

**VALORACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS EN UN ENSAYO DE  
VACUNAS VLP FRENTE A LOS SEROTIPOS 1 Y 4 DE LA LENGUA AZUL  
EVALUATION OF THE ANTIBODY PRODUCTION OF A TRIAL ON VLP  
VACCINES FOR BLUETONGUE 1 AND 4 SEROTYPES**

**Ana Cristina Pérez de Diego, Laura Espinosa, José Manuel Sánchez-Vizcaíno**

Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria VISAVET. UCM.

Departamento de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. UCM.

**RESUMEN**

El objetivo de este trabajo ha sido valorar mediante una prueba ELISA de competición los anticuerpos frente a VP7 generados por las vacunas VLP frente a los serotipos 1 y 1+4 de la lengua azul, así como tras el desafío de los animales, para poder conocer la respuesta humoral generada por estas vacunas. Los tres grupos de animales vacunados presentaron resultados positivos a los 35 días de la primera vacunación, mientras que en los animales no vacunados sólo se evidenció la presencia de anticuerpos a partir del día 10 tras el desafío.

La presencia de anticuerpos en los animales vacunados indica la capacidad de las vacunas VLP para estimular la respuesta humoral.

**PALABRAS CLAVE:** VLP, lengua azul, anticuerpos, ovino

**ABSTRACT**

The main purpose of this study was to evaluate by a competitive ELISA test the VP7 antibodies in response to VLPs vaccines for bluetongue serotypes 1 & 1+4, and after the virus challenge, to assess the humoral immune response produced by these VLPs. The three vaccinated groups showed positive results 35 days after the vaccination. However, in non vaccinated animals antibodies were not detected before day 10 post virus challenge.

The presence of antibodies in vaccinated animals implies that VLP Vaccines are able to stimulate a humoral response.

**KEYWORDS:** VLP, Bluetongue virus, Antibodies, sheep.

**INTRODUCCIÓN**

La LA (lengua azul) es una enfermedad infecciosa causada por un virus ARN bicatenario perteneciente al género *Orbivirus* de la familia *Reoviridae* (Schwartz-Cornil *et al.*, 2008). De los 25 serotipos de este virus que han sido descritos (Chaignat *et al.*, 2009), cabe destacar la presencia en España de los serotipos 1 y 8, y circulando en el resto de Europa el 2, 4, 9 y 16.

El virus de la lengua azul presenta 7 proteínas estructurales (VP1-VP7) y cuatro no estructurales (NS 1, 2, 3, 3A) (Roy, 1992). 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, mientras que la VP7 es específica de serogrupo pero común a todos los serotipos. Ésta permite diferenciar la lengua azul de otras enfermedades pertenecientes al mismo género como puede ser la Enfermedad Hemorrágica del Ciervo.

La vacunación es el método fundamental para poder erradicar la enfermedad (MARM, 2008) como ha sido demostrado con la reciente erradicación del serotipo 4 en España (MARM, 2009). En la actualidad se dispone de vacunas atenuadas e inactivadas. Las atenuadas presentan problemas tales como: virulencia residual, posible viremia o la aparición de efectos teratológicos al aplicarse en hembras gestantes y, sobre todo, que al ser vivas e inducir replicación pueden ser transmitidas por el vector a otras zonas no afectadas (Savini *et al.*, 2008).

Debido a todos estos inconvenientes se desarrollaron vacunas inactivadas que no pueden replicarse en el animal vacunado, siendo, por tanto, más seguras con respecto a la virulencia residual. Sin embargo, inducen una inmunidad de menor duración, y presentan el inconveniente de que en la mayoría de los casos se trata de vacunas de tipo monovalente y, por tanto, sólo son efectivas para un serotipo y necesitan dos dosis de vacuna para inducir una respuesta eficaz (Savini *et al.*, 2008).

La ausencia de inmunidad cruzada para diferentes serotipos supone un gran problema, puesto que exige desarrollar una vacuna para cada serotipo, e inmunizar a toda la cabaña. La situación epidemiológica actual en España, con la presencia de dos serotipos y el riesgo de entrada de otros, como los que circulan en el resto de Europa, complica la situación. Las nuevas vacunas VLP (*Virus Like Particles*), que se encuentran en fase de desarrollo y estudio, contienen solo las proteínas estructurales VP2, VP3, VP5 y VP7 del virus (Roy *et al.*, 1997), y permiten utilizar proteínas VP2 de diferentes serotipos en una sola vacuna, generando así vacunas polivalentes. Cabe destacar la ausencia en estas vacunas de las proteínas no estructurales del virus, así como del genoma, lo que permitirá diferenciar animales vacunados de infectados (Noad and Roy, 2003).

El objetivo ha sido valorar la respuesta humoral de las vacunas VLP monovalentes para el serotipo 1 y bivalentes para los serotipos 1 y 4, mediante la técnica ELISA. Este estudio está englobado en el proyecto europeo BTVAC FP6-2005-SSP-5A del que nuestro equipo es miembro.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Instalaciones

El estudio se realizó en el laboratorio de Bioseguridad de nivel 3 del centro Visavet (Vigilancia Sanitaria Veterinaria). Los animales fueron alojados en 3 boxes, con los parámetros de presión y temperatura controlados y se les facilitó pienso, forraje y agua *ad limitum*.

### Animales

Se utilizaron 26 ovejas de raza merina, tanto machos como hembras, de 7-8 meses de edad al inicio del experimento y con ausencia de anticuerpos frente al virus de la lengua azul, puesto que no habían sido vacunados en la explotación de origen.

De acuerdo al diseño experimental, se dividió a los animales de manera aleatoria, en 5 grupos (**Tabla 1**), siendo el A el formado por 8 animales vacunados con VLP del serotipo 1 y desafiados con el mismo serotipo, el B, 6 animales vacunados con VLP 1+4 y desafiados con el serotipo 1, el C 3 animales sin vacunar a los que se infectó con el serotipo 1, grupo D compuesto por 6 animales vacunados con VLP 1+4 y desafiados con el serotipo 4 y finalmente, el grupo E compuesto por 3 animales a los que no se administró vacuna y que fueron desafiados con el serotipo 4

| <b>Grupo</b> | <b>Vacuna</b>             | <b>Desafío<br/>(serotipo)</b> | <b>Número de<br/>animales</b> |
|--------------|---------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| <b>A</b>     | <b>VLP 1</b>              | <b>1</b>                      | <b>8</b>                      |
| <b>B</b>     | <b>VLP 1+4</b>            | <b>1</b>                      | <b>6</b>                      |
| <b>C</b>     | <b>Control, adyuvante</b> | <b>1</b>                      | <b>3</b>                      |
| <b>D</b>     | <b>VLP 1+4</b>            | <b>4</b>                      | <b>6</b>                      |
| <b>E</b>     | <b>Control, adyuvante</b> | <b>4</b>                      | <b>3</b>                      |

Tabla 1. Grupos en los que fueron divididas las ovejas, atendiendo a la vacuna utilizada, así como al serotipo de desafío.

### Vacunación

Siguiendo el calendario que se muestra en la **Tabla 2**, se realizó la vacunación el día 0 del experimento y la revacunación el día 20. Las vacunas administradas fueron VLPs, una de ellas para el serotipo 1 y otra bivalente para los serotipos 1 y 4, dependiendo de los grupos anteriormente citados. La vía de administración fue subcutánea, tanto en la vacunación como en la revacunación, realizándose en la zona axilar y lateral del cuello respectivamente.

|                         |                 |       |                    |       |                 |                 |                 |                 |                        |
|-------------------------|-----------------|-------|--------------------|-------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------------|
| <b>Día</b>              | 0<br>Vacunación | 10    | 20<br>Revacunación | 35    | 42              | 48<br>Desafío   | 51              | 53              | 54                     |
| <b>Toma de muestras</b> | Sangre<br>Suero | Suero | Sangre<br>Suero    | Suero | Suero           | Sangre<br>Suero | Sangre          | Suero           | Sangre                 |
| <b>Día</b>              | 57              | 58    | 61                 | 68    | 69              | 70              | 71              | 74              | 75. Fin de Experimento |
| <b>Toma de muestras</b> | Sangre          | Suero | Sangre             | Suero | Sangre<br>Suero | Sangre<br>Suero | Sangre<br>Suero | Sangre<br>Suero | Sangre<br>Suero        |

Tabla 2. Calendario en el que se reseña el día de la vacunación, revacunación, y desafío, así como la toma de muestras de suero.

### Desafío

Para el desafío se inoculó el serotipo 1 “Argelia 2006 P3 en BHK L20” suministrado por el CISA (Centro de Investigación en Sanidad Animal) por vía intravenosa y el serotipo 4 mediante un protocolo realizado por Merial. Los grupos A, B y C fueron infectados con el serotipo 1 del virus de la lengua azul y los grupos D y E, con el serotipo 4.

### Toma de muestras

De acuerdo con el calendario establecido en el diseño del experimento, se tomaron muestras de sangre sin anticoagulante de la vena yugular mediante el sistema Vacutainer® para la posterior obtención de suero. Estos eran congelados a - 40°C hasta el momento del análisis.

### Técnica de ELISA

Las muestras de suero fueron analizadas mediante un kit de ELISA de competición para la detección de anticuerpos frente a la proteína VP7 del virus (POURQUIER® Bluetongue Competitive ELISA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Una vez procesada la placa de ELISA, se midió la densidad óptica de cada pocillo a 450nm, en un lector de placas Anthos 2001®. A continuación se calculó el ratio de cada muestra, dividiendo la densidad óptica de la muestra entre la densidad óptica del control negativo del kit, y el resultado se multiplicó por 100, para obtener el ratio en forma de porcentaje. El criterio de interpretación se basó en las recomendaciones del fabricante, que indica que los resultados superiores al 45% son negativos, y los inferiores al 35% positivos.

Las muestras se analizaron siempre por duplicado, y en caso de obtener resultados dudosos, se repitió el test, hasta obtener resultados concluyentes.

### RESULTADOS

En el grupo A, cinco animales (5/8) empezaron a presentar anticuerpos a partir del día 10, aunque cuatro de ellos dieron resultados negativos el día 20. A partir del día 35, todos los animales de este grupo presentaron resultados positivos, a excepción de un individuo (1/8), en el cual no se detectaron anticuerpos hasta transcurridos 10 días desde el desafío (**Figura 1a**).

En el grupo B, un individuo (1/6) mostró anticuerpos el día 10 y otros dos animales (2/6) el día 20. Transcurridos 15 días desde la revacunación (día 35), todos los animales de este grupo (6/6) presentaron resultados positivos (**Figura 1b**).

En el grupo C, a diferencia de los grupos anteriores, todos los animales (3/3) mostraron resultados negativos previos al desafío, comenzando a observarse anticuerpos a partir del día 58, es decir 10 días después del desafío. (**Figura 1c**).

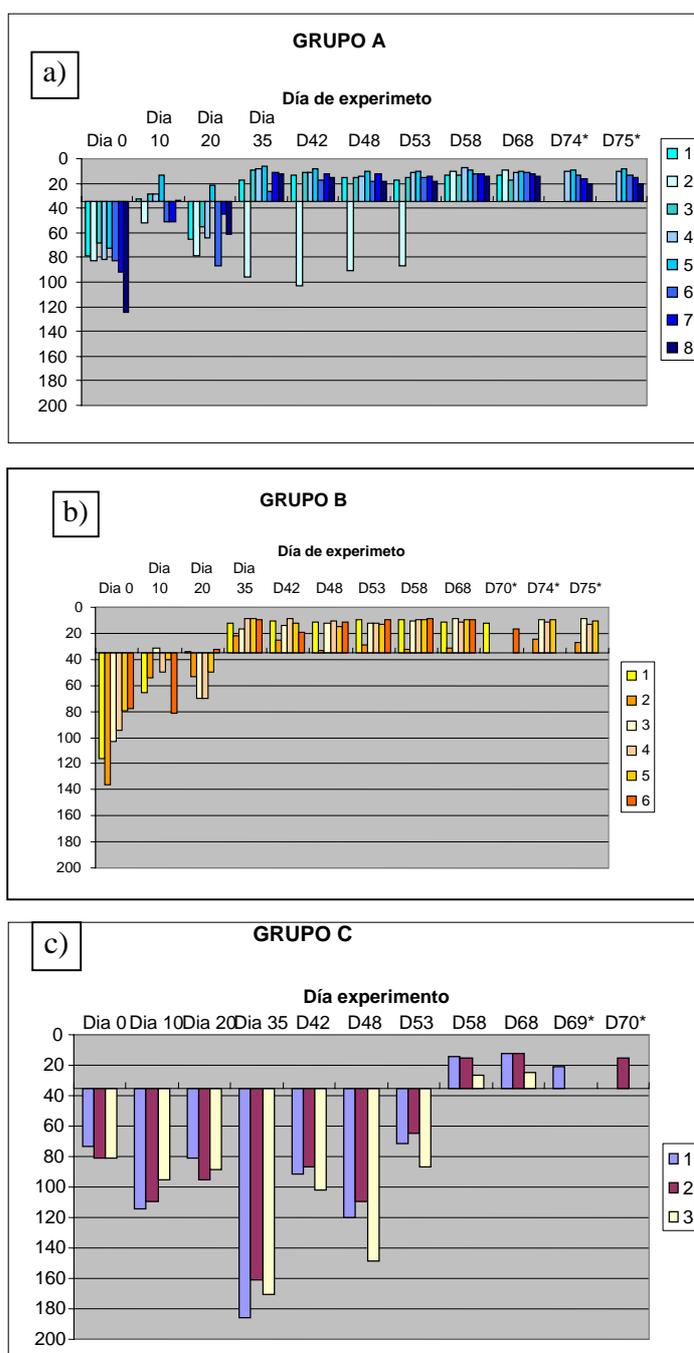


Figura 1. Resultados de los porcentajes de inhibición mediante ELISA de cada animal a lo largo del tiempo. a) grupo A; b) grupo B; y c) grupo C. El eje de las Y muestra el ratio en forma de porcentaje. El eje de las X está situado en 35%; por tanto, las barras que se encuentran por encima, son resultados positivos.

En cuanto a los grupos desafiados con el serotipo 4, los resultados obtenidos en los animales vacunados fueron similares a los de los grupos A y B. De tal manera, en el grupo D tres animales (3/6) mostraron anticuerpos a partir del día 10, de los cuales un individuo (1/6) los mantuvo hasta el día 20. En cinco animales (5/6) se observaron anticuerpos el día 35 y no fue hasta el día 42 en el que todos los animales (6/6) dieron resultados positivos. En conjunto, la media de los animales del grupo D muestra la presencia de anticuerpos a partir del día 35, es decir, 15 días después de la revacunación. En cambio, en el grupo E, un animal (1/3) mostró resultados positivos transcurridos 10 días desde el desafío (día 58) de tal forma que la media del grupo, atendiendo al ratio en forma de porcentaje, es positiva a partir del día 58; pero es a partir del día 68 en el que todos los animales (3/3) mostraron anticuerpos (**Figura 2**).

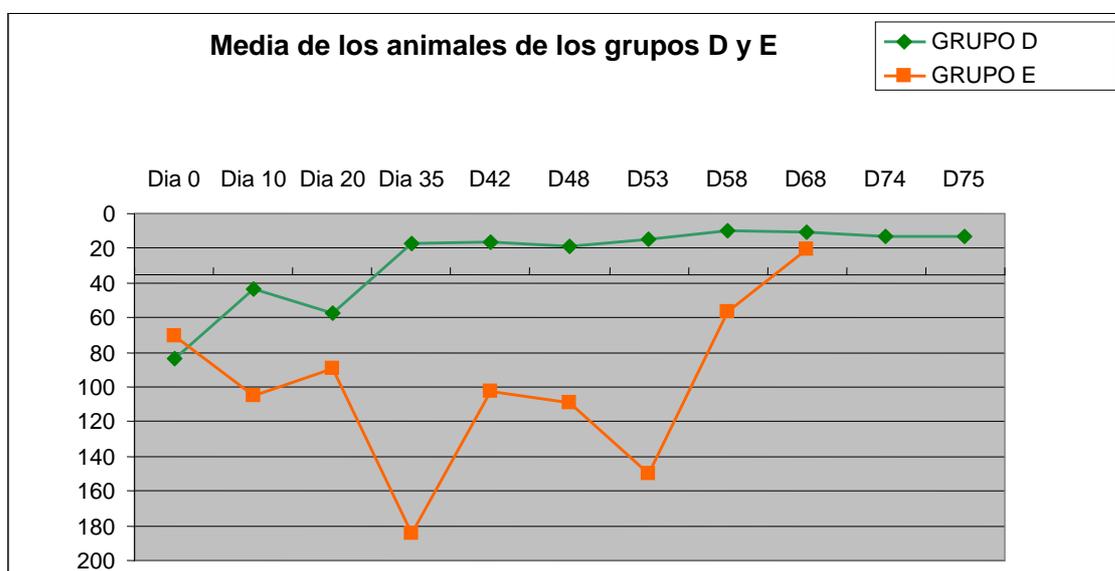


Figura 2. Resultados de los porcentajes de inhibición mediante ELISA de la media de los animales de los grupos D y E. El eje de las Y muestra el ratio en forma de porcentaje El eje de las X se encuentra situado en el nivel de 35%, de manera que los puntos situados por encima, son resultados positivos al ELISA.

## DISCUSIÓN

En algunos animales vacunados comenzó a detectarse la presencia de anticuerpos frente a VP7 a partir del día 10 post vacunación, en otros a partir del día 20, obteniéndose el mayor resultado de anticuerpos a los 35 días. Estudios previos realizados con vacuna inactivada del serotipo 2 y analizando la presencia de anticuerpos neutralizantes frente a VP2 mostraron resultados positivos a los 20 días y el pico máximo a los 40 (Hamers *et al.*, 2009). Estos resultados se asemejan a la evolución observada en nuestro estudio, puesto que el punto en el que mayor aumento se detectó fue a los 35 días y los niveles a partir de ese momento se mantuvieron, lo que supone que la evolución temporal de la respuesta inmune de las vacunas VLP es similar a la de las vacunas inactivadas.

En cuanto a los animales no vacunados, la presencia de anticuerpos tras el desafío sucede rápidamente, detectándose en nuestro caso sólo 10 días después y coincidiendo con estudios previos (Wade-Evans *et al.*, 1996), en los que el pico máximo de anticuerpos frente a VP7 en los animales no vacunados se detectó a las 2 semanas tras la inoculación,.

Cabe destacar que el animal vacunado del grupo A, que no mostró resultado positivo al test ELISA antes del desafío con el virus, fue según los datos de los que disponemos, el único que presentó timo en la necropsia. La no involución normal del timo podría implicar una respuesta inmune defectuosa, ya que si su evolución fisiológica es anormal esta puede también haber ocurrido a nivel de sus funciones de maduración y diferenciación de las células del sistema inmune. Por tanto los resultados de la respuesta humoral obtenidos se deberían a un defecto del animal más que a un defecto de la vacuna.

### **CONCLUSIONES**

Se ha comprobado la utilidad del ELISA como técnica para el estudio de la presencia de anticuerpos frente al virus de la lengua azul, cuyos resultados deberán estudiarse conjuntamente con los de seroneutralización, prueba que se está llevando a cabo en estos momentos, para evaluar la respuesta específica frente a cada serotipo.

La presencia de anticuerpos en los animales vacunados indica la capacidad de las vacunas VLP para estimular la respuesta inmune humoral.

La vacuna bivalente frente a los serotipos 1 y 4 indujo la respuesta esperada, demostrándose la efectividad de este tipo de vacunas para inducir anticuerpos para más de un serotipo.

### **AGRADECIMIENTOS**

Este estudio ha sido financiado gracias la proyecto europeo BTVAC FP6-2005-SSP-5A.

AC. Pérez de Diego disfruta de una beca del programa FPU del Ministerio de Educación.

A todo el equipo de VISAVET, a Belén y Rocio, técnicos de nuestro equipo por su eficiencia a la hora de procesar las muestras.

### **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.

**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, Rural y Marino (MARM)** (2008). Manual práctico de operaciones en la lucha contra la lengua azul, 22-47.
- Ministerio de Medio Ambiente, Rural y Marino (MARM)** (2009). Informe sobre la ausencia de detección del serotipo 4 del virus de la lengua azul en España desde el año 2006. ene; 17.
- Noad, R., Roy, P.** (2003) Virus-like particles as immunogens. *Trends Microbiol.* 11: 438-444.
- Roy, P.** (1992) Bluetongue virus proteins. *J. Gen. Virol.* 73: 3051-3064.
- Roy, P., Mikhailov, M., Bishop, D.H.** (1997) Baculovirus multigene expression vectors and their use for understanding the assembly process of architecturally complex virus particles. *Gene* 190:119-129.
- Savini G, James MacLachlan N, Sanchez-Vizcaino J.M., Zientara S.** (2008) Vaccines against bluetongue in Europe. *Comparat. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 31: 101-120.
- Schwartz-Cornil, I., Mertens, P.P., Contreras, V., Hemati, B., Pascale, F., Breard, E., Mellor, P.S., MacLachlan, N.J., Zientara, S.** (2008) Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity. *Vet. Res.* 39: 46
- 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.