

SEGUIMIENTO CLÍNICO DEL ENSAYO DE UNA VACUNA VLP PARA LOS SEROTIPOS 1 Y 1+4 DE LA LENGUA AZUL EN GANADO OVINO

CLINICAL STUDY OF A TRIAL ON VLP VACCINE FOR BLUETONGUE VIRUS SEORTYPES 1 & 1+4 IN SHEEP

Ana Cristina Pérez de Diego, Pablo del Carmen, Javier Carvajal, José Manuel Sánchez-
Vizcaíno

Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET), UCM
Departamento de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. UCM

Resumen

La Lengua azul es una enfermedad vírica sometida a un control sanitario compuesto por varias medidas de prevención, entre ellas la vacunación de las especies sensibles. En el desarrollo de vacunas frente a esta enfermedad, una nueva tendencia es la producción de vacunas polivalentes mediante la técnica de VLP (*virus like particles*). Este trabajo ha tenido como objetivo valorar mediante seguimiento clínico 2 vacunas VLP, frente al serotipo 1 y frente a los serotipos 1+4. Los resultados confirman la falta de fiebre, sintomatología y lesiones anatomopatológicas en los animales vacunados frente a los controles, lo que indica que estas nuevas vacunas protegen frente a la aparición de sintomatología clínica.

Palabras clave: Vacunas Virus Like Particles , Lengua Azul, oveja

Abstract

Bluetongue Virus disease is an infectious disease submitted to a sanitary control composed by several measures of prevention, and one of these measures is the vaccination of the sensible species. In the development of vaccines opposite to this disease, a new trend is the production of polyvalent vaccines by VLP's technology (*virus like particles*). This work has had as aim to value by clinical survey, 2 VLP vaccines, for serotypes 1 and 1+4. The results confirm the lack of fever, clinical signs and pathologic injuries in vaccinated animals opposite to control animals, which indicates that these new vaccines protect for the appearance of clinical signs.

Keywords: Virus Like Particles vaccines, Bluetongue virus, sheep

Introducción

La vacunación, es la técnica fundamental para el control de la LA (Lengua Azul) (MARM, 2008) y herramienta recomendada por la OIE. Su uso permite el movimiento de animales vacunados y es básica para la erradicación de la enfermedad (Savini *et al.*, 2008). Actualmente existen dos tipos de vacunas frente a la LA, atenuadas e inactivadas. Las primeras, generan múltiples problemas, entre los que destacan su potencial capacidad de recombinación genética, virulencia residual, posible viremia o la aparición de efectos teratológicos y sobre todo, que al ser vivas pueden ser transmitidas por vector a otras zonas no afectadas generando la difusión de la enfermedad (Savini *et al.*, 2008). En el caso de las inactivadas, los problemas que se presentan son la necesidad de administrar dos dosis, la inducción de inmunidad de menor duración, y que salvo excepciones, sólo se han desarrollado vacunas monovalentes, necesitándose la aplicación de diferentes vacunas para la protección frente a los serotipos existentes.

España se ha visto afectada por los serotipos 2, 4, 1 y 8, de los que gracias a la vacunación, se han conseguido erradicar los dos primeros. (MARM, 2009). No obstante, dada la situación epidemiológica de esta enfermedad en Europa, existe riesgo de entrada de nuevos serotipos, lo que conllevaría una nueva vacunación frente a estos, puesto que la cabaña ganadera española no está inmunizada. De ahí la importancia del desarrollo de vacunas polivalentes que permitan la inmunización frente a distintos serotipos en una única vacuna.

El virus de la LA está formado por proteínas estructurales (VP1 a VP7) y no estructurales (NS1 a NS3/NS3A). La cápside del virus está formada por las proteínas VP2 y VP5, mientras que VP3 y VP7 son las de mayor presencia en el interior del virión. (Roy, 1992). Dentro de las proteínas estructurales, destaca VP2, responsable de la formación de anticuerpos neutralizantes, y específica de cada serotipo, habiéndose descrito 25 serotipos distintos (Chaignat *et al.*, 2009). La técnica de producción de las vacunas VLP frente a la LA, consiste en insertar genes del virus de la LA que codifican para 4 proteínas estructurales (VP2, VP3, VP5 y VP7) en un vector, en este caso un baculovirus, para que este las exprese y poder así producir estas proteínas. (Noad and Roy, 2003). Éstas posteriormente son ensambladas formando una estructura similar a la del virus, pero sin presencia del genoma de este (Pearson and Roy, 1993). Dos características fundamentales de estas vacunas son: la posibilidad de crear vacunas polivalentes mediante la inclusión de proteínas VP2 de diferentes serotipos, consiguiendo así una inmunización frente a ellos en una sola vacuna, y la posibilidad de distinguir los animales infectados de los vacunados, ya que estos últimos no presentarán anticuerpos frente a proteínas no estructurales puesto que en la vacuna solo se encuentran 4

proteínas estructurales. El seguimiento clínico del ensayo de este tipo de vacunas está englobado dentro del proyecto europeo BTVAC FP6-2005-SSP-5A que permitirá conocer la eficacia de las VLPs y su potencial utilización como método de control, y del que nuestro equipo es miembro.

Material y métodos

- Animales:

Veintiséis ovejas merinas (13 machos y 13 hembras), de entre 7 y 8 meses de edad al comienzo del estudio, libres de anticuerpos frente a la L.A. procedentes de una explotación situada en la sierra de Madrid. Los animales fueron distribuidos en 5 grupos de ensayo: 8 animales vacunados con VLP S1 (serotipo 1) e infectados con S1 (grupo A); 6 animales vacunados con VLP S1+S4 (serotipo 1, y serotipo 4) e infectados con S1 (grupo B); 3 animales controles no vacunados e infectados con S1 (grupo C); 6 animales vacunados con VLP S1+S4 e infectados con S4 (grupo D); y 3 animales controles no vacunados e infectados con S4 (grupo E). Los grupos no vacunados fueron de menor tamaño atendiendo al bienestar animal. En el caso de los grupos vacunados la diferencia en el número de animales se debe al espacio disponible para el alojamiento de los mismos.

- Instalaciones:

Dentro de las instalaciones del animalario del Laboratorio de bioseguridad de nivel 3 del Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET) los animales fueron alojados en 3 boxes estancos, incomunicados entre sí. Con el fin de maximizar el bienestar de los animales, éstos fueron alojados en condiciones de temperatura controlada, la cama de paja era renovada diariamente y las instalaciones limpiadas cada 3 días. Se puso a disposición de los animales pienso, forraje, y agua *ad libitum*.

- Vacunas

En el estudio se utilizaron dos vacunas desarrolladas por la Prof. Roy de la Escuela de Higiene y Medicina Tropical de Londres, una para el serotipo 1 (Grupo A) y otra frente a los serotipos 1 y 4 del virus LA (Grupos B y D), El adyuvante presente en las vacunas VLP es el adyuvante *Montanide ISA 296 VG*. Éste fue administrado en lugar de la vacuna en los animales control (Grupos C y E).

- Cepas virales

Como agente para el desafío del serotipo 1 se utilizó la cepa "BTV1 Argelia 2006 P3 en BHK L20" proporcionado por el CISA (Centro de investigación en Sanidad Animal) a una

concentración de $1,9 \times 10^6$ TCID₅₀/ ml en vero. Para llevar a cabo el desafío del serotipo 4 se utilizó la cepa “BTV4” proporcionado por Merial®

- Toma de temperatura rectal y tomas termográficas

Siguiendo el calendario previamente establecido que se muestra en la **Tabla 1.**, se tomó la temperatura rectal de los animales, utilizando un termómetro digital (“KRUSSE® Instant digital thermometer for domestic animals. Cat. 291110”). En combinación con esta técnica, se llevó a cabo la toma de fotografías termográficas con la Cámara termográfica ThermaCam™ E45, con el fin de comparar los resultados de ambas técnicas.

L	M	Mx	J	V	S	D
08-SEPTIEMBRE	9	10 D-1 S. CLINICOS / T ^a	11 D0 VACUNACION S. CLINICOS / T ^a TERMOCAM.	12 D1 S. CLINICOS / T ^a TERMOCAM.	13 D 2 S. CLINICOS / T ^a TERMOCAM.	14 D3 S. CLINICOS / T ^a TERMOCAM.
15 D4 S. CLINICOS / T ^a TERMOCAM.	16 D5 S. CLINICOS / T ^a TERMOCAM.	17 D6 S. CLINICOS / T ^a TERMOCAM.	18 D7 S. CLINICOS / T ^a TERMOCAM.	19 D8	20 D9	21 D10
22 D11	23 D12	24 D13	25 D14	26 D15	27 D16	28 D17
29 D18	30 D19 T ^a TERMOCAM.	01-OCTUBRE D20 REVACUNACIÓN S. CLINICOS / T ^a TERMOCAM.	1.D21 S. CLINICOS / T ^a TERMOCAM.	1.D22 S. CLINICOS / T ^a TERMOCAM.	1.D23 S. CLINICOS / T ^a TERMOCAM.	5 D24 S. CLINICOS / T ^a TERMOCAM.
1.D25 S. CLINICOS / T ^a TERMOCAM.	7 D26 S. CLINICOS / T ^a TERMOCAM.	8 D27 S. CLINICOS / T ^a TERMOCAM.	9 D28	10 D29	11 D30	12 D31
13 D32	14 D33	15 D34	16 D35	17 D36	18 D37	19 D38
20 D39	21 D40	22 D41	23 D42	24 D43	25 D44	26 D45
27 D46	28 D47 / T ^a TERMOCAM.	29 D48 DESAFÍO S. CLINICOS / T ^a TERMOCAM.	30 D49 S. CLINICOS / T ^a TERMOCAM.	31 D50 S. CLINICOS / T ^a TERMOCAM.	01-NOV D51 S. CLINICOS / T ^a TERMOCAM.	2 D52 S. CLINICOS / T ^a TERMOCAM.
3 D53 S. CLINICOS / T ^a TERMOCAM.	4 D54 S. CLINICOS / T ^a TERMOCAM.	5 D55 S. CLINICOS / T ^a TERMOCAM.	6 D56 S. CLINICOS TERMOCAM.	7 D57 S. CLINICOS TERMOCAM.	8 D58 S. CLINICOS TERMOCAM.	9 D59 S. CLINICOS TERMOCAM.
10 D60 S. CLINICOS TERMOCAM.	11 D61 S. CLINICOS TERMOCAM.	12 D62 S. CLINICOS TERMOCAM.	13 D63 S. CLINICOS TERMOCAM.	14 D64 S. CLINICOS TERMOCAM.	15 D65 S. CLINICOS	16 D66 S. CLINICOS
17 D67 S. CLINICOS	18 D68 S. CLINICOS	19 D69 S. CLINICOS Necropsias	20 D70 Necropsias	21 D71 Necropsia	22 D72	23 D73
24 D74	25 D75 EUTANASIA	26 D76	27 D77	28 D78	29 D79	30 D80

Tabla 1. Calendario del ensayo clínico desde el día previo a la vacunación hasta las necropsias y fin de experimento en el que se marcan los días de toma de signos clínicos (S.CLINICOS), temperaturas rectales (T^a) y termográficas (TERMOCAM.)

- Seguimiento clínico de la enfermedad:

Previo al comienzo del seguimiento, se llevó a cabo la recepción de los animales y su entrada al laboratorio. Tras un periodo de 7 días de adaptación, los animales fueron evaluados

clínicamente por primera vez. La sistemática para realizar la exploración comenzaba con la toma de la temperatura rectal, seguida por la realización de tomas termográficas, y por último el examen de la sintomatología clínica de cada animal. Esta dinámica de trabajo se realizó de igual manera todos los días correspondientes a la toma de signos clínicos (**Tabla 1**). Para llevar a cabo la exploración clínica, nos basamos en experimentos previos (Perrin *et al.*, 2007) a partir de los cuales, fue desarrollada una tabla con los principales signos clínicos de la LA, asignando a cada uno de ellos, según su importancia, diferentes puntuaciones (**Tabla 2**). La suma de las puntuaciones diarias de cada animal refleja de forma objetiva el estado del mismo.

1. Estado general	bueno = 0 pt	apático = 1 pt	postración = 2 pts	tumbado = 3 pts
2. Signos clínicos				
2.1 edema lingual (1 pt)	facial (1 pt),	nasal (1 pt),	mandibular (1 pt),	labial (1 pt)
2.2 congestión en piel o rodete coronario (4 pts),				
2.3 trastornos locomotores :	cojera (2 pts)	laminitis (2 pts)		
2.4 problemas respiratorios	descarga leve (1 pt),	descarga importante (2 pts)	tos (1 pt)	
2.5 problemas digestivos (1 pt)				
2.6 otros: conjuntivitis, úlceras orales, balido de dolor, hipersalivación (1 pt por signo)				
2.7 mortalidad (20 pts)				

Tabla 2. Descripción de los diferentes signos asociados con la enfermedad de la LA, y la puntuación aplicada en el estudio. Tabla adaptada del estudio de Perrin *et al.* 2007.

El seguimiento comenzó el día 0, momento de la vacunación de los animales con la vacuna correspondiente según el grupo al que pertenecían. Los animales fueron vacunados vía subcutánea en la piel de la axila. Los días siguientes a la vacunación se hizo hincapié en la observación de esta región con objeto de reseñar posibles reacciones locales del animal frente a la vacuna. Siguiendo el calendario previsto (**Tabla. 1**), el día 20 se realizó la revacunación de los animales, realizándose esta vez la administración vía subcutánea en la piel del cuello. De igual forma, durante los días siguientes se prestó especial atención a la región de inyección. El día 48 se realizó el desafío con las cepas del virus. La inoculación del virus se realizó vía intravenosa en yugular para el serotipo 1 y mediante una técnica propia de los laboratorios Merial® para el serotipo 4. El seguimiento terminó con las necropsias de los animales el día 75.

- Sacrificio y necropsia de los animales:

Entre los días 69 y 71 se sacrificó y se realizó la necropsia de los animales de los grupos C y E, y de 2 animales de cada uno de los grupos vacunados. El fin del experimento se sitúa en el día 75, momento en que los animales restantes fueron sacrificados. El sacrificio se realizó mediante inyección letal con T61[®] (Intervet/Schering-Plough) siguiendo las instrucciones y dosis recomendadas por el fabricante. La técnica de necropsia, sistemática y ordenada se realizó con los animales en decúbito supino, abordando por la línea media, primero la cavidad torácica y seguidamente la abdominal. Se tomaron muestras en todos los animales de tejidos y órganos susceptibles de presentar algún tipo de lesión anatomopatológica.

Resultados

Sintomatología

Los datos de exploración clínica recogidos de los grupos A, B y D, indican que los animales vacunados no presentan sintomatología propia de la LA. Realizado el estudio de los datos, se comprobó que todos los animales de los grupos C y E mostraron sintomatología, siendo mas leve en los del grupo E en el que la media máxima de la sintomatología no alcanza los 2 puntos, que en los del C, en el que la media llega hasta 6 puntos. **(Figuras 1 y 2)**. Los síntomas observados en el grupo control C fueron apatía (2/3), descarga nasal leve (3/3), edema labial y facial/nasal (3/3), conjuntivitis (2/3), congestión en mucosas (1/3), cojera (1/3), tos (1/3), hipersalivación leve (2/3), diarrea (1/3). En el grupo E, se observó apatía (1/3), descarga nasal leve (3/3), congestión en mucosas (2/3), edema labial (1/3). En ambos grupos los cuadros clínicos aparecen alrededor de los días 8 (D56) y 11 (D61) tras el desafío manteniéndose en algunos casos hasta el día 19 (D67) tras el desafío.

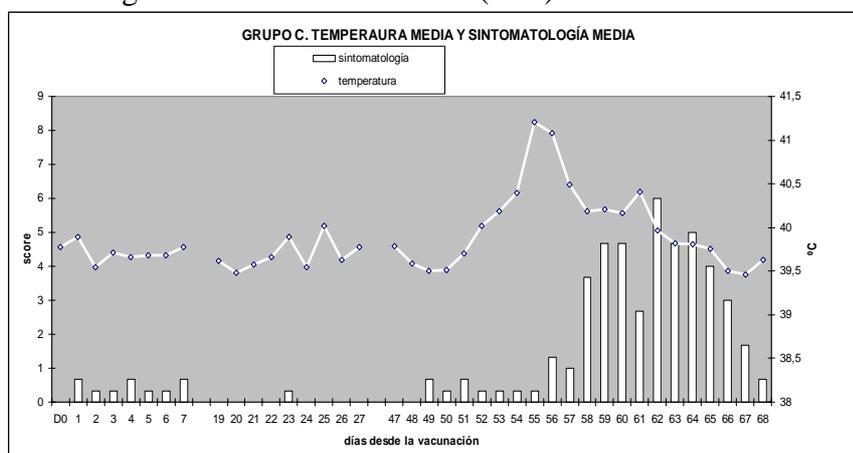


Figura 1. Las barras del gráfico representan la media de la sintomatología de los animales del grupo C, mientras que la línea representa la evolución de la temperatura rectal media del mismo grupo.

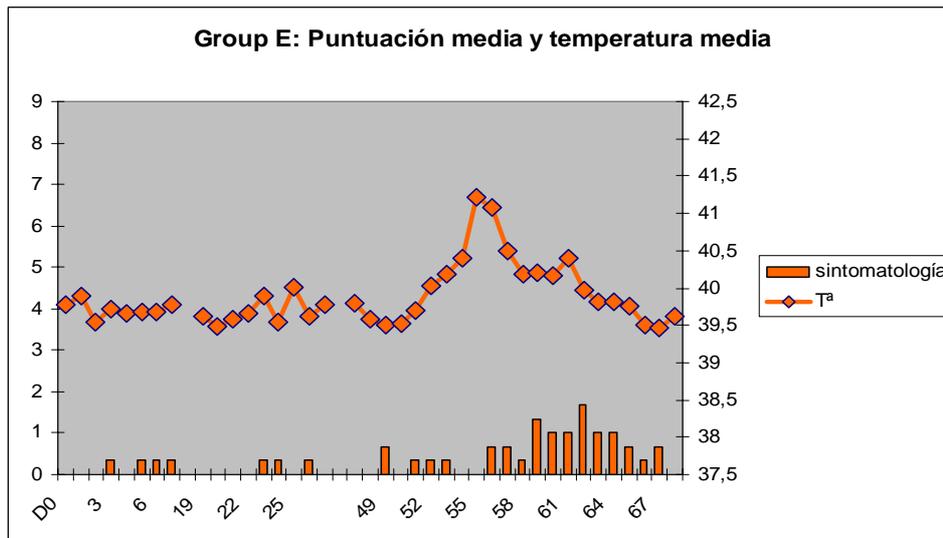


Figura 2. Las barras del gráfico representan la media de la sintomatología de los animales del grupo E, mientras que la línea representa la evolución de la temperatura rectal media del mismo grupo.

Temperatura rectal y Termografía

La temperatura media de los grupos vacunados (A, B y D) no sufrió un aumento significativo tras el desafío (**Figura 3**). La temperatura rectal media de los grupos C y E sufrió un aumento a partir del día 8 tras el desafío (**Figura 1**), en concreto cabe reseñar que de los tres animales del grupo C, en dos la temperatura rectal superó los 41.73 °C subiendo mas de 0.6 °C la temperatura basal máxima que puntualmente estos animales habían mostrado previamente al desafío. De los tres animales del grupo E, dos presentaron temperaturas superiores a 40.82 °C que supuso un aumento de mas de 0.6 °C respecto a las máximas basales como ocurrió en el grupo C. En cuanto a la temperatura termográfica, podemos decir que los resultados tratados de uno de los animales del grupo C, indican que la temperatura registrada en los ojos del mismo, no supera los 38,4 °C durante los días previos al desafío, produciéndose un aumento de esta temperatura hasta los 40,1 °C el día 5 post-desafío, coincidiendo en el tiempo con la temperatura rectal máxima registrada en el animal (41,9 °C).

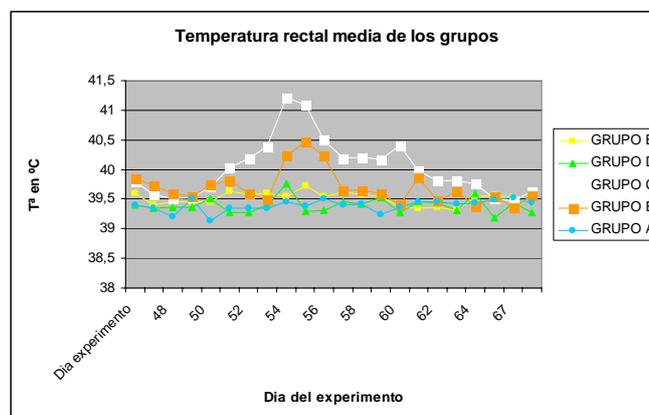


Figura 3. Temperatura rectal media de los grupos desde el desafío hasta en fin de experimento.

Hallazgos anatomopatológicos.

En los animales de los grupos A, B y D no se detectaron lesiones compatibles con LA. En el Grupo C se encontró: predominio de pulpa esplénica blanca (2/3), Médula ósea reactiva (1/3), hipertrofia ganglionar generalizada (3/3) y ligero edema alveolar (2/3).

Los animales pertenecientes al grupo E presentaron Predominio de pulpa esplénica blanca (1/3) e Hipertrofia ganglionar generalizada (2/3).

Discusión

Los animales pertenecientes a los grupos control, que mostraron sintomatología, lo hicieron con cuadros clínicos variables, similares a los descritos en estudios previos (Wade-Evans *et al.*, 1996) tales como, conjuntivitis, y edema en labios y hocico. El uso de una tabla de puntuaciones para valorar los síntomas parece una forma objetiva que permite comparar los resultados entre diferentes estudios. En ensayos previos realizados con el serotipo 2 (Perrin *et al.*, 2007) la puntuación máxima mostrada por un animal, fue de 7, mientras que en este trabajo un animal del grupo C llegó en los momentos de mayor sintomatología hasta los 8 puntos.

La sintomatología observada fue mayor en los animales infectados con el serotipo 1 que en aquellos infectados con el serotipo 4, lo que coincide con las observaciones de campo en España (Saegerman *et al.*, 2008).

La evolución en la temperatura de los animales no vacunados en la que se ve un marcado aumento a partir del día 8 post-inoculación, era la esperada, puesto que estudios anteriores aunque realizados con el serotipo 2, (Hamers *et al.*, 2009), y el serotipo 17 (Ellis *et al.*, 1990) indicaban que el pico de fiebre aparece entre los días 7 y 8 tras el desafío, y en el caso del serotipo 2, coincidiendo con el de sintomatología, aunque en nuestro caso, la sintomatología sucede una semana después de la fiebre.

Los datos preliminares de termografía infrarroja, cuyos resultados definitivos que están procesándose, indican que ésta es una herramienta rápida, eficaz y que reduce el nivel de estrés de los animales, y será apta para detectar los cambios de temperatura derivados de procesos febriles especialmente registrando la temperatura de los ojos, ya que esta zona parece la más apropiada para obtener temperaturas fiables.

En cuanto a los hallazgos anatomopatológicos, no son llamativos, aunque probablemente se deba a que el momento elegido para la realización de las necropsias no fuese el más apropiado ya que los animales se encontraban en fase de recuperación de la enfermedad. Esto se debió a que en nuestro estudio, para la evaluación de la vacuna era más importante esperar a la

disminución de la viremia, datos que han sido valorados por nuestro equipo en un estudio complementario.

Conclusiones

La ausencia de sintomatología clínica, así como de fiebre y de lesiones anatomopatológicas compatibles en los animales vacunados indica, la capacidad de las vacunas VLP1 y VLP1+4 para evitar la aparición del cuadro clínico.

Agradecimientos

Los autores muestran su agradecimiento al equipo del Centro VISAVET, y al Dr. P. J. Sánchez-Cordón (Universidad de Córdoba) por la realización del estudio anatómo-patológico. Este ensayo ha sido financiado gracias al proyecto europeo BTVAC FP6-2005-SSP-5A. AC. Pérez de Diego, disfruta de una beca del programa FPU del Ministerio de Educación.

Bibliografía

- Chaignat, V., Worwa, G., Scherrer, N., Hilbe, M., Ehrensperger, F., Batten, C., Cortyen, M., Hofmann, M., Thuer, B.,** (2009), Toggenburg Orbivirus, a new bluetongue virus: Initial detection, first observations in field and experimental infection of goats and sheep. *Vet. Microbiol.* Article in press
- Ellis, J.A., Luedke, A.J., Davis, W.C., Wechsler, S.J., Mecham, J.O., Pratt, D.L., Elliott, J.D.,** (1990), T lymphocyte subset alterations following bluetongue virus infection in sheep and cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 24, 49-67.
- Hamers, C., Rehbein, S., Hudelet, P., Blanchet, M., Lapostolle, B., Cariou, C., Duboeuf, M., Goutebroze, S.,** (2009), Protective duration of immunity of an inactivated bluetongue (BTV) serotype 2 vaccine against a virulent BTV serotype 2 challenge in sheep. *Vaccine.* 27, 2789-2793.
- Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino** (2008). Manual práctico de operaciones en la lucha contra la lengua azul 2008 oct; 22-47.
- Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino.** Informa sobre la ausencia de detección del serotipo 4 del virus de la Lengua Azul en España desde el año 2006. 2009.ene; 17.
- Noad, R., Roy, P.,** (2003), Virus-like particles as immunogens. *Trends Microbiol.* 11, 438-444.

- Pearson, L.D., Roy, P.**, (1993), Genetically engineered multi-component virus-like particles as veterinary vaccines. *Immunol. Cell Biol.* 71, 381-389.
- Perrin, A., Albina, E., Breard, E., Sailleau, C., Prome, S., Grillet, C., Kwiatek, O., Russo, P., Thiery, R., Zientara, S., Cetre-Sossah, C.**, 2007, Recombinant capripoxviruses expressing proteins of bluetongue virus: evaluation of immune responses and protection in small ruminants. *Vaccine* 25, 6774-6783.
- Roy, P.**, (1992), Bluetongue virus proteins. *J. Gen. Virol.* 73 (Pt 12), 3051-3064.
- Saegerman, C., Berkvens, D., Mellor, P.S.**, (2008), Bluetongue. En: *Manual of diagnostic and vaccines for terrestrial animals. Vol.1.* Paris: OIE, 2004,221-232.
- Savini, G., MacLachlan, N.J., Sanchez-Vizcaino, J.M., Zientara, S.**, (2008) Vaccines against bluetongue in Europe. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 31, 101-120.
- Wade-Evans, A.M., Romero, C.H., Mellor, P., Takamatsu, H., Anderson, J., Thevasagayam, J., Fleming, M.J., Mertens, P.P., Black, D.N.**, (1996) Expression of the major core structural protein (VP7) of bluetongue virus, by a recombinant capripox virus, provides partial protection of sheep against a virulent heterotypic bluetongue virus challenge. *Virology.* 220, 227-231.