

la UNLP.

Finalmente, la Dra. Romera, en representación del grupo de trabajo, hará una breve presentación del trabajo galardonado, la cual nos permitirá apreciar los méritos del mismo.

Muchas gracias por acompañarnos en esta jornada.

Premio Biogénesis Bagó, versión 2013

Trabajo ganador del Premio Biogénesis Bagó 2013

Nueva vacuna marcadora contra herpesvirus bovino 1. Protección inducida en bovinos por la cepa marcadora BoHV1ΔgEβgal

New marker vaccine against bovine herpesvirus 1. Protection induced in cattle by the marker strain BoHV1ΔgEβgal

S. A. Romera^{1,4,5,*†}; M. Puntel^{2,†}; V. Quattrocchi¹; P. Del Medico Zajac¹; P. Zamorano^{1,4,5}; J Blanco Viera³ y A. Sadir^{1,4,5}.

†Ambos autores contribuyeron de igual manera en este trabajo

1 Instituto de Virología, Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias (CICV), Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Castelar, CC77, 1708 Morón, Argentina

2 Fundación Instituto Leloir-IIBBA, CONICET, Av. Patricias Argentinas 435, 1405 CABA, Argentina

3 Instituto de Patobiología-CICVyA, INTA, Castelar CC77, 1708 Morón, Argentina

4 Universidad del Salvador, Buenos Aires, Argentina

5 CONICET, Buenos Aires, Argentina

* Corresponding author. Instituto de Virología, Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias (CICV), Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Castelar, CC77, 1708 Morón, Argentina

Se presenta un resumen del trabajo publicado en BMC Veterinary Research:

Romera, S. A., Puntel, M., Quattrocchi, V., Zajac, P. D. M., Zamorano, P., BlancoViera, J., Sadir, A. M. (2014). Protection induced by a glycoprotein E-

deleted bovine herpesvirus type 1 marker strain used either as an inactivated or live attenuated vaccine in cattle. BMC Veterinary Research, 10:8, 1-12.

RESUMEN

El Herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV1) es el agente causal de infecciones de la mucosa respiratoria y genital de los bovinos causando grandes pérdidas económicas en todos los continentes. El uso de vacunas marcadoras en los programas de erradicación de rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) es ampliamente utilizada ya que permite la protección de los animales contra la enfermedad y adicionalmente la posibilidad de diferenciar animales vacunados de infectados.

El objetivo del presente estudio fue el desarrollo y la evaluación de la seguridad y eficacia de una cepa vacunal marcadora (BoHV1 Δ gE β gal) generada en base a la cepa parental BoHV1 LA sustituyendo por recombinación homóloga el gen que codifica para la glicoproteína E (gE) del virus con el gen de la β -galactosidasa (β gal).

La cinética de crecimiento in vitro del virus BoHV1 Δ gE β gal fue similar a la del virus parental BoHV1 LA. Cuando se evaluó la respuesta inmune inducida BoHV-1 Δ gE β gal resultó altamente inmunogénico en ambas formulaciones, induciendo respuesta inmune tanto humoral como celular. Los títulos de anticuerpos inducidos en los animales vacunados con la vacuna inactivada (IBoHV1 Δ gE β gal) fueron similares a los inducidos por la vacuna control con el virus parental (IBoHV1 LA). Los niveles de IFN- γ fueron significativamente mayores en los animales vacunados con vacuna viva atenuada que los vacunados con vacuna inactivada. La cepa recombinante BoHV1 Δ gE β gal exhibió una atenuación evidente cuando se administra como vacuna viva atenuada, no se detectó virus en las secreciones nasales de animales vacunados o centinelas durante el período posterior a la vacunación. La cepa marcadora BoHV1 Δ gE β gal, cuando se utilizó, ya sea como vacuna inactivada o como vacuna viva atenuada, indujo una respuesta inmune específica eficiente que protege a los animales en el desafío contra la cepa salvaje BoHV1 LA infecciosa. Asimismo, la delección del gen gE resultó un marcador inmunológico para diferenciar animales vacunados de infectados. Todos los animales vacunados con la cepa BoHV1 Δ gE resultaron protegidos contra la enfermedad después del desafío y excretaron significativamente menos

virus que los bovinos control, independientemente de la ruta y la formulación con la que se inocularon.

Basados en la atenuación, inmunogenicidad y eficacia protectora frente al desafío viral, el virus BoHV1 Δ gE β gal es un candidato a vacuna muy eficaz cuando se lo usa tanto inactivo como vivo atenuado, seguro en cuanto a transmisión horizontal y en hembras preñadas.

Palabras clave: BoHV-1 Δ gE β gal, vacuna marcadora contra BoHV1, vacuna inactivada, vacuna viva atenuada, bovinos.

ABSTRACT

Bovine herpesvirus type 1 (BoHV1) is the causative agent of respiratory and genital tract infections; causing a high economic loss in all continents. Use of marker vaccines in infectious bovine rhinotracheitis (IBR) eradication programs is widely accepted since it allows for protection of the animals against the disease while adding the possibility of differentiating vaccinated from infected animals.

The aim of the present study was the development and evaluation of safety and efficacy of a glycoprotein E-deleted (gE-) BoHV1 marker vaccine strain (BoHV1 Δ gE β gal) generated by homologous recombination, replacing the viral gE gene with the β -galactosidase (β gal) gene.

In vitro growth kinetics of the BoHV1 Δ gE β gal virus was similar to BoHV1 LA. The immune response triggered by the new recombinant strain in cattle was characterized both as live attenuated vaccine (LAV) and as an inactivated vaccine. BoHV-1 Δ gE β gal was highly immunogenic in both formulations, inducing specific humoral and cellular immune responses. Antibody titers found in animals vaccinated with the inactivated vaccine based on BoHV1 Δ gE β gal was similar to the titers found for the control vaccine (BoHV1 LA). In the same way, titers of inactivated vaccine groups were significantly higher than any of the LAV immunized groups, independently of the inoculation route. Levels of IFN- γ were significantly higher in those animals that received the LAV in comparison with those that received the inactivated vaccine. BoHV-1 Δ gE β gal exhibited an evident attenuation when administered as a LAV; no virus was detected in nasal secretions of vaccinated or sentinel animals during the post-vaccination period. BoHV1 Δ gE β gal, when used in either formulation, elicited an efficient immune response that protected animals against

challenge with virulent wild-type BoHV1. Also, the deletion of the gE gene served as an immunological marker to differentiate vaccinated animals from infected animals. All animals vaccinated with the BoHV1 Δ gE β gal strain were protected against disease after challenge and shed significantly less virus than control calves, regardless of the route and formulation they were inoculated.

Based on its attenuation, immunogenicity and protective effect after challenge, el virus BoHV1 Δ gE β gal virus is an efficient and safe vaccine candidate when used either as inactivated or as live attenuated forms.

Keywords: BoHV-1 Δ gE β gal, BoHV-1 marker vaccine, Inactivated/live attenuated vaccine, Bovines.

INTRODUCCION

El Herpesvirus bovino 1 (BoHV1) afecta al ganado y es un componente importante de la enfermedad del complejo respiratorio bovino. BoHV1 es responsable de una amplia variedad de enfermedades clínicas, incluyendo la infección del tracto respiratorio superior y conjuntivitis conocido como rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR); también produce lesiones del tracto reproductivo, el aborto en vacas preñadas y la infección sistémica en el recién nacido (Jones, 2007, Ellis 2010). Es responsable de considerables pérdidas económicas debido a la disminución de la producción de leche, la pérdida de peso y los abortos. En Argentina, los índices de seroprevalencia promedian el 55% del ganado bovino (entre 24,8 y 84,1 % según la región y la edad de los animales) (Odeón 2001, Campos 2009). Para el control de la enfermedad se utilizan ampliamente como vacunas virus vivos atenuados o viriones inactivados. El uso de vacunas clásicas con virus inactivos complica el diagnóstico serológico y la determinación de la prevalencia real de la infección. Dado que, el ganado seronegativo para herpesvirus bovino 1 juega un papel importante en el comercio internacional, varios países europeos han erradicado este virus con costos muy altos. En los países con una alta prevalencia de la infección, incluyendo los Estados Unidos, el control de IBR se asocia con la vacunación del ganado con vacunas marcadoras. Debido a que en Europa existen zonas de BoHV1, la capacidad de diferenciar entre animales infectados y vacunados (DIVA)

se ha convertido en algo crítico como una herramienta de negociación. Las vacunas marcadoras con virus deleteados ofrecen la ventaja de la delección de los genes virulentos específicos que no son esenciales para la replicación viral (van Oirschot 1996). Las vacunas utilizadas en programas de control de BoHV1 utilizan cepas de BoHV1 con delección de la glicoproteína E (Muylkens 2006).

En esta investigación se presentan datos sobre el desarrollo nacional de una nueva cepa en base a la cepa BoHV- 1 salvaje "Los Angeles" deleteada en gE (BoHV1ΔgEβgal) y su uso, ya sea como una vacuna a virus inactivado o como una vacuna marcadora viva atenuada en bovinos. Los resultados demostraron que el virus BoHV1ΔgEβgal es un candidato a vacuna muy eficaz cuando se lo usa tanto inactivo como vivo atenuado, seguro en cuanto a transmisión horizontal y en hembras preñadas.

Objetivo: Desarrollar una nueva vacuna marcadora contra herpes virus bovino 1 en base a la cepa BoHV1ΔgEβgal capaz de inducir niveles similares de protección que la vacuna convencional, pero con la ventaja adicional de permitir la diferenciación serológica entre animales infectados y vacunados.

METODOLOGIA

Una vez obtenida la cepa recombinante BoHV1ΔgEβgal se evaluó la capacidad inmunogénica y protectora inmunizando bovinos con la cepa recombinante formulada en vacuna inactivada o viva atenuada.

A. Vacuna inactivada

Se utilizaron 16 bovinos Hereford x Angus y Holando de 8 a 12 meses de edad separados en dos grupos de vacunados inmunizados con 3 ml por vía subcutánea: vacuna BoHV1ΔgEβgal inactivada (IBoHV1ΔgEβgal, n=5); vacuna BoHV1 inactivada (IBoHV1; n=5) y un grupo control sin vacunación (n=6). Al momento de la vacunación todos los bovinos fueron seronegativos a BoHV1 (evaluados por seroneutralización y ELISA), se los revacunó a los 21 días post vacunación (dpv) y se desafiaron con el virus infeccioso BoHV1 LA (107.5 DICT50/ml) a los 186 dpv. Todos los experimentos se realizaron siguiendo las recomendaciones de las Guías

Internacionales de Cuidado y Uso Animal. El desafío se realizó en boxes de NBS 2 con aire filtrado y presión negativa. Los bovinos fueron sangrados a distintos tiempos, con heparina para ensayos de linfoproliferación y sin heparina para serología. A su vez se tomaron muestras de secreciones nasales a distintos días pos desafío (dpd) y tituladas en MDBK.

B. Vacuna viva atenuada

Se utilizaron 25 bovinos (12 a 18 meses) seronegativos a BoHV1. Se trabajó con 3 grupos de vacunados inmunizados con 4 ml (108.25 DICT50%/ml) de la vacuna viva atenuada: por vía intranasal (LBoHV1ΔgEβgal in); por vía intramuscular (LBoHV1ΔgEβgal im) y por vía intravenosa (LBoHV1ΔgEβgal iv). En el grupo LBoHV1ΔgEβgal iv, se utilizaron hembras preñadas para evaluar la seguridad de la vacuna viva en cuanto a la transmisión vertical. Un grupo fue usado como centinela y no recibió vacuna ni desafío y otro como grupo control de desafío (sin vacunación). Para evaluar la seguridad en cuanto a transmisión horizontal, a los 3 días de que los animales fueron vacunados se pusieron en contacto con los centinelas. Los signos clínicos y excreción viral fueron controlados durante 42 dpv. Los grupos vacunados con LBoHV1ΔgEβgal in, im y los controles fueron desafiados por aerosol con 4 ml de BoHV1 salvaje (107.5 DICT50/ml) a los 42 dpv. Se tomaron muestras de sangre e hisopados nasales a distintos dpv y dpd. El grupo LBoHV1ΔgEβgal iv, de hembras preñadas, no fue desafiado. Los niveles de excreción viral se evaluaron como log₁₀ DICT50/ml de fluido nasal. Los bovinos fueron examinados clínicamente y los parámetros evaluados incluyeron anorexia, temperatura corporal, conjuntivitis, rinitis y vulvovaginitis. La escala para el estatus de rinitis fue (0=ausencia; 1=serosa leve; 2=serosa severa; 3=seromucosa y 4=mucopurulenta).

Evaluación de seguridad de la vacuna viva atenuada en cuanto a transmisión vertical

Como se mencionó anteriormente en el grupo LBoHV1ΔgEβgal iv, se seleccionaron 5 vacas preñadas (cursando entre el tercer y sexto mes de gestación) e inoculadas por vía iv con la vacuna viva atenuada. Las vacas fueron evaluadas tanto clínicamente como inmunológicamente durante un período de 42 días junto a los demás grupos experimentales. Durante la experiencia de desafío este grupo no fue expuesto al virus parental

BoHV1 salvaje, pero siguieron siendo evaluadas hasta los 370 días post-vacunación incluyendo sus correspondientes pariciones.

RESULTADOS

Se desarrolló un nuevo virus recombinante BoHV1 Δ gE β gal

Con el objeto de desarrollar el virus recombinante se realizó un ensayo de recombinación homóloga entre el DNA del virus BoHV1 salvaje y un plásmido de recombinación que contiene las secuencias homólogas flanqueantes al gen gE y el gen marcador de la β galactosida. Se procedió a la generación de los fragmentos homólogos por amplificación por PCR y a clonados sucesivos en diferentes construcciones de manera tal que se arribó al vector PuLR β gal. Una vez confirmada la estructura del clon PuLR- β gal se utilizó en los ensayos de co-transfección. La selección primaria de clones recombinantes se realizó macroscópicamente mediante un ensayo de revelado de la expresión de la enzima β -galactosidasa, en monocapas de células inoculadas con el producto de la co-transfección. Luego se obtuvieron focos aislados que permitieron seleccionar clones virales individuales. Para la purificación del virus recombinante putativo, se sometió el clon a cinco pasajes sucesivos bajo medio semisólido, en condiciones de revelado de la enzima β -gal. Se corroboró la delección de gE en el virus BoHV1 Δ gE β gal por PCR utilizando primers específicos a gE, DNA del clon de BoHV1 Δ gE β gal seleccionado y BoHV1 como control. También se realizó la caracterización genética del recombinante BoHV1 Δ gE β gal por Southern Blot digiriendo el genoma viral con la enzima HindIII y enfrentando los fragmentos a sondas marcadas con 32S de las regiones gE, L, y R en tres ensayos independientes respectivamente, confirmando que solo las sondas L y R hibridaron tanto con el genoma del virus BoHV1 como con BoHV1 Δ gE β gal y como era de esperarse la sonda E solo hibridizó con el genoma BoHV1 parental, esto permitió confirmar en el "clon a" de BoHV1 Δ gE β gal la ausencia de secuencias codificantes para la gE y que las secuencias flanqueantes L y R permanecieron intactas. Con el objeto de analizar la ausencia de la proteína gE en el "clon a" de BoHV1 Δ gE β gal, se procedió a su detección en un ensayo de Western blot a través del uso de anticuerpos monoclonales anti gD y gE incubados tanto con el perfil de proteínas de BoHV1 Δ gE β gal como de BoHV1 LA. El anticuerpo anto

gD reaccionó con ambos virus, sin embargo, el anticuerpo monoclonal específico para gE no reaccionó con ninguna de las proteínas de la cepa viral recombinante BoHV1ΔgEβgal (clon a), mientras que sí lo hizo con la proteína en la cepa BoHV1 LA parental. Esto indica que la cepa viral recombinante no sintetiza la gE, confirmando lo observado a nivel genético.

Caracterización de la habilidad replicativa del clon BoHV1ΔgEβgal

A fines de conocer la viabilidad y la eficiencia replicativa de la cepa BoHV1ΔgEβgal, se realizó un ensayo de cinética de crecimiento en múltiples pasos en monocapas de células MDBK, en donde se comparó durante 60 horas el comportamiento replicativo en cultivos celulares del clon purificado BoHV1ΔgEβgal y de la cepa BoHV1 parental. Los resultados obtenidos al cosechar y titular cada 6 horas los productos virales de ambos virus reflejaron un crecimiento en cultivo de tejidos de la cepa BoHV1ΔgEβgal similar al descrito para la cepa BoHV1 parental. Se detectaron títulos superiores a 10⁷ DICT50 /ml desde las 18 hs post-infección y se mantuvieron hasta el final del ensayo. Por ello, la cepa BoHV1ΔgEβgal resultó una buena candidata para su amplificación en escala y su utilización en la formulación de una vacuna inactivada y también su utilización directa como vacuna viva

Caracterización inmunogénica de la cepa viral BoHV1ΔgEβgal.

La cepa BoHV1ΔgEβgal utilizada tanto como vacuna inactivada o como viva atenuada resultó inmunogénica y protectora

Con el objeto de evaluar la integridad de la cepa BoHV1ΔgEβgal desde el punto de vista inmunogénico, se inmunizaron dos grupos de bovinos con vacuna inactivada usando las cepas recombinante BoHV1ΔgEβgal (IBoHV1ΔgEβgal) y parental BoHV1 LA (IBoHV1LA) y 3 grupos con vacuna viva atenuada por vía im, iv e in (LBoHV1ΔgEβgal im; LBoHV1ΔgEβgal iv, LBoHV1ΔgEβgal in). La inducción de respuesta humoral se evaluó por ELISA y seroneutralización según lo descrito previamente (Parreño 2010; Romera 2000). En todos los animales vacunados se detectaron niveles de anticuerpos a partir de los 19 días post-vacunación llegando a títulos de 4 (expresados en log 10) a los 30 dpv en ambos grupos de vacunados con vacuna inactivada y alrededor de 2 en los vacunados con vacuna viva atenuada (im e iv). Los

anticuerpos neutralizantes comenzaron a detectarse a los 30 dpv con títulos alrededor de 2 (expresados en log 10) para los vacunados con vacuna inactivada y si bien en los vacunados con vacuna viva atenuada se detectaron antes, éstos alcanzaron niveles de alrededor de 1,5. Al momento del desafío los vacunados con vacunas inactivadas presentaron títulos en promedio de anticuerpos totales de 2,7 y de 2 para los vacunados con vacuna viva atenuada. En cuanto a los anticuerpos neutralizantes todos los animales vacunados, independientemente de la vacuna y vía, presentaron al desafío títulos de alrededor de 1. No se registraron anticuerpos neutralizantes en el grupo in, ni en no vacunados y centinelas en el período post-vacunación. Los niveles de anticuerpos totales y neutralizantes inducidos por la vacuna marcadora inactivada BoHV1ΔgEβgal no difieren significativamente de los inducidos por la vacuna IBoHV1 LA convencional.

Los niveles de inmunidad celular específica a los 7 dpv evaluados en términos de activación de linfocitos T por el ensayo de linfoproliferación según Parreño (2010) y por secreción de interferón (IFN-γ) fueron significativamente mayores en los animales vacunados con vacuna viva (100%, 60% y 25% de animales positivos en los grupos in, im e iv respectivamente) que en los vacunados con vacuna inactivada (40% y 20% para los vacunados con cepa recombinante o parental respectivamente) y que en los no vacunados, en los que no se detectó respuesta celular específica en todo el período de estudio.

La vacuna BoHV1ΔgEβgal es protectora frente al desafío viral con la cepa salvaje BoHV1 LA

La excreción viral en el grupo de no vacunados fue de 12 días y tuvo un máximo de excreción viral a los 8 dpd con un título de 6.1 DICT50%/ml y descarga serosa severa a mucosa durante dos semanas aproximadamente. Los títulos virales excretados por los animales vacunados fueron por un período máximo de 10 días y significativamente menores en todo el período que los controles sin vacunar desafiados (2 logaritmos menos) y en el día pico la diferencia fue de 4 logaritmos menos respecto de los controles. Todos los animales vacunados con la cepa marcadora BoHV1ΔgEβgal presentaron síntomas clínicos y rinitis significativamente menor que los controles de desafío. Los vacunados con vacuna inactivada presentaron rinitis serosa leve a severa mientras que los vacunados con la vacuna atenuada tuvieron ausencia de rinitis o

serosa leve.

La vacuna BoHV1 Δ gE β gal es eficaz como vacuna marcador

Para la evaluación de anticuerpos específicos contra gE se utilizó el ELISA Herdchek (IDEXX, Bélgica).

Solo los animales vacunados con BoHV1 tuvieron anticuerpos contra gE durante todo el periodo de estudio, a diferencia de los vacunados con BoHV1 Δ gE β gal, en los que se detectaron solo a partir de los 14 días post-desafío en que se los enfrentó con el virus salvaje.

La cepa BoHV1 Δ gE β gal es atenuada

El virus vivo modificado BoHV1 Δ gE β gal mostró una alta atenuación ya que luego de la vacunación los 15 animales que recibieron la vacuna viva exhibieron solo signos clínicos leves de infección (ausencia de rinitis o rinitis serosa) como único signo de enfermedad. Adicionalmente no se detectó virus infeccioso en las secreciones nasales de los animales vacunados con BoHV1 Δ gE β gal independientemente de la ruta de inoculación.

La vacuna BoHV1 Δ gE β gal atenuada es segura en cuanto a capacidad abortigénica y transmisibilidad de la infección por la cepa vacunal

Para determinar la seguridad de la vacuna atenuada en cuanto a su abortigenicidad, se inocularon por vía intravenosa 5 hembras que cursaban el último tercio de la gestación. Todas las hembras tuvieron pariciones normales, con terneros sanos. Éstos tuvieron título de anticuerpos contra BoHV1 de 1.6 al noveno día de vida indicando la absorción de inmunoglobulinas específicas desde el calostro materno. Aunque la vía IV podría considerarse la más agresiva, BoHV1 Δ gE β gal demostró ser inocuo no causando efectos adversos ni malformaciones o momificaciones. Las vacas preñadas que se mantuvieron vacunadas pero sin desafiar para evaluar la seguridad de la vacuna en la preñez tuvieron títulos de anticuerpos contra BoHV1 de 1.6 hasta los 370 dpv, demostrando que la vacuna atenuada administrada por vía IV induce una larga inmunidad.

En cuanto a la transmisibilidad horizontal de la cepa, no se detectó virus infeccioso en las secreciones nasales de animales que actuaron como controles no vacunados y centinelas desde el tercer día post inoculación,

a lo largo del período post-vacunal

CONCLUSIONES

-Se desarrolló en Argentina una nueva cepa de BoHV1 deleteada en la glicoproteína E portando la enzima β galactosidasa como gen marcador (BoHV1 Δ gE β gal).

-La cepa BoHV1 Δ gE β gal podría ser amplificada a nivel industrial ya que presentó una cinética de crecimiento similar a la que presenta la cepa BoHV1 LA salvaje en cultivo de tejidos.

-La inmunogenicidad de la cepa BoHV1 Δ gE β gal se mantuvo intacta, comparada con la cepa parental, cuando se la utilizó como un inmunógeno inactivado induciendo niveles de respuesta inmune y protección comparables a los inducidos por la vacuna BoHV1 LA convencional actualmente en uso.

-El virus BoHV1 Δ gE β gal podría ser utilizado además como vacuna atenuada ya que indujo una buena respuesta inmune específica tanto humoral como celular que resultó protectora frente al desafío viral, independientemente de la vía de inoculación.

-La cepa BoHV1 Δ gE β gal viva atenuada es segura ya que se comprobó que en las condiciones experimentales no hubo transmisión por contacto a animales vírgenes ni fue abortigénica.

La vacuna BoHV1 Δ gE β gal es eficaz como una vacuna marcadora ya que, en base a la respuesta de anticuerpos inducidos en los bovinos vacunados con BoHV 1 Δ gE β gal, se pudo diferenciar fácilmente tanto los animales vacunados con BoHV1 de los bovinos sin vacunar y de los desafiados con BoHV 1.

Este nuevo desarrollo permite contar con una valiosa herramienta para iniciar futuros programas de control y erradicación en nuestro país.

Bibliografía

- Campos F.C., Franco A.C., Humber S.O., Oliveira M.T., Silva A.D., Esteves

- P.A., Roehe M.P. and Rijsewijk F.A., 2009. High prevalence of co-infections with bovine herpesvirus 1 y 5 found in cattle in Southern Brazil. *Veterinary Microbiology*, 139-1, 67-73.
- Ellis J.A., 2009. Update on viral pathogenesis in BRD. *Animal health research reviews, Conference of Research Workers in Animal Diseases*, 10-2, 149-153.
 - Jones C., Chowdhury S., 2007. A review of the biology of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines. *Animal Health Research Reviews, Conference of Research Workers in Animal Diseases*, 8-2, 187-205.
 - Muylkens B., Meurens F., Schynts F., Farnir F., Pourchet A., Bardiau M., Gogev S., Thiry J., Cuisenaire A., Vanderplasschen A., 2006. Intraspecific bovine herpesvirus 1 recombinants carrying glycoprotein E deletion as a vaccine marker are virulent in cattle. *The Journal of General Virology*, 87-8, 2149-2154.
 - Odeón A.C., Spath E.J.A., Paloma E.J., Leunda M.R., Fernandez Sainz I.J., Perez S.E., Kaiser G.G., Draghi M.G., Cetrá B.M., Cano A., 2001. Seroprevalencia de la diarrea viral bovina, herpesvirus bovino y virus sincicial respiratorio en Argentina. *Revista de Medicina Veterinaria*, 82, 216–220.
 - van Oirschot J.T., Kaashoek M.J., Rijsewijk F.A., 1996. Advances in the development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines. *Veterinary Microbiology*, 53-1, 43-54.
 - Parreño V., Romera S.A., Makek L., Rodriguez D., Malacari D., Maidana S., Compaired D., Combessies G., Vena M.M., Garaicoechea L., 2010. Validation of an indirect ELISA to detect antibodies against BoHV-1 in bovine and guinea-pig serum samples using ISO/IEC 17025 standards. *Journal of Virological Methods*, 169-1, 143-153.
 - Romera S.A., Hilgers L.A., Puntel M., Zamorano P.I., Alcon V.L., Dus Santos M.J., Blanco Viera J., Borca M.V., Sadir A.M., 2000. Adjuvant effects of sulfolipo-cyclodextrin in a squalane-in-water and water-in-mineral oil emulsions for BHV-1 vaccines in cattle. *Vaccine*, 19-1, 132-141.

Premio Biogénesis Bagó, versión 2013

Primera Mención del Premio Biogénesis Bagó 2013

Endometritis subclínica en vacas de tambo

Subclinical endometritis in dairy cows

Madoz LV^{1,2,6}, Jaureguiberry M¹, Domínguez AG³, Migliorisi AL^{1,4},