

## RESUMEN

**“Estudio comparativo de la respuesta inmune inducida por dos tipos de vacunas (VLP e inactivada) frente al virus de la Lengua Azul en ganado ovino”**

La Lengua azul (LA) es una enfermedad infecciosa, no contagiosa, transmitida por jejenes del género *Culicoides* que afecta a diferentes especies de rumiantes, tanto domésticos, como silvestres. Los animales que desarrollan la enfermedad son fundamentalmente las ovejas, pudiéndose alcanzar altas tasas de morbilidad y mortalidad. La enfermedad de la LA no afecta al ser humano, pero cobra gran importancia debido a su elevado poder de transmisión y difusión provocando graves consecuencias socioeconómicas y sanitarias, que repercuten en el comercio internacional de animales y productos de origen animal. Por todo ello, la LA está incluida dentro de la lista de enfermedades de declaración obligatoria de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE).

Esta enfermedad está causada por un virus perteneciente al género *Orbivirus* (familia *Reoviridae*), que presenta 7 proteínas estructurales (VP1-VP7) y cinco no estructurales (NS 1, 2, 3, 3A y 4). La VP2 destaca por su importancia en la respuesta inmune, ya que es la responsable de la formación de anticuerpos neutralizantes, y específica de cada serotipo.

En el contexto actual de Europa, donde se encuentran hasta 6 serotipos distintos (1,2,4,8,9,16), la vacunación ha demostrado ser una herramienta básica para el control y la erradicación de esta enfermedad como ha sido observado en España con la erradicación de los serotipos 2 y 4.

La ausencia de inmunidad cruzada para diferentes serotipos supone un gran problema, puesto que implica inmunizar a toda la cabaña para cada serotipo. Actualmente las vacunas de las que se dispone son monovalentes y sólo en algunos casos bivalentes. Hasta la fecha tampoco se ha podido desarrollar un método de diagnóstico que permita la diferenciación entre animales vacunados con vacuna inactivada y animales infectados.

Con el fin de resolver los problemas anteriormente citados se han desarrollado las denominadas vacunas VLP (virus like particles). Se trata de complejos de proteínas estructurales (VP2, VP3, VP5, VP7), carentes de material genético lo que conlleva incapacidad replicativa, que se ensamblan formando estructuras semejantes al virus auténtico. Para su producción se utilizan vectores de expresión basados en la utilización de *Baculovirus*. Este tipo de vacunas presentan grandes ventajas como su alto nivel de seguridad, la posibilidad de diferenciar animales vacunados de infectados, gracias a la ausencia de proteínas no

estructurales como NS1, y la capacidad de generar vacunas polivalentes incluyendo en ellas diferentes VP2 pertenecientes a diferentes serotipos. Por todo ello presentan un gran potencial para convertirse en las vacunas del futuro, resultando necesario demostrar que este tipo de vacunas inducen una buena respuesta inmune y ofrecen una protección eficaz en los animales, teniendo en cuenta las condiciones actuales de Europa.

El objetivo de esta tesis es la valoración de la respuesta humoral y celular producida por las vacunas VLP frente al virus de la LA y su comparación con las inactivadas, valorando las ventajas e inconvenientes que presentan ambos tipos de vacunas en un escenario de control y erradicación de la enfermedad. Para ello, se han adaptado técnicas que permiten caracterizar el sistema inmune del ganado ovino, en condiciones fisiológicas normales, y la respuesta inmune que se produce como consecuencia de la aplicación de las vacunas o tras la exposición al virus.

Para caracterizar la respuesta inmune producida por las vacunas, se han estudiado diferentes parámetros tales como: producción de anticuerpos, niveles de viremia, o niveles de citoquinas inducidas. Para llevar a cabo este trabajo se han puesto a punto las técnicas de detección mediante RT-PCR en tiempo real, de ARN mensajero que codifica para 6 citoquinas diferentes en el ganado ovino (IL2, IL4, IL10, IL12, IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ ) así como la detección de diferentes poblaciones celulares del sistema inmune en sangre periférica de ovino, a través de la citometría de flujo (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>, linfocitos B, la subpoblación de linfocitos T  $\gamma\delta$  TCR1-N6 y los WC1<sup>+</sup>).

A nivel experimental y dentro del proyecto europeo BTVAC FP6-2005-SSP-5A, se ha realizado un ensayo de dos vacunas VLPs, una monovalente frente al serotipo 1 y otra bivalente frente a los serotipos 1 y 4 del virus de la LA, así como el ensayo de una vacuna inactivada monovalente frente al serotipo 1 en ovino. En este ensayo de vacunas, se ha realizado a diario el seguimiento y control de los animales con el registro de la sintomatología clínica, la temperatura rectal y la temperatura superficial mediante termografía infrarroja. También se realizaron extracciones de sangre periódicas para detección de virus por RT-PCR en tiempo real, presencia y niveles de anticuerpos por ELISA, detección de poblaciones celulares por citometría de flujo, y extracción de ARNm para analizar la expresión de genes que codifican para citoquinas por PCR en tiempo real.

Los resultados de esta tesis indican que la respuesta inmune generada evita la aparición de sintomatología, lesiones y viremia tras la exposición al virus homólogo virulento, tanto con la utilización de las vacunas monovalentes (inactivada y VLP) como con la bivalente, lo que indica la seguridad de ambos tipos de vacunas para ser utilizadas incluso en presencia del vector. En la detección de sintomatología clínica se ha analizado la posible utilización de la termografía infrarroja como herramienta de detección de fiebre, arrojando unos resultados con

una sensibilidad y especificidad suficientes para su uso como herramienta de uso masivo, pudiendo esta herramienta ser utilizada en la vigilancia de animales centinelas.

La evolución de la expresión de citoquinas ha mostrado la importancia de la IL2 en respuesta a la vacuna VLP monovalente y de la IL12 en respuesta a la vacunación con VLP bivalente, así como tras el desafío de los animales control con sus respectivos virus homólogos virulentos. Por el contrario otras citoquinas como el IFN $\gamma$ , cuya importancia en la respuesta al virus LA había sido previamente descrita, no ha podido demostrarse en algunos casos, debido a la variabilidad presentada tanto por la técnica como por los animales. El análisis de las poblaciones celulares mostró en el caso de ambas vacunas VLP, el incremento de la población CD25<sup>+</sup> post-vacunación, siendo más evidente en el caso de los animales vacunados con vacuna VLP monovalente. Los animales vacunados con vacuna inactivada mostraron un aumento significativo en el porcentaje de linfocitos B. Tanto los animales vacunados con vacuna inactivada, como los no vacunados, mostraron un aumento en los linfocitos T CD8<sup>+</sup> tras el desafío con el virus, no observándose variación significativa en el caso de los vacunados con VLP.

La respuesta generada por ambos tipos de vacunas es suficiente para generar anticuerpos protectores tanto en el caso de las vacunas monovalentes para el serotipo 1 (VLP e inactivada) como en el caso de la vacuna VLP bivalente para los serotipos 1 y 4. Finalmente, los resultados obtenidos en los grupos control indican que el serotipo 1 presenta una mayor capacidad patógena que el serotipo 4.