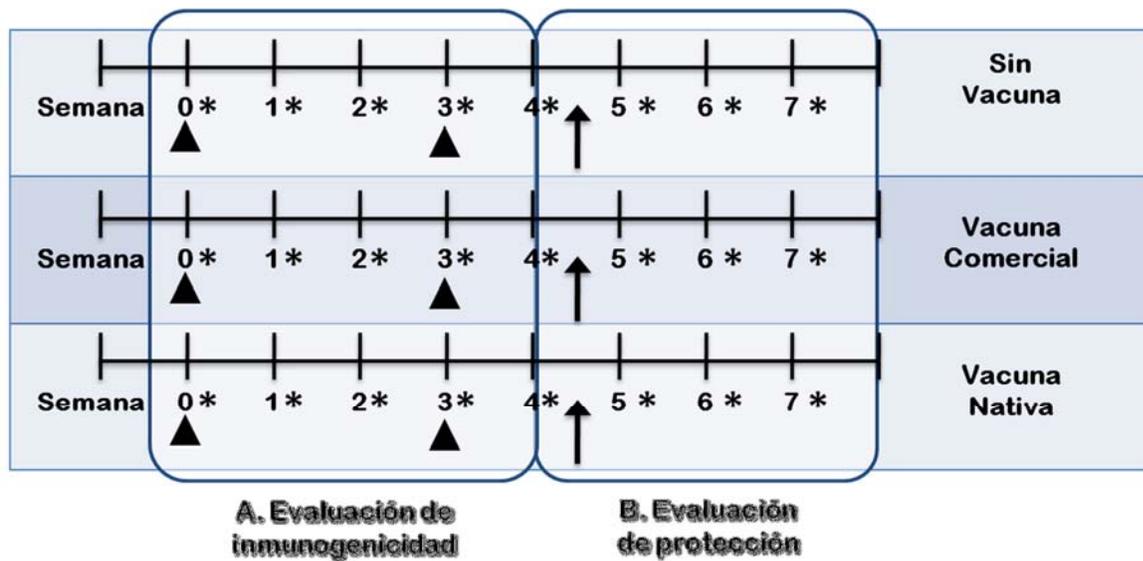
Es necesario sin embargo, explorar el potencial de la vacuna en evaluaciones de inmunidad a largo plazo, ante las cuales sin lugar a dudas, la presencia de un adyuvante es fundamental para lograr una liberación lenta del antígeno y una protección a largo

plazo (Peters et al., 2004; Patel, 2005). La vacuna comercial utilizada, ha sido previamente evaluada y ha demostrado su utilidad en prevenir la infección en bovinos (Zimmerman et al., 2007). Esta usa un adyuvante comercial llamado Xtend III® (Novartis Animal Health US, Inc.), el cual es una emulsión oleosa que potencia la respuesta inmune y tiene por característica mantener los antígenos de la vacuna en el sitio de la inyección, liberando lentamente los antígenos para inmunidad de más larga duración (Chung et al., 2001; Zimmerman et al., 2007); sin embargo como ha sido reportado, la inmunidad a corto plazo puede ser similar a otras vacunas comerciales lo cual lleva a que nuestra vacuna nativa aun sin adyuvante muestre su enorme potencial para futuros estudios.

En conclusión nuestros resultados presentan el enorme potencial inmunogénico que posee una vacuna inactivada generada a partir de una cepa nativa del BHV-1.1 denominada Córdoba2, la cual aporta una gran masa antigénica a la vacuna induciendo una óptima inmunidad y protección contra el reto con una cepa de referencia de alta virulencia, disminuyendo la tasa de infección y la excreción viral.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por la División de Investigación de la Universidad de Nacional Colombia, proyectos N °: 20201007738 y 202010013254. JRS es Becario doctoral de COLCIENCIAS.



Esquema 1. Esquema vacunal por grupo de animales. Los animales de cada grupo recibieron dos vacunas. (▲) Indican los momentos de vacunación con cada vacuna o con PBS en el grupo control negativo. (↑) indica la inoculación con virus de referencia. (*)Indica momento de sangrado para evaluación de anticuerpos. A. Denota la evaluación de inmunogenicidad y B. Evaluación de protección ante el reto.

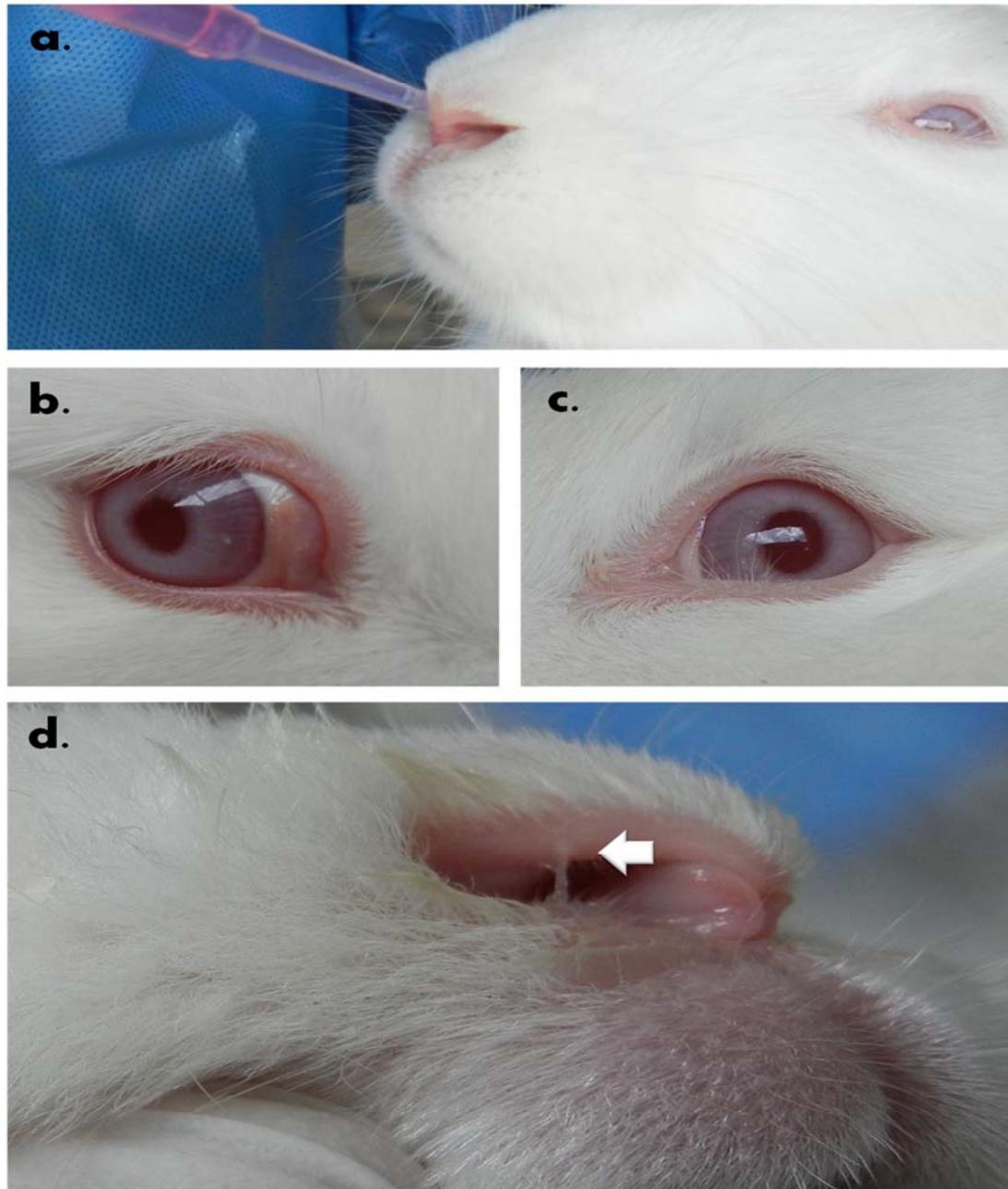


Figura 1. Inoculación intranasal en conejos con BHV-1 Iowa. a. Los animales fueron restringidos mecánicamente y el inóculo fue instilado en las fosas nasales; b. Imagen representativa mostrando conjuntivitis en el grupo control sin vacunación 3 días post infección; c. Imagen representativa mostrando ligera conjuntivitis en grupo vacunado; d. Secreción mucoserosa en conejo no vacunado infectado con BHV-1 Iowa.

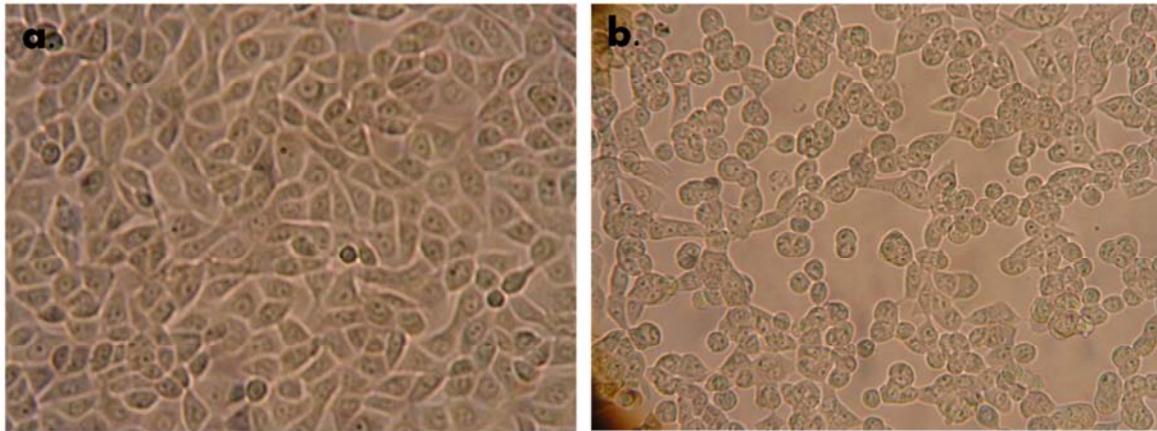


Figura 2. Completa inactivación de la cepa vacunal. a. Cultivo de células MDBK 48 horas post inoculación con cepa BHV-1 Córdoba tratada con BEI; b. Células MDBK inoculadas con virus Córdoba sin tratar. Nótese en A la integridad de la Monocapa celular y en B el efecto citopático característico de la Infección por el BHV-1.

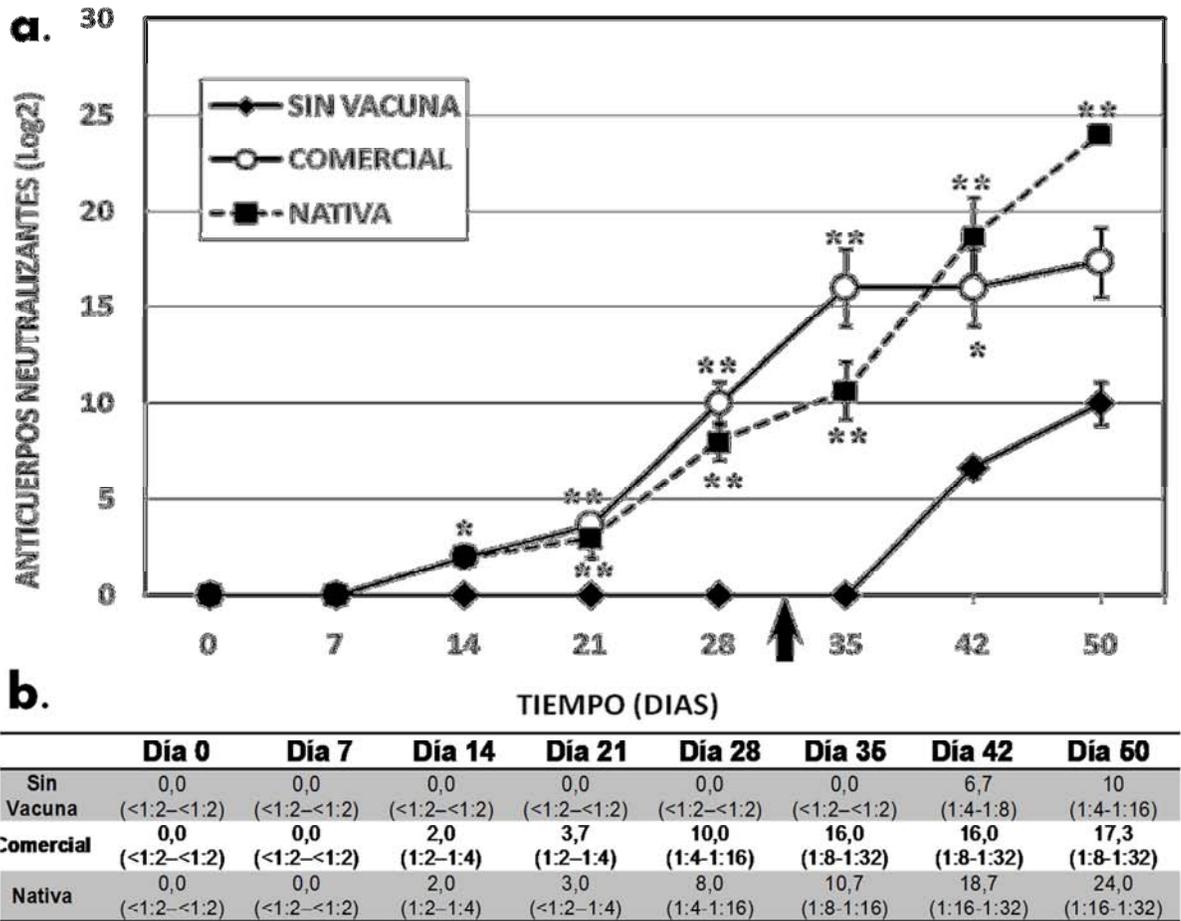


Figura 3. Anticuerpos neutralizantes en conejos inoculados con diferentes vacunas. a. Curva de Anticuerpos Neutralizantes; LA flecha indica el momento Del reto con virus de referencia IOWA (día 30). Los iconos representan los valores promedio de cada grupo \pm EEM. **b.** Promedios y (Rangos) de anticuerpos Neutralizantes al BHV-1 a diferentes tiempos en conejos vacunados. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$

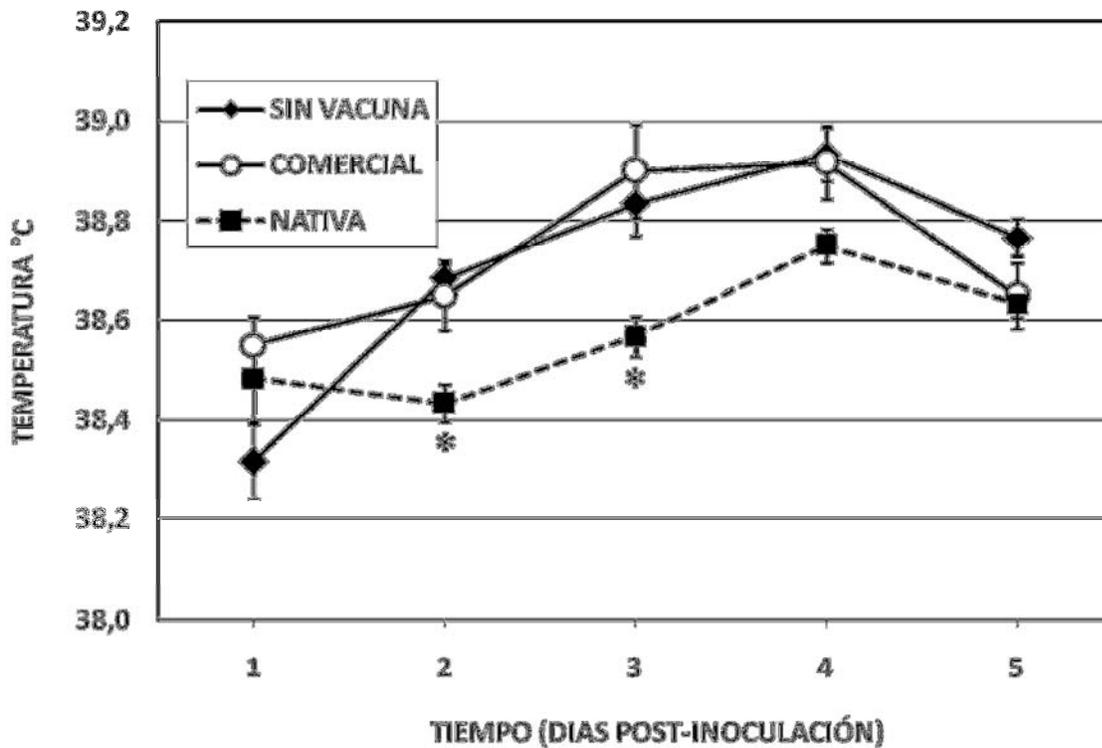


Figura 4. Promedios de temperatura rectal post Inoculación. La temperatura fue medida en cada uno de los grupos experimentales después del reto con virus de referencia. Cada línea representa los valores promedio de cada grupo \pm EEM. * $p < 0,05$.

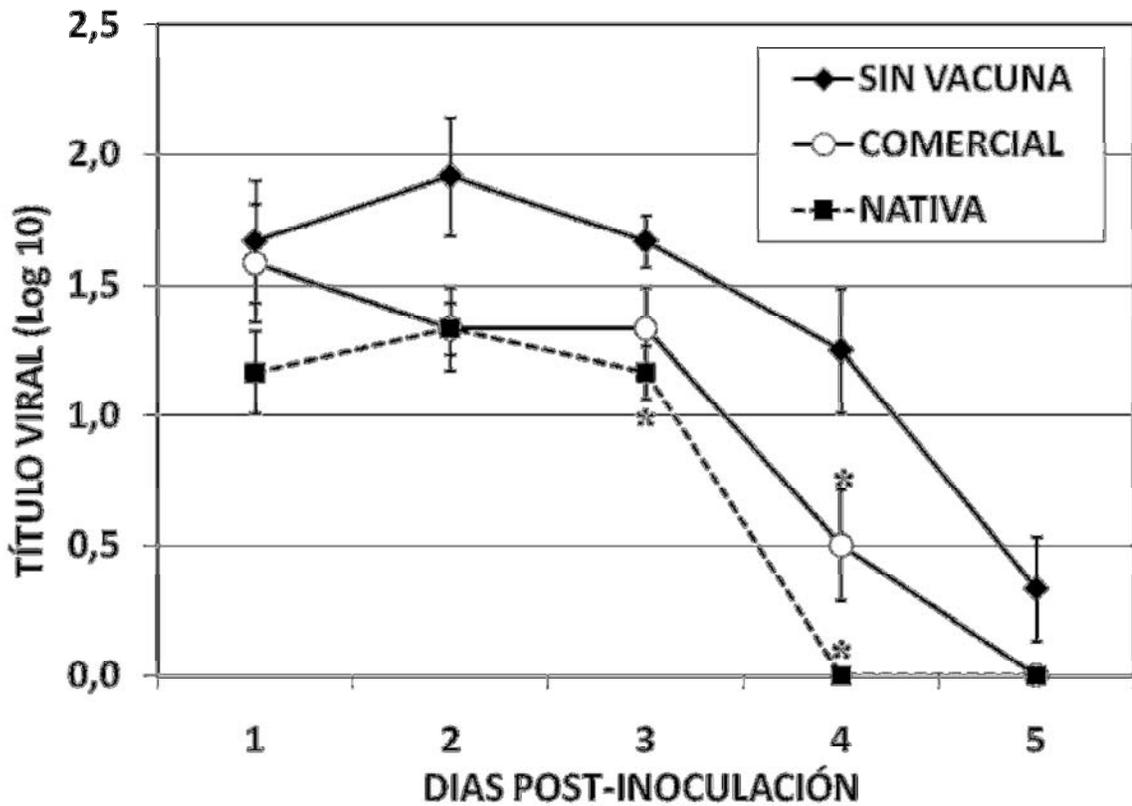


Figura 5. Excreción viral en individuos vacunados y no vacunados a partir de hisopos nasales de conejos inoculados con BHV-1 Iowa por vía respiratoria. Los títulos fueron calculados por la técnica de DICC50% y se expresa como log10 DICC50% /grupo. Los datos representan el título promedio obtenido de cada muestra nasal procesado individualmente. * $p < 0.05$.

BIBLIOGRAFÍA

- Bahnemann HG. Inactivation of viral antigens for vaccine preparation with particular reference to the application of binary ethylenimine. *Vaccine*; 1990; 8:299-303
- Caron L, Flores EF, Weiblen R, Scherer CF, Irigoyen LF, Roehe PM, Odeon A, Sur JH. Latent infection by bovine herpesvirus type-5 in experimentally infected rabbits: virus reactivation, shedding and recrudescence of neurological disease. *VetMicrobiol.* 2002;84(4):285-95.
- Chung H, Kim TW, Kwon M, Kwon IC, Jeong SY. Oil components modulate physical characteristics and function of the natural oil emulsions as drug or gene delivery system. *J Control Release.* 2001;71(3):339-50.
- DesCôteaux L, Cécyre D, Elsener J, Beauchamp G. Comparison of humoral immune responses in dairy heifers vaccinated with 3 different commercial vaccines against bovine viral diarrhoea virus and bovine herpesvirus-1. *Can Vet J.* 2003;44(10):816-21.
- Duque H, Marshall RL, Israel BA, Letchworth GJ. Effects of formalin inactivation on bovine herpes virus-1 glycoproteins and antibody response elicited by formalin-inactivated vaccines in rabbits. *Vaccine.* 1989;7(6):513-20.
- Duque H, Marshall RL, Israel BA, Letchworth GJ. Effects of formalin inactivation on bovine herpes virus-1 glycoproteins and antibody response elicited by formalin-inactivated vaccines in rabbits. *Vaccine.* 1989;7(6):513-20.
- ICA - Subgerencia De Protección Animal, Dirección Técnica de Inocuidad e Insumos Veterinarios, productos biológicos con registro vigente a 15 marzo de 2011. Bogotá 2011.
- Ioannou XP, Griebel P, Hecker R, Babiuk LA, van Drunen Littel-van den Hurk S. The immunogenicity and protective efficacy of bovine herpesvirus 1 glycoprotein D plus

- Emulsigen are increased by formulation with CpG oligodeoxynucleotides. *J Virol.* 2002;76:9002-10.
- Kamaraj G, Rana SK, Srinivasan VA. Serological response in cattle immunized with inactivated oil and Algel adjuvant vaccines against infectious bovine rhinotracheitis. *New Microbiol.* 2009;32(2):135-41.
 - Lesko J, Veber P, Hrda M, Feketeova. Large scale production of infectious bovine rhinotracheitis virus in cell culture on microcarriers. *Acta Virol.* 1993;37: 73-78.
 - Miller JM, Whetstone CA, Bello JJ, Lawrence WC. Determination of ability of a thymidine kinase-negative deletion mutant of bovine herpesvirus-1 to cause abortion in cattle. *Am J Vet.* 1991;52:1038-1043.
 - Muylkens B, Meurens F, Schynts F, Farnir F, Pourchet A, Bardiau M, Gogev S, Thiry J, Cuisenaire A, Vanderplasschen A, Thiry E. Intrasppecific bovine herpesvirus 1 recombinants carrying glycoprotein E deletion as a vaccine marker are virulent in cattle. *J Gen Virol.* 2006;87(8):2149-54.
 - Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (2004). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 5a edición. OIE, París, 1178 págs.
 - Parreño V, López MV, Rodríguez D, Vena MM, Izuel M, Filippi J, Romera A, Faverin C, Bellinzoni R, Fernandez F, Marangunich L. Development and statistical validation of a guinea pig model for vaccine potency testing against Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) virus. *Vaccine.* 2010;28(13):2539-49.
 - Patel JR. Evaluation of a quadrivalent inactivated vaccine for the protection of cattle against diseases due to viral infections. *J. South African Vet. Assoc.* 2004;75(3):137-146.
 - Patel JR. Relative efficacy of inactivated bovine herpesvirus-1 (BHV-1) vaccines. *Vaccine.* 2005; 23(31):4054-61.

- Peters AR, Thevasagayam SJ, Wiseman A, Salt JS. Duration of immunity of a quadrivalent vaccine against respiratory diseases caused by BHV-1, PI3V, BVDV, and BRSV in experimentally infected calves. *Prev Vet Med.* 2004;66(1-4):63-77.
- Piedrahita D, Ramírez G, Vera V. Detección y caracterización por métodos moleculares de aislamientos colombianos de Herpesvirus bovino tipo 1. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia.* 2005; 52: 122-127
- Ruiz-Saenz J, Jaime J, Ramirez G, Vera VJ. Molecular and in vitro characterization of field isolates of bovine herpesvirus-1 .*Viol Sin.* 2011;26 (6).
- Schudel AA, Carrillo BJ, Wyler R, Metzler AE. Infections of calves with antigenic variants of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurological disease. *Zentralbl Veterinarmed B.* 1986;33:303-10.
- Toussaint JF, Letellier C, Paquet D, Dispas M, Kerkhofs P. Prime-boost strategies combining DNA and inactivated vaccines confer high immunity and protection in cattle against bovine herpesvirus-1. *Vaccine.* 2005;23(43):5073-81.
- Valera AR, Pidone CL, Massone AR, Quiroga MA, Riganti JG, Corva SG, Galosi CM. A simple method of infecting rabbits with Bovine herpesvirus 1 and 5. *J Virol Methods.* 2008;150(1-2):77-9.
- Wyler R, Engels M, Schwyzer M. Infectious Bovine Rhinotracheitis/Vulvovaginitis (BHV1). In: *Herpesvirus Diseases of Cattle, Horses and Pigs*, Wittmann G., ed. Kluwer Academic publishers, Boston, USA, 1989. p. 1-72.
- Wyler R., Engels M, Schwyzer M. (1995). Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis (BHV1) Institute of Virology. University of Zurich p 1-55 1995.

-
- Zimmerman AD, Buterbaugh RE, Herbert JM, Hass JM, Frank NE, Luempert Iii LG, Chase CC. Efficacy of bovine herpesvirus-1 inactivated vaccine against abortion and stillbirth in pregnant heifers. *J Am Vet Med Assoc.* 2007;231(9):1386-9.

5. Capítulo 5

Nota corta / Short communication

Desarrollo de un Poxvirus recombinante que exprese la glicoproteína D del Herpesvirus Bovino-1

Development of a recombinant Poxvirus expressing Bovine herpesvirus-1 glycoprotein D

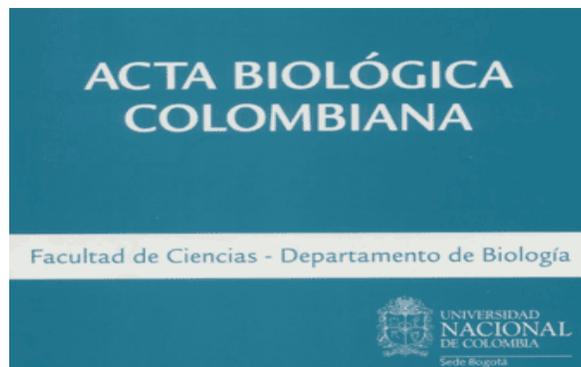
Julián Ruiz-Sáenz,¹ MV, MSc; Jorge E. Osorio², MV, MSc, PhD, Víctor J. Vera,¹ MV, MSc, PhD.

¹Grupo de Microbiología y Epidemiología. Universidad Nacional de Colombia

²Department of Pathobiological Sciences, School of Veterinary Medicine, University of Wisconsin-Madison

Sometido a:

Acta Biológica Colombiana



RESUMEN

El herpesvirus bovino-1 es un virus de genoma DNA perteneciente a la familia Herpesviridae, subfamilia Alfa herpesvinae, el cual afecta al bovino, en el que provoca un amplio espectro de manifestaciones clínicas, acarreado graves pérdidas económicas. El principal componente inmunogénico de su envoltura es la glicoproteína D (gD), la cual ha sido caracterizada y utilizada como inmunógeno en distintos sistemas de expresión. Diferentes estudios han demostrado la eficacia de los vectores poxvirales como un sistema eficiente para inmunizar animales contra diferentes antígenos. El objetivo de este trabajo fue generar un poxvirus recombinante (Raccoonpox [RCN]) que expresara una versión truncada de la gD del BHV-1 para ser usado como inmunógeno. Para ello, con ayuda de cebadores específicos se amplificó el gen que codifica para a versión truncada de la gD la cual no posee el dominio de anclaje de membrana (1,089 pares de bases), el cual posteriormente se clonó usando las enzimas EcoRI y BamHI en el plásmido de transferencia pTK/IRES/tpa que posee sitios de homología a la timidina kinasa del poxvirus, un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) y una señal secretoria (tPA), generando el constructo pTK/gD/IRES/tpa. Para generar el RCN recombinante, se tomaron células de riñón de mono verde africano BSC-1, se infectaron con una cepa Silvestre del RCN (CDC/V71-I-85A) a un Índice de Multiplicidad de Infección (MOI) de 0,05, y se incubaron a 37°C por 90 minutos; luego, las células fueron transfectadas con el constructo pTK/gD/IRES/tpa usando el sistema de transfección FuGENE 6®; generándose a través del sistema celular de recombinación de homólogos diferentes poblaciones virales con y sin el gen de interés. Para seleccionar los virus recombinantes que expresaban el gen de interés, se realizó una selección de recombinantes negativos para timidina kinasa y positivos para la gD por tres rondas de purificación de placas en monocapas de células RAT-2 las cuales son mutantes para timidina kinasa y en presencia de bromodeoxiuridina. Los virus recombinantes se confirmaron por PCR y secuenciación de nucleótidos y se denominaron RCN-gD.

Palabras clave: Clonación, ganadería, rinotraqueitis, virus.

ABSTRACT

Bovine Herpesvirus-1 is a DNA virus belonging to the family Herpesviridae, subfamily *Alfaherpesvirinae*, which affects cattle, causing a wide spectrum of clinical manifestations, resulting in high economic losses. The main immunogenic component is its envelope glycoprotein D (gD), which has been characterized and used as immunogen in different expression systems. Several studies have demonstrated the efficacy of poxviral vectors as an efficient system to immunize animals against various antigens. The aim of this paper was to generate a recombinant poxvirus (Raccoonpox [RCN]) expressing a truncated version of BHV-1 gD to be used as a vaccine. To do this, using specific primers, it was amplified the gene for a truncated version of gD that lacks the membrane anchoring domain (1,089 bp), which subsequently was cloned using EcoRI and BamHI enzymes in transfer plasmid PTK / IRES / tpa which has homology to sites of poxvirus thymidine kinase, an internal site of ribosome entry (IRES) and a secretory signal (tPA), generating the construct PTK / gD / IRES / tpa. To generate the recombinant RCN, we took cells from African green monkey kidney BSC-1, that cells were infected with a wild type RCN (CDC/V71-I-85A) at a multiplicity of infection (MOI) of 0.05 and incubated at 37 °C for 90 minutes, then cells were transfected with the construct PTK / gD / IRES / tpa using the FuGENE 6® transfection system, generating through the cellular system of homologous recombination different viral populations with and without the gene of interest. To select recombinant viruses expressing the gene of interest, we performed a selection of recombinant thymidine kinase negative and positive for gD by three rounds of plaque purification on RAT-2 cells monolayers which are thymidine kinase null and using bromodeoxyuridine. Recombinant viruses were recovered and confirmed by PCR and nucleotide sequencing and so called RCN-gD.

Keywords: Cloning, livestock, rhinotracheitis, virus.

INTRODUCCIÓN

El herpesvirus Bovino es un virus de genoma DNA perteneciente a la familia *herpesviridae*, subfamilia *Alfaherpesvirinae* (Wylere *et al.*, 1989); el cual posee una amplia diversidad de cepas, las cuales son serológicamente indiferenciables. Sin embargo, con

base en el análisis del genoma con endonucleasas de restricción y sus respectivos patrones de migración, se han clasificado en dos tipos y 3 subtipos: BHV-1.1, BHV-1.2a, BHV-1.2b (Wylter *et al.*, 1995). Los subtipos conocidos como BHV-1.3a y BHV-1.3b han sido reclasificados como BHV-5, el cual presenta un alto potencial neuropatogénico (Büchen-Osmond C, 1995).

El BHV-1 afecta naturalmente al bovino, especie en la que provoca un amplio espectro de manifestaciones conocidas como rinotraqueitis (IBR), vulvovaginitis pustular infecciosa (IPV), balanopostitis (IPB), conjuntivitis, aborto, enteritis y encefalitis. La distribución de la infección es mundial y la prevalencia de reactores serológicos indica que prácticamente todos los bovinos mayores de tres años han estado en contacto con el virus (Pidone *et al.*, 1999).

En Colombia, se han realizado diferentes estudios seroepidemiológicos, los cuales además de demostrar la extensión de la infección, han permitido el aislamiento de algunas cepas nativas, las cuales fueron aisladas a comienzos de los años 70 (CIAT 1972-1975), en la mitad de los años noventa (Molano y Rodríguez, 1995), y un grupo mayor (18 aislamientos) aisladas a finales de la última década, las cuales han sido sujeto de caracterización molecular, clasificando la mayoría de los aislamientos del país como BHV-1.1 y a un aislamiento de la sabana de Bogotá como BHV-1.2a (Piedrahita D, 2005, Ruiz-Saenz *et al.*, 2010, Ruiz-Saenz *et al.*, 2011. Capítulo 3).

Desde hace más de 20 años, existen en el comercio vacunas convencionales contra el BHV-1, las cuales se utilizan en muchos países en sus distintas variantes: generadas a partir de virus vivo modificado o inactivado, mono o polivalente, etc. Según la Organización Mundial de Sanidad Animal-OIE, dependiendo de la capacidad del producto de inducir inmunogenicidad, la vacuna puede ser efectiva en reducir las manifestaciones clínicas de la enfermedad y en consecuencia, reducir las pérdidas económicas asociadas a dicho proceso clínico; sin embargo, no logra proteger completamente de la infección por virus de campo (OIE, 2004).

Recientes avances en el desarrollo de vacunas han resultado en el desarrollo e implementación de vacunas más seguras y eficientes contra enfermedades humanas y

veterinarias usando subunidades proteicas recombinantes, vectores virales y bacterianos, y vectores basados en DNA. Los problemas concernientes tanto a las vacunas atenuadas como a las vacunas inactivadas (reversión de virulencia, fallas en la inducción de inmunidad etc.), impulsaron la producción de nuevas alternativas vacunales que contienen sólo determinados componentes virales, los cuales previamente han mostrado ser altamente inmunogénicos, como son las diferentes glicoproteínas virales. Las vacunas recombinantes pueden ser replicativas o no replicativas de acuerdo a su capacidad de replicar el agente viral en el individuo vacunado. Entre las replicativas se encuentran las vacunas marcadoras, las atenuadas y las portadas por un vector bacteriano o viral; y en las no replicativas están las de sub-unidades proteicas y las de sub-unidades génicas (Ruiz-Saenz et al., 2009).

Para el BHV-1 se han descrito el desarrollo de diferentes vectores virales los cuales expresan glicoproteínas inmunogénicas, principalmente la gD. Entre estos vectores virales se resalta el uso del Herpesvirus Bovino-4 (BHV-4), un miembro de la subfamilia *Gammaherpesvirinae*, el cual expresando la gD del BHV-1 es altamente inmunogénico e induce la producción de anticuerpos neutralizantes anti-gD (Donofrio *et al.*, 2006, Donofrio *et al.*, 2008). Otra alternativa ampliamente explorada ha sido el uso de vectores adenovirales tanto de origen bovino como humano y en versiones replicativas y no replicativas, encontrándose resultados contradictorios en los diferentes estudios (van Drunen Littel van den Hurk *et al.*, 1993; Mittal *et al.*, 1996; Reddy *et al.*, 1999; Reddy *et al.*, 2000; Gogev *et al.*, 2002). Adicionalmente, se han desarrollado Baculovirus recombinantes como inmunógenos que llevan en su superficie moléculas quiméricas entre la glicoproteína de superficie gp64 del baculovirus y la gD derivada del BHV-1, lográndose inducir la producción de anticuerpos capaces de neutralizar el virus *in vitro* (Peralta *et al.*, 2006; Peralta, 2007).

El poxvirus de mapaches (Raccoon Poxvirus - RCN) es un virus envuelto, de genoma DNA de doble cadena perteneciente a la Familia *Poxviridae*, Subfamilia *Chordopoxvirinae*, género *Orthopoxvirus*, nativo de América del Norte el cual fue aislado del tracto respiratorio superior de mapaches clínicamente sanos durante una evaluación de vigilancia epidemiológica en Maryland, USA (Herman, 1964). Durante más de dos décadas, los RCN han sido usados como sistemas de expresión de genes heterólogos, demostrándose que la inserción de dichos genes heterólogos sobre el gen de la timidina

kinasa viral (tk) reduce la virulencia del RCN a la vez que facilita la expresión del gen de interés (Esposito *et al.*, 1988). El uso eficiente de este virus recombinante ha sido demostrado en diversas especies de mamíferos, entre ellos, zorros, conejos, gatos domésticos, lechones, ovejas y primates no humanos (Esposito *et al.*, 1992). Distintas rutas de inoculación han sido evaluadas, las cuales incluyen las rutas: intramuscular, intranasal, subcutánea y oral, demostrando no solo una amplia versatilidad de este vector para infectar diferentes células blanco en los organismos, sino también, una eficiente producción de inmunidad tanto celular como humoral contra enfermedades virales y bacterianas (Osorio *et al.*, 2003; Memcher *et al.*, 2004).

Teniendo en cuenta que los últimos estudios del BHV-1 realizados en el país demuestran que la prevalencia serológica llega a ser del 100% por hato y más del 75% por animales, tanto en explotaciones lecheras como en ganaderías de producción de carne (Ruiz-Saenz *et al.*, 2010 – Capítulo II), y el hecho de la falta de una vacuna monovalente que induzca una eficiente respuesta inmune, el presente trabajo tuvo por objetivo generar un poxvirus recombinante (Raccoonpox [RCN]) que expresara una versión truncada de la gD del BHV-1 para ser usado a futuro como inmunógeno en bovinos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Células y virus: En el presente trabajo se utilizaron células de riñón de mono verde africano (BSC-1 ATCC #CCL-26), células VERO (ATCC#CCL-18), fibroblastos de embrión de rata (RAT-2 (ATCC 1764)) y células MDBK (ATCC CCL-22) obtenidas del repositorio de células del Departamento de Patobiología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Wisconsin. Las células se mantuvieron a 37°C en una atmósfera del 5% de CO₂ en DMEM (Gibco-Invitrogen, Inc. Grand Island, NY) suplementado con SFB al 10% (Gibco-Invitrogen, Inc. Grand Island, NY), penicilina-estreptomicina (10.000U/ml y 10µg/ml respectivamente) y anfotericina (0.25µg/ml) (Gibco-Invitrogen, Inc. Grand Island, NY). Para los experimentos de transfección se usó OptiMEM® (Gibco-Invitrogen, Inc. Grand Island, NY) sin suplementación adicional de suero. El poxvirus de mapaches de referencia, RCN cepa CDC/V71-I-85A fue replicado en células VERO, mientras que el BHV-1 cepa IOWA fue replicado en células MDBK y

almacenado a -80°C. El RCN se mezcló 1:1 con solución de tripsina-verseno (0,05% de tripsina, EDTA 0,02% en solución salina equilibrada) y se incubó durante 15 min a 37 °C para liberar partículas infecciosas de los agregados que puedan haberse formado durante el almacenamiento antes de la inoculación en células.

Plaqueo y Titulación por Unidades formadoras de placa (UFP): Se sembraron células VERO en platos de 24 pozos y fueron tratadas con diluciones decimales de los virus; una hora post-infección, se retiró el inóculo y se adicionó medio semisólido (MEM al 5% de SFB con agarosa al 0,4%) y se incubó por 72 horas a 37° C en una atmósfera al 5% de CO₂, tiempo para el cual las monocapas fueron fijadas con formaldehído al 4% y teñidas usando el colorante cristal violeta.

Extracción del ADN: Las muestras de virus fueron resuspendidas en 0.5 ml de buffer de lisis (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 100 mM EDTA; 0.5% SDS) e incubadas a 50 °C en presencia de 20 µg/ml de proteinasa K (Fermentas®), durante 3 horas. El ADN se extrajo del lisado celular usando fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), seguido por precipitación con 50 µl de acetato de sodio (3M) y 1 ml isopropanol 100% (previamente conservado a -20°C). Inmediatamente, el ADN fue recolectado por centrifugación y lavado dos veces con etanol al 70% y disuelto en 200 µl de buffer TE (Tris 10 mM, EDTA 1mM).

Plásmido vector de transferencia: Se utilizó el vector pTK-IRES-tPA, el cual posee el sitio de inserción del DNA exógeno flanqueado por secuencias del gen tk del RCN y se pueden recombinar en el gen tk de los ortopoxvirus de tipo silvestre. Adicionalmente, el vector posee un potenciador de la traducción que es el sitio interno de entrada ribosomal (IRES) del virus de la encefalomiocarditis (EMCV) y la señal secretoria de la proteína activadora del plasminógeno tisular (tPA), los cuales es bien sabido que mejoran de forma significativa los niveles de expresión de genes exógenos en un RCN recombinante (Osorio et al., 2003).

Amplificación y Clonación de la versión truncada de la gD del BHV-1: Para obtener dicha versión truncada de la gD del BHV-1, se realizó PCR-RFLP con BamHI y EcoRI y con los cebadores: gDF 5'-TATT**GGATCC**ATGCAAGGGCCGACATTGGCCGTG-3' y gDR 5'-TTAC**GAATTC**TTAGGGCGTAGCGGGGGCGGGCG-3', generando un fragmento de

1,089pb aproximadamente. Este fragmento de PCR fue clonado en el plásmido de transferencia pTK-IRES-tPA previamente digerido con EcoRI y BamHI generando el plásmido pTK-IRES-tPA-gD, el cual tiene un tamaño de cerca de 5082pb; generándose una versión truncada de la gD de 355 aminoácidos. La selección del plásmido se realizó por resistencia a Ampicilina (GIBCO BRL) y la confirmación de la correcta inserción por secuenciación de nucleótidos y digestión con la enzima XmaI para confirmar la correcta inserción del gen.

Generación del Poxvirus recombinante: Los virus recombinantes se obtuvieron utilizando el sistema de recombinación de homólogos. Brevemente, para la generación del RCNgD, se sembraron platos de 6 pozos con 500.000 células de BSC-1, las cuales posteriormente se infectaron con el RCN cepa de referencia (CDC/V71-I-85A) a un Índice de Multiplicidad de Infección (MOI) de 0,05; 90 minutos post-inoculación, las células fueron transfectadas con el vector de transferencia pTK-IRES-tpa-gD usando el sistema FuGENE® 6 (Roche®) y se incubó a 37°C durante 72 horas. Posterior a la infección / transfección, las células se congelan y descongelado tres veces y el lisado fue inoculado en células RAT-2 en medio M199 con 5% de SFB y 50 ug / ml 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU sigma®). Tras una incubación de 2 horas, se retiró el medio y la monocapa infectada se cubrió con MEM con 5% de SFB y 1,2% de agarosa de bajo punto de fusión. En presencia de BrdU, sólo los virus RCN tk- dan lugar a la formación de unidades formadoras de placa (UFP). Las placas de crecimiento viral resistentes a la BrdU fueron recolectadas aproximadamente 14 días después de la inoculación (PI) y se re-plaquearon dos veces en células RAT-2 (mutantes de timidina kinasa) cultivadas en un medio con BrdU. Los clones virales positivos se amplificaron y caracterizaron para su posterior crecimiento a gran escala en las células Vero.

Confirmación de los Recombinantes: se realizó extracción de ADN, PCR y secuenciación de nucleótidos utilizando los cebadores RCNgDF 5'-ATGCAAGGGCCGACATTGGCCGTG-3' y RCNgDR 5'-TTAGGGCGTAGCGGGGGCGGCG-3', para confirmar la secuencia de la gD expresada por el RCN-gD. Las condiciones de PCR fueron 1 minuto de desnaturalización

y activación de polimerasa en 95°C, seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, 62°C durante 30 segundos, y 72°C durante 30 segundos con una extensión final de 10 minutos a 72°C. Los productos de PCR se verificaron en gel de agarosa al 0.8% (p/v) preparado en buffer TAE y teñido con bromuro de etidio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se replicó el BVH-1 en células MDBK durante 48 horas para posteriormente realizar extracción de DNA viral y PCR usando los cebadores descritos anteriormente a partir del sobrenadante del cultivo con efecto citopático característico. Se amplificó un fragmento de 1,089 pb que codifica para una versión truncada de la glicoproteína D del BHV-1 la cual posee una terminación en el aminoácido 355, corriente arriba del dominio de anclaje de membrana (van Drunen littel van Den Hurk.et al., 1990). Se ha demostrado que dicha proteína es altamente inmunogénica en bovinos permitiendo la producción de anticuerpos neutralizantes y de inmunidad celular, humoral y de mucosas (van Drunen Littel van den Hurk et al., 1993, 1994; van Drunen Littel van den Hurk, 2006). Como se evidencia en el diagrama presentado en la figura 1, se utilizó un sistema tradicional de clonación del gen de interés y posterior transfección / infección en células de mamífero (Byrd & Hruby, 2004).

Para el proceso de clonación, se utilizó el plásmido de referencia pTK-IRES-tPA, en el cual se realizó la ligación del gen de la gD amplificada para su posterior selección por resistencia ampicilina generando el plásmido pTK-IRES-tPA-gD como se aprecia en la Figura 2. A partir de DNA extraído de las colonias amplificadas en mini preparación, se realizó PCR para la gD del BHV-1 lo cual permitió confirmar la presencia del gen de interés y el correcto funcionamiento de la ligación. Se realizó evaluación de aproximadamente 60 colonias para encontrar 5 colonias transformadas que por PCR mostraron la presencia del gen de interés (Figura 3). Dichas colonia se amplificaron en una maxi-preparación de la cual se obtuvo un lote de bacterias transformadas que se almacenó posteriormente a -80°C. Los plásmidos fueron secuenciados para confirmar la presencia del gen de la gD y se realizó digestión con la enzima XmaI para confirmar la correcta inserción.

Nuevamente se realizó extracción de DNA y se confirmó nuevamente la presencia del gen de interés en el plásmido de transferencia, el cual se usó para realizar el ensayo de transfección/infección usando 1 µg de DNA plasmídico por pozo de un plato de 6 pozos de células BSC-1, las cuales se infectaron con el RCN a MOI de 0,05 y se incubó durante 72 horas, tiempo para el cual hubo presencia de efecto citopático (figura 4a – c) y las células fueron recuperadas, lisadas y el sobrenadante puesto sobre una monocapa confluyente de células Rat-2 en presencia de medio semisólido y BrdU en incubación durante 14 días tiempo para el cual solo los virus recombinantes TK- logran replicar y dar lugar a la formación de placas de lisis (figura 4d – e). Cada placa de lisis fue replicada en una monocapa nueva en presencia de medio con BrdU realizándose 2 rondas de plaqueo y confirmando por PCR la presencia del gen de la gD en los virus RCNgD (Figura 5).

Los poxvirus han sido ampliamente utilizados como inmunógenos, incluso algunos ya han sido licenciados para uso comercial en diversas partes de Estados Unidos y Europa para su uso en diversas especies de interés veterinario (Larson & Schultz, 2007; Guthrie et al., 2009; Soboll et al., 2010); incluso en Colombia, recientemente se autorizó la comercialización de un Canarypox que expresa las glicoproteínas H y F del virus del Distemper canino (ICA, Reg 4734 y 4735 de 2011). En general, los poxvirus han demostrado ser muy buenos inmunógenos y dado que no tienen potencial patogénico en una especie diferente a su especie huésped natural son uno de las más importantes alternativas para vacunación con virus con capacidad replicativa en el mundo (Vanderplasschen & Pastoret, 2003).

Puntualmente, el RCN ha sido empleado como un vector viral que expresa proteínas de *Yersinia Pestis* (Rocke et al., 2008; Rocke et al., 2009), como un vector que expresa eficientemente la glicoproteína G del virus de la Rabia (Osorio et al., 2003) y más recientemente como un vector viral que expresa la Hemaglutinina (H5) del virus de la Influenza Aviar de alta patogenicidad (H5N1) (Hwa, et al., 2010) demostrando en todos los casos ser un eficiente sistema para la inducción de inmunidad humoral, inmunidad en mucosas e inmunidad celular (Walsh & Dolin, 2011). Por otra parte, su seguridad para el personal que aplica la vacuna o que se expone a dicho virus recombinante ha sido probada, mostrando que no existe riesgo significativo ante la exposición directa (Rocke et al., 2004)

Un constructo similar basado en un virus de Vaccinia Ankara -MVA expresando la misma versión de esta glicoproteína del BHV-1, ha sido generado y evaluado en conejos y ratones modelos de infección por el BHV-1, encontrando este recombinante muy útil para inducir inmunidad humoral específica y reducir los niveles de excreción viral posteriores al reto con BHV-1 de referencia (Ferrer et al., 2011); sin embargo su uso en bovinos no ha sido explorado hasta el momento, hecho que resalta la importancia de explorar la capacidad inmunogénica del RCNgD recombinante generado en el presente trabajo y su potencial uso como vector en bovinos tanto para la gD del BHV-1 como para otras proteínas inmunogénicas de agentes patógenos de importancia en el campo médico veterinario.

CONCLUSIÓN

En el presenta trabajo se presenta el desarrollo técnico de un poxvirus de mapaches que expresa la gD del BHV-1 (RCNgD), un virus que tiene amplio potencial para ser desarrollado a escala como una potencial vacuna monovalente contra la infección por el BHV-1. Es necesario por tanto realizar estudios de *in vitro* de expresión y estabilidad de la gD recombinante en el vector y llevar dicho recombinante a pruebas *in vivo* de inducción de inmunidad y de protección ante el reto con cepas de referencia.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren agradecer al personal del laboratorio del DR. Jorge Osorio en la Universidad de Wisconsin por el apoyo técnico en el desarrollo del proyecto. JRS es becario del programa de apoyo a doctorandos nacionales de COLCIENCIAS.

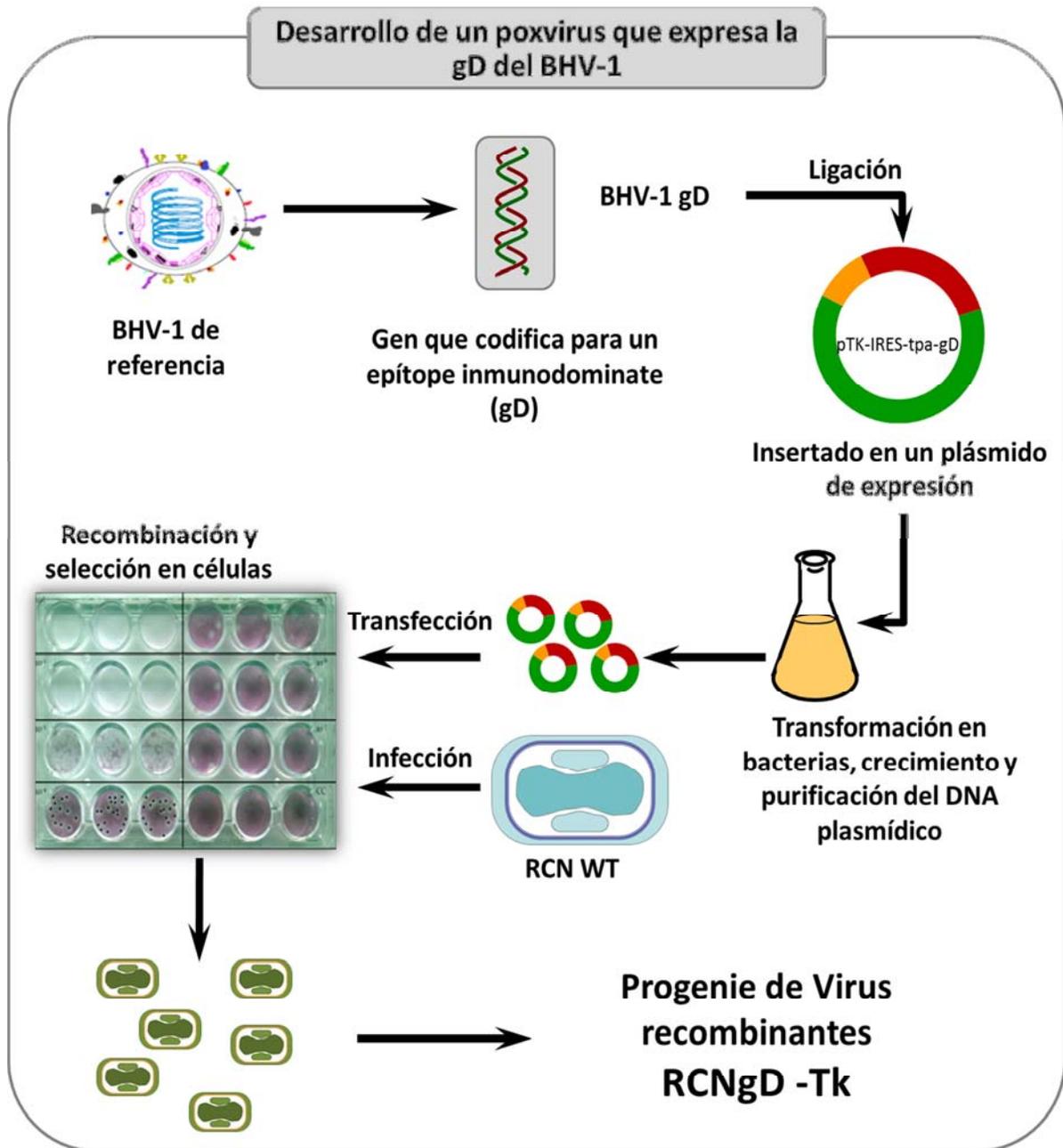


Figura 1. Desarrollo de un poxvirus recombinante que expresa la gD del BHV-1. El diagrama muestra de forma esquemática las diferentes fases de desarrollo del virus recombinante desde la selección del gen de interés (gD del BHV-1) hasta la obtención de la progenie de virus recombinantes RCN-gD.

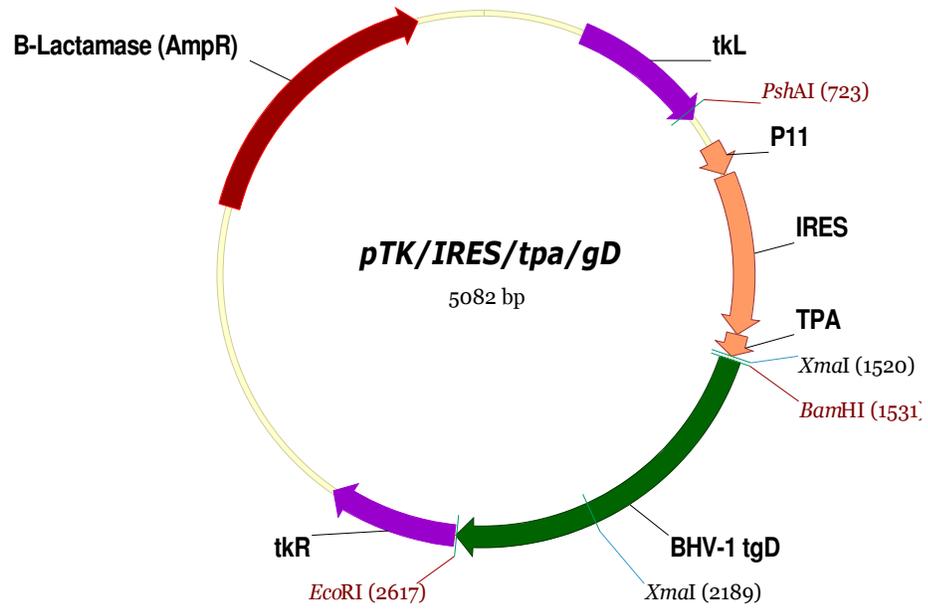


Figura 2. Mapa del plásmido de transferencia pTK-IRES-tpa-gD. Se resaltan los sitios de restricción para BamHI y EcoRI (modelo construido usando Vector NTI Advance 11® INVITROGEN™)

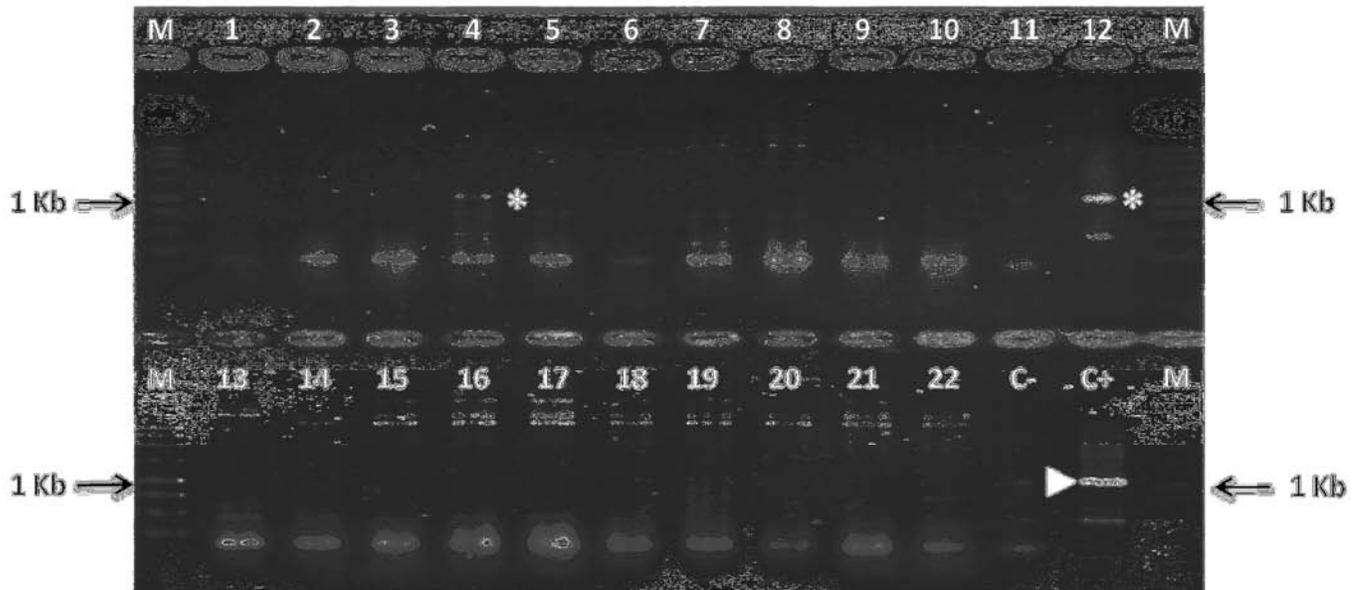


Figura 3. Visualización de productos de PCR de la gD en plásmidos pTK/IRES/tpa/gD. Gel de electroforesis de agarosa al 0,8% coloreado con bromuro de etidio. M: Marcador de peso molecular (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Fermentas®, Vilnius, Lithuania). 1-22: colonias amplificadas evaluadas. C-: Control Negativo (DNA bacteriano sin transfectar). C+: ADN de muestra Infectada con cepa IOWA

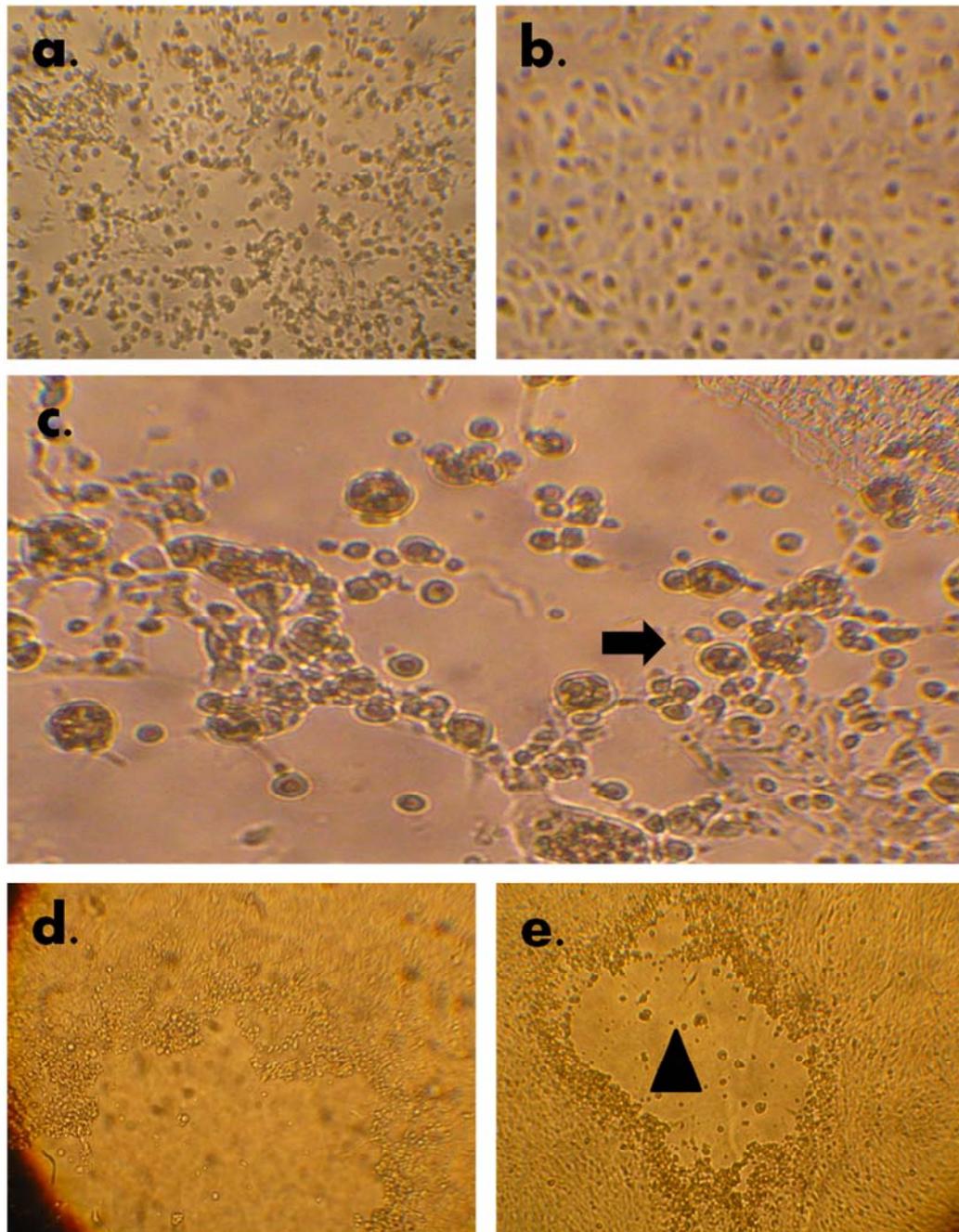


Figura 4. Presencia de infección por el RCN de tipo silvestre y RCNgD. a y c, Células BSC-1 infectadas con el RCN y transfectadas con el plásmido pTK-IRES-tPA-gD; b. Células BSC-1 control sin infección a las 72 horas post infección. d-e, Células Rat-2 infectadas con el RCN gD. Flecha indica efecto citopático característico del RCN caracterizado por redondeamiento y desprendimiento celular. Cabeza de flecha indica placa formada por el virus en presencia de BrdU.

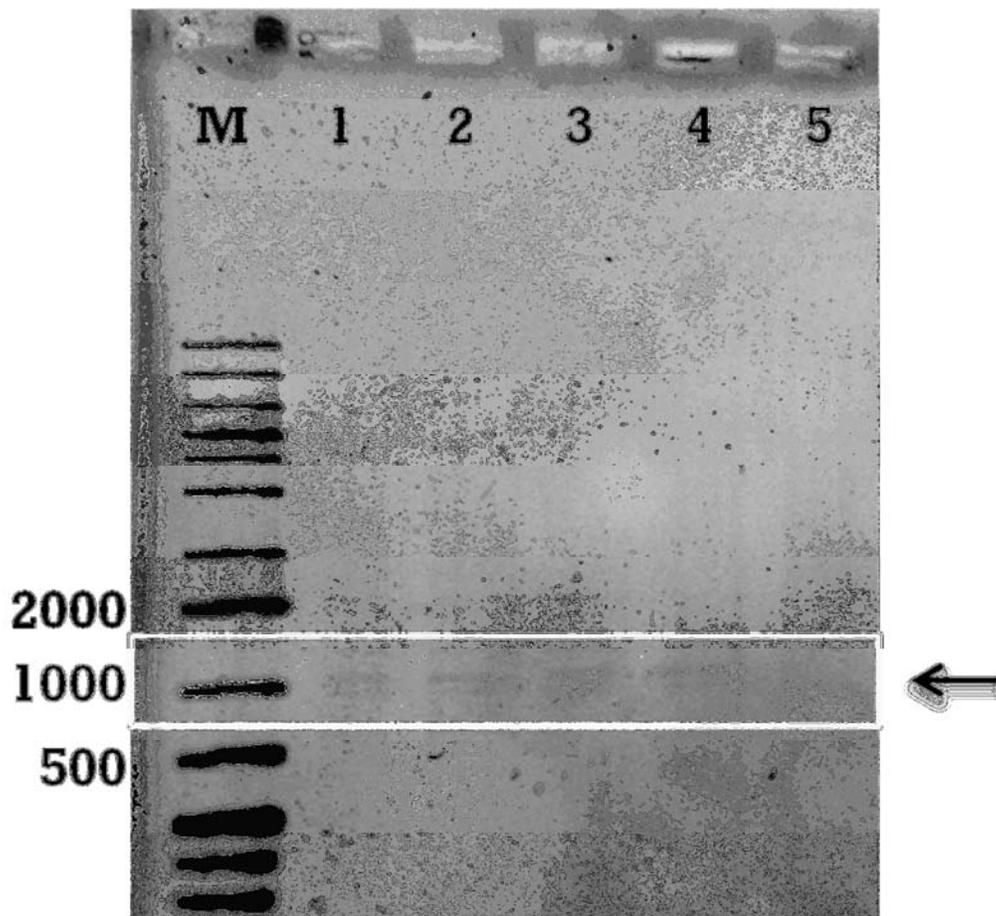


Figura 5. Visualización de productos de PCR de la gD del RCNgD. Gel de electroforesis de agarosa al 0,8% coloreado con bromuro de etidio. M: Marcador de peso molecular. 1-4: Placas de virus recombinantes RCNgD: 5: Sobrenadante de células sin infectar

REFERENCIAS

Büchen-Osmond C. Alphabetical List of ICTV approved Virus Families and Genera. Created April,1995. Última actualización: 8 de abril de 1998. Revisado Noviembre de 2011.

Byrd CM, Hruby DE. Construction of recombinant vaccinia virus: cloning into the thymidine kinase locus. *Methods Mol Biol.* 2004;269:31-40.

CIAT - Centro Internacional de Agricultura Tropical. Informe anual de salud animal; 1972.

CIAT - Centro Internacional de Agricultura Tropical. Informe anual de salud animal; 1975.

Donofrio G, Cavarani S, Vanderplasschen A, Gillet L, Flammini CF. Recombinant bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) expressing glycoprotein D of BoHV-1 is immunogenic and elicits serum-neutralizing antibodies against BoHV-1 in a rabbit model. *Clin Vaccine Immunol* 2006; 13: 1246-54.

Donofrio G, Sartori C, Franceschi V, Capocefalo A, Cavarani S, Taddei S, Flammini CF. Double immunization strategy with a BoHV-4-vectorialized secreted chimeric peptide BVDV-E2/BoHV-1-gD. *Vaccine.* 2008 Nov 11;26(48):6031-42.

Esposito JJ, Knight JC, Shaddock JH, Novembre FJ, Baer GM. Successful oral rabies vaccination of raccoons with raccoon poxvirus recombinants expressing rabies virus glycoprotein. *Virology* 1988;165(1):313-6.

Esposito JJ, Sumner JW, Brown DR, Ebert JW, Shaddock JH, Bai XH, Dobbins JG, Fekadu M. Raccoon poxvirus rabies-glycoprotein recombinant oral vaccine for wildlife: further efficacy and safety studies and serosurvey for raccoon poxvirus. In: Brown F, Chanock RM, Ginsberg H, Lerner RA (eds), *Vaccines-91: modern approaches to new vaccines including prevention of AIDS.* Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp 321-330. 1992

Ferrer MF, Del Médico Zajac MP, Zanetti FA, Valera AR, Zabal O, Calamante G. Recombinant MVA expressing secreted glycoprotein D of BoHV-1 induces systemic and mucosal immunity in animal models. *Viral Immunol.* 2011 Aug;24(4):331-9.

Gogev S, Vanderheijden N, Lemaire M, Schynts F, D'Offay J, Deprez I, Adam M, Eloit M, Thiry E. Induction of protective immunity to bovine herpesvirus type 1 in cattle by intranasal administration of replication-defective human adenovirus type 5 expressing glycoprotein gC or gD. *Vaccine.* 2002; 20:1451-65

Guthrie AJ, Quan M, Lourens CW, Audonnet JC, Minke JM, Yao J, He L, Nordgren R, Gardner IA, Maclachlan NJ. Protective immunization of horses with a recombinant canarypox virus vectored vaccine co-expressing genes encoding the outer capsid proteins of African horse sickness virus. *Vaccine.* 2009;27(33):4434-8.

Hwa SH, Iams KP, Hall JS, Kingstad BA, Osorio JE. Characterization of recombinant raccoonpox vaccine vectors in chickens. *Avian Dis.* 2010;54(4):1157-65.

Ioannou XP, Griebel P, Hecker R, Babiuk LA, van Drunen Littel-van den Hurk S. The immunogenicity and protective efficacy of bovine herpesvirus 1 glycoprotein D plus Emulsigen are increased by formulation with CpG oligodeoxynucleotides. *J Virol.* 2002 Sep;76:9002-10.

Larson LJ, Schultz RD. Three-year serologic immunity against canine parvovirus type 2 and canine adenovirus type 2 in dogs vaccinated with a canine combination vaccine. *Vet Ther.* 2007;8(4):305-10.

Mencher JS, Smith SR, Powell TD, Stinchcomb DT, Osorio JE, Rocke TE. Protection of black-tailed prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*) against plague after voluntary consumption of baits containing recombinant raccoon poxvirus vaccine. *Infect Immun.* 2004;72(9):5502-5.

Mittal SK, Papp Z, Tikoo SK, Baca-Estrada ME, Yoo D, Benko M, Babiuk LA. Induction of systemic and mucosal immune responses in cotton rats immunized with human adenovirus type 5 recombinants expressing the full and truncated forms of bovine herpesvirus type 1 glycoprotein gD. *Virology.* 1996; 222: 299-309.

Molano D, Rodríguez JL, Ramírez G, Villamil LC. Caracterización electroforética e inmunológica de una cepa de campo del virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina y su comparación con cepas de referencia. *Rev Med Vet Zootec.* 1996. 44:35-8.

Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (2004). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, 5a edición. OIE, París, 1178 págs.

Osorio JE, Frank RS, Moss K, Taraska T, Powell T, Stinchcomb DT. Raccoon poxvirus as a mucosal vaccine vector for domestic cats. *J Drug Target.* 2003;11(8-10):463-70.

Osorio JE, Powell TD, Frank RS, Moss K, Haanes EJ, Smith SR, Rocke TE, Stinchcomb DT. Recombinant raccoon pox vaccine protects mice against lethal plague. *Vaccine.* 2003;21(11-12):1232-8.

Peralta A, Molinari MP, Taboga O. Baculovirus recombinantes como inmunogenos. *Rev Argent Microbiol.* 2006; 38:74

Peralta A, Molinari P, Conte-Grand D, Calamante G, Taboga O. A chimeric baculovirus displaying bovine herpesvirus-1 (BHV-1) glycoprotein D on its surface and their immunological properties. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007; 75: 407-14.

Pidone CL, Galosi CM, Etcheverrigaray EM. Herpesvirus Bovinos 1 y 5. *Analecta Veterinaria* 1999; 19,1/2: 40-50

Piedrahita D, Ramírez G, Vera V. Detección y caracterización por métodos moleculares de aislamientos colombianos de Herpesvirus bovino tipo 1. *Rev Fac Med Vet Zoo.* 2005;52:122-127.

Reddy PS, Idamakanti N, Pyne C, Zakhartchouk AN, Godson DL, Papp Z, Baca-Estrada ME, Babiuk LA, Mutwiri GK, Tikoo SK. The immunogenicity and efficacy of replication-defective and replication-competent bovine adenovirus-3 expressing bovine herpesvirus-1 glycoprotein gD in cattle. *Vet Immunol Immunopathol.* 2000; 76: 257-68

Reddy PS, Idamakanti N, Zakhartchouk AN, Baxi MK, Lee JB, Pyne C, Babiuk LA, Tikoo SK. Nucleotide sequence, genome organization and transcription map of bovine adenovirus type 3. *J Virol.* 1999; 72:1394–1402.

Rocke TE, Dein FJ, Fuchsberger M, Fox BC, Stinchcomb DT, Osorio JE. Limited infection upon human exposure to a recombinant raccoon pox vaccine vector. *Vaccine*. 2004 Jul 29;22(21-22):2757-60.

Rocke TE, Smith SR, Stinchcomb DT, Osorio JE. Immunization of black-tailed prairie dog against plague through consumption of vaccine-laden baits. *J Wildl Dis*. 2008;44(4):930-7.

Rocke TE, Iams KP, Dawe S, Smith SR, Williamson JL, Heisey DM, Osorio JE. Further development of raccoon poxvirus-vectored vaccines against plague (*Yersinia pestis*). *Vaccine*. 2009;28(2):338-44.

Ruiz-Saenz J, Jaime J, Ramirez G, Vera VJ. Molecular and in vitro characterization of field isolates of bovine herpesvirus-1. *Virol Sin*. 2011;26 (6).

Ruiz-Saenz J, Jaime J, Vera V. Serological prevalence and isolation of Bovine herpesvirus-1 (BHV-1) in cattle herds from Antioquia and Valle del Cauca provinces. *Rev Colomb Cienc Pecu* 2010; 299-307.

Ruiz-Sáenz J, Jaime J, Vera V. Vacunas contra el BHV-1: Una mirada desde el pasado hacia el futuro de la inmunización. *Acta Biol Colomb*. 2009; 14(2): 3-20

Soboll G, Hussey SB, Minke JM, Landolt GA, Hunter JS, Jagannatha S, Lunn DP. Onset and duration of immunity to equine influenza virus resulting from canarypox- vectored (ALVAC) vaccination. *Vet Immunol Immunopathol*. 2010;135(1-2):100-7.

van Drunen Littel-van den Hurk S, Parker MD, Massie B, van den Hurk JV, Harland R, Babiuk LA and Zamb TJ. Protection of cattle from BHV-1 infection by immunization with recombinant glycoprotein gIV. *Vaccine* 1993; 11 (1):25-35.

Van DrunenLittel-van den Hurk S, GiffordGA, Babiuk LA. Epitope specificity of the protective immune response induced by individual bovine herpesvirus-1 glycoproteins. *Vaccine*. 1990; 8: 358-68

Van DrunenLittel-van den Hurk S, Parker MD, Massie B, van den Hurk JV, Harland R, Babiuk LA and Zamb TJ. Protection of cattle from BHV-1 infection by immunization with recombinant glycoprotein gIV. *Vaccine* 1993; 11 (1):25-35.

Van DrunenLittel-van den Hurk S, van Donkersgoed J, Kowalski J, van den Hurk JV, Harland R, Babiuk LA and Zamb TJ. A subunit gIV vaccine, produced by transfected mammalian cells in culture, induces mucosal immunity against bovine herpesvirus-1 in cattle. *Vaccine* 1994; 12, 14:1295-1302.

Van DrunenLittel-van den Hurk S. Rationale and perspectives on the success of vaccination against bovine herpesvirus-1. *Veterinary microbiology*, 2006;113:275-82

Vanderplasschen A, Pastoret PP. The uses of poxviruses as vectors. *Curr Gene Ther.* 2003;3(6):583-95.

Walsh SR, Dolin R. Vaccinia viruses: vaccines against smallpox and vectors against infectious diseases and tumors. *Expert Rev Vaccines.* 2011;10(8):1221-40.

Wyler R, Engels M, Schwyzer M. Infectious Bovine Rhinotracheitis/Vulvovaginitis (BHV-1) Institute of Virology. University of Zurich 1995. p. 1-55.

6. Discusión, conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones y Discusión

El BHV-1 es un virus patógeno de bovinos de distribución mundial; En el presente estudio, se encontró en dos regiones de Colombia, un 100% de prevalencia serológica por hato para el BHV-1 y una prevalencia general por individuos del 75.63%. La prevalencia para las haciendas ganaderas de los departamentos de Antioquia y del Valle fue del 85.51% y 69.84% respectivamente; resultados que permiten postular que la infección por el BHV-1 en Colombia se comporta bajo un estatus de enzootia de la infección y descartan la posibilidad de iniciar programas de erradicación de la infección, ya que se ha demostrado que solo es posible eliminar o erradicar la infección en áreas con prevalencias serológicas relativamente bajas (<10%), de la cual estamos muy lejanos (Ackermann y Engels, 2006). Para los países con altas prevalencias serológicas y enzootia, es recomendable, establecer sistemas de “convivencia con la infección” por medio de programas de vacunación que permitan mantener un “cordón inmune” y disminuir así las pérdidas económicas debidas a las reactivaciones virales (OIE, 2004; Ackermann y Engels, 2006).

En el presente estudio, se evidenció que la inmunosupresión farmacológica utilizando una dosis única de 200 mg de dexametasona por animal es un sistema eficiente para lograr aislamientos virales con capacidad infecciosa a partir de animales seropositivos, con un mínimo o nulo deterioro de la salud del animal y un leve detrimento en la productividad del mismo. A partir de 18 aislamientos realizados en 5 zonas del país (Córdoba, Llanos, Bogotá, Antioquia y Valle del Cauca) y 2 cepas de referencia se logró caracterizar la presencia de cepas altamente virulentas *in vitro* (Córdoba y Medellín) y cepas de baja virulencia o “naturalmente atenuadas” (Cali). Adicionalmente se demostró que las cepas pertenecen principalmente al subtipo BHV-1.1 no tienen diferencias en la presentación de las glicoproteínas antigénicas de los diferentes aislamientos nativos.

La caracterización de dichos aislamientos permitió encontrar una cepa con características reportadas como óptimas para el desarrollo de una cepa que sea útil como “Semilla” para la producción de vacunas. Para nuestro caso, la Cepa Cordoba-2 demuestra que aporta una importante masa antigénica lo cual se pudo confirmar que favorece la inducción de una respuesta inmune neutralizante aun en ausencia de adyuvantes y se comprobó que protegía contra el reto con una alta dosis infecciosa en un modelo de conejo, demostrando el alto potencial de la vacuna generada, demostrando finalmente mejor protección incluso que una vacuna comercial al ser comparadas.

Teniendo en cuenta la alta prevalencia serológica para la infección al BHV-1, indicativo de un estado de enzootia, se hace realmente difícil establecer hatos bovinos seronegativos que permitan la evaluación de posibles candidatos vacunales. Es por tanto, que es importante resaltar, que este es el primer estudio en el país que adapta un modelo *in vivo* de infección por el BHV-1; el cual aunque previamente había sido reportado (Valera *et al.*, 2008), a la fecha no se ha reportado su uso para evaluación de vacunas y permite establecer un nuevo campo de trabajo no solo para la evaluación de modelos vacunales, sino también incursionar en nuevas áreas como el desarrollo y evaluación de antivirales, técnicas diagnósticas, etc.

Finalmente, el desarrollo de un virus recombinante que expresa la gD del BHV-1 es un logro que debe seguir siendo explotado. Los RCN han sido empleados como inmunógenos para múltiples enfermedades virales y bacterianas, demostrando ser muy útiles y seguros. El desarrollo logrado del RCNgD es un potencial para el desarrollo de biológicos seguros que permitan controlar la infección en el país. Adicionalmente aporta tecnologías de punta con un modelo de vector que nunca había sido utilizado para desarrollar vacunas para bovinos. Como se presentó en el documento, el uso de virus recombinantes ha crecido sustancialmente y los poxvirus son uno de los pocos grupos de virus recombinantes que por su seguridad y eficacia han logrado ser comercializados y distribuidos alrededor del mundo como biológicos recombinantes. Es por tanto que ésta tesis crea una nueva expectativa de investigación nacional, a la vanguardia del desarrollo científico mundial y con miras a la apropiación de los resultados obtenidos en trabajos básicos y pronta aplicación en la comunidad ganadera del país.

6.2 Recomendaciones

Basados en los resultados planteados, es necesario desarrollar sistemas de prevención y control encaminados a disminuir la prevalencia de la infección por el BHV-1 mediante sistemas de control apropiados para el estado de enzootia de la infección que se poseen el país y establecer los puntos críticos y momentos (ciclos) adecuados de vacunación que permitan mantener un buen estatus inmune y eviten las pérdidas económicas debidas a las reactivaciones y reinfecciones virales.

Se propone realizar estudios in vivo de patogenicidad de las cepas nativas aisladas, que permitan principalmente evaluar la posible atenuación de las cepas aisladas de la zona del Valle del Cauca (Cali 1-8), las cuales podrían ser de mucha utilidad en el desarrollo de vacunas “vivas atenuadas”.

Es necesario continuar con los estudios de desarrollo de la vacuna atenuada, añadiendo adyuvantes y estabilizantes a la formulación, los cuales permitan aumentar la duración de la inmunidad en el tiempo; Así como también es importante establecer un sistema de evaluación de la vacuna en terneros seronegativos y en bovinos seropositivos, para lograr así, tener la primera vacuna monovalente del país la cual adicionalmente sea desarrollada a partir de una cepa nativa.

Es necesario continuar el desarrollo de biológicos recombinantes como alternativas eficientes y seguras para inducir una inmunidad protectora. Nuestro RCNgD, queda pendiente para ser replicado y evaluado en modelos de inmunogenicidad y protección y es un potencial que no debe ser desperdiciado, sino por el contrario debe convertirse en una prioridad de trabajo.

Aunque no es una conclusión/recomendación derivada directamente de la tesis, es necesario trabajar en sistemas de protección de propiedad científica e intelectual que protejan los hallazgos de los procesos científicos de formación y que aseguren a los grupos de investigación la continuidad de los procesos y el mérito logrado.

A. Anexo A: Presentaciones en eventos

IV Simposio Nacional de Virología. Medellín, Noviembre 17-19 de 2011. Sede de Investigación Universitaria SIU

Hechos Microbiol. 2011;1(2 Suppl 1).

TL69. Caracterización biológica y molecular de aislamientos colombianos del herpesvirus bovino-1

Ruiz-Saenz J*, Jaime J*, Ramirez G*, Vera VJ*

INTRODUCCION. El herpesvirus bovino-1 (BHV-1), agente causante de graves pérdidas económicas, ha sido reportado en Colombia, desde los años setenta y aunque existe un plan de vacunación y prevención de la enfermedad, se sospecha que es uno de los principales limitantes de las explotaciones ganaderas del país.

OBJETIVO GENERAL. Caracterizar biológica y molecularmente 18 aislamientos del BHV-1, 10 de ellos obtenidos de tracto respiratorio y los 8 restantes de tracto reproductivo.

METODOLOGIA. Para la evaluación biológica se realizaron titulaciones en cultivo de células MDBK por las técnicas de Unidades Formadoras de Placa (PFU/mL) y Dosis Infecciosa (TCID₅₀), al igual que curvas de crecimiento en un solo paso y medición del tamaño de placa comparando con las cepas de referencia Iowa y Colorado-1. Para la evaluación molecular, se usó PCR, RFLP de genoma completo y Western Blot para epítopos inmunodominantes de glicoproteínas.

RESULTADOS. Se encontró que la mayoría de cepas presentaron un fenotipo de placa uniforme en un rango entre 1 y 2 mm de diámetro similar a las cepas de referencia; sin embargo, las cepas denominadas Cali 1 a 8 mostraron un reducido tamaño de placa (< 1 mm de diámetro). Al evaluar si existían diferencias en la infectividad *in vitro* por TCID₅₀ y PFU/mL comparado con los virus de referencia, se encontró que las cepas aisladas de las zonas de Córdoba y Medellín presentaron los mayores títulos (1x10⁸-8,25 TCID₅₀) mientras que los títulos más bajos (1x10³-3,75 TCID₅₀) se obtuvieron en la cepa Sabana-1. En PFU/mL, los virus de Medellín y Córdoba tuvieron títulos mayores a 10⁷ PFU/mL aunque no hubo completa correlación entre PFU y TCID₅₀. Los títulos para Iowa y Colorado-1 fueron similares a los de las cepas de Medellín y Córdoba. Para analizar las diferencias en replicación se realizó una curva de crecimiento usando un MOI de 10 y se titularon los sobrenadantes y las monocapas. Los aislamientos Córdoba 1 y 2 tuvieron características de crecimiento intra y extracelulares similares a la cepa de referencia altamente virulenta Iowa, mientras que las cepas Cali y Sabana tuvieron 3 logaritmos menos en producción tanto de virus intra como extracelulares. En la caracterización molecular por PCR se confirmó que todas las cepas son BHV-1 y por RFLP se evidenció que la mayoría de las cepas pertenecen al subtipo BHV-1.1 y solo una de ellas, la cepa Sabana-1 pertenece al subtipo BHV-1.2a. Por otro lado, no se encontraron diferencias en la expresión de los epítopos en las diferentes glicoproteínas de envoltura.

CONCLUSIONES. Algunos de los aislamientos colombianos del BHV-1 poseen características biológicas de cepas de alta virulencia, mientras que otras parecen estar naturalmente atenuadas, sin embargo, no existen características moleculares ni inmunogénicas que puedan explicar los perfiles de virulencia. Es necesario realizar estudios de patogenicidad *in vivo* para confirmar dichos perfiles y si se correlacionan con lo encontrado *in vitro*. Adicionalmente, algunas de estas cepas pueden ser útiles para el desarrollo de vacunas a partir de cepas nativas inactivadas o atenuadas.

PALABRAS CLAVES. Herpesvirus bovino. Aislamiento viral. Virulencia.

*Grupo de Microbiología y Epidemiología, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Colombia. Contacto: jruizsaenz@gmail.com

TL70. Análisis de la estructura poblacional del virus del mosaico de la caña de azúcar infectando maíz en Cosoleacaque-Veracruz

Giovanni Chaves-Bedoya*, Susana Ruiz†, Laura Silva†

INTRODUCCION. El análisis de la constitución genética de las poblaciones de los virus de plantas, puede proporcionar información que ayude a entender la estabilidad genética de la mayoría de virus de ARN que infectan plantas, a pesar de su alto potencial para variar. La comparación de secuencias de nucleótidos de aislamiento virales de diferentes orígenes geográficos, permite el análisis de la estructura genética de las especies virales vegetales y el estudio de la evolución molecular de los virus ayuda al entendimiento de características importantes de su biología, como cambio en la virulencia y rango geográfico, y su surgimiento como nuevas epidemias.

OBJETIVO GENERAL. Conocer la dinámica poblacional del virus del mosaico de la caña de azúcar infectando cultivos de maíz en una región productora en Cosoleacaque, Veracruz.

METODOLOGIA. Con hojas de maíz infectadas con SCMV se hicieron extracciones de ARN empleando trizol. Las muestras de ARN total fueron el templado para RT-PCR. El alineamiento múltiple de los nucleótidos y aminoácidos se hizo con ClustalX. Los árboles filogenéticos se reconstruyeron con PhyML. El análisis de recombinación se hizo empleando el algoritmo GARD.

RESULTADOS. El análisis GARD y árboles filogenéticos sugieren que en Cosoleacaque hay por lo menos tres grupos genéticos diferentes de SCMV incluyendo aislamientos recombinantes.

La diversidad de haplotipos y aislamientos de SCMV recombinantes encontrados, los altos valores de sustitución nucleotídica no sinónima y la diversidad nucleotídica encontrada, permiten proponer que Cosoleacaque es un lugar que alberga un enjambre genómico viral, sugiriendo la presencia de "quasiespecies" en SCMV, como se ha reportado para otros sistemas virales. Desde el punto de vista fitosanitario es preocupante la presencia de por lo menos 33 haplotipos diferentes de SCMV en una pequeña región, capaces de establecer infección en todos los genotipos de maíz que se siembran en la localidad, incluyendo material comercial que supone resistencia a SCMV.

CONCLUSIONES. Este estudio sugiere que en la región de Cosoleacaque, Veracruz, se presentan diferentes haplotipos de SCMV y puede ser una región de diversificación de SCMV en México. Las posibles causas de la alta incidencia de la infección viral y de la alta variabilidad podrían ser (1) Las variedades susceptibles de maíz, (2) Altas densidades de poblaciones de áfidos que transmiten SCMV, y (3) La presencia de reservorios de inóculos virales presentes cerca de las áreas de crecimiento de maíz. La poca restricción evolutiva que tiene el citrón P1 como lo indica la relación dN/ds puede deberse a su función biológica como determinantes de patogenicidad de hospedantes específicos. P1 apunta a ser un punto caliente de recombinación en SCMV, de la misma manera que lo es para el virus del mosaico del nabo.

PALABRAS CLAVES. SCMV. Maíz. Evolución. Recombinación.

*Laboratorio de Interacciones Planta-Virus, Departamento de Ingeniería Genética, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, CINVESTAV-Quintana Roo, México. †Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad de los Llanos, Villavicencio, Meta, Colombia. Contacto: gchaves@genetica.cinvestav.mx

Annual Meeting of the American Society for Virology – ASV, 2010.
Tuesday - July 20, 2010. Montana State University, Bozeman

ABSTRACTS

W31-10

GENETIC, ANTIGENIC DIVERSITY AND HISTO-BLOOD GROUP ANTIGEN INTERACTIONS OF RHESUS ENTERIC CALCIVIRUSES

Tibor Farkas^{1,2}, Edwin T. Hargitt III¹, Karol Sestak^{3,4},
¹Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, OH,
²University of Cincinnati College of Medicine, Cincinnati, OH, ³Tulane University School of Medicine, New Orleans, LA, ⁴Tulane National Primate Research Center, Covington, LA

Rhesus enteric caliciviruses (Recovirus) were detected in ~13 % of 500 randomly selected colony rhesus macaques and approximately 70% of the animals possessed virus-neutralizing (VN) antibodies against the prototype Tulane virus (TV). VN antibodies were also detected in other primate species, including humans, suggesting the possible zoonotic nature of recovirus infections. The 68 strains identified in this study could be classified into two genogroups and four genetic types, with 38%, 16%, 37%, and 9% of the isolates grouping to G1.1, G1.2, G1.3 and G2.1, respectively. To date, including TV, five G1.1 and one G1.2 strains have been tissue culture adapted. Hyperimmune sera generated against TV neutralized all G1.1 strains, but not the G1.2 strain. ABO typing of the 500 animals revealed a relatively homotypic population with 97%, 0.4%, and 2.6% being type B, AB, or O, respectively. The distribution of ABO types among the virus-positive animals was similar; 66/68 (98 %) type B and 2/68 (2%) type O. This and the presence of VN antibodies in different non-human primate species, including type A animals, indicates that all ABO types are susceptible to recovirus infection. Association of infectious status could not be established with any of the Lewis types tested (Lea, Leb, Lex, Ley). Using plaque reduction assays, replication of the G1.1 viruses could be blocked by type A (up to 95% inhibition) and type B (up to 90% inhibition) saliva samples, while replication of the G1.2 virus was blocked only by type B saliva samples (up to 100% inhibition). However, type O saliva samples did not have an effect on any of the isolates. More detailed evaluation of HBGA recognition of the different strains is ongoing. Based on their genetic and antigenic relatedness to noroviruses, their similar genetic and antigenic diversity, their HBGA usage and possible cross species transmission our goal is to develop the rhesus enteric calicivirus system into a tissue culture and non-human primate animal model for calicivirus gastroenteritis.

W31-11

DETECTION OF HUMAN HERPES VIRUS 6 (HHV6) IN PEDIATRIC LYMPHOMAS: IMPACT ON CLINICAL COURSE AND ASSOCIATION WITH CYTOMEGALOVIRUS INFECTION.

Samah Loutfy, Mohamed Fawzy, Mohamed El Wakil.
¹Cairo university, National cancer Institute, cancer biology Dept, virology&Immunology Unit, ²Cairo university, National cancer Institute, Pediatric oncology Dept, ³Beni-Suef University, Faculty of medicine, clinical oncology Dept

Background: Activation of HHV6 was seen in Hodgkin's and non-Hodgkin's Lymphoma (HL&NHL) as a result of lymphoma associated immunosuppression. Multiple evidences suggested the association between both HHV6 and CMV for development of CMV disease affecting the pathogenesis of lymphoma disease. So we aimed to investigate the frequency of HHV6 and its impact on clinical manifestations of lymphoma and its possible contribution with CMV for development of CMV infection. Methods: We investigated HHV6 DNA, CMV DNA in both WBC's and plasma by PCR assay from 50 patients diagnosed with HL or NHL. The level of CMV antibody titer was investigated in sera obtained from each patient. Twenty apparently healthy siblings served as a control group Results: Out of 50 patients with HL or NHL, 23/50 (46%) were found to be positive for herpes virus DNA (HHV6 or CMV) in cells or plasma by PCR assay, this was significantly higher than its presence in normal children 2/20 (10%). Ten out of these 23 (43%) were coinfecting with CMV. Eighty percent out of patients with CMV coinfection were among NHL cases. The presence of CMV coinfection was significantly associated with more frequent episodes of febrile neutropenia (median

3 episodes), absolute neutrophil count (<0.8), lymphocytes (<0.5), and low Hb conc (<9.1), (p<0.05). Conclusion: The presence of HHV6 could be considered as a predicting indicator of presumptive cellular immunosuppression preceding the onset of CMV coinfection which might result in a severe outcome among pediatric lymphoma patients.

Key words: HHV-6; CMV; Lymphoma; PCR

W31-12

IN VITRO CHARACTERIZATION OF FIELD ISOLATIONS OF BOVINE HERPESVIRUS-1

Julian Ruiz -Saenz, Jairo Jaime, Victor J. Vera.
Grupo de Microbiología y Epidemiología, Universidad Nacional de Colombia

BHV-1 is worldwide distributed as a major pathogen for cattle, and is the causal agent of a variety of clinical syndromes with high morbidity and low lethality rates. The aim of this study was to isolate and in vitro characterize BHV-1 from 29 immunosuppressed animals belonging to different Colombian geographical areas. It was possible to isolate 18 viruses from different animal each, most of them (10 viruses) from respiratory tract and eight from reproductive tract. In some cases the cytopathic effect (CPE) was visible at 6 – 12 hours post-inoculation, and became characteristic until 36-48 hours. Biological characteristic were evaluated and compared with Iowa and Colorado-1 reference strains. Plaque size were measured and we found that plaque size were uniform in a rank from 1-2 mm in diameter in almost all field isolates; however, plaque size in virus isolates named Cali 1-8 show to had strikingly reduced plaque size being < 1 mm in diameter. Both reference strains produced similar plaque size to the most of the field isolates. Virus titer was evaluated by TCID₅₀ and PFU/ml, trying to identify differences in virus infectivity compared with the reference strains. We found that so-called Cordoba and Medellin field isolates have the higher TCID₅₀ titers reaching 1 x 10^{4.25} infectious doses in the Cordoba-2 isolate, while the lowest TCID₅₀ titers were as low as 1 x 10^{3.75} infectious doses in the Sabana-1 isolate. Highly and mid pathogenic Iowa and Colorado-1 strains had a TCID₅₀ of 1x10^{7.37} and 1x10^{5.87} respectively. By PFU/ml, virus isolates from Medellin y Cordoba has the higher titer with more than 10⁷ PFU/ml, although there were not complete correlations between PFU and TCID₅₀ virus titer. The highest titer was 2,4 x 10⁸ PFU/ml for Medellin-2 isolate while the lowest was 650 PFU/ml for the Cali-6 isolate. The virus titer for Iowa and Colorado-1 strains was similar to the Medellin and Cordoba (1,86 x 10⁸ and 2,02 x 10⁷ PFU/ml respectively). To analyze differences in virus growth, a one step viral growth curve was performed using a M.O.I. of 10, virus yield in supernatant and intracellular virus in monolayers were measured. We could see that Iowa strain reach the highest titer, as it was expected due its highly pathogenic presentation. Field isolations called Cordoba 1 and 2 had similar intra and extracellular growth characteristic that highly pathogenic Iowa strain while Cali and Sabana isolation had 3 logarithms less intra and extracellular virus production. The set of our result indicates that there are differences between BHV-1 field isolations and some strains could be classified as highly pathogenic in vitro.

W32-1

CHARACTERIZATION OF THE ENVELOPE GLYCOPROTEINS OF VIRULENT AND AVIRULENT ARENAVIRUSES IN MEDIATING CELL ENTRY

Kumar Naveen, Wang Jialong, Ly Hinh, Liang Yuying.
Department of Pathology and Laboratory Medicine, Emory University School of Medicine, Atlanta, GA 30322, USA

Infection of guinea pigs with the P2 strain of the Pichinde arenavirus (PICV) results in a mild febrile reaction, but infection with the high-passaged P18 strain causes a severe disease with clinical and pathological features reminiscent of arenavirus-induced hemorrhagic fevers in humans. The envelope glycoproteins (GPC) of P2 and P18 viruses differ by three amino acids at positions 119, 140, and 164, all localized to the receptor binding GP1 subunit. We found that lentivirus-like particles

VII Encuentro Nacional de Investigación en Enfermedades Infecciosas. Asociación Colombiana de Infectología. Hotel Estelar, Paipa, Mayo 20 – 22 de 2010.

describir la infección en el ganglio del trigémino. **Materiales y métodos.** Se inocularon ratones ICR con HSV1 en el fondo vestibular de la mucosa oral tras escarificación. A los tres, cinco y siete días después de la infección, se disecaron los ganglios del trigémino y se evaluó la presencia del antígeno viral por inmunohistoquímica y ácidos nucleicos virales. Además, se cuantificó el título viral por reducción de placa. **Resultados.** A los tres días después de la infección, se encontraron antígeno, ADN y partículas virales infecciosas en el ganglio del trigémino. Al quinto día después de la infección, el antígeno viral se encontró en fibras nerviosas; igualmente, se encontraron ADN viral y partículas virales. A los siete días después de la infección hubo células similares a macrófagos positivas para el antígeno viral y menor cantidad de ADN viral, y no se detectaron partículas virales. Además, se pudo amplificar el transcrito asociado a latencia. No se encontró A22RNm viral. **Conclusiones.** Este modelo permitió evaluar por diversas técnicas la cinética de la infección por HSV1 y replicar la patogénesis de la misma cuando se inicia en la mucosa oral, con el fin de adelantar estudios sobre virología e inmunología.

MO-26 Caracterización *in vitro* de aislamientos colombianos del virus del herpes bovino-1

Julían Ruiz-Sáenz, Jairo Jaime, Víctor Vera
Grupo de Microbiología y Epidemiología, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C. julianruizsaenz@gmail.com

Introducción y Objetivos. El virus del herpes bovino-1 (BHV-1) afecta a los bovinos, provocando graves pérdidas económicas. El presente trabajo pretendió caracterizar *in vitro* y molecularmente aislamientos colombianos del BHV-1. **Materiales y métodos.** Los 18 aislamientos realizados en cinco zonas del país (Córdoba, Llanos Orientales, Bogotá, Antioquia y Valle del Cauca) y las dos cepas de referencia, fueron confirmados por PCR y titulados por dosis infecciosa (DICC₅₀) y unidades formadoras de placa (UFP). Finalmente, se realizaron curvas de crecimiento a partir de monocapas y sobrenadantes para caracterizar el crecimiento en células MDBK infectadas y se evaluó el fenotipo de placa por UFP. **Resultados.** Previa confirmación por PCR y usando la DICC₅₀ se encontraron títulos virales entre 1x10^{4.5} y 1x10^{4.25} DICC₅₀; los títulos más bajos fueron los de las cepas del Valle del Cauca y los más altos los de Córdoba. En las UFP los títulos estuvieron entre 650 y 2,4x10⁶ UFP/ml, y fue mayor el título para las cepas de Córdoba y Medellín y menor para las cepas del Valle del Cauca. Los títulos de las cepas de referencia Iowa (alta capacidad patógena) y la cepa Colorado (capacidad patógena media) fueron 1x10^{7.5} y 1x10^{6.7} DICC₅₀ y 1,86x10⁶ y 2,02x10⁷ UFP, respectivamente. Se encontró una diferencia importante en el fenotipo de placa entre los aislamientos del Valle del Cauca, y éstas fueron más pequeñas (<1 mm) Vs. los demás aislamientos y las cepas de referencia (1-2 mm). **Conclusiones.** Algunas cepas tienen comportamiento de cepas de alta capacidad patógena (Córdoba y Medellín), mientras que otras (Valle del Cauca) parecen estar naturalmente atenuadas o ser cepas de baja capacidad patógena. Estas cepas serán útiles para desarrollar vacunas con cepas nativas.

MP-43 Análisis descriptivo de los casos de influenza AH1N1 en una clínica universitaria de Bogotá

Patricia Reyes, Diana Constanza Bermúdez, Jorge Cortés
Clínica Universitaria Colombia, Bogotá, D.C.
jirafavelozmed@yahoo.com

Objetivo. Describir las características demográficas, clínicas y epidemiológicas de los pacientes con casos confirmados para el virus de influenza AH1N1, en una clínica de tercer nivel de Bogotá. **Materiales y métodos.** Se revisó la base de datos de los pacientes con infección respiratoria aguda que consultaron en el periodo comprendido entre el 27 de abril de 2009 y el 31 de enero de 2010. Se seleccionaron los casos con hisopado faríngeo positivo para virus AH1N1 por rRT-PCR. Las variables cualitativas se presentan en proporciones y las cuantitativas en promedios. **Resultados.** De 2.594 pacientes con criterios para infección respiratoria aguda, se procesaron 1.366 muestras, de las cuales, se recibió reporte en 33% (n=451). En total, 36 (8%) presentaron prueba positiva (rRT-PCR) para influenza AH1N1. De éstos, 66% eran mujeres; la mediana de edad fue de 30,6 años, con rango de un mes a 62 años. La duración promedio de los síntomas fue de 3,4 días, y los más frecuentes fueron: la tos (80%), la fiebre (61%) y el malestar general (30%). El 44% tenía, al menos, un factor de riesgo, y el más común fue ser trabajador de la salud (13,4%). La radiografía de tórax fue anormal en 79% de los casos y se documentó neumonía en 34,5%. Sólo 12,5% de los pacientes requirieron manejo en la unidad de cuidados intensivos. Se presentó un caso de mortalidad. **Conclusiones.** Las características demográficas y los síntomas reportados en esta serie coinciden con lo reportado en la literatura. Es llamativo que la radiografía tórax fue anormal en 79% de los casos, valor muy superior a lo reportado previamente.

MO-10 Genotipos del virus del papiloma humano en la papilomatosis respiratoria recurrente en Colombia

Gloria Sánchez, Gustavo Cuello, Roberto Jaramillo, Katherine Quintero, Adriana O'Byrne, Antonio Reyes, Consuelo Santamaría, Harold Cuello, Ana María Arrunátegui, Nubia Muñoz
Grupo Infección y Cáncer, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia; 2 Centro Médico Imbanaco, Cali, Colombia; 3 Departamento de Patología, Fundación Valle del Lili, Cali, Colombia; 4 Departamentos de Otorrinolaringología y Pediatría, Universidad del Valle, Cali, Colombia; 5 Laboratorio de Patología, Hospital Universitario del Valle, Cali, Colombia; 6 Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá Colombia. k.thy01@hotmail.com

Introducción y Objetivos. La papilomatosis respiratoria recurrente es una neoplasia benigna de la laringe asociada a la infección con virus del papiloma humano (VPH). En este estudio se estimó la prevalencia de los genotipos de VPH en los casos de papilomatosis respiratoria recurrente de Cali y Medellín. **Materiales y métodos.** De los laboratorios de patología de Cali y Medellín se recolectaron los bloques de parafina de los casos de papilomatosis respiratoria recurrente diagnosticados entre 1985 y 2009. Se hicieron cinco cortes de cada bloque. El primero y el último se usaron para tinción con hematoxilina eosina y los tres restantes, para disecar la lesión y extraer el ADN. El VPH se determinó mediante la prueba de SPF 10 LiPA y la calidad del ADN, amplificando un segmento de 209 pb de betaglobina. **Resultados.** Se identificaron 358 registros de papilomatosis respiratoria recurrente y se encontraron 140 bloques primarios. Un caso no presentaba ninguna lesión y nueve fueron negativos para betaglobina. La edad media de los 130 casos incluidos fue de 33 años; 46,2% eran mayores de 17 años en el momento del diagnóstico y 60% eran hombres. El 94,6% fueron positivos para VPH. El VPH6 y VPH11 se detectaron en 67,7% y 26,9% de los casos, respectivamente, y en nueve casos (6,9%) se detectó VPH16. En siete casos se detectó VPH 11/6 y VPH 16/6; en tres casos se encontraron simultáneamente VPH 6/52 y VPH 6/54. **Conclusiones.** El VPH6 y el VPH11 se encontraron en 95% de los casos de papilomatosis respiratoria recurrente en Colombia. Una vacuna profiláctica contra estos genotipos tendría un gran impacto en la incidencia de esta enfermedad.

Congreso Colombiano de Microbiología Clínica, Industrial, Ambiental y Bioanálisis. Hotel Intercontinental, Medellín, Abril 28-30 de 2010

Hechos Microbiol. 2010; 1(1 Suppl 1).

VE-3. Uso de cepas nativas en el desarrollo de vacunas para bovinos

Julián Ruiz-Sáenz*, Jairo Jaime*, Víctor J. Vera*

La producción de ganado, tanto para carne como para lácteos, en Colombia es uno de los principales renglones de la economía agropecuaria nacional; representando el 53% del total de producción pecuaria nacional, con un inventario Bovino de 23.500.000 cabezas las cuales ubican a Colombia en el tercer puesto en número de animales en América Latina. Sin embargo, los indicadores de sanidad no son tan alentadores como quisiéramos. Existe en nuestro país una amplia diversidad de enfermedades virales que afectan la población bovina y aunque existen algunos planes de control y vacunación, estos no abarcan la totalidad de agentes presentes, ni están correctamente enfocados para la epidemiología de cada uno de ellos. Adicionalmente, desconocemos en gran magnitud las cepas de la mayoría de agentes virales que circulan en Colombia, hecho que nos lleva a vacunar con las cepas extranjeras o cepas de referencia que nos ofrecen las casas comerciales, las cuales no sabemos si son útiles para proteger contra las cepas locales o si son suficientemente inmunogénicas para prevenir o controlar la presentación de enfermedad en nuestro país.

Dos de las principales enfermedades virales que afectan la población ganadera nacional son la Rinotraqueitis infecciosa bovina causada por el herpesvirus bovino-1 y la diarrea viral bovina causada por un flavivirus, que lleva el mismo nombre. Las dos enfermedades ocasionan graves pérdidas económicas debidas principalmente a abortos, muertes embrionarias tempranas, entre otras, manejándose las dos como un complejo reproductivo junto a algunos agentes bacterianos. Existen múltiples alternativas vacunales para la prevención de estos; sin embargo, hasta la fecha, no se ha realizado ninguna evaluación real de la eficacia para proteger o controlar contra las cepas circulantes; con el agravante que no existen vacunas monovalentes sino que, por el contrario, hay una tendencia a usar vacunas polivalentes con múltiple cantidad de agentes tanto virales como bacterianos, algunos incluso con más de 10 antígenos simultáneamente.

Ante esta problemática, la cual es común a otros países del continente como Brasil y Argentina, distintos grupos de investigación en sanidad animal se han encaminado a la tarea de aislar y caracterizar las cepas actuantes en cada país, para generar, a partir de éstas, biológicos que sean óptimos para cada uno. En Colombia, nuestro grupo de investigación ha logrado el aislamiento y caracterización *in vitro* de múltiples cepas del herpesvirus bovino-1 y está trabajando en el aislamiento de cepas del virus de la diarrea viral bovina, para generar, a partir de estas cepas, vacunas nacionales que sean un referente de las cepas circulantes y que sean óptimas para las condiciones nacionales. Adicionalmente, se han desarrollado algunos estudios preliminares de evaluación de biológicos los comerciales, los cuales han demostrado que éstos no son lo suficientemente inmunogénicos para evitar la presentación de la infección en nuestro medio.

*Grupo de Microbiología y Epidemiología, Universidad Nacional de Colombia, Colombia.

VE-4. Importancia de la microbiología veterinaria, aplicaciones y perspectivas

Lina A. Gutiérrez-Builes*

La Microbiología Veterinaria es un área de la Microbiología concebida para estudiar particularmente a los microorganismos, procariotes, eucariotes y virus, involucrados como agentes causales de enfermedades de diversas especies de animales, y tiene como énfasis especial el análisis de la estructura microbiana, fisiología, patogenicidad, diversidad genética y ecológica de los microorganismos, así como la implementación de metodologías para su aislamiento, identificación y control. Colombia se caracteriza por presentar una actividad pecuaria que impulsa de forma significativa la economía del país, lo que ha hecho indispensable la implementación y el sostenimiento de estrategias sólidas para garantizar la estructura sanitaria en las regiones productoras. En el país se han identificado diferentes enfermedades, cuyo agente etiológico es, en su mayoría, de origen viral o bacteriano, que han cobrado importancia en el ámbito nacional y que afectan a muchas especies animales, entre las que se encuentran bovinos, equinos, porcinos, aves y especies acuícolas, entre otras. Las acciones de erradicación dirigidas sobre enfermedades como la tuberculosis bovina, leptospirosis y brucelosis, revisten especial importancia por sus características de zoonosis, lo que ha justificado aún más su estudio, vigilancia epidemiológica y el direccionamiento de políticas sanitarias que propenden por su control. En este sentido, la Microbiología Veterinaria plantea un primer reto para los profesionales de la Microbiología de nuestro país, consistente en la ampliación del conocimiento de las enfermedades infectocontagiosas de importancia médica veterinaria y la participación activa en espacios interdisciplinarios con los profesionales del sector pecuario, que le permita a Colombia seguir los lineamientos de la OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal), el fortalecimiento de las medidas de control en cada uno de los casos y prevenir el impacto zoonótico de estas enfermedades en nuestra sociedad. Finalmente y no menos significativo, es el segundo reto que impone actualmente la Microbiología Veterinaria para el profesional de la Microbiología: el estudio de la microbiota no patógena propia de los animales. Los resultados de investigaciones científicas realizadas en esta área han sugerido el potencial que presentan desde el punto de vista ecológico, industrial y biotecnológico, diferentes microorganismos que conforman los consorcios microbianos establecidos en ecosistemas como el ruminal e intestinal de diversos animales. En la actualidad es de especial interés el estudio de aspectos que permitan optimizar la producción de carne y leche derivada de animales rumiantes, tales como los bovinos, proceso en el cual está demostrada la participación activa y significativa de la microbiota ruminal. Sin embargo, se estima que la diversidad de microorganismos presentes en el ecosistema ruminal es mayor a la descrita hasta el momento, y por lo tanto su potencial está aún subvalorado. A este respecto, es necesario resaltar que será una tarea prioritaria del microbiólogo la implementación de las metodologías necesarias para lograr las condiciones óptimas que permitan el estudio de estos microorganismos, para lograr el aprovechamiento adecuado de su potencial biotecnológico.

*PhD, Docente de la Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Colombia.

EMBO World lecture course: VIRUS-HOST partners in Pathogenicity. Universidad de Costa Rica, San José Costa Rica, Febrero 23 – 26, 2010.



Virus-Host: Partners in Pathogenicity

Enzootic Bovine herpesvirus-1 and Equine herpesvirus 1 / 4 in Colombia

Julián Ruiz- Sáenz. julianruizaenz@gmail.com

Universidad Nacional de Colombia, Bogota Colombia.

Bovine herpesvirus-1 (BHV-1) and *Equine herpesvirus 1 and 4* (EHV-1/4) are world wide spread viruses that cause significant economic losses. BHV-1 has been reported in Colombia since 70's as the main abortion cause in Colombian cattle; different serological studies had been done, but there is no present confirmation of the serological status of cattle populations. Otherwise, EHV-1/4 was first reported in 2001, but no serological or molecular studies had been performed to establish the presence of these viruses in equine populations. Using viral neutralization test, we showed that prevalence for BHV-1 by herd was 100% and the prevalence by individuals was 75.63% in a rank of 69.84% to 85.51% in dependence of the area. For EHV-1, using indirect ELISA we found a prevalence ranking from 1,92% to 33.3% in horses depending of risk factors such as expositions and shows. To EHV-4 the prevalence was 97,8% and there was no difference between age and sex of the animals. Taking in mind that this viruses establish long life latency in the host; we evaluated the presence of reservoirs host in different horses and Bovine's populations. For BHV-1, using viral isolation and PCR confirmation, we obtain 13 viruses from seropositive animals (as bulls as cows) under immunosuppressive treatment confirming the presence of reservoirs in bovine populations. For EHV 1/4, we performed PCR and sequencing confirmation from PBMCs and trigeminal ganglions from seropositive animals, confirming the presence of viral genome in samples indicating the latency state and the reservoir host. The high serological prevalence of these diseases in unvaccinated animal populations and the presence of viral latency indicate that there is an enzootic infection, and control measures must be design to establish a stable balance between viral infection, and reactivations to try to diminish the economic losses due to those diseases.



Microbiología e inmunología

Adaptación de células madre mesenquimales caninas a medios de cultivo suplementados con suero autólogo

Adjustment of mesenchymal stem cells from canine to culture media supplement with autologous serum

Nancy Bibiana Riaño Gutiérrez, Bact Lab Clin MSc; Víctor Julio Vera Alfonso, MV MSc PhD

Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia. nbrianog@gmail.com

Células madre mesenquimales obtenidas a partir de tejido adiposo canino (ad-MSCs) previamente caracterizadas bajo criterios morfológicos, celulares y moleculares, se adaptaron a medios de cultivo sin suero fetal bovino (SFB), el cual es un suplemento necesario en cultivos celulares, que contribuye al crecimiento y proliferación celular. El SFB tiene inconvenientes relacionados con el trasplante de células a un organismo vivo, como la posibilidad de generar efectos secundarios relacionados con posibles contaminaciones (priones, virus, agentes zoonóticos), reacciones inmunológicas contra antígenos xenogénicos bovinos, y presentar variaciones de sus propiedades nutricionales y mitogénicas en los diferentes lotes de producción. El suero sanguíneo proveniente del mismo individuo o autólogo (SA) posee componentes que favorecen el crecimiento y la proliferación celular. Su uso como sustituto en cultivos celulares permitiera la aplicación de ad-MSCs en un organismo vivo. En el presente trabajo se cultivaron ad-MSCs de caninos, en medios de cultivo con SFB, que luego fue reemplazado con SA, como sustituto nutricional, hasta obtener cultivos suplementados únicamente con SA. Las células adaptadas tuvieron recuentos inferiores comparativamente con los cultivos mantenidos con SFB. Sin embargo, las ad-MSC cultivadas con 10% de SA, proliferaron y mantuvieron una viabilidad celular aceptable (96% de viabilidad).

Palabras clave: células madre mesenquimales, curva de crecimiento, suero sanguíneo, suero fetal bovino.

Key words: blood serum, fetal bovine serum, growth curve, mesenchymal stem cell.

Adecuación de metodologías moleculares para la diferenciación de cepas vacunales y de campo en micoplasmosis aviar

Adjustment of molecular methodologies for the differentiation of vaccination strain and field in avian micoplasmosis

Luis José Carrión G, MV (c)MSc; Víctor Julio Vera A, DMV MSc PhD; Jairo Jaime C, MV MSc PhD

Grupo de investigación en Microbiología y Epidemiología, Posgrado en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional de Colombia, luizcarrion@yahoo.es, vjveraa@unal.edu.co

El *Mycoplasma gallisepticum* (Mg), afecta de forma drástica el sector avícola, por disminuir los parámetros productivos, con considerables pérdidas económicas. La presencia de la micoplasmosis aviar, pone en riesgo la supervivencia de la avicultura industrial y su efectivo control y/o erradicación, conlleva una alta inversión y el uso de adecuadas pruebas diagnósticas para su detección. Frente a las tradicionales técnicas serológicas y de aislamiento microbiológico, emergen las pruebas de carácter molecular, que mejoran la especificidad y sensibilidad de las anteriores. En la actualidad no existe un método molecular definitivo de caracterización de cepas de *M. gallisepticum*, que permita diferenciar cepas de campo vacunales. En el presente estudio se evaluó la prueba de PCR-RFLP empleando como sustrato de amplificación el gen de la lipoproteína Lp, del *M. gallisepticum*. Para lo anterior, se obtuvieron cepas de *M. gallisepticum* a partir de muestras (hisopos traqueales) de granjas con antecedentes de la presencia del agente y de vacunas comerciales correspondientes a las cepas f y Ts-11; se hizo extracción del ADN empleando el método de Moscoso (1993) y se amplificó el gen de interés a partir del empleo de primers seleccionados de acuerdo a una región conservada en el gen de elección que permitía la amplificación de un producto de 455 pb. Los productos del PCR fueron sometidos a proceso de restricción con la enzima TaqI. Para la cepa f, se obtuvieron fragmentos de 341 y 114 pb; para la cepa Ts-11, 3 fragmentos: 135, 217 y 103 pb y para las cepas de campo, fragmentos de 341 y 114 pb. Los resultados anteriores permiten establecer que en los sitios de toma de muestras de campo puede estar actuando una cepa f, que es la cepa vacunal con reversión de su patogenicidad o una cepa de campo aún no reportada, lo cual debe ser comprobado por secuenciación de los segmentos amplificados. Se espera al futuro incluir otros genes (GapA, Mge2 y PvpA) para tener mayor certeza en la identificación de las cepas vacunales y de campo.

Palabras clave: enzima TaqI, gen Lp, PCR, RFLP.

Key words: Lp gene, PCR, RFLP, TaqI enzyme.

Aislamiento y caracterización del herpesvirus bovino-1 (BHV-1) en hatos de Antioquia y el Valle del Cauca

Bovine herpesvirus-1 (BHV-1) isolation and characterization in herds from Antioquia and Valle del Cauca

Julián Ruiz Sáenz, MV MSc (c)PhD; Jairo Jaime C, MV MSc PhD; Víctor J Vera, MV MSc PhD.

Grupo de Investigación en Microbiología y Epidemiología, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.

El herpesvirus bovino-1 es un virus de genoma DNA perteneciente a la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alfaherpesvirinae*, el cual afecta al bovino, en el que provoca un amplio espectro de manifestaciones clínicas, acarreado graves pérdidas económicas. En nuestro país, ha sido reportado desde los años 70's y aunque existe un plan de vacunación y prevención de la enfermedad, se sospecha que es uno de las principales limitantes de las explotaciones ganaderas. El objetivo del presente trabajo fue realizar aislamientos y caracterización *in vitro* del BHV-1 en dos sistemas de producción ganadera de leche y carne. Para ello, previo conocimiento del estatus serológico de los hatos, se escogió a los animales que tuvieran los mayores títulos seroneutralizantes, los cuales fueron sometidos a inmunosupresión terapéutica con dexametasona. Se inmunosuprimieron 15 animales del valle y 9 de Antioquia a los cuales se le tomó muestra respiratoria, ocular y reproductiva, para un total de 72 muestras, las cuales se llevaron a cultivo celular. Se logró aislar virus de los tres tipos de muestras; siendo posible recuperar virus tanto de toros como de vacas inmunosuprimidas. Se recuperaron un total de 13 cepas virales, 8 de ellas pertenecientes al departamento del valle y las 5 restantes al de Antioquia. De las cepas aisladas, 5 fueron recuperadas de tracto reproductivo y las restantes fueron recuperadas de tracto respiratorio (ocular y nasal). Los aislamientos se confirmaron utilizando PCR. Se titularon las cepas utilizando las técnicas de DICC_{50%} y de Unidades Formadoras de Placa (PFU), encontrando títulos virales entre $1 \times 10^{4.5}$ y $1 \times 10^{8.13}$ DICC_{50%}, con un promedio de $1 \times 10^{5.84}$ DICC_{50%}; y entre 650 y 2.4×10^8 PFU/ml, presentando una marcada diferencia en el fenotipo de placa en los aislamientos de Cali siendo estas más pequeñas (<1 mm) vs los demás aislamientos y las cepas de referencia (1-3 mm). Actualmente se está realizando la caracterización molecular de las diferentes cepas a fin de esclarecer el subtipo viral circulante. Los resultados confirman que el BHV-1 es uno de los agentes de mayor difusión en diferentes ámbitos ganaderos, y que ante una reactivación el virus puede excretarse tanto por vía respiratoria como reproductiva.

Palabras clave: *corticoides, ganadería, latencia, rinotraqueítis, virus.*
Key words: *corticoids, latency, livestock, rhinotracheitis, virus.*

Búsqueda de evidencia serológica y genética de agentes emergentes y re-emergentes en humanos y roedores urbanos y rurales en Antioquia, Colombia

Search for serological and genetic evidence of emergent and re-emergent agents in humans and urban and rural rodents in Antioquia, Colombia

Piedad Agudelo¹, Biol PhD; Andrés Londoño², MV (c)MSc; Victor H Quiroz³, MV (c)MSc; Javier Díaz³, MD PhD; Margarita Arboleda¹, MD Esp; Nataly Moreno¹, MD (c)MSc; Juan D Rodas³, MV PhD.

¹Instituto Colombiano de Medicina Tropical - CES.

²Grupo de Investigación en Ciencias Veterinarias, Centauro, Universidad de Antioquia.

³Grupo de Immunovirología, Universidad de Antioquia.

La Leptospirosis y los robovirus (virus transmitidos por roedores), son zoonosis de distribución mundial. Para los seres humanos en zonas rurales y urbanas, los roedores son los principales reservorios de la infección. Este estudio pretende determinar la frecuencias de infección con *Leptospira spp* y robovirus en muestras de roedores: domésticos y silvestres; y muestras humanas, de áreas urbanas y rurales de tres municipios del Urabá Antioqueño por medio de técnicas serológicas y moleculares. Se capturaron y muestrearon sangre y tejidos de un total de 354 roedores, entre *Rattus rattus* (Rr, 124), *Rattus norvegicus* (Rn, 24), *Mus musculus* (Mm, 71), *Zygodontomys sp* (Zyg, 109), *Proechimys sp* (Pro, 22), *Heteromys sp* (Het, 4), *Didelphis marsupiales* (Dm, 1) y *Sylvilagus brasiliensis* (Sb, 1). Simultáneamente se captaron 221 muestras, de suero sanguíneo de humanos febriles en fase aguda y en

fase convaleciente, negativos a la prueba de malana por gota gruesa. Las pruebas de laboratorio empleadas fueron, inmunofluorescencia indirecta (IFI), microaglutinación (MAT), ELISA, cultivo de riñón macerado en medio Fletcher, PCR y RT-PCR. Hasta la fecha hemos determinado un total de 23 cultivos positivos y 28 sospechosos para *Leptospira*. Todos, están siendo sometidos a extracción de DNA para confirmar por PCR. Adicionalmente 100 del total de las muestras humanas han sido probadas por IFI, de las cuales 12 son positivas para inmunoglobulinas G (IgG) y 15 son positivas para inmunoglobulinas M (IgM). 13% (14/109) de los roedores *Zygodontomys sp* resultaron positivos a una ELISA para virus Sin Nombre (VSN) y corroborados por un ELISA para virus Maciel (MacV) y los 71 *Mm* resultaron negativos para la presencia de anticuerpos contra el virus de la Coriomeningitis Linfocítica (LCMV). 11 de los 14 (79%) *Zygodontomys* seropositivos, fueron también positivos por RT-PCR a hantavirus en pulmón, y estas muestras están siendo secuenciadas con el fin de identificar los agentes. Aún debemos probar sueros de pacientes humanos para MacV, y sueros y tejidos de roedores silvestres para ELISA y RT-PCR respectivamente de arenavirus del nuevo mundo (virus Junin, JV). Hasta donde sabemos, estos resultados podrían representar la primera evidencia genética de Hantavirus en roedores de Colombia.

Palabras clave: *Leptospirosis, Arenavirus, Hantavirus, Sigmodontinos, Rattus spp.*

Caracterización microbiológica en poblaciones del caracol *Helix aspersa* del oriente Antioqueño

*Microbial characterization in snail populations *Helix aspersa* from eastern Antioquia*

Laura Patricia López Isaza, Micro Bioan; Erika Valencia Mejía, Micro Bioan; Juan Pablo Niño García, Microb MSc; Luz Elena Velásquez Trujillo, Biol MSc

Grupo de Microbiología Ambiental, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia. mjuanp@udea.edu.co

La situación demográfica y económica latinoamericana demanda alimentos alternativos como fuentes proteicas animales de bajo costo. La helicultura es una excelente alternativa, ya que genera una buena fuente de proteína, que además puede aprovecharse para la producción de baba de caracol y productos asociados; esta industria utiliza principalmente el caracol *Helix aspersa*. Se ha especulado sobre la influencia negativa de las bacterias en la supervivencia de estos caracoles. Sin embargo, gran variedad de microorganismos pueden encontrarse asociados jugando un papel fundamental en la digestión y en la protección que brinda la microbiota normal a sus hospederos. Es fundamental establecer la variabilidad de la microbiota asociada a animales enfermos y sanos en diferentes helicultivos para la comprensión del efecto de los microorganismos en la producción helícola en Colombia. El objetivo del trabajo es caracterizar la microbiota bacteriana asociada a *Helix aspersa*, en seis helicultivos del oriente antioqueño, utilizando métodos de recuento y electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (PCR-DGGE). Se han muestreado cuatro helicultivos; se aplicó una encuesta para establecer las condiciones ambientales y de manejo. Se recolectaron 16 caracoles en cada finca. Tras disección, tanto en la muestra interna como en la superficial se cuantificaron las poblaciones bacterianas mediante Número Más Probable de mesófilos aerobios, *Pseudomonas* y coliformes, y se identificaron los morfotipos utilizando el sistema Vitek 2 (Biomérieux). La composición de la comunidad bacteriana y su variabilidad se analizará a partir de los perfiles de PCR-DGGE. Resultados parciales: el 90% de las bacterias son bacilos gram negativos, sin embargo se observó una gran variabilidad en las especies presentes en los diferentes helicultivos. Los recuentos por NMP han sido consistentemente mayores en los caracoles enfermos y existe una relación cualitativa entre las condiciones de manejo de los helicultivos y la distribución de las dichas bacterias.

de los perfiles de diversidad filogenética de los trabajos, considerando las diferencias y similitudes existentes entre los heliocultivos, utilizando técnicas de análisis multivariante a partir de los resultados obtenidos e identificar factores de riesgo a partir de los patrones de distribución de bacterias y las condiciones de manejo de los heliocultivos.

Palabras clave: comunidades y poblaciones bacterianas, heliocultura, PCR-DGGE, variabilidad espacial.

Key words: helioculture, bacterial communities and populations, PCR-DGGE, spatial variability

Caracterización molecular de tres cepas de campo del virus de la enfermedad infecciosa de la bursa¹

Molecular characterization of three field strains of infectious bursal disease virus

Javier Andrés Jaimes Olaya^{1,2}, MV MSc; Diana Claudia Álvarez Espejo^{3,4}, MV (c)MSc; Jairo Jaime Correa^{1,2}, MV MSc PhD; Víctor Julio Vera Alfonso^{1,2}, DMV MSc PhD.

¹División de Investigación Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, Proyecto número 8010025.

²Grupo de Microbiología y Epidemiología, Universidad Nacional de Colombia.

³Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de La Salle. Coordinador, Programa BIOFARMA, Instituto La Salle de Investigaciones Avanzadas. jajaimeso@lasalle.edu.co

⁴Laboratorio de Medicina Aviar, Laboratorio Nacional de Diagnóstico Veterinario (CEISA), Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). diana.alvarez@ica.gov.co

⁵Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia. jjaimec@unal.edu.co, vjveraa@unal.edu.co

El virus de la enfermedad de infecciosa de la bursa (IBDV) es el agente infeccioso causal de una patología inmunosupresiva severa en aves comerciales, conocida como enfermedad infecciosa de la bursa o enfermedad de Gumboro. EL IBDV es un virus icosaédrico cubierto, con genoma ARN de doble banda, perteneciente a la familia *Birnaviridae* y al género *Avibirnavirus*. En Colombia esta enfermedad se encuentra ampliamente distribuida y es causante grandes pérdidas económicas en las explotaciones avícolas. Durante el desarrollo de un estudio retrospectivo se obtuvieron tres muestras sospechosas al IBDV, las cuales se evaluaron mediante la técnica de RT-PCR para la detección del virus. Se encontró positividad en las tres muestras analizadas, por lo que se realizó secuenciación de nucleótidos del segmento VP2 hipervariable del genoma del virus y su posterior alineamiento y análisis filogenético. Se encontró alta similitud genética de dos de las cepas analizadas (Colombia08Unal01 y Colombia08Unal03), con cepas vacunales utilizadas en Colombia (Lukert y Winterfield 2512). Sin embargo, estas provienen de granjas con historia de enfermedad de forma endémica. En el caso de la tercera cepa (Colombia08Unal02), esta presentó alta similitud con otras cepas de campo reportadas en Colombia en el año 2008, las cuales se agrupan dentro de las llamadas cepas muy virulentas. No obstante, no se reporta el cuadro típico de enfermedad producida por las cepas de este grupo, lo cual podría ser indicativo de que los factores de virulencia del virus, no solo se encuentran asociados a la proteína VP2. Los hallazgos encontrados demuestran que el IBDV continúa circulando en las explotaciones avícolas, a pesar del uso de vacunas para prevenir la patología. Por otro, el hecho de que cepas vacunales se encuentren en recirculación en granjas con historia de enfermedad, podría ser un indicativo de reversión de patogenidad por parte la cepa vacunal.

Palabras clave: cepa de campo, cepa vacunal, IBDV, secuenciación de nucleótidos.

Key words: field strain, IBDV, nucleotide sequence, vaccine strain.

de los rumiantes

Composition of anaerobic fungi in the ruminant digestive tract

Hugo Rodolfo Jiménez Sabogal¹, Biol PhD; Joan Elizabeth Edwards², BSc Bioch PhD; Neil Ross McEwan², BSc Gen PhD; Mike Theodorou², BSc Bioch PhD.

¹Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA), Bogotá, Colombia.

²Institute of Grassland and Environmental Research (IBERS), Aberystwyth University, UK

Los hongos anaerobios (*Neocallimastigales*) pueden ser aislados a partir de muestras de digesta y de heces (frescas y/o secas al ambiente) obtenidas a lo largo del tracto gastrointestinal del rumiante, excepto en muestras secas al ambiente del contenido ruminal. A partir de estos hallazgos se sugirió que las poblaciones de hongos encontradas en el rumen podrían diferir de aquellas encontradas en la parte baja del tracto gastrointestinal. Debido a que la información que se dispone acerca de este aspecto es limitada, el propósito de este trabajo fue comparar las poblaciones de hongos anaerobios a lo largo del tracto gastrointestinal utilizando muestras de digesta y heces obtenidas del rumen, duodeno y heces frescas. Las muestras fueron higiénicamente colectadas durante 3 días consecutivos de una vaca que poseía una fistula ruminal y duodenal. Este animal fue alimentado con heno de cebada, un suplemento mineral y agua a voluntad. Las muestras se secaron al ambiente (25 °C) por 8 días y a partir del material seco, se realizó una extracción de ADN. La composición de las poblaciones de hongos se determinó utilizando un análisis de la región intergénica del gen ribosomal denominada *Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis* (ARISA). Los resultados obtenidos del análisis ARISA fueron directamente comparados usando un análisis de cluster (*Pearson algorithms*). Los resultados del análisis de cluster mostraron que la composición de las poblaciones de hongos anaerobios fue consistente entre los segmentos del tracto gastrointestinal (86 %). Aunque, el análisis muestra que los perfiles de ARISA para el rumen y heces fueron más similares en comparación con el duodeno. Estos resultados sugieren que la composición de las poblaciones de hongos anaerobios es similar en el tracto. Por consiguiente se hipotetiza, que las diferencias en la habilidad de los hongos para sobrevivir en las heces secas pero no en el contenido ruminal seco; se deben a diferencias en la fisiología del hongo y no a diferencias en la composición de las poblaciones de estos en ambos segmentos del tracto gastrointestinal.

Palabras clave: ARISA, hongos anaerobios.

Key words: anaerobic fungi, ARISA.

Desarrollo de un poxvirus recombinante que expresa la glicoproteína D del Herpesvirus bovino-1

Development of a recombinant Poxvirus expressing Bovine herpesvirus-1 glycoprotein D

Julián Ruiz Sáenz¹, MV MSc (c)PhD; Víctor J Vera¹, MV MSc PhD; Jorge E Osoño², MV MSc PhD

¹Grupo de Investigación en Microbiología y Epidemiología, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. juliannruizsaenz@gmail.com.

²Department of Pathobiological Sciences, School of Veterinary Medicine, University of Wisconsin-Madison.

El herpesvirus bovino-1 es un virus de genoma DNA perteneciente a la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alfaherpesvirinae*, el cual afecta al bovino, en el que provoca un amplio espectro de manifestaciones

clínicas, acarreado graves pérdidas económicas. El principal componente inmunogénico de su envoltura es la glicoproteína D (gD), la cual ha sido caracterizada y utilizada como inmunógeno en distintos sistemas de expresión. Diferentes estudios han demostrado la eficacia de los vectores poxvirales como un sistema eficiente para inmunizar animales contra diferentes antígenos. El objetivo de este trabajo es generar un poxvirus (Raccoonpox [RCN]) que exprese una versión truncada de la gD del BHV-1 para ser usado como inmunógeno. Para ello, con ayuda de cebadores específicos se amplificó el gen que codifica para la versión truncada de la gD la cual no posee el dominio de anclaje de membrana (1.089 pares de bases), el cual posteriormente se clonó usando las enzimas EcoRI y BamHI en el plásmido de transferencia pTK/IRES/tpa que posee sitios de homología a la timidina kinasa del poxvirus, un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) y una señal secretoria (tPA), generando el constructo pTK/gD/IRES/tpa. Para generar el RCN recombinante, se tomaron células de riñón de mono verde africano BSC-1, se infectaron con una cepa Silvestre del RCN (CDC/V71-I-85A) a un Índice de Multiplicidad de Infección (MOI) de 0,05, y se incubaron a 37°C por 90 minutos; luego, las células fueron transfectadas con el constructo pTK/gD/IRES/tpa usando el sistema de transfección FuGENE 6®; generándose a través del sistema celular de recombinación de homólogos diferentes poblaciones virales con y sin el gen de interés. Para seleccionar los virus recombinantes que expresaban el gen de interés, se realizó una selección de recombinantes negativos para timidina kinasa y positivos para la gD por tres rondas de purificación de placas en monocapas de células RAT-2 las cuales son mutantes para timidina kinasa y en presencia de bromodeoxiuridina. Los virus recombinantes se confirmaron por PCR y secuenciación de nucleótidos y se denominaron RCN-gD. Actualmente nos encontramos en proceso de evaluar la expresión e inmunogenicidad de la gD del RCN-gD.

Palabras clave: clonación, ganadería, rinotraqueítis, virus.
Key words: cattle, cloning, rhinotracheitis, virus.

Descripción epidemiológica de la infección con agentes del género rickettsia en roedores, ectoparásitos y humanos en el Urabá antioqueño

Epidemiological description of infection with agents of the rickettsia genus in rodents, ectoparasites and humans in Urabá antioqueño.

Juan Carlos Quintero¹, MV Zoot; Andrés F Londoño¹, MV; Víctor H Quiroz¹, MV; Francisco Javier Díaz², MD PhD; Piedad Agudelo³, Biol PhD; Margarita Arboleda³, MD; Juan David Rodas¹, MV PhD.

¹Grupo de Investigación en Ciencias Veterinarias, Centauro, Universidad de Antioquia.

²Grupo de Inmunovirología, Universidad de Antioquia.

³Instituto Colombiano de Medicina Tropical – CÉS.

Las Rickettsia son un género de bacterias mejor conocidas por ser transmitidas por ectoparásitos hematófagos. En Colombia las Rickettsiosis se han estudiado poco, el primer reporte data de la década de los 30, encontrándose una enfermedad febril con brote eruptivo en piel, en la población de Tobía Cundinamarca. Los últimos brotes fueron diagnosticados en los municipios de Necoclí (Antioquia), Los Córdoba (Córdoba) y Turbo (Antioquia), en los años 2006, 2007 y 2008 respectivamente. Este proyecto es un estudio descriptivo mixto, que tiene como objetivo general realizar una descripción eco-epidemiológica de la infección con *Rickettsia* en roedores, ectoparásitos y humanos en el Urabá. Los muestreos fueron realizados en los municipios de Apartadó, Turbo y Necoclí, donde se capturaron 355 roedores y fueron colectados ectoparásitos en 108 de ellos. Se obtuvieron además, 220 muestras dobles (fase aguda y convaleciente), de sangre de pacientes humanos con síntomas febriles, negativos a gota gruesa por malaria. La muestras de laboratorio fueron procesadas en el laboratorio CENTAURO/Grica de la SIU (Universidad de Antioquia) y en el Instituto Nacional de Salud (INS). Se utilizaron pruebas inmunológicas (IFI) y

moleculares (PCR), para detectar la reactividad a la infección bacteriana y amplificar secuencias genéticas específicas de género y de rickettsias patógenas, a partir de muestras de sangre sin anticoagulante y tejidos macerados de humanos y roedores o ectoparásitos respectivamente. De los DNA de 142 roedores probados hasta la fecha, hemos obtenido 16 positivos para el gen *gltA* (Citrato Sintetasa) género específico para *Rickettsia* y 6 positivos para el gen *OmpB* (específico para *Rickettsias* patógenas del hombre). A un individuo positivo para el gen *gltA*, se le secuenció el producto de PCR y mostró una similitud del 98 % con la especie *Rickettsia prowazekii*. En los pacientes humanos se probaron 89 muestras de suero por IFI y 11 fueron positivas en una dilución 1:64 (10 de las muestras fueron positivas en el periodo de convalecencia, M2 y una en el periodo agudo, M1). Hasta donde sabemos, éste podría ser el primer reporte de *Rickettsia prowazekii* en roedores de Colombia.

Palabras clave: diagnóstico, fiebres manchadas, reservorios, vectores, tífus.

Key words: diagnostic, reservoirs, spotted fever, vectors, typhus.

Detección de contaminación bacteriana en plasma rico en plaquetas (PRP) de caballos

Detection of bacteriological contamination in equine platelet rich plasma (PRP)

Maria Elena Alvarez, BSc MSc; Carlos Eduardo Giraldo, MVZ MSc; Jorge U Carmona, MVZ Esp MSc PhD

Grupo de Investigación Terapia Regenerativa, Departamento de Salud Animal, Universidad de Caldas, Manizales, Colombia

Existe un uso creciente de terapias (biofármacos) autólogas basadas en células o factores de crecimiento como tratamiento de afecciones crónicas degenerativas del aparato locomotor equino. Dado que la contaminación bacteriana constituye un grave riesgo de transmisión a través de los componentes sanguíneos, como el plasma rico en plaquetas, se planteó el presente estudio cuyos objetivos fueron: evaluar el riesgo de contaminación bacteriana del plasma rico en plaquetas (PRP) de caballos, obtenido mediante el método del tubo en tres condiciones técnicas diferentes a) cámara de flujo laminar, b) en ambiente de laboratorio limpio con mechero de Bunsen y c) sin mechero de Bunsen, identificar los puntos críticos del proceso de preparación de PRP con posibilidad de contaminación bacteriana, e identificar las bacterias potencialmente contaminantes en el proceso y conocer su susceptibilidad antimicrobiana. Se tomaron muestras bacteriológicas de la piel (rasurada o no) del sitio de venopunción de 15 caballos, antes y después de ser desinfectados manos y garganta del operario, tapones de los tubos donde se procesó la sangre, medio ambiente donde se tomaron las muestras de sangre, ambiente de laboratorio, cámara de flujo laminar, estufa bacteriológica y de PRP obtenido bajo condiciones técnicas. Se aislaron bacterias de la piel equina sin desinfectar manos y garganta del operario y del lugar donde se tomaron las muestras de sangre. No se aislaron bacterias de los tapones de los tubos, medio ambiente del laboratorio, cámara de flujo laminar, ni de los plasmas ricos en plaquetas. Las bacterias aisladas fueron biota normal de la piel equina, de la piel y garganta humana, y contaminantes medioambientales. De las bacterias aisladas, el 23% fue resistente a penicilina, el 19% a ampicilina, el 2,1% a ceftiofur, el 3,2% a sulfametoxazol/trimetoprim y el 1,1% a enrofloxacin. No se observó resistencia bacteriana frente a amikacina y gentamicina. En conclusión, el PRP puede ser obtenido mediante el método del tubo en un ambiente limpio sin necesidad de usar cámara de flujo laminar o un mechero de Bunsen. Es necesario realizar el procedimiento mediante una estricta técnica aséptica.

Palabras clave: control de calidad bacteriológico, plasma rico en plaquetas equinas, terapia regenerativa.

Key words: bacteriological control quality, equine platelet rich plasma, regenerative therapy.

producción y calidad de *Acacia decurrens* Willd

Inoculation of rhizobios and micorrhizal in the production and quality of Acacia decurrens Willd

Ana María Rey Obando¹, Microb Ind MSc (c)PhD; Diego Chamorro Viveros², Zoot MSc; Gina Saboya López³, Microb Ind; Carolina Múnera Camacho³, Microb Ind.

¹Universidad Nacional de Colombia, Doctorado en Biotecnología.

²Fundación Universitaria Agraria de Colombia UNLAGRARIA

³Pontificia Universidad Javeriana.

Con el fin de evaluar la doble inoculación en el crecimiento de *Acacia decurrens* Willd, se realizaron 18 aislamientos de rizobios de *A. decurrens* de Cundinamarca, caracterizándose morfológica y fenotípicamente mediante pruebas microbiológicas. Se seleccionaron cinco cepas representativas y fueron evaluadas individualmente y en mezclas con un inoculo mixto de micorrizas (*Acaulospora* spp., *Entrophospora* spp., *Glomus* spp., *Gigaspora rosea* y *Scutellospora heterogama*). Los tratamientos que incluía la inoculación con la cepa del municipio de Funza (OZR) y Facatativa (IIR) tanto individual como con el inoculo de micorrizas, presentaron las mejores respuestas agronómicas y microbiológicas, reflejadas en una mejor producción y calidad nutricional del forraje principalmente en proteína cruda y fósforo. En el análisis de las variables agronómicas a los 90 días se observó diferencias ($P < 0.001$) para las variables de longitud total, longitud foliar, longitud radicular, diferencias significativas ($P < 0.05$) para peso seco foliar. A los tres meses de edad, *A. decurrens* mostró su dependencia a la inoculación con cepas de rizobios asociadas con el inoculo mixto de micorrizas lo cual incidió marcadamente en una mayor respuesta en el rendimiento de forraje seco, longitud total y radicular, porcentaje de colonización y número de nódulos. La doble inoculación con las cepas nativas asociadas con en el inoculo mixto de micorrizas permitió incrementar la calidad nutricional de *A. decurrens* en cantidad de proteína cruda (101%), gramos de fósforo por planta (121,3%), digestibilidad *in situ* (53,53%), lo que favorece la utilización de nutrientes por el rumiante. La biodiversidad microbiana y los consorcios naturales son un reflejo de los trabajos de investigación que se deben realizar para mejorar la respuesta en vivero y en campo de leñosas perennes.

Palabras clave: fijación biológica nitrógeno, Glomales, microbiología, Rhizobiaceas.

Key words: biological nitrogen fixation, Glomales, microbiology, Rhizobiaceas.

La inmunosupresión terapéutica, una alternativa óptima para el aislamiento del herpesvirus bovino-1 (BHV-1)

Therapeutic immunosuppression: an optimal alternative for bovine herpesvirus-1 (BHV-1) isolation

Julián Ruiz Sáenz, MV MSc (c)PhD; Jairo Jaime C. MV MSc PhD; Víctor J Vera, MV MSc PhD.

Grupo de Investigación en Microbiología y Epidemiología, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, julianruizsaenz@gmail.com

El BHV-1 es un virus de genoma DNA perteneciente a la familia *Herpesviridae*, que afecta al bovino, provocando un amplio espectro de manifestaciones clínicas. Establece latencia durante la vida del hospedero evadiendo la respuesta inmune. Durante eventos de estrés, inmunosupresión o uso de corticoides, el virus puede reactivarse dispersándose a animales susceptibles. Durante los años 90's se evidenció una gran dificultad para aislar virus de animales naturalmente infectados, aun cuando estos presentaban signos compatibles con

Rev Colomb Cienc Pecu 2009; 22:3

Epidemiología de la Universidad Nacional con conocimiento del estatus serológico y mediante el uso de inmunosupresión terapéutica ha logrado más de 15 aislamientos del BHV-1. Para éstos, se realizaron muestreos poblacionales en diferentes ganaderías, tanto de carne como de leche. Los animales fueron sangrados dos veces con un intervalo de 20-30 días a fin de evaluar los títulos de anticuerpos neutralizantes, mediante la técnica de seroneutralización. Con base en la serología, se escogió un grupo de individuos positivos y seroconvertores (2-5 individuos por hato), los cuales se sometieron a inmunosupresión terapéutica, usando uno de dos protocolos: 1) dos dosis: 100 mg de dexametasona por vía intravenosa y 100 mg a los dos días siguientes vía intramuscular, 2) una dosis única de 200 mg de dexametasona por vía intravenosa. En ambos protocolos se tomaron hisopados (nasales, conjuntivales, vaginales) y lavados prepucales a los 4 días postinmunosupresión. A la toma de la muestra, los animales se encontraban en óptimas condiciones de salud. Algunas hembras presentaron leve vulvovaginitis, ninguno de los toros mostró balanopostitis y ninguno de los animales mostró signos de enfermedad respiratoria. Se encontró una disminución de la producción láctea de cerca del 80% a las 24 horas postinmunosupresión, la cual se recuperó totalmente al 5 día. No fue posible registrar el peso de los animales; sin embargo no hubo disminución en los índices de condición corporal. Se aislaron virus tanto de muestras respiratorias, conjuntivales como reproductivas y tanto de toros como de vacas tratadas, demostrando la eficiencia de la técnica para realizar aislamientos del BHV-1 con mínimo deterioro de la salud de los animales.

Palabras clave: corticoides, ganadería, latencia, rinotraqueitis, virus.
Key words: cattle, corticoids, latency, rhinotracheitis, virus.

Métodos y Estrategias para la detección de bovinos persistentemente infectados con el virus de diarrea viral bovina (DVB)

Methods and strategies for the detection of bovines persistently infected by the bovine viral diarrhoea virus (BVDV)

Chiara Piancastelli¹, MV PhD; Sandro Cavirani¹, MV MSc PhD; Giovanni Moreno Figueredo^{1,2}, MV (c)PhD.

¹Universidad de Parma (Italia), Departamento de Salud Animal, sección de Enfermedades Infecciosas, Facultad de Medicina Veterinaria
²Fundación Universitaria Juan de Castellanos (Tinja), Facultad de Ciencias Agrarias, Programa de Medicina Veterinaria, Grupo de Investigación IRABI

La diarrea viral bovina es una enfermedad causada por un pestivirus que produce sintomatología respiratoria y reproductiva, de acuerdo con el biotipo involucrado (citopático o no citopático). El virus no citopático infecta hembras gestantes durante los primeros cuatro meses de preñez, pasando a un estado de inmunotolerancia, en el que el feto no es capaz de reconocer el virus y por ello no produce anticuerpos, convirtiéndose en un paciente infectado persistente y difusor del virus. El presente trabajo se realizó con el fin de evaluar la difusión del virus de DVB en fincas lecheras de algunas regiones de Italia, utilizando diferentes estrategias y técnicas diagnósticas. La técnica para la detección de animales persistentemente infectados así como la identificación del virus, se hizo por PCR en sangre completa, en biopsia y en pool de sangre (constituido por 20 muestras). La identificación de anticuerpos contra NS2-3, en animales seronegativos, se hizo por el método de ELISA. De manera complementaria, se hizo PCR tiempo real en terneros. En las fincas lecheras se encontró una seroprevalencia de 87% considerada muy alta debido a terneros infectados durante la etapa de gestación. Con relación a la mejor prueba diagnóstica, considerando balance costo beneficio, en este estudio se encontró que PCR tiempo real tuvo una alta sensibilidad y confiabilidad comparado con la PCR en sangre completa y biopsia individual, permitiendo identificar los animales infectados en

Congreso de la Asociación Colombiana de Parasitología y Medicina Tropical y X Simposio PECET. Centro de Convenciones Plaza Mayor, Medellín, Octubre 8-11, 2009

Trabajos libres

Biomédica 2009;29(Supl.):310-41

Introducción. Los sistemas de alerta temprana para malaria usan tres grupos de indicadores para predecir el tiempo y seriedad de los brotes 1) de vulnerabilidad, 2) de riesgo de transmisión, y 3) de detección temprana.

Los indicadores de vulnerabilidad, más que predecir la temporalidad de los brotes, indican la seriedad o magnitud del impacto. Entre estos indicadores se destacan el grado de inmunidad, la respuesta social organizada, la mala nutrición, las migraciones la y resistencia a los medicamentos. La evaluación de la vulnerabilidad expresa el grado de susceptibilidad de una población ante un potencial de transmisión de malaria, como resultado de diferentes exposiciones a la infección (mediante el uso de medidas contra los vectores) o por variaciones en la capacidad individual o de la población para hacer frente a la infección (como resultado de la inmunidad, el estatus nutricional, la genética, el acceso a efectivo a la salud o las conductas de búsqueda de atención).

En este trabajo nos centramos en la descripción epidemiológica, el nivel de inmunidad, la endemia y su grado y el acceso a los servicios preventivos y asistenciales como principales indicadores para la estimación de la vulnerabilidad en cuatro municipios de Colombia en el marco del proyecto INAP.

Materiales y métodos. La metodología tuvo dos etapas: un estudio descriptivo retrospectivo de fuente –SIVIGILA–, se construyeron series de tiempo de casos de malaria e índices parasitarios anuales (IPA) de 2000 a 2008 por grupos etarios como aproximación del estatus inmunitario; se referenciaron geográficamente con el *software* SIGEpi y se hizo un análisis por conglomerados a nivel nacional. Posteriormente, y con base en la primera etapa, en los municipios piloto del proyecto INAP –San José del Guaviare, Buenaventura, Puerto Libertador y Montelíbano– se desarrolló un estudio de corte transversal para hogares e individuos. Se seleccionó la localidad dentro de los municipios con mayor reporte histórico, y se seleccionaron aleatoriamente hogares e individuos.

En los hogares, por medio de una encuesta validada, se midieron los episodios de malaria y posesión o uso de medidas preventivas, condiciones habitacionales, población menor de 5 años y mujeres embarazadas; paralelamente, se seleccionaron los individuos del hogar para la toma de la gota gruesa en estación seca y lluviosa.

Resultados. A nivel nacional, históricamente, en dos departamentos se concentra el 50% de los casos y

en 44 municipios ocurre el 75% de los mismos; en 15 municipios se explica el 63% de la variabilidad de los casos y se observan ciclos en las series de tiempo en el conglomerado así como los cambios abruptos en el periodo analizado.

En la mayoría de los territorios enferma más el grupo de 15 años y más, señalando escenarios epidémicos y de baja a moderada inmunidad, a nivel nacional y en los cuatro municipios. Las series históricas sistemáticas, aunque cortas, señalan una transmisión inestable e hipoendémica con prevalencias entre 0 % y 6,8% (en ambas épocas del año) en los cuatro municipios, excepto en San José del Guaviare donde la transmisión es estable. El acceso real a los servicios preventivos y asistenciales no ha logrado la cobertura óptima para causar un impacto en la población; se encuentra un porcentaje importante de menores de 5 años y de mujeres embarazadas.

Aislamiento y caracterización del virus herpes bovino 1 en hatos de Antioquia y el Valle del Cauca

Julián Ruiz-Sáenz, Jairo Jaime, Víctor J. Vera

Grupo de Investigación en Microbiología y Epidemiología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. El herpesvirus bovino 1 es un virus de genoma ADN que pertenece a la familia Herpesviridae, subfamilia Alphaherpesvirinae, el cual afecta al bovino, en el que provoca un amplio espectro de manifestaciones clínicas, que acarrea graves pérdidas económicas. En nuestro país ha sido reportado desde los años 70 y, aunque existe un plan de vacunación y prevención de la enfermedad, se sospecha que es uno de las principales limitantes de las explotaciones ganaderas.

Materiales y métodos. Usando la técnica de seroneutralización, se realizó un muestreo de poblaciones en cada uno de los hatos y, posteriormente, se seleccionaron los animales que tenían los mayores títulos de seroneutralización, los cuales fueron sometidos a inmunosupresión terapéutica con dexametasona. Se inmunosuprimieron 15 animales del departamento del Valle y 9 de Antioquia a los cuales se le tomó muestra respiratoria, ocular y reproductiva, para un total de 72 muestras, las cuales se llevaron a cultivo de células MDBK.

Resultados. Se logró aislar virus de los tres tipos de muestras, y fue posible recuperar virus tanto de toros como de vacas inmunosuprimidas.

Biomédica 2009;29(Supl.):310-41

Se recuperaron 13 cepas virales, 8 de ellas pertenecientes al Valle y las 5 restantes, a Antioquia. De las cepas aisladas, 5 se recuperaron del sistema reproductivo y las restantes, del sistema respiratorio (ocular y nasal).

Los aislamientos se confirmaron utilizando PCR y cebadores para la glicoproteína B del BHV-1. Se realizó titulación de las cepas utilizando las técnicas de DICC50% y de unidades formadoras de placa (UFP), y se encontraron títulos virales entre $1 \times 10^{-4.5}$ y $1 \times 10^{-9.12}$ DICC50%, con un promedio de $1 \times 10^{-3.24}$ DICC50%; y entre $1,86 \times 10^4$ PFU y $2,2 \times 10^7$ UFP/ml.

Se confirmó que el BHV-1 es uno de los agentes de mayor difusión en diferentes ámbitos ganaderos del país.

Investigación de brotes de Chagas de posible transmisión oral en Colombia

Pilar Zambrano¹, Zulma Cucunubá¹, Marleny Montilla¹, Carolina Flórez¹, Edgar Parra¹, Martha Ayala¹, José Cháves¹, Mariela Torres¹, Lyda Muñoz¹, Lesly Guasmayán¹, Liliana Cortés¹, Adriana Arévalo¹, Sofía Duque¹, Paula Pavia², Concepción J. Puerta²

¹ Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

² Laboratorio de Parasitología Molecular, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. La enfermedad de Chagas es uno de los eventos de interés en salud pública del país. Durante los últimos 6 meses se ha presentado un aumento inusitado en la incidencia de brotes de miocarditis chagásica en zonas no endémicas para la enfermedad, que han ocasionado una letalidad elevada y, por consiguiente, un impacto negativo en las comunidades, que desconocen la etiología y las vías de transmisión de esta parasitosis.

Asimismo, el personal encargado de la vigilancia y el personal de salud se han visto enfrentados a una situación poco común que ha requerido de acompañamiento continuo y capacitación en metodologías para el abordaje y contención de estos brotes.

Materiales y métodos. Se realizaron estudios de foco en tres municipios del país conforme a la metodología del protocolo de vigilancia nacional para la enfermedad de Chagas que incluye la investigación epidemiológica, entomológica y de reservorios, diagnóstico por laboratorio y tratamiento de pacientes,

Epidemiología, ecoepidemiología

así como la implementación de medidas de prevención y control a nivel individual y colectivo.

Resultados. Los estudios de foco han arrojado resultados similares en cuanto a las características epidemiológicas. Los tres focos se presentaron en sitios que no son considerados endémicos para la enfermedad, los reportes de entomología confirmaron la ausencia de triatomíneos en la zona. Se han presentado casos de miocarditis chagásica en más de un miembro de la misma familia, en períodos de que sugieren una fuente común de infección y se ha registrado una letalidad que oscila entre 20% y 40%.

Las características ecológicas son similares en cuanto a parámetros de altura sobre el nivel del mar, temperatura y cultivos. Las manifestaciones clínicas evidenciadas en los casos sintomáticos han sido muy serias, y se han presentado alteraciones electrocardiográficas en 56% de los pacientes, lo cual ha requerido la implantación de marcapaso con la consecuente elevación de los costos de atención. Los afectados están en el rango de edad de 1 a 68 años, con una mayor incidencia en el grupo de adultos jóvenes. La mortalidad ha afectado, principalmente, a los menores de 27 años. La confirmación diagnóstica serológica de los casos se realizó en 100% por inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ELISA (IgG), histopatología en 89% de las mortalidades, exámenes directos (gota gruesa) en 2%, PCR en 70% y hemocultivo en 22%. El 5% (1/20) de los casos se confirmó por nexo epidemiológico.

Durante la investigación del primer brote de miocarditis chagásica, se realizaron cultivos parasitarios a partir de alimentos potencialmente infecciosos, mediante un protocolo adaptado para establecer la fuente de infección y focalizar las acciones de prevención y control; sin embargo, los cultivos han sido negativos hasta la fecha.

Con los resultados obtenidos en las investigaciones de estos brotes, la hipótesis de trabajo se basa en una posible transmisión oral del parásito, dados los hallazgos clínicos, epidemiológicos y entomológicos.

Debido a que en el país no se cuenta con experiencia relacionada con este modo de transmisión y a la dificultad de la identificación de los alimentos involucrados, las acciones de control implementadas se han orientado de manera idéntica a una enfermedad transmitida por alimentos.

III Simposio Nacional de Virología. Hotel Radisson. Cali, Octubre 1-3 de 2008

III Simposio Nacional de Virología

Prevalencia serológica y aislamiento del herpesvirus bovino-1 (BHV-1) en hatos ganaderos de Antioquia y del Valle del Cauca

Ruiz-Sáenz J¹, Jaime J, Vera V²

INTRODUCCIÓN

El herpesvirus bovino es un virus de genoma DNA perteneciente a la familia herpesviridae, subfamilia Alphaherpesvirinae, el cual afecta naturalmente al bovino, en el que provoca un amplio espectro de manifestaciones conocidas como rinotraqueítis, vulvovaginitis, balanopostitis, conjuntivitis, aborto, enteritis y encefalitis acarreado graves pérdidas económicas. En nuestro país, ha sido reportado desde comienzos de los 70 y aunque existe un plan de vacunación y prevención de la enfermedad, se sospecha que es uno de las principales limitantes de las explotaciones ganaderas del país.

OBJETIVO

Desarrollar un estudio serológico de la presencia del BHV-1 en dos sistemas de producción ganadera de leche y carne; para posteriormente mediante inmunosupresión terapéutica intentar aislamientos virales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para ello, se realizó un estudio serológico transversal en el cual se muestrearon 316 individuos no vacunados pertenecientes a 6 diferentes haciendas ganaderas; tres de ellas dedicadas a la producción de leche, ubicadas en el departamento de Antioquia y las 3 restantes dedicadas a la ceba de ganado destinado al faenado ubicadas en el departamento del Valle del Cauca. A los individuos se les tomó una muestra de sangre mediante punción en la vena coccígea media. Luego, las muestras fueron transportadas refrigeradas al laboratorio donde se separaron los sueros y se realizó la prueba de seroneutralización viral en cultivo celular. A partir de dichos resultados se escogió a los animales que tuvieran los mayores títulos seroneutralizantes del hato, los cuales fueron sometidos a inmunosupresión terapéutica con una dosis única de 200mg de dexametazona para posteriormente tratar de aislar el virus en muestras de estos.

RESULTADOS

Se encontró un 100% de prevalencia serológica por hato para el BHV-1 y una prevalencia general por individuos del 75.63%. La prevalencia para los departamentos de Antioquia y del Valle fue del 85.51% y 69.84% respectivamente. Se inmunosuprimieron 15 animales del valle y 9 de Antioquia a los cuales se le tomó muestra respiratoria, ocular y reproductiva, para un total de 72 muestras, las cuales se llevaron a cultivo celular. Se logró aislar virus de todas las muestras; siendo posible recuperar virus tanto de toros como de vacas tratadas. Se recuperaron un total de 10 cepas virales, 7 de ellas pertenecientes al departamento del valle y las 3 restantes al de Antioquia. De las cepas aisladas, 4 fueron recuperadas de tracto reproductivo y las restantes fueron recuperadas de tracto respiratorio (Muestras oculares y nasales). Utilizando la técnica de DICC50% se realizó la titulación de una de las cepas proveniente de tracto reproductivo de un toro del valle del cauca, encontrándose un título viral de 1x105.51 DICC50%.

CONCLUSIONES

Los presentes resultados se relacionan con un estado de enzootia de la infección y demuestran que el BHV-1 sigue siendo uno de los agentes de mayor difusión en diferentes ámbitos ganaderos, y que tanto machos como hembras están siendo afectados por esta infección. Adicionalmente, si tenemos en cuenta la larga convivencia con la infección en el país permiten cuestionar la eficacia de los sistemas de prevención y control de la infección en Colombia.

1 Grupo de Investigación en Microbiología y Epidemiología, Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá., E- mail: julianruizsaenz@gmail.com

2 Grupo de Investigación en Microbiología y Epidemiología, Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá.

Reproducción experimental y caracterización molecular de cepas de campo del virus de herpesvirus bovino tipo 1 aisladas en Colombia

Jenny J. Chaparro¹, Diego Piedrahita²,
Gloria C. Ramírez N.²,
Víctor J. Vera A.³, Luis Carlos Villamil J.⁴

B. Anexo B. Instrucciones a los autores revistas

B1. ACTA BIOLÓGICA COLOMBIANA (Publindex A2)

Normas para autores

ACTA BIOLÓGICA COLOMBIANA se publica cuatrimestralmente y divulga resultados originales inéditos de investigación básica y aplicada sobre temas biológicos. Los manuscritos pueden ser revisiones, artículos, notas o resúmenes. Los Editores de la revista evalúan el mérito científico de los artículos y luego son sometidos a revisión por pares. Pueden escribirse en español o inglés, sin embargo, título, resumen y palabras claves deben presentarse siempre en los dos idiomas. Los artículos publicados aparecerán además en la página web de la revista.

Los manuscritos que no sigan las normas básicas no se considerarán. ACTA BIOLÓGICA COLOMBIANA admite comentarios y opiniones sobre el material publicado, acepta retractaciones argumentadas de los autores y corregirá oportunamente los errores tipográficos que se hayan cometido al publicar un manuscrito (Fe de erratas).

Revisión. Es aquella que consigna el estado actual del conocimiento sobre un tema en particular donde el autor establece su aporte y criterio sobre dicho tema. Se acepta por invitación del comité Editor.

Artículos. Son escritos científicos cuyo contenido debe incluir resumen, introducción, materiales y métodos, resultados-discusión, agradecimientos y bibliografía. En general no deben exceder 30 páginas.

Artículos de reflexión. Son escritos en los cuales los autores presentan una posición determinada sobre un tema en particular, y basan su argumentación en su trabajo y literatura consultada.

Notas breves. Son comentarios concisos y críticos que consignan un resultado original de un tema, con máximo dos figuras y hasta de cinco páginas.

Notas de actualización. Son comentarios concisos que consignan el estado actual de un tema en aproximadamente cinco páginas

PREPARACIÓN DE MANUSCRITO E ILUSTRACIONES

La revista sigue las normas Vancouver para la preparación de los manuscritos, modificadas parcialmente como sigue:

Página del título. En la página inicial constará lo siguiente:

Título. El título debe ser conciso pero informativo y no debe exceder 120 caracteres incluyendo los espacios. Se debe sugerir un título breve para el encabezamiento de las páginas. Para nombres científicos escriba entre paréntesis la familia taxonómica después del nombre de la especie. No adicione autoría de especies en el título.

Autor (es). Debe aparecer el nombre de cada autor y autora, con su rango académico más elevado y su afiliación o centro de trabajo, ciudad y país. Igualmente debe aparecer el nombre y dirección del autor responsable de la correspondencia sobre el manuscrito.

Resumen. El resumen incluye el objetivo central del trabajo, procedimientos básicos (selección de los sujetos del estudio; métodos de observación y de análisis), hallazgos más importantes (consignando información específica o datos y su significación estadística siempre que sea posible) y conclusiones principales. Deberán destacarse las observaciones y aspectos más novedosos y relevantes del estudio. Tamaño máximo de 250 palabras. Debe aparecer en español e inglés.

Palabras clave. Máximo cinco y usando palabras estándar internacionalmente aceptadas.

Texto. Se deben presentar en tamaño carta, a doble espacio, incluyendo tablas, figuras, sus títulos y bibliografía. Justifique márgenes de 3 cm en los cuatro lados. Use letra itálica solo para nombres científicos y vocablos en otro idioma.

1. Numere a partir de la segunda hoja.

2. Los títulos de las secciones (RESUMEN, INTRODUCCIÓN, etc.) deben ir centrados con mayúscula sostenida y negrilla. Los subtítulos primarios y secundarios deben ir justificados al margen izquierdo y en negrilla; los subtítulos primarios con mayúscula sostenida y secundarios solo la primera letra en mayúscula.

3. Siempre se definirán los términos estadísticos, abreviaturas y los símbolos.
4. Los géneros de los binomios se escriben completos únicamente la primera vez que se usan en el resumen, texto principal y claves, a menos que haya ambigüedad (p.e. dos o más géneros que empiecen con la misma letra).
5. Los nombres en latín de los taxones hasta el nivel de orden deben ir en letra itálica. Aparte de esto, no utilice ningún tipo especial de letra dentro del texto. Las abreviaturas como sp., sp. nov., spp., etc. no son nombres propiamente dichos y no van en itálica. Note que en castellano, la palabra taxón se escribe con tilde (plural, taxones); en latín, los términos correspondientes son taxón y taxa.
6. Para las unidades de medida use el sistema métrico decimal, excepto en citas textuales, y no utilice puntos después de cada abreviatura (g, mm, m, km, ha, l, etc.). Cuando no van seguidos de unidades, los números enteros hasta diez se escriben con la palabra (uno, dos, diez) y mayores de diez con números (11, 12, 102). Cuando se utilicen números, éstos deberán ir seguidos de su símbolo y se mantendrá un espacio entre uno y otro (100 m, 50 mL). Para los símbolos o abreviaturas se recomiendan las minúsculas; algunas excepciones son: la K de la unidad Kelvin de temperatura; la A de la unidad de corriente eléctrica, el amperio; M de concentración molar; y la L de litro. Ningún símbolo deberá expresarse como plural; todos los símbolos serán singulares (kg, m, etc.).

Introducción. Debe contener el propósito del trabajo y resumir los fundamentos lógicos para la realización del mismo. Solo se darán las referencias estrictamente oportunas y no incluirá datos o conclusiones del trabajo que se está publicando.

Métodos. Identifique los métodos, aparatos (reseñar el nombre del fabricante entre paréntesis), y los procedimientos utilizados con detalle suficiente como para permitir a otros profesionales reproducir la investigación. Incluya las referencias de los métodos, métodos estadísticos y se suministre referencias y breves descripción de los métodos que aunque ya estén publicados no sean muy conocidos; describa los métodos nuevos o sustancialmente modificados y sustente las razones para utilizarlos, evaluando sus limitaciones. Identifique con precisión todos los reactivos utilizados.

Cuando corresponda se describirán los métodos estadísticos con detalle suficiente como para permitir a los lectores entendidos en el objeto de estudio con acceso a la información original, verificar los resultados. Siempre que sea posible, se cuantificarán y

presentarán los hallazgos con indicación apropiada del margen de error o la fiabilidad (como por ejemplo los intervalos de confianza). Evite apoyarse únicamente en las pruebas de hipótesis estadísticas, como el uso de valores "p" puesto que omite información cuantitativa y cualitativa importante. Justifique la elección de los sujetos que participan en la investigación, detalle la aleatorización, informe sobre las posibles complicaciones de la intervención, número de observaciones, pérdida de sujetos, (tales como las bajas en un ensayo clínico). Siempre que sea posible, las referencias sobre el diseño del estudio y los métodos estadísticos serán de trabajos vigentes, mejor que de los originales dónde se describieron por primera vez. Si se han utilizado programas informáticos indique cuales.

Los autores que envíen revisiones deberán incluir una sección que describa los métodos empleados para localizar, seleccionar, extraer y sintetizar la información. Estos métodos se deberán resumir también de forma estructurada.

Resultados. Se presentarán en un orden lógico y se destacarán o resumirán solo las observaciones relevantes.

Discusión. Se destacarán los aspectos nuevos y relevantes del estudio, así como las conclusiones que de ellos se derivan. Hay que evitar repetir de forma detallada información u otro material ya facilitado en las secciones Introducción o Resultados. Las conclusiones se vincularán a los objetivos del estudio y se evitará realizar afirmaciones no cualificadas y conclusiones que no estén plenamente respaldadas por los datos. Se establecerán nuevas hipótesis cuando estén claramente justificadas. Cuando sea conveniente se incluirán recomendaciones.

Agradecimientos. Explícite apoyos recibidos para la realización del estudio en forma de becas, equipos, reactivos, o todos ellos. Deberá nombrarse a aquellas personas que hayan prestado su ayuda intelectual al trabajo pero cuyas contribuciones no justifiquen la autoría y se describirá la contribución llevada a cabo, por ejemplo, "asesoría científica", "revisión crítica del proyecto de investigación", "recolección de datos". Se agradecerá la ayuda técnica en un párrafo separado de aquellos destinados a expresar agradecimiento por otro tipo de contribuciones.

Las referencias bibliográficas en el texto se escriben así:

Un autor: Lozano (1995) o (Lozano, 1995).

Dos autores: Lozano y Barrera (1994) o (Lozano y Barrera, 1994).

Más de dos autores: Lozano et al. (1993) o (Lozano et al., 1993).

Los artículos aceptados pero aún no publicados:

Jones y Smith (en prensa) o (Jones y Smith, en prensa).

Cuando se trata de varias referencias en el texto se deben citar en orden cronológico.

Cada referencia citada en el texto debe aparecer en la bibliografía y viceversa.

Bibliografía. Es conveniente evitar citar como referencia los resúmenes presentados en congresos u otras reuniones. Las alusiones a trabajos admitidos para su publicación pero aún no publicados deberán aparecer como "En prensa" indicando el nombre de la revista; los autores deberán obtener permiso escrito para citar estos trabajos así como tener constancia de que están admitidos para su publicación. La información sobre trabajos presentados pero que no han sido aceptados deberá aparecer en el texto como "observaciones no publicadas" y siempre con consentimiento escrito por parte de los responsables de la fuente de información.

En la medida de lo posible, se evitará utilizar expresiones como "comunicación personal", a menos que lo citado suministre información esencial que no se pueda obtener de fuentes publicadas, en cuyo caso el nombre de la persona y la fecha en que se efectuó la comunicación deberán constar entre paréntesis en el texto. Si se trata de artículos científicos, los autores necesitarán obtener permiso escrito de donde proceda la información particular, y confirmación de la exactitud de la misma. El autor deberá comprobar las referencias cotejándolas con los documentos originales.

Se debe anotar el apellido y las iniciales del nombre de todos los autores. Ordene la bibliografía alfabéticamente, comenzando por el apellido del primer autor.

Se deberán escribir en abreviatura los títulos de las revistas según el estilo empleado en NCBI- Journals:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=journals>

Artículo de revista

Artículo estándar.

-Menos de seis autores: se incluyen todos los autores.

NILSSON S, ARUP V, BARANOWSKI R, EKMONS S. Tree-Dependent Lichens and Beetles as Indicators in Conservation Forest. *Conserv Biol.* 1994;9(5):1208-1215.

-Más de seis autores: incluir hasta los seis primeros autores y a continuación escribir et al.

ROLDÁN A, CARAVACA F, HERNÁNDEZ MT, GARCÍA C, SÁNCHEZ B, VELÁSQUEZ C, et al. No- Tillage, Crop Residue Additions, and Legume Cover Cropping Effects on Soil Quality Characteristics Under Maize in Patzcuaro Watershed (México). *Soil Till Res* 2003;1786:1-9.

Indicación del tipo de artículo según corresponda.

CLEMENT J, DE BOCK R. Hematological Complications of Antavirus Nephropathy (HVN) [summary]. *Kidney Int* 1992;42:1285.

Libros y otras monografías

Individuos como autores

DARNELL J, LODISH H, BALTIMORE D. *Biología celular y molecular*. 5 ed. Barcelona: Editorial Labor S.A.; 1988.

Editor(es), compilador(es) como autores

PANKBURST C, DOUBE BM, GUPTA VV, editores. *Biological Indicators of Soil Health*. New York: CAB Internacional; 1997.

Organización como autor y editor

FUNDACIÓN NATURA. Plan integral para la conservación biológica y el desarrollo sostenible en el municipio de Encino, Santander. Encino: Fundación Natura, Alcaldía Municipal de Encino; 2000.

Capítulo de libro

JONES C, MCSHEA WJ, CONROY MJ, KUNZ TH. Capturing Mammals. En: Wilson DE, Cole FR, Nichols JD, Rudran R, Foster MS, editors. *Measuring and Monitoring Biological Diversity: Standard Methods for Mammals*. Washington and London: Smithsonian Institution Press; 1996. p. 53-78.

Tesis doctoral (o similar)

BECERRA MT. Influencia del disturbio antrópico sobre las comunidades de pequeños mamíferos de bosque seco tropical [tesis de maestría]. Bogotá: Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia; 1999.

Diccionarios y obras de consulta similares

Stedman's Medical Dictionary. 26th ed. Baltimore: Williams and Wilkins; 1995. Apraxia; p. 119-20.

Mapa

Zonas de vida o formaciones vegetales de Colombia, [mapa de vegetación]. Instituto Geográfico Agustín Codazzi, Subdirección Agrológica; 1977.

Material no publicado

En prensa

LESHNER AI. Molecular Mechanisms of Cocaine Addiction. N Engl J Med. En prensa 1997.

Material Informático

Artículo de revista en formato electrónico MORSE SS. Factors in the Emergence of Infectious Diseases. Emerg Infect Dis [serial online] 1995 Jan- Mar [citado 5 Jun 1996]; 1(1): [24 pantallas]. Disponible en: URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>.

Archivos de ordenador

Hemodinámics III: The Ups and Downs of Hemodynamics [programa de ordenador]. Versión 2.2. Orlando (FL): Computerized Educational Systems; 1993.

Leyendas de tablas y figuras. Deben aparecer separadas del texto al final. Las explicaciones y abreviaturas no estándar irán en notas al pie de la tabla o figura. Se identificarán las medidas estadísticas de dispersión tales como la desviación estándar y el error estándar de la media. Si se utiliza información de cualquier fuente, publicada o no, es preciso obtener permiso de la misma y expresarle el agradecimiento anexando el permiso escrito del propietario de los derechos de autor para reproducir el material. Los títulos y explicaciones detalladas se incluirán en las leyendas de las figuras y no en las propias tablas o figuras.

Tablas y figuras. Deben aparecer separadas del texto al final. Cite cada figura y tabla en el texto de acuerdo con un orden numérico, por ejemplo (Fig. 4) o (Figs. 4 y 5) o (Tabla 1.). Deben usarse las tablas y figuras estrictamente necesarias para explicar el argumento del trabajo y respaldarlo. También deben usarse figuras como alternativa a las tablas con muchas entradas; no se deben duplicar los datos en los gráficos y tablas, ni tampoco repetir en el texto la información de las tablas o figuras.

Las tablas deben presentarse numeradas consecutivamente. Evite diseños con exceso de líneas y sombreados. Distinga entre títulos de columnas y los datos. Las figuras, entre las que se incluyen fotografías, esquemas, gráficas, mapas, etc., en blanco y negro, deben ir numeradas consecutivamente con un título en la parte inferior. Combine varias figuras en una sola si éstas apoyan la misma conclusión. Las imágenes deben enviarse en .jpg o .tiff, tamaño de 10 x 13 cm, resolución 300 dpi. La publicación en color será financiada por el autor. Si se incluyen dibujos o esquemas estos deberán estar dibujados de manera profesional; no se admite la rotulación a mano alzada o mecanografiada. Las letras, números y símbolos deberán ser claros y uniformes a lo largo de toda la figura y de un tamaño tal que, cuando se reduzcan para su publicación, sigan siendo legibles. Evite márgenes en las figuras y diseños con color si no van a aparecer así. Las fotografías tomadas a través de un microscopio deberán tener indicadores internos de escala. Los símbolos, flechas, o letras empleados en este tipo de fotografías deberán contrastar claramente con el fondo. La escala interna e identificación del método de tinción empleado en las fotomicrografías deben expresarse en la leyenda de la figura.

Abreviaturas y símbolos. Cuando se emplee por primera vez una abreviatura irá precedida del término completo al que corresponde, salvo si se trata de unidades de medida común.

Procedimiento. La carta remisoría debe venir firmada por todos los autores, indicando como se han aplicado las normas nacionales e internacionales de ética e indicar que los autores no tienen conflicto de interés.

El manuscrito debe tener Nombre(es) del autor(es), título del trabajo, número de páginas, tablas y figuras, algunas instrucciones especiales, direcciones, teléfono, FAX y correo

electrónico (preferiblemente institucional) para correspondencia con el autor. Indispensable incluir: Nombre, dirección, teléfono, número de FAX y correo electrónico de cinco posibles evaluadores.

Correspondencia dirigida a:

Comité Editor

ACTA BIOLÓGICA COLOMBIANA

Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia,

Apartado Aéreo 14490, Bogotá, Colombia.

FAX: 571 3165310, racbiocol_fcbog@unal.edu.co,

<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol>

Declaración de privacidad

Los nombres y direcciones de correo-e introducidos en esta revista se usarán exclusivamente para los fines declarados por esta revista y no estarán disponibles para ningún otro propósito u otra persona.

B2. REVISTA COLOMBIANA DE CIENCIAS PECUARIAS (Publindex A1)

Author Guidelines

TYPES OF ARTICLES:

LITERATURE REVIEWS AND ESSAYS

ORIGINAL RESEARCH ARTICLES

CASE REPORTS OR CLINICAL CASES

BRIEF COMMUNICATIONS

SUPPLEMENTS

NEWS / POINT OF VIEW

MAXIMUM LENGTH OF MANUSCRIPTS

Manuscripts should not exceed the following (spaces included):

Literature reviews: 40.000 characters.

Original research articles: 30.000 characters.

Case reports: 15.000 characters.

Brief communications: 10.000 characters.

1. ORIGINAL ARTICLES.

Original articles are unpublished manuscripts based on scientific and technological reports resulting from original research.

The first page should contain:

Title. Should be in bold, centered, and in Spanish, English, and Portuguese. Scientific names should be set in italics (e.g., *Bos indicus*, *Escherichia coli*, *Brucella abortus*).

Names of authors. Should be centered.

Order: First name, middle name initial and complete last name (do not include any punctuation marks between them), followed by a number (in superscript, italics and bold font), indicating the affiliation of the author. Use commas to separate the name of the authors and abbreviations of their academic degrees. Names of authors should be separated by a semicolon (e.g., Jorge E Ossa¹, MV, PhD; Juan D Rodas², MV, PhD).

Affiliation. Affiliations are placed below the authors, centered and with numbers corresponding to authors in superscript and in bold italic font. Include complete affiliations for each author. E.g.:

Jorge E Ossa¹, MV, PhD; Juan D Rodas², MV, PhD.

¹Biogenesis Research Program, and Virology Laboratory, Department of Medicine, Universidad de Antioquia, AA 1226, Medellín, Colombia.

²Medical Laboratory, Hospital Las Américas, Medellín, Colombia.

Corresponding author. Must be referenced by an asterisk and placed as a footnote. Specify both mailing and e-mail addresses.

Summaries and keywords in three languages:

Summary. Should be 300 words or less. It should contain five subtitles covering: Background (brief description of precedents), Hypothesis (a hypothesis statement), Methods (brief description of materials and methods), Results (only the most important findings), and a relevant Conclusion. The summary must be set in bold and italic font.

Keywords. List 3 to 6 keywords, separated by commas, and presented in alphabetical order and italics.

Resumen. It corresponds to the Summary in Spanish. It must be set in bold and italics.

Palabras clave. List 3 to 6 keywords in Spanish.

Resumo. It corresponds to the Summary in Portuguese. It must be set in bold and italics.

Palavras chave. List 3 to 6 keywords in Portuguese.

Body of the manuscript:

Introduction. The introduction should not exceed 400 words and should present the current literature associated with the main topic, tested hypotheses and objectives.

Materials and methods. This section can be divided into subsections and must include:

Approval from the Ethics Committee for Animal Experimentation, including date and the approval number.

Type of study. It includes the type of study conducted, study sample and sample size used.

Methods. Describe precisely the methods used or standardized by the authors. If a method has already been described by other authors, do not include details but give the respective references. Methods modified by the authors should include the exact references and description of modifications made. In case of subtitles describing procedures and protocols, proceed as follows:

First order subtitle. The first order subtitle must be typed in italic, do not use bold font. Begin the description of the procedure in the following line.

Second order subtitle: The second order subtitle must be typed in italic, do not use bold font. Use a period followed by the description.

Methods should include:

Location of the study, Animals used, Statistical analysis (the statistical analysis should specify the procedures used, the transformed data to facilitate analysis, statistical models applied, significance level and the types of error employed).

Results.

Titles and subtitles of this section will follow the same rules as described previously in Materials and methods.

Results must be expressed in past tense, and statistical significance must be shown in parentheses (e.g.: $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p > 0.05$).

Tables and figures must be mentioned in order as presented in this section. In the text, refer to the tables by the number as follows:

a)... as shown in table 2...; or

b) ... the results did not show significant statistical differences (Table 2).

Units of measurement will be expressed according to the International System of Units (SI).

Use a space between the number and the unit, except for the symbol for percentage (%) and pesos or any other currency (\$).

Abbreviated units should always be singular (e.g.: 3 cm not 3 cms).

Do not use a period after a unit of measurement, except at the end of a sentence.

Do not repeat abbreviated units when expressing multiple amounts (e.g.: 3 - 5 kg not 3 kg – 5 kg).

Use a period, and not a comma, to separate decimals (e.g.: 3.5 not 3,5).

All tables and figures (photographs included) should be identified by an Arabic number followed by a period. The table title must be located above the table and the figure title below the image. The first word for column and row headings should be capitalized.

Tables must only have horizontal lines between the title and subject headings (Take as an example a table from a previously published journal). Do not use vertical lines.

Units included in the headings should be set in parentheses. Numbers, letters or asterisks, used to indicate a note placed below the body of the table, statistical measures or particular meanings should be indicated by superscript and set in italic font. Likewise, and just in special cases, specific and explanatory notes about the methodology used can be placed underneath a table in italics.

Abbreviations and Acronyms. When a proper name is in a language other than the language of its origin, do not translate it. The name must be followed by its respective abbreviation in parentheses, e.g.: Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). Thereafter, use the abbreviation in the text without further explanation.

Identify chemical compounds purchased and equipment used by providing in parentheses the parent company, city, state and country, e.g.: Sigma, St Louis, MO, USA.

Discussion. The discussion is an independent component and not part of the results section. It should interpret and discuss the results obtained with relevant data from the literature. This section should include detailed discussions associated only with the results stated in the manuscript.

Acknowledgments. You can mention institutions and people who financed or assisted in conducting the study, and also the grants awarded.

References. Give the author(s)' last name(s) followed by the year of publication. E.g.: (Jaramillo, 2006; Zuluaga y Tobón, 2008; Botero et al., 2009) or Muñoz et al. (1998).

HOW TO CITE THE REFERENCES

Journal names must be abbreviated according to the Index Medicus guidelines, with no period at the end of abbreviations. References should be listed according to the following examples:

Original Research Articles

Original Article

E.g.: Cushman RA, Allan MF, Kuehn LA, Snelling WM, Cupp AS, and Freetly HC. Evaluation of antral follicle count and ovarian morphology in crossbred beef cows: Investigation of influence of stage of the estrous cycle, age, and birth weight. *J Anim Sci* 2009; 87: 1971-1980. <http://www.animal-science.org/content/87/6/1971.full>

2. Organization or Institution

E.g.: Cardiac Society of Australia and New Zealand. Clinical exercise stress testing. Safety and performance guidelines. *Med J Aust* 1996; 164: 282-284.

3. Reference with no Identified Author

E.g.: Cancer in South Africa [editorial]. *S Afr Med J* 1994; 84:15.

4. Journal Supplement

E.g.: Shen HM and Zhang QF. Risk assessment of nickel carcinogenicity and occupational lung cancer. *Environ Health Perspect* 1994; 102 Suppl 1:275-282. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1566900/>

5. Reference with neither Volume nor Number

E.g.: Browell DA and Lennard TW. Immunologic status of the cancer patient and the effects of blood transfusion on antitumor responses. *Curr Opin Gen Surg* 1993:325-33.

Books

Author(s)

E.g.: Ringsven MK and Bond D. Gerontology and leadership skills for nurses. 2nd ed. Albany (NY): Delmar Publishers; 1996.

2. Editor(s), Compiler(s) as Author(s)

E.g.: Norman IJ and Redfern SJ, editors. Mental health care for elderly people. New York: Churchill Livingstone; 1996.

3. Organization

E.g.: Institute of Medicine (US). Looking at the future of the Medical program. Washington: The Institute; 1992.

4. Book chapter

E.g.: Phillips SJ and Whisnant JP. Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM, editors. Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management. 2nd ed. New York: Raven Press; 1995. p. 465-78.

Personal Communications

Cite personal communications in text only (do not include them in the reference list). Give the author's name, affiliation and provide a date when the communication took place.

E.g.: P. Jones (personal communication, April 15, 2005)

Electronic Reference

E.g.: Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. Emerg Infect Dis 1995; [accessed date...] URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>

2. BRIEF COMMUNICATIONS

Brief communications have the same content as original research articles; however, brief communications should be significantly shorter than regular research articles.

3. CASE REPORTS OR CLINICAL CASES

Case reports can be in Spanish or English, and must have the following elements: title, author(s) name(s), affiliation, abstract, (do not exceed 150 words), keywords and introduction. Case reports must also include, patient examination (with the following subtitles: anamnesis, clinical findings, diagnostic aids), treatment approach, discussion and conclusion. The previous items should follow the rules of original research articles.

4. LITERATURE REVIEWS AND ESSAYS

Review. Critical analysis of the published literature about a subject of interest should focus preferentially on animal sciences, including animal health and husbandry. Manuscripts must follow the previous rules, except for Materials and Methods, Results and Discussion; instead, use titles and subtitles about the review topic. Authors should discuss in detail the current literature; furthermore, authors should give a critical opinion about strengths, weaknesses, and research opportunities related to the proposed topic.

Essay. An essay is a piece of writing in which the author sets his/her ideas down about a specific topic, generally related to the author's expertise or specialty.

5. SUPPLEMENTS

Papers in this section should follow the same guidelines given for original research articles. When the object is a research project, the content must be specified through clear objectives, hypotheses and methodologies applied. For journal clubs, seminars or lectures, or any other category included in this section, the previous guidelines must be followed.

6. NEWS / POINT OF VIEW

Authors are free of choosing the writing style they prefer as long as it meets the editorial guidelines previously stated.

Submission Preparation Checklist

As part of the submission process, authors are required to check off their submission's compliance with all of the following items, and submissions may be returned to authors that do not adhere to these guidelines.

Copyright Notice

All manuscripts accepted for publication become the sole property of RCCP. Before publication authors are requested to assign copyright to RCCP. You will hereby be relinquishing to RCCP all control over this material such as rights to make or authorize reprints, to reproduce the material in other publications, and to grant the material to others without charge in any book of which you are the author or editor after it has appeared in RCCP. As an author, you retain rights for large number of author uses, including use by your employing institute or company. These rights are retained and permitted without the need to obtain specific permission from RCCP. The preferred language for RCCP is English, and any translation of parts or the entire publication must have written permission from RCCP.

Privacy Statement

The names and email addresses entered in this journal site will be used exclusively for the stated purposes of this journal and will not be made available for any other purpose or to any other party.

ISSN: 0120-0690

B3. VIROLOGICA SINICA (Publindex A1)

Requirement for Preparing Papers

Type every portion of the manuscript double spaced, including figure legends, table footnotes, and References. Number all pages in sequence, including the abstract, figure legends, and tables. Place the figures and tables after the text section. The font size of the paper should be 12Pt. The font type should be "Times New Roman". Do not create symbols as graphics or use special fonts that are external to your word processing program; use the "insert symbol" function. Italicize or underline any words that should appear in italics. **Authors from China should provide the Chinese information in Title Page.**

The manuscript should be succinct, well organized, and clearly written. Standard terms, abbreviations, and nomenclature should be used. Jargon should be avoided. All abbreviations, symbols, and acronyms should be defined and/or spelled out the first time that they appear in the text, unless they are so well known and standardized that no ambiguity is possible (e.g., PCR). An abbreviation may then be used throughout the remainder of the article. Standard American spelling must be used.

Title Page

- The full title, which should be informative, explicit, and concise (200 characters or fewer).
- The full name(s) of the author(s) with the official names of each author's affiliation, and the name and full address (including postcode, telephone number, fax number and e-mail) of corresponding author. Chinese authors' name should be written in Pinyin. There is a hyphen "-" between given double name (capitalize first letter), and put family name (all capital) to postposition,. Here are the examples: Xiao-ping LI (李小平); Li WANG (王丽). Use numbers to distinguish the authors from different institutions. Authors from other country should write their names as their own principles.
- The source of any financial support received for the work should also be indicated in title page.
- Additional Information. Chinese authors should provide the same information as above, and abstract written in Chinese. **NOTE:** Place an asterisk (*) after the title if it was supported by grants or special funds. Place two asterisks(**) after the name of the author to whom correspondence should be addressed(corresponding author).

Text

Research paper should be arranged in following order: 1) running title, author(s) and institution(s);2) Abstract; 3) key words; 4) introduction; 5) materials and methods; 6) results; 7) discussion; 8)acknowledgments; 9) references; 10) figures and tables

Abstract: Less than 250 words, concisely summarize the basic content of the paper without presenting extensive experimental details. Avoid abbreviations and references, and do not include diagrams. Just one paragraph, no other headings, no figures and tables, no undefined symbols and abbreviations.

Key words: Carefully selected key words (3-8) for indexing purposes.

Introduction: Sufficient background information should be given to allow the reader to understand and evaluate the results of the present study. A good rule of thumb is to write so that someone with a broad knowledge in your field would understand your paper. The introduction should also provide your hypothesis that was clearly addressed or the rationale for the present study.

MATERIALS AND METHODS

It could place subtitles when need in this section. A careful and complete description of the methods you used to carry out your research is required. Sufficient technical information should be included to allow the experiment to be repeated. Describe your selection of the observational or experimental subjects (experimental animals, cells, virus strains, etc) clearly. Give references to the established method, including statistical methods; provide references and brief description for the methods that have been published but are not will known; Identify all reagents used, including generic name (s), dose (s), and route (s) of administration.

RESULTS

It could place subtitles when needed. In this section, carefully report the rationale or the design of the experiments and the results; reserve extensive interpretation of the results for the Discussion section. Present the results as concisely as possible in one of the following: text, table(s), or figure(s). It should contain the significant statistical data in tables. Illustrations should be limited to those are absolutely necessary to show the experimental findings. Number figures and tables in the order in which they are cited in the text, and be sure to cite all figures and tables. Place the figures and tables in results after the reference section.

Figures: At the bottom of the figure, place Fig. X., X means the sequence number of the figure. If the figure consists of panels, each part should be designated by an unpunctuated uppercase lettering the top left-hand corner, and should be referred to in the legend as (A), (B), (C), etc. The first sentence of the figure legend should function as a brief, stand-alone title to the figure. Following is an example.

Tables: Tables should be drawn by 3 lines. Table title should be placed on the top of the table. In case a description of the table is required, sign a letter of the description point, and make an explanation under the table. Following is an example.

DISCUSSION

An interpretation or analysis of the results in relation to previously published work is required in this section. And it should not contain extensive repetition of the Results section or reiteration of the introduction. In short papers, the Results and Discussion sections may be combined.

Acknowledgments: The source of any financial support received for the work should be indicated in the Acknowledgments section. Recognition of personal assistance should be given as a separate paragraph, as should any statements disclaiming endorsement or approval of the views reflected in the paper or of a product mentioned therein.

References

The reference section must include all journal articles (both print and online), book and book chapters (both print and online), patents, theses and dissertations, and published conference proceedings (not abstracts). Arrange the citations in **alphabetical order** (letter by letter, ignoring spaces and punctuation) by first author's family name and number consecutively. All listed references must be cited by number parenthetically in the text. Unpublished data and personal communications are not accepted. The following is the example:

Quotation in text

However, in practice, vaccinated animals do produce antibodies to some of the NSP's such as 3D and antibodies to others, such as 2C, were found to rapidly fall below detectable levels [8]. The 3ABC proteins appear to be the most promising protein as diagnostic antigens [4,10]. The non-structural proteins (NSPs) of foot-and-mouth disease virus (FMDV) have received considerable attention in recent years with the search for improved serological tests for the virus [3].

The virus neutralization test and liquid phase blocking ELISA (LPBE) are currently the prescribed tests by the OIE [6]. -----

Sequence of References

1. -----
2. -----
3. **Berger H G, Straub O C, Ahl R, et al.** 1990. Identification of foot-and-mouth disease virus replication in vaccinated cattle by antibodies to non-structural virus proteins. **Vaccine**,8:213-216.
4. **Bergmann I E, Malirat E V, Neitzert E, Beck N, et al.** 2000. Improvement of a serodiagnostic strategy for foot-and- mouth disease virus surveillance in cattle under systematic vaccination: a combined system of an indirect ELISA-3ABC with an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay. **Arch Virol**, 145: 473-489.
5. -----
6. **Golding S M, Hedger R S, Talbot P.** 1976. Radial immuno-diffusion and serum nestralsation techniques for the assay of antibodies to swine vesicular disease. **Res Vet Sci**,20(2): 142-147.....
7. -----
8. **Mezencio J M, Babcock G D, Meyer R F, et al.** 1998. Differentiating foot-and-mouth disease virus-infected from vaccinated animals with baculovirus-expressed specific proteins. **Vet Q**, 20, Suppl 2: S11-13.
9. ----
10. **Sorensen K J, Madsen K G, Madsen E S, et al.** 1998. Differentiation of infection from vaccination in foot-and-mouth disease by the detection of antibodies to the non-structural proteins 3D,3AB and 3ABC in ELISA using antigens expressed in baculovirus. **Arch Virol**,143, 1461-1476.

Format of writing references:

Journal: **Authors.** Year. Title. **Journal**, Vol (Issue): Pages.

Book: **Authors.** Year. Title. In: **Book name.** edition(first edition can be omitted), Publishing place: Publishing house. Pages.

Patent literature: **Patent owner.** Patent title. Country of the patent: Patent number. Publishing date

Dissertation: **Author.** Year. **Title**, Place: presentation organization.

Database: **Authors.** year. **Title.** Database.

WebPages: **Authors.** year. **Title.** Website.

List authors or editors up to three and “*et al*” if more than three Chinese references should be translated Chinese into English and place (in Chinese) in the end.

<http://www.springer.com/journal/12250>

B4. REVISTA ARGENTINA DE MICROBIOLOGÍA (Publindex A1)

NUEVAS INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

La Revista Argentina de Microbiología (RAM) es una publicación trimestral editada por la Asociación Argentina de Microbiología y destinada a la difusión de trabajos científicos en las distintas áreas de la Microbiología. La Asociación Argentina de Microbiología se reserva los derechos de propiedad y reproducción del material aceptado y publicado.

REQUISITOS GENERALES

Los manuscritos enviados a esta revista deben constituir informes de investigación original. El envío de un manuscrito implica que los autores tienen las autorizaciones institucionales para proceder a la publicación de los datos y que el mismo manuscrito (u otro de contenido similar) no ha sido previamente publicado (salvo presentaciones parciales en reuniones científicas) ni se encuentra en consideración por otra revista. Los datos originales deberán ser presentados al Comité Editor en caso de ser necesario. Se debe explicitar que los resultados que se muestran provienen de proyectos aprobados por los Comités de Bioseguridad y/o Bioética de las instituciones participantes, así como que respetan la Ley de Habeas Data en caso de incluir datos de pacientes.

PRESENTACIÓN DE LOS ORIGINALES Y DERECHOS DE AUTOR

Los manuscritos deben dirigirse al Comité Editor de la Revista Argentina de Microbiología acompañados de una nota de acuerdo con el siguiente modelo:

“Sres. Comité Editor de la Revista Argentina de Microbiología: en mi carácter de autor responsable declaro que el resto de los autores han acordado que los represente frente a la RAM con respecto al envío del manuscrito ...[Título]... y son responsables junto a mí de su contenido. Este trabajo (u otro de contenido similar) no ha sido publicado previamente ni está siendo considerado en otra revista para su publicación. Asimismo, manifiesto mi conformidad de otorgar los derechos de copia (copyright) a la Revista Argentina de Microbiología, una vez concretada la publicación”.

Todos los autores de un manuscrito deberán acceder explícitamente a su publicación, serán responsables de la veracidad de los contenidos y deberán explicitar su conformidad para que uno de ellos, que es quien suscribirá la nota arriba citada, actúe como autor para la correspondencia a los fines del manejo editorial. Asimismo, los autores manifestarán su conformidad con la posición de cada uno en la lista de autores, en la que se indicará su filiación académica. Un cambio de autor o de orden de autores sólo será considerado si se solicita mediante una nota firmada por todos los autores a tal efecto. En una carta adjunta, los autores deberán especificar la existencia de conflictos de interés que puedan afectar la evaluación del manuscrito. Estos serán confidenciales y mantenidos en reserva por el Comité Editor.

Deben especificarse en la sección agradecimientos las fuentes de financiación para la area experimental descrita en el manuscrito, ya sean éstas institucionales, oficiales o privadas. También se deberán especificar en esta sección las afiliaciones comerciales o los vínculos tales como consultorías, así como la copropiedad de licencias con fines comerciales por parte de uno o más autores.

El material será analizado por el Comité Editor y sometido a la consideración de dos árbitros científicos designados para cada caso. El Comité Editor se reserva el derecho de rechazar aquellos manuscritos cuyos contenidos se superponen total o parcialmente con trabajos ya publicados, o cuyas temáticas no se correspondan con las de la RAM.

Asimismo, son motivos de rechazo la falta de cumplimiento de las reglas editoriales, violaciones éticas, baja calidad científica y un uso pobre del idioma, sea éste inglés o español. El Comité Editor se reserva el derecho de efectuar las modificaciones gramaticales o de estilo que considere necesarias.

ORGANIZACIÓN Y FORMATO

La RAM acepta artículos originales, informes breves, artículos especiales, imágenes microbiológicas, editoriales y también edita suplementos. Se solicita leer cuidadosamente las especificaciones de cada formato a los efectos de elegir el más apropiado y de esta manera agilizar el proceso de evaluación.

Los manuscritos podrán redactarse indistintamente en español o en inglés, aunque el Comité Editor estimula a los autores a escribir los trabajos en inglés para favorecer su difusión y lectura a nivel internacional.

Artículos originales. Son trabajos de investigación completos y deben redactarse respetando las siguientes secciones: Título (en español y en inglés) y Título abreviado, Resumen y Palabras clave (en español y en inglés), Introducción, Materiales y métodos, Resultados, Discusión, Agradecimientos y Bibliografía. El manuscrito no deberá exceder las 8000 palabras incluyendo a todas las secciones, con hasta 6 tablas o figuras.

Informes breves. Son trabajos de menor extensión, entre los que se incluyen casuísticas, casos clínicos y descripciones de técnicas o dispositivos nuevos, avalados por trabajos experimentales concluyentes. Se debe omitir la división del texto en secciones y todo el manuscrito no podrá exceder las 3000 palabras, con un máximo de quince citas bibliográficas y de tres tablas o figuras. Es necesario un análisis cuidadoso de la presentación de los datos para evitar su reiteración en el texto, en las tablas y en las figuras, a fin de mantener la característica de brevedad de este tipo de artículos.

Artículos especiales. Son actualizaciones o consensos de grupos de trabajo acerca de temas de gran interés en el ámbito regional o internacional. Sus autores deben ser especialistas en la materia y el texto debe incluir una revisión bibliográfica amplia y actualizada. Los artículos especiales admiten hasta 10 000 palabras, 8 tablas o figuras y no más de 100 citas bibliográficas.

Imágenes microbiológicas. Pueden corresponder a fotos de bacterias, hongos, parásitos o virus, tomadas de exámenes en fresco o con coloraciones, y observadas bajo microscopía óptica, electrónica o de fluorescencia. También se admiten otras imágenes fotográficas, por ejemplo, microorganismos en medios de cultivo, lesiones ilustrativas en pacientes o en animales de experimentación, imágenes radiográficas y ecográficas, de tomografías computarizadas, de resonancia magnética nuclear, etc.

Estas imágenes, de gran valor didáctico y no necesariamente excepcionales, deben estar acompañadas de un texto explicativo y de flechas indicadoras, cuando corresponda. El conjunto no debe exceder una página impresa. Los requisitos de calidad para el envío de las imágenes se describen bajo el ítem "Figuras".

Cartas al Editor. Pueden corresponder a comentarios o nuevos datos. Los primeros consisten en observaciones sobre los artículos publicados en la revista; los segundos están destinados a comunicar hallazgos concisos que no son apropiados para su publicación como trabajo completo o informe breve. Ambas clases de contribuciones no deben exceder las 500 palabras, deben tener título en español e inglés, no deben llevar resumen y pueden contener no más de una figura o tabla. Los autores y sus filiaciones aparecerán al pie de la carta. Se debe proporcionar solo la filiación primaria de cada autor. Los comentarios deben hacer mención del volumen y el número en que se publicó el artículo comentado, de su título completo y del apellido del primer autor. Asimismo, deben contener referencias bibliográficas que apoyen el argumento de quien envía la carta. Para considerar la publicación de un comentario, se solicitará primero una respuesta al autor de correspondencia del artículo publicado; la aprobación final y publicación de ambas quedará a criterio del editor. En el caso de una contribución presentada como nuevos datos, ésta se asignará a un editor experto en la materia, quien junto con revisores externos se encargará de su evaluación. Se debe tener en cuenta que algunos de los servicios de indexación no incluyen las Cartas al Editor en sus bases de datos.

Editoriales. Abordan tópicos científicos de gran actualidad y particular relevancia para la comunidad científica especializada en la Microbiología, o trabajos de opinión sobre política científica. La oportunidad y autoría de los editoriales, así como sus lineamientos generales, quedan exclusivamente a criterio del Comité Editor.

Suplementos. Corresponden a revisiones extensas de un tema específico realizadas por una o varias sociedades científicas o universidades, o a los resúmenes de las contribuciones efectuadas en el marco de eventos científicos organizados por la Asociación Argentina de Microbiología o alguna de sus Divisiones o Filiales (comunicaciones orales, paneles, conferencias, mesas redondas, etc.). Los suplementos estarán a cargo de editores invitados; sus propuestas temáticas y lineamientos generales deberán ser aceptados por el Comité Editor.

La revisión de los manuscritos correspondientes a los suplementos estará a cargo de revisores elegidos por el Comité Editor (revisiones extensas) y de los editores invitados (resúmenes de eventos). El suplemento deberá ser financiado en su totalidad por la entidad que ha organizado la reunión científica, la que tendrá en cuenta que el suplemento deberá ser accesible a todos los participantes del evento o a todos los socios de la Asociación Argentina de Microbiología (por suscripción y on line). Con respecto a la edición, el suplemento deberá respetar exactamente el formato y el estilo de la Revista Argentina de Microbiología en todos sus aspectos (tapa, tipo de papel, impresión, tablas, figuras, fotos, etc.), tal como se describe en este instructivo. Los suplementos correspondientes a los resúmenes de los eventos deben incluir en este orden: nómina de los miembros del Comité Editor de la Revista Argentina de Microbiología, datos de presentación del evento (título completo, lugar y fecha), índice en español y en inglés, agradecimientos, nómina de las autoridades del evento y mensaje/s del/de los presidente/s. A continuación se presentarán los resúmenes numerados desde el uno con

números arábigos. Al final del suplemento debe incluirse el índice alfabético de autores y las "Instrucciones para los autores" de la Revista Argentina de Microbiología, en español y en inglés. El programa esquemático del evento sólo se podrá incluir en forma de tríptico, suelto en el interior del suplemento.

ELABORACIÓN DE LOS MANUSCRITOS

Los manuscritos se deben escribir en hoja A4 con márgenes de 3 cm de lado. Se deberá utilizar formato de fuente Times New Roman, estilo regular, tamaño 12 puntos, a doble espacio. Las letras en negrita o itálica se usarán sólo cuando corresponda. A partir del resumen, se deberán numerar consecutivamente las páginas (en el ángulo inferior derecho) y las líneas del manuscrito. Esto se aplicará tanto para el texto como para las tablas, figuras y leyendas, y también para la bibliografía. Las páginas correspondientes a las tablas, figuras y leyendas se incluirán después de la sección de bibliografía.

Carátula. En la primera página se debe indicar el título del trabajo (sólo la primera letra en mayúscula, el resto en minúscula); los autores (primer nombre completo, iniciales de los nombres restantes y apellidos completos de todos los autores); lugar de trabajo (nombre de la institución y dirección postal) y título abreviado del trabajo, de hasta 50 caracteres, para cabeza de página. Si el trabajo incluye autores con distintos lugares de trabajo, se colocarán superíndices numéricos (no encerrados entre paréntesis) junto a los nombres, de manera de identificar a cada autor con su respectivo lugar de trabajo. El autor responsable de la correspondencia se indicará con un asterisco en posición de superíndice ubicado junto al nombre; se detallará su dirección de correo electrónico. En aquellos casos en que uno o varios de los autores hayan cambiado de filiación, se debe consignar la filiación donde se realizó el trabajo y al pie de página, su lugar de trabajo actual.

Resúmenes. Se incluirán sólo en los artículos originales, informes breves y artículos especiales y podrán tener una extensión máxima de 250 palabras para los artículos originales y de 150 palabras para los informes breves. El primero de ellos estará redactado en el idioma empleado en el trabajo; el segundo, en el otro idioma y estará encabezado por el título completo del trabajo. Cada uno de ellos estará seguido de una lista de tres a seis palabras clave en el idioma correspondiente. Se debe evitar en los resúmenes el uso de abreviaturas y de citas bibliográficas. Dado que el resumen puede ser publicado separadamente por servicios bibliográficos, se deberá asegurar que resulte comprensible aun en ausencia del texto completo.

Introducción. Debe suministrar suficiente y adecuada información sobre el tema en cuestión, como para permitir su comprensión al lector no especializado. Asimismo debe incluir la hipótesis o la base científica que guió el diseño experimental y los objetivos del

trabajo definidos con claridad. Las referencias citadas en esta sección deberán ser elegidas muy cuidadosamente y ser las más importantes del tema.

Materiales y Métodos. Debe contener una adecuada descripción de los métodos, aparatos, reactivos y procedimientos utilizados, con el detalle suficiente como para permitir la reproducción de los experimentos. Los procedimientos o técnicas comunes y de utilización de rutina pueden citarse por medio de una referencia (ej., determinación de la CIM según el CLSI, 2010). Los métodos nuevos o desarrollados especialmente para el trabajo deben ser descritos con detalle, como así también la fuente de drogas poco comunes o materiales biológicos (cepas bacterianas, virales, fúngicas, plásmidos, etc.). La marca y la procedencia de los reactivos, de los medios de cultivo y de los equipos deben consignarse en el texto la primera vez que se los cita identificando marca, ciudad/estado (si correspondiera) y país de origen.

Resultados. Debe incluir el diseño experimental y su base científica, así como los resultados obtenidos presentados en forma concisa como texto (preferentemente) o como tabla(s) o figura(s). Evite el uso innecesario de tablas y figuras para mencionar datos que podrían ser presentados en el texto. No duplique la misma información incluyéndola en el texto y en las tablas o figuras. Limite el número de fotografías a las mínimas necesarias para mostrar los resultados experimentales. Numere las tablas y figuras en el orden en el que se citan en el texto. Se deben evitar las repeticiones y destacar sólo los datos importantes. Se debe dejar para la sección Discusión la interpretación más extensa.

Discusión. Debe hacer énfasis sobre los aspectos más importantes y novedosos del estudio, e interpretar los datos experimentales obtenidos en relación con los ya publicados. Indique las conclusiones a las que se arribó y evite la reiteración de datos y conceptos ya vertidos en secciones anteriores. Se admite la presentación de Resultados y Discusión como una sección conjunta.

Agradecimientos. Esta sección se debe presentar en un solo párrafo, en un tamaño de letra menor al usado en el texto del manuscrito (Times New Roman, tamaño 11 puntos). Se mencionarán en esta sección las fuentes de financiación y los individuos o instituciones que hayan contribuido con reactivos, materiales biológicos o discusión de resultados. 236 *Revista Argentina de Microbiología* (2006) 38: 49-52

Bibliografía. En todos los manuscritos es conveniente que el 70% de las citas bibliográficas corresponda a los últimos 10 años y el 30% restante se distribuya entre los trabajos clave publicados durante los años anteriores. Las citas bibliográficas se deben escribir en hoja aparte y presentarse en orden alfabético de autores, numeradas correlativamente empleando números arábigos. En el texto, las citas deben aparecer con números entre paréntesis, en correspondencia con el número con que aparecen en la bibliografía. Las referencias a comentarios personales y a trabajos inéditos deberán mencionarse en el texto como comunicación personal, escrito entre paréntesis. Para las referencias, se deberán citar la totalidad de los autores y seguir los siguientes modelos:

a. Publicaciones periódicas

Héritier C, Poirel L, Lambert T, Nordmann P. Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 3198-202.

Los títulos de las revistas serán abreviados según el Index Medicus (el listado puede obtenerse en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=journals>).

b. Capítulos de libros/módulos

Martins Teixeira L, Siqueira Carvalho M da G, Facklam RR. *Enterococcus*. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. *Manual of Clinical Microbiology*, 9th edition. Washington DC, ASM Press, 2007, p. 430-42.

c. Presentaciones en congresos u otros eventos científicos

Aguilar M, Punschke K, Touati D, Pianzola MJ. Estudios fisiológicos y genéticos en la bacteria sulfato reductora *Desulfoarculus baarsii*. Terceras Jornadas Rioplatenses de Microbiología, 1997, Resumen J2, p. 102, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

d. Presentaciones en congresos u otros eventos científicos reproducidas dentro de un suplemento publicado por una revista de publicación periódica.

Fellner MD, Correa RM, Durand K, Teyssié AR, Picconi MA. Análisis del ADN circulante de virus Epstein-Barr (EBV) en pacientes inmunosuprimidos con y sin linfomas asociados. VIII Congreso Argentino de Virología, Resumen 10416. *Rev Argent Microbiol* 2005; 37 Supl 1: 95.

e. Institucionales

Clinical and Laboratory Standards Institute. Disk diffusion. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 15th Informational Supplement, 2005; M100-S15. Wayne, PA, EE.UU.

f. Tesis

Brizzio A. Aplicación de una PCR múltiple para la identificación de cepas de *Staphylococcus aureus* toxigénicas. Tesis de Maestría en Microbiología Molecular 2009. ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" y Universidad Nacional de San Martín.

g. Referencias on line

1. Para libros on line

Sullivan CJ, editor. 1999-2001. *Fungi: an evolving electronic resource for the microbiological community*. ASM Press. [Online]

<http://link.asmus.de/link/service/books/91090>. Consultado el 7 de setiembre de 2001.

2. Para versiones on line de revistas disponibles en forma impresa.

van der Zeiss L, Danziger VB. History of clinical microbiology. *Clin Microbiol* 1999; 100: 123–234. [Online]

3. Para revistas únicamente disponibles on line

Zellnitz F, Foley PM. October 1998, posting {or revision} date. History of virology. *Am Virol J* 1998; 1: 30-50. [Online] <http://www.avj.html>.

4. Para trabajos publicados on line como manuscritos de publicación adelantada

Zheng Z, Zou J. 5 September 2001. The initial step of the glycerolipid pathway: identification of glycerol-3-phosphate/dihydroxy- The initial step of the glycerolipid pathway: identification of glycerol-3-phosphate/dihydroxyacetone phosphate dual substrate acyltransferases in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 10. 1074/jbc.M104749200.

h. Los ítems, referencias a trabajos o a resúmenes de congresos no publicados, en proceso de publicación o bajo revisión; comunicaciones personales; patentes en aplicación o en trámite; bases de datos y páginas web deben ser citadas en el texto entre paréntesis como se muestra:

... resultados similares (Gómez H, resultados no publicados)

... nuevo protocolo de detección empleado (González JL, enviado para su publicación).

... concentraciones de droga (López GO, 34th Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother; abstr. 114, 1994).

... nueva especie de bacteria celulolítica (Márquez W, comunicación personal)

... comentados previamente por diversas fuentes (<http://fcen.uba.edu.ar>)

Tablas. Se presentarán en hoja aparte, numeradas consecutivamente con números arábigos, encabezadas con un breve título explicativo (que en lo posible no reitere los títulos de las filas y las columnas), con las leyendas y/o aclaraciones que correspondan al pie. Las llamadas para las aclaraciones al pie se harán empleando números arábigos entre paréntesis y superíndice. Sólo los bordes externos de la primera y la última fila y la separación entre los títulos de las columnas y los datos se marcarán con línea continua. No se marcarán las filas ni los bordes de las columnas.

Figuras. Se presentarán en hoja aparte, con el número de figura en el margen superior izquierdo y en el orden que aparecen en el texto. Los dibujos deberán estar en condiciones que aseguren una adecuada reproducción. Los números, letras y signos tendrán dimensiones adecuadas para ser legibles cuando se hagan las reducciones necesarias. Las referencias de los símbolos utilizados en las figuras deberán incluirse dentro de la misma figura y no en el texto de la leyenda. Las fotografías podrán ser realizadas en color o en blanco y negro, en el formato JPEG o TIFF. Las resoluciones mínimas requeridas son 300 dpi para las imágenes y fotografías en color y escala de grises, 600 dpi para las imágenes de arte de combinación (letras e imágenes) y 1200 dpi

para las imágenes de arte de línea (gráficos y dibujos). Nota: es muy importante que se use una adecuada resolución de archivo. Todas las imágenes individuales que se importan en un archivo gráfico deben estar en la resolución correcta antes de su carga. Tenga en cuenta, sin embargo, que cuanto mayor sea la resolución más grande será el archivo y más tiempo demandará su envío por medios electrónicos. Las leyendas de las figuras se presentarán reunidas en una hoja aparte, ordenadas consecutivamente con números arábigos.

Secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos. Las secuencias nuevas comunicadas a través de la publicación en esta revista deberán ser depositadas en una base de datos y sus números de acceso incluidos en el manuscrito, no más tarde de la etapa de revisión. Los números de acceso deberán ser incorporados en un párrafo separado al final de la sección "Materiales y métodos" en el caso de trabajos originales, o luego del texto en el caso de informes breves. La información sobre bases de datos actualmente disponibles es la siguiente:

DDBJ: Center for Information Biology and DNA Data Bank of Japan National Institute of Genetics; e-mail: ddbj@ddbj.nig.ac.jp; URL, <http://www.ddbj.nig.ac.jp237>

EMBL: EMBL Nucleotide Sequence Submissions, European Bioinformatics Institute; e-mail: datasubs@ebi.ac.uk; URL, <http://www.ebi.ac.uk>

GenBank: National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine; e-mail: info@ncbi.nlm.nih.gov; URL, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

En lo que respecta a la presentación de nuevas secuencias de ácidos nucleicos, aquellas de hasta 50 nucleótidos pueden ser presentadas en cualquier estilo. Las secuencias de longitud importante deben ser presentadas como Figuras para reducir espacio, indicando 80 a 120 nucleótidos por línea, en un tipo de letra que lo haga fácilmente legible en las condiciones de publicación (16 cm, ancho de dos columnas de la RAM). De ser posible, se dividirán las líneas de la secuencia en bloques de 10 o 20 nucleótidos separados por un espacio o por números indicativos encima de la secuencia. Las líneas deberán estar numeradas, indicando el número correspondiente a la izquierda de la primera base de cada línea. Las anotaciones necesarias se marcarán en negrita, subrayadas o entre paréntesis. Si se requiriere presentar la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia nucleotídica, se indicará mediante el uso de símbolos de una letra aceptados como indicativos de aminoácidos, los que se localizarán debajo del primer nucleótido del codón codificante.

Siglas. Las siglas y demás abreviaciones (cuando esto corresponda) deberán ser explicitadas después de su primera mención en el texto. Las unidades de medida se expresarán siguiendo las normas del *Système International d'Unités*.

ENVÍO DE LOS MANUSCRITOS

Los manuscritos podrán ser enviados por correo electrónico (ram@aam.org.ar) o por correo postal (Deán Funes 472, C1214AAD, Ciudad Autónoma de Buenos Aires,

Argentina), incluyendo una versión electrónica en CD-ROM, el que deberá estar identificado con una etiqueta o rótulo que indique el nombre del trabajo y los programas (y versiones) usados para confeccionar el texto, las figuras y las fotografías, así como el nombre de los archivos que contiene.

Se recomienda incluir todo el texto del artículo en un solo archivo; en caso de haber imágenes, éstas deben enviarse en archivos separados. Se recomienda además tipear las mayúsculas, los espacios entre palabras, las itálicas y las negritas tal como se desea se muestren luego en el impreso; no dejar espacios antes y después de los subtítulos; justificar el texto y usar la tecla de tabulación y no la barra espaciadora para encolumnar las tablas.

Se recomienda a los autores revisar la lista de chequeo que figura a continuación de estas instrucciones y verificar que se ha cumplido con todos los requisitos allí señalados. Antes de enviar un manuscrito, es también recomendable consultar algún ejemplar reciente de la RAM para verificar si se han seguido las pautas requeridas de formato y estilo y, eventualmente, efectuar las modificaciones necesarias.

Se aconseja a los autores eliminar de las propiedades de los archivos que envíen todo tipo de información que identifique su autoría.

PROCESO EDITORIAL

Una vez que el manuscrito ha cumplido el proceso editorial y se encuentra listo para su publicación, se enviará por correo electrónico al autor responsable el archivo en formato pdf de la prueba de galera, para que realice las correcciones tipográficas que correspondieran. No podrá cambiar conceptos ni modificar párrafos que alteren el formato de la impresión. Se deberá imprimir el documento, realizar las correcciones sobre el texto y devolverlo por fax o como archivo escaneado por correo electrónico. Las correcciones también pueden ser enviadas por correo electrónico, especificando claramente la página, el párrafo y la línea que se desea corregir. La corrección deberá ser devuelta en un plazo no superior a los siete días corridos de remitida la prueba de galera, caso contrario se considerará como declinada su publicación. En ese momento se le enviará al autor el monto que deberá abonar para que el artículo pueda ser publicado.

La Revista Argentina de Microbiología apoya las políticas para el registro de ensayos clínicos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y del International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), reconociendo la importancia de estas iniciativas para el registro y la divulgación internacional de información sobre estudios clínicos, en acceso abierto. En consecuencia, solamente se aceptarán para publicación los artículos de investigaciones clínicas que hayan recibido un número de identificación en uno de los Registros de Ensayos Clínicos validados por los criterios establecidos por la OMS y el ICMJE, cuyas direcciones están disponibles en el sitio del ICMJE. El número de identificación se deberá registrar al final del resumen.

Costo de la página. Por cada página publicada se cobrarán \$ 75 o \$ 200 si ésta incluye fotografías en color (Argentina, socios de la AAM), \$ 200 o \$ 600 (Argentina, no socios de la AAM) y USD 70 o USD 180 (otros países).Separatas. Se suministrarán 25 separatas sin cargo.

Secretaria: Deán Funes 472, (C1214AAD) Ciudad Autónoma de Buenos Aires - Argentina; Tel.: (54-11) 4932-8858 y (54-11) 4932-8948; e-mail: info@aam.org.ar; <http://www.aam.org.ar> enviándonos la fotocopia, idem instrucciones para Bco. Galicia.

Bibliografía

1. Abdelmagid OY, Mansour MM, Minocha HC, Van Drunen Littel-van den Hurk S. Evaluation of baculovirus-expressed bovine herpesvirus-1 (BHV-1) glycoproteins for detection and analysis of BHV-1-specific antibody responses. *Vet Microbiol.* 1998; 61:249-59.
2. Abdelmagid OY, Mansour MM, Okwumabua O, van Drunen Littel-van den Hurk S. Expression and cellular distribution of baculovirus-expressed bovine herpesvirus 1 (BHV-1) glycoprotein D (gD) sequences. *Arch Virol.* 1998b;143:2173-87.
3. Abril C, Engels M, Liman A, et al. Both viral and host factors contribute to neurovirulence of bovine herpesviruses 1 and 5 in interferon receptor deficient mice. *J Virol*, 2004;78 (7):3644–3653.
4. Ackermann M, Engels M. Pro and contra IBR-eradication. *Vet Microbiol.* 2006;113:293-302.
5. Arboleda J, Bedoya J, Rodas J, Acevedo J, Ossa J. Estudio virológico y epidemiológico de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina en un hato lechero en Antioquia. *Acovez.* 1993;34-35.
6. Babiuk LA, van Drunen Littel-van den Hurk S, Tikoo SK, Immunology of Bovine herpesvirus 1 infection. *Vet Microbiol.* 1996;53, 31-42.
7. Bahnemann HG. Inactivation of viral antigens for vaccine preparation with particular reference to the application of binary ethylenimine. *Vaccine*, 1990; 8:299-303
8. Betancur B, González, Reza L. Seroepidemiología de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina en el Municipio de Montería, Colombia. *Rev.MVZ Córdoba* 2006;11:830-836
9. Bielanski A, Dubuc C. In-Vitro Fertilization and Culture of Ova from Heifers Infected with Bovine Herpesvirus-1 (BHV-1). *Theriogenology* 1994; 41:1211-1217.
10. Bielanski A, Loewen KG, Hare WCD.. Inactivation of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) from in vitro infected bovine semen. *Theriogenology* 1988; 30 (4):649-656.
11. Boelaert F, Biront P, Soumare B, Dispas M, Vanopdenbosch E, Vermeersch JP, et al., Prevalence of bovine herpesvirus-1 in the Belgian cattle population. *Prev Vet Med.* 2000;45:285-95.
12. Boelaert F, Speybroeck N, de Kruif A, Aerts M, Burzykowski T, Molenberghs G, Berkvens DL. Risk factors for bovine herpesvirus-1 seropositivity. *Prev Vet Med.* 2005;69:285-95.
13. Bosch JC, DE Jong MC, Franken P, Frankena K, Hage et al., An inactivated gE-negative marker vaccine and an experimental gD-subunit vaccine reduce the incidence of bovine herpesvirus 1 infections in the field. *Vaccine* 1998; 16: 265-71.
14. Branco FJ, Fraser NW. Herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript expression protects trigeminal ganglion neurons from apoptosis. *J. Virol.* 2005;79:9019-9025.
15. Bratanich AC, Jones C. Localization of cis-acting sequences in the latency-related promoter of bovine herpesvirus 1 which are regulated by neuronal cell type factors and immediate-early genes. *J. Virol.* 1992; 68:6099-6106.

16. Büchen-Osmond C. Alphabetical List of ICTV approved Virus Families and Genera. Created April, 1995. Última actualización: 8 de abril de 1998. Revisado Noviembre de 2011.
17. Byrd CM, Hruby DE. Construction of recombinant vaccinia virus: cloning into the thymidine kinase locus. *Methods Mol Biol.* 2004;269:31-40.
18. Caron L, Flores EF, Weiblen R, Scherer CF, Irigoyen LF, Roehe PM, Odeon A, Sur JH. Latent infection by bovine herpesvirus type-5 in experimentally infected rabbits: virus reactivation, shedding and recrudescence of neurological disease. *Vet Microbiol.* 2002;84(4):285-95.
19. Castrucci G, Frigeri F, Salvatori D, Ferrari M, Lo Dico M, Rotola A, Sardomini Q, Petrini S, Cassai E. A study on latency in calves by five vaccines against bovine herpesvirus-1 infection. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 2002;25:205-215.
20. Chaparro JJ, Ramirez G, Vera V, Gongora A, Villamil LC. Aislamiento de una cepa de campo del virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina en una explotación de ganado de carne en el departamento del Meta. *Revista Orinoquia,* 2002;6:100-107.
21. Chaparro JJ. Evaluación de la capacidad infectiva de una cepa de campo del virus de la rinotraqueitis bovina infecciosa en terneros. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 2003.
22. Chowdhury SI, Ross CS, Lee BJ, Hall V, Chu HJ. Construction and characterization of a glycoprotein E gene-deleted bovine herpesvirus type 1 recombinant. *Am J Vet Res.* 1999; 60:227-232
23. Chowdhury SI. 1996 Construction and characterization of an attenuated bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) recombinant virus. *Vet Microbiol,* 52(1-2):13-23.
24. Chung H, Kim TW, Kwon M, Kwon IC, Jeong SY. Oil components modulate physical characteristics and function of the natural oil emulsions as drug or gene delivery system. *J Control Release.* 2001;71(3):339-50.
25. Ciacci-Zanella J, Stone M, Henderson G, Jones C. The latency-related gene of bovine herpesvirus 1 inhibits programmed cell death. *J. Virol.* 1999;73:9734-9740.
26. CIAT - Centro Internacional de Agricultura Tropical. Informe anual de salud animal; 1972.
27. CIAT - Centro Internacional de Agricultura Tropical. Informe anual de salud animal; 1975.
28. Connolly SA, Whitbeck JJ, Rux AH, Krummenacher C, van Drunen Littel-van den Hurk S, Cohen GH, Eisenberg RJ. Glycoprotein D homologues in herpes simplex virus type 1, pseudorabies virus and bovine herpesvirus-1 bind directly to human HveC (nectin-1) with different affinities. *Virology.* 2001; 280:7-18.
29. Cox GJ, Zamb TJ, Babiuk LA. Bovine herpesvirus 1: immune responses in mice and cattle injected with plasmid DNA. *J Virol.* 1993; 67: 5664-7
30. D'Arce RC, Almeida RS, Silva TC, et al. 2002. Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5. *Vet Microbiol,* 88:315-24.
31. Dasika DK, Letchworth III GJ. Homologous and heterologous interference requires bovine herpesvirus-1 gD on the cell surface during virus entry. *J. Gen. Virol.* 2000;81: 1041-1049.
32. Dasika GK, Letchworth GJ 3rd. Cellular expression of bovine herpesvirus 1 gD inhibits cell-to-cell spread of two closely related viruses without blocking their primary infection. *Virology,* 1999;254(1):24-36.

33. Delhon G, Jones C. Identification of DNA sequences in the latency related promoter of bovine herpes virus type 1 which are bound by neuronal specific factors. *Virus Res.* 1997;51:93–103.
34. DesCôteaux L, Cécyre D, Elsener J, Beauchamp G. Comparison of humoral immune responses in dairy heifers vaccinated with 3 different commercial vaccines against bovine viral diarrhea virus and bovine herpesvirus-1. *Can Vet J.* 2003;44(10):816-21.
35. Devireddy LR, Jones C. Activation of caspases and p53 by bovine herpesvirus 1 infection results in programmed cell death and efficient virus release. *J. Virol.* 1999; 73:3778–378
36. Devireddy LR, Jones C. Alternative splicing of the latency related transcript of bovine herpesvirus 1 yields RNAs containing unique open reading frames. *J. Virol.* 1998;72:7294–7301.
37. Devireddy LR, Zang Y, Jones C. Cloning and initial characterization of an alternatively spliced transcript encoded by the bovine herpes virus 1 latency-related gene. *J. Neurovirol.* 2003;9:612-622.
38. Donofrio G, Cavirani S, Vanderplasschen A, Gillet L, Flammini CF. Recombinant bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) expressing glycoprotein D of BoHV-1 is immunogenic and elicits serum-neutralizing antibodies against BoHV-1 in a rabbit model. *Clin Vaccine Immunol* 2006;13:1246-54.
39. Donofrio G, Sartori C, Franceschi V, Capocéfalo A, Cavirani S, Taddei S, Flammini CF. Double immunization strategy with a BoHV-4-vectorialized secreted chimeric peptide BVDV-E2/BoHV-1-gD. *Vaccine.* 2008;26(48):6031-42.
40. Dry I, Haig DM, Inglis NF, et al. 2008. Proteomic analysis of pathogenic and attenuated alcelaphine herpesvirus 1. *J Virol*, 82(11):5390-5397.
41. Duque H, Marshall RL, Israel BA, Letchworth GJ. Effects of formalin inactivation on bovine herpes virus-1 glycoproteins and antibody response elicited by formalin-inactivated vaccines in rabbits. *Vaccine.* 1989;7(6):513-20.
42. Engels M, Giuliani C, Wild P, et al. The genome of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) strains exhibiting a neuropathogenic potential compared to known BHV-1 strains by restriction site mapping and cross-hybridization. *Virus Res*, 1986;6(1):57–73.
43. Esposito JJ, Knight JC, Shaddock JH, Novembre FJ, Baer GM. Successful oral rabies vaccination of raccoons with raccoon poxvirus recombinants expressing rabies virus glycoprotein. *Virology* 1988;165(1):313-6.
44. Esposito JJ, Sumner JW, Brown DR, Ebert JW, Shaddock JH, Bai XH, Dobbins JG, Fekadu M. Raccoon poxvirus rabies-glycoprotein recombinant oral vaccine for wildlife: further efficacy and safety studies and serosurvey for raccoon poxvirus. In: Brown F, Chanock RM, Ginsberg H, Lerner RA (eds), *Vaccines-91: modern approaches to new vaccines including prevention of AIDS*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp 321-330. 1992
45. Ferrer MF, Del Médico Zajac MP, Zanetti FA, Valera AR, Zabal O, Calamante G. Recombinant MVA expressing secreted glycoprotein D of BoHV-1 induces systemic and mucosal immunity in animal models. *Viral Immunol.* 2011;24(4):331-9.
46. Fraefel C, Zeng J, Choffat Y, Engels M, Schwyzer M, Ackermann M. Identification and zinc dependence of the bovine herpesvirus 1 transactivator protein BICP0. *J. Virol.* 1994;68:3154–3162.

47. Fuchs M, Hubert P, Detterer J, Rziha HJ. Detection of bovine herpesvirus type 1 in blood from naturally infected cattle by using a sensitive PCR that discriminates between wild-type virus and virus lacking glycoprotein E. *J Clin Microbiol.* 1999;37:2498-507
48. Galosi CM, Barbeito CG, Vila Roza MV, et al. Argentine strain of equine herpesvirus 1 isolated from an aborted foetus shows low virulence in mouse respiratory and abortion models. *Vet Microbiol.* 2004;103:1-12.
49. Geiser V, Inman M, Zhang Y, Jones C. The latency-related gene of bovine herpesvirus-1 can inhibit the ability of bICP0 to activate productive infection. *J. Gen. Virol.* 2002;83:2965-2971.
50. Geiser V, Jones C. Localization of sequences within the latency-related gene of bovine herpesvirus 1 that inhibit mammalian cell growth. *J Neurovirol.* 2005;11:563-570.
51. Geiser V, Zhang Y, Jones C. Characterization of a BHV-1 strain that does not express the major regulatory protein, bICP0. *J. Gen. Virol.* 2005;86:1987-1996.
52. Geraghty RJ, Krummenacher C, Cohen GH, Eisenberg RJ, Spear PG. Entry of alphaherpesvirus mediated by poliovirus receptor-related protein-1 and poliovirus receptor. *Science.* 1998;280:1618-1620.
53. Gillet L, Daix V, Donofrio G, Wagner M, Koszinowski UH, China B, et al. Development of bovine herpesvirus 4 as an expression vector using bacterial artificial chromosome cloning. *J Gen Virol.* 2005; 86:907-917
54. Gogev S, de Fays K, versali MF, Gautier S, Thiry E. Glycol chitosan improves the efficacy of intranasally administrated replication defective human adenovirus type 5 expressing glycoprotein D of bovine herpesvirus 1. *Vaccine.* 2004a; 22: 1946-53
55. Gogev s, Georgin JP, Schynts F, Vanderplasschen A, Thiry E. Bovine herpesvirus 1 glycoprotein D expression in bovine upper respiratory tract mediated by a human adenovirus type 5. *Vet Res.* 2004b; 35:715-21
56. Gogev S, Vanderheijden N, Lemaire M, Schynts F, D'Offay J, Deprez I, Adam M, Eloit M, Thiry E. Induction of protective immunity to bovine herpesvirus type 1 in cattle by intranasal administration of replication-defective human adenovirus type 5 expressing glycoprotein gC or gD. *Vaccine.* 2002; 20:1451-65
57. Gongora A, Villamil LC, Vera V, Parra JL, Ramirez GC, Lopez G. Aislamiento de un herpesvirus bovino tipo-1 (BHV-1) de secrecion nasal y esmegma prepucial en un toro reproductor. *Rev Med Vet.* 1995; 63:43 - 47.
58. Góngora A, Villamil LC, Vera V, Ramírez G, Parra J. Diagnóstico de las principales enfermedades reproductivas en toros de la Sabana de Bogotá. Énfasis en RIB. *Rev Med Vet Zoot* 1995; 43: 37-41
59. Griffiths IB, Gallego MI, Villamil LC. Factores de infertilidad y pérdidas económicas en ganado de leche en Colombia. Publicaciones ICA. p.168, 1982.
60. Guthrie AJ, Quan M, Lourens CW, Audonnet JC, Minke JM, Yao J, He L, Nordgren R, Gardner IA, Maclachlan NJ. Protective immunization of horses with a recombinant canarypox virus vectored vaccine co-expressing genes encoding the outer capsid proteins of African horse sickness virus. *Vaccine.* 2009;27(33):4434-8.
61. Hage JJ, Glas RD, Westra HH, Maris-Veldhuis MA, van Oirschot JT, Rijsewijk FA. Reactivation of latent bovine herpesvirus 1 in cattle seronegative to glycoproteins gB and gE. *Vet. Microbiol.* 1998;60:87-98.

62. Hanon E, Keil G, van Drunen Littel-van den Hurk S, Gabriel P, Vanderpalsschen A, Rijsewijk FA, Babiuk LA, Pastoret PP. Bovine herpesvirus-1-induced apoptotic cell death: role of glycoprotein D. *Virology*. 1999;257:191-197.
63. Hanon E, Meyer G, Vanderpalsschen A, Dessy-Doize C, Thirty E, Pastoret PP. Attachment but not penetration of bovine herpesvirus-1 is necessary to induce apoptosis in target cells. *J. Virol.* 1998;72:7638-41.
64. Henderson G, Perng GC, Nesburn AB, Wechsler SL, Clinton C. The latency-related gene encoded by bovine herpesvirus 1 can suppress caspase 3 and caspase 9 cleavage during productive infection. *J. Neurovirol*, 2004a;10:64-70.
65. Henderson G, Zhang Y, Inman M, Jones D, Jones C. Infected cell protein 0 encoded by bovine herpesvirus 1 can activate caspase 3 when overexpressed in transfected cells. *J. Gen. Virol.* 2004b;85:3511-3516.
66. Hierholzer JC, Killington RA. 1996. Virus isolation and quantitation. In: Mahy, B.W.J. and Kangro, H.O. Editors, *Virology methods manual* Academic Press, London, pp. 25–46.
67. Higaki S, Gebhardt BM, Lukiw WJ, Thompson HW, Hill JM. Effect of Immunosuppression on Gene Expression in the HSV-1 Latently Infected Mouse Trigeminal Ganglion. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2002;43: 1862 – 1869.
68. Hossain A, Schang LM, Jones C. Identification of gene products encoded by the latency-related gene of bovine herpesvirus 1. *J. Virol.* 1995; 69:5345–5352.
69. Hunter E. 2001. Virus Assembly. Chapter 8. In: Knipe DM., Howley PM. *Fields` Virology* edition 4th, Vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. Pp 171-197.
70. Hwa SH, Iams KP, Hall JS, Kingstad BA, Osorio JE. Characterization of recombinant raccoonpox vaccine vectors in chickens. *Avian Dis.* 2010;54(4):1157-65.
71. ICA - Subgerencia de Protección Animal, Dirección Técnica de Inocuidad e Insumos Veterinarios, productos biológicos con registro vigente a 15 marzo de 2011. Bogotá 2011.
72. Inman M, Lovato L, Doster A, Jones C. A mutation in the latency related gene of bovine herpesvirus 1 interferes with the latency-reactivation cycle of latency in calves. *J. Virol.* 2002;76:6771–6779.
73. Inman M, Zhang Y, Geiser V, Jones C. The zinc ring finger in the bICP0 protein encoded by bovine herpes virus-1 mediates toxicity and activates productive infection. *J Gen Virol.* 2001b;82:483-492.
74. Inman M. Lovato L. Doster A. Jones C. A mutation in the latency-related gene of bovine herpesvirus 1 leads to impaired ocular shedding in acutely infected calves. *J. Virol.* 2001a;75:8507–8515.
75. Inman M. Zhou J. Webb H. Jones C. Identification of a novel transcript containing a small open reading frame that is expressed during latency, and is antisense to the latency related gene of bovine herpes virus 1 (BHV-1). *J. Virol.* 2004;78:5438–5447.
76. INTA. 2005. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Desarrollo de nuevas tecnologías para estudio de patogenicidad de virus genéticamente modificados. En: <http://www.inta.gov.ar/virologia/investiga/proyectos/ar1.htm> Revisado en Julio de 2009.
77. Ioannou XP, Griebel P, Hecker R, Babiuk LA, van Drunen Littel-van den Hurk S. The immunogenicity and protective efficacy of bovine herpesvirus 1 glycoprotein D plus Emulsigen are increased by formulation with CpG oligodeoxynucleotides. *J Virol.* 2002;76:9002-10.

78. Jacob RJ, Price R, Bouchey D, et al. Temperature sensitivity of equine herpesvirus isolates: a brief review. *SAAS Bull Biochem Biotechnol*, 1990; 3:124-128.
79. Jiang Y, Hossain A, Winkler MT, Holt T, Doster A, Jones C. A protein encoded by the latency-related gene of bovine herpesvirus 1 is expressed in trigeminal ganglionic neurons of latently infected cattle and interacts with cyclin-dependent kinase 2 during productive infection. *J. Virol.* 1998;72:8133–8142.
80. Jiang Y, Inman M, Zhang Y, Posadas NA, Jones C. A mutation in the latency related gene of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) inhibits protein expression of a protein from open reading frame 2 (ORF-2) and an adjacent reading frame during productive infection. *J. Virol.* 2004;78:3184–3189.
81. Jones C, Delhon G, Bratanich A, Kutish G, Rock D. Analysis of the transcriptional promoter which regulates the latency-related transcript of bovine herpesvirus 1. *J. Virol.* 1990;64:1164–1170.
82. Jones C, Geiser V, Henderson G, Jiang Y, Meyer F, Perez S, Zhang Y. Functional analysis of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) genes expressed during latency. *Vet. Microbiol.* 2006;113:199-210.
83. Jones C. Herpes Simplex Virus Type 1 and Bovine Herpesvirus 1 Latency. *Clin. Microbiol. Rev.* 2003;16:79-95.
84. Jubb K. 1993. Pathology of domestic animals. 4th edition. Academic Press Inc. San Diego, California, PP 177-179.
85. Kaashoek MJ, Rijsewijk FA, Ruuls RC, et al. Virulence, immunogenicity and reactivation of bovine herpesvirus 1 mutants with a deletion in the gC, gG, gI, gE, or in both the gI and gE gene. *Vaccine*, 1998;16(8):802-9.
86. Kaashoek MJ, Straver PH, Van Rooij EM et al. Virulence, immunogenicity and reactivation of seven bovine herpesvirus 1.1 strains: clinical and virological aspects. *Vet Rec*, 1996;139:416-21.
87. Kaashoek MJ, van Engelenburg FA, Moerman A, et al. Virulence and immunogenicity in calves of thymidine kinase- and glycoprotein E-negative bovine herpesvirus 1 mutants. *Vet Microbiol*, 1996;48(1-2):143-53.
88. Kamaraj G, Rana SK, Srinivasan VA. Serological response in cattle immunized with inactivated oil and Algel adjuvant vaccines against infectious bovine rhinotracheitis. *New Microbiol.* 2009;32(2):135-41.
89. Kowalski J, Gilbert SA, van Drunen-Littel-van den Hurk S, van den Hurk J, Babiuk LA, Zamb TJ. Heat-shock promoter-driven synthesis of secreted bovine herpesvirus glycoproteins in transfected cells. *Vaccine.* 1993;11:1100-7
90. Kutish G, Mainprize T, Rock D. Characterization of the latency-related transcriptionally active region of the bovine herpesvirus 1 genome. *J. Virol.* 1990;64:5730–5737.
91. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680-685.
92. Larson LJ, Schultz RD. Three-year serologic immunity against canine parvovirus type 2 and canine adenovirus type 2 in dogs vaccinated with a canine combination vaccine. *Vet Ther.* 2007;8(4):305-10.
93. Lemaire M, Meyer G, Branowsky E, Schynts F, Wellemans G, Kerkhofs P, Thiry E. Production of Bovine Herpesvirus Type 1-Seronegative Latent Carriers by Administration of a Live-Attenuated Vaccine in Passively Immunized Calves. *J. Clin. Microbiol.* 2000a;38:4233-4238.

94. Lemaire M, Schynts F, Meyer G, Georgin GP, Branowsky E, Gabriel A, Ros C, Belak S, Thiry E. Latency and reactivation of a glycoprotein E negative bovine herpesvirus type 1 vaccine: influence of virus load and effect of specific maternal antibodies. *Vaccine*. 2001;9:4795-4804.
95. Lemaire M, Weynants V, Godfroid J, Schynts F, Meyer G, Letesson JJ, Thiry E.. Effects of bovine herpesvirus type 1 infection in calves with maternal antibodies on immune response and virus latency. *J. Clin. Microbiol.* 2000b;38:1885–1894.
96. Lesko J, Veber P, Hrda M, Feketeova. Large scale production of infectious bovine rhinotracheitis virus in cell culture on microcarriers. *Acta Virol.* 1993;37: 73-78.
97. Li Y, Liang X, van Drunen Littel-van den Hurk S, Attah-Poku S, Babiuk LA. Glycoprotein Bb, N-terminal subunit of bovine herpesvirus-1 glycoprotein B, can bind to heparan sulfate on the surfaces of Madin-Darby bovine kidney cells. *J. Virol.* 1996;70:2032-2037.
98. Li Y, van Drunen Littel-van den Hurk S, Babiuk LA, Liang X. Characterization of cell binding properties of bovine herpesvirus-1 glycoprotein B, C and D: Identification of a dual cell binding cell function of gB. *J. Virol.* 1995;69:4758-4768.
99. Lovato L, Inman M, Henderson G, Doster A, Jones C. Infection of cattle with a bovine herpesvirus 1 (BHV-1) strain that contains a mutation in the latency related gene leads to increased apoptosis in trigeminal ganglia during the transition from acute infection to latency. *J. Virol.* 2003;77:4848–4857.
100. Mars MH, de Jong MCM, Franken P, van Oirschot JT. Efficacy of a live glycoprotein E-negative bovine herpesvirus 1 vaccine in cattle in the field, *Vaccine*, 2001;19:1924-1930.
101. Marshall RL, Israel BA, Letchworth GJ 3rd. Monoclonal antibody analysis of bovine herpesvirus-1 glycoprotein antigenic areas relevant to natural infection. *Virology*, 1988;165:338-347.
102. Mencher JS, Smith SR, Powell TD, Stinchcomb DT, Osorio JE, Rocke TE. Protection of black-tailed prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*) against plague after voluntary consumption of baits containing recombinant raccoon poxvirus vaccine. *Infect Immun.* 2004;72(9):5502-5.
103. Meurens F, Schynts F, Keil GM, Muylkens B, Vanderplasschen A, Gallego P, Thiry E. Superinfection prevents recombination of the alphaherpesvirus bovine herpesvirus-1. *J Virol.* 2004;78:3872-3879.
104. Meyer F, Perez S, Geiser V, Sintek M, Inman M, Jones C. A protein encoded by the bovine herpesvirus 1 latency-related gene interacts with specific cellular regulatory proteins, including CCAAT enhancer binding protein alpha. *J. Virol.* 2007;81:59-67.
105. Miller JM, Whetstone CA, Bello JJ, Lawrence WC. Determination of ability of a thymidine kinase-negative deletion mutant of bovine herpesvirus-1 to cause abortion in cattle. *Am J Vet.* 1991;52:1038-1043.
106. Miller JM, Whetstone CA, Bello JJ, Lawrence WC. Determination of ability of a thymidine kinase-negative deletion mutant of bovine herpesvirus-1 to cause abortion in cattle. *Am. J. Vet.* 1991.52:1038-1043.
107. Miller JM, Whetstone CA, Van der Maaten MM. 1991. Abortifacient property of bovine herpesvirus type 1 isolates that represent three subtypes determined by restriction endonuclease analysis of viral DNA. *Am J Vet Res*, 52:458-461.
108. Misra V, Walker S, Hayes S, O'Hare P. The bovine herpesvirus alpha gene trans-inducing factor activates transcription by mechanisms different from those of its herpes simplex virus type 1 counterpart VP16. *J. Virol.* 1995;69:5209–5216.

109. Mittal SK, Papp Z, Tikoo SK, Baca-Estrada ME, Yoo D, Benko M, Babiuk LA. Induction of systemic and mucosal immune responses in cotton rats immunized with human adenovirus type 5 recombinants expressing the full and truncated forms of bovine herpesvirus type 1 glycoprotein gD. *Virology*. 1996; 222: 299-309.
110. Molano D, Rodríguez JL, Ramírez G, Villamil LC. Caracterización electroforética e inmunológica de una cepa de campo del virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina y su comparación con cepas de referencia. *Rev Med Vet Zootec*. 1996. 44:35-8.
111. Muylkens B, Meurens F, Schynts F, DE Fays K, Pourchet A, Thiry J, et al. Biological characterization of bovine herpesvirus 1 recombinants possessing the vaccine glycoprotein E negative phenotype. *Vet Microbiol*. 2006a; 31;113:283-91
112. Muylkens B, Meurens F, Schynts F, Farnir F, Pourchet A, Bardiau M, Gogev S, Thiry J, Cuisenaire A, Vanderplasschen A, Thiry E. Intraspecific bovine herpesvirus 1 recombinants carrying glycoprotein E deletion as a vaccine marker are virulent in cattle. *J Gen Virol*. 2006;87(8):2149-54.
113. Mweene AS, Okazaki K, Kida H. Detection of viral genome in non-neural tissues of cattle experimentally infected with bovine herpesvirus 1. *Jpn. J. Vet. Res*. 1996;44:165–174.
114. OMS-OPS. Centro Panamericano de Zoonosis. Primer seminario sobre rabia paralítica de las Américas. Buenos Aires, Argentina. 1976.
115. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (2004). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, 5a edición. OIE, París, 1178 págs.
116. Orjuela J, Navarrete M, Betancourt A, Roqueme L, Cortez E, Morrison RB. Salud y productividad en bovinos de la costa norte de Colombia. *World Animal Review*. 1991; 69.
117. Osorio JE, Frank RS, Moss K, Taraska T, Powell T, Stinchcomb DT. Raccoon poxvirus as a mucosal vaccine vector for domestic cats. *J Drug Target*. 2003;11(8-10):463-70.
118. Osorio JE, Powell TD, Frank RS, Moss K, Haanes EJ, Smith SR, Rocke TE, Stinchcomb DT. Recombinant raccoon pox vaccine protects mice against lethal plague. *Vaccine*. 2003;21(11-12):1232-8.
119. Otte E, Navarrete M, Orjuela J. Resultados de una encuesta realizada sobre producción y salud animal en Montería-Córdoba, Colombia. 1982-1984: parte II. Proyecto Colombo Alemán ICA-GTZ. Informe técnico. 1985; p.1-125.
120. Papp Z, Babiuk LA, Baca-Estrada ME. The effect of pre-existing adenovirus-specific immunity on immune responses induced by recombinant adenovirus expressing glycoprotein D of bovine herpesvirus type 1. *Vaccine*. 1999; 17: 933-43
121. Parreño V, López MV, Rodríguez D, Vena MM, Izuel M, Filippi J, Romera A, Faverin C, Bellinzoni R, Fernandez F, Marangunich L. Development and statistical validation of a guinea pig model for vaccine potency testing against Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) virus. *Vaccine*. 2010;28(13):2539-49.
122. Pastoret PP, Burtonboy G, Aguilar-Setiena A, et al. Comparison between strains of infectious bovine rhinotracheitis virus (Bovine herpesvirus-1), from respiratory and genital origins, using polyacrylamide gel electrophoresis of structural proteins. *Vet Microbiol*, 1980;5:187-194.
123. Patel JR. Evaluation of a quadrivalent inactivated vaccine for the protection of cattle against diseases due to viral infections. *J. South African Vet. Assoc*. 2004;75(3):137-146.

124. Patel JR. Relative efficacy of inactivated bovine herpesvirus-1 (BHV-1) vaccines. *Vaccine*. 2005; 23(31):4054-61.
125. Peralta A, Molinari MP, Taboga O. Baculovirus recombinantes como inmunogenos. *Rev Argent Microbiol*. 2006; 38:74
126. Peralta A, Molinari P, Conte-Grand D, Calamante G, Taboga O. A chimeric baculovirus displaying bovine herpesvirus-1 (BHV-1) glycoprotein D on its surface and their immunological properties. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007; 75: 407-14.
127. Perez S, Inman M, Doster A, Jones C. Latency-related gene encoded by bovine herpesvirus 1 promotes virus growth and reactivation from latency in tonsils of infected calves. *J. Clin. Microbiol*. 2005;43:393–401.
128. Perez S, Lovato L, Zhou J, Doster A, Jones C. Comparison of inflammatory infiltrates in trigeminal ganglia of cattle infected with wild-type Bovine herpesvirus 1 versus a virus strain containing a mutation in the LR (latency-related) gene. *J. NeuroVirol*. 2006;12:392-397.
129. Peters AR, Thevasagayam SJ, Wiseman A, Salt JS. Duration of immunity of a quadrivalent vaccine against respiratory diseases caused by BHV-1, PI3V, BVDV, and BRSV in experimentally infected calves. *Prev Vet Med*. 2004;66(1-4):63-77.
130. Peterson RB, Goyal SM. Propagation and quantitation of animal herpesviruses in eight cell culture systems. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 1988;11(2):93-8.
131. Pidone CL, Galosi CM, Echeverria MG, et al. Restriction endonuclease analysis of BHV-1 and -5 strains isolated in Argentina. *J Vet Med B*, 1999;46(7):453–456.
132. Pidone CL, Galosi CM, Etcheverrigaray EM. Herpesvirus Bovinos 1 y 5. *Analecta Veterinaria* 1999; 19,1/2: 40-50
133. Piedrahita D, Ramírez G, Vera V. Detección y caracterización por métodos moleculares de aislamientos colombianos de Herpesvirus bovino tipo 1. *Rev Fac Med Vet Zoo*. 2005;52:122-127.
134. Pontarollo RA, Babiuk LA, Hecker R, VAN Drunen Littel-van den hurk S. Augmentation of cellular immune responses to bovine herpesvirus-1 glycoprotein D by vaccination with CpG-enhanced plasmid vectors. *J Gen Virol*. 2002; 83: 2973-81
135. Reddy PS, Idamakanti N, Pyne C, Zakhartchouk AN, Godson DL, Papp Z, Baca-Estrada ME, Babiuk LA, Mutwiri GK, Tikoo SK. The immunogenicity and efficacy of replication-defective and replication-competent bovine adenovirus-3 expressing bovine herpesvirus-1 glycoprotein gD in cattle. *Vet Immunol Immunopathol*. 2000; 76: 257-68
136. Reddy PS, Idamakanti N, Zakhartchouk AN, Baxi MK, Lee JB, Pyne C, Babiuk LA, Tikoo SK. Nucleotide sequence, genome organization and transcription map of bovine adenovirus type 3. *J Virol*. 1999; 72:1394–1402.
137. Rijsewijk FA, Kaashoek MJ, Landeveld JP, Meloen R, Judek J, Bienkowska-Szewczyk K, Maris-Veldhuis MA, van Oirschot JT. Epitopes of glycoprotein C of bovine herpesvirus-1 that allow differentiation between BHV-1.1 and BHV-1.2 strains. *J. Gen. Virol*. 1999;80:1477-83.
138. Rock D, Lokensgard J, Lewis T, Kutish G. Characterization of dexamethasone-induced reactivation of latent bovine herpesvirus 1. *J. Virol*. 1992;66:2484–2490.

139. Rocke TE, Dein FJ, Fuchsberger M, Fox BC, Stinchcomb DT, Osorio JE. Limited infection upon human exposure to a recombinant raccoon pox vaccine vector. *Vaccine*. 2004;22(21-22):2757-60.
140. Rocke TE, Iams KP, Dawe S, Smith SR, Williamson JL, Heisey DM, Osorio JE. Further development of raccoon poxvirus-vectored vaccines against plague (*Yersinia pestis*). *Vaccine*. 2009;28(2):338-44.
141. Rocke TE, Smith SR, Stinchcomb DT, Osorio JE. Immunization of black-tailed prairie dog against plague through consumption of vaccine-laden baits. *J Wildl Dis*. 2008;44(4):930-7.
142. Roehe PM, Silva TC, Nardi NB, et al. Diferenciação entre os vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (BHV-1) e herpesvirus da encefalite bovina (BHV-5) com anticorpos monoclonais. *Pesq Vet Bras*. 1997;7:41-44.
143. Roels S, Charlier G, Lettelier C, et al. Natural case of bovine herpesvirus 1 meningoencephalitis in an adult cow. *Vet Rec*. 2000;146:586-588.
144. Roizman B, Pellett PE. 2001. The family herpesviridae: A brief introduction. In *Fields Virology*, Fourth edition. Knipe DM and Howley PM, Editors. Lippincott Williams & Wilkins. USA. pp.2381-2397.
145. Ros C, Belak S. Studies of genetic relationships between bovine, caprine, cervine and rangiferine alphaherpes viruses and improved molecular methods for virus detection and identification. *J Clin Microbiol*. 1999;37:1247-1253.
146. Ruiz-Saenz J, Jaime J, Ramirez G, Vera VJ. Molecular and in vitro characterization of field isolates of bovine herpesvirus-1. *Viol Sin*. 2011;26 (6).
147. Ruiz-Saenz J, Jaime J, Vera V. Serological prevalence and isolation of Bovine herpesvirus-1 (BHV-1) in cattle herds from Antioquia and Valle del Cauca provinces. *Rev Colomb Cienc Pecu* 2010; 299-307.
148. Ruiz-Sáenz J, Jaime J, Vera V. Vacunas contra el Herpesvirus bovino-1: una mirada desde el pasado hacia el futuro de la inmunización. *Acta biol. Colomb*. 2009;14:3 - 20.
149. Sabin AB, Boulger LR. History of Sabin attenuated poliovirus vaccine. *J. Biol. Stand*. 1973; 1:115-118.
150. Schang LM, Hossain A, Jones C. The latency-related gene of bovine herpesvirus 1 encodes a product which inhibits cell cycle progression. *J. Virol*. 1996;70:3807-3814.
151. Schang LM, Jones C. Analysis of bovine herpesvirus 1 transcripts during a primary infection of trigeminal ganglia of cattle. *J. Virol*. 1997;71:6786-6795.
152. Schroder C, Keil GM. Bovine herpesvirus-1 requires glycoprotein H for infectivity and direct spreading, and glycoproteins gH (W450) and gB for gD-independent cell-to-cell spread. *J. Gen. Virol*. 1999;80:57-61.
153. Schudel AA, Carrillo BJ, Wyler R, Metzler AE. Infections of calves with antigenic variants of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurological disease. *Zentralbl Veterinarmed B*. 1986;33:303-10.
154. Schwyzer M, Ackerman M. Molecular virology of ruminant herpesviruses. *Vet. Microbiol*. 1996;53:17-29.
155. Sheffy BE, Davies DH. Reactivation of a bovine herpesvirus after corticosteroid treatment. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*. 1972;40:974-976.
156. Smith KC, Whitwell KE, Mumford JA, et al. Virulence of the V592 isolate of equid herpesvirus-1 in ponies. *J Comp Pathol*. 2000;122(4):288-297.

157. Soboll G, Hussey SB, Minke JM, Landolt GA, Hunter JS, Jagannatha S, Lunn DP. Onset and duration of immunity to equine influenza virus resulting from canarypox-vectored (ALVAC) vaccination. *Vet Immunol Immunopathol.* 2010;135(1-2):100-7.
158. Sreenivasa BP, Natarjan C, Rasool TJ. Restriction endonuclease analysis of DNA from Indian isolates of bovine herpesvirus 1. *Acta Virol,* 1996;40:315–318.
159. Thiry E, Bublot M, Dubuisson J, Pastoret PP. Bovine herpesvirus-4 (BHV-4) infection in cattle, p. 96–115. In G. Wittmann (ed.), *Herpesvirus diseases of cattle, horses and pigs.* Boston, 1989.
160. Toussaint JF, Coen L, Letellier C, Dispas M, Gillet L, Vanderplasschen A, et al. Genetic immunisation of cattle against bovine herpesvirus 1: glycoprotein gD confers higher protection than glycoprotein gC or tegument protein VP8. *Vet Res.* 2005;36:529-44
161. Toussaint JF, Letellier C, Paquet D, Dispas M, Kerkhofs P. Prime-boost strategies combining DNA and inactivated vaccines confer high immunity and protection in cattle against bovine herpesvirus-1. *Vaccine.* 2005;23(43):5073-81.
162. Tyler KL, Nathanson N. 2001. Pathogenesis of Viral infections. Chapter 7. In: Knipe, DM., Howley, PM., Fields` *Virology* edition 4th, Vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. Pp 199-243.
163. Valera AR, Pidone CL, Massone AR, Quiroga MA, Riganti JG, Corva SG, Galosi CM. A simple method of infecting rabbits with Bovine herpesvirus 1 and 5. *J Virol Methods.* 2008;150(1-2):77-9.
164. van Drunen Littel-van den Hurk S, Braun RP, Lewis PJ, Karvonen BC, Baca-Estrada ME, Snider M, et al. Intradermal immunization with a bovine herpesvirus-1 DNA vaccine induces protective immunity in cattle. *J Gen Virol.* 1998; 79: 831-9
165. van Drunen Littel-van den Hurk S, D Myers, P A Doig, et al. Identification of a mutant bovine herpesvirus-1 (BHV-1) in post-arrival outbreaks of IBR in feedlot calves and protection with conventional vaccination. *Can J Vet Res,* 2001;5(2):81–88.
166. van Drunen Littel-van den Hurk S, Gifford GA, Babiuk LA. Epitope specificity of the protective immune response induced by individual bovine herpesvirus-1 glycoproteins. *Vaccine.* 1990;8:358-68
167. van Drunen Littel-van den Hurk S, Parker MD, Massie B, van den Hurk JV, Harland R, Babiuk LA and Zamb TJ. Protection of cattle from BHV-1 infection by immunization with recombinant glycoprotein gIV. *Vaccine* 1993; 11 (1):25-35.
168. van Drunen Littel-van den Hurk S, Snider M, Thompson P, Babiuk LA. Strategies for induction of protective immunity to bovine herpesvirus-1 in newborn calves with maternal antibodies. *Vaccine.* 2008; 26:3103-11
169. van Drunen Littel-van den Hurk S, Tikoo SK, Liang X, Babiuk LA. Bovine herpesvirus-1 vaccines. *Immunol Cell Biol.* 1993; 71: 405-20
170. van Drunen Littel-van den Hurk S. Rationale and perspectives on the success of vaccination against bovine herpesvirus-1. *Vet Microbiol* 2006;113:275-82.
171. Van Drunen Littel-van den Hurk S, van Donkersgoed J, Kowalski J, van den Hurk JV, Harland R, Babiuk LA and Zamb TJ. A subunit gIV vaccine, produced by transfected mammalian cells in culture, induces mucosal immunity against bovine herpesvirus-1 in cattle. *Vaccine* 1994;12/14:1295-1302.
172. van Oirschot JT, Straver PJ, van Lieshout JAH, Quak J, Westenbrink F, van Exsel ACA. A subclinical infection of bulls with bovine herpesvirus type 1 at an artificial insemination centre. *Vet Rec* 1993;132:32-35.

173. Vanderplasschen A, Pastoret PP. The uses of poxviruses as vectors. *Curr Gene Ther.* 2003;3(6):583-95.
174. Voguel FSF, Florez EF, Weiblen R, Winkelmann R, Moraes MP, Bragança JFM. Intrapreputial infection of young bulls with bovine herpesvirus type 1.2 (BHV-1.2): acute balanoposthitis, latent infection and detection of viral DNA in regional neural and non-neural tissues 50 days after experimental reactivation. *Vet. Microbiol.* 2004;85:185-196.
175. Vonk Noordegraaf A, Buijtels JA, Dijkhuizen AA, Franken P, Stegeman JA, Verhoeff J. An epidemiological and economic simulation model to evaluate the spread and control of infectious bovine rhinotracheitis in The Netherlands. *Prev Vet Med.* 1998;36:219-38.
176. Walsh SR, Dolin R. Vaccinia viruses: vaccines against smallpox and vectors against infectious diseases and tumors. *Expert Rev Vaccines.* 2011;10(8):1221-40.
177. Weiblen R, Moraes MP, Rebelatto MC, et al. Bovine herpesvirus isolates. *Rev Microbiol.* 1996;27: 208–211.
178. Whestone CA, Miller JM, Bortner DM, et al. Changes in the bovine herpesvirus 1 genome during acute infection, after reactivation from latency and after superinfection in the host animal. *Arch Virol.* 1989;106:261-279.
179. Winkler MT, Doster A, Jones C. Bovine herpesvirus 1 can infect CD4(+) T lymphocytes and induce programmed cell death during acute infection of cattle. *J. Virol.* 1999;73:8657–8668.
180. Winkler MT, Doster A, Jones C. Persistence and reactivation of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) in tonsils of latently infected cattle. *J Virol.* 2000b;74: 5337–5346.
181. Winkler MT, Doster A, Sur JH, Jones C. Analysis of bovine trigeminal ganglia following infection with bovine herpesvirus 1. *Vet. Microbiol.* 2002;86: 139–155.
182. Winkler MT, Schang LS, Doster A, Holt T, Jones C. Analysis of cyclins in trigeminal ganglia of calves infected with bovine herpesvirus-1. *J. Gen. Virol.* 2000a;81:2993–2998.
183. Wirth UV, Fraefel C, Vogt B, Vlcek C, Paces V, Schwyzer M. Immediate-early RNA 2.9 and early RNA 2.6 of bovine herpesvirus 1 are 3' coterminal and encode a putative zinc finger transactivator protein. *J. Virol.* 1992;66:2763–2772.
184. Wirth UV, Gunkel K, Engels M, Schwyzer M. Spatial and temporal distribution of bovine herpesvirus 1 transcripts. *J. Virol.* 1989;63:4882-4889.
185. Wirth UV, Vogt B, Schwyzer M. The three major immediate-early transcripts of bovine herpesvirus 1 arise from two divergent and spliced transcription units. *J. Virol.* 1991;65:195–205.
186. Wittels M, Spear G. Penetration of cells by herpes simplex virus does not require a low pH-dependent endocytic pathway. *Virus Res.* 1990;18:271–290.
187. Wyler R, Engels M, Schwyzer M. Infectious Bovine Rhinotracheitis/Vulvovaginitis (BHV1). In: *Herpesvirus Diseases of Cattle, Horses and Pigs*, Wittmann G., ed. Kluwer Academic publishers, Boston, USA, 1989. p. 1-72.
188. Wyler R., Engels M, Schwyzer M. 1995. Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis (BHV1) Institute of Virology. University of Zurich p 1-55 1995.

189. Zakhartchouk AN, Pyne C, Mutwiri GK, Papp Z, Baca-Estrada ME, Griebel P, Babiuk LA, Tikoo SK. Mucosal immunization of calves with recombinant bovine adenovirus-3: induction of protective immunity to bovine herpesvirus-1. *J Gen Virol.* 1999; 80: 1263-69.
190. Zakhartchouk AN, Reddy PS, Baxi M, Baca-Estrada ME, Mehtali M, et al. Construction and characterization of E3-deleted bovine adenovirus type 3 expressing full-length and truncated form of bovine herpesvirus type 1 glycoprotein gD. *Virology.* 1998; 250: 220-229
191. Zamorano P, Taboga O, Dominguez M, Romera A, Puntel M, Tami C, et al. BHV-1 DNA vaccination: effect of the adjuvant RN-205 on the modulation of the immune response in mice. *Vaccine.* 2002; 20: 21-22
192. Zapata JC, Ossa JE, Bedoya G, Zuluaga FN. Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (RIB). Caracterización Molecular de una cepa Colombiana de Herpesvirus Bovino tipo 1. *Rev Colomb Cienc Pecu.* 2002; 15: 92-99.
193. Zhu X, Letchworth GJ. Mucosal and systemic immunity to bovine herpesvirus-1 glycoprotein D confer resistance to viral replication and latency in cattle. *Vaccine.* 1996; 14: 61-9
194. Zimmerman AD, Buterbaugh RE, Herbert JM, Hass JM, Frank NE, Luempert lii LG, Chase CC. Efficacy of bovine herpesvirus-1 inactivated vaccine against abortion and stillbirth in pregnant heifers. *J Am Vet Med Assoc.* 2007;231(9):1386-9.