



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

**CARACTERIZACIÓN DE LA SEGURIDAD Y EFICACIA
DE BA71ΔCD2:
UNA VACUNA EXPERIMENTAL CONTRA EL VIRUS DE LA
PESTE PORCINA AFRICANA**

Elisabet López Fernández

Tesis Doctoral
Bellaterra, 2019



**CARACTERIZACIÓN DE LA SEGURIDAD Y EFICACIA DE BA71ΔCD2:
UNA VACUNA EXPERIMENTAL CONTRA EL VIRUS DE LA PESTE PORCINA
AFRICANA**

Tesis doctoral presentada por **Elisabet López Fernández** para acceder al grado de doctora en el marco del programa de Doctorado en Medicina y Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autònoma de Barcelona, bajo la direcció del Dr. **Fernando Rodríguez González**, la Dra. **Sonia Pina Pedrero** y la tutoría del Dr. **Joaquim Segalés Coma**.

Bellaterra, 2019



El Dr. **Fernando Rodríguez González** y la Dra. **Sonia Pina Pedrero**, investigadores del Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias-Centro de Investigación en Sanidad Animal (IRTA-CReSA), y el Dr. **Joaquim Segalés Coma**, investigador del IRTA-CReSA y profesor titular de la UAB

Certifican:

Que la memoria titulada >> **CARACTERIZACIÓN DE LA SEGURIDAD Y EFICACIA DE BA71ΔCD2: UNA VACUNA EXPERIMENTAL CONTRA EL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA**>> presentada por **Elisabet López Fernández** para la obtención del grado de **Doctora en Medicina y Sanidad Animal**, se ha realizado bajo su supervisión y tutoría, y autorizan su presentación para que sea valorada por la comisión establecida.

Para que conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Bellaterra (Barcelona), el 24 de Abril de 2019.

Dr. Fernando Rodríguez González
Director

Dra. Sonia Pina Pedrero
Co-directora

Dr. Joaquim Segalés Coma
Tutor

Elisabet López Fernández
Doctoranda

Los estudios de doctorado de Elisabet López Fernández han sido financiados por una beca de Ayuda para contratos predoctorales (FPI), con referencia BES-2014-068171 y vinculada al proyecto AGL2013-48998-C2-1-R, proyecto y beca concedidos por el Ministerio de Ciencia e Innovación español.

ÍNDICE

RESUMEN	V
SUMMARY	IX
ABREVIATURAS.....	XI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 La Peste Porcina Africana	3
1.1.1 Historia y situación actual de la enfermedad	3
1.1.2 Epidemiología de la PPA.....	5
1.1.3 Patogenia y manifestaciones clínicas de la enfermedad	9
1.1.4 Prevención, diagnóstico y control	11
1.2 Etiología: El virus de la peste porcina africana	12
1.2.1 Morfología y estructura	12
1.2.2 Genoma viral.....	14
1.2.3 Ciclo de infección del VPPA	16
1.3 Interacción del VPPA con el sistema inmunológico del huésped	18
1.3.1 Mecanismos de evasión del VPPA	18
1.3.2 Mecanismos inmunes implicados en la protección frente al VPPA.....	20
1.3.2.1 Implicación de la respuesta humoral en protección frente al VPPA	20
1.3.2.2 Implicación de la respuesta celular en protección frente al VPPA.....	22
1.4 Desarrollo de vacunas frente a la PPA	23
2. OBJETIVOS	27
3. MATERIAL Y MÉTODOS	31
3.1 Cultivos celulares.....	33
3.1.1 Líneas celulares estables.....	33
3.1.2 Líneas celulares primarias.....	33
3.1.2.1 Células mononucleares de sangre periférica (PBMC)	33
3.1.2.2 Macrófagos alveolares porcinos (MAPs)	34
3.2 Cepas virales y técnicas de cuantificación empleadas	35
3.2.1 Cepas de VPPA	35

Índice

3.2.2 Preparación de <i>stocks</i> virales para su uso <i>in vivo</i> como vacunas experimentales	36
3.2.3 Técnicas de titulación virales	36
3.2.3.1 Titulación del VPPA mediante hemadsorción (HAD)	36
3.2.3.2 Titulación del VPPA mediante la formación de placas de lisis	37
3.2.3.3 Titulación del VPPA mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).....	38
3.3 Manipulación genética del virus atenuado BA71ΔCD2	40
3.3.1 Diseño de las construcciones plasmídicas pUC.EP153R.LacZ y pUC.DP96R.LacZ	40
3.3.2 Generación de virus dobles recombinantes: transfección de las construcciones plasmídicas e infección con el virus.....	41
3.4 Ensayos <i>in vivo</i>	42
3.4.1 Protocolos de inmunización e infección y toma de muestras	42
3.4.2 Seguimiento clínico experimental.....	44
3.4.3 Cuantificación de la carga viral mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).....	44
3.4.4 Valoración de la respuesta inmunológica.....	44
3.4.4.1 Medición de la respuesta humoral frente al VPPA mediante ELISA	44
3.4.4.2 Medición de la respuesta celular frente al VPPA mediante un ELISPOT de IFN γ	45
3.5 Estrategias empleadas para intentar mejorar la seguridad y la eficacia de BA71ΔCD2.....	46
3.5.1 Inactivación de BA71ΔCD2 para aumentar su seguridad.....	46
3.5.1.1 Inactivación con etilamina binaria (BEI)	46
3.5.1.2 Inactivación con Beta-propiolactona (BPL)	47
3.5.1.3 Inactivación por ultravioleta (UV)	47
3.5.2. Utilización de adyuvantes para potenciar la respuesta inmune.....	48
3.5.2.1 Conjugación de BA71ΔCD2 a micropartículas de silicio.	48
3.5.2.2 Conjugación BA71ΔCD2 a micropartículas de quitosano sulfonado.	49
3.6 Ensayo de la Inhibición de la hemadsorción del VPPA	50
4. RESULTADOS	53

4.1 Buscando estrategias de vacunación que permitan mejorar la seguridad de BA71ΔCD2.....	55
4.1.1 BA71ΔCD2 pierde la capacidad protectora tras su inactivación.	56
4.1.2 La utilización de dosis subóptimas repetidas de BA71ΔCD2 (estrategia <i>prime-boost</i>) no protege totalmente frente a la infección con Georgia2007/1.	61
4.1.3 Ensayo preliminar de vacunación de BA71ΔCD2 con micropartículas de silicio mesoporosas o de quitosano-sulfonado, administradas como adyuvantes.	65
4.2 Manipulación genética de BA71ΔCD2 como alternativa para obtener una vacuna más segura.....	73
4.2.1 Eliminación de un segundo factor de virulencia a partir de BA71ΔCD2: Caracterización del potencial protector de los nuevos virus dobles recombinantes, BA71ΔCD2EP153R y BA71ΔCD2DP96R.....	73
4.2.2 Caracterización del potencial protector del virus inducible BA71ΔCD2PKi...79	79
4.3 Explorando diferentes rutas de inoculación para la vacunación con BA71ΔCD2 y para la infección con el VPPA.	85
4.3.1 La inoculación intranasal de BA71ΔCD2 resulta más segura que la intramuscular para el animal vacunado, pero provoca la acumulación del virus vacunal en fosas nasales.....	85
4.3.2 BA71ΔCD2 protege frente a la inoculación intranasal con una dosis letal de Georgia2007/1.....	88
4.3.3 BA71ΔCD2 confiere protección frente a la infección por contacto con Georgia2007/1 y frente a la infección con garrapatas naturalmente portadoras de un VPPA perteneciente al genotipo XIX.	92
4.4 Evaluando la capacidad cros-protectora de BA71ΔCD2 frente Ken06.Bus (genotipo IX), una cepa de VPPA filogenéticamente muy distante de BA71 (Genotipo I).....	95
4.4.1 BA71ΔCD2 protege con muy poca eficacia contra la cepa virulenta Ken06.Bus.	95
4.4.2 Los animales vacunados con BA71ΔCD2 que sobreviven a la infección con su homólogo virulento, BA71, son capaces de resistir la infección contra la cepa virulenta Ken06.Bus.	99
4.5 La hemaglutinina viral. Una proteína con capacidad DIVA.....	104

Índice

5. DISCUSIÓN	107
6. CONCLUSIONES.....	121
7. BIBLIOGRAFÍA.....	125

RESUMEN

El virus de la peste porcina africana (VPPA) representa, hoy en día, una gran amenaza para la industria porcina. La presencia descontrolada de la PPA en África ha favorecido su exportación a otros países, tal y como demuestra la última entrada del VPPA en el Cáucaso, en el año 2007, a través de la República de Georgia. Desde entonces, el VPPA se ha extendido a países vecinos, alcanzando la Unión Europea en 2014, y más recientemente llegando a China en verano de 2018, desde donde ya ha comenzado a extenderse por el resto de Asia. La falta de vacunas disponibles contra la PPA hace su control difícil y, hasta ahora, solamente la utilización de virus atenuados vivos como vacunas experimentales, había demostrado una sólida protección homóloga, contra la infección letal utilizando los virus virulentos parentales. Más recientemente, resultados obtenidos en nuestro laboratorio (Monteagudo *et al.*, 2017) , han permitido describir un nuevo candidato vacunal con capacidades únicas de protección cruzada: BA71ΔCD2. Así, la inoculación de cerdos con BA71ΔCD2 fue capaz de proteger no sólo contra el desafío experimental con BA71, la cepa virulenta parental, sino también contra virus heterólogos, incluyendo Georgia2007/1, la cepa del genotipo II del VPPA que circula actualmente en la Europa continental y en Asia.

A pesar de su demostrada eficacia y capacidad *cross-protectora*, BA71ΔCD2 presenta una serie de limitaciones de bioseguridad para su uso comercial, al menos en zonas libres de la enfermedad.

Así pues, dos son los objetivos principales de esta tesis: primero, desarrollar una vacuna basada en BA71ΔCD2 más segura, reduciendo, en lo posible, la presencia de virulencia residual detectable sin disminuir su eficacia. Segundo, caracterizar en la medida de lo posible, su potencial protector pensando en escenarios muy distintos; como el de la Europa que nos rodea, así como en zonas endémicas donde la enfermedad está causando grandes estragos sin poder aplicar ninguna medida de control; como en el caso del África subsahariana y más recientemente de Asia.

Para el primer objetivo se abordaron diferentes estrategias de vacunación que implicaban desde la inactivación del virus, cambiar las pautas de administración, buscar rutas de inoculación alternativas, usar adyuvantes de última generación e incluso llegar a manipular el genoma del virus, creando virus dobles mutantes e incluso inducibles. Los datos recopilados durante esta tesis nos demuestran que existe un fino equilibrio entre

Resumen

atenuación, virulencia y apatogenicidad para el caso del VPPA, pudiendo pasar con facilidad del éxito al fracaso en términos de protección. Si bien no podemos garantizar una formulación óptima para la administración de BA71ΔCD2 que conjugue su máxima eficacia y bioseguridad, estamos hoy más cerca de ello, exigiendo en el futuro más esfuerzos en investigación. Como sucede con casi todas las vacunas vivas en el mercado, incluyendo las que se administran en niños, su éxito depende precisamente de su capacidad de replicar *in vivo*.

La dificultad añadida en el caso de una vacuna frente a la PPA en cerdo es que, como sucedería con el caso del Ébola para humanos, su administración en Europa, zona libre de ambas enfermedades, exige tolerancia cero en lo que se refiere al riesgo. El segundo objetivo de nuestra tesis se realizó pensando en zonas más desfavorecidas, endémicas para el VPPA, como podría ser el África subsahariana. Zonas en las que, en ocasiones circulan concomitantemente diversos genotipos del virus y multitud de subvariantes del mismo, y en los que habría que generar vacunas individuales para cada uno de ellos. De forma muy resumida, a lo largo de esta tesis hemos podido demostrar, por un lado, la capacidad de BA71ΔCD2 de proteger no sólo frente a una infección con Georgia2007/1, administrada intramuscularmente, sino además frente a la inoculación intranasal o por contacto con el mismo virus, extendiendo la protección incluso a la infección con garrapatas infectadas naturalmente con el genotipo XIX del VPPA; virus que se encuentra circulando actualmente en África. Finalmente, hemos podido demostrar que aquel animal vacunado frente a BA71ΔCD2 que sobrevive a una infección con un virus virulento, queda a su vez protegido frente a posteriores infecciones incluso con aislados muy alejados filogenéticamente de BA71ΔCD2. Virus contra los que por sí solo su eficacia había demostrado ser muy baja. Así pues, la vacunación con BA71ΔCD2 podrá no sólo tener efectos beneficiosos directos, sino también, indirectos, sobre todo para aquellos animales que han de vivir en zonas con una presión epidemiológica muy fuerte. De nuevo, futuras investigaciones habrán de desentrañar los mecanismos intrínsecos implicados en esta protección dual.

La demostración, en esta tesis, de que BA71ΔCD2 podía inducir una respuesta de anticuerpos diferenciales respecto a la cepa circulante, basadas en un ensayo de inhibición de la hemadsorción, junto con el hecho de que BA71ΔCD2 sea el único prototipo vacunal existente, hoy en día, capaz de crecer en una línea celular estable añade

muchas posibilidades a su utilización como vacuna de emergencia en zonas endémicas y muy castigadas por el virus.

Mientras esperamos la vacuna ideal, estamos orgullosos de poder estar en el punto de mira, de aquellos que necesitan herramientas para controlar una más que inminente epidemia global.

SUMMARY

African swine fever virus (ASFV) represents today a major threat to the swine industry. The uncontrolled presence of ASF in Africa has favoured its exportation to other countries, as evidenced by the last entry of ASFV in the Caucasus in 2007 through the Republic of Georgia. Since then, ASFV has spread to neighbouring countries, reaching the European Union in 2014, and more recently China in the summer of 2018, where it has already begun to spread throughout the rest of Asia. The lack of available vaccines against ASF makes its control even more difficult, and to date, only the use of live attenuated viruses as experimental vaccines, had demonstrated a strong but homologous protection against lethal infection with parental virulent viruses only. Recent results obtained in our laboratory (Monteagudo *et al.*, 2017), allowed us to describe a new candidate with cross-protective capabilities: BA71 Δ CD2. Thus, the inoculation of pigs with BA71 Δ CD2 was able to protect not only against the experimental challenge with BA71, its virulent counterpart strain, but also against heterologous viruses, including Georgia2007/1, the strain of genotype II, currently circulating in Europe and Asia.

Despite its demonstrated efficacy and cross-protective capacity, BA71 Δ CD2 presents a series of biosecurity limitations for commercial use, at least in disease-free areas.

So, two are the main objectives of this thesis: first, the development of a safer vaccine based on BA71 Δ CD2, reducing as much as possible its residual virulence without decreasing its effectiveness. Second, the characterization of its protective potential in different scenarios, as it could be the Continental Europe, as well as endemic areas where the disease is causing great damage, without being able to apply any control measure, like Sub-Saharan African countries, or, more recently, Asia.

For the first objective, different vaccination strategies were approached, involving the inactivation of the virus, changing the administration guidelines, searching for alternative inoculation routes, using next-generation adjuvants and even manipulating the genome of the virus for the generation of double mutants and inducible viruses. Although we cannot guarantee an optimal formulation for the administration of BA71 Δ CD2 that combines its maximum efficacy and biosecurity, we can state that today we are closer than ever to reach such goal. Nevertheless, more efforts in research are needed to obtain the aforementioned objective. As it happens for almost all live vaccines

Summary

in the market, including those that are currently administered in children, its success depends on its ability to replicate *in vivo*.

A vaccine against ASF in pigs presents an additional difficulty. Similarly, to the case of Ebola for humans, its administration in Europe, a free area of both pathogens, requires zero tolerance in terms of risk. The second objective of our thesis was carried out thinking in the most disadvantaged areas such as Sub-Saharan Africa, which is endemic for ASFV. In these regions, diverse genotypes of the virus and a multitude virus subvariants circulate concomitantly at the same time, and individual vaccines would have to be generated for each one. Briefly, throughout this thesis we have been able to demonstrate the capacity of BA71 Δ CD2 to protect not only against an infection with Georgia2007/1, administered intramuscularly, but also against intranasal, contact inoculation with the same virus, even expanding its protection to infection with ticks naturally infected with a genotype XIX of ASFV; currently circulating in Africa. Finally, we have been able to demonstrate that animals vaccinated with BA71 Δ CD2 that survive an infection with its virulent counterpart, are protected against subsequent ASFV-infections even with phylogenetically very distant isolates from the BA71 Δ CD2, against which its effectiveness is limited. These experiments demonstrate that vaccination with BA71 Δ CD2 has direct and indirect effects that might be extremely beneficial, especially for those animals living in areas with a very high epidemiological pressure. Again, future investigations will have to unravel the intrinsic mechanisms involved in this dual protection.

This thesis demonstrates that BA71 Δ CD2 could induce a differential antibody response to the circulating strain, based on a hemadsorption inhibition assay. Moreover, BA71 Δ CD2 is the only prototype vaccine capable of growing in a stable cell line, which represents a high benefit for its use as an emergency vaccine in endemic areas.

While waiting for the ideal vaccine, we are proud to be in the spotlight of those who need tools to control a more than imminent global epidemic

ABREVIATURAS

µg	microgramo
µl	microlitro
µM	micromolar
µm	micrómetro o micron
ADCC	Citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (del inglés, <i>antibody dependent cell mediated cytotoxicity</i>)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARC-OVR	Consejo de Investigación Agrícola-Instituto Veterinario de Onderstepoort (Sudáfrica)
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ASFV	Peste Porcina Africana (del inglés, <i>African Swine Fever Virus</i>)
ATCC	Colección americana de cultivos tipo (del inglés, <i>American Type Culture Collection</i>)
BEI	Etilamina binaria (del inglés, <i>binary ethyleneimine</i>)
BI	Boehringer Ingelheim
BPL	β-propiolactona
BSA	Albúmina sérica bovina (del inglés, <i>Bovine Serum Albumina</i>)
CBMSO	Centro de Biología Molecular Severo Ochoa
CD	Célula dendrítica
CD2v	Hemaglutinina viral (homólogo receptor CD2)
CD4	Receptor de membrana expresado por los linfocitos T cooperadores
CD8	Receptor de membrana expresado por los linfocitos T citotóxicos
CGE	Copias Genómicas Equivalentes
CID	Coagulación intravascular diseminada
CISA	Centro de Investigación en Sanidad Animal, Madrid
cm²	Centímetro cuadrado
COS-1	Células semejantes a fibroblastos de riñón de mono verde africano
CPA	Célula Presentadora de Antígeno
CRISPR/Cas9	Sistema de edición genómica. Basado en la detección de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (del inglés, <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>) y la escisión por parte de la nucleasa Cas9.
CS	Célula Secretora
CTL	Linfocito T-CD8+ citotóxico (del inglés, <i>Cytotoxic T lymphocyte</i>)
DIVA	del inglés, <i>Differentiating Infected from Vaccinated Animals</i>

Abreviaturas

DMEM	Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (del inglés, <i>Dubelcco's Modified Eagle Medium</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido (CH ₃ SOCH ₃)
DO	Densidad Óptica
Dpi	días post-inmunización
Dpc	días post-infección (del inglés, <i>days post challenge</i>)
dsADN	ADN de doble cadena
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético (del inglés, <i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>)
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima (del inglés, <i>Enzime-Linked Immunoabsorvent Assay</i>)
ELISPOT	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima mediante recuento de spots (del inglés, <i>Enzime-Linked immunoabsorvent Spot Assay</i>)
FAO	Organización de la ONU para la Alimentación y la Agricultura
RE	Retículo Endoplasmático
G	Unidad de fuerza centrífuga relativa
HA	Hemaglutinina
HAD	Hemadsorción
HN	Hisopo Nasal
INIA	Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria
IFN	Interferón
iHAD	Inhibición de la hemadsorción
IL	Interleuquina
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (C ₉ H ₁₈ O ₅ S ₁)
lacZ	Gen que codifica el enzima β-galactosidasa
MAP	Macrófago Alveolar Porcino
Mg	Miligramo
MGF	Familia multigénica (del inglés, <i>Multigene Family</i>)
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés, <i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MI	Mililitro
MOI	Multiplicidad de infección (del inglés, <i>Multiplicity of Infection</i>)
Ng	Nanogramo
NK	Células naturalmente asesinas (del inglés, <i>Natural Killer</i>)
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (del inglés, <i>Nuclear Factor kappa B</i>)
NFAT	Factor nuclear de células T activadas (del inglés, <i>Nuclear Factor of Activated T-cells</i>)
Nt	Nucleótidos

OIE	Organización Internacional de Sanidad Animal (del francés, <i>Office International des Epizooties</i>)
OptiMEM	Medio de cultivo de células de mamífero que contiene una cantidad reducida de suero fetal bovino, optimizado para realizar transfeciones.
ORF	Marco de lectura abierto (del inglés, <i>Open Reading Frame</i>)
Pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino (del inglés, <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PHA	Fitohemaglutinina (del inglés, <i>Phytohemagglutinin</i>)
PK	Proteína Serina Quinasa
PPA	Peste Porcina Africana
PPC	Peste Porcina Clásica
PRR	Receptores de reconocimientos de patrones (del inglés, <i>Pattern Recognition Receptors</i>)
Rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	Medio de cultivo de Roswell Park Memorial Institute
qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
SFB	Suero Fetal Bovino
SLA	Antígeno leucocitario porcino (del inglés, <i>Swine Leukocyte Antigen</i>)
STR	Secuencia repetida en tandem (del inglés, <i>Short Tandem Repeat</i>)
TAP	Transportador asociado al procesamiento antigénico (del inglés, <i>Transporter associated with Antigen Processing</i>)
Th	Célula T cooperadora (del inglés, <i>T helper</i>)
TIR	Repeticiones invertidas terminales (del inglés, <i>Terminal Inverted Repeats</i>)
TK	Proteína Timidina quinasa
TLR	Receptor tipo Toll (del inglés, <i>Toll Like Receptor</i>)
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina
TNF	Factor de necrosis tumoral (del inglés, <i>Tumor Necrosis Factor</i>)
UE	Unión Europea
UHA	Unidad Hemoaglutinante
USDA	Departamento de Agricultura de los Estados Unidos
UFP	Unidad Formadora de Placa
UV	Ultravioleta
Vero	Células epiteliales de riñón de mono verde africano
VFA	Virus de la Fiebre Aftosa
VPPA	Virus de la Peste Porcina Africana

Abreviaturas

X-gal 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (C₁₄H₁₅BrClNO₆)

1. INTRODUCCIÓN

“Si pasas por el infierno, sigue adelante”

W. Churchill

1.1 La Peste Porcina Africana

1.1.1 Historia y situación actual de la enfermedad

La peste porcina africana (PPA), es una enfermedad vírica, de carácter hemorrágico, que afecta a los miembros de la familia *Suidae*, tanto domésticos como salvajes. Se trata de una enfermedad de declaración obligatoria por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), que causa grandes pérdidas económicas en los países afectados.

La PPA fue descrita por primera vez en 1921 (Montgomery, 1921), tras los primeros brotes de una enfermedad hemorrágica desconocida, detectada en 1907 en Kenia. Únicamente afectaba al ganado porcino doméstico europeo recién introducido en África, causando una mortalidad cercana al 100%.

Inicialmente fue considerada como una variante de la peste porcina clásica (PPC), debido a la similitud en lesiones que presentaban los animales. Posteriormente, se observó que los animales que sobrevivían a una infección por el virus de la PPC, no quedaban protegidos contra este nuevo agente infeccioso, llamándola de esta manera la peste porcina del continente africano. Más tarde, se demostró que los cerdos salvajes africanos, *Phacochoerus aethiopicus* y *Potamochoerus porcus*, pese a no sufrir la enfermedad aparente, podían actuar como reservorios naturales del VPPA, siendo los responsables de los primeros brotes en cerdos domésticos (Montgomery, 1921).

En 1932, y por primera vez, el agente causal de la PPA fue aislado de cerdos salvajes africanos (Steyn, 1932). Posteriormente, se pudo demostrar la transmisión directa existente entre estos y los cerdos domésticos, a través de las garrapatas blandas del género *Ornithodoros*, que podían ser portadoras del virus (Detray, 1957). De esta manera, se establecía un ciclo selvático de transmisión entre los animales susceptibles y los portadores, en el que intervenían las garrapatas como vector (Heuschele *et al.*, 1965; Plowright *et al.*, 1969).

La PPA se encuentra de forma endémica en el África subsahariana desde la introducción de los primeros cerdos domésticos en la zona. El primer caso de PPA fuera del continente africano tuvo lugar en Portugal en 1957 (Manso-Ribeiro *et al.*, 1958), originado por la introducción, vía aérea, de comida infectada que fue usada

Introducción

involuntariamente para alimentar a cerdos domésticos. Pese a que el brote fue inicialmente controlado, tres años más tarde, en 1960, una nueva reentrada del virus, muy probablemente usando la misma ruta que en la anterior ocasión, provocó un nuevo brote de PPA en el país, extendiéndose dramáticamente y alcanzando a la península ibérica (Polo-Jover *et al.*, 1961). Durante más de veinte años, la PPA llegó a afectar a diversos países europeos (Italia, Holanda, Francia, Malta y Bélgica) e incluso americanos (Cuba, Brasil, República Dominicana y Haití), seguramente por el movimiento de productos cárnicos contaminados. A pesar de ello, todos estos focos fueron controlados con el sacrificio masivo de los animales, suponiendo grandes pérdidas económicas (Costard *et al.*, 2013; Sanchez-Vizcaino *et al.*, 2015). Tras casi 40 años de presencia ininterrumpida, la PPA fue erradicada de la península Ibérica en 1995 (Arias *et al.*, 2002), siendo el último reducto infectado del continente europeo. Sin embargo, en la isla de Cerdeña, todavía se mantiene de forma endémica desde 1978 (Jurado *et al.*, 2018; Mur *et al.*, 2016), al igual que ocurre en algunos países del África subsahariana.

Tras más de una década de silencio epidemiológico, en el año 2007, el virus se reintrodujo en el continente europeo, a través de la República de Georgia en esta ocasión desde el Este del África subsahariana. La cepa que provocó el primer brote (Georgia 2007/1), era filogenéticamente muy parecida a la que circulaba en ese momento en Mozambique, Madagascar y Zambia (Rowlands *et al.*, 2008), y se expandió rápidamente a países del Cáucaso, como Armenia y el sur de la Federación Rusa. A partir de aquí, y debido a la falta de medidas de control efectivas, la PPA continuó su propagación por Azerbaiyán (2008), Ucrania (2012) y Bielorrusia (2013), llegando a establecerse de forma endémica.

La primera notificación de PPA en un país de la UE ocurrió en enero de 2014, en Lituania y un mes más tarde, se detectaba en Polonia. A partir de aquí, varios países de Europa del Este y países bálticos han quedado afectados: Letonia y Estonia (2014), Moldavia (2016), República Checa y Rumanía (2017), Hungría, Bulgaria y Bélgica (2018). Y, por último, los casos reportados más recientemente han sido los brotes generados en Asia, tanto en China (2018), como en Mongolia, Vietnam y Camboya (2019). En la Figura 1.1 podemos observar un mapa global actualizado de los países afectados por la presencia de la PPA desde el año 2007.

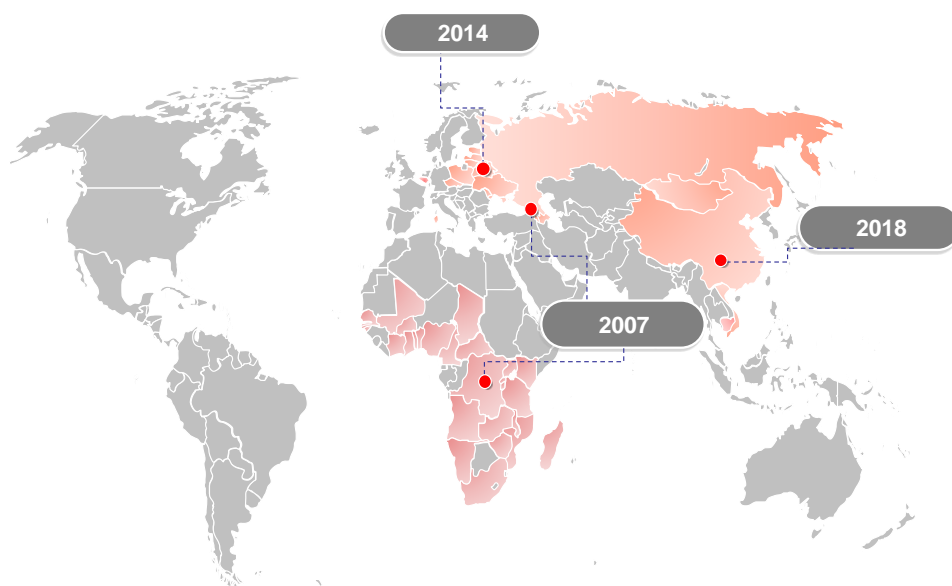


Figura 1.1 Mapa actual de la distribución geográfica de la PPA a nivel mundial desde Marzo 2007-Abril 2019. Fuente OIE WAHID 2019.

1.1.2 Epidemiología de la PPA

La epidemiología de la PPA es bastante compleja, existiendo diferencias significativas entre África y Europa/Asia. Mientras que, en Europa, el virus afecta a dos miembros de la familia *Suidae* altamente susceptibles, como los cerdos domésticos y los jabalíes, la situación en África resulta mucho más compleja.

En algunas regiones del África subsahariana, el virus de la PPA se mantiene en un ciclo de infección selvático (Figura 1.2) entre suidos salvajes africanos del género *Phacochoerus* (*P. aethiopicus*, *P. africanus*), *Potamochoerus* (*P. larvatus*, *P. porcus*) y *Hylochoerus*, y las garrapatas blandas del género *Ornithodoros* (*O. moubata* y *O. sonrai*) (Hess, 1981; Vial *et al.*, 2007). Estas especies actúan como un reservorio natural, creando focos enzoóticos en el sur y este de África (Jori *et al.*, 2013; Sanchez-Botija, 1963; Sanchez-Vizcaino *et al.*, 2016) lo que dificulta todavía más su erradicación. Aunque los suidos salvajes africanos pueden persistir infectados de por vida de manera asintomática, la transmisión directa entre estos o entre cerdos salvajes y domésticos se considera infrecuente (Anderson *et al.*, 1998; Heuschele *et al.*, 1969).

Introducción

Las garrapatas juegan un papel fundamental en la transmisión por el contacto continuo existente entre ambas especies y las madrigueras infestadas (Plowright *et al.*, 1969). Además, el virus puede replicar en las garrapatas y permanecer infeccioso durante largos periodos de tiempo (Basto *et al.*, 2006; Boinas *et al.*, 2011; Kleiboeker *et al.*, 2001).

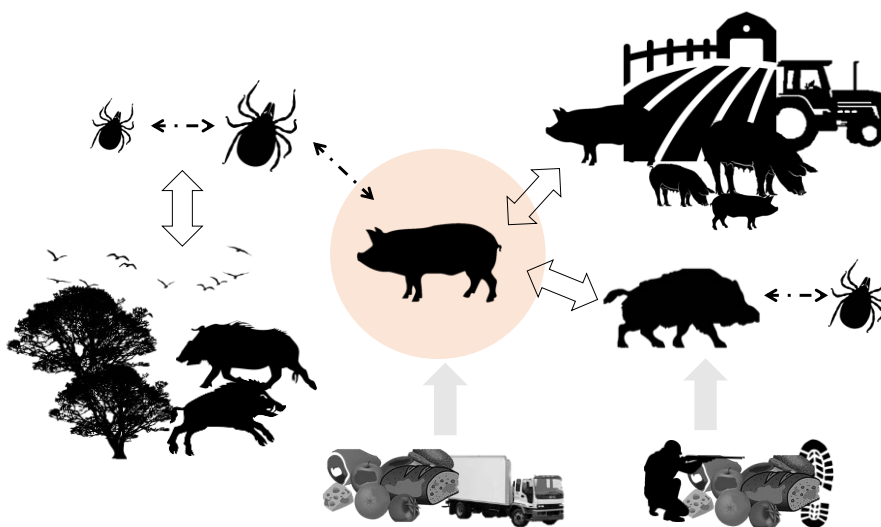


Figura 1.2 Representación gráfica del ciclo selvático y doméstico de la PPA.

La PPA puede evolucionar a formas crónicas y subagudas en animales que una vez recuperados de la infección, y sin enfermedad aparente (portadores), son capaces de transmitir el virus al medio ambiente (Penrith *et al.*, 2013; Sanchez-Vizcaino *et al.*, 2012). Estas formas clínicas, son importantes desde el punto de vista epidemiológico, agravando la posibilidad de controlar la enfermedad.

Debido a su enorme estabilidad ambiental y elevada resistencia a la temperatura, el VPPA puede permanecer infeccioso durante largos periodos de tiempo (Costard *et al.*, 2013; Penrith *et al.*, 2009), incluso en carnes procesadas (McKercher *et al.*, 1978; Mebus *et al.*, 1993; Petrini *et al.*, 2019). Remarcar que, la entrada del virus en regiones libres de PPA suele ocurrir a través de desechos de comida contaminada que se usa para alimentar a otros animales (Sanchez-Botija, 1982; Sanchez-Vizcaino *et al.*, 2015). De hecho, se relacionan las tres entradas del VPPA fuera del continente

africano, los dos primeras en Lisboa y la tercera en Georgia, a consecuencia de restos contaminados (Beltran-Alcrudo *et al.*, 2008; Rowlands *et al.*, 2008; Sanchez-Botija, 1982; Sanchez-Vizcaino *et al.*, 2012).

La utilización de técnicas moleculares que nos permitan caracterizar el genotipo de un virus es de gran utilidad para poder definir su origen y crear así un mapa epidemiológico detallado (Atuhaire *et al.*, 2013; Bastos *et al.*, 2003; Gallardo *et al.*, 2009, 2011, 2014; Giammarioli *et al.*, 2011; Lubisi *et al.*, 2005, 2007; Malogolovkin *et al.*, 2012; Misinzo *et al.*, 2012; Nix *et al.*, 2006; Rowlands *et al.*, 2008).

Hasta ahora, se han podido identificar 24 genotipos distintos del VPPA, basados en la variación de la región C-terminal del gen B646L (p72), que codifica para la proteína mayoritaria de la cápside viral (Achenbach *et al.*, 2017; Bastos *et al.*, 2003; Boshoff *et al.*, 2007; Lubisi *et al.*, 2005; Muangkram *et al.*, 2015; Mulumba-Mfumu *et al.*, 2017; Quembo *et al.*, 2018). La clasificación más actual incluye, además la secuenciación de la región de variable central (CVR) del gen B602L, y otras regiones como por ejemplo, los genes E183L (p54) o CP204L (p30) (Bastos *et al.*, 2004; Gallardo *et al.*, 2009, 2011; Giammarioli *et al.*, 2011; Lubisi *et al.*, 2007; Nix *et al.*, 2006; Owolodun *et al.*, 2010; Rowlands *et al.*, 2008), permitiendo discernir las diferentes variantes entre cepas filogenéticamente muy relacionadas.

Los 24 genotipos, identificados hasta ahora, se encuentran, todos ellos, en los países del este y del sur de África (Figura 1.3), siendo el genotipo I el predominante en África occidental (Boshoff *et al.*, 2007; Lubisi *et al.*, 2005; Muangkram *et al.*, 2015), mientras que el genotipo VIII, se encuentra confinado en solo 4 países del este de África. El nivel de diversidad entre los aislados encontrados en las regiones africanas se atribuye, a nivel evolutivo, a la adaptación del virus entre los huéspedes salvajes, sugiriendo la existencia de varias introducciones desde estos a la población de cerdos domésticos importados desde Europa (Bastos *et al.*, 2003; Dixon *et al.*, 1990; Wesley *et al.*, 1984).

Fuera de África, la homología en secuencias, demostró que el genotipo I fue el único encontrado en Europa, Sudamérica y el Caribe (Bastos *et al.*, 2003; Boshoff *et al.*, 2007; Lubisi *et al.*, 2005), hasta la introducción del genotipo II en Georgia en 2007 (Gallardo *et al.*, 2009). Ésta ha sido la única entrada de este genotipo, según los datos

Introducción

moleculares recopilados actualmente (Gallardo *et al.*, 2014; Ge *et al.*, 2018; Malogolovkin *et al.*, 2012). Junto con estos datos, la secuencias STR (secuencias repetidas en tándem), han revelado la presencia de dos variantes en el genotipo II entre los virus que circulan en los países de Europa del Este desde 2012 (Gallardo *et al.*, 2014; Goller *et al.*, 2015).

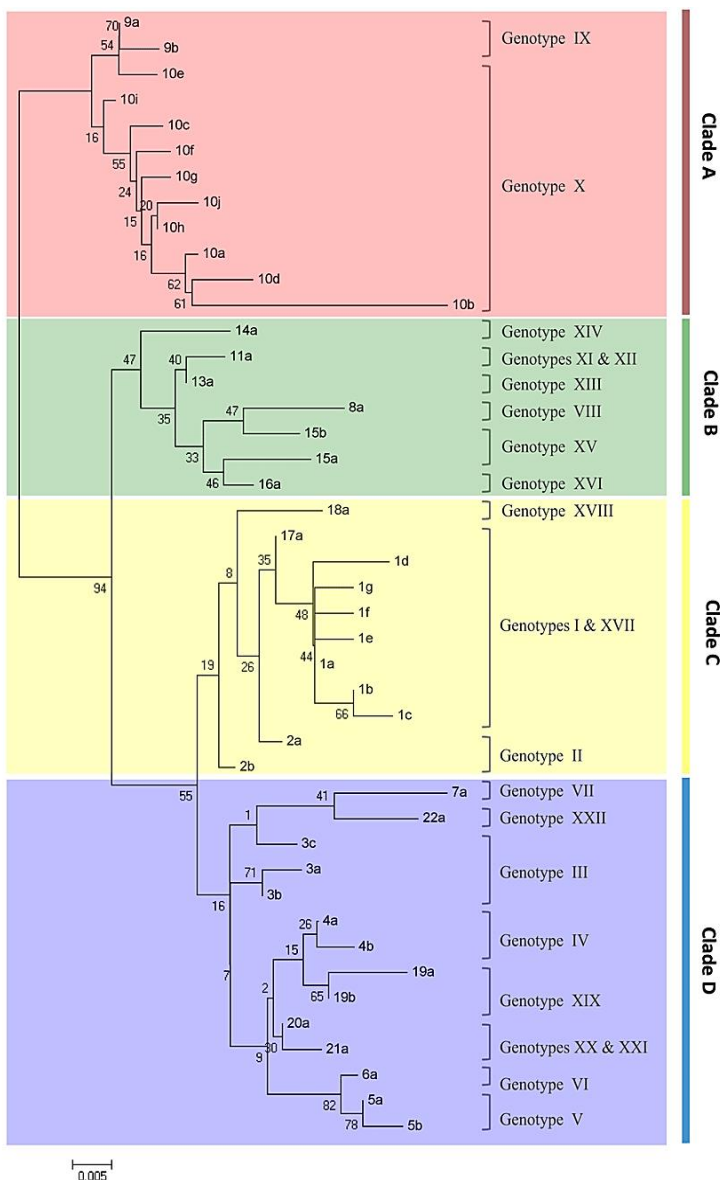


Figura 1.3 Árbol filogenético del virus de la peste porcina africana, basado en la secuencia del gen P72, en cepas del continente africano y su distribución geográfica agrupados en 4 Clados. Clado A: África central y oriental superior; Clado B: África oriental; Clado C: África oriental y meridional; Clado D: África meridional. Fuente: Muangkram *et al.*, 2015.

La clasificación del VPPA en genotipos, si bien de utilidad diagnóstica, no permite explicar la ausencia de cross-protección observada. En este sentido, cabe destacar el intento de agrupar los distintos aislados de VPPA en 8 serotipos diferentes basados en ensayos de la inhibición de la hemadsorción (HAI; del inglés)(Malogolovkin *et al.*, 2015a). Esta evidencia, inicialmente descrita por Ruiz-Gonzalvo y colaboradores en 1986, correlaciona la protección con la presencia de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación (Ruiz-Gonzalvo *et al.*, 1986,1993). Sin embargo, algo se escapa cuando dos virus hemaglutinantes, como lo son BA71 (acceso del GenBank KP055815) y E75 (acceso del GenBank FN557520), con hemaglutininas idénticas (CD2v), se comportan como heterólogos (Lacasta *et al.*, 2015).

1.1.3 Patogenia y manifestaciones clínicas de la enfermedad

Aunque la vía principal de entrada del virus en el huésped porcino es la oronasal (Montgomery, 1921; Norley *et al.*, 1983; Plowright *et al.*, 1969), existen otras rutas alternativas; como la dérmica (heridas), la subcutánea, la intramuscular y la intravenosa (por picaduras de garrapatas).

Tras la entrada, el virus replica por primera vez en monocitos y macrófagos de los ganglios linfáticos colindantes al lugar de entrada (Heuschele *et al.*, 1966; McVicar, 1984) y se disemina a través de la sangre o el sistema linfático hacia los órganos secundarios: nódulos linfáticos, bazo, hígado, pulmón, riñón y médula ósea, donde se produce una segunda oleada de replicación (Heuschele *et al.*, 1966), coincidiendo con la fase febril (Plowright *et al.*, 1969). La PPA puede presentarse en un amplio rango de formas clínicas. El desarrollo clínico de las mismas, difiere en evolución y período de incubación (Gallardo *et al.*, 2015; Gomez-Villamandos *et al.*, 2013; Pan *et al.*, 1984; Sanchez-Vizcaino *et al.*, 2015), y dependerá fundamentalmente, de la virulencia del aislado, de la dosis y vía de entrada y del estado inmunológico de los animales (Mebus, 1988).

La virulencia de las cepas del VPPA es variable, pudiendo encontrar desde cepas altamente patógenas hasta cepas de baja patogenicidad, que pueden ser difíciles de diagnosticar (Blome *et al.*, 2012a; Pan *et al.*, 1984; Sanchez-Vizcaino *et al.*, 2015).

Introducción

En cerdos domésticos y jabalíes, las manifestaciones clínicas se pueden clasificar en formas agudas e hiperagudas, subagudas y crónicas, pero inclusive, se pueden encontrar casos subclínicos o inaparentes (Sanchez-Vizcaino *et al.*, 2015). Remarcar que, en el caso de cerdos salvajes africanos, resistentes a la enfermedad, sólo se ha observado una ligera leucopenia en linfonodo, pero no da lugar a la patología observada en los cerdos domésticos (Oura *et al.*, 1998).

La forma **aguda** de la enfermedad se caracteriza por un síndrome febril con eritema y cianosis en la piel provocado por un extenso daño tisular y cambios hemodinámicos y hemostáticos severos, que acaban generando fallos funcionales de los órganos internos, sobre todo del sistema digestivo, vómitos y diarrea hemorrágica. Las lesiones internas se caracterizan principalmente por esplenomegalia y hemorragias, particularmente en los ganglios linfáticos viscerales, con un exceso de líquidos naturales en las cavidades y espacios del cuerpo (Blome *et al.*, 2012b; Carrasco *et al.*, 1997; Sanchez-Vizcaino *et al.*, 2015). Entre el 90 y el 100% de los animales afectados mueren en estado de *shock*, generalmente, una semana después del comienzo de la fiebre (Kleiboeker, 2002; Mebus, 1988).

El curso **hiperagudo**, provocado por cepas muy virulentas, está caracterizado por una elevada mortalidad, a tan solo 2-4 días tras la primoinfección. En estos casos no se observan signos clínicos evidentes, excepto por la presencia de algún pico de fiebre (Sanchez-Vizcaino *et al.*, 2015).

En formas **subagudas** de la enfermedad, se presenta un cuadro similar al que encontramos en la enfermedad aguda, pero con menor intensidad y mayor duración. Algunos cerdos permanecen sanos, mientras que otros muestran los síntomas descritos para la forma aguda, aunque las lesiones son más leves (Kleiboeker, 2002; Sanchez-Vizcaino *et al.*, 2015). En este caso, la mortalidad también es moderada, ocurriendo entre los 15 y 20 días tras la infección (Mebus, 1988).

En las formas **crónicas** de la PPA, provocada básicamente por aislados de baja virulencia encontramos una baja mortalidad (Thomson *et al.*, 1979). En estos casos, los signos clínicos y/o lesiones no son específicos, es decir, no se parecen al cuadro típico de una infección por PPA, pero pueden persistir durante varios meses. De hecho, los signos clínicos se limitan a lesiones en el aparato respiratorio, lo que puede llegar a confundirse con otras infecciones víricas como la peste porcina clásica,

(Mebus *et al.*, 1980; Pan *et al.*, 1984; Sanchez-Botija, 1982; Thomson *et al.*, 1979; Sanchez-Vizcaino *et al.*, 2015). Por otro lado, los animales infectados con estas cepas de forma crónica, pueden sobrevivir durante varias semanas y algunos incluso pueden recuperarse de la infección y permanecer sub-clínicamente infectados por un período de tiempo (Arias *et al.*, 2002; Bech-Nielsen *et al.*, 1993; Mebus *et al.*, 1980; Perez *et al.*, 1998; Sanchez-Botija, 1982). Las formas crónicas y de tipo subclínico, suelen darse en zonas endémicas de la enfermedad, y pueden ser debidas a una evolución del virus o de la propia enfermedad, en su proceso de adaptación al hospedador (Sanchez-Botija, 1982). Estas formas clínicas han ido descritas en la Península Ibérica, en la República Dominicana y en Brasil, así como en determinadas regiones de África.

1.1.4 Prevención, diagnóstico y control

Con su reintroducción desde 2007 en la República de Georgia, la PPA ha vuelto a generar una gran alarma, debido a las profundas repercusiones socioeconómicas que conlleva en los países afectados. Sobre todo, desde 2014 con la aparición en países del Este de la UE y su rápida expansión, más recientemente en Asia.

A día de hoy no existe ni tratamiento, ni vacuna capaz de retener la propagación de este virus, por lo tanto, es muy importante el diagnóstico inmediato y el sacrificio de los animales infectados y en contacto, para evitar la propagación de la enfermedad (Arias *et al.*, 2002; Beltran-Alcrudo *et al.*, 2008; Chenais *et al.*, 2019; Khomenko *et al.*, 2013; Sanchez-Vizcaino *et al.*, 2012).

El diagnóstico en el laboratorio, es particularmente importante en el caso de la PPA, debido a la dificultad para diferenciar los síntomas y lesiones, en algunos casos inespecíficos (fiebre, letargia) y hemorrágicos (Mebus, 1988; Sanchez-Vizcaino *et al.*, 2015; Schulz *et al.*, 2017). Actualmente se dispone de un amplio abanico de técnicas, que permiten de forma segura y fiable la detección tanto de animales infectados como de los supervivientes recuperados de la infección y capaces de transmitirla (OIE Terrestrial Manual, 2018).

Introducción

Tras una sospecha de PPA, ésta debe ser declarada a las autoridades competentes. Si se verifica su existencia, se debe aplicar el programa de erradicación establecido por la ley (Arias *et al.*, 2002; Sanchez-Vellisco, 1996).

Estas medidas, recomendadas por la OIE, han sido aplicadas con éxito en los países más favorecidos que cuentan con políticas de compensación al ganadero afectado, que ve así compensada su participación activa en el programa de erradicación (Arias *et al.*, 2002; Sanchez-Vellisco, 1996). Desafortunadamente, en los países con menos potencial económico y sin políticas de compensación bien definidas, este tipo de programa es mucho menos eficiente, favoreciendo la expansión de la enfermedad.

1.2 Etiología: El virus de la peste porcina africana

El agente etiológico causante de la PPA, el virus de la peste porcina africana (VPPA), es uno de los virus más complejos que existe, caracterizándose por ser el único miembro de la familia *Asfaviridae* (género *Asfivirus*) (Alonso *et al.*, 2018; Dixon *et al.*, 2012).

Se trata de un virus grande, icosaédrico, con envuelta y con un genoma de ADN de doble cadena, siendo el único arbovirus conocido con ADN como material genético, capaz de replicar en artrópodos (Burrage, 2012; Costard *et al.*, 2013).

El virus replica principalmente en monocitos y macrófagos (Alcami *et al.*, 1990; Franzoni *et al.*, 2017; Gomez-Villamandos *et al.*, 2013), aunque también se ha observado la capacidad de infectar, aunque en menor medida, otros tipos celulares, como células endoteliales, hepatocitos y neutrófilos (Blome *et al.*, 2012b; Fernandez *et al.*, 1992; Gomez-Villamandos *et al.*, 1996).

1.2.1 Morfología y estructura

Las partículas víricas de la PPA, presentan una morfología icosaédrica de unos 200 nm de diámetro (Breese *et al.*, 1966; Carrascosa *et al.*, 1984), compuesta por varias capas concéntricas: nucleóide, *core shell*, envuelta interna y envuelta externa (Figura 1.4).

El nucleoide, de 80 nm aproximadamente, se localiza en la región central, y contiene el genoma viral junto a varias nucleoproteínas, tales como la p10 (pK78R) (Nunes-Correia *et al.*, 2008) y la pA104R (Frouco *et al.*, 2017), más toda la maquinaria transcripcional necesaria para la síntesis temprana de los ARNs virales (Salas *et al.*, 2013).

Rodeando al núcleo, se encuentra una estructura proteica llamada matriz o *core shell*, con un diámetro de unos 110 nm y compuesta mayoritariamente por las poliproteínas pp220 (pCP2475L) y pp62 (pCP530R) (Andres *et al.*, 2002a). Estas poliproteínas se escinden por acción de la proteasa viral S273R, dando lugar a las proteínas estructurales p150, p37, p34, p14 y p5 por un lado, y las proteínas estructurales p35, p15 y p8, respectivamente (Alejo *et al.*, 2018; Andres, *et al.*, 2001a).

En la zona intermedia, encontramos una capa lipídica interna, derivada del retículo endoplasmático (Cobbold *et al.*, 1996; Salas *et al.*, 2013), y que rodea el *core*. Esta capa contiene las proteínas virales p54 (pE183L), p17 (pD117L), y pE248R (Alejo *et al.*, 2018; Rodriguez *et al.*, 2009; Rodriguez *et al.*, 2004; Suarez *et al.*, 2010) entre otras. Sobre la misma, se dispone la cápside, siendo esta, la capa más externa de los viriones intracelulares (Carrascosa *et al.*, 1984; Salas *et al.*, 2013). La cápside, de simetría icosaédrica, está formada por unos 1892-2172 capsómeros en forma de prismas hexagonales y es rica en proteínas, siendo la p72 (pB646L) la mayoritaria (García-Escudero *et al.*, 1998). También encontramos las proteínas pE120R, relacionada con el transporte de las partículas maduras para su salida de la célula (García-Escudero, *et al.*, 2001), y la proteína p49 (pB438L), formando parte de los vértices de la partícula viral (Epifano *et al.*, 2006).

Finalmente, la membrana externa se encuentra, solamente, en los viriones extracelulares, obtenida durante la salida de este a través de la membrana plasmática de la célula huésped, alcanzando un diámetro de unos 175-215nm (Arzuza *et al.*, 1992; Breese *et al.*, 1966, 1967; Carrascosa *et al.*, 1984). Contiene proteínas virales como la p12 (O61R) implicada en la adhesión viral a células Vero (Carrascosa *et al.*, 1995) y la proteína CD2v (pEP402R), implicada principalmente en la hemadsorción de la célula infectada, entre otras funciones (Dixon *et al.*, 2004; Kay-Jackson *et al.*, 2004; Sereida *et al.*, 2016).

Introducción

Sin embargo, ésta envuelta extracelular no se requiere para la infectividad (Andres *et al.*, 2001b; Hernaez *et al.*, 2016).

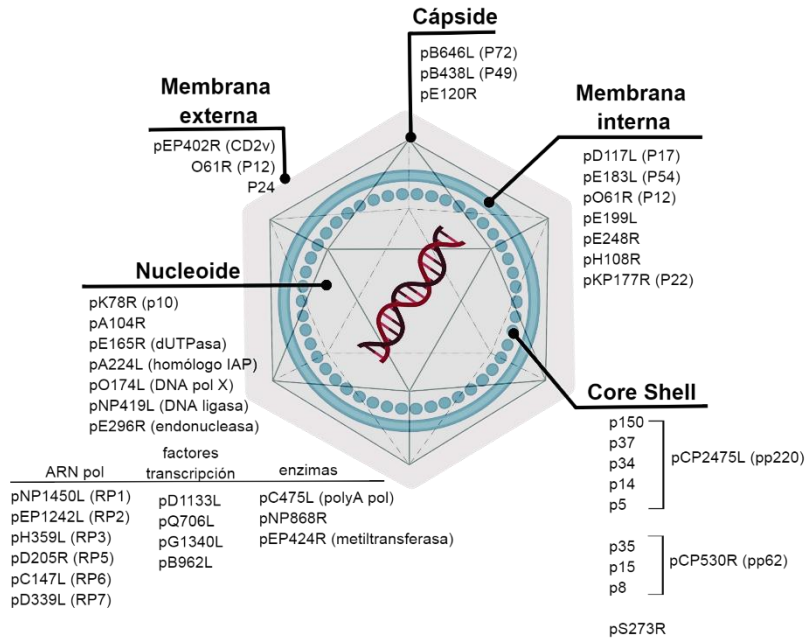


Figura 1.4 Representación esquemática de la estructura de un virión de PPA. *Adaptado de Alejo et al., 2018.*

1.2.2 Genoma viral

El genoma del VPPA consiste en una molécula de ADN lineal bicatenario (dsDNA), de 170 a 193 kpb de longitud (Chapman *et al.*, 2008; Yañez *et al.*, 1995), dependiendo del aislado, que codifican entre 150 y 167 ORFs. Estos ORFs se encuentran separados por regiones intergénicas cortas y se distribuyen a lo largo de ambas cadenas de ADN (Figura 1.5).

Al igual que Poxvirus, los extremos del genoma del VPPA se encuentran unidos covalentemente entre sí, con la presencia de repeticiones terminales invertidas (TIR) (Gonzalez *et al.*, 1986). Estas secuencias TIR, están constituidas por varias series de repeticiones directas dispuestas en tándem y separadas por zonas de secuencia única (Dixon *et al.*, 1990, 2013; Meireles *et al.*, 1994; Sogo *et al.*, 1984).

El genoma de VPPA consta de una región central relativamente constante (RCC), de unas 125-126 Kb y dos regiones variables, situadas en los extremos de la molécula,

resultado de inserciones o deleciones de genes, que se engloban dentro de cinco familias multigénicas (MGFs): MGF100, MGF110, MGF300, MGF360, MGF530 (Chapman *et al.*, 2008; Dixon, 1986; Dixon *et al.*, 2013) y que evolucionan mediante mecanismos de duplicación y recombinación de secuencias.

Por otro lado, se han descrito tres regiones variables caracterizadas por la presencia de secuencias STR, que se sitúan, tanto dentro de secuencias codificantes, como en regiones intergénicas y también otorgan variabilidad a los genomas del VPPA por variaciones en el número de repeticiones de estas unidades (Chapman *et al.*, 2011; Dixon *et al.*, 1990; Farlow *et al.*, 2018; Lubisi *et al.*, 2007), más que por la secuencia en sí. Debido a su sorprendente variabilidad genética, varios estudios sugieren el uso de estas regiones variables, como recurso complementario al genotipado actual (sección 1.1.2 Epidemiología), para poder llegar a discernir, por ejemplo, entre subvariantes de un mismo aislado. Además de lo que hemos visto hasta ahora, en epidemiología molecular, estos estudios incluyen: el gen KP86R, I196L, las regiones intergénicas I73R/I329L, I78R/I215L y la región adyacente al J286L (Gallardo *et al.*, 2014; Goller *et al.*, 2015; Malogolovkin *et al.*, 2012a; Nix *et al.*, 2006), además de las regiones variables de los genes, EP402R y MGF505-2R (Frączyk *et al.*, 2016; Gallardo *et al.*, 2014; Sanna *et al.*, 2017).

Entre las proteínas codificadas por el genoma viral, destacan aquellas implicadas en la interacción con la célula infectada y en particular, las involucradas en evadir la respuesta inmune del huésped, pero de estas hablaremos más adelante, en la sección correspondiente (apartado 1.3).

replicativo del virus tiene lugar en el citoplasma, son varios los autores, incluidos los de nuestro grupo, que han propuesto una fase inicial de replicación en el núcleo (Ballester *et al.*, 2010, 2011; Garcia-Beato *et al.*, 1992; Rojo *et al.*, 1999).

La transcripción de los genes virales sigue una regulación temporal. Esta regulación empieza con la transcripción de los genes tempranos, los cuales se expresan antes del inicio de la replicación del ADN, inmediatamente tras la entrada del virus, utilizando toda una maquinaria celular que incluye enzimas de poliadenilación, RNA polimerasas y factores de transcripción entre muchas otras (Rodríguez *et al.*, 1996; Salas *et al.*, 1981, 2013). La expresión de estos genes tempranos da lugar a una serie de enzimas involucrados en el metabolismo de nucleótidos y replicación del ADN viral, así como otros factores necesarios para la expresión de los genes intermedios y tardíos del virus que codifican, entre otras, las proteínas estructurales, enzimas y factores que, finalmente, serán empaquetados en el virión (Almazan *et al.*, 1992, 1993; Rodríguez *et al.*, 2013; Rojo *et al.*, 1999; Salas *et al.*, 1981).

Tal y como hemos comentado, tras la replicación del ADN, comienza la transcripción de los genes intermedios y tardíos, y la morfogénesis del virión, eventos que ocurren en las llamadas factorías víricas (Almazan *et al.*, 1992; Andres *et al.*, 1998; Garcia-Escudero *et al.*, 1998; Netherton *et al.*, 2013; Rodríguez *et al.*, 1996). Las factorías víricas, contienen toda una serie de precursores celulares y virales, como por ejemplo chaperonas, que se convierten en proteínas intermediarias que se ensamblan para formar la cápside icosaédrica (Cobbold *et al.*, 1998; Epifano *et al.*, 2006) y el dominio central o *core shell* (Andres, 2017; Andres *et al.*, 2002b). El último paso de la morfogénesis del virión es la encapsulación del ADN que da lugar a los viriones maduros ya ensamblados (Brookes *et al.*, 1996).

La partícula vírica madura se transporta finalmente desde las factorías víricas a la superficie celular, a través de un mecanismo mediado por microtúbulos dependiendo de la proteína motora quinasa tipo I (Jouvenet *et al.*, 2004), y de la proteína de cápside pE120R (Andres *et al.*, 2001b; Netherton *et al.*, 2013). Una vez en la superficie celular, los viriones salen de la célula huésped, adquiriendo una envoltura adicional procedente de la membrana externa celular (Andres *et al.*, 2001b).

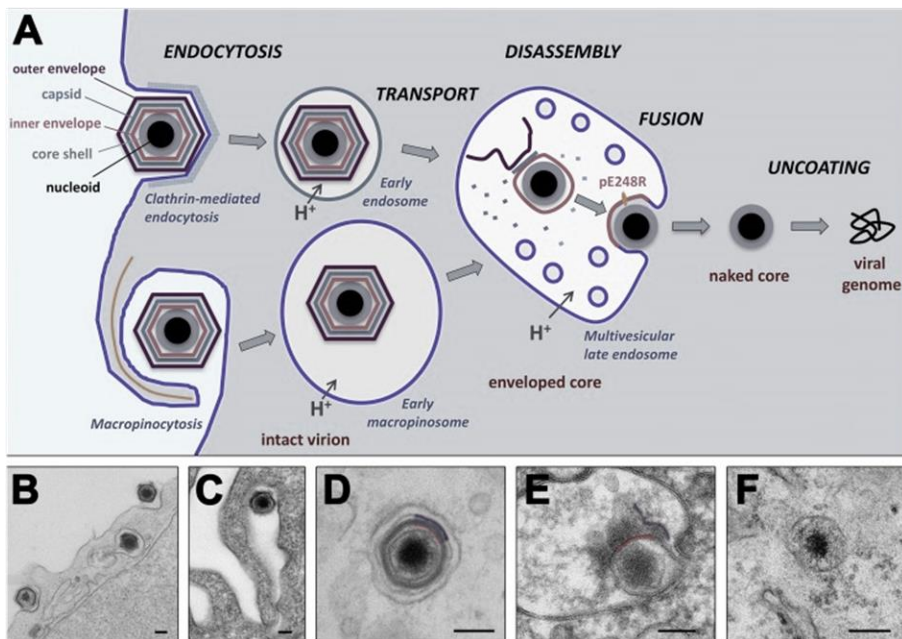


Figura 1.6 Ciclo de replicación del VPPA. (A) Las micrografías electrónicas ilustran la endocitosis mediada por clatrina (B) y macropinocitosis (C) de partículas extracelulares del VPPA, un virión intacto dentro de un endosoma temprano (D), una partícula dañada (sin cápside y con una envoltura externa fragmentada, parcialmente desprendida) dentro de un endosoma tardío (E), y un núcleo desnudo citosólico (F). Barras, 100 nm. Fuente: *Andres et al., 2017*.

1.3 Interacción del VPPA con el sistema inmunológico del huésped

La relación existente entre el VPPA y el sistema inmune se presenta de forma dual. Por un lado, el virus utiliza el macrófago porcino, célula clave del sistema inmune, como diana natural para replicarse y expandirse, y por el otro, es este mismo sistema inmune el único capaz de controlarlo, abriendo la esperanza a poder diseñar futuras vacunas terapéuticas contra la enfermedad. Entender el fino equilibrio existente entre inmunopatología e inmunoprotección será clave en la lucha contra la PPA.

1.3.1 Mecanismos de evasión del VPPA

El VPPA infecta mayoritariamente a células de linaje mieloide, siendo los CD44⁺ la subpoblación de macrófagos más susceptibles a la infección (*Alcami et al., 1990; Casal et al., 1984; Gomez-Villamandos et al., 2013; Malmquist, 1960; Wardley et al., 1977*), aunque como ya hemos comentado anteriormente, también puede ser capaz

de infectar otros tipos celulares (Blome *et al.*, 2012b; Franzoni *et al.*, 2017; Gomez-Villamandos *et al.*, 1996, 2013). Todas ellas son células presentadoras de antígenos (CPA) que juegan un papel clave para el sistema inmunológico del animal, por lo que, la infección por parte del VPPA compromete tanto su capacidad fagocítica, como su capacidad para presentar antígenos, afectando negativamente tanto a la respuesta inmune celular, como a la humoral (Neilan *et al.*, 2004; Takamatsu *et al.*, 2013).

El VPPA codifica proteínas que modulan o interfieren en la respuesta inmune innata y adaptativa del hospedador frente a la infección, siendo esta modulación uno de los mecanismos más eficaces que utiliza el virus para evadir los sistemas de defensa del hospedador (Dixon *et al.*, 2004; Reis *et al.*, 2017a). Una de las vías explotadas por el VPPA es la modulación de la apoptosis de las células infectadas, pudiendo tanto prolongar, como acortar la supervivencia de la célula, utilizando todo un arsenal de genes distintos (Carrasco *et al.*, 1996; Dixon *et al.*, 2017; Oura *et al.*, 1998). Así, los genes A224L, EP153R, A179L, homólogo viral de Bcl-2, y DP71L, son capaces de inhibir la apoptosis utilizando dianas diferentes (Banjara *et al.*, 2017; Barber *et al.*, 2017; Brun *et al.*, 1996; Dixon *et al.*, 2017; Hurtado *et al.*, 2011; Neilan *et al.*, 1997; Nogal *et al.*, 2001; Reis *et al.*, 2017a; Revilla *et al.*, 2004; Yañez *et al.*, 1995), asegurando así una óptima replicación del virus. El VPPA codifica a su vez proteínas involucradas en el efecto contrario, provocando la apoptosis de la célula a tiempos tardíos tras la infección, como sucede con la p54 (Dixon *et al.*, 2017; Reis *et al.*, 2017a) favoreciendo la salida de la nueva progenie viral de la célula infectada. Entre los productos virales especializados en evadir la respuesta inmune, cabe destacar a la proteína A238L, homólogo a la familia de proteínas I κ B (Powell *et al.*, 1996), capaz de inhibir específicamente la transcripción de genes relacionados con la respuesta inmune e inflamatoria durante la infección viral (Dixon *et al.*, 2017; Reis *et al.*, 2017a; Silk *et al.*, 2007). Del mismo modo, varios miembros de distintas familias multigénicas, MGF360 y MGF505, y el gen DP96R, han demostrado estar involucrados en la inhibición de la expresión de IFN α/β (Afonso *et al.*, 2004; Neilan *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2018), mediador clave en la defensa innata.

Un hecho descrito hace décadas, que ha quedado sin embargo sin explicar, es el que atañe a uno de los fenómenos más característicos de la patogenicidad del VPPA: su capacidad para provocar la apoptosis de linfocitos T y B no infectados (apoptosis *by-*

Introducción

stander), hasta el punto de provocar su total desaparición en los casos agudos de la enfermedad (Gomez-Villamandos *et al.*, 1995; Salguero *et al.*, 2005). A pesar de ello, la disminución tanto en el número de linfocitos B, como en número y en funcionalidad de los linfocitos T, está asociada principalmente a la apoptosis inducida por la infección, principalmente por la inducción de mediadores solubles como la IL-1, IL-6 o TNF α (Carrasco *et al.*, 2002; Gomez-Villamandos *et al.*, 1995; Gomez del Moral *et al.*, 1999; Salguero *et al.*, 2005).

1.3.2 Mecanismos inmunes implicados en la protección frente al VPPA.

A pesar de los 100 años de historia del virus, poco es lo que se conoce sobre los mecanismos implicados en protección. A día de hoy sabemos que tanto la respuesta de anticuerpos, como la respuesta celular, junto con una óptima presentación al sistema inmune innato, son importantes en protección, no pudiendo descartar ninguna de ellas a la hora de diseñar una vacuna ideal.

Un buen reconocimiento por parte del sistema inmune innato resulta del todo esencial a la hora de inducir una correcta protección frente al VPPA, aunque desafortunadamente, poco es lo que se conoce al respecto (Takamatsu *et al.*, 2013). Una de las evidencias más sólidas vienen de trabajos de hace casi 20 años, en los que se demuestra la clara correlación entre el aumento de la actividad efectora de las células NK (Leitão *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 1994; Norley *et al.*, 1983) y la ausencia de síntomas clínicos en cerdos inoculados con el aislado atenuado NH/P68, mientras que aquellos animales con síntomas típicos de PPA presentaban una menor actividad de las NK (Leitão *et al.*, 2001).

1.3.2.1 Implicación de la respuesta humoral en protección frente al VPPA

Los mecanismos de protección mediada por anticuerpos siguen siendo, a día de hoy, controvertidos, debido en gran medida, a la continua discusión sobre la existencia o no de anticuerpos neutralizantes. Mientras que algunos autores sostenían que el virus era incapaz por si solo de generar anticuerpos neutralizantes (De Boer *et al.*, 1969; Hess, 1981; Viñuela, 1985), otros demostraron su existencia (Gomez-Puertas *et al.*, 1996; Onisk *et al.*, 1994; Ruiz-Gonzalvo *et al.*, 1986; Zsak *et al.*, 1993).

La relevancia de los anticuerpos en protección es indiscutible, demostrada fehacientemente con un experimento de transferencia pasiva de anticuerpos procedentes del suero o calostro de cerdos supervivientes a la infección con virus atenuados. Experimento que, permitió demostrar cierto grado de protección tras la infección con una dosis letal del virus homólogo, mostrando, además, un retraso en la sintomatología clínica y una reducción de la viremia (Onisk *et al.*, 1994; Schlafer *et al.*, 1984). La discusión no se centra en si los anticuerpos pueden tener un papel protector, sino en el mecanismo de actuación, existiendo todavía hoy una enorme discusión sobre la existencia de anticuerpos neutralizantes o no (Escribano *et al.*, 2013). Discusión a nuestro juicio abierta por las diversas metodologías empleadas para demostrar su existencia, incluyendo cepas virales y sistemas celulares totalmente distintos. Independientemente, la existencia de anticuerpos inhibidores de la infección de cepas virulentas en macrófagos porcinos, ha sido descrita hace décadas por Ruiz-Gonzalvo y colaboradores, asociando esta, en ocasiones, a la capacidad del suero de inhibir la hemaglutinación (Ruiz-Gonzalvo *et al.*, 1981, 1996). Estos estudios, parecen ser refutados por experimentos más recientes, que proponen clasificar a los aislados de PPA en serogrupos, basados justamente en la técnica de inhibición de la hemadsorción, dependiente al 100% de la presencia del CD2v y/o del gen EP153R (Malogolovkin *et al.*, 2015a; 2015b).

Además de la neutralización, inhibición de la infección e inhibición de la hemaglutinación, los anticuerpos pueden ejercer su papel protector utilizando múltiples mecanismos adicionales, incluyendo ADCC (citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos), descritos para PPA (Wardley *et al.*, 1985), aunque no profundamente explorados. Intentar correlacionar la protección *in vitro*, es esencial para el futuro diseño de vacunas y para evitar el sufrimiento innecesario, derivado de experimentos de infección *in vivo*, con cepas virulentas del virus, hoy única forma de esclarecer qué es relevante y qué no, y el papel que juega en protección.

A un nivel similar, de desconocimiento y discusión, se encuentra en lo que se refiere a los antígenos de los virus relevantes en protección. Así, una primera aproximación en los años 90 permitió caracterizar antígenos inmunodominantes del VPPA (reconocidos mayoritariamente por sueros de animales supervivientes a la

Introducción

infección), cuyo potencial protector todavía hoy se encuentra en discusión al no haber sido reproducibles entre los diferentes grupos de investigación frente a la PPA existentes. Un estudio pionero *in vitro*, permitió la caracterización de un epítipo conformacional neutralizante en la proteína mayoritaria de la cápside, la p72 (Zsak *et al.*, 1993). Así, un estudio posterior más detallado describió anticuerpos dirigidos contra las proteínas estructurales p72, y p54, como capaces de bloquear la entrada del virus en la célula, mientras que anticuerpos frente a la proteína p30 bloquean su internalización (Gomez-Puertas *et al.*, 1996, 1998).

Desafortunadamente, todos los experimentos posteriormente realizados con diversas proteínas han fracasado en su intento de conferir protección, incluyendo tanto antígenos estructurales, como no estructurales, o con proteínas todavía sin caracterizar, llegándose incluso a relacionar, en algunos casos, con la aparición de lesiones crónicas de la PPA. (Gutierrez-Castaneda *et al.*, 2008; Kollnberger *et al.*, 2002; Neilan *et al.*, 2004; Reis *et al.*, 2007a; Zsak *et al.*, 1993).

1.3.2.2 Implicación de la respuesta celular en protección frente al VPPA

Trabajos pioneros en PPA demostraban la existencia de complejos mecanismos inmunitarios mediados por células durante la infección con VPPA, incluyendo la proliferación de células T-CD4⁺ antígeno-específicas, actividad citotóxica natural (NK) (Leitão *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 1994) y actividad mediada por linfocitos T-CD8⁺ (CTL funcionales), claramente activados en animales supervivientes a una infección por el VPPA (Lacasta *et al.*, 2015; Takamatsu *et al.*, 2013).

Desafortunadamente, a día de hoy no existe ningún modelo alternativo al cerdo, a la hora de estudiar la patogenia y los mecanismos de protección frente al VPPA. Además de las implicaciones éticas que esto conlleva, estudiar la respuesta celular específica frente a un virus tan complejo como el VPPA y en un sistema biológico tan poco conocido como el cerdo, dificultan enormemente estos estudios. Otra limitación a considerar es el reducido número de grupos de investigación dedicados a este propósito a lo largo de la historia, que hace que nos encontremos, aún hoy día, en estadios muy iniciales del conocimiento de esta compleja faceta de la inmunidad frente a la PPA.

De entre todas las evidencias acumuladas a lo largo de los años, hay una indudable, de nuevo procedente de trabajos *in vivo* utilizando cepas atenuadas del VPPA. Así, se ha demostrado, que la depleción de las células T-CD8⁺, inhabilita la protección conferida por el aislado atenuado OURT88/3 frente a la infección letal con el virus homólogo virulento OURT88/1 (Oura *et al.*, 2005). Esta evidencia parece confirmarse con resultados posteriores obtenidos por el mismo grupo de investigación, que correlaciona protección con la presencia de elevados niveles de IFN γ (King *et al.*, 2011), utilizando este mismo modelo de protección frente a OURT88/1, basado en el virus atenuado OURT88/3.

Estudios más recientes realizados en nuestro laboratorio inmunizando con el virus atenuado recombinante BA71 Δ CD2, permitían correlacionar su capacidad cros-protectora *in vivo*, con su habilidad para inducir células T-CD8⁺ capaces de reconocer, *in vitro*, a cada uno de los virus empleados (Monteagudo *et al.*, 2017). También en nuestro laboratorio, esta vez utilizando la vacunación con ADN, se pudo demostrar protección en ausencia de anticuerpos antes del desafío, frente a la infección letal con VPPA (Argilaguet *et al.*, 2012; Lacasta *et al.*, 2014), llegando incluso a correlacionar la protección conferida con la inducción de células T-CD8⁺ específicamente dirigidas contra dos epítomos concretos de CD2v (Argilaguet *et al.*, 2012).

Con esta excepción, ningún otro determinante CTL con capacidad protectora ha sido definido en el VPPA. DNA, péptidos, proteínas y diversos vectores de expresión han sido utilizados, solos o en combinación como estrategias de *prime-boost* homólogo o heterólogo, en la mayoría de las ocasiones con poco éxito o en el mejor de los casos, con un éxito relativo (Ivanov *et al.*, 2011; Jankovich *et al.*, 2018; Lokhandwala *et al.*, 2016; Lopera-Madrid *et al.*, 2017; Sunwoo *et al.*, 2019). La identificación de epítomos CTL de PPA que sean relevantes para la protección es un problema que se ve agravado por la enorme complejidad del virus.

1.4 Desarrollo de vacunas frente a la PPA

Una de las estrategias más convencionales para el desarrollo de vacunas, como la utilización de vacunas inactivadas, han demostrado ser ineficaces contra el VPPA, independientemente del método de inactivación y el adyuvante utilizado (Blome *et*

Introducción

al., 2014; Forman *et al.*, 1982; Mebus, 1988; Stone *et al.*, 1967), muy probablemente debido a su baja eficacia para inducir respuestas CTL, claves en protección.

Como ya se ha mencionado con anterioridad, los virus vivos atenuados (LAV) ya sean atenuados naturalmente o adaptados a cultivo, se han utilizado como modelos experimentales para entender los mecanismos implicados en protección frente al VPPA (Gomez-Puertas *et al.*, 1996; King *et al.*, 2011; Lacasta *et al.*, 2015; Mulumba-Mfumum *et al.*, 2016; Neilan *et al.*, 2004; Onisk *et al.*, 1994; Oura *et al.*, 2005; Wilkinson *et al.*, 1981).

A pesar de su enorme eficacia, la utilización en campo de los virus atenuados como vacunas frente a VPPA se ha visto limitada por diversos factores que ponen en cuestión su bioseguridad, relacionados básicamente, por su inherente naturaleza infecciosa (Sanchez-Cordon *et al.*, 2017): la aparición de efectos secundarios tras la vacunación, muchas veces dependiendo de la dosis, la posibilidad de reversión a virulencia o la presencia de virulencia residual.

A modo de ejemplo, y con motivo de la atenuación del VPPA, la PPA en España pasó de una forma virulenta con una letalidad cercana al 100%, a cursar en los últimos años como una enfermedad crónica (Arias *et al.*, 2002; Wilkinson, 1984), apareciendo síntomas clínicos y lesiones asociados al curso crónico de la PPA en un número significativo de animales que actuaban como reservorio continuo del virus. Este patrón se ha repetido en la naturaleza cada vez que ha circulado un aislado atenuado de VPPA presentando: altos títulos de anticuerpos, viremias leves e intermitentes y focos necróticos en articulaciones (Gallardo *et al.*, 2015; Leitão *et al.*, 2001; Sanchez-Cordon *et al.*, 2017).

La posibilidad a día de hoy de delecionar genes específicos utilizando tecnologías de recombinación (Abrams *et al.*, 2012; Rodriguez *et al.*, 1992) o por edición de genomas mediante el sistema CRISPR-Cas9 (Borca *et al.*, 2018; Hübner *et al.*, 2018), abre la posibilidad de conseguir virus recombinantes más seguros e igualmente eficaces.

Una de las herramientas que más información han aportado a la identificación de genes implicados en virulencia del VPPA o en la replicación del virus y el papel que estos juegan durante la infección, proviene de la manipulación del propio genoma del virus (Abrams *et al.*, 2012; Garcia-Escudero, *et al.*, 1998, 2001; Barber *et al.*, 2017;

Boinas *et al.*, 2004; Lewis *et al.*, 2000; Neilan *et al.*, 1997; O'Donnell *et al.*, 2015a; Oliveros *et al.*, 1999; Reis *et al.*, 2016, 2017b; Revilla *et al.*, 2004; Rodriguez *et al.*, 2004; Salguero *et al.*, 2008; Sanchez-Cordon *et al.*, 2018; Zani *et al.*, 2018; Zsak *et al.*, 1998).

El primer mutante por delección que se testó *in vivo* fue $\Delta 8$ -DR, un virus recombinante carente de la hemaglutinina viral, también conocida como CD2v (Borca *et al.*, 1994; Rodriguez *et al.*, 1993), basado en el aislado Malawi Lil-20/1 y que aun mostrando una reducción de la viremia, seguía provocando signos clínicos y mortalidad similar a aquellos provocados por el virus parental (Borca *et al.*, 1998).

A partir de aquí, varios genes han sido identificados como implicados en la virulencia de distintas cepas del VPPA *in vivo*, tales como el gen B119L (9GL), DP71L (NL-S), o el gen DP96R (UK) (Abrams *et al.*, 2013; Lewis *et al.*, 2000; O'Donnell *et al.*, 2016), cuya delección provoca su atenuación *in vivo*, facilitando que los animales, una vez recuperados, queden protegidos contra virus homólogos virulentos.

Curiosamente, la eliminación conjunta de los genes 9GL y DP96R del virus Georgia2007/1 (O'Donnell *et al.*, 2016), o de genes pertenecientes a las familias multigénicas MGF303 y MGF505 (O'donnell, 2015b; 2016), dio lugar a prototipos de vacunas más eficaces que aquellos que carecían de los ORF individuales.

Como ya se ha mencionado anteriormente, nuestro laboratorio, en colaboración con la Dra. María Luisa Salas del CBMSO y la empresa farmacéutica Boehringer Ingelheim, se obtuvo el virus BA71 Δ CD2. Virus recombinante, a partir del virus virulento BA71, carente del gen EP402R (CD2v), capaz de conferir protección total, por primera vez para el caso de la PPA, tanto homóloga como heteróloga, incluyendo al virus Georgia20017/1 (Monteagudo *et al.*, 2017).

Pese a la impresionante capacidad protectora conseguida con esta vacuna experimental, BA71 Δ CD2 presenta ciertos picos de virulencia residual transitorios muy bajos, pero detectables, que podrían limitar su futuro uso en zonas libres de la enfermedad. Cabe aclarar que esta virulencia residual detectada, tanto en sueros como en hisopos nasales, en una pequeña proporción de los animales vacunados, coincide con picos puntuales de fiebre, pero sin ninguna otra sintomatología ni signos clínicos compatibles con PPA. Además, tras ese pico, todos los animales acaban eliminando el virus en las primeras 4 semanas tras la vacunación.

Introducción

Así pues, a pesar de la protección cruzada que ofrece, BA71ΔCD2 es una vacuna experimental todavía por perfeccionar, principalmente desde el punto de vista de la bioseguridad, uno de los objetivos de la de la presente tesis y de nuestro laboratorio en general.

2. OBJETIVOS

“El que tiene un porqué puede con cualquier cómo”
Friedrich Nietzsche

BA71ΔCD2, es un virus vivo atenuado obtenido en nuestro laboratorio, capaz de conferir protección homóloga y heteróloga frente al virus de la VPPA, incluyendo el genotipo que actualmente circula por la Europa continental y Asia. A pesar de su efectividad, BA71ΔCD2, presenta un problema principal de bioseguridad, inherente a su capacidad de replicar *in vivo*.

Dos fueron los objetivos principales planteados al inicio de esta tesis:

- 1) **Intentar obtener una formulación vacunal óptima que permitiera aumentar al máximo la seguridad de BA71ΔCD2, manteniendo o incluso mejorando su eficacia protectora.**
- 2) **Caracterizar en la medida de lo posible, el potencial protector de BA71ΔCD2 y su potencial como herramienta de control en situaciones de emergencia como la que se está viviendo en algunas zonas de África.**

Para abordar ambos objetivos, propusimos varias acciones paralelas:

1. Optimizar los protocolos de inmunización con BA71ΔCD2 mediante: su inactivación, usando adyuvantes inmunológicos o usando una dosis de refuerzo.
2. Manipular genéticamente el virus atenuado BA71ΔCD2, buscando nuevos factores de virulencia para generar dobles mutantes o virus inducibles de genes esenciales.
3. Buscar rutas alternativas de inmunización más seguras, así como explorar el potencial protector de BA71ΔCD2 frente a rutas de infección fisiológicamente más relevantes que mimeticen las situaciones reales que se dan en campo, incluyendo la infección intranasal, por contacto, o incluso con garrapata.

Objetivos

4. Evaluar la capacidad cros-protectora de BA71 Δ CD2 con cepas filogenéticamente lo más distantes posibles, simulando situaciones epidemiológicas distintas.
5. Demostrar que la inhibición de la hemadsorción, podría resultar una técnica de utilidad para poder distinguir animales vacunados de infectados, cumpliendo así el requisito DIVA exigido al prototipo BA71 Δ CD2.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

*“Personalmente, siempre estoy listo para aprender,
aunque no siempre me gusta que me enseñen”*

W. Churchill

3.1 Cultivos celulares

3.1.1 Líneas celulares estables

Las líneas celulares estables utilizadas durante la fase experimental de esta tesis fueron adquiridas de la American Type Culture Collection (ATCC): células VERO (células epiteliales de riñón de mono verde africano) y células COS-1, semejantes a fibroblastos de riñón de mono verde africano (CRL-1650, Manassas, VA 20108, USA). Para su cultivo, ambos tipos celulares se mantuvieron a 37°C en una atmósfera húmeda con un 5% de CO₂ en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco), suplementado con 2 mM de L-Glutamina (Invitrogen), 100 UI/ml de penicilina (Invitrogen), 100 µg/ml de estreptomicina (Invitrogen) y un 10% (v/v) de suero fetal bovino (SFB HyClone, GE Healthcare) inactivado por calor, en el caso de las células Vero, y un 5% para las COS-1.

Al tratarse de líneas celulares adherentes, para realizar pases sucesivos, las células se lavaron en tampón fosfato salino 1X (PBS, Lonza) y fueron desprendidas de la botella de cultivo con tripsina/EDTA (0,25% y 0,025% p/v, respectivamente, Sigma). Finalmente, las células se conservaron a largo plazo a -150°C en medio de congelación con 90% de SFB y 10% dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma).

3.1.2 Líneas celulares primarias

Dos tipos de cultivos primarios fueron empleados: PBMCs y MAPs

3.1.2.1 Células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

Las PBMC porcinas se purificaron a partir de sangre recogida directamente en tubos BD Vacutainer (Plus Blood collection tubes K2E, EDTA 18.0 mg como anticoagulante), mediante un gradiente de densidad sobre Histopaque 1077 (Sigma). Un volumen total de 20 ml de sangre total diluida 1:1 en PBS, se depositó suavemente con pipeta sobre un lecho de 7 ml de Histopaque, y tras su centrifugación durante 30 minutos a 400 xg (sin aceleración, ni freno), se recogieron los anillos de la interfase generada entre la fracción celular con el Histopaque y el plasma sanguíneo. Este

Material y métodos

anillo, donde se encuentran las PBMCs, se centrifugó durante 10 minutos a 400 xg para posteriormente lisar los eritrocitos contaminantes con 3,5 ml de agua destilada estéril a 4°C durante 30 segundos, tras los cuales se restableció el equilibrio osmótico del medio añadiendo 9 ml de cloruro sódico (NaCl) al 3,5%.

A continuación, las PBMC se centrifugaron y lavaron dos veces con PBS y una última con medio del cultivo Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI, Sigma) suplementado con 2 mM de L-glutamina (Invitrogen), 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina (Invitrogen) y un 10% de SFB (HyClone, GE Healthcare). Finalmente, las PBMC fueron contadas en cámara de Neubauer, tras la exclusión con azul tripano (Sigma), y resuspendidas finalmente en medio RPMI 1640 completo, a una concentración de 10⁶ células/ml.

3.1.2.2 *Macrófagos alveolares porcinos (MAPs)*

Los macrófagos alveolares porcinos provienen de pulmones de cerdos extraídos, de forma aséptica inmediatamente después de ser sacrificados. Para su obtención, los pulmones son sometidos a lavados continuos con 250 ml de PBS suplementado con gentamicina a 1 µg/ml (Sigma). Cada lavado se administró a través de la tráquea con la ayuda de un embudo estéril. Tras masajear los lóbulos pulmonares durante 5 minutos aproximadamente, la suspensión de MAPs se recolectó en un recipiente estéril. Una vez extraída la máxima cantidad de MAPs posible, la suspensión se reparte en tubos de 50ml y se centrifugan a 300 xg durante 10 minutos, para realizar 2 lavados consecutivos con PBS suplementado con gentamicina a 1 µg/ml (Sigma) y seguidamente, hacer el recuento en cámara de Neubauer tras la exclusión con azul tripano (Sigma). Después de comprobar su viabilidad, los MAPs se conservaron a largo plazo a -150 °C a una concentración de 2x10⁷ células/ml en medio de congelación.

3.2 Cepas virales y técnicas de cuantificación empleadas

3.2.1 Cepas de VPPA

A lo largo de esta Tesis Doctoral se han utilizado 4 aislados virulentos de VPPA: BA71, Georgia2007/1, Ken06.Bus y un aislado en garrapatas RSA (Tabla 3.1).

La cepa BA71 fue aislada de los brotes ocurridos en España en 1971 y fue cedida por la Dra. María Luisa Salas (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CBMSO, Madrid). La cepa virulenta Georgia 2007/1 proviene del aislado original detectado en la República de Georgia en 2007 y fue cedida por el laboratorio de la Dra. Linda Dixon (The Pirbright Institute, Reino Unido). La cepa Ken06.Bus proviene de uno de los brotes de Kenia y fue cedida por la Dra. Carmina Gallardo (Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, INIA, Madrid). Finalmente, las garrapatas del género *Ornithodoros*, portadoras del virus RSA-XIX, fueron recolectadas de campo, por el Agricultural Research Council-Onderstepoort Veterinary Research (ARC-OVR) en Sudáfrica.

Del mismo modo, se ha utilizado el virus atenuado BA71 Δ CD2 (Monteagudo *et al.*, 2017) y el inducible, BA71 Δ CD2PKi, previamente obtenidos en el laboratorio, así como los virus dobles recombinantes descritos en el apartado 3.3.

Tabla 3.1 Cepas de VPPA utilizadas

Cepa	Origen	Genotipo	Virulencia	Referencia
Ken06.Bus	Kenia	IX	Virulento	Bishop <i>et al.</i> , 2015
RSA-tick	Sudáfrica	XIX	Virulento	ARC-OVR
Georgia 2007/1	Rep. Georgia	II	Virulento	Chapman <i>et al.</i> , 2011
BA71	España	I	Virulento	Rodríguez <i>et al.</i> , 2015
BA71 Δ CD2	Recombinante	I	Atenuado	Monteagudo <i>et al.</i> 2017
BA71 Δ CD2PKi	Recombinante	I	Atenuado	CBMO-IRTA
BA71 Δ CD2EP153R	Recombinante	I	Atenuado	USDA-IRTA
BA71 Δ CD2DP96R	Recombinante	I	Atenuado	USDA-IRTA

Material y métodos

3.2.2 Preparación de *stocks* virales para su uso in vivo como vacunas experimentales

Para la producción de grandes cantidades de virus en cultivo celular, se sembraron 3×10^6 células COS-1, en frascos de cultivo T175 estériles ($1,7 \times 10^4$ células/cm²) y se mantuvieron en un incubador a 37°C con 5% de CO₂, hasta alcanzar el 80% de confluencia. Posteriormente, las células se infectaron con una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1 del virus correspondiente, hasta observar efecto citopático prácticamente completo (4-6 días), dependiendo de la cepa.

Las células COS-1 infectadas se recogen junto al medio y se centrifugan a baja velocidad, 1200 xg, durante 20 minutos a 4°C, para eliminar los restos celulares. Posteriormente, se recupera el sobrenadante, que se centrifuga durante 6 horas a 8500 rpm y 4°C en una Sorvall RC-5 utilizando un rotor SG3. El pellet, conteniendo grandes cantidades de virus extracelular, se rehidrata con PBS en un volumen 10 veces menor que el original y tras 24 horas de incubación a 4°C se resuspende de forma homogénea, almacenándose en pequeños volúmenes, para posteriormente determinar el título viral mediante recuento placas de lisis sobre células COS-1.

En el caso de la preparación de virus inducibles, el procedimiento es el mismo, con la única diferencia destacable de que fue necesario añadir al medio de cultivo el inductor químico isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 500 μM.

3.2.3 Técnicas de titulación virales

3.2.3.1 Titulación del VPPA mediante hemadsorción (HAD)

Con excepción de BA71ΔCD2, carente de CD2v (hemaglutinina viral), el resto de los virus utilizados tienen la capacidad de unirse a los glóbulos rojos, y las células infectadas por los mismos también se unen a los eritrocitos, en lo que se conoce como hemadsorción, fenómeno fácilmente observable al microscopio y muy utilizado para diagnosticar la PPA y para titular el VPPA. Así, nuestros *stocks* virales vienen en ocasiones cuantificados en unidades hemadsorbentes (UHA). A continuación, se describe el protocolo típico de hemadsorción.

Primeramente, 400.000 MAPs/pocillo ($1,25 \times 10^6/\text{cm}^2$) fueron sembrados en placas Biolite de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific) un mínimo de 4 horas antes del ensayo, para a continuación infectarlos con diluciones seriadas en base 10 (6 réplicas) de la cepa de PPA de interés. Transcurridas 18 horas tras la infección, se dispensaron 20 μl de una suspensión 1/100 en PBS de eritrocitos frescos de porcino. Cada 24 horas se observó el fenómeno de hemadsorción en forma de “rosetas” (Figura 3.1). El título viral se puede calcular teniendo en cuenta la última dilución en la que se observó el efecto hemadsorbente en el 50% de los pocillos, viniendo así definido en forma de unidades hemadsorbentes por mililitro ($\text{UHA}_{50}/\text{ml}$) (Reed & Muench, 1938).

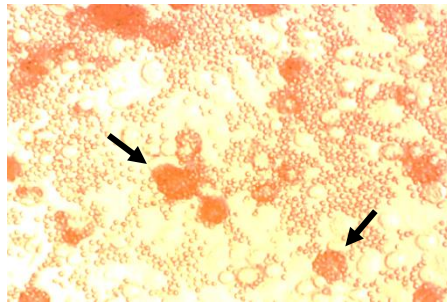


Figura 3.1 Imagen típica del fenómeno de la hemadsorción donde podemos observar la adhesión de eritrocitos (flechas negras) en la superficie de los MAPs infectados con el virus de la PPA.

3.2.3.2 Titulación del VPPA mediante la formación de placas de lisis

Con el objetivo de cuantificar tanto *stocks* virales crecidos en COS-1, como inóculos utilizados durante la fase experimental, se utilizó la técnica de formación de placas de lisis. Esta técnica se basa en infectar monocapas de células COS-1 en medio semisólido para observar la aparición de placas de lisis, como consecuencia del efecto citopático que provoca el VPPA (Hurtado *et al.*, 2010).

De forma resumida, se siembran aproximadamente 70.000 COS-1 por pocillo ($3,8 \times 10^5$ células/ cm^2) en una placa de 24 pocillos (Nunc) con un volumen final de 1ml de DMEM completo, al 5% de SFB, y se mantienen en cultivo entre 12-18 horas. Pasadas las horas correspondientes y siempre observando una capa homogénea, las

Material y métodos

células se infectan con diluciones seriadas en base 10 en un volumen de 150 µl del inóculo viral, permitiendo su adsorción durante 2 horas a 37°C, balanceando la placa cada 20 minutos con el objetivo de evitar que se sequen las células y que la adsorción sea uniforme.

Tras la adsorción y una vez retirado el inóculo, se añade 1ml de una mezcla 1:1 de DMEM (Gibco) 2X completo con Agar Noble Difco (BD Biosciences) al 1,4%. Una vez solidificado, se añaden unas gotas extra de medio DMEM 2X completo, para mantener la humedad y se incuban a 37°C en atmosfera de 5% de CO₂, durante 4-7 días hasta que se observan las placas de lisis formadas por el virus. Es en este momento cuando se fijan las placas con formaldehído al 10% durante 2 horas, para posteriormente retirar el agar y teñir con cristal violeta al 2% en formaldehído al 5%, durante 10 minutos. Finalmente se lavan las placas con agua.

El recuento de unidades formadoras de placas (UFP) se representa como el número de placas de lisis formadas por mililitro de inóculo (UFP/ml), teniendo en cuenta al hacer el cálculo la dilución utilizada.

3.2.3.3 Titulación del VPPA mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

La utilización de métodos moleculares de detección ha facilitado la cuantificación de virus presentes en gran número de muestras biológicas, incluyendo *stocks* virales, sueros e hisopos nasales obtenidos a lo largo de cada fase experimental *in vivo*. La extracción del ADN viral se realizó a partir de 200 µl de solución viral mediante el kit Nucleospin Blood (Macherey-Nagel) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los cebadores, qPCR-PK-F y qPCR-PK-R (Tabla 3.2), fueron diseñados utilizando el software Primer express de Applied Biosystems, amplificando un fragmento de 85 pb del gen R298L (PK) del VPPA (A. Lacasta *et al.*, 2014).

Todas las amplificaciones se realizaron en placas MicroAmp™ Fast Optical 96-well Reaction plate (Applied Biosystem), por duplicado y en un volumen final de 20µl, conteniendo; 2 µl de muestra, 450nM de cada cebador y 10 µl de PowerUp Sybr green Master mix 2X (Applied Biosystems). La reacción de amplificación se realizó dentro del termociclador ABI 7500 Fast Real Time PCR system (Applied Biosystems), siguiendo las siguientes condiciones: 2 minutos a 95°C, que nos activa la polimerasa,

y 40 ciclos con un primer paso de desnaturalización de las cadenas a 95°C, durante 15 segundos, un segundo período de alineamiento de los cebadores por 1 minuto a 60°C y finalmente, una extensión final para la síntesis de las nuevas cadenas de 1 minuto a 72°C. Posteriormente a la amplificación, se realiza siempre una curva de disociación de forma automática, que nos permite discriminar los dímeros de cebadores que generan las amplificaciones inespecíficas.

Tabla 3.2 *Parejas de cebadores usados en la qPCR en tiempo real y en la generación del amplicón utilizado como estándar.*

Cebador	Secuencia 5' → 3'	nt	Tm (°C)
PK-F2	ATGTCCAGGCCGGAACAAC	19	56,83
PK-R2	CTACTCCTAGTTCCGAAATAGGC	23	53,96
qPCR-PK-F	GTCCAGGCCGGAACAACA	18	56,59
qPCR-PK-R	CCTTTCCACCTTTGCTGTAGGA	22	56,32

La curva estándar fue realizada mediante la amplificación y cuantificación de un amplicón de 891 pb del gen de la PK del VPPA usando la pareja de cebadores PK-F2 y PK-R2 (Tabla 3.2). El producto de la PCR fue purificado de un gel de agarosa mediante el kit MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante y cuantificado por espectrofotometría con NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Products). Para usar el producto como estándar, se utilizaron diluciones seriadas desde 2 a 2×10^9 copias del gen, siendo 2 el límite de moléculas de ADN detectadas del producto de PCR utilizado como estándar. Los resultados de la qPCR se expresan en Log_{10} de copias genómicas equivalente por mililitro (CGE/ml), siendo el límite de detección de la técnica de 10^3 CGE/ml, al menos para el tipo de muestras biológicas analizadas.

3.3 Manipulación genética del virus atenuado BA71ΔCD2

Para generar nuevos VPPA modificados mediante la delección de un segundo gen (BA71ΔCD2 tiene ya de hecho un gen menos que el virus parental: CD2v), nos basamos en el intercambio genético por recombinación homóloga (Borca *et al.*, 1998; Monteagudo *et al.*, 2017; Rodríguez *et al.*, 1992). Se utilizó un plásmido incorporando las secuencias homólogas complementarias que flanquean, a la derecha y a la izquierda, el gen de interés (a eliminar), para intercambiar este gen del genoma del virus por un gen marcador (en este caso el gen que codifica la β-galactosidasa).

3.3.1 Diseño de las construcciones plasmídicas pUC.EP153R.LacZ y pUC.DP96R.LacZ

Para deleccionar los genes EP153R y DP96R en el genoma del virus recombinante BA71ΔCD2, se generaron dos construcciones plasmídicas sintéticas (GenScript, USA), cada una con la secuencia homóloga complementaria a las regiones flanqueantes derecha e izquierda (1 kpb aproximadamente por cada lado) de los genes de interés. Entre estas regiones, se incorporó el gen indicador *lacZ* que codifica la β-galactosidasa, bajo el control de un promotor viral. Todo ello dentro del plásmido pUC57mini entre dianas *AatII* (Figura 3.2).

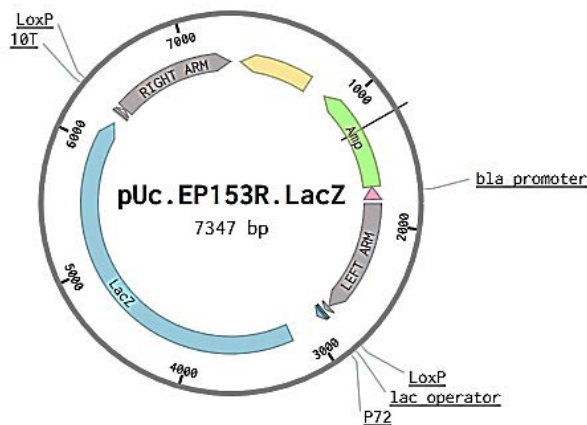


Figura 3.2 Esquema del diseño básico de un plásmido sintético destinado para recombinación. En gris se representan las secuencias homólogas flanqueantes del gen a deleccionar, que recombinarán con el virus, reemplazándolo por el gen marcador *lacZ* que codifica la proteína β-galactosidasa.

3.3.2 Generación de virus dobles recombinantes: transfección de las construcciones plasmídicas e infección con el virus

El genoma del VPPA no es infeccioso per sé, por lo que para producir virus recombinantes es necesario disponer en una misma célula, tanto el virus que se utiliza como molde, BA71 Δ CD2, como el plásmido donante. Así pues, el proceso de recombinación exigió dos pasos consecutivos: en un primer paso, se transfectaron 100.000 células COS-1, sembradas previamente el día anterior en placas de cultivo de 24 pocillos, utilizando 500 ng de plásmido diluido en medio libre de suero (OptiMEM, Gibco), en presencia de lipofectamina 2000 (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del fabricante. A continuación, y después de tres horas de transfección, las células se infectaron con el virus BA71 Δ CD2 a una MOI de 3, para conseguir así la recombinación homóloga entre el plásmido de interés y el genoma viral (Figura 3.3). Una vez se alcanza efecto citopático total, el sobrenadante de cultivo (conteniendo BA71 Δ CD2 y el virus recombinante), es recolectado y preparado para proceder a infectar una nueva monocapa de células COS-1, para ir enriqueciendo, aislando y purificando el virus recombinante, mediante ensayos en placa con medio semi-sólido y en presencia del sustrato de la β -galactosidasa: una solución de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (UltraPure™ X-gal, Invitrogen) en N-N-dimetilformamida (DMF, Sigma), detectando así el fenotipo azul de los virus que han incorporado el gen marcador y que han recombinado.

De una manera resumida, una vez se visualizan las placas de lisis a simple vista, se añade 1 ml de una nueva mezcla de agar-DMEM (con una concentración final de 300 μ g/ml de X-gal), dejando que difunda por el resto de la mezcla de agar-DMEM, como mínimo durante 6 horas. Las placas de lisis producidas por los virus recombinantes se tiñen de azul facilitando así su visualización, en contraste con las placas del virus parental incoloras. La recogida de virus contenidos en las placas de lisis se realizó con pipetas Pasteur, aspirando tanto las células infectadas como la columna de agar correspondiente, y se depositaron en un tubo Eppendorf conteniendo 0,5 ml de medio DMEM completo. Finalmente, la incubación durante la noche a 4°C facilitaría la difusión del virus del medio para su posterior plaqueo en una segunda ronda de purificación. Tras 6-8 rondas de plaqueo y una vez asegurada la pureza del virus

Material y métodos

recombinante mediante PCR convencional (demostrando la ausencia del gen a delecionar) se da por finalizado el proceso y se secuencia el nuevo virus.

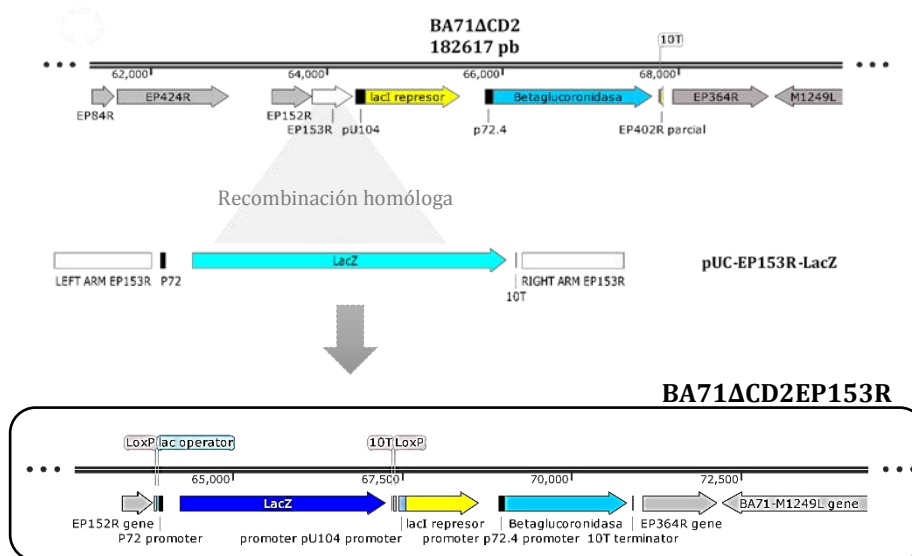


Figura 3.3 Representación esquemática del proceso de recombinación entre el virus parental BA71ΔCD2 y el plásmido pUC-EP153R-LacZ, diseñado para generar uno de los virus dobles mutantes, BA71ΔCD2ΔEP153R.

3.4 Ensayos *in vivo*

3.4.1 Protocolos de inmunización e infección y toma de muestras

Todos los procedimientos experimentales *in vivo* se realizaron con cerdos convencionales de la raza Landrace x Large White de 6-8 semanas de edad, en las instalaciones de alta seguridad biológica de nivel 3 plus (BSL3+) del *Centre de Recerca en Sanitat Animal* (IRTA-CReSA), siguiendo las normas de ética y seguridad aprobadas por los comités correspondientes de la Universidad Autónoma de Barcelona, UAB y/o del IRTA. A excepción de un experimento que tuvo lugar en las instalaciones de alta seguridad biológica BSL3, del OVR-ARC en Sudáfrica, siguiendo las normas de ética y seguridad aprobadas por el NSPCA (Consejo Nacional de Sociedades para la Prevención de la Crueldad a los Animales).

En el caso de la inoculación **intramuscular**, se administró siempre un volumen de 1-1,5ml (inóculo diluido en PBS estéril) en el músculo braquiocefálico o el trapecio

cervical del cuello, usando jeringas apirógenas de 2 ml (3C/Luer Cen, Enfa), con aguja estéril 23G (0,6x25 mm, ICO plus3). En cada experimento se indica tanto la formulación como la dosis de virus indicada y en su caso, el número de dosis utilizadas (en este caso alternando el lado derecho e izquierdo).

En el caso de las inoculaciones **intranasales**. El sistema usado es el LMA MAD Nasal intranasal Mucosal Atomization Device (Teleflex), el cual incluye jeringas de 3 ml a las que se les incorpora un adaptador MAD Nasal™ para la atomización de partículas de 30-100 µm por vía nasal. Las jeringas se cargaron con 2 ml del inóculo correspondiente diluido en PBS estéril, administrando al animal 1ml en cada una de las fosas nasales.

Para la **infección con garrapatas** blandas infectadas de forma natural con VPPA, estas fueron recolectadas en campo (Sudáfrica) y genotipadas posteriormente, coincidiendo todas ellas en estar infectadas del genotipo XIX. En el momento de la infección, las garrapatas infectadas se ubican en el interior de un depósito cilíndrico con una membrana que permite el contacto directo con el animal. Cuatro garrapatas por animal fueron colocadas directamente sobre la cadera del cerdo, un mínimo de 60 minutos, permitiendo su alimentación, hasta que ellas mismas se desprendieron. El experimento de **infección por contacto** se describe en la sección de resultados correspondiente. Consistiendo en una ratio 1/3 infectados respecto a no infectados, permitiendo el contacto durante 6 días tras la infección intramuscular de los animales donantes.

En la sección de resultados se incluye, para cada experimento *in vivo*, un diagrama a modo resumen del diseño experimental a seguir, incluyendo los grupos de inmunización, las dosis utilizadas, los intervalos entre inmunización e infección, así como los días de toma de muestras: sangre en EDTA y suero obtenidos directamente de la vena cava para la detección y evolución de la carga viral en sangre, la inducción de anticuerpos frente a la PPA y la medición de la respuesta celular inducida, hisopos nasales para seguir la secreción nasal del virus, así como cualquier otra muestra de tejido tomada durante las necropsias.

Material y métodos

3.4.2 Seguimiento clínico experimental

Durante las inmunizaciones, se realizó un seguimiento clínico diario tanto de la temperatura rectal, como del estado general de cada animal. Tras la infección con cepas virulentas de VPPA, todos los animales fueron observados diariamente para determinar de forma cuantitativa (escala de 0 a 4) la aparición de los siguientes signos clínicos, característicos de una infección por PPA: temperatura rectal, postración, pérdida de apetito, cianosis, diarrea y hemorragias. En el momento que la progresión de la enfermedad imposibilitaba la vida de los animales sin sufrimiento, éstos fueron sacrificados siguiendo los protocolos éticos establecidos, y posteriormente se realizó una necropsia completa, incluyendo la valoración de las lesiones macroscópicas y microscópicas de los distintos órganos, siempre siguiendo una versión simplificada de los protocolos descritos por Galindo-Cardiel y colaboradores (Galindo-Cardiel *et al.*, 2013).

3.4.3 Cuantificación de la carga viral mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).

La cuantificación de la carga viral se realizó como se describe previamente en el apartado 3.1.2.4. Remarcar que la extracción de ADN se realizó a partir de 200 µl, tanto de suero como de una suspensión de PBS pre-incubado a temperatura ambiente con el hisopo nasal. Los resultados de la qPCR se expresan en log₁₀ de copias genómicas equivalente por mililitro (CGE/ml) de suero o bien de contenido nasal, siendo el límite de detección de la técnica de 10³ CGE/ml, como ya dijimos anteriormente, al menos para el tipo de muestras biológicas analizadas.

3.4.4 Valoración de la respuesta inmunológica

3.4.4.1 Medición de la respuesta humoral frente al VPPA mediante ELISA

La determinación de la presencia de anticuerpos específicos contra el VPPA en los sueros de cerdos vacunados y/o infectados, se realizó mediante un ELISA de tipo indirecto, utilizando antígeno soluble obtenido a partir de células infectadas con VPPA (OIE, 2012), facilitado por la Dra. Carmina Gallardo, CISA-INIA.

De manera resumida, se tapizaron placas de 96 pocillos (COSTAR 3590 ELISA Corning high binding, Cultek) con 100 μ l/pocillo del antígeno diluido a una concentración de 5 μ g/ml en tampón carbonato-bicarbonato 0,05M pH 9,6 (Merk) durante 12 horas a 4^oC. Tras lavar con PBS suplementado con Tween-20 al 0,05% (v/v, Sigma), estas se bloquearon durante 1 hora a 37^oC con 200 μ l de PBS suplementado con 1% de albúmina sérica bovina (p/v) (BSA, sigma). Los sueros porcinos diluidos 1:200 se incubaron durante 1 hora a 37^oC y tras los lavados correspondientes, se añadió el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa (α -IgG de cerdo diluido 1:20000, 0,05 μ g/ml, Serotec) durante 1 h a 37^oC. Tras los últimos lavados, las reacciones se revelaron utilizando 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina soluble (TMB soluble, Sigma) como sustrato, parando la reacción 30 minutos más tarde con ácido sulfúrico 1N (Merck), para su posterior lectura. Los resultados obtenidos se representaron como la absorbancia obtenida para cada pocillo a una longitud de onda de 450nm.

3.4.4.2 Medición de la respuesta celular frente al VPPA mediante un ELISPOT de IFN γ

Para la medición de la respuesta celular frente al VPPA, se realiza un recuento de células secretoras de IFN γ mediante la técnica de ELISPOT. Esta técnica adaptada a porcino (Díaz *et al.*, 2005), permite determinar la frecuencia de células específicas secretoras de IFN γ presentes en sangre tras la vacunación y/o infección.

Para ello, se tapizaron placas de 96 pocillos (COSTAR 3590 ELISA Corning high binding, Cultek) con 50 μ l por pocillo del anticuerpo anti-IFN γ porcino (clon P2G10, BD Pharmingen) a una dilución 1:100 en tampón carbonato-bicarbonato (pH 9,6), durante 18 horas a 4^oC. Tras lavar 3 veces con PBS suplementado con Tween-20 al 0,05% (v/v) las placas se bloquearon con 100 μ l de medio RPMI 1640 completo durante 1 hora a 37^oC y posteriormente se añadieron 5x10⁵ PBMCs en cada pocillo, bien en ausencia o en presencia de su estímulo correspondiente y en un volumen final de 200 μ l/pocillo.

Los estímulos específicos utilizados en todos los estudios consistieron en una concentración fija (1x10⁵ UFP por pocillo) del aislado de VPPA correspondiente. Dependiendo del estudio se utilizó uno o más de los siguientes virus virulentos:

Material y métodos

BA71, Georgia2007/1 y Ken06.Bus, o bien el virus atenuado BA71 Δ CD2. Como control positivo del ensayo se utilizó la Fito-hemaglutinina (PHA, Sigma) a 5 μ g/ml y como control negativo se utilizó medio RPMI 1640. En todos los casos los ensayos se realizaron por duplicado. Tras 20 horas de estimulación a 37 $^{\circ}$ C, las células se retiraron mediante sucesivos lavados con PBS-Tween-20 al 0,05% (v/v). Una vez los pocillos resultaron libres de células, se añadió 50 μ l/pocillo del anticuerpo porcino anti-IFN γ biotinilado (clon P2C11, BD Pharmingen) diluido 1:1000 en PBS-Tween-20 con albúmina sérica bovina al 0,5% (BSA), y tras 1 hora de incubación a 37 $^{\circ}$ C, se añadió estreptavidina-peroxidasa (Biosource) a una concentración de 0,5 μ g/ml, durante 1 hora a 37 $^{\circ}$ C. Finalmente, la reacción se reveló utilizando TMB insoluble (Calbiochem) durante 30 minutos y, posteriormente se lavaron con agua corriente. Los resultados definitivos, se obtienen al sustraer la media de los valores obtenidos en los pocillos del control negativo, de la media de los pocillos problema (cada célula secretora de IFN γ deja una huella en el fondo de la placa en forma de punto de precipitación del sustrato revelador), y se representan como el número de células específicas secretoras de IFN γ por cada 500.000 PBMCs (CS-IFN γ /5x10 5 PBMCs).

3.5 Estrategias empleadas para intentar mejorar la seguridad y la eficacia de BA71 Δ CD2

Durante esta tesis se han realizado dos aproximaciones complementarias con el propósito de mejorar la seguridad de BA71 Δ CD2, siendo la primera la inactivación de BA71 Δ CD2 y la segunda, la utilización de adyuvantes inmunológicos.

3.5.1 Inactivación de BA71 Δ CD2 para aumentar su seguridad

Para los ensayos de inactivación del VPPA se emplearon tanto métodos de inactivación químicos: BEI y BPL, como físicos: luz ultravioleta.

3.5.1.1 Inactivación con etilamina binaria (BEI)

BEI es un compuesto de aziridina, producido a partir de bromhidrato de bromo etilamina (BEA), comúnmente utilizado para la inactivación del virus de la fiebre

aftosa durante la fabricación de la vacuna (Bahnemann, 1975, 1990). Aunque también se ha utilizado con otros virus diferentes (Habib *et al.*, 2006; Larghi *et al.*, 1980), inclusive el VPPA (Blome *et al.*, 2014; Schloer, 1982). Supuestamente, BEI no cambia la conformación de los epítomos presentes en las proteínas del virus, por lo que no altera los componentes antigénicos del mismo (Bahnemann, 1990; Blackburn *et al.*, 1991).

Con el objetivo de optimizar el ensayo de inactivación, en un primer experimento y siguiendo los procedimientos por Scholer (Schloer, 1982) ligeramente modificados, se utilizaron distintas concentraciones de BEI (0, 2, 5 y 10 mM) con $1,45 \times 10^5$ UFP/ml de BA71ΔCD2 en un volumen final de 20 ml. Realizando el ensayo a 37°C en agitación y tomando alícuotas de 0,5ml de la mezcla cada 6 horas, para controlar la inactivación mediante la titulación de todas ellas por qPCR y sobre monocapas de células COS-1. De estos experimentos, se definieron como óptima la inactivación de BA71ΔCD2 utilizando 4 mM de BEI a 37°C en agitación durante 24 horas. Tras este tiempo se detuvo el procedimiento de inactivación añadiendo una solución de tiosulfato de sodio (STS, Sigma-Aldrich) a una concentración final del 2% en la muestra, durante 10 minutos, manteniendo el virus inactivado a 4°C hasta su formulación final. El virus inactivado preparado para su utilización *in vivo* correspondió siempre a lotes de inactivación conteniendo 20 ml de virus, a una concentración de $1,45 \times 10^5$ UFP/ml ($2,9 \times 10^6$ UFP totales).

3.5.1.2 Inactivación con Beta-propiolactona (BPL)

Misma concentración y volumen de BA71ΔCD2 se trató siguiendo el protocolo de Stone y Hess (Stone, 1967) modificado, con una concentración del 0,2% de BPL, en frío. Tras la incubación durante 24 h a 4°C, con agitación continua, cada lote se incubó durante al menos 18 horas adicionales a 36-38°C para inactivar la BPL. Para descartar su toxicidad, cada lote se ensayó sobre monocapas de cultivo celular.

3.5.1.3 Inactivación por ultravioleta (UV)

Las suspensiones víricas de BA71ΔCD2 (20 ml a $1,45 \times 10^5$ UFP/ml) se dispensaron en placas de cultivo de 35 mm de diámetro, y manteniendo la tapa abierta, se irradiaron con luz ultravioleta utilizando un tubo fluorescente germicida con una longitud de onda de 270 nm, situado a 20 cm de distancia durante 20 min.

Material y métodos

La inactivación completa del virus, en cada una de las preparaciones anteriores, se confirmó mediante tres pases ciegos tanto en células COS-1, como en macrófagos alveolares porcinos, así como utilizando qPCR en tiempo real (datos no mostrados). De forma resumida, se inocularon $7,25 \times 10^4$ UFP del virus inactivado, en monocapas celulares con 750.000 células COS (MOI 0,1), por duplicado. Las células infectadas se examinaron diariamente, y después de 4 días se recuperaron y congelaron a -80°C . Para el segundo y tercer pase, se inocularon 5 ml de material congelado y descongelado del pase anterior. Uno de los dos frascos inoculados en cada pase, se usó para determinar la presencia de copias del genoma del VPPA (apartado 3.2.3.3), mientras que el otro se utilizaba para evaluar la presencia de efecto citopático.

3.5.2. Utilización de adyuvantes para potenciar la respuesta inmune.

Estudios previos realizados por nuestros colaboradores, el Dr. Manuel del Moral de la facultad de medicina complutense de Madrid y del Dr. Sergio Bucarey de la Universidad de Chile, permitieron caracterizar el potencial inmunoadyuvante de las micropartículas de silicio en cerdo, previamente demostrado *in vitro* (Jimenez-Periañez *et al.*, 2013) y de quitosano-sulfonado en ratón (Bucarey *et al.*, 2014). La hipótesis de partida sería poder reducir la dosis vacunal lo suficiente como para que resultara lo bastante segura para el animal, gracias a la capacidad de estas micropartículas de redirigir el antígeno vacunal a las células presentadoras de antígeno, permitiendo su liberación gradual y, por lo tanto, favoreciendo su inmunogenicidad.

3.5.2.1 Conjugación de BA71ΔCD2 a micropartículas de silicio.

Las nanopartículas de silicio mesoporosas (SiM) aquí empleadas son partículas de alrededor de $0,65\text{-}5\ \mu\text{m}$, pequeñas estructuras concatenadas de diferentes moléculas de silicio, con un nivel de carga mucho mayor que otras nanopartículas de distinta naturaleza (Jimenez-Periañez *et al.*, 2013).

Las SiM provienen de una mezcla de micropartículas con diferentes cargas en una solución de etanol a una concentración de 70 mg/ml, donde cada miligramo contiene 33 millones de partículas. De estas soluciones, se recogen el número de

micropartículas deseadas y se resuspenden en 2 ml de PBS para proceder a lavarlas antes de su conjugación con el virus.

Previo al ensayo *in vivo* las SiM se conjugaron con diferentes concentraciones del virus atenuado BA71ΔCD2, para posteriormente comprobar tanto la viabilidad del virus como la ausencia de toxicidad. Para ello, se infectaron monocapas de MAPs, en presencia o ausencia del virus BA71ΔCD2 y comparando tanto la viabilidad celular como la cantidad de virus obtenido tanto en sobrenadante (por qPCR) como en la fracción celular, mediante tinción con 50 µg/ml de X-gluc (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indol 3-D-glucurónico, Glycosynth, sustrato del gen marcador *gusA* que codifica la proteína β-glucuronidasa presente en BA71ΔCD2), en presencia o en ausencia de SiM.

De estos resultados se definió la siguiente formulación para cada una de las dosis vacunales: 3×10^3 partículas víricas conjugadas a 10 mg de partículas de silicio en un volumen final de 1 ml de PBS estéril para ser inoculadas intramuscularmente (SiM fueron incubadas conjuntamente durante 24 horas, en agitación constante y temperatura ambiente previo a su inoculación).

3.5.2.2 Conjugación BA71ΔCD2 a micropartículas de quitosano sulfonado.

Las micropartículas de quitosano-sulfonado (QuiS) producidas por Bucarey y colaboradores, poseen un diámetro de 2,5 µm y una morfología esférica, con una carga superficial media de 8,19 milivoltios (mV)(Bucarey *et al.*, 2014). A pesar de su tamaño, resultó imposible empaquetar a BA71ΔCD2 dentro de estas partículas, sin que éste resultara inactivado (exigencia de pH ácido durante el procedimiento), por lo que decidimos utilizarlo de forma conjugada, exigiendo dos pasos bien diferenciados en el proceso: obtención del quitosano-sulfonado en forma de micropartículas y posteriormente su conjugación con BA71ΔCD2.

Para la primera fase se partió de 10 ml de una suspensión de quitosano de bajo peso molecular (LMW Chitosan, Sigma-aldrich, MO, USA) al 1% (p/v) en 2% de ácido acético, al que se le añadieron 13 ml de agua desionizada (volumen total 23 ml). Tras media hora en agitación constante, durante 30 minutos a 1510 rpm, y temperatura ambiente, se agregó gota a gota un volumen total de 1,4 ml de tripolifosfato de sodio (TPP, Sigma-Aldrich, MO, USA) a una concentración de 3 mg/ml y tras 10 minutos de

Material y métodos

incubación en agitación constante, se añadieron otros 1,4 ml de TPP. Transcurridos los diez minutos de agitación pertinentes, se agregaron 0,6 ml de TPP, en esta ocasión mucho más concentrada (100 mg/ml) para incubar durante 10 minutos finales, antes de proceder a la centrifugación a 3000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente de las micropartículas formadas. El pellet se lavó dos veces con agua desionizada y se congeló a -80°C como mínimo 4 horas, para posteriormente secarlo y concentrarlo. En nuestro caso utilizando un sonicador Labsonic 2000 B.Braun, y un concentrador a 240 xg (Vacufuge Vacuum Concentrator 5301 Rotor F-45-48-11, Eppendorf) durante 24 horas. Una vez seco, el pellet se pesa y se disuelve en PBS estéril hasta dejarlo a la concentración de partículas deseada.

Como se acaba de describir para SiM, concentraciones constantes de BA71ΔCD2 se mezclaron con concentraciones variables de QuiS y fueron ensayadas sobre MAPs para comprobar su citotoxicidad y capacidad de mantener el virus viable.

Las condiciones escogidas para los ensayos de vacunación consistieron en 10^3 partículas víricas conjugadas con 4,5 mg de QuiS.

3.6 Ensayo de la Inhibición de la hemadsorción del VPPA

Ante las dificultades encontradas para obtener virus recombinantes carentes de genes inmunodominantes con fines diagnósticos, decidimos explorar como alternativa el uso de la hemaglutinina viral (CD2v) como test DIVA alternativo que acompaña a BA71ΔCD2 como vacuna.

En nuestro test negativo, los animales vacunados con BA71ΔCD2, al no presentar la hemaglutinina viral en su genoma, no deberían ser capaces de producir anticuerpos contra esta, mientras que los animales infectados con una cepa hemadsorbente, desarrollarían anticuerpos anti-CD2v, capaces inhibir la hemadsorción (Malmquist, 1960; Ruiz-Gonzalvo *et al.*, 1986).

Durante las fases experimentales, los sueros extraídos de los animales, vacunados y los controles infectados destinados a este procedimiento, fueron tratados por calor, un mínimo de 30 minutos a 56°C, para inactivar el sistema del complemento.

Parecido a lo descrito anteriormente en el apartado 3.1.2.4, se sembraron $1,25 \times 10^6$ /cm² MAPs en una placa de 96 pocillos (Biolite) con medio RPMI completo. Al día siguiente estos MAPs, se lavaron con PBS y fueron infectados con el virus de interés, en unidades hemadsorbentes. Pasadas 18 horas, se retiró el inóculo y se añadieron directamente 100 μ l de los sueros pre-tratados con calor, diluidos en series logarítmicas en base de 2, dejando un pocillo sin diluir, seguidos de 20 μ l de una dilución 1:100 en PBS de eritrocitos frescos. Posteriormente y cada 24 horas se observó la evolución de la aparición de las “rosetas” de eritrocitos en cada pocillo, imagen típica del fenómeno de hemadsorción.

4. RESULTADOS

*“Lasciate ogni speranza, voi ch’entrate”
(Abandonar toda esperanza, quienes aquí entráis)*

La Divina Comedia, El Infierno, Canto III. Dante Alighieri

4.1 Buscando estrategias de vacunación que permitan mejorar la seguridad de BA71ΔCD2.

A pesar de su eficacia protectora, el prototipo vacunal BA71ΔCD2, es detectado en una pequeña proporción de los animales inoculados intramuscularmente (siempre dependiendo de la dosis), tanto en sangre como en hisopos nasales y rectales. A pesar de que el título viral detectado por qPCR es relativamente bajo, y normalmente limitado en el tiempo, el riesgo de transmisión de BA71ΔCD2 existe y merece ser estudiado en profundidad en el futuro. Complementariamente a los estudios de transmisión, durante esta tesis se han planteado diversas alternativas encaminadas a intentar mejorar la seguridad de BA71ΔCD2, incluyendo:

- I. **la inactivación de BA71ΔCD2**, para evitar su replicación *in vivo*.

- II. **la utilización de dos dosis subóptimas de 10³ UFP de BA71ΔCD2 (estrategia *prime-boost*)**, dosis descrita previamente como subóptima en régimen de única dosis, en lo que refiere a su eficacia protectora, pero más segura en cuanto a la ausencia de virulencia residual (Monteagudo *et al.*, 2017).

- III. **la utilización de nuevos adyuvantes experimentales basados en micropartículas de silicio mesoporosas o de quitosano-sulfonado**, con el objetivo de potenciar la respuesta inmune inducida tras la inmunización con dosis subóptimas de BA71ΔCD2.

En el apartado 4.2 Manipulación genética de BA71ΔCD2 como alternativa para obtener una vacuna más segura, se describirán una serie de estrategias basadas en la manipulación del genoma de BA71ΔCD2 con este mismo propósito, mejorar su seguridad.

Resultados

4.1.1 BA71 Δ CD2 pierde la capacidad protectora tras su inactivación.

La inactivación de BA71 Δ CD2, si éste no perdiera su capacidad protectora, sería sin duda alguna el método ideal a seguir, pensando tanto en su seguridad como en las posibilidades que abriría para obtener una vacuna DIVA en el futuro. A pesar de que desafortunadamente, todos los intentos de inactivación realizados con cepas de VPPA virulentas, han fracasado como vacunas. La ausencia de la proteína inmunosupresora CD2v en la superficie del virión, permitió hipotetizar con la posibilidad de que BA71 Δ CD2 inactivado provocara una respuesta más potente que el virus original y quizás protectora. Así pues, nosotros apostamos por esta estrategia como la más obvia a probar en primera instancia con BA71 Δ CD2.

Tres fueron los tratamientos utilizados para inactivar BA71 Δ CD2: la inactivación química con β -propiolactona (BPL), la inactivación física con luz ultravioleta (UV); ambos empleados con anterioridad para la VPPA y un tratamiento adicional de inactivación química con etilamina binaria (BEI), tratamiento que ha demostrado su efectividad sin cambiar la conformación de los epítomos presentes en las proteínas de diversos virus, como por ejemplo el de la fiebre aftosa (VFA) (Bahnmann, 1990; Habib *et al.*, 2006; Larghi *et al.*, 1980).

Una vez demostrada la inactivación total del virus (condiciones descritas en el capítulo 3, apartado 3.5.1), la formulación de la vacuna se llevó a cabo utilizando Carbopol® 971P NF (Lubrizol) como adyuvante, un carbómero polianiónico que ha demostrado proporcionar altos títulos de anticuerpos específicos, una fuerte respuesta celular y unos elevados niveles de citoquinas Th1 específicas (Gartlan *et al.*, 2016; Mair *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2018).

Para probar la respuesta inmune inducida y la protección conferida por las distintas formulaciones vacunales, treinta cerdos se alojaron en dos boxes (15 cerdos por box), y se repartieron en 5 grupos de trabajo; 10 animales inmunizados con BA71 Δ CD2 inactivado con BEI (BEI-BA71 Δ CD2), 5 animales inmunizados con BA71 Δ CD2 inactivado con β -propiolactona (BPL-BA71 Δ CD2) y 5 animales inmunizados con BA71 Δ CD2 inactivado con luz ultravioleta (UV-BA71 Δ CD2). Los 10 animales restantes, se utilizaron como animales control: 5 de ellos inoculados con PBS (control) y los otros 5, inoculados solamente con Carbopol (adyuvante). Todos

los cerdos recibieron dos inmunizaciones intramusculares utilizando 10^6 UFP del BA71 Δ CD2 inactivado correspondiente, adyuvantado con Carbopol al 0,5%, en un volumen final de 1,5 ml en PBS, y con un intervalo de tres semanas. Los cerdos control recibieron 1,5 ml de PBS estéril o 1ml de Carbopol solo. Todos los cerdos fueron infectados, con una dosis letal de 10^3 CGE de la cepa virulenta de VPPA Georgia2007/1, tres semanas después de la segunda inmunización (Figura 4.1).

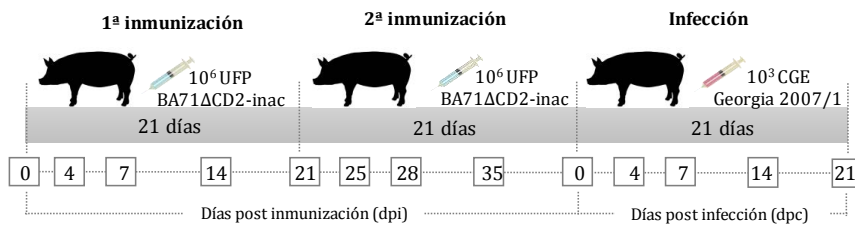


Figura 4.1 Esquema sobre el diseño experimental *in vivo* con BA71 Δ CD2 inactivado con diferentes procedimientos e infectando posteriormente a los animales con el aislado Georgia2007/1. Los números enmarcados representan los días de toma de muestras.

Tras la inmunización con BEI-BA71 Δ CD2, BPL-BA71 Δ CD2 o UV-BA71 Δ CD2, ninguno de los animales mostró fiebre, ni viremia, ni ningún otro signo clínico compatible con la PPA, confirmando la correcta inactivación del virus. Desafortunadamente, tras la infección letal con la cepa virulenta Georgia2007/1, ningún animal fue capaz de sobrevivir, independientemente del método de inactivación seleccionado (Figura 4.2).

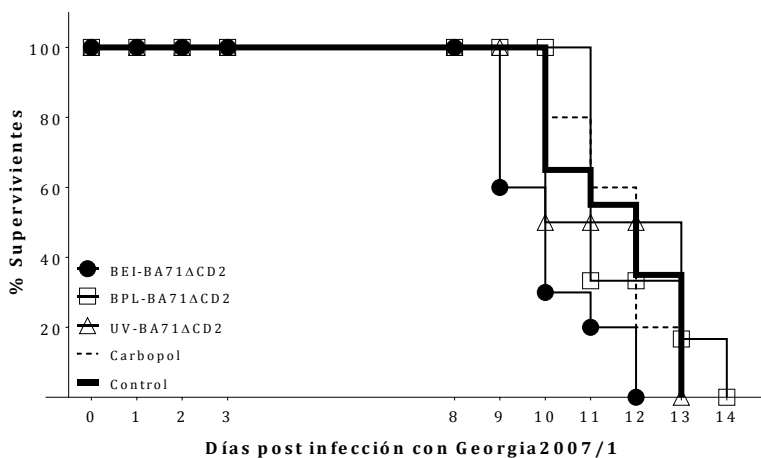


Figura 4.2 Porcentaje de supervivencia de los animales inmunizados con BA71 Δ CD2 inactivado tras la infección con una dosis letal de Georgia2007/1. También se representan los datos de los grupos control.

Resultados

Estos datos confirman los previamente obtenidos con el virus salvaje y demuestra que la inactivación de BA71 Δ CD2, le hace perder su capacidad protectora.

Ante la uniformidad de los datos, centramos nuestro trabajo en caracterizar la respuesta inducida en el grupo de animales inmunizado con BEI-BA71 Δ CD2, virus tratado con etilamina binaria (BEI), ya utilizado anteriormente en el caso del VPPA (Bahnemann, 1990; Blome *et al.*, 2014; Schloer, 1982).

Todos los animales del grupo desarrollaron un curso letal agudo de PPA con fiebre alta (Figura 4.3), altas cargas virales en sueros (Figura 4.4) y signos clínicos evidentes de enfermedad (disnea, postración, petequias, cianosis). De igual modo, todos los animales sucumbieron y mostraron lesiones patológicas compatibles con PPA durante las inspecciones post mortem, sin diferenciación ninguna observable entre vacunados y animales control sin vacunar.

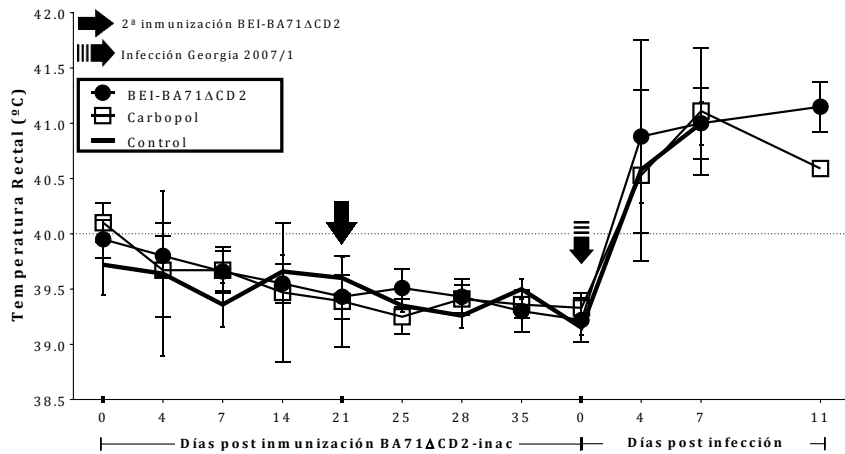


Figura 4.3 Evolución de la temperatura rectal tanto de los animales inmunizados con BA71 Δ CD2 inactivado con BEI como de los controles inoculados con Carbopol o PBS y tras la infección letal con Georgia2007/1. Se representa una la media de cada grupo con su correspondiente desviación estándar.

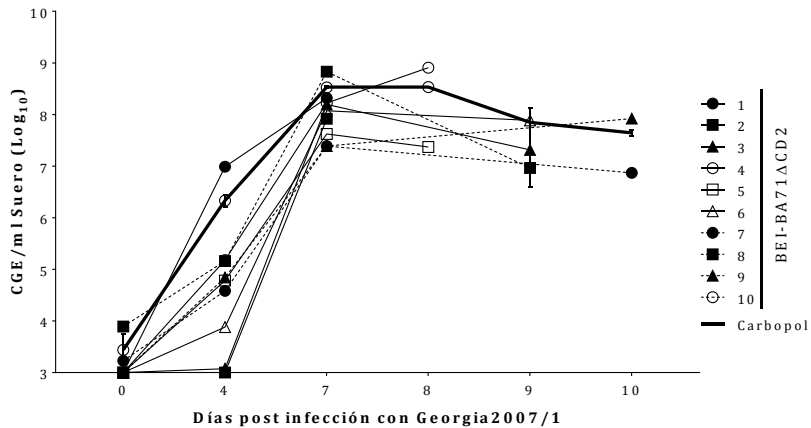


Figura 4.4 Detección de la carga viral del VPPA en sueros de los animales inmunizados con BEI-BA71ΔCD2 tras la infección con Georgia2007/1. Para el grupo control inoculado con Carbopol, se representan los valores medios obtenidos, así como su desviación estándar correspondiente.

Sorprendentemente, la inoculación con cualquiera de las formulaciones inactivadas, incluyendo BEI-BA71ΔCD2 fue incapaz de desencadenar una respuesta eficaz de anticuerpos específicos contra la PPA (Figura 4.5). Ninguno de los 10 cerdos que recibieron la vacuna inactivada, mostró anticuerpos detectables después de la primera dosis, a pesar de la presencia de Carbopol, observándose un despunte en la respuesta tras la segunda dosis, mucho menor a lo observado tras una sola dosis, con el virus BA71ΔCD2 vivo (Monteagudo *et al.*, 2017).

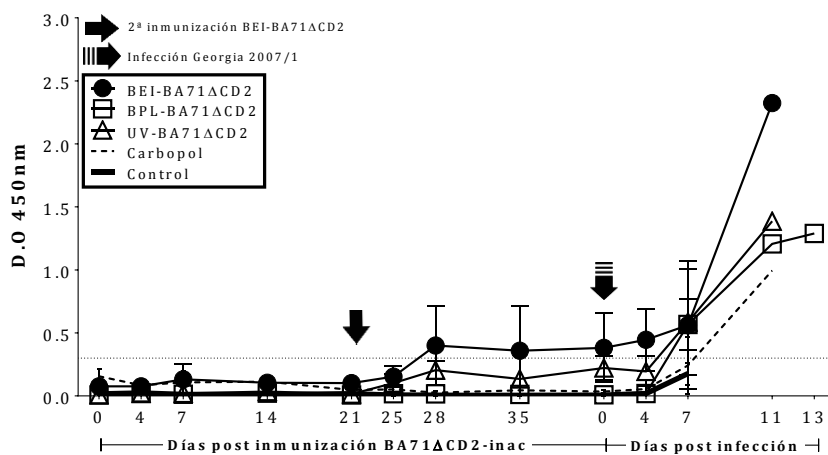


Figura 4.5 Detección de anticuerpos específicos frente al VPPA detectados mediante ELISA a partir de sueros de cerdos inmunizados con diferentes preparaciones inactivadas de BA71ΔCD2 e infectados posteriormente con Georgia2007/1. Se muestran las medias de los valores obtenidos en el ELISA para cada grupo y las desviaciones estándar correspondientes.

Resultados

Tras la infección con Georgia2007/1, se observó una pequeña aceleración de la respuesta de anticuerpos en los animales inmunizados con BA71 Δ CD2 inactivado, proporcional a la observada para los animales control.

Independientemente de este incremento, que únicamente refleja el primado de los animales antes de la infección con Georgia2007/1, todos los animales, incluidos los controles sucumbieron a la enfermedad, demostrando la imposibilidad de utilizar BEI-BA71 Δ CD2 como vacuna.

De una manera semejante a lo descrito para la respuesta específica de anticuerpos, sorprende el bajísimo recuento de células T-específicas, inducidas por las vacunas inactivadas, medidas mediante un ELISPOT de IFN γ tras la estimulación *in vitro* con el virus parental BA71 (Figura 4.6). Tras la inmunización con BEI-BA71 Δ CD2, sólo el cerdo número 5 mostró una respuesta celular elevada 42 días post inmunización (0dpc), justo antes de la infección letal con Georgia2007/1.

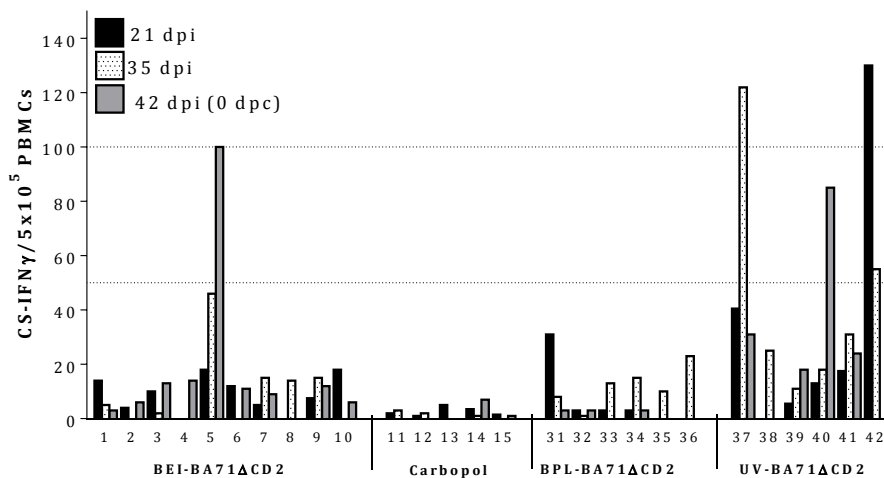


Figura 4.6 Recuento de células T-secretoras de IFN γ específicas frente a BA71 en PBMCs de cerdos inmunizados con diferentes preparaciones inactivadas de BA71 Δ CD2. El valor medio de las células secretoras detectadas en los controles inoculados con PBS fue sustraído del resto de grupos.

A pesar de la gran cantidad de células T-específicas de IFN γ encontradas, el cerdo número 5 sucumbió a la infección por PPA, sin mostrar ninguna diferencia significativa en comparación con el resto de los cerdos dentro del grupo. Mientras

que prácticamente ninguno de los animales vacunados con BPL-BA71 Δ CD2 indujo respuesta T, mantenidas y significativas, una gran proporción de los cerdos inmunizados con UV-BA71 Δ CD2, indujeron respuestas detectables en algún momento tras la inoculación. Independientemente de los resultados obtenidos, éstos fueron mucho menos consistentes que los obtenidos normalmente con el virus BA71 Δ CD2 vivo (Monteagudo *et al.*, 2017) y no correlacionaron con protección.

En su conjunto, los resultados aquí obtenidos confirman que la inactivación del BA71 Δ CD2 parece inviable con objetivos vacunales y ratifican la teoría de que la protección conferida por BA71 Δ CD2 está estrictamente ligada a su capacidad de replicar en el animal.

4.1.2 La utilización de dosis subóptimas repetidas de BA71 Δ CD2 (estrategia *prime-boost*) no protege totalmente frente a la infección con Georgia2007/1.

Experimentos realizados con anterioridad en el laboratorio demostraban, claramente, que la protección conferida por BA71 Δ CD2 frente al VPPA era dosis dependiente. No obstante, de estos mismos experimentos se pudo demostrar que, pese a la magnífica protección conseguida, la virulencia residual de BA71 Δ CD2, también dependía de la dosis vacunal empleada. Así, el 100% de los animales vacunados con una dosis de 10^6 UFP de BA71 Δ CD2 eran capaces de sobrevivir, independientemente del virus virulento utilizado: BA71 (homólogo genotipo I), E75 (heterólogo, genotipo I) o Georgia2007/1 (heterólogo, genotipo II). En claro contraste, sólo un 20% de los animales sobrevivía tras la inoculación con 10^3 UFP de BA71 Δ CD2 (Tesis Paula L. Monteagudo, 2015).

Directamente proporcional a la protección conferida, BA71 Δ CD2 se detectaba en un tercio de los cerdos inoculados con 10^6 UFP de BA71 Δ CD2, mientras que a una dosis de 10^3 UFP de BA71 Δ CD2 no se detectaba virulencia residual alguna (Monteagudo *et al.*, 2017). Con estos datos en mente, y siguiendo evidencias experimentales de otros grupos de investigación que demostraban una mejora exponencial de la respuesta frente al VPPA utilizando virus atenuados en protocolos *prime-boost* (Reis *et al.*, 2016; Sanchez-Cordon *et al.*, 2018), planteamos el siguiente experimento *in vivo*.

Resultados

Un grupo de 10 cerdos fueron inmunizados con dos dosis subóptimas de 10^3 UFP de BA71 Δ CD2, administradas intramuscularmente, con tres semanas de diferencia. Como control del ensayo, un grupo de 5 animales fueron inoculados con 1 ml de PBS. 21 días después (42 días tras la primera inoculación), todos los cerdos fueron infectados con una dosis letal de 10^3 CGE de Georgia2007/1 (Figura 4.7).

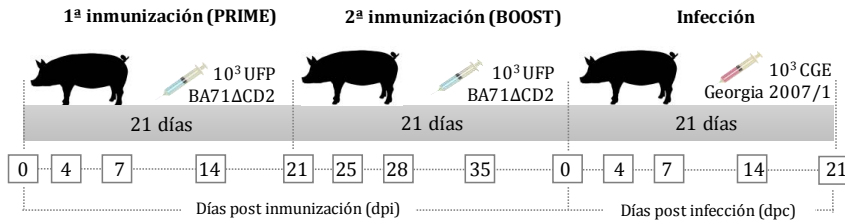


Figura 4.7 Esquema sobre el diseño experimental *in vivo* usando un régimen de inmunización *prime-boost* con una dosis subóptima de BA71 Δ CD2 e infectando posteriormente a los animales, con una dosis letal de Georgia2007/1. Los números enmarcados representan los días de toma de muestras.

Como cabía esperar, ninguno de los cerdos vacunados con 10^3 UFP de BA71 Δ CD2, mostró síntoma alguno compatible con PPA, con la excepción de un pequeño pico de fiebre en el animal número 20 (Figura 4.8), que correspondió con la presencia de un cuadro diarreico puntual.

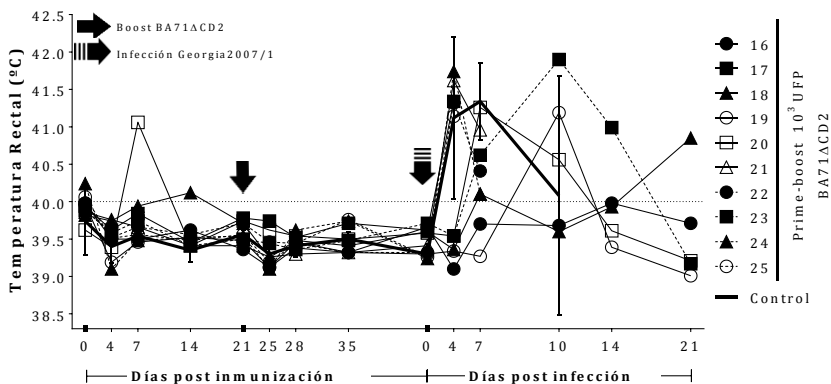


Figura 4.8 Evolución de la temperatura rectal de los animales inmunizados con dos dosis subóptimas en régimen *prime-boost* con BA71 Δ CD2 y tras la infección letal con Georgia2007/1. Los datos correspondientes a los animales control se representan como media con su desviación estándar correspondiente.

Independientemente de este hecho aislado, ningún animal mostró carga viral detectable en suero (Figura 4.9) antes de la infección, a excepción de dos animales de forma esporádica, siendo uno de ellos el animal número 20.

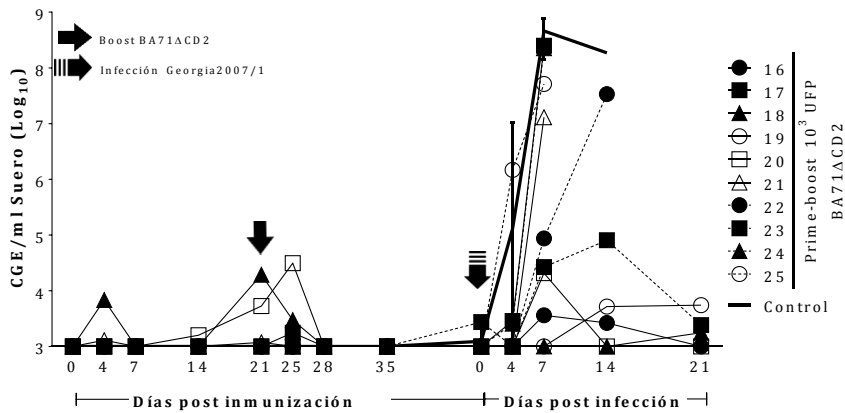


Figura 4.9 Detección de la carga viral del VPPA en sueros de los animales inmunizados con dos dosis subóptimas en régimen *prime-boost* con BA71ΔCD2 y tras la infección con Georgia2007/1. Los datos correspondientes a los animales control se representan como media, con su desviación estándar correspondiente.

Tras la infección con la dosis letal de Georgia2007/1, 5 de los 10 animales vacunados con el régimen de *prime-boost*, sobrevivieron a la infección (Figura 4.10), mostrando picos de fiebre muy variables y viremias más cortas y con títulos, por lo menos, 3 logaritmos por debajo de los observados en los cerdos control (Figura 4.9).

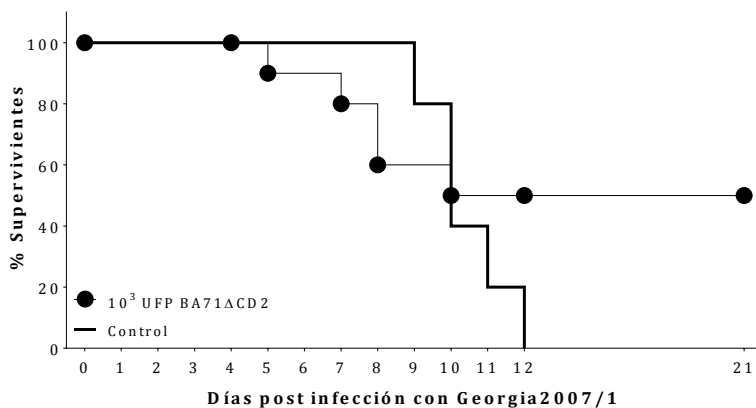


Figura 4.10 Porcentaje de animales supervivientes tras la inmunización con dos dosis subóptimas (*prime-boost*) de BA71ΔCD2 y tras la infección letal con Georgia2007/1. También se representan los datos de los animales control inoculados con PBS solamente.

Resultados

Curiosamente, los 5 cerdos restantes, que no resisten la enfermedad, siguieron cinéticas de fiebre (Figura 4.8), viremia (Figura 4.9) y de progreso de la enfermedad (Figura 4.10), indistinguibles a lo observado para los animales control.

Como podemos observar en la Figura 4.11, exceptuando el animal 24, que desarrolla niveles de anticuerpos muy bajos, todos los animales, en menor o mayor medida desarrollan títulos de anticuerpos frente al VPPA muy significativos, detectables desde a partir del día 14 tras la primera inmunización con BA71ΔCD2. Estos valores aumentan tras la dosis de refuerzo y llegan a su máximo tras su reinfección con el virus virulento Georgia2007/1. Como ya se ha descrito de manera recurrente para la PPA, los niveles de anticuerpos detectados tras la inmunización no correlacionaron con protección. En cualquier caso, merece la pena, recordar como la inducción de anticuerpos es muchísimo más eficiente con BA71ΔCD2 vivo que inactivado, incluso utilizando dosis 1000 veces menor (comparar con los datos descritos en la figura 4.5).

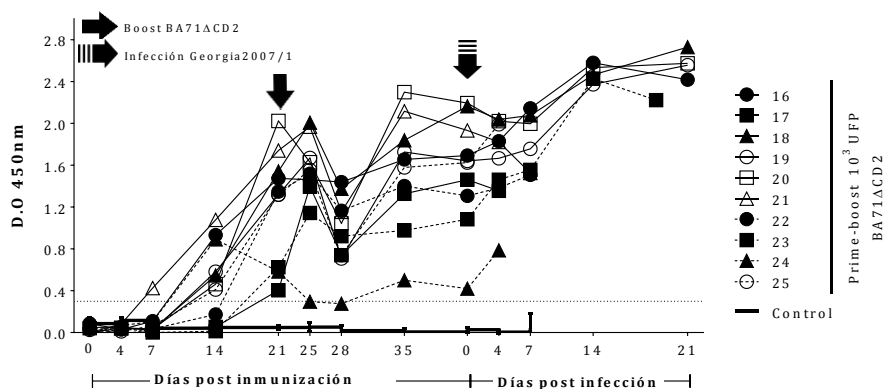


Figura 4.11 Detección de anticuerpos específicos frente al VPPA detectados mediante ELISA. Se muestran los valores medios obtenidos de los animales control con sus desviaciones estándar correspondientes.

Si nos centramos en la respuesta celular inducida (Figura 4.12), sorprende la heterogénea detección de células T-específicas en los animales inmunizados, tanto la práctica ausencia tras el refuerzo (42dpi), como la poca consistencia en su detección en un mismo animal a lo largo del tiempo.

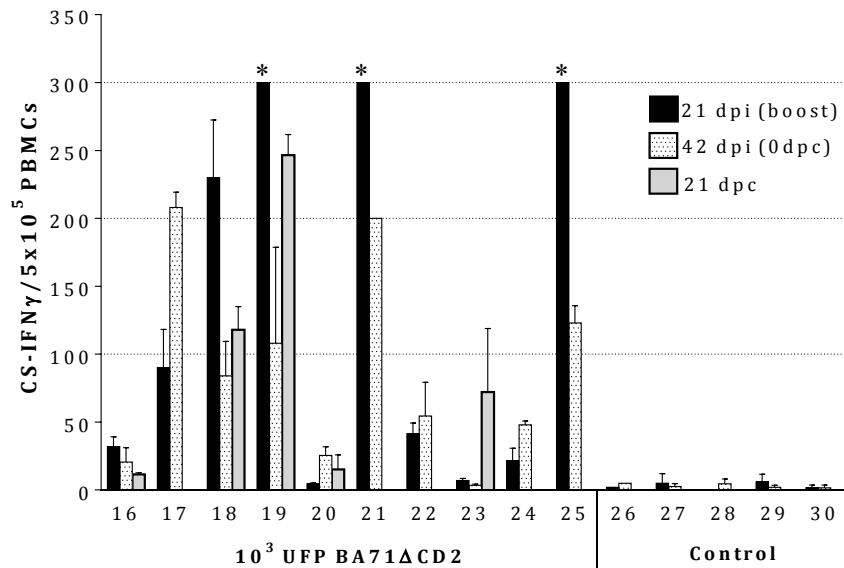


Figura 4.12 Recuento de células T-secretoras de IFN γ específicas frente a BA71 en PBMCs de cerdos inmunizados con una dosis subóptima en régimen *prime-boost* con BA71 Δ CD2 (dpi) e infectados con Georgia2007/1 (dpc). Los asteriscos (*) representan el límite máximo de recuento de la técnica (300 spots).

Tanto la medición de anticuerpos específicos por ELISA como de la respuesta T-específica para el VPPA por un ELISPOT de IFN γ , resultan útiles para distinguir animales control y vacunados, pero no aportan gran valor en lo referente a su correlación con protección.

4.1.3 Ensayo preliminar de vacunación de BA71 Δ CD2 con micropartículas de silicio mesoporosas o de quitosano-sulfonado, administradas como adyuvantes.

Si bien la vacunación con BA71 Δ CD2 inactivado claramente invalidaba su capacidad protectora (ver apartado 4.1.1), la utilización de dosis bajas repetidas de BA71 Δ CD2, sí permitía mejorar la protección conferida por una única dosis vista anteriormente, aunque todavía lejos de la protección total conseguida por la dosis óptima de vacunación. Con el objetivo de conseguir protocolos de inmunización de una única

Resultados

dosis (comercialmente más llamativos) y a la vez más seguros y eficaces, nos planteamos combinar:

- i. la utilización de una dosis baja del BA71ΔCD2, con el objetivo de reducir al máximo la virulencia residual de BA71ΔCD2.
- ii. la utilización de un adyuvante adecuado que permitiera potenciar aquellas armas implicadas en la protección frente al VPPA, sin detrimento en la respuesta inmune inducida.

La nanotecnología ha evolucionado extraordinariamente en las últimas décadas debido a su elevado número de aplicaciones, especialmente en medicina. Así pues, aprovechando la colaboración existente con los investigadores Sergio Bucarey (Universidad de Chile) y de Manuel del Moral (Universidad Complutense de Madrid), decidimos probar dos adyuvantes desarrollados en sus laboratorios: micropartículas de quitosano-sulfonado y de silicio mesoporosas, respectivamente. La elección de ambos adyuvantes, se basó en resultados obtenidos tanto *in vitro*, como en ratones (Bucarey *et al.*, 2014; Jimenez-Periañez *et al.*, 2013), demostrando la potenciación de respuestas CTL, clave en la protección frente al VPPA (Argilagué *et al.*, 2012; King *et al.*, 2011; Takamatsu *et al.*, 2013). Por lo tanto, la idea detrás de su utilización reside en la capacidad de ambos tipos de partículas de atraer al sitio de inoculación a las células presentadoras de antígeno (APC): células dendríticas, principalmente, facilitando la liberación gradual de su contenido en las mismas (en nuestro caso BA71ΔCD2).

Una vez demostrada la ausencia tanto de toxicidad de dichas micropartículas, como la inactivación del virus por las mismas *in vitro*, 2 grupos de 6 cerdos cada uno, fueron vacunados con una dosis subóptima de 10^3 UFP de BA71ΔCD2, adyuvantada bien con SiM o bien QuiS (condiciones descritas en el capítulo 3, apartado 3.4.2), dejando 3 animales más inoculados con PBS, solamente, como control del ensayo.

Posteriormente, tras 22 días, todos los animales se infectaron con una dosis letal de 10^3 CGE del aislado virulento Georgia2007/1 (Figura 4.13).

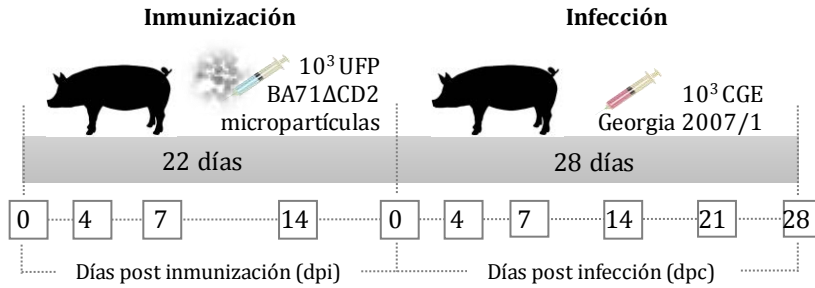


Figura 4.13 Esquema sobre el diseño experimental *in vivo* con una dosis subóptima de BA71ΔCD2 adyuvantado con micropartículas de silicio mesoporosas (SiM) o de quitosano sulfonado (QuiS), e infectando posteriormente con Georgia2007/1. Los números enmarcados representan el día de toma de muestras.

De una manera similar a lo descrito para la estrategia *prime-boost*, la inoculación de una única dosis de 10³ UFP de BA71ΔCD2 adyuvantada con SiM o QuiS, mejoró notablemente la protección obtenida si se compara con una única dosis sin adyuvantar. Como se puede observar en la Figura 4.14, cuatro de los seis cerdos inmunizados con QuiS (66,6%) y tres de los seis inmunizados con SiM (50%), sobrevivieron a la infección letal frente a Georgia2007/1, mientras que solamente uno de los cinco cerdos inmunizados con la misma dosis de BA71ΔCD2 resistió el desafío. Como cabía esperar, los tres animales del grupo control murieron antes de las dos semanas tras la infección.

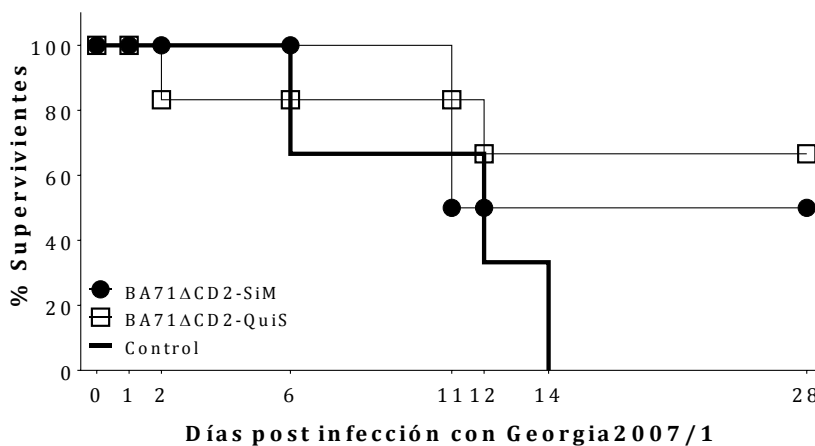


Figura 4.14 Porcentaje de animales supervivientes tras la inmunización con una dosis subóptima de BA71ΔCD2 adyuvantado con micropartículas e infección letal con Georgia2007/1. También se representa al grupo control sin inmunizar.

Resultados

Con la excepción única del animal 157, todos los animales inoculados con 10^3 UFP de BA71 Δ CD2 permanecen asintomáticos, sin temperaturas elevadas (Figura 4.15), ni sintomatología alguna compatible con PPA.

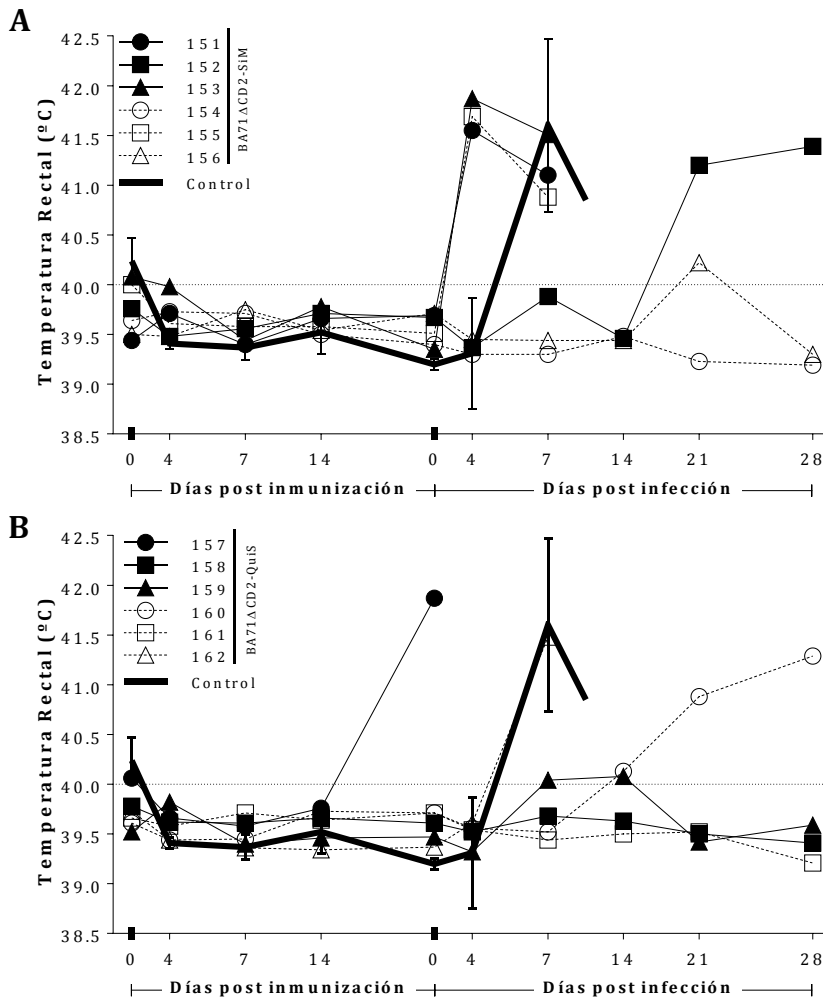


Figura 4.15 Evolución de la temperatura rectal de los animales inmunizados con una dosis subóptima de BA71 Δ CD2 adyuvantado con micropartículas de silicio (A-SiM) o de quitosano sulfonado (B-QuiS) e infectados, posteriormente, con Georgia2007/1. Los datos correspondientes al grupo control sin inmunizar, se representan como media de los valores obtenidos con sus respectivas desviaciones estándar.

Respecto al animal 157, cabe destacar no sólo el pico de fiebre detectado a partir del día 14 post inmunización, sino la presencia constante de fiebre, acompañada de una

leve apatía y disnea, teniendo que ser sacrificado un día después de la infección con Georgia2007/1. La necropsia del animal permitió hacer el análisis post mortem, encontrándose ligeros depósitos de fibrina alrededor del hígado, una congestión generalizada y áreas de consolidación pulmonar craneoventrales, compatibles con una infección bacteriana severa, pero sin ninguna otra lesión compatible con una infección aguda de PPA.

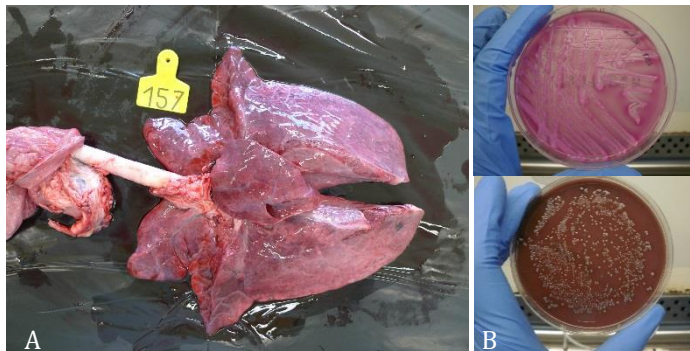


Figura 4.16 Imágenes de las lesiones macroscópicas encontradas en el pulmón del animal número 157 tras 22 días post inmunización (A) y de las colonias crecidas tras la toma de muestra de un hisopo pulmonar (B).

Independientemente de la causa de la muerte, el animal número 157 presentaba una carga viral muy elevada en circulación (10^7 CGE/ml de suero) el día del desafío (Figura 4.17), seguramente debido a la posible inmunosupresión por parte de la infección bacteriana, comprometiendo de esta manera el control por parte del sistema inmune del virus vacunal facilitando su replicación.

Cabe destacar que una gran parte de los animales supervivientes apenas sufrieron fiebre ni viremia detectable, con excepción del cerdo número 153, inmunizado con SiM, y del animal número 160 adyuvantado con QuiS, en los que viremia y fiebre apareció a partir del día 21 tras la infección con Georgia2007/1 (Figura 4.17).

Resultados

Tras el desafío, tal y como esperábamos, los animales control desarrollan fiebres elevadas, sintomatología compatible con PPA y viremia, muriendo todos ellos antes del día 14 dpc. Cabe destacar que, la incorporación del adyuvante en la formulación vacunal, permitió que algunos animales no sólo sobrevivieran a la infección letal, sino que además, alguno lo hiciera libre de síntomas y viremia: caso de 3 de los 4 supervivientes del grupo inmunizado con BA71 Δ CD2-QuiS, y de 2 de los tres inmunizados con BA71 Δ CD2-SiM.

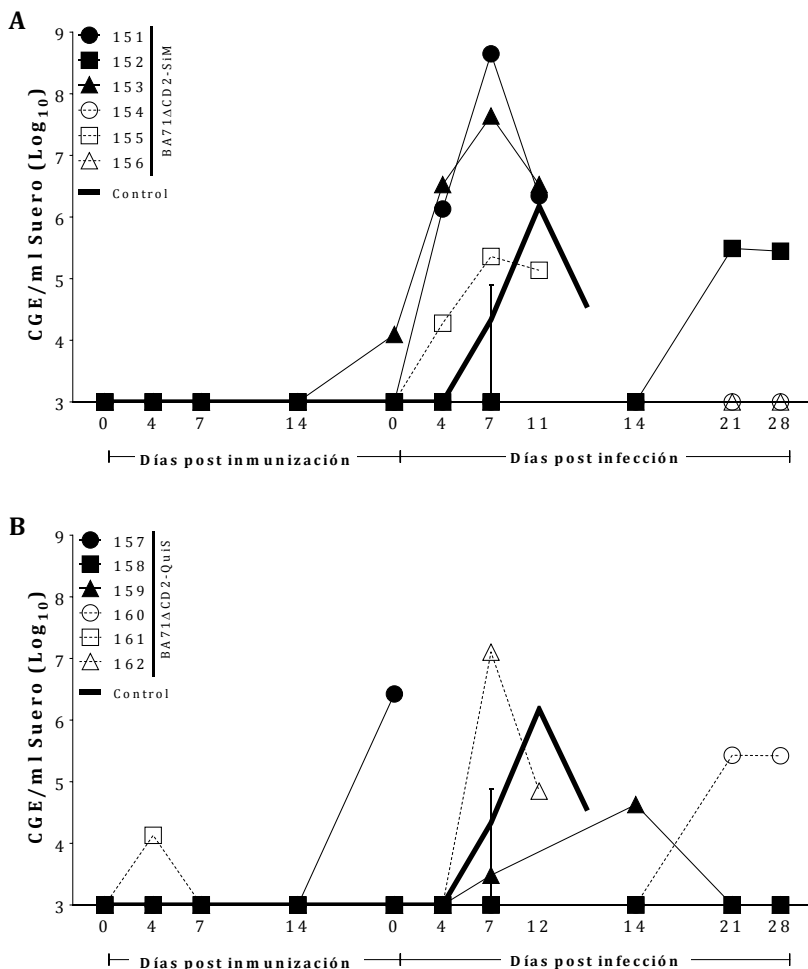


Figura 4.17 Evolución de carga viral antes y después de la infección con Georgia 2007/1. Los datos que se representan en la **gráfica A**, aquellos animales inmunizados con BA71 Δ CD2 adyuvantado con SiM y en la **gráfica B**, aquellos inmunizados con BA71 Δ CD2 adyuvantado con QuiS. Los controles se presentan como media con sus correspondientes desviaciones estándar.

Si nos centramos en la respuesta humoral inducida (Figura 4.18), todos los animales, en mayor o menor medida, presentan anticuerpos específicos frente a la PPA detectables a partir de los 14 días post inmunización y alcanzan su máximo tras la reinfección con el aislado virulento Georgia2007/1. Como hecho sorprendente, cabe remarcar la homogénea respuesta observada para el grupo inmunizado con QuiS, incluyendo al animal 157, que hubo que sacrificar a día 1 post infección con Georgia2007/1.

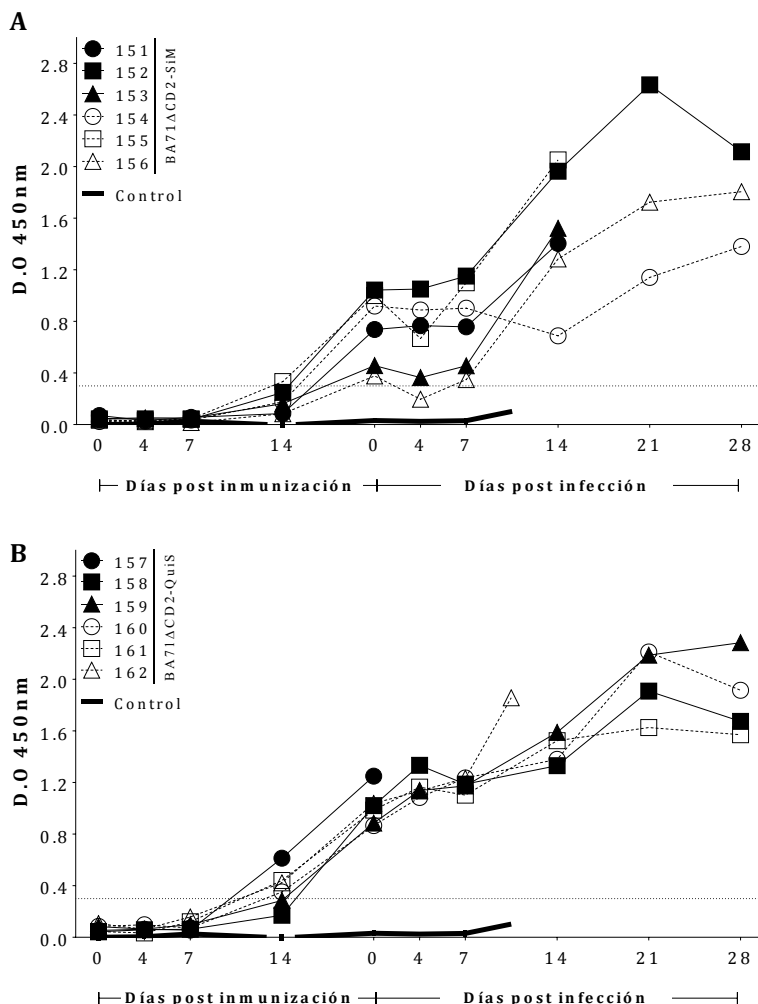


Figura 4.18 Evolución de carga viral antes y después de la infección con Georgia 2007/1. Los datos que se representan en la **gráfica A**, corresponden a los animales inmunizados con BA71ΔCD2 adyuvantado con SiM y en la **gráfica B**, a los inmunizados con BA71ΔCD2 adyuvantado con QuiS. Los controles se presentan como media con sus correspondientes desviaciones estándar.

Resultados

Conclusiones parecidas se pueden extraer de los resultados obtenidos en el ELISPOT de IFN γ . Si acaso, destacar que la incorporación de adyuvante potencia la respuesta celular inducida por BA71 Δ CD2, siendo quizás más sólida la respuesta obtenida con QuiS (Tabla 4.1). En el apartado de discusión se intentará explicar la constante falta de correlación observada entre la respuesta inmune medida en nuestros ensayos y la protección conferida por la vacuna. En cualquier caso, los ensayos empleados permiten, de una manera sencilla monitorizar si el animal ha sido inmunizado eficientemente o no.

Tabla 4.1 Recuento de células T secretoras de IFN γ tras la estimulación *in vitro* con BA71.

	BA71 Δ CD2-SiM						BA71 Δ CD2-QuiS					
	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162
35 dpi	>300	>300	96	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
22 dpc		>300		>300		>300		>300	>300	>300	>300	

35 dpi: 35 días post inmunización con BA71 Δ CD2-micropartículas
 22 dpc: 22 días post infección con Georgia 2007/1

A pesar de que los resultados aquí obtenidos no permiten sacar conclusiones definitivas, sí abre la posibilidad a incluir adyuvantes como potenciadores de la respuesta inmune inducida, permitiendo plantear una reducción de las dosis a emplear de BA71 Δ CD2. Combinando los resultados obtenidos en este apartado, uno podría aventurar que un protocolo *prime-boost* con una dosis subóptima de BA71 Δ CD2 en presencia de adyuvante, permitiría obtener la ratio de eficacia y seguridad deseada. En cualquier caso, en los próximos capítulos se describen nuevas alternativas empleadas con el objetivo de conseguir este propósito.

4.2 Manipulación genética de BA71ΔCD2 como alternativa para obtener una vacuna más segura.

Como se ha reiterado ya, uno de los objetivos de esta tesis es conseguir reducir la virulencia residual de BA71ΔCD2 para disponer de una vacuna lo más segura posible para su utilización en el campo.

Con este objetivo en mente, se plantearon dos estrategias diferentes y complementarias a la vez, a partir de BA71ΔCD2:

- I. Eliminación de un segundo factor de virulencia del VPPA mediante la obtención de virus **dobles recombinantes**.
- II. Generar un **virus mutante inducible** para un gen esencial que vea limitada su replicación *in vivo*, disminuyendo así su virulencia residual.

4.2.1 Eliminación de un segundo factor de virulencia a partir de BA71ΔCD2: Caracterización del potencial protector de los nuevos virus dobles recombinantes, BA71ΔCD2EP153R y BA71ΔCD2DP96R.

Como se describe en la introducción, el VPPA es un maestro de la evasión inmune. Por un lado, su diana natural es el macrófago porcino, célula de defensa clave en el sistema inmunológico del animal. Por el otro, una vez lo infecta, secreta una serie de componentes, que hacen que células tan importantes como los linfocitos B y T, entren en apoptosis, llegando a provocar la inmunosupresión del animal, paralelamente a la invasión de los tejidos del animal por parte del virus, desembocando en una hemorragia generalizada. El VPPA codifica para multitud de genes, muchos de ellos implicados en esta inmunosupresión, afectando al sistema inmune de maneras muy diversas y utilizando mecanismos muy distintos, algunos de ellos descritos en el

Resultados

apartado 1.3, perteneciente al capítulo introducción. Ante la multitud de posibilidades existentes aquí decidimos centrarnos en eliminar dos genes muy concretos: el gen EP153R, adyacente a CD2v, descrito como un inhibidor de la presentación de antígenos en clase I (Galindo *et al.*, 2000; Hurtado *et al.*, 2011; Lopera-Madrid *et al.*, 2017; Revilla *et al.*, 2004) y el gen DP96R, cuya delección en el virus de Georgia provoca su atenuación. Curiosamente, la eliminación de este gen junto con el gen 9GL, provocaba una atenuación todavía mayor de Georgia2007/1, manteniendo su capacidad para proteger frente al virus virulento homólogo (Abrams *et al.*, 2013; O'Donnell *et al.*, 2015a,2017; Wang *et al.*, 2018), siendo éste uno de los candidatos vacunales más prometedores de los hoy existentes.

Los virus dobles mutantes, **BA71ΔCD2EP153R** y **BA71ΔCD2DP96R**, se obtuvieron mediante recombinación homóloga, partiendo del virus BA71ΔCD2, siguiendo protocolos descritos en el capítulo metodología (apartado 3.3). Ambos virus replicaban en macrófagos porcinos siguiendo cinéticas indistinguibles a las del virus parental, BA71ΔCD2, confirmando que al menos *in vitro*, ambos genes eran prescindibles para el virus. A continuación, para estudiar su atenuación y su capacidad protectora, se diseñó el siguiente experimento (Figura 4.19). Tres grupos de seis animales cada uno, se inmunizaron con 10^6 UFP de BA71ΔCD2EP153R y BA71ΔCD2DP96R, respectivamente, mientras que el tercer grupo, inoculado con PBS, se utilizó como grupo control. Veinticuatro días más tarde, todos los animales recibieron una dosis letal de 10^3 CGE de la cepa virulenta Georgia2007/1.

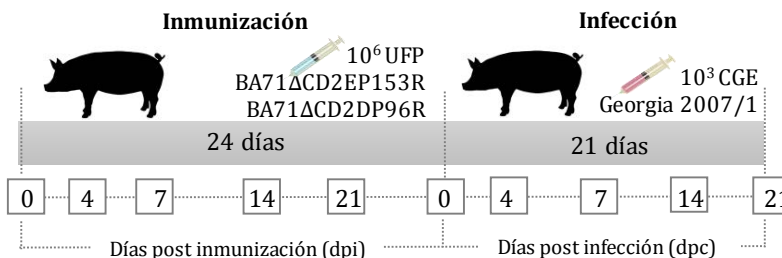


Figura 4.19 Esquema sobre el diseño experimental *in vivo*, inmunizando con los virus dobles mutantes: **BA71ΔCD2EP153R** o **BA71ΔCD2DP96R**. Los números enmarcados indican los días de recogida de muestras post inmunización (dpi) y post infección (dpc).

Como cabía esperar, los animales control sucumbieron entre los días 7 y 8 post infección, mientras que los animales vacunados con BA71ΔCD2EP153R y BA71ΔCD2DP96R, sobrevivieron un 66,6% (4 de 6) y 83,3% (5 de 6) de los animales respectivamente (Figura 4.20).

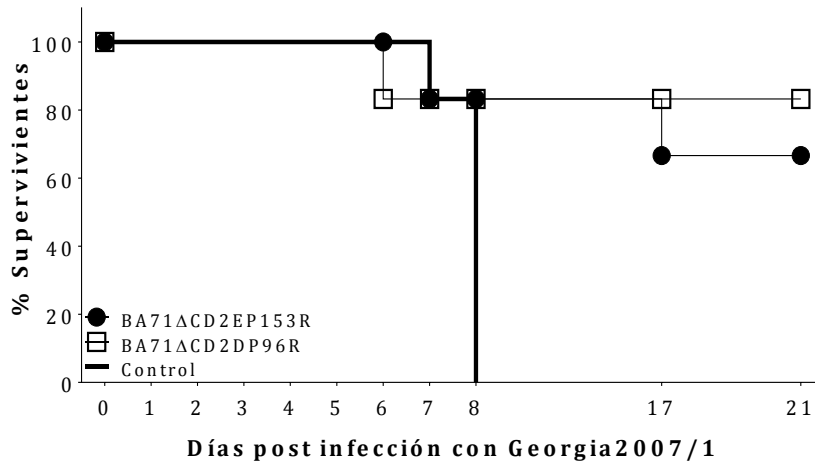


Figura 4.20 Porcentaje de animales supervivientes tras la infección letal con Georgia2007/1. Se representan los porcentajes de supervivencia de los animales inmunizados previamente con BA71ΔCD2EP153R y BA71ΔCD2DP96R, así como de los animales control.

Tras y durante la inmunización con BA71ΔCD2EP153R y BA71ΔCD2DP96R, los animales permanecieron libres de sintomatología compatible con PPA; ni siquiera fiebre, con la excepción del animal 85, perteneciente al grupo inmunizado con BA71ΔCD2DP96R, que presentaba un ligero pico de fiebre a los 14 días post inmunización (Figura 4.21). A pesar de la reducida presencia de fiebre, el porcentaje de animales con virus vacunal detectable en suero (Figura 4.21), no se veía disminuido con respecto a los descritos previamente para el virus original BA71ΔCD2; detectándose picos e intensidades relativamente cortos y bajos de virus en 3 de los 6 cerdos inmunizados con cada uno de los virus dobles recombinantes.

Resultados

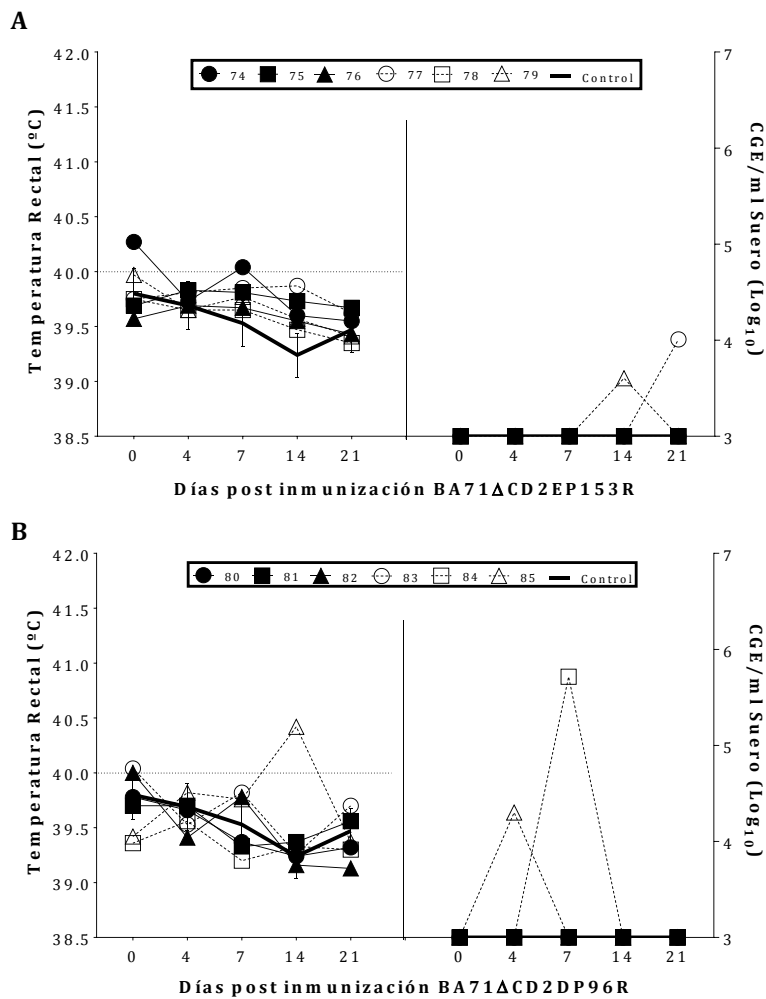


Figura 4.21 Evolución de la temperatura rectal y carga viral detectada en suero, de los animales inmunizados con BA71ΔCD2EP153R (A) y con BA71ΔCD2DP96R (B). Los animales control se representan con ambos grupos como media de los valores obtenidos, con sus correspondientes desviaciones estándar.

Tras la infección con Georgia2007/1, los títulos virales detectados por qPCR y la fiebre se correlacionan a la perfección con los signos clínicos de PPA observados (Figura 4.22). Así, los cerdos 75 y 81 inmunizados con BA71ΔCD2EP153R y BA71ΔCD2DP96R, respectivamente, mostraron perfiles de temperatura rectal y de cantidad de virus en suero indistinguibles de los controles, muriendo entre los días 6 y 7 tras la infección con Georgia2007/1.

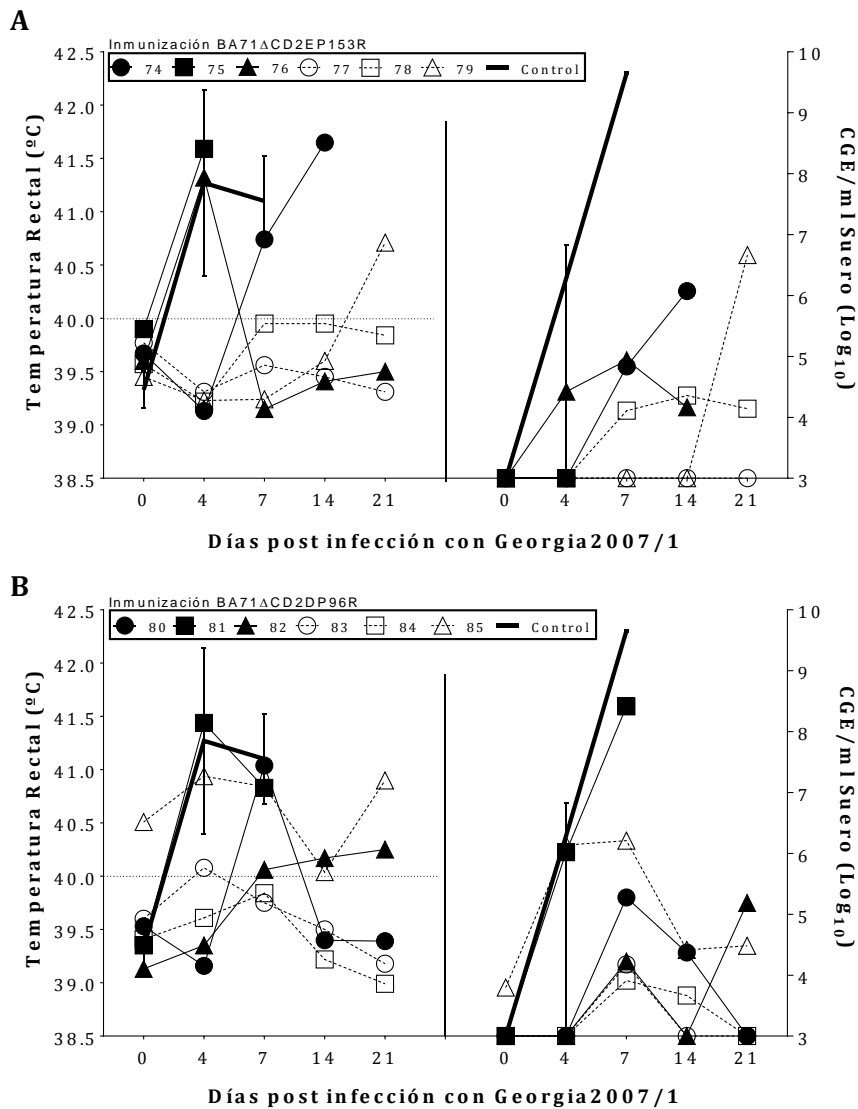


Figura 4.22 Evolución de la temperatura rectal y carga viral detectada por qPCR, tras la infección letal con Georgia2007/1. Los valores correspondientes a los animales control se representan con ambos grupos como media de los valores obtenidos, con sus correspondientes desviaciones estándar.

Curiosamente, el cerdo 74, inmunizado con BA71ΔCD2EP153R murió repentinamente el día 17 tras la infección con Georgia2007/1, coincidiendo previamente con la presencia de virus en suero y fiebre desde el día 7. La necropsia confirmó la presencia de lesiones compatibles con PPA.

Resultados

Cabe destacar la ausencia de fiebre ni sintomatología compatible con PPA en casi todos los animales supervivientes, con excepción de los animales 74 y 81 inmunizados con BA71 Δ CD2EP153R y BA71 Δ CD2DP96R, respectivamente. Los 5 supervivientes del grupo vacunado con BA71 Δ CD2DP96R, o bien no tienen virus detectable en el momento del sacrificio (3/5) o bien los títulos se encuentran en remisión (Figura 4.22).

Los niveles de anticuerpos observados antes y después del desafío fueron los esperados (Figura 4.23), tanto para los cerdos control como para los inmunizados, permitiendo asegurar que los doce animales inmunizados habían recibido la vacuna correctamente.

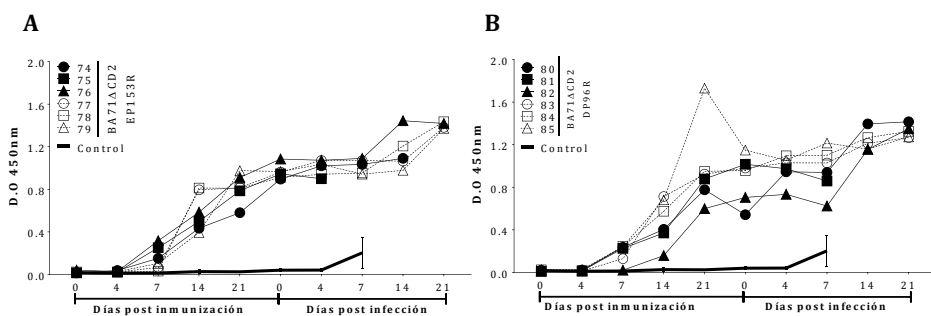


Figura 4.23 Detección de anticuerpos en suero, durante la inmunización con BA71 Δ CD2EP153R (A), o con BA71 Δ CD2DP96R (B), y después del desafío con Georgia2007/1. Los valores del grupo control se representan como media con sus correspondientes desviaciones estándar.

Algo parecido sucede para el caso de la respuesta T-específica antes o después del desafío, cuantificada mediante el ELISPOT de IFN γ . Aunque útil como herramienta diagnóstica, no aporta ningún valor predictivo (Figura 4.24).

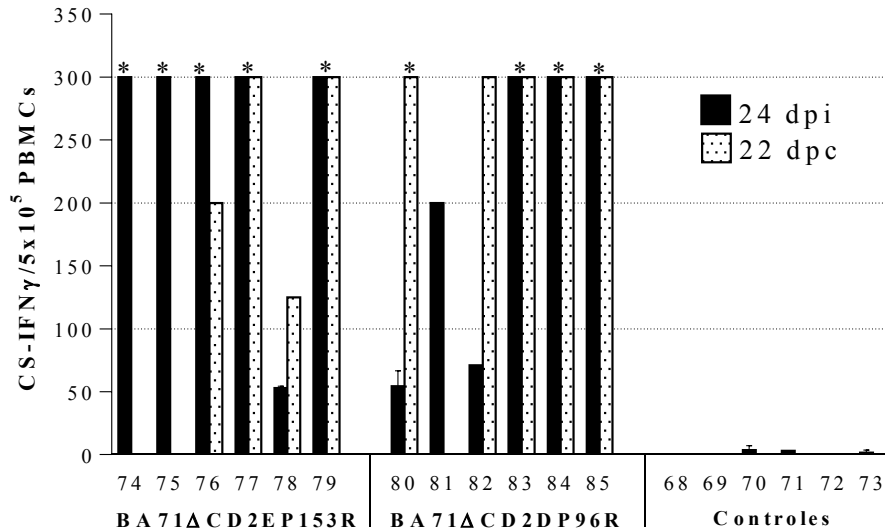


Figura 4.24 Recuento de células secretoras de IFN γ específicas frente al VPPA detectadas por ELISPOT post inmunización (dpi) y post infección (dpc) con Georgia2007/1. Se representa la media de los valores obtenidos y su desviación estándar correspondiente. El límite máximo de contaje de spots se fijó en 300.

De forma resumida, se puede concluir que la eliminación de los genes EP153R o DP96R no atenúan significativamente a BA71 Δ CD2, al menos no excesivamente, mostrando virulencias residuales comparables a las que presenta el virus original. Por otro lado, los niveles de protección conferidos por BA71 Δ CD2DP96R no mejorarían los del prototipo original BA71 Δ CD2. Además, atendiendo a la supervivencia y a la cantidad de virus detectable tras la infección con Georgia2007/1, quedaría claro que BA71 Δ CD2EP153R se comportaría de forma menos eficaz que el virus parental BA71 Δ CD2.

4.2.2 Caracterización del potencial protector del virus inducible BA71 Δ CD2PKi.

Una estrategia alternativa a la obtención de virus dobles mutantes, sería la generación de virus inducibles para genes esenciales del VPPA (Epifano *et al.*, 2006; Garcia-Escudero *et al.*, 1998, 2002 ; Suarez *et al.*, 2010). Estudios preliminares

Resultados

realizados con la cepa no-patogénica BA71V, permitieron demostrar la utilidad de esta metodología para estudiar la función que distintos genes esenciales del virus (Alejo *et al.*, 2003; Alejo, *et al.*, 2002; Epifano *et al.*, 2006; Suarez *et al.*, 2010).

Los resultados aquí presentados se basan en un virus inducible obtenido a partir de BA71 Δ CD2, conteniendo el gen de la serina proteína quinasa (PK) del VPPA (R298L) bajo el control de un promotor inducible. La PK del VPPA es una proteína esencial (no se ha podido eliminar del genoma del VPPA), de gran interés por su posible implicación en diversos aspectos de la morfogénesis viral y ciclo celular, incluyendo la fase nuclear del virus, confirmada en nuestro laboratorio (Ballester *et al.*, 2011). Una vez generado el virus inducible **BA71 Δ CD2PKi** por recombinación homóloga, se pasó a comprobar tanto la eficiencia de inducción y represión *in vitro*, como su cinética de crecimiento en células COS-1 respecto al virus parental (BA71 Δ CD2). Sorprendentemente, la cinética y el título máximo de **BA71 Δ CD2PKi** obtenido tras la infección en células COS-1, fue idéntica en presencia o en ausencia del inductor IPTG. Este resultado sólo se puede explicar asumiendo que el promotor inducible, era capaz de expresar trazas de PK, incluso en ausencia de IPTG. Al tratarse de una enzima, trazas de esta podrían hacer su función *in vitro*, sin afectar al crecimiento y título final del virus. La efectiva reducción de la expresión de PK en ausencia de IPTG ya fue descrita y detallada con anterioridad en nuestro laboratorio. Se demostró además que esta reducción era suficiente para evitar que el inducible para la poliproteína estructural del virus, pp220, formara virones, pero no para evitar que PK ejerciera su función eficazmente *in vitro* (Tesis Paula L. Monteagudo 2015). Disponiendo de este virus en el laboratorio, nos propusimos analizar si esta diferencia de expresión podría ser de utilidad para reducir la virulencia residual observada *in vivo* con BA71 Δ CD2.

Para este experimento (Figura 4.25), 12 animales, 6 por grupo, se inocularon intramuscularmente con $3,3 \times 10^4$ o 10^6 UFP, respectivamente, con el virus inducible BA71 Δ CD2PKi, para 35 días más tarde, ser infectados con 10^3 CGE de la cepa virulenta Georgia2007/1. Adicionalmente, 3 animales se inocularon con PBS, como control de infección.

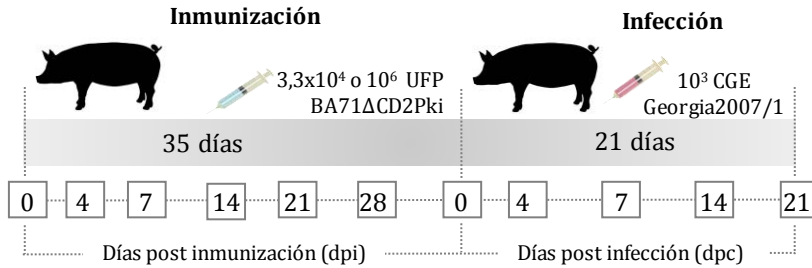


Figura 4.25 Esquema sobre el diseño experimental *in vivo* de los animales inmunizados con BA71ΔCD2PKi. Los números enmarcados indican los días de recogida de muestras post inmunización (dpi) y post infección (dpc).

Inesperadamente, solamente el 33,3% (2/6) y el 16% (1/6) de los animales inmunizados con $3,3 \times 10^4$ y 10^6 UFP de BA71ΔCD2PKi, respectivamente, fueron capaces de resistir la infección letal con Georgia2007/1 (Figura 4.26). Muy por debajo del 100% de protección conferido por el virus parental BA71ΔCD2.

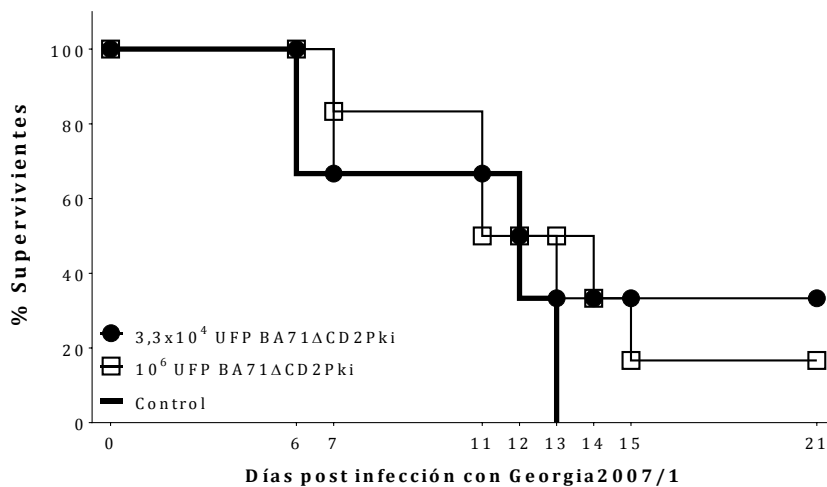


Figura 4.26 Porcentaje de animales supervivientes tras la infección letal con Georgia2007/1. Se representan los porcentajes de supervivencia de los animales inmunizados previamente con BA71ΔCD2PKi, así como de los animales del grupo de control.

La ausencia de fiebre y carga viral en suero observada tras la inmunización (Figura 4.27), correlaciona con la deficiente respuesta humoral (Figura 4.29) y celular

Resultados

(Figura 4.30) observada en los animales vacunados con BA71 Δ CD2PKi. Con excepción del animal 135, donde se ven retrasada y disminuida, respectivamente, comparado con lo descrito para BA71 Δ CD2.

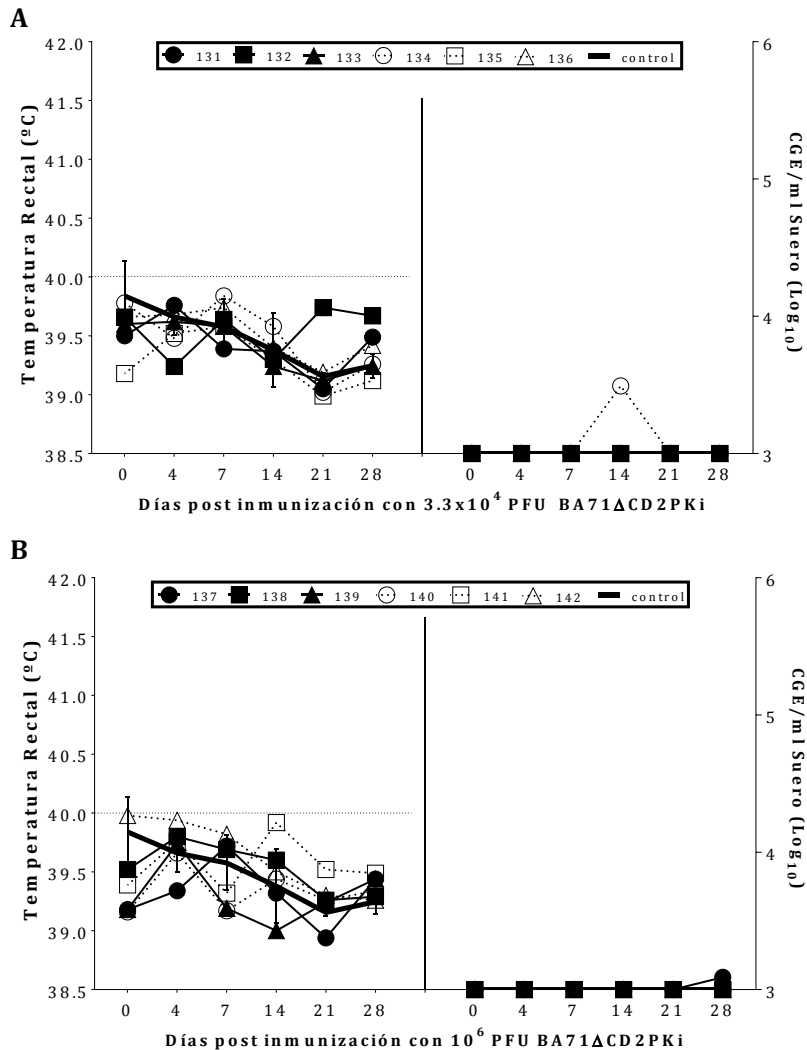


Figura 4.27 Evolución de la temperatura rectal y carga viral detectada en suero, tras la inmunización con BA71 Δ CD2PKi. Los animales control se representan con ambos grupos como media de los valores obtenidos, con sus correspondientes desviaciones estándar.

En claro contraste con lo descrito utilizando virus vivos atenuados, cabe destacar que incluso los animales supervivientes tras la infección letal con Georgia2007/1, sufrieron síntomas severos de PPA, incluyendo fiebre y carga viral elevada (Figura

4.28), indistinguible de la observada tanto en los animales del grupo inmunizado con BA71ΔCD2PKi, que sucumbieron a la infección, como del grupo control.

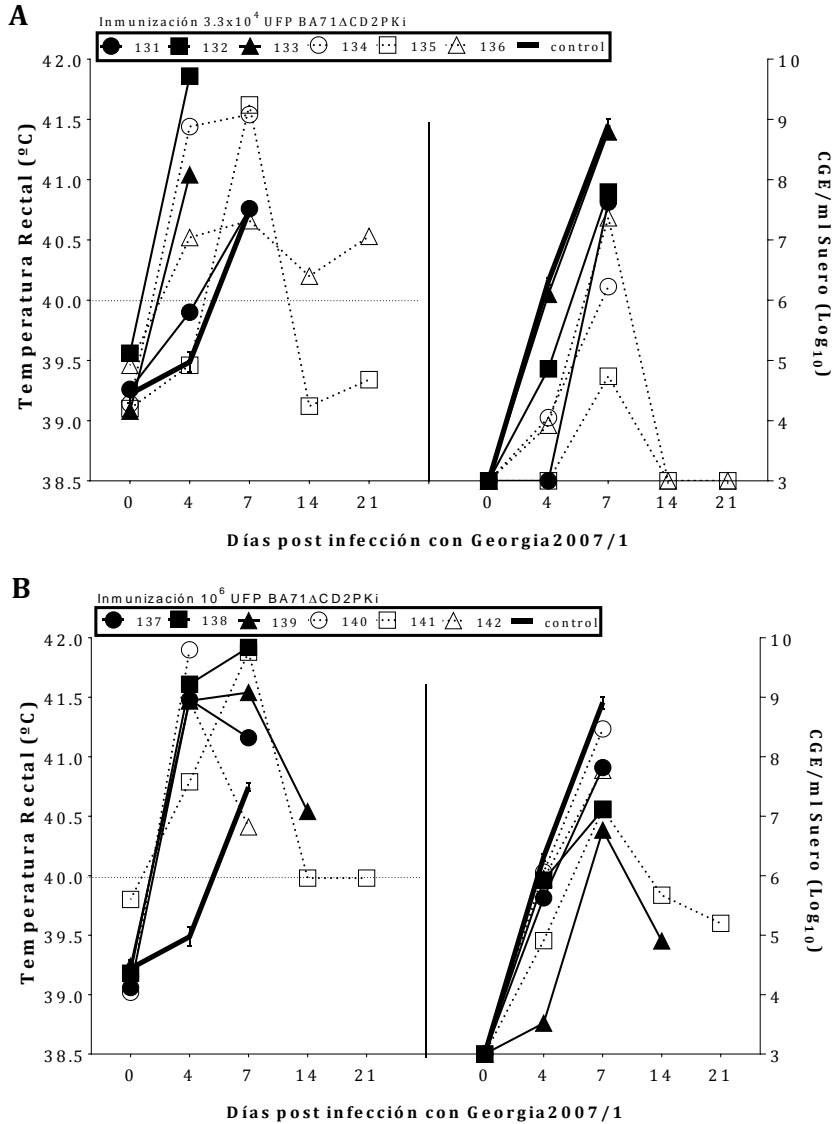


Figura 4.28 Evolución de la temperatura rectal y carga viral detectada, tras la infección letal con Georgia2007/1. Se representan los animales inmunizados con $3,3 \times 10^4$ UFP de (A) o 10^6 UFP (B) de BA71ΔCD2PKi. Los animales control se representan con ambos grupos como media de los valores obtenidos, con sus correspondientes desviaciones estándar.

Resultados

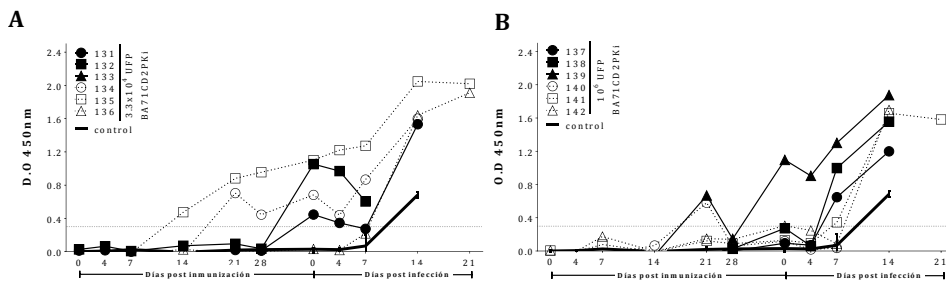


Figura 4.29 Detección de anticuerpos en suero, tras la inmunización con $3,3 \times 10^4$ (A) y con 10^6 (B) UFP de BA71ΔCD2PKi y después del desafío con Georgia2007/1. La media de los resultados correspondientes a los animales control y la desviación estándar correspondiente se representa en cada panel.

Con contadas excepciones, la respuesta celular observada en general fue muy baja (Figura 4.30). De los dos animales que habían respondido significativamente, tanto en lo que se refiere a anticuerpos, como a células T-específicas detectables antes de la infección con Georgia 2007/1 (animales 135 y 139): uno fue capaz de sobrevivir (135), mientras que el otro sucumbió a la infección (139), ratificando la falta de correlación de estos parámetros con protección. Del mismo modo, el otro animal superviviente, número 136, lo hizo en ausencia de anticuerpos antes del desafío y con niveles muy bajos de células T.

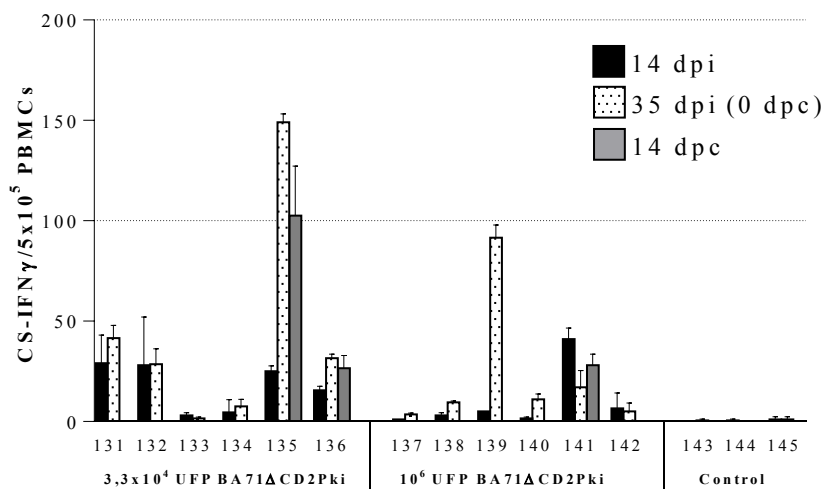


Figura 4.30 Recuento de células secretoras de IFN γ específicas frente al VPPA detectadas por ELISPOT post inmunización (dpi) y post infección (dpc) con Georgia2007/1. Para cada grupo, se representan la media de los valores obtenidos y su desviación estándar correspondiente. El límite máximo de conteo de spots se fijó en 300.

Los resultados aquí obtenidos confirman una vez más el frágil equilibrio entre atenuación e inactivación, y entre fracaso y éxito en protección.

La utilización de un virus inducible, BA71 Δ CD2PKi, que *in vitro* parece comportarse como BA71 Δ CD2, demuestra comportarse *in vivo* de una manera totalmente deficiente, pasando a perder su potencial protector casi totalmente.

4.3 Explorando diferentes rutas de inoculación para la vacunación con BA71 Δ CD2 y para la infección con el VPPA.

En una última tentativa de conseguir reducir la virulencia residual de BA71 Δ CD2, decidimos explorar la inoculación intranasal como vía alternativa de inoculación de BA71 Δ CD2, una estrategia recientemente utilizada con éxito con otro virus atenuado de PPA, (Leitão *et al.*, 2001; Sanchez-Cordon *et al.*, 2017) demostrando menos efectos secundarios que tras su inoculación intramuscular.

4.3.1 La inoculación intranasal de BA71 Δ CD2 resulta más segura que la intramuscular para el animal vacunado, pero provoca la acumulación del virus vacunal en fosas nasales.

Con el objetivo de estudiar el grado de seguridad que la inoculación intranasal de BA71 Δ CD2 demostraba, se diseñó un procedimiento experimental (Figura 4.31) de la siguiente manera: Tres grupos con 5 animales cada uno, fueron inoculados

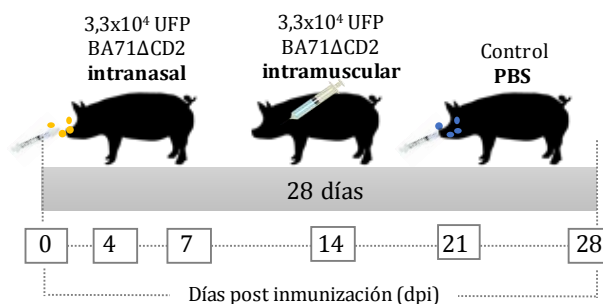


Figura 4.31. Esquema sobre el diseño experimental *in vivo* con BA71 Δ CD2 administrado de forma intranasal o intramuscular. Los números enmarcados corresponden a los días de toma de muestras tras la inmunización (dpi).

Resultados

utilizando $3,3 \times 10^4$ UFP, bien inoculados intramuscularmente o intranasalmente, mientras que el tercer grupo se inoculaba con PBS de forma intranasal, como control. Haciendo buena la hipótesis de partida, la vía de inmunización intranasal parecía ser más segura que la intramuscular, mostrando animales completamente libres tanto de fiebre, como de virus detectable en suero (Figura 4.32A). En claro contraste y como ya había sido descrito recurrentemente en el laboratorio, tras la inmunización intramuscular (Figura 4.32B), una proporción de los individuos mostró picos de fiebre y/o carga viral en suero, pero apenas un logaritmo por encima del límite de detección.

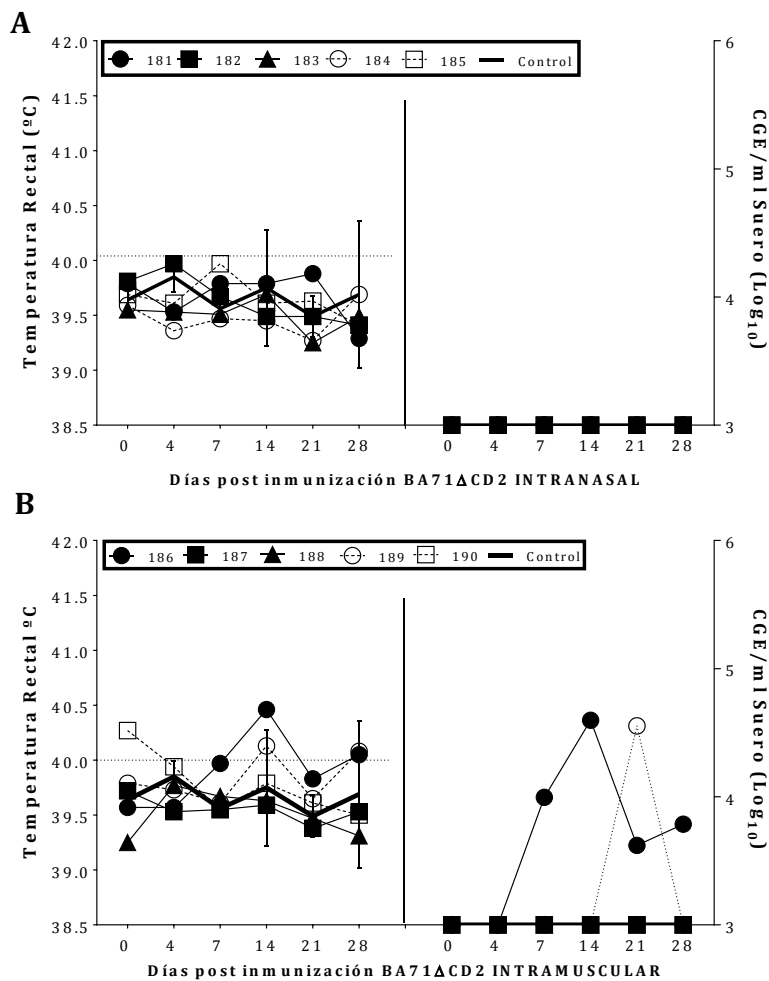


Figura 4.32 Evolución de la temperatura y carga viral en suero, tras la inmunización con BA71ΔCD2 de forma intranasal (gráfica A) o de forma intramuscular (gráfica B). El grupo control se representa en ambas gráficas como media de los valores obtenidos con sus correspondientes desviaciones estándar.

Pese a los buenos resultados obtenidos, teniendo en cuenta que era la primera vez en la que realmente conseguimos reducir la carga viral residual detectable a cero (al menos con esta dosis de virus), la titulación del virus en hisopos nasales (Figura 4.33) nos hizo caer en la cuenta de que, tras la inoculación intranasal, BA71ΔCD2 se acantonaba en las fosas nasales. Consecuentemente, se encontraron títulos virales muy elevados, que alcanzaban hasta 10^8 copias genómicas en uno de los animales; títulos jamás observados tras la inoculación intramuscular, y que se encuentran en este experimento 3-5 logaritmos por debajo, para a continuación ir disminuyendo, hasta resultar casi indetectables a día 28 post inmunización.

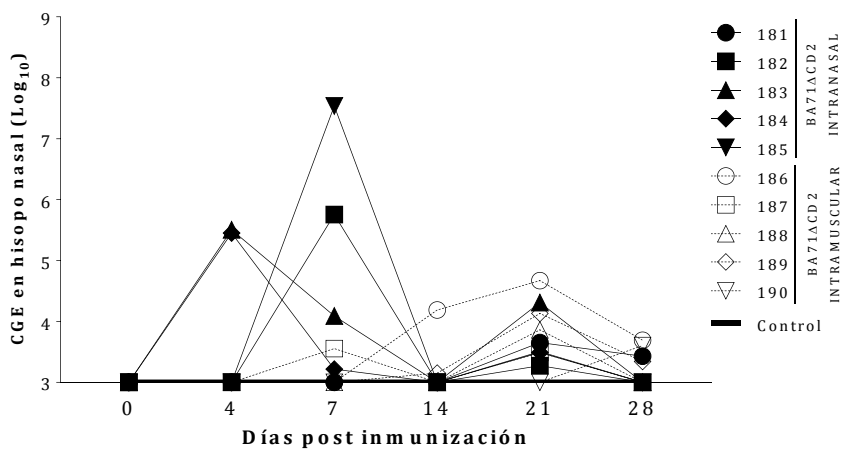


Figura 4.33 Cuantificación del título viral detectado en hisopo nasal tras la inmunización con BA71ΔCD2. El grupo control se representa como media de los valores obtenidos con su correspondiente desviación estándar.

Independientemente de las razones que explican este hecho, la mejora en seguridad observada para los animales vacunados intranasalmente, queda contrarrestada por episodios de secreción elevada de virus vacunal que, a pesar de ser atenuado, ha de demostrar su inocuidad en experimentos de transmisión que habrán de ser realizados en el futuro. En la última sección de esta Tesis se plantean algunas hipótesis que podrían ayudar a entender el comportamiento de BA71ΔCD2 tras la inoculación intranasal, discutiendo además las posibles consecuencias de su hipotética utilización en el campo.

Resultados

4.3.2 BA71 Δ CD2 protege frente a la inoculación intranasal con una dosis letal de Georgia2007/1.

Cualquier estrategia de vacunación que pretenda ser utilizada en el campo, ha de ser capaz de bloquear al VPPA en el sitio de entrada del virus: las mucosas oro-nasales. Así pues, nos propusimos evaluar la capacidad protectora de BA71 Δ CD2 frente a la infección con una dosis letal del Georgia2007/1 inoculado intranasalmente.

Con esa idea en mente, a los 28 post inmunización, todos los animales (15) de los grupos descritos con anterioridad, fueron desafiados con una dosis letal de 10^5 CGE del virus virulento Georgia2007/1 de forma intranasal (dosis mínima infecciosa letal para este virus y ruta).

Independientemente de la ruta de administración de la vacuna, todos los animales vacunados con BA71 Δ CD2 sobrevivieron a la infección intranasal con el virus virulento Georgia2007/1, independientemente de la ruta utilizada. Como cabía esperar, todos los animales control murieron antes de los 11 días post infección (Figura 4.34).

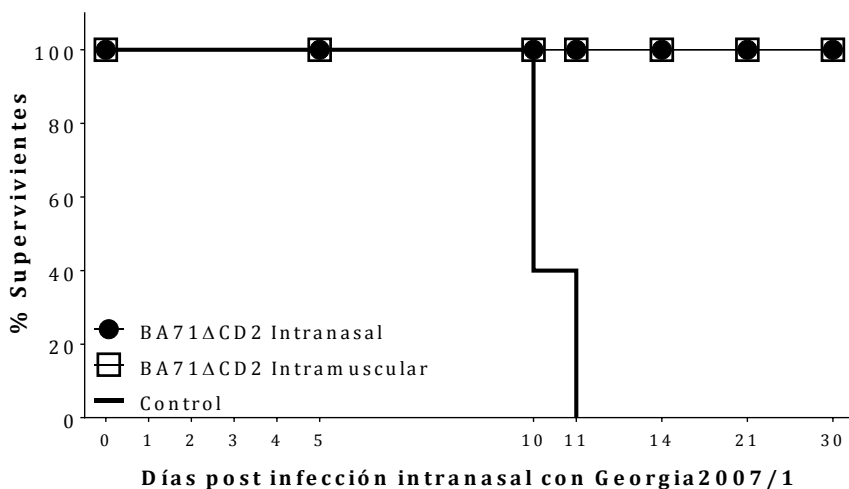


Figura 4.34 Porcentaje de animales supervivientes tras la infección letal con Georgia2007/1 de forma intranasal. También se representa al grupo control como control de infección.

Lo más destacable a reseñar, es el hecho de que tras la infección con Georgia2007/1, prácticamente ninguno de los animales vacunados con BA71 Δ CD2 presentara síntomas compatibles con una infección por PPA aguda a lo largo del tiempo, con la excepción quizás de un pequeño pico muy temprano de fiebre y carga viral en suero en el animal 184, o un ligero remonte de la temperatura y de la carga viral, al final del estudio para el animal 185 (Figura 4.35A), ambos del grupo inmunizado intranasalmente.

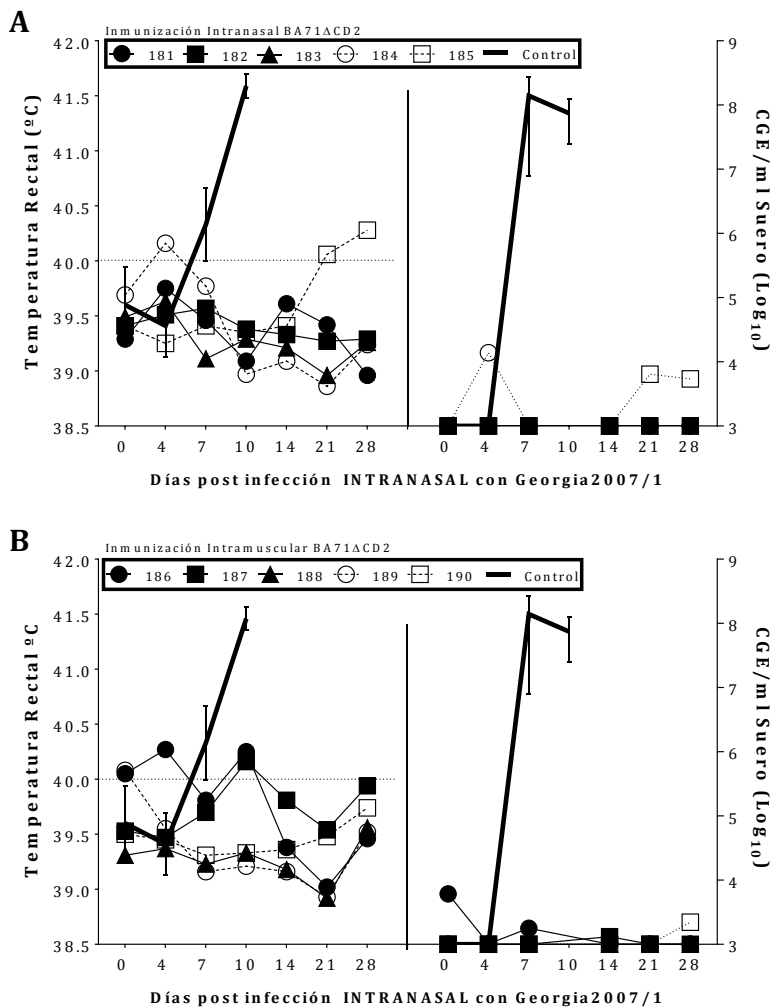


Figura 4.35 Evolución de la temperatura y carga viral en suero post infección con Georgia2007/1. En el panel A se representan al grupo inmunizado previamente de forma intranasal y en el panel B al grupo inmunizado intramuscularmente. El grupo control se representa en ambas gráficas como media de los valores obtenidos con sus correspondientes desviaciones estándar.

Resultados

Algo similar a lo observado dentro del grupo inoculado intramuscularmente, con una fase temprana de fiebre y carga viral reducida en el animal 186, o un ligero remonte de la temperatura y virus detectable en suero al final del estudio para los animales 187 y 190 (Figura 4.35B). En claro contraste los animales del grupo control, sucumbieron a la enfermedad tras sufrir fiebre elevada y cargas virales muy elevadas en suero, correspondiéndose a una clínica aguda de PPA, confirmada post-mortem.

Finalmente, y en lo que se refiere a excreción nasal de virus, sorprende comprobar el marcado control del virus en el sitio de entrada, por parte de los animales inmunizados tanto intranasal como muscularmente, mostrando picos muy bajos de virus en hisopos nasales que desaparecen muy rápido, estando casi siempre 5 logaritmos por debajo de los encontrados en los animales control (Figura 4.36). Como única excepción cabe destacar el animal 186 inmunizado intramuscularmente, con cargas en hisopos nasales más elevadas, pero siempre muy por debajo de los controles, coincidiendo como máximo excretor del grupo antes del desafío (Figura 4.32B).

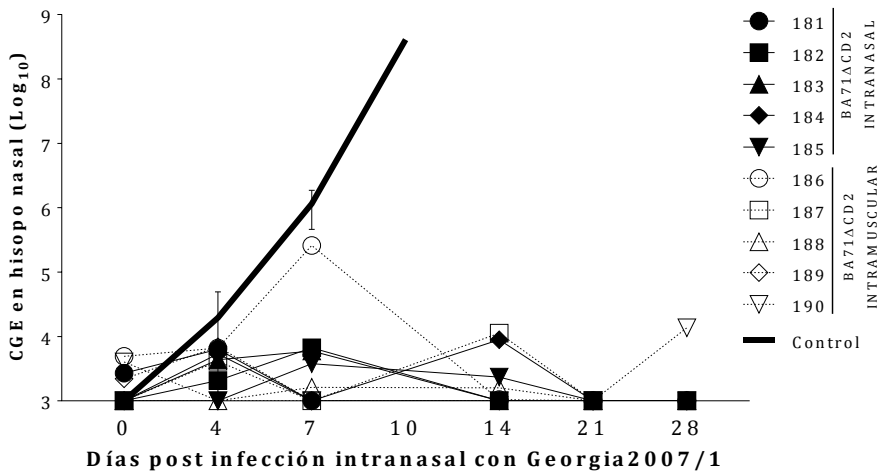


Figura 4.36. Cuantificación del título viral detectado en hisopo nasal tras la infección intranasal con Georgia2007/1. El grupo control se representa como media de los valores obtenidos con su correspondiente desviación estándar.

Ambas rutas de inoculación con BA71 Δ CD2, indujeron una respuesta, tanto de anticuerpos específicos, como de células T-específicas, detectables en sangre, antes de la infección con Georgia2007/1 (Figura 4.37), no pudiendo observar, de nuevo, una clara correlación entre la ausencia de una u otra con la protección conferida. Los animales control, tal y como cabría de esperar, no tienen tiempo de generar una respuesta específica detectable.

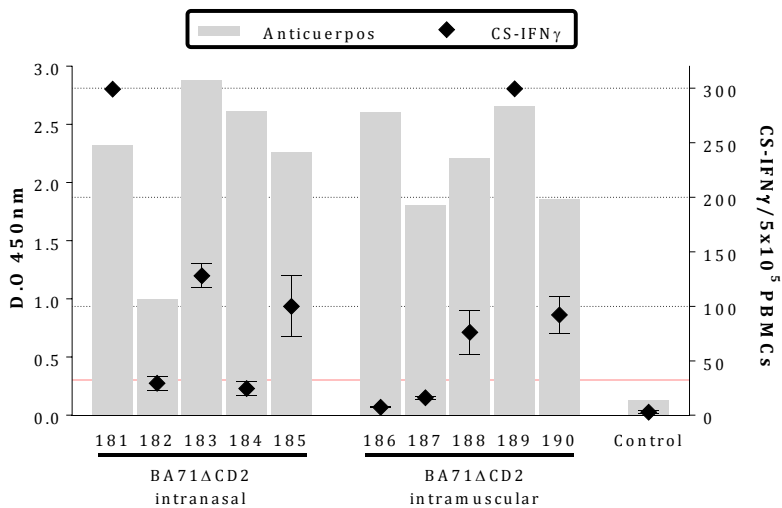


Figura 4.37 Detección de anticuerpos específicos frente al VPPA y recuento de células T-secretores productoras de IFN γ frente a BA71, 28 días post inmunización. El grupo control se representa como el recuento medio de los datos obtenidos con su correspondiente desviación estándar. El límite máximo de recuento de spots se fijó en 300.

Remarcar que, el grado de protección conferido por la vacuna frente a la infección intranasal, mejora significativamente los resultados de protección obtenidos tras la infección intramuscular, quizás reflejando las diferencias existentes durante la infección con Georgia2007/1 entre ambas rutas, asunto que se discutirá oportunamente al final de esta tesis.

Resultados

4.3.3 BA71ΔCD2 confiere protección frente a la infección por contacto con Georgia2007/1 y frente a la infección con garrapatas naturalmente portadoras de un VPPA perteneciente al genotipo XIX.

Teniendo en cuenta que el VPPA sólo se transmite por contacto directo, decidimos llevar a cabo dos experimentos paralelos, aunque preliminares, intentando caracterizar el potencial protector de BA71ΔCD2 frente a dos modelos de infección experimental que intentan mimetizar dos de las situaciones que más se dan en el campo: Una infección por contacto directo con animales infectados con VPPA (experimento 1) y una infección a través de la picadura de garrapatas infectadas con VPPA (experimento 2).

Para el experimento de contacto (**experimento 1**, Figura 4.38A), 10 animales fueron separados en 2 grupos, mientras que un grupo de 5 cerdos fue inoculado intranasalmente con $3,3 \times 10^4$ UFP de BA71ΔCD2, otro grupo de 5 cerdos se dejó sin inmunizar. Veintiocho días tras la inmunización, los animales se pusieron en contacto con un tercer grupo de 5 animales infectados intramuscularmente con 10^3 CGE con Georgia2007/1 (infección por contacto). Este es el típico escenario de ciclo doméstico o europeo.

Para el segundo experimento (**experimento 2**, Figura 4.38B), un grupo de 6 animales fue inoculado intramuscularmente con 10^6 UFP de BA71ΔCD2, mientras que un segundo grupo de 3 animales se dejó sin inmunizar. Veinte días más tarde, todos los animales fueron infectados con garrapatas blandas naturalmente infectadas con la cepa RSA de VPPA perteneciente al genotipo XIX. Este último experimento nos permitió poner en contacto nuestro prototipo vacunal con un genotipo diferente, mimetizando uno de los escenarios, más típicos y a la vez complejos de transmisión frente a la PPA.

Este experimento pudo ser realizado gracias a la financiación de GALV-Med y a la colaboración con la Dra. Van Heerden del ARC-OVR (Consejo de investigación Agrícola, Sudáfrica).

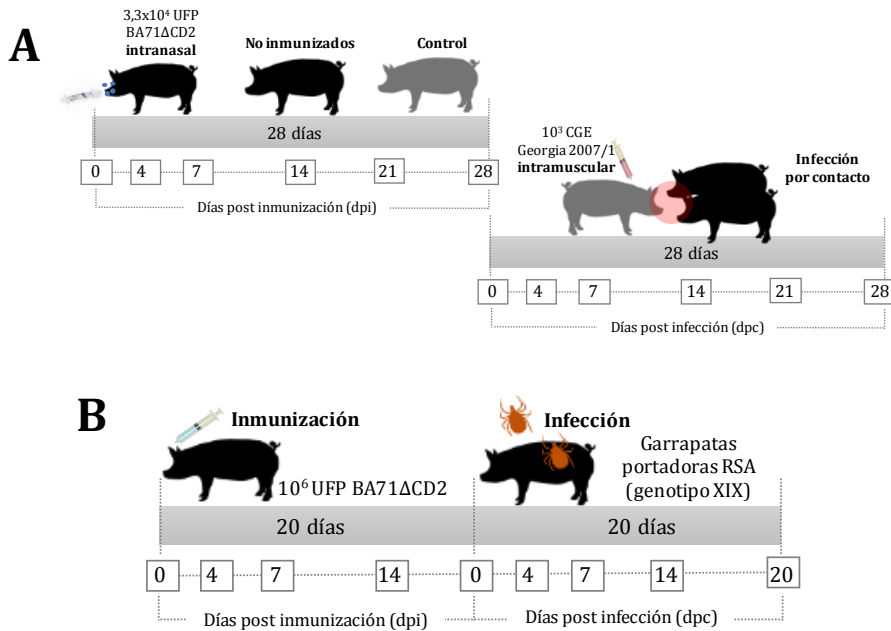


Figura 4.38 Esquema sobre el diseño experimental *in vivo* con BA71ΔCD2. Los animales son infectados tras la inmunización, por contacto directo con animales infectados (**A**) o por garrapatas portadoras (**B**). Los números enmarcados corresponden a los días de toma de muestras tras la inmunización (dpi) o tras la infección (dpc).

Tras la inmunización con BA71ΔCD2 se evidencia un más que significativo grado de protección frente a la infección letal con el VPPA, e independientemente de la ruta, dosis o virus empleado (Tabla 4.1). Así, mientras que todos los cerdos control sucumbieron a la infección, 4/5 (80%) y 5/6 (83,33%) de los cerdos inmunizados con BA71ΔCD2, resistieron a la infección por contacto con Georgia2007/1 (genotipo II) y a la picadura de garrapatas infectadas con el virus RSA (genotipo XIX), respectivamente.

Resultados

Tabla 4.1 Breve esquema experimental y porcentajes de supervivencia de los animales inmunizados con BA71ΔCD2, tras la infección por contacto directo con animales infectados con Georgia2007/1 (experimento 1) o tras la exposición a garrapatas infectadas con el VPPA RSA (experimento 2).

Grupo	Inmunización		Infección		Supervivencia
	Dosis/virus	Ruta	Dosis/virus	Ruta	
1 (n=5)	3,3x10 ⁴ UFP BA71ΔCD2	IN	Georgia2007/1	C.D	80 % (4/5)
2 (n=5)	-		Georgia2007/1	C.D	0%
3 (n=5)	Control		10 ³ CGE Georgia2007/1	IM	0%
4 (n=6)	10 ⁶ UFP BA71ΔCD2	IM	RSA XIX	Garrapata	83,3% (5/6)
5 (n=3)	Control		RSA XIX	Garrapata	0%

IN, intranasal; IM, intramuscular; C.D, contacto directo

Para acabar, varias son las conclusiones que podemos extraer de este apartado y que intentaremos resumir a continuación. Por un lado, la inmunización intranasal con BA71ΔCD2 parece ofrecer ventajas en cuanto a la seguridad para el animal vacunado, no observándose fiebre, ni carga viral en ningún momento tras la inoculación, ofreciendo sin embargo una enorme protección, incluso a dosis más bajas de las empleadas para la dosis intramuscular. Sin embargo, la replicación masiva local, en las fosas nasales de los individuos vacunados, aumenta el riesgo de transmisión a animales no vacunados, al menos por un periodo breve de tiempo, riesgo que habría que cuantificar en el futuro. Por otro lado, nuestros experimentos parecen demostrar de forma fehaciente que BA71ΔCD2, independientemente de la ruta utilizada, no sólo protege frente al desafío intramuscular con Georgia2007/1, sino también frente a la infección intranasal o por contacto con este mismo virus. Finalmente, la utilización de garrapatas infectadas de forma natural con un virus del genotipo XIX, capturadas en madrigueras de facóqueros, permite ampliar no sólo la información sobre el rango de virus frente a los que BA71ΔCD2 es capaz de proteger, sino también frente a una ruta de infección extremadamente relevante en territorios africanos, que podrían verse favorecidos por la implementación de este prototipo vacunal.

4.4 Evaluando la capacidad cros-protectora de BA71ΔCD2 frente Ken06.Bus (genotipo IX), una cepa de VPPA filogenéticamente muy distante de BA71 (Genotipo I).

Estudios clásicos de inmunización con virus atenuados demostraban claramente que su protección se limitaba a la infección letal contra virus virulentos muy relacionados filogenéticamente (Detray, 1957; Malmquist, 1963). Esta realidad hace aún más relevante el hecho de que nuestro prototipo vacunal BA71ΔCD2, fuera capaz no sólo de proteger frente al virus virulento parental BA71, sino además contra E75, virus heterólogo del mismo genotipo (I) (Lacasta *et al.*, 2015), así como frente al virus Georgia2007/1 virus heterólogo de genotipo II (Monteagudo *et al.*, 2017).

Acabamos de describir, además que, la capacidad cros-protectora de BA71ΔCD2 se extendía, como mínimo, frente a la infección con garrapatas portadoras de una cepa de VPPA del genotipo XIX; ampliando así el conocimiento sobre el espectro de protección frente a otros genotipos del VPPA filogenéticamente más próximos.

Con el objetivo de ampliar estos resultados se realizaron dos experimentos complementarios de protección, utilizando el virus Ken06.Bus, perteneciente al genotipo IX, filogenéticamente muy distante del genotipo I, originalmente empleado para obtener nuestra vacuna.

4.4.1 BA71ΔCD2 protege con muy poca eficacia contra la cepa virulenta Ken06.Bus.

Dos grupos con seis cerdos cada uno, fueron inmunizados intramuscularmente con $3,3 \times 10^4$ o 10^6 UFP de BA71ΔCD2, respectivamente, dejando un grupo control de 3 cerdos inoculados con PBS. 35 días tras la inoculación (dpi), todos los animales fueron infectados intramuscularmente con una dosis letal a 10^2 UHA del virus virulento Ken06.Bus (Figura 4.39).

Resultados

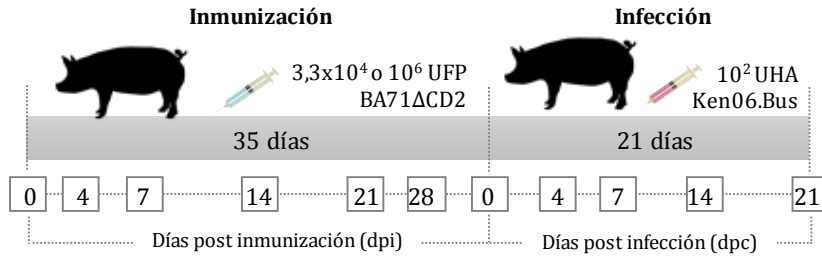


Figura 4.39 Esquema sobre el diseño experimental *in vivo* inmunizando con BA71ΔCD2, e infectando posteriormente con el virus virulento Ken06.Bus. Los números enmarcados corresponden a los días de toma de muestras tras la inmunización (dpi) o tras la infección (dpc).

En contraste con la sólida protección conferida por frente a los virus del genotipo I, II y XIX, la protección de BA71ΔCD2, contra Ken06.Bus, se vio reducida drásticamente (Figura 4.40) sobreviviendo, únicamente, el 16,6% (1/6) y el 33,3% (2/6) de los animales vacunados con $3,3 \times 10^4$ o 10^6 UFP de BA71ΔCD2, respectivamente.

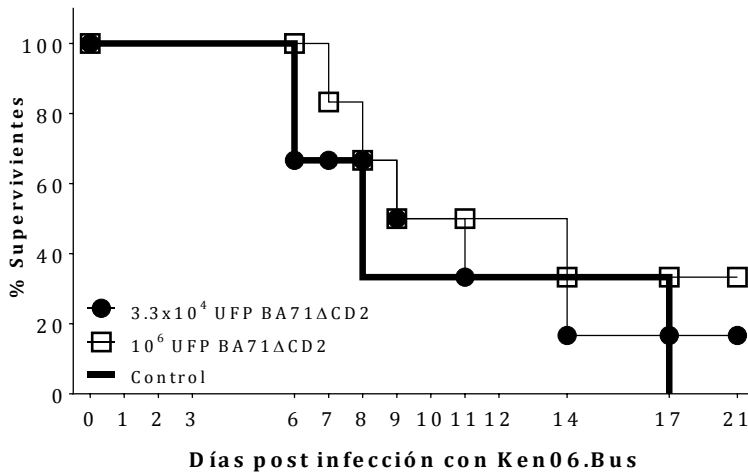


Figura 4.40 Porcentaje de animales supervivientes, inmunizados con diferentes dosis de BA71ΔCD2, tras la infección letal con Ken06.Bus. También se representa al grupo control como control de infección.

Independientemente de la dosis de vacuna empleada, los animales que sucumbieron a la infección con Ken06.Bus, sufrieron síntomas clínicos, temperaturas y cargas virales (Figura 4.41), prácticamente indistinguibles a las de los animales control. En claro contraste, los tres animales supervivientes gracias a la vacunación con

BA71 Δ CD2, fueron capaces de controlar totalmente al virus Ken06.Bus, no mostrando signo clínico alguno, incluyendo fiebre y carga viral, con títulos, mucho más bajos que los animales control tras la infección.

La proporción de animales que muestran pequeños picos de fiebre y virulencia residual tras la inoculación con BA71 Δ CD2 y antes de la infección con Ken06.Bus, están en consonancia con los experimentos realizados anteriormente, destacando por inusual la prolongada presencia de fiebre y virus en suero, observada para el animal 117 (del grupo 3,3x10⁴ UFP) que, con la excepción de su coincidencia con virus en suero, no mostró ninguna otra sintomatología compatible con PPA, resultando éste, ser uno de los animales que sobreviven a la infección letal con Ken06.Bus.

Resultados

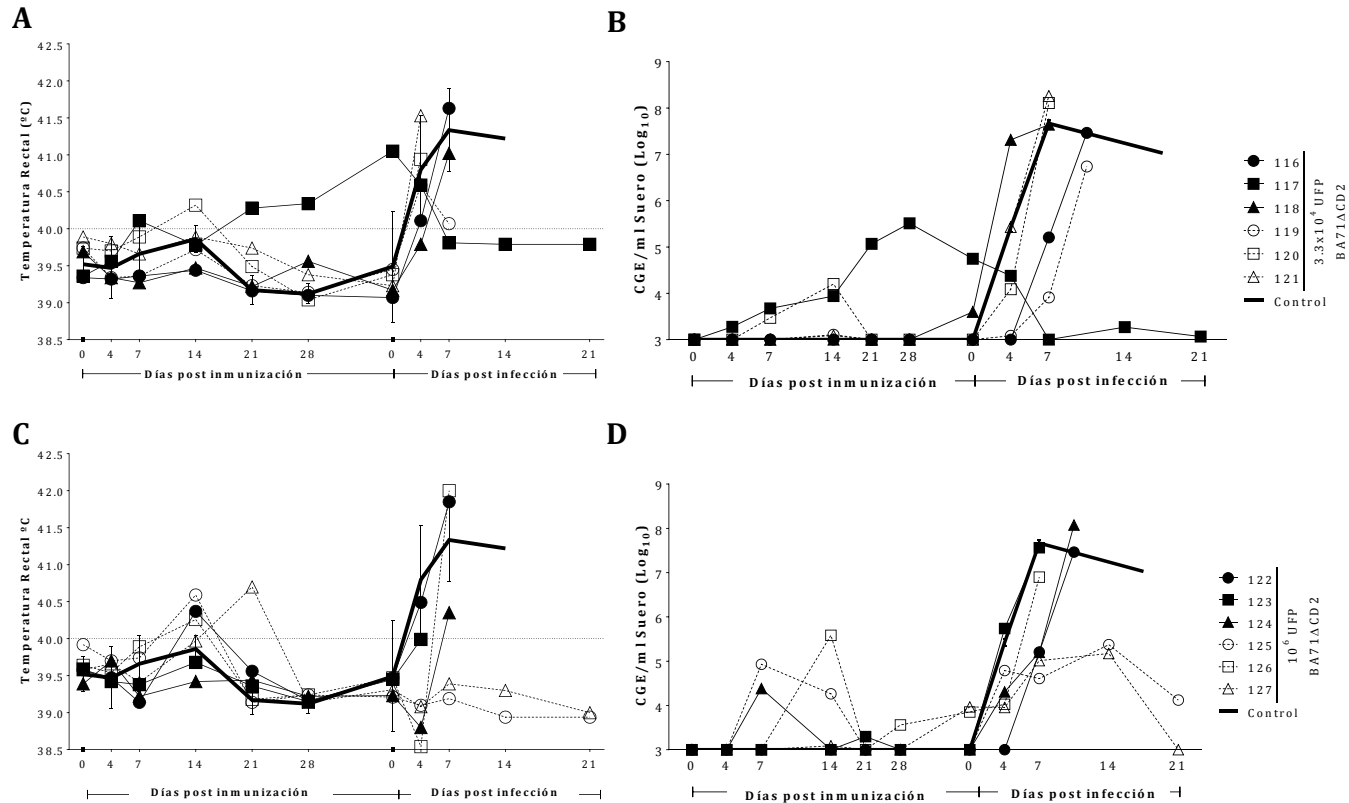


Figura 4.41 Evolución de la temperatura rectal y cargas virales, detectadas en sueros, de los animales inmunizados con 3.3×10^4 UFP de BA71ΔCD2 (gráficas A y B) y de los animales inmunizados con 10^6 UFP de BA71ΔCD2 (gráficas C y D) y tras la infección letal con Ken06.Bus. Los controles se representan en todas las gráficas, como media de los valores obtenidos, de temperatura o carga viral, con sus correspondientes desviaciones estándar.

En el momento de la infección (35 dpi) con Ken06.Bus, todos los animales vacunados con BA71 Δ CD2 presentaron títulos muy elevados de anticuerpos y de células T específicas frente al virus (Figura 4.42), con excepción del animal 117, con contajes de células T específicas en sangre muy bajas, probablemente debido a la presencia, ya comentada anteriormente, del virus vacunal, BA71 Δ CD2, en sangre, de nuevo sin correlacionar con protección.

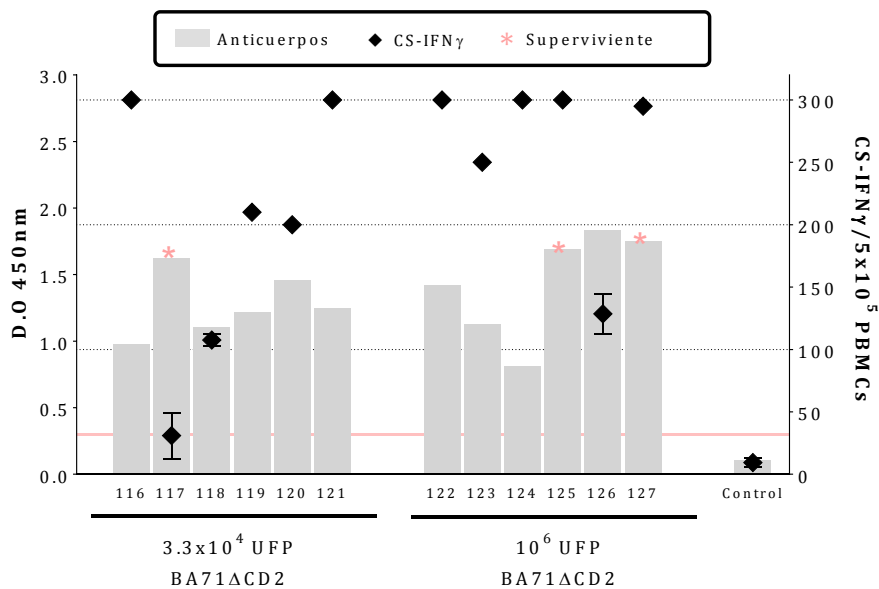


Figura 4.42 Detección de anticuerpos específicos frente al VPPA y recuento de células T-secretores productoras de IFN γ a 35 días post inmunización (día de infección con Ken06.Bus). El grupo control se representa como el recuento medio de spots con su correspondiente desviación estándar. La línea rosa representa el límite a partir del cual, los anticuerpos detectados presentan valor positivo significativo.

4.4.2 Los animales vacunados con BA71 Δ CD2 que sobreviven a la infección con su homólogo virulento, BA71, son capaces de resistir la infección contra la cepa virulenta Ken06.Bus.

A pesar de que las propiedades protectoras de BA71 Δ CD2 no son ilimitadas, hoy en día, no se ha descrito otro prototipo vacunal capaz de proteger totalmente frente a virus de al menos 3 genotipos distintos (I, II y XIX), y parcialmente frente a virus de

Resultados

genotipos muy distantes filogenéticamente hablando. Esta capacidad, permite hipotetizar con la posibilidad de utilizar nuestro prototipo vacunal en zonas donde hay más de un virus circulando, en ocasiones de más de un genotipo, como ocurre en África. Con el objetivo de mimetizar en el laboratorio, una posible situación en un escenario tan complejo como el de una zona con múltiples entradas y reentradas de virus distintos, se realizó el siguiente experimento (Figura 4.43).

Ocho animales se inmunizaron intramuscularmente con una dosis de $3,3 \times 10^4$ UFP de BA71 Δ CD2, para a continuación, 21 días tras la inmunización, separarlos en dos grupos, independientes, de 4 animales cada uno. Uno de los grupos, recibió una dosis recuerdo de $3,3 \times 10^4$ UFP de BA71 Δ CD2 (grupo BA71 Δ CD2-boost), mientras que el segundo grupo de animales se infectó con 10^3 UHA del virus BA71 homólogo virulento (grupo BA71 Δ CD2/BA71). Finalmente, a los 21 días tras la segunda inoculación, todos los animales, incluyendo un grupo control de cuatro animales inoculados con PBS previamente, y no infectados con el homólogo virulento, se infectaron con una dosis letal de 10^2 UHA del virus virulento Ken06.Bus.

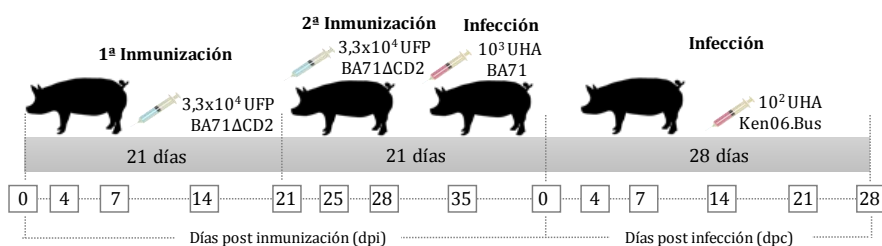


Figura 4.43 Esquema del experimento *in vivo*. 2 grupos de animales, primados con BA71 Δ CD2, fueron inoculados con una dosis recuerdo de BA71 Δ CD2 o con BA71 virulento, para posteriormente ser infectados por una dosis letal de Ken06.Bus.

A pesar de haber recibido dos dosis vacunales de $3,3 \times 10^4$ UFP de BA71 Δ CD2, solamente el 50% de los animales (2 de 4) inmunizados sobrevivieron a la infección con Ken06.Bus (Figura 4.44), a pesar de que todos presentaron siempre fiebre y cargas virales más bajas que los animales del grupo control (Figura 4.45C y D).

En claro contraste con estos resultados, todos los animales inmunizados con BA71 Δ CD2 y recuperados de la infección con BA71, sobrevivieron a la infección con Ken06.Bus (Figura 4.44). Tal y como cabía esperar, los animales control murieron en las primeras dos semanas tras la infección con Ken06.Bus.

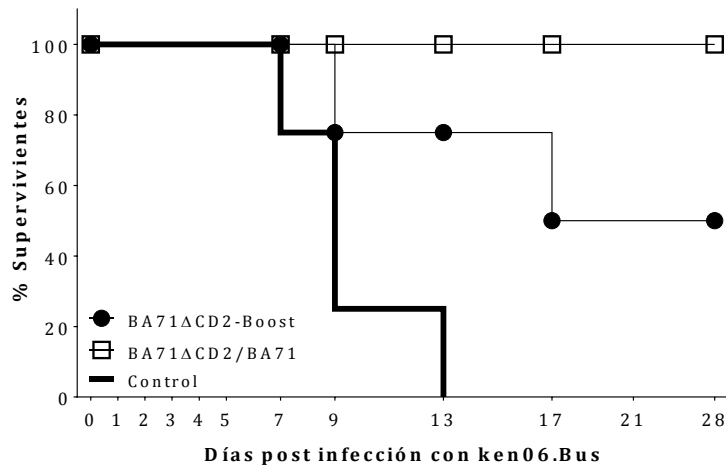


Figura 4.44 Porcentaje de animales supervivientes tras la infección letal con Ken06.Bus. Se representan los resultados obtenidos de animales inmunizados previamente, con dos dosis de $3,3 \times 10^4$ UFP de BA71 Δ CD2, los inmunizados con BA71 Δ CD2 e infectados con BA71 y los controles de infección inoculados con PBS.

Más destacable aún resulta el hecho de que ninguno de los animales de este grupo, sufriera signo clínico de PPA tras la infección con Ken06.Bus, ni se pudiera identificar hallazgo alguno post-mortem macro o microscópico compatible con PPA. A modo de ejemplo, ninguno de los animales supervivientes del grupo inmunizado e infectado con BA71, mostró fiebre tras la infección con Ken06.Bus (Figura 4.45A), y los títulos de virus encontrados en suero (Figura 4.45B) fueron muy bajos y reducidos en el tiempo en comparación con los de los animales control.

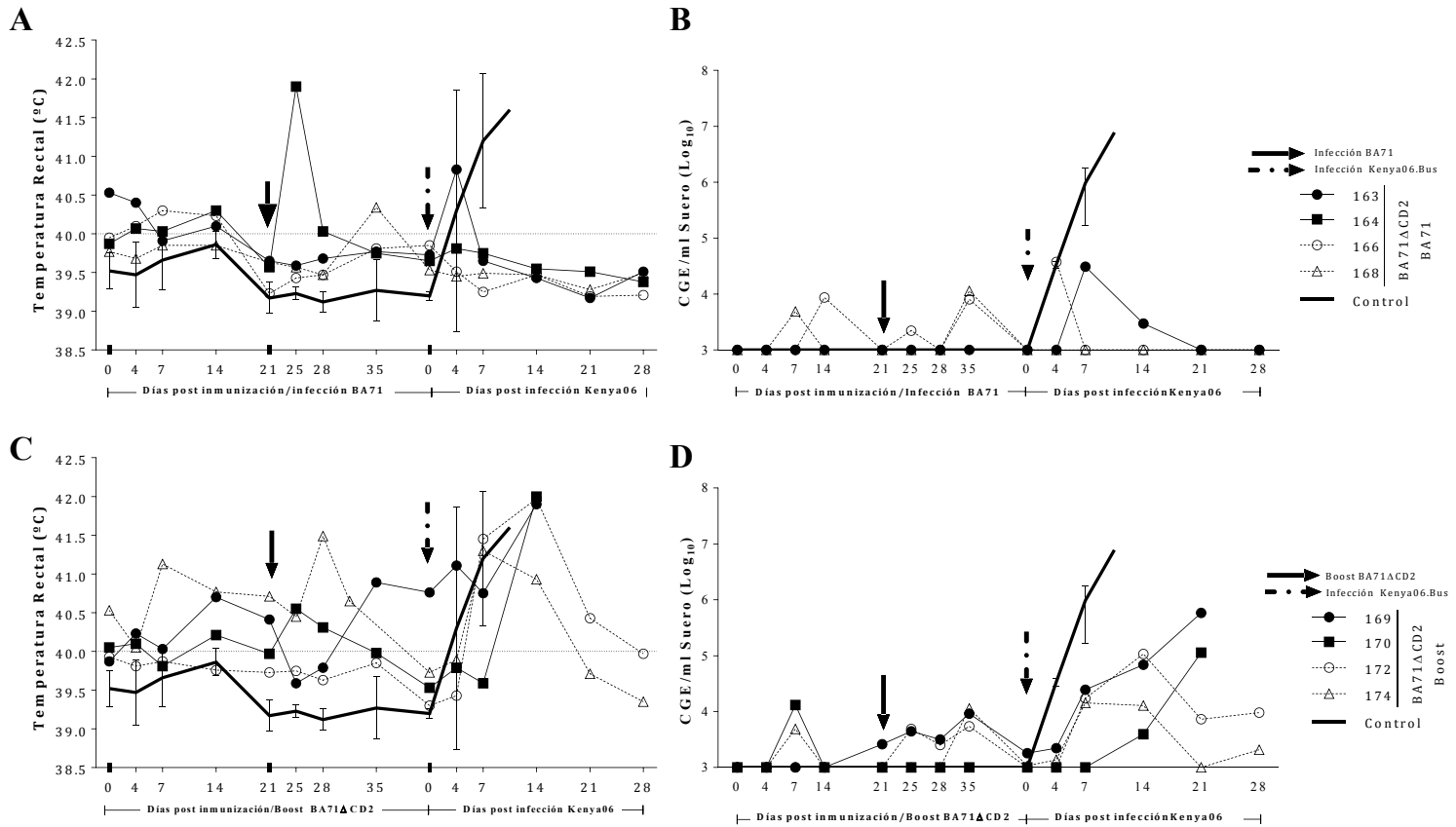


Figura 4.45 Evolución de la temperatura rectal y cargas virales, detectadas en sueros, de los animales inmunizados con BA71ΔCD2 e infectados con BA71 (gráficas A y B) y de los animales inmunizados con dos veces con BA71ΔCD2 (gráficas C y D), y tras la infección letal con Ken06.Bus. Los controles se representan en todas las gráficas, como media de temperatura o carga viral con sus correspondientes desviaciones estándar.

Al analizar la respuesta humoral y celular detectada en los animales, previa a la infección con Ken06.Bus (Figura 4.46), no se pudieron constatar diferencias significativas entre ambos grupos de animales, independientemente del virus utilizado en la segunda dosis de inoculación: BA71 Δ CD2 y / o BA71. Así los títulos de anticuerpos por ELISA y el número de spots específicos detectados por ELISPOT, previos a la infección letal, fueron muy similares, independientemente de la utilización de BA71 o Ken06.Bus como estímulo.

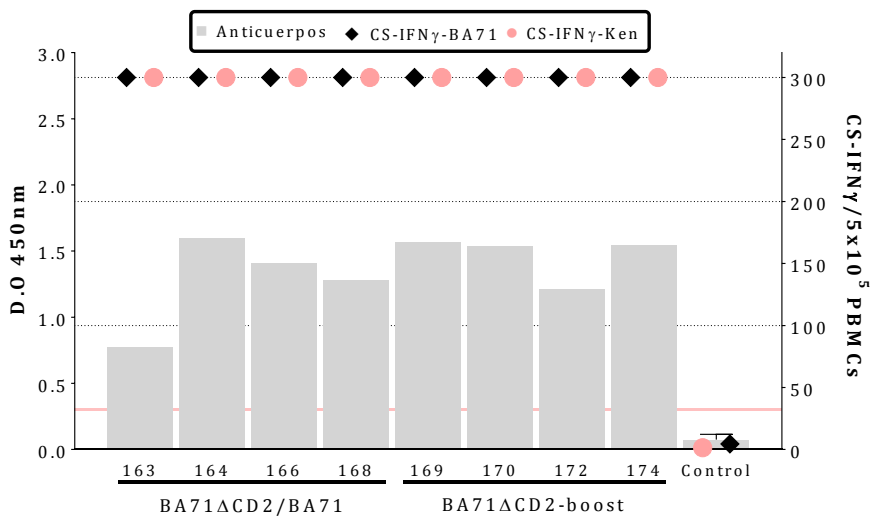


Figura 4.46 Detección de anticuerpos específicos frente al VPPA y recuento de células T-secretoras productoras de IFN γ tras la estimulación *in vitro* con BA71 o Ken06.Bus, 42 días tras la primera -inmunización (día de infección con Ken06.Bus). La línea rosa marca el límite de detección detectados para los anticuerpos, a partir del cual los valores adquieren valor significativo como positivo.

En conclusión, la vacunación con BA71 Δ CD2 en una zona endémica no sólo podría tener beneficios directos en el caso de que el animal se encontrara con un virus virulento frente al que resulte eficaz directamente (genotipos I, II, XIX...), sino que, como resultado de ese encuentro, el animal quedaría protegido indirectamente frente a cepas de VPPA muy distintas desde el punto de vista filogenético.

4.5 La hemaglutinitina viral. Una proteína con capacidad DIVA

Antes de comenzar esta tesis se había planteado como objetivo el obtener una vacuna DIVA a partir de BA71 Δ CD2. La dificultad de buscar antígenos inmunodominantes prescindibles para el virus (casi todos son proteínas estructurales), y las complicaciones encontradas a lo largo de este trabajo, recomendó descartar esta posibilidad, siendo uno de los objetivos a investigar en el futuro. Sin embargo, en este último apartado de la tesis, se explora como alternativa DIVA la utilización del propio BA71 Δ CD2, aprovechando que el gen eliminado en BA71 Δ CD2 es precisamente el CD2v, también conocido como hemaglutinina viral, responsable de la típica hemadsorción (capacidad para unirse a glóbulos rojos) observada en las células infectadas por el VPPA.

La propuesta se basaría en la capacidad de muchas cepas del VPPA, incluido, BA71, E75CV1 y los virus circulantes en Asia y en la Europa continental (Georgia2007/1, como prototipo) de inducir anticuerpos capaces de inhibir la hemadsorción, mientras que teóricamente, la vacunación con BA71 Δ CD2 no induciría ese tipo de anticuerpos.

En la última figura de esta Tesis (Figura 4.47) se presentan evidencias de que efectivamente, la teoría se cumple. Así, los animales vacunados con BA71 Δ CD2, son capaces de inducir eficientemente anticuerpos que reconocen al VPPA (demostrado en cualquiera de los ELISAS presentados en esta tesis), pero que no inhiben la hemadsorción (panel intermedio). En claro contraste, los animales infectados con la cepa atenuada hemadsorbente E75CV, inducen anticuerpos inhibidores de la hemadsorción (panel inferior).

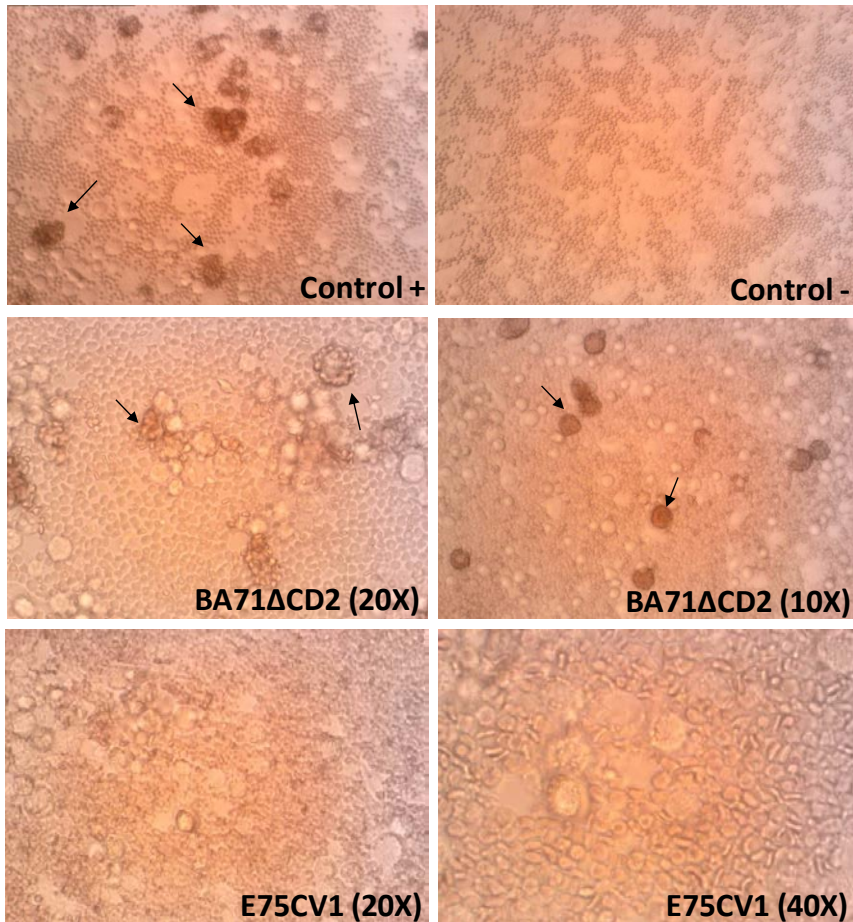


Figura 4.47 Test de inhibición de la hemadsorción. Podemos observar las rosetas formadas alrededor de la célula en las muestras de suero de animales vacunados con BA71ΔCD2 (flechas negras, panel intermedio) mientras que los animales infectados con la cepa hemadsorbente E75CV1, son capaces de inhibir la hemadsorción y por lo tanto no se observan las rosetas (panel inferior con E75CV1). Entre paréntesis se indican los aumentos del microscopio.

Actualmente estamos intentando optimizar un protocolo de inhibición de la hemaglutinación (IHA) que permita realizar el ensayo DIVA en formato de placas de 96 pocillo y libre de células.

5. DISCUSIÓN

“La felicidad no está en la ciencia, sino en la adquisición de la ciencia”

Edgar Allan Poe

Desde su reintroducción en 2007 a través de la República de Georgia, la expansión de la PPA ha alcanzado cotas tan elevadas que a día de hoy puede ser considerada como una epidemia global que amenaza economías tan potentes como la de China, país que cuenta con la mitad de la producción mundial porcina. La alarma es tal, que la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), emitió una alerta en septiembre de 2018 (FAO/CEE Expert Consultation on African Swine Fever, 2018), sobre la más que posible propagación a otros países asiáticos desde China, resultando en una catástrofe económica difícil de calcular. Haciendo buena la previsión, son ya tres los países del entorno de China que han declarado en 2019 brotes de PPA: Mongolia, Vietnam y Camboya.

En Europa la situación es también alarmante, en gran parte debido a la dificultad de controlar la propagación en la población de jabalíes, claves en la expansión de la enfermedad en la zona. Desde la UE se ha modificado el anexo de la Decisión de Ejecución 2014/709, sobre medidas de control zoonositarias relativas a la PPA en los Estados miembros. Mientras que Dinamarca, primer productor porcino a nivel europeo, ha optado por construir una valla para impedir la entrada de los cerdos salvajes en su territorio, Polonia se plantea eliminar a toda su población de jabalíes, y Francia ha establecido una franja de vacío sanitario en la frontera con Bélgica libre de estos animales salvajes. De manera preventiva, en nuestro país, aunque no hay registro de la pandemia, ya se han intensificado los sistemas de vigilancia (Ministerio de Agricultura, 2019), prohibiendo además la importación de jabalíes.

La ausencia de una vacuna frente a la PPA complica aún más su control. Así pues, el desarrollo de estas frente a la PPA está más justificado que nunca. El trabajo de esta Tesis se encuadra dentro de una línea de investigación financiada por el Gobierno Español desde su inicio, en el año 2004, antes incluso de que el virus volviera a entrar en Europa. La tantas veces olvidada situación de la enfermedad en África, contribuyendo a la situación de pobreza de la zona, recomendaba buscar alternativas que ayudaran a reducir la presión epidemiológica del VPPA en estas áreas y el riesgo de exportación fuera el continente africano. Aunque un poco tarde, creemos que nuestros estudios permiten aportar un poco de optimismo en cuanto a la posibilidad de disponer en un periodo razonable de tiempo, de una vacuna segura y eficaz con capacidad cros-protectora en el mercado; algo esencial en zonas azotadas por el

Discusión

VPPA donde la presencia de más de una cepa distinta de VPPA esté circulando concomitantemente.

La atenuación del virus mediante la eliminación de uno o varios genes asociados a virulencia, es una de las herramientas con más potencial para generar una vacuna eficaz frente a la PPA a corto-medio plazo (African Swine Fever EU reference laboratory, 2017; Arias *et al.*, 2017). Esta tesis parte de resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio, precisamente utilizando un virus atenuado modificado genéticamente, BA71ΔCD2 como prototipo, capaz de proteger a los animales frente a la infección experimental con el VPPA (Monteagudo *et al.*, 2017). Dos son las principales características que hacen único a BA71ΔCD2: su capacidad de proteger no sólo frente al virus homólogo (parental) virulento BA71, sino también frente a virus heterólogos como E75 (remarcar que estos virus habían sido previamente descritos como heterólogos por no existir protección cruzada entre ellos a pesar de pertenecer al mismo genotipo I) (Lacasta *et al.*, 2015), o más interesante aún, frente a Georgia2007/1, virus circulante a día de hoy en la Europa continental y en Asia, perteneciente al genotipo II.

Si bien este prototipo vacunal podría ser considerado una alternativa de emergencia en situaciones como la que viven algunos países del África subsahariana o China, necesita todavía ser mejorado, sobre todo desde el punto de vista de su bioseguridad y de su potencial DIVA, pensando principalmente en zonas libres de enfermedad. Uno de los propósitos de esta Tesis fue intentar reducir al máximo la replicación y la excreción que se observa en algunos animales tras la inmunización con BA71ΔCD2, para prevenir su posible diseminación y transmisión a otros huéspedes susceptibles y/o portadores, sin que se vea afectada su eficacia protectora.

La primera estrategia para probar parecía ser la más lógica y evidente: la inactivación de BA71ΔCD2. Estrategia que garantizaría la seguridad del prototipo, incluso para su utilización en individuos con un déficit inmunológico importante, además de facilitar la obtención de un diagnóstico DIVA utilizando proteínas no estructurales inmunodominantes (Bhatt *et al.*, 2018; Burgara-Estrella *et al.*, 2013; Dundon *et al.*,

2007; Kollnberger *et al.*, 2002). La inactivación del VPPA ya había sido probada con anterioridad infructuosamente utilizando aislados del VPPA virulentos (Blome *et al.*, 2014; Bommeli, 1981; Mebus *et al.*, 1988; Stone *et al.*, 1967). Si bien las razones que explican su ineficacia siguen sin conocerse, el hecho de que CD2v haya sido descrito como una de las proteínas del virus con mayor capacidad inmunosupresora (Borca *et al.*, 1998; Dixon *et al.*, 2004; Kay-Jackson *et al.*, 2004; Rodriguez *et al.*, 1993) junto con su localización en la superficie del virión, nos hizo hipotetizar, tal vez, con que éste interviniera en el fracaso de la respuesta protectora observada con vacunas inactivadas. Sin embargo, la incapacidad de las tres formas inactivadas de BA71ΔCD2, presentadas en los primeros resultados de esta tesis, de conferir protección, descartan esta hipótesis y confirman una vez más, que la capacidad protectora de BA71ΔCD2 está intrínsecamente ligada a su capacidad de replicar. Una de las razones más plausibles para explicar la ausencia de protección, aunque no la baja respuesta de anticuerpos observada, sea la incapacidad de los virus inactivados de provocar una respuesta T-CD8⁺ citotóxica tan eficaz como los virus vivos (Korenkov *et al.*, 2018; Sridhar *et al.*, 2015), respuesta clave para proteger frente al VPPA (Argilaguet *et al.*, 2012; King *et al.*, 2011; Lacasta *et al.*, 2015; Monteagudo *et al.*, 2017; Oura *et al.*, 2005). El desarrollo de adyuvantes mucho más eficaces a la hora de inducir este tipo de respuestas, podría en el futuro permitir recuperar esta estrategia de inmunización frente al VPPA, como ya se ha hecho realidad para otros patógenos (Bouguyon *et al.*, 2015; Halbroth *et al.*, 2018; Macleod *et al.*, 2011).

La baja respuesta de anticuerpos observada podría deberse a modificaciones en las muchas proteínas estructurales y/o en la estructura conformacional del virión, como se ha demostrado previamente para otros virus tras la inactivación con BPL (Uittenbogaard *et al.*, 2011), o con el BEI a determinadas condiciones de concentración y temperatura (Broo *et al.*, 2001; Rweyemamu *et al.*, 1989). Otra explicación posible a las bajas respuestas obtenidas, sea de la inapropiada elección del adyuvante, como parece inferirse de los resultados obtenidos por Blome y colaboradores, comparando dos adyuvantes distintos con una misma preparación de virus inactivado con BEI (Blome *et al.*, 2014). Independientemente de la concentración de los niveles de anticuerpos detectados, ambas inmunizaciones

Discusión

fracasaron a la hora de conferir protección, muy probablemente por su ineficacia a la hora de inducir una respuesta celular T-CD8⁺ citotóxica (CTL).

Con esta última premisa en mente, decidimos abordar una segunda aproximación, consistente en la utilización de una dosis subóptima de BA71ΔCD2 (más segura para el animal), en presencia de un adyuvante que potenciara la respuesta CTL (mejorar su eficacia frente al VPPA). Así pues, decidimos centrar estos primeros esfuerzos en dos estrategias paralelas basadas en la utilización de dos tipos de micropartículas diferentes. Las micropartículas: de silicio y de quitosano-sulfonado habían sido probadas por nuestros colaboradores exitosamente, tanto *in vitro* como en modelos de ratón, como adyuvantes capaces de potenciar la respuesta inmune humoral y celular frente a diversos antígenos (Bucarey *et al.*, 2014; Jimenez-Periañez, *et al.*, 2013). A pesar de que la protección conseguida tras una sola inmunización con BA71ΔCD2 adyuvantado con ambas micropartículas no fue total, los porcentajes de supervivencia tras la infección con Georgia2007/1 (50-60%), mejoraron de forma ostensible los observados previamente con BA71ΔCD2 sin adyuvantar, que nunca superaron el 20% de supervivencia (Tesis Laia Bosch, 2019). Por otro lado, la ausencia de carga viral detectable en suero en la mayoría de los animales tras la inmunización con esta dosis vacunal confirmaría su seguridad, al menos en lo que se refiere a ausencia de virulencia residual detectable. Estos resultados, muy preliminares, permiten especular sobre el futuro uso de micropartículas como adyuvantes, exigiendo un estudio mucho más sistemático y riguroso que el aquí empleado. Así, por ejemplo, sería ideal poder probar distintas concentraciones y número de micropartículas en cerdo. En el caso del QuiS además, habría que probar su capacidad como adyuvante de mucosas, para lo que inicialmente fue diseñado, aprovechando su afinidad por los receptores de heparán sulfato (Bucarey *et al.*, 2014; Christianson *et al.*, 2014; Doncel-Perez *et al.*, 2018), receptor ubicuo pero sobreexpresado en esta mucosas. Quizás debido a esta ubicuidad, se pudo observar una respuesta T más homogénea y elevada en los animales inmunizados con el virus adyuvantado con las QuiS, que en los inmunizados con SiM.

El enorme coste económico que supondría el poder analizar todas las variables posibles, junto con el hecho de que ambos adyuvantes se encuentren a su vez en fase

experimental, nos hizo decidir seguir explorando nuevas posibilidades de optimizar la utilización de BA71ΔCD2 como vacuna, a la espera de poder profundizar en el futuro en cada uno de los aspectos aquí explorados.

En este sentido, nuestra tercera y última apuesta por conseguir reducir la virulencia residual de BA71ΔCD2 sin afectar a su eficacia, se basó en la obtención de nuevos virus recombinantes mediante manipulación genética. Disponer de una vacuna delecionada en más de determinante de virulencia presentaría ventajas indiscutibles frente a mutantes simples. Una de ellas, sería la reducción del riesgo, casi improbable, de reversión a formas virulentas. Sin embargo, la enorme complejidad del virus hace de esta una tarea complicada. Con más de 165 proteínas codificadas, no resulta fácil escoger el segundo gen a deleccionar y más teniendo en cuenta que solamente se conoce un 50 % de la función de todos ellos. Probablemente para muchos de ellos es imposible su deleción ya sea porque resultan esenciales para la replicación del virus *in vitro* (Borca *et al.*, 2016; Rodriguez *et al.*, 1996) o bien porque son imprescindibles para su replicación *in vivo* (Afonso *et al.*, 1998; Lewis *et al.*, 2000; O'Donnell *et al.*, 2016; Oliveros *et al.*, 1999; Sanford *et al.*, 2016; Zsak *et al.*, 1998). Si bien la elección de un primer factor de virulencia resulta complicada, aún más puede ser la selección de un segundo factor de virulencia para optimizar al virus recombinante ya disponible en el laboratorio. Confirmando esta realidad, la eliminación del gen EP153R o el gen DP96R, segundo factor de virulencia escogido para obtener virus dobles mutantes más seguros a partir de BA71ΔCD2, no parecen mejorar la seguridad de la vacuna, al menos en lo que se refiere a la virulencia residual de los virus resultantes. A pesar de ello, BA71ΔCD2EP153R (quizás demasiado atenuado) y, sobre todo, BA71ΔCD2DP96R (atendiendo a los resultados obtenidos), podrían presentar una ventaja adicional respecto a BA71ΔCD2; la doble seguridad que proporciona el hecho casi improbable, de que los dobles recombinantes puedan revertir a la forma salvaje, mediante recombinación con virus circulantes. Para que esta hipótesis sea validada, es necesario primero comprobar el potencial protector del virus BA71ΔDP96R; mutantes simples para el gen DP96R. A pesar de haber sido seleccionado por su capacidad de atenuar al VPPA tras su eliminación del genoma viral, estos experimentos fueron realizados con otras cepas del virus, incluyendo Malawi y Georgia (Abrams *et al.*, 2012; Gallardo *et al.*, 2018; Hurtado *et al.*, 2011;

Discusión

O'Donnell *et al.*, 2017; Zsak *et al.*, 1998). El hecho ya demostrado previamente para muchos otros genes, incluidos el DP71L (NL) (Afonso *et al.*, 1998) o el mismo EP402R (CD2v) (Borca *et al.*, 1998; Monteagudo *et al.*, 2017), de que su delección resulta en fenotipos distintos dependiendo de la cepa de virus empleada (Abrams *et al.*, 2013; Sanchez-Cordon *et al.*, 2017), recomienda ser cautos en cuanto al resultado que se obtendría al deleccionar DP96R de BA71. Mientras tanto, seguimos buscando algún otro factor de virulencia susceptible de ser eliminado del BA71 Δ CD2 para conseguir obtener “la vacuna ideal” en cuanto a seguridad y eficacia, a pesar de que, en nuestra experiencia, cualquier estrategia empleada para intentar reducir la virulencia residual de BA71 Δ CD2 siempre se cobra lo que podríamos llamar “un peaje” en protección. No obstante, seguiremos insistiendo en el futuro.

Creemos que estrategias como la utilización de virus inducibles frente a la PPA, merecen un capítulo aparte en esta sección. La idea inicialmente barajada con nuestros colaboradores del CBMSO, bajo la supervisión de la Dra. María Luisa Salas, fue la de utilizar el virus BA71 Δ CD2pp220i, inducible para la poliproteína estructural pp220, codificada por el gen CP2475L y regulado por el sistema operador-represor de *E. coli*. El virus inducible BA71Vpp220i, generado previamente sobre el virus apatogéno, BA71V (adaptado a cultivo), en condiciones restrictivas (sin el inductor IPTG), generaba cápsides vacías capaces incluso de salir de la célula infectada (García-Escudero, *et al.*, 2002), permitiendo hipotetizar que el nuevo virus BA71 Δ CD2pp220i, generado sobre la cepa homóloga virulenta (BA71), podría resultar en un virus de ciclo único. Un virus con un enorme potencial como vacuna segura frente al VPPA, precisamente al tratarse de un virus de ciclo único. Desafortunadamente, fuimos incapaces de obtener el virus inducible BA71 Δ CD2pp220i sobre BA71, a pesar de que, en paralelo, este mismo virus sí lo conseguíamos obtener a partir del apatogéno BA71V. Estos resultados, repetidos en varias ocasiones permiten conjeturar con una función mucho más compleja para pp220 durante la replicación *in vivo*, que la definida como poliproteína estructural en BA71V (Andrés *et al.*, 2002; García-Escudero, *et al.*, 2002). Así pues, y para estudiar el potencial de los virus inducibles como estrategia vacunal, decidimos utilizar un virus inducible generado en el laboratorio para controlar la expresión de la proteína quinasa viral (R298L/PK), con el objetivo inicial de estudiar la fase

temprana de replicación nuclear (Ballester *et al.*, 2011), previamente confirmada en el laboratorio.

La primera sorpresa que nos encontramos con BA71 Δ CD2PKi, virus inducible para la PK, fue la imposibilidad de controlar totalmente su expresión *in vitro*. A pesar de que por *Western Blot*, sí se observara una clara reducción de la expresión de la PK en ausencia de IPTG (Tesis Paula L. Monteagudo 2015), esta seguía expresándose suficientemente como para no afectar al crecimiento del virus tanto en macrófagos alveolares, como en células COS-1, no observándose diferencias en su cinética de crecimiento, tanto en ausencia como en presencia de IPTG (inductor), ni frente al virus parental, BA71 Δ CD2. Al tratarse de una enzima, la expresión de trazas de PK, muy probablemente sea suficiente como para realizar su función a concentraciones muy bajas, algo imposible si jugara un papel estructural importante.

Teniendo en cuenta los resultados con los dobles mutantes, pensamos que cualquier estrategia que redujera lo más mínimo la replicación del virus *in vivo*, era merecedora de ser probada.

La segunda sorpresa deparada por el virus inducible BA71 Δ CD2PKi fue que, resultara defectivo *in vivo*, no observándose replicación alguna. Como consecuencia, provocaba una pobre respuesta inmunológica y una más dramática protección contra Georgia 2007/1, no pudiendo ser utilizado como alternativa vacunal. Siendo difícil de explicar, este resultado demuestra que los resultados *in vitro* sobre monocapas de macrófagos todos infectados casi sincrónicamente, no reflejan lo que sucede realmente *in vivo*. Una vez en el huésped, parece ser que cada macrófago infectado se encuentra en un ambiente mucho más complejo en el que, muy probablemente, los mecanismos de represión, capaces inhabilitar la transcripción de la PK, sí hayan funcionado, evitando que se produzca la progenie viral. Si la PK además tiene su función en etapas muy tempranas de la infección (Ballester *et al.*, 2011), no se producirían viriones maduros como sí habría sucedido para el mutante de la pp220, abortando el ciclo en etapas demasiado tempranas como para dar una respuesta lo suficientemente efectiva. Esto es difícil de probar por lo que queda así; en una hipótesis de trabajo.

Los resultados hasta ahora mostrados, en su conjunto, confirman que los niveles de protección tan elevados obtenidos con BA71 Δ CD2, exigen un grado de replicación

Discusión

mínima del virus *in vivo*. Desafortunadamente, esto implica un cierto grado de inseguridad con el que debemos contar y que ha de ser estudiado con mucha atención en un futuro, con experimentos de transmisión muy bien estructurados, que incluyan grupos de animales más grandes y tiempos experimentales más prolongados.

Mientras tanto, habrá que ser mucho más ingeniosos en el futuro si se quiere conseguir el equilibrio ideal entre seguridad y eficacia en el futuro.

Resultados obtenidos en nuestro laboratorio demuestran sin lugar a duda que la infección intramuscular con VPPA, además de resultar una ruta totalmente artificial, resulta más agresiva para el animal cuando se compara con rutas de infección fisiológicamente más relevantes, como por ejemplo la intranasal. Demostrar esta realidad ha resultado clave para poder caracterizar antígenos individuales con potencial protector que pasaban inadvertidos tras realizar el desafío intramuscular con Georgia2007/1, mientras que, con otras cepas, esta limitación no había sido tan evidente. Así pues, nuestros siguientes pasos se enfocaron en establecer modelos tanto de inmunización como de infección que mimetizaran las situaciones que realmente tienen lugar en campo (infecciones naturales), bien a través de inoculaciones intranasales, por contacto o por picadura de garrapata.

De una manera resumida, hemos podido demostrar que tanto la inoculación intramuscular como la intranasal de BA71ΔCD2, es capaz de proteger a los animales frente a cualquier ruta de infección, ya sea intramuscular, intranasal, por contacto frente a Georgia 2007/1 y/o frente a la picadura por garrapatas infectadas por un virus aislado de campo del genotipo XIX, abriendo nuevas expectativas de futuro a los futuros prototipos derivados de BA71ΔCD2.

Confirmando la teoría de partida, la infección intranasal o por contacto, demostraban ser menos agresiva que la ruta intramuscular, pudiendo conseguir idénticos porcentajes de supervivencia, mientras se controlaba la infección mucho mejor tal y como demuestran las bajas copias genómicas de Georgia2007/1, detectadas tras la infección letal. El hecho de que la dosis infectiva necesaria de Georgia2007/1 para la inoculación intranasal (y muy probablemente por contacto), sea mucho mayor, podría explicar las dificultades del virus para diseminarse por el organismo cuando

usa esta vía de entrada, tal y como han demostrado otros estudios (Guinat *et al.*, 2016; Vlasova *et al.*, 2015), facilitando su control previa vacunación con BA71ΔCD2. No obstante, esta dificultad no puede explicarse simplemente con la destrucción innata del virus antes de llegar a poder infectar la célula diana. En este caso, con BA71ΔCD2, sucede justo lo contrario de lo que se describe para Georgia2007/1, donde se necesita menos dosis, para conseguir una respuesta inmune y protectora equivalente a la conseguida tras la inmunización intramuscular, resultado observado con anterioridad para otros prototipos vacunales (Sanchez-Cordon *et al.*, 2017). Así pues, uno podría pensar que la vía intranasal serviría como un mecanismo inmediato de defensa frente a cepas virulentas. Una buena vía para conseguir una óptima inmunidad tanto de mucosas como sistémica, quizás reflejado en la presencia de multitud de células profesionales presentadoras de antígeno y otros tipos celulares claves en defensa inmunológica (Corr *et al.*, 2008; Jabbal-Gill, 2010; Zaman *et al.*, 2013).

Una de las sorpresas inicialmente obtenidas tras la inmunización intranasal con BA71ΔCD2, incidió en la reducción de la virulencia residual observada en sueros de los animales inmunizados, mientras se conservaba la protección otorgada. Pero rápidamente la decepción se hizo innegable, al comprobar la acumulación del virus vacunal en fosas nasales, facilitando su excreción al medio. Si bien el virus secretado es atenuado, la utilización de esta ruta de inoculación no permitiría controlar la cantidad de virus presente en el campo, ni su persistencia en el medio ambiente, limitando su uso como candidato vacunal. El hecho de que BA71ΔCD2 se acumule con tanta facilidad en fosas nasales sin ser detectado en suero, muy probablemente tenga que ver con el hecho de que en ausencia de CD2v, la hemaglutinina viral, el virus no puede asociarse a eritrocitos para viajar por el torrente sanguíneo con facilidad (Rodríguez *et al.*, 1993; Sereda *et al.*, 2016).

La protección obtenida por contacto y sobre todo la capacidad de BA71ΔCD2 de proteger frente al desafío con garrapatas infectadas por el genotipo XIX, manifestando una vez más su característico y único nivel cross-protector, y permite ser optimista en cuanto a sus posibilidades de futuro. Posibilidades. como la de su potencial uso en zonas endémicas, donde hay más de un virus circulando de forma

Discusión

concomitante o continuamente sometido a entradas y reentradas (Muangkram *et al.*, 2015; Simulundu *et al.*, 2018).

Enlazando con esta última observación, y teniendo en cuenta la capacidad de BA71ΔCD2 de proteger frente a virus tan distintos como BA71 y E75 (genotipo I), Georgia 2007/1 (genotipo II) y RSA (genotipo XIX), decidimos extender nuestros estudios de cros-protección en la medida de lo posible, a una de las cepas más alejadas filogenéticamente de las disponible en el laboratorio: Ken06.Bus (genotipo IX). Como cabía esperar, la protección conferida por BA71ΔCD2 frente a Ken06.Bus, se vio dramáticamente reducida, independientemente de la dosis recibida, correlacionando con la enorme distancia filogenética entre aislados (Garigliany *et al.*, 2018; Muangkram *et al.*, 2015). Confirmando la teoría, los genotipos I y II se encuentran dentro del clado C y el genotipo XIX en el D, mientras que el genotipo IX, se encuentra en el otro extremo del árbol filogenético, en el clado A (ver introducción, sección 1.1.2, figura 1.3). Así pues, lógicamente la capacidad protectora de BA71ΔCD2 (genotipo I), se ve disminuida a medida que el virus se hace más divergente.

Como demuestran nuestros resultados, la vacunación con BA71ΔCD2 no sólo supone un beneficio directo frente aquellas cepas circulantes frente a las que pueda resultar eficaz directamente, sino que además podría suponer una ventaja, al permitir que cualquier animal, vacunado y superviviente a una infección, sea capaz de resistir cualquier otra infección, incluso Ken06.Bus. El hecho que dos dosis de BA71ΔCD2 no hagan el mismo efecto, indica que es necesario estar sometido a un desafío con un virus más agresivo que el vacunal en una segunda ocasión, dando pistas sobre el posible mecanismo que explique este fenómeno. Nuestros resultados confirman trabajos pioneros realizados por Ruiz-Gonzalvo y colaboradores hace décadas (Ruiz-Gonzalvo *et al.*, 1986). Un trabajo más reciente, realizado por Takamatsu y colaboradores, permitió correlacionar la cros-protección observada en sus experimentos de inmunización, con la presencia de células T-específicas secretoras de IFN γ , capaces de reconocer *in vitro* cada uno de los aislados utilizados (Takamatsu *et al.*, 2013). Siendo ésta una correlación interesante, no explica el

mecanismo exacto del fenómeno observado, exigiendo un estudio más profundo. Actualmente nos encontramos realizando estudios de secuenciación masiva de transcritos a partir de las muestras obtenidas en nuestro experimento, esperando poder arrojar un poco más de luz a este fenómeno de protección.

Independientemente del mecanismo de actuación, consideramos que los resultados obtenidos anexan un nuevo argumento de peso en favor de la utilización de vacunas vivas atenuadas en la lucha contra la PPA en zonas endémicas.

Dentro del variable arsenal de virus vivos atenuados existentes en la actualidad, consideramos que BA71ΔCD2 ofrece diversas ventajas: a su capacidad cross-protectora, habría que añadirle en ser el único prototipo susceptible de infectar una línea celular estable como COS-1 (Monteagudo *et al.*, 2017), además de poseer capacidad DIVA, siendo fácilmente distinguible la respuesta inmune inducida por él, de la que provoca el virus Georgia2007/1. Esta última propiedad, ratificada en el último ensayo de mi Tesis, permite demostrar la incapacidad de los sueros de los animales vacunados con BA71ΔCD2, de inhibir la hemadsorción provocada por la infección de macrófagos por el VPPA *in vitro*. Mientras que cualquier animal recuperado de una infección con un virus hemadsorbente, la inhibiría efectivamente. Lejos de ser un ensayo ideal, éste podría automatizarse sustituyendo la inhibición de la hemadsorción, por la inhibición de la hemaglutinación (Ruiz-Gonzalvo *et al.*, 1986; Ruiz-Gonzalvo *et al.*, 1993), y en el futuro, mediante la eliminación de proteínas más inmunodominantes que permitan desarrollar técnicas como un ELISA, más eficaces y sencillos.

Siendo conscientes de que BA71ΔCD2 sigue teniendo que mejorar, intentando llegar a un equilibrio entre eficacia y seguridad y optimizar su capacidad DIVA creemos que, a día de hoy es una alternativa realista para ayudar a luchar contra el VPPA en zonas de emergencia.

6. CONCLUSIONES

*“Este no es el final, no es ni siquiera el principio del final,
puede ser, quizás, el final del principio”*

W. Churchill

De los resultados obtenidos en el presente trabajo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. La inactivación de BA71 Δ CD2, merma completamente su capacidad protectora, demostrando que ésta depende de su capacidad de replicar *in vivo*.
2. La utilización de una dosis subóptima (10^3 UFP) de BA71 Δ CD2, aunque segura para el animal, seguida de una dosis de recuerdo, no mejora los resultados en términos de protección y reducción de virulencia residual.
3. La administración de una única dosis subóptima de BA71 Δ CD2 en presencia de micropartículas de silicio o de quitosano-sulfonado, permiten potenciar la respuesta inmunológica y la protección conferida, abriendo la posibilidad a la utilización de adyuvantes en próximas formulaciones vacunales.
4. La manipulación genética de BA71 Δ CD2 para generar los dobles mutantes BA71 Δ CD2EP153R, BA71 Δ CD2DP96R o el virus inducible BA71 Δ CD2PKi, permiten ratificar la teoría de que cualquier manipulación que disminuya la capacidad replicativa del virus, disminuye a su vez su capacidad protectora.
5. La inoculación de BA71 Δ CD2 de forma intranasal reduce enormemente la virulencia residual detectada en los sueros de los animales, pero a cambio permite su detección acumulada en fosas nasales, aumentando dramáticamente la excreción, comprometiendo su uso como método de inmunización.
6. La inmunización con BA71 Δ CD2, tanto intramuscular como intranasal, confiere protección frente a Georgia2007/1, inoculado intramuscularmente, intranasalmente o por contacto.

Conclusiones

7. BA71 Δ CD2 es capaz de proteger frente al desafío con garrapatas infectadas de forma natural por el genotipo XIX, mimetizando las situaciones de campo.
8. BA71 Δ CD2 confiere sólo protección parcial frente al virus Ken06.Bus (genotipo IX), virus filogenéticamente muy distante a los genotipos I y II. Sin embargo, los animales inmunizados con el virus atenuado BA71 Δ CD2 que sobreviven a la infección con su homólogo virulento, BA71, son capaces de resistir al desafío letal contra Ken06.Bus.
9. La delección de la proteína CD2v, codificada por el gen EP402R, nos permite obtener un test DIVA alternativo, para poder discernir entre animales vacunados con BA71 Δ CD2 de infectados con Georgia2007/1, basado en la técnica de la inhibición de la hemadsorción.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abrams, C. C., Dixon, L. K. (2012).** Sequential deletion of genes from the African swine fever virus genome using the cre/loxP recombination system. *Virology*, 433, 142–148.
- Abrams, C. C., Goatley, L., Fishbourne, E., Chapman, D., Cooke, L., Oura, C. A., Netherton, C. L., Takamatsu, H. H., Dixon, L. K. (2013).** Deletion of virulence associated genes from attenuated African swine fever virus isolate OUR T88/3 decreases its ability to protect against challenge with virulent virus. *Virology*, 443, 99–105.
- Achenbach, J. E., Gallardo, C., Nieto-Pelegrín, E., Rivera-Arroyo, B., Degefa-Negi, T., Arias, M., Jenberie, S., Mulisa, D. D., Gizaw, D., Gelaye, E., Chibssa, T. R., Belaye, A., Loitsch, A., Forsa, M., Yami, M., Diallo, A., Soler, A., Lamien, C. E., Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2017).** Identification of a New Genotype of African Swine Fever Virus in Domestic Pigs from Ethiopia. *Transbound. Emerg. Dis.*, 64, 1393–1404.
- Afonso, C. L., Carrillo, C., Zsak, L., Rock, D. L., Borca, M. V. (1998).** African swine fever virus NL gene is not required for virus virulence. *J. Gen. Virol.*, 79, 2543–2547.
- Afonso, C. L., Piccone, M. E., Zaffuto, K. M., Neilan, J., Kutish, G. F., Lu, Z., Balinsky, C. a, Gibb, T. R., Bean, T. J., Zsak, L., Rock, D. L. (2004).** African Swine Fever Virus Multigene Family 360 and 530 Genes Affect Host Interferon Response African Swine Fever Virus Multigene Family 360 and 530 Genes Affect Host Interferon Response. *J. Virol.*, 78, 1858–1864.
- African Swine Fever EU reference laboratory. (2017).** Blueprint and Roadmap on the possible development of a vaccine for African Swine Fever. *Unit D4 Food Saf. Program. Emerg. Funding Eur. Comm.*, 1–36.
- Alcami, A., Carrascosa, A. L., Viñuela, E. (1989).** Saturable binding sites mediate the entry of African swine fever virus into VERO cells. *Virology*, 171, 68–75.
- Alcami, A., Carrascosa, A. L., Viñuela, E. (1990).** Interaction of African swine fever virus with macrophages. *Virus Res.*, 17, 93–104.
- Alejo, A., Andres, G., Salas, M. L. (2003).** African Swine Fever Virus Proteinase Is Essential for Core Maturation and Infectivity. *J. Virol.*, 77, 5571–5577.
- Alejo, A., Matamoros, T., Guerra, M., Andres, G. (2018).** A proteomic atlas of the African swine fever virus particle. *J. Virol.*, 92, 1–18.
- Almazan, F., Rodriguez, J. F. M., Andres, G., Perez, R., Viñuela, E., Rodriguez, J. F. M. (1992).** Transcriptional analysis of multigene family 110 of African swine fever virus. *J. Virol.*, 66, 6655–6667.
- Almazan, F., Rodriguez, J. M., Angulo, A., Viñuela, E., Rodriguez, J. F. (1993).** Transcriptional mapping of a late gene coding for the p12 attachment protein of African swine fever virus. *J. Virol.*, 67.
- Alonso, C., Miskin, J., Hernaez, B., Fernandez-zapatero, P., Soto, L., Rodriguez, I., Canto, C., Dixon, L., Escribano, J. M. (2001).** African Swine Fever Virus Protein p54 Interacts with the Microtubular Motor Complex through Direct Binding to

Bibliografía

- Light-Chain Dynein. *Journal Virol.*, 75, 9819–9827.
- Alonso, C., Borca, M., Dixon, L., Revilla, Y., Rodriguez, F., Escribano, J. M. (2018).** ICTV Virus Taxonomy Profile: Asfarviridae. *J. Gen. Virol.*, 99, 613–614.
- Anderson, E. C., Hutchings, G. H., Mukarati, N., Wilkinson, P. J. (1998).** African swine fever virus infection of the bushpig (*Potamochoerus porcus*) and its significance in the epidemiology of the disease. *Vet. Microbiol.*, 62, 1–15.
- Andres, G. (2017).** African Swine Fever Virus Gets Undressed: New Insights on the Entry Pathway. *J. Virol.*, 91, 1–5.
- Andres, G., Garcia-Escudero, R., Simon-Mateo, C., Viñuela, E. (1998).** African Swine Fever Virus Is Enveloped by a Two-Membraned Collapsed Cisterna Derived from the Endoplasmic Reticulum. *Journal Virol.*, 72, 8988–9001.
- Andres, G., Alejo, A., Simón-Mateo, C., Salas, M. L. (2001a).** African swine fever virus protease, a new viral member of the SUMO-1-specific protease family. *J. Biol. Chem.*, 276, 780–787.
- Andres, G., Garcia-Escudero, R., Vinuela, E., Salas, M. L. M. , Rodriguez, J. . (2001b).** African swine fever virus structural protein pE120R is essential for virus transport from assembly sites to plasma membrane but not for infectivity. *J. Virol.*, 75, 6758.
- Andres, G., Alejo, A., Salas, J., Salas, M. L. (2002a).** African Swine Fever Virus Polyproteins pp220 and pp62 Assemble into the Core Shell. *J. Virol.*, 76, 12473–12482.
- Andres, G., Garcia-Escudero, R., Salas, M. L., Rodriguez, J. M. (2002b).** Repression of African Swine Fever Virus Polyprotein pp220-Encoding Gene Leads to the Assembly of Icosahedral Core-Less Particles. *J. Virol.*, 76, 2654–2666.
- Argilaguet, J. M., Perez-Martín, E., Nofrarías, M., Gallardo, C., Accensi, F., Lacasta, A., Mora, M., Ballester, M., Galindo-Cardiel, I., López-Soria, S., Escribano, J. M., Reche, P. A., Rodríguez, F. (2012).** DNA Vaccination Partially Protects against African Swine Fever Virus Lethal Challenge in the Absence of Antibodies. *PLoS One*, 7.
- Arias, M., Sanchez-Vizcaino, J. M. (2002).** African Swine Fever Eradication: The Spanish Model. *Trends Emerg. Viral Infect. Swine*, 133–139.
- Arias, M., de la Torre, A., Dixon, L., Gallardo, C., Jori, F., Laddomada, A., Martins, C., Parkhouse, R. M., Revilla, Y., Rodriguez, F. and J.-M., Sanchez-Vizcaino. (2017).** Approaches and Perspectives for Development of African Swine Fever Virus Vaccines, 5, 35.
- Arzuza, O., Urzainqui, A., Díaz-Ruiz, J. R., Tabarés, E. (1992).** Morphogenesis of African swine fever virus in monkey kidney cells after reversible inhibition of replication by cycloheximide. *Arch. Virol.*, 124, 343–354.
- Atuhaire, D. K., Afayoa, M., Ochwo, S., Mwesigwa, S., Okuni, J. B., Olaho-Mukani, W., Ojok, L. (2013).** Molecular characterization and phylogenetic study of African swine fever virus isolates from recent outbreaks in Uganda (2010–2013). *Virol. J.*, 10.

- Bahnemann, H. G. (1975).** Binary ethylenimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production. *Arch. Virol.*, *47*, 47–56.
- Bahnemann, H. G. (1990).** Inactivation of viral antigens for vaccine preparation with particular reference to the application of binary ethylenimine. *Vaccine*.
- Ballester, M., Galindo-cardiel, I., Gallardo, C., Argilagué, J. M., Segalés, J. (2010).** Intranuclear detection of African swine fever virus DNA in several cell types from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues using a new in situ hybridisation protocol. *J. Virol. Methods*, *168*, 38–43.
- Ballester, M., Rodríguez-Cariño, C., Pérez, M., Gallardo, C., Rodríguez, J. M., Salas, M. L., Rodríguez, F. (2011).** Disruption of nuclear organization during the initial phase of African swine fever virus infection. *J. Virol.*, *85*, 8263–8269.
- Banjara, S., Caria, S., Hinds, M. G., Dixon, L. K., Kvensakul, M., Hinds, M. G., Kvensakul, M. (2017).** Structural Insight into African Swine Fever Virus A179L-Mediated Inhibition of Apoptosis. *J. Virol.*, *91*, 1–10.
- Barber, C., Netherton, C., Goatley, L., Moon, A., Goodbourn, S., Dixon, L. (2017).** Identification of residues within the African swine fever virus DP71L protein required for dephosphorylation of translation initiation factor eIF2 α and inhibiting activation of pro-apoptotic CHOP. *Virology*, *504*, 107–113.
- Basto, A. P., Nix, R. J., Boinas, F., Mendes, S., Silva, M. J., Cartaxeiro, C., Portugal, R. S., Leitão, A., Dixon, L. K., Martins, C. (2006).** Kinetics of African swine fever virus infection in *Ornithodoros erraticus* ticks. *J. Gen. Virol.*, *87*, 1863–1871.
- Bastos, A. D. S., Penrith, M. L., Cruciere, C., Edrich, J. L., Hutchings, G., Roger, F., Couacy-Hymann, E., Thomson, G. R. (2003).** Genotyping field strains of African swine fever virus by partial p72 gene characterisation. *Arch. Virol.*, *148*, 693–706.
- Bastos, A. D. S., Penrith, M. L., Macome, F., Pinto, F., Thomson, G. R. (2004).** Co-circulation of two genetically distinct viruses in an outbreak of African swine fever in Mozambique: No evidence for individual co-infection. *Vet. Microbiol.*, *103*, 169–182.
- Bech-Nielsen, S., Perez Bonilla, Q., Sanchez-Vizcaino, J. M. (1993).** Benefit-cost analysis of the current African swine fever eradication program in Spain and of an accelerated program. *Prev. Vet. Med.*, *17*, 235–249.
- Beltran-Alcrudo, D., Lubroth, J., Depner, K., De La Rocque, S. (2008).** African swine fever in the Caucasus. *FAO Empres. Watch*, 1–8.
- Bhatt, M., Mohapatra, J. K., Pandey, L. K., Mohanty, N. N., Das, B., Prusty, B. R., Pattnaik, B. (2018).** Mutational analysis of foot and mouth disease virus nonstructural polyprotein 3AB-coding region to design a negative marker virus. *Virus Res.*, *243*, 36–43.
- Bishop, R. P., Fleischauer, C., de Villiers, E. P., Okoth, E. A., Arias, M., Gallardo, C., Upton, C. (2015).** Comparative analysis of the complete genome sequences of Kenyan African swine fever virus isolates within p72 genotypes IX and X. *Virus Genes*, *50*, 303–309.

Bibliografia

- Blackburn, N. K., Besselaar, T. G. (1991).** A study of the effect of chemical inactivants on the epitopes of Rift Valley fever virus glycoproteins using monoclonal antibodies. *J. Virol. Methods*, *33*, 367–374.
- Blome, S., Gabriel, C., Beer, M. (2012a).** Pathogenesis of African swine fever in domestic pigs and European wild boar. *Virus Res.*, *173*, 122–30.
- Blome, S., Gabriel, C., Dietze, K., Breithaupt, A., Beer, M. (2012b).** High virulence of african swine fever virus caucasus isolate in European wild boars of all ages. *Emerg. Infect. Dis.*, *18*, 708.
- Blome, S., Gabriel, C., Beer, M. (2014).** Modern adjuvants do not enhance the efficacy of an inactivated African swine fever virus vaccine preparation. *Vaccine*, *32*, 3879–3882.
- Boinas, F. S., Hutchings, G. H., Dixon, L. K., Wilkinson, P. J. (2004).** Characterization of pathogenic and non-pathogenic African swine fever virus isolates from *Ornithodoros erraticus* inhabiting pig premises in Portugal. *J. Gen. Virol.*, *199*, 463–468.
- Boinas, F. S., Wilson, A. J., Hutchings, G. H., Martins, C., Dixon, L. J. (2011).** The persistence of African swine fever virus in field-infected *Ornithodoros erraticus* during the ASF endemic period in Portugal. *PLoS One*, *6*, e20383.
- Bommeli, W. (1981).** Preliminary study on immunization of pigs against African swine fever; Proceedings of the CEC/FAO *Research Seminar Held in Sassari; Sardinia, Italy.*
- Borca, M. V., Kutish, G. F., Afonso, C. L., Irusta, P., Carrillo, C., Brun, A., Sussman, M., Rock, D. L. (1994).** An African Swine Fever Virus Gene with Similarity to the T-Lymphocyte Surface Antigen CD2 Mediates Hemadsorption. *Virology*, *199*, 463–468.
- Borca, M. V., Carrillo, C., Zsak, L., Laegreid, W. W., Kutish, G. F., Neilan, J. G., Burrage, T. G., Rock, D. L. (1998).** Deletion of a CD2-like gene, 8-DR, from African swine fever virus affects viral infection in domestic swine. *J. Virol.*, *72*, 2881–2889.
- Borca, M. V., O'Donnell, V., Holinka, L. G., Rai, D. K., Sanford, B., Alfano, M., Carlson, J., Azzinaro, P. A., Alonso, C., Gladue, D. P. (2016).** The Ep152R ORF of African swine fever virus strain Georgia encodes for an essential gene that interacts with host protein BAG6. *Virus Res.*, *223*, 181–189.
- Borca, M. V., Holinka, L. G., Berggren, K. A., Gladue, D. P. (2018).** CRISPR-Cas9, a tool to efficiently increase the development of recombinant African swine fever viruses. *Sci. Rep.*, *8:3154*, 6.
- Boshoff, C. I., Bastos, A. D. S., Gerber, L. J., Vosloo, W. (2007).** Genetic characterisation of African swine fever viruses from outbreaks in southern Africa (1973-1999). *Vet. Microbiol.*, *121*, 45–55.
- Bouguyon, E., Goncalves, E., Shevtsov, A., Maisonnasse, P., Remyga, S., Goryushev, O., Deville, S., Bertho, N., Ben Arous, J. (2015).** A New Adjuvant Combined with Inactivated Influenza Enhances Specific CD8 T Cell Response in Mice and Decreases Symptoms in Swine Upon Challenge. *Viral Immunol.*, *28*,

524–531.

- Breese, S. S., DeBoer, C. J. (1966).** Electron microscope observations of African swine fever virus in tissue culture cells. *Virology*, *28*, 420–428.
- Breese, S. S., DeBoer, C. J. (1967).** Chemical structure of African swine fever virus investigated by electron microscopy. *J. Gen. Virol.*, *1*, 251–252.
- Broo, K., Wei, J., Marshall, D., Brown, F., Smith, T. J., Johnson, J. E., Schneemann, A., Siuzdak, G. (2001).** Viral capsid mobility: A dynamic conduit for inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, *98*, 2274–2277.
- Brookes, S. M., Dixon, L. K., Parkhouse, R. M. E. (1996).** Assembly of African swine fever virus: Quantitative ultrastructural analysis in vitro and in vivo. *Virology*, *224*, 84–92.
- Brun, A., Rivas, C., Esteban, M., Escribano, J. M., Alonso, C. (1996).** African swine fever virus gene A179L, a viral homologue of bcl-2, protects cells from programmed cell death. *Virology*, *225*, 227–230.
- Bucarey, S. A., Pujol, M., Poblete, J., Nuñez, I., Tapia, C. V., Neira-Carrillo, A., Martínez, J., Bassa, O. (2014).** Chitosan microparticles loaded with yeast-derived PCV2 virus-like particles elicit antigen-specific cellular immune response in mice after oral administration. *Virol. J.*, *11*, 1–12.
- Burgara-Estrella, A., Díaz, I., Rodríguez-Gomez, I. M., Essler, S. E., Hernández, J., Mateu, E. (2013).** Predicted peptides from non-structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus are able to induce IFN- γ and IL-10. *Viruses*, *5*, 663–677.
- Burrage, T. G. (2012).** African swine fever virus infection in Ornithodoros ticks corrected copy. *Virus Res.*, *173*, 1–9.
- Carrasco, L., Chacón, F., de Lara, M., Martín de las Mulas, J., Gómez-Villamandos, J., Pérez, J., Wilkinson, P. J., Sierra, M. A. (1996).** Apoptosis in Lymph Nodes in Acute African Swine Fever. *Journal Virol.*, *115*, 415–428.
- Carrasco, L., Bautista, M. J., Gómez-Villamandos, J. C., De Las Mulas, J. M., De Lara, F. C. M., Wilkinson, P. J., Sierra, M. A. (1997).** Development of microscopic lesions in splenic cords of pigs infected with African swine fever virus. *Vet. Res.*, *28*, 93–99.
- Carrasco, L., Nuñez, A., Salguero, F. J., Díaz San Segundo, F., Sánchez-Cordón, P., Gómez-Villamandos, J. C., Sierra, M. A. (2002).** African Swine Fever: Expression of Interleukin-1 alpha and Tumour Necrosis Factor-alpha by Pulmonary Intravascular Macrophages. *J. Comp. Pathol.*, *126*, 194–201.
- Carrascosa, A. L., Sastre, I., Viñuela, E. (1995).** Production and purification of recombinant African swine fever virus attachment protein p12. *J. Biotechnol.*, *40*, 73–86.
- Carrascosa, J. L., Carazo, J. M., Carrascosa, A. L., García, N., Santisteban, A., Viñuela, E. (1984).** General morphology and capsid fine structure of African swine fever virus particles. *Virology*, *132*, 160–172.
- Casal, I., Enjuanes, L., Viñuela, E. (1984).** Porcine Leukocyte Cellular Subsets

Bibliografia

- Sensitive to African Swine Fever Virus In Vitro. *J. Virol.*, *52*, 37–46.
- Chapman, D. A. G., Tcherepanov, V., Upton, C., Dixon, L. K. (2008).** Comparison of the genome sequences of non-pathogenic and pathogenic African swine fever virus isolates. *J. Gen. Virol.*, *89*, 397–408.
- Chapman, D. A. G., Darby, A. C., da Silva, M., Upton, C., Radford, A. D., Dixon, L. K. (2011).** Genomic analysis of highly virulent Georgia 2007/1 isolate of African swine fever virus. *Emerg. Infect. Dis.*, *17*, 599–605.
- Chenais, E., Depner, K., Guberti, V., Dietze, K., Viltrop, A., Ståhl, K. (2019).** Epidemiological considerations on African swine fever in Europe 2014-2018. *Porc. Heal. Manag.*, *5*, 1–10.
- Christianson, H. C., Belting, M. (2014).** Heparan sulfate proteoglycan as a cell-surface endocytosis receptor. *Matrix Biol.*, *35*, 51–55.
- Cobbold, C., Whittle, J. T., Wileman, T. (1996).** Involvement of the endoplasmic reticulum in the assembly and envelopment of African swine fever virus. *J. Virol.*, *70*, 8382–8390.
- Cobbold, C., Wileman, T. (1998).** The Major Structural Protein of African Swine Fever Virus, p73, Is Packaged into Large Structures, Indicative of Viral Capsid or Matrix Precursors, on the Endoplasmic Reticulum. *Journal Virol.*, *72*, 5215–5223.
- Corr, S. C., Gahan, C. C. G. M., Hill, C. (2008).** M-cells: Origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, *52*, 2–12.
- Costard, S., Mur, L., Lubroth, J., Sanchez-Vizcaino, J. M., Pfeiffer, D. U. (2013).** Epidemiology of African swine fever virus. *Virus Res.*, *173*, 191–197.
- Cuesta-geijo, M. A., Galindo, I., Hernaez, B., Quetglas, J. I., Dalmau-mena, I., Alonso, C. (2012).** Endosomal Maturation, Rab7 GTPase and Phosphoinositides in African Swine Fever Virus Entry. *PLoS One*, *7*, e48853.
- De Boer, C. J., Hess, W. R., Dardiri, A. H. (1969).** Studies to determine the presence of neutralizing antibody in sera and kidneys from swine recovered from African swine fever. *Arch Gesamte Virusforsch*, *27*, 44–54.
- de Villiers, E. P., Gallardo, C., Arias, M., da Silva, M., Upton, C., Martin, R., Bishop, R. P. (2010).** Phylogenomic analysis of 11 complete African swine fever virus genome sequences. *Virology*, *400*, 128–136.
- Detray, D. E. (1957).** Persistence of viremia and immunity in African swine fever. *Am. J. Vet. Res.*, *18*, 811–816.
- Diaz, I., Mateu, E. (2005).** Use of ELISPOT and ELISA to evaluate IFN- γ , IL-10 and IL-4 responses in conventional pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, *106*, 107–112.
- Dixon, L. K. (1986).** The structure and function of the African swine fever virus genome. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, *216*, 677–88.
- Dixon, L. K., Bristow, C., Wilkinson, P. J., Sumption, K. J. (1990).** Identification of a variable region of the African swine fever virus genome that has undergone separate DNA rearrangements leading to expansion of minisatellite-like

- sequences. *J. Mol. Biol.*, 216, 677–688.
- Dixon, L. K., Abrams, C. C., Bowick, G., Goatley, L. C., Kay-Jackson, P. C., Chapman, D., Liverani, E., Nix, R., Silk, R., Zhang, F. (2004).** African swine fever virus proteins involved in evading host defence systems. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 100, 117–134.
- Dixon, L. K., Alonso, C., Escribano, J. M., Martins, C., Revilla, Y., Salas, M. L., Takamatsu, H. (2012).** Asfarviridae. In *Virus Taxonomy* (pp. 153–162). Elsevier.
- Dixon, L. K., Chapman, D. A. G., Netherton, C. L., Upton, C. (2013).** African swine fever virus replication and genomics. *Virus Res.*, 173, 3–14.
- Dixon, L. K., Sanchez-Cordon, P. J., Galindo, I., Alonso, C. (2017).** Investigations of Pro- and Anti-Apoptotic Factors Affecting African Swine Fever Virus Replication and Pathogenesis. *Viruses*, 9, 241.
- Doncel-Perez, E., Aranaz, I., Bastida, A., Revuelta, J., Camacho, C., Acosta, N., Garrido, L., Civera, C., García-Junceda, E., Heras, A., Fernandez-Mayoralas, A. (2018).** Synthesis, physicochemical characterization and biological evaluation of chitosan sulfate as heparan sulfate mimics. *Carbohydr. Polym.*, 191, 225–233.
- Dundon, W. G., Maniero, S., Toffan, A., Capua, I., Cattoli, G. (2007).** Appearance of Serum Antibodies Against the Avian Influenza Nonstructural 1 Protein in Experimentally Infected Chickens and Turkeys. *Avian Dis.*, 51, 209–212.
- Epifano, C., Krijnse-Locker, J., Salas, M. L., Salas, J., Rodriguez, J. M. (2006).** Generation of Filamentous Instead of Icosahedral Particles by Repression of African Swine Fever Virus Structural Protein pB438L. *J. Virol.*, 80, 11456–11466.
- Escribano, J. M., Galindo, I., Alonso, C. (2013).** Antibody-mediated neutralization of African swine fever virus: Myths and facts. *Virus Res.*, 173, 101–109.
- FAO/CEE Expert Consultation on African Swine Fever. (2018).** *Concept Note: EMERGENCY REGIONAL CONSULTATION ON AFRICAN SWINE FEVER.*
- Farlow, J., Donduashvili, M., Kokhraidze, M., Kotorashvili, A., Vepkhvadze, N. G., Kotaria, N., Gulbani, A. (2018).** Intra-epidemic genome variation in highly pathogenic African swine fever virus (ASFV) from the country of Georgia. *Virol. J.*, 15, 1–8.
- Fernandez, A., Perez, J., Carrasco, L., Bautista, M. J., Sanchez-Vizcaino, J. M., Sierra, M. A. (1992).** Distribution of ASFV Antigens in Pig Tissues Experimentally Infected With Two Different Spanish Virus Isolates. *Zentralbl. Veterinärmed B.*, 39, 393–402.
- Forman, A. J., Wardley, R. C., Wilkinson, P. J. (1982).** The immunological response of pigs and guinea pigs to antigens of African swine fever virus, 74, 91–100.
- Frączyk, M., Woźniakowski, G., Kowalczyk, A., Bocian, Ł., Kozak, E., Niemczuk, K., Pejsak, Z. (2016).** Evolution of African swine fever virus genes related to evasion of host immune response. *Vet. Microbiol.*, 193, 133–144.

Bibliografía

- Franzoni, G., Graham, S. P., Giudici, S. D., Bonelli, P., Pilo, G., Anfossi, A. G., Pittau, M., Nicolussi, P. S., Laddomada, A., Oggiano, A. (2017).** Characterization of the interaction of African swine fever virus with monocytes and derived macrophage subsets. *Vet. Microbiol.*, *198*, 88–98.
- Frouco, G., Freitas, F. B., Coelho, J., Leitão, A., Martins, C., Ferreira, F. (2017).** DNA-Binding Properties of African Swine Fever Virus pA104R, a Histone-Like Protein Involved in Viral Replication and Transcription. *J. Virol.*, *91*, 1–14.
- Galindo-Cardiel, I., Ballester, M., Solanes, D., Nofrarías, M., López-Soria, S., Argilaguuet, J. M., Lacasta, A., Accensi, F., Rodríguez, F., Segalés, J. (2013).** Standardization of pathological investigations in the framework of experimental ASFV infections. *Virus Res.*, *173*, 180–190.
- Galindo, I., Almazán, F., Bustos, M. J., Viñuela, E., Carrascosa, A. L. (2000).** African swine fever virus EP153R open reading frame encodes a glycoprotein involved in the hemadsorption of infected cells. *Virology*, *266*, 340–351.
- Galindo, I., Cuesta-geijo, M. A., Hlavova, K., Muñoz-Moreno, R., Barrado-gil, L., Dominguez, J., Alonso, C. (2015).** African swine fever virus infects macrophages ,the natural host cells,via clathrin-and cholesterol-dependent endocytosis. *Virus Res.*, *200*, 45–55.
- Gallardo, C., Mwaengo, D. M., MacHaria, J. M., Arias, M., Taracha, E. A., Soler, A., Okoth, E., Martín, E., Kasiti, J., Bishop, R. P. (2009).** Enhanced discrimination of African swine fever virus isolates through nucleotide sequencing of the p54, p72, and pB602L (CVR) genes. *Virus Genes*, *38*, 85–95.
- Gallardo, C., Okoth, E., Pelayo, V., Anchuelo, R., Martín, E., Simón, A., Llorente, A., Nieto, R., Soler, A., Martín, R., Arias, M., Bishop, R. P. (2011).** African swine fever viruses with two different genotypes, both of which occur in domestic pigs, are associated with ticks and adult warthogs, respectively, at a single geographical site. *J. Gen. Virol.*, *92*, 432–444.
- Gallardo, C., Fernandez-Pinero, J., Pelayo, V., Gazaev, I., Markowska-Daniel, I., Pridotkas, G., Nieto, R., Fernandez-Pacheco, P., Bokhan, S., Nevolko, O., Drozhzhe, Z., Pérez, C., Soler, A., Kolvasov, D., Arias, M. (2014).** Genetic variation among african swine fever genotype II viruses, Eastern and Central Europe. *Emerg. Infect. Dis.*, *20*, 1544–1547.
- Gallardo, C., Soler, A., Nieto, R., Sánchez, M. A., Martins, C., Pelayo, V., Carrascosa, A., Revilla, Y., Simón, A., Briones, V., Sánchez-Vizcaíno, J. M., Arias, M. (2015).** Experimental Transmission of African Swine Fever (ASF) Low Virulent Isolate NH/P68 by Surviving Pigs. *Transbound. Emerg. Dis.*, *62*, 612–622.
- Gallardo, C., Sánchez, E. G., Pérez-Núñez, D., Nogal, M., de León, P., Carrascosa, Á. L., Nieto, R., Soler, A., Arias, M. L., Revilla, Y. (2018).** African swine fever virus (ASFV) protection mediated by NH/P68 and NH/P68 recombinant live-attenuated viruses. *Vaccine*, *36*, 2694–2704.
- García-Beato, R., Salas, M. L., Viñuela, E., Salas, J. (1992).** Role of the host cell nucleus in the replication of African swine fever virus DNA. *Virology*, *188*, 637–649.
- García-Escudero, R., Andres, G., Almazan, F., Vinuela, E. (1998).** Inducible Gene

- Expression from African Swine Fever Virus Recombinants: Analysis of the Major Capsid Protein p72. *J. Virol.*, 72, 3185–3195.
- Garigliany, M., Desmecht, D., Tignon, M., Cassart, D., Lesenfant, C., Paternostre, J., Volpe, R., Cay, A. B., van den Berg, T., Linden, A. (2018).** Phylogeographic Analysis of African Swine Fever Virus, Western Europe, 2018. *Emerg. Infect. Dis.*, 25, 184–186.
- Gartlan, K. H., Krashias, G., Wegmann, F., Hillson, W. R., Scherer, E. M., Greenberg, P. D., Eisenbarth, S. C., Moghaddam, A. E., Sattentau, Q. J. (2016).** Sterile inflammation induced by Carbopol elicits robust adaptive immune responses in the absence of pathogen-associated molecular patterns. *Vaccine*, 34, 2188–2196.
- Ge, S., Li, J., Fan, X., Liu, F., Li, L., Wang, Q., Ren, W., Bao, J., Liu, C., Wang, H., Liu, Y., Zhang, Y., Xu, T., Wu, X., Wang, Z. (2018).** Molecular Characterization of African Swine Fever Virus, China, 2018. *Emerg. Infect. Dis.*, 24, 2131–2133.
- Giammarioli, M., Gallardo, C., Oggiano, A., Iscaro, C., Nieto, R., Pellegrini, C., Dei Giudici, S., Arias, M., De Mia, G. M. (2011).** Genetic characterisation of African swine fever viruses from recent and historical outbreaks in Sardinia (1978–2009). *Virus Genes*, 42, 377–387.
- Goller, K. V., Malogolovkin, A. S., Katorkin, S., Kolbasov, D., Titov, I., Höper, D., Beer, M., Keil, G. M., Portugal, R., Blome, S. (2015).** Tandem repeat insertion in African swine fever virus, Russia, 2012. *Emerg. Infect. Dis.*, 21, 731–732.
- Gomez-Puertas, P., Rodriguez, F., Oviedo, J. M., Ramiro-Ibáñez, F., Ruiz-Gonzalvo, F., Alonso, C., Escribano, J. M. (1996).** Neutralizing antibodies to different proteins of African swine fever virus inhibit both virus attachment and internalization. *J. Virol.*, 70, 5689–94.
- Gomez-Puertas, P., Rodriguez, F., Oviedo, J. M., Brun, A., Alonso, C., Escribano, J. M. (1998).** The African swine fever virus proteins p54 and p30 are involved in two distinct steps of virus attachment and both contribute to the antibody-mediated protective immune response. *Virology*, 243, 461–471.
- Gomez-Villamandos, J. C., Hervas, J., Mendez, A., Carrasco, L., Martin de las Mulas, J., Villeda, C. J., Wilkinson, P. J., Sierra, M. A. (1995).** Experimental African swine fever: apoptosis of lymphocytes and virus replication in other cells. *J. Gen. Virol.*, 76, 2399–2405.
- Gomez-Villamandos, J. C., Bautista, M. J., Hervas, J., Carrasco, L., Chacon-M. de Lara, F., Perez, J., Wilkinson, P. J., Sierra, M. A. (1996).** Subcellular changes in platelets in acute and subacute African swine fever. *J. Comp. Pathol.*, 115, 327–341.
- Gomez-Villamandos, J. C., Bautista, M. J., Sánchez-Cordón, P. J., Carrasco, L. (2013).** Pathology of African swine fever: The role of monocyte-macrophage. *Virus Res.*, 173, 140–149.
- Gomez del Moral, M., Ortuño, E., Fernández-Zapatero, P., Alonso, F., Alonso, C., Ezquerro, A., Domínguez, J. (1999).** African swine fever virus infection induces tumor necrosis factor alpha production: implications in pathogenesis. *J. Virol.*, 73, 2173–80.

Bibliografía

- Gonzalez, A., Talavera, A., Almendral, J. M., Viñuela, E. (1986).** Hairpin loop structure of African swine fever virus DNA. *Nucleic Acids Res.*, *14*, 6835–6844.
- Guinat, C., Gogin, A., Blome, S., Keil, G., Pollin, R., Pfeiffer, D. U., Dixon, L. (2016).** Transmission routes of African swine fever virus to domestic pigs: current knowledge and future research directions. *Vet. Rec.*, *178*, 262–267.
- Gutierrez-Castaneda B., L. Reis, Kollnberger, C. A., M. E. Parkhouse. (2008).** Expression, cellular localization and antibody responses of the African swine fever virus genes B602L and K205R. *Arch Virol*, *153*, 2303–2306.
- Habib, M., Hussain, I., Fang, W. H., Rajput, Z. I., Yang, Z. Z., Irshad, H. (2006).** Inactivation of infectious bursal disease virus by binary ethylenimine and formalin. *J. Zhejiang Univ. Sci. B*, *7*, 320–323.
- Halbroth, B. R., Sebastian, S., Poyntz, H. C., Bregu, M., Cottingham, M. G., Hill, A. V. S., Spencer, A. J. (2018).** Development of a Molecular Adjuvant to Enhance Antigen-Specific CD8+ T Cell Responses. *Sci. Rep.*, *8*, 1–14.
- Heath, C. M., Windsor, M., Wileman, T. (2001).** Aggresomes Resemble Sites Specialized for Virus Assembly *7*, *153*, 449–455.
- Hernaiz, B., Alonso, C. (2010).** Dynamin- and Clathrin-Dependent Endocytosis in African Swine Fever Virus Entry. *Journal Virol.*, *84*, 2100–2109.
- Hernaiz, B., Guerra, M., Salas, M. L., Andrés, G. (2016).** African Swine Fever Virus Undergoes Outer Envelope Disruption, Capsid Disassembly and Inner Envelope Fusion before Core Release from Multivesicular Endosomes. *PLoS Pathog.*, *12*, 1–32.
- Hess, W. R. (1971).** African swine fever., 1–33.
- Hess, W. R. (1981).** African swine fever: a reassessment. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, *25*, 39–69.
- Heuschele, W. P., Coggins, L. (1966).** Studies on the transmission of African swine fever virus by arthropods. *Proceedings. United States Live Stock Sanit. Assoc.* 1965, 94–100.
- Heuschele, W. P., Coggins, L. (1969).** Epizootiology of African swine fever virus in warthogs. *Bull. Epizoot. Dis. Afr.*, *17*, 173–183.
- Heuschele, W. P., Stone, S. ., Coggins, L. (1965).** Observations on the epizootiology of African swine fever. *Bull. Epizoot. Dis. Afr.*, *13*, 157–160.
- Hübner, A., Petersen, B., Keil, G. M., Niemann, H., Mettenleiter, T. C., Fuchs, W. (2018).** Efficient inhibition of African swine fever virus replication by CRISPR/Cas9 targeting of the viral p30 gene (CP204L). *Sci. Rep.*, *8*, 1449.
- Hurtado, C., Bustos, M. J., Carrascosa, A. L. (2010).** The use of COS-1 cells for studies of field and laboratory African swine fever virus samples. *J. Virol. Methods*, *164*, 131–4.
- Hurtado, C., Bustos, M. J., Granja, A. G., de León, P., Sabina, P., López-Viñas, E., Gómez-Puertas, P., Revilla, Y., Carrascosa, A. L. (2011).** The African swine fever virus lectin EP153R modulates the surface membrane expression of MHC class I antigens. *Arch. Virol.*, *156*, 219–234.

- Ivanov, V., Efremov, E. E., Novikov, B. V., Balyshev, V. M., Tsibanov, S. Z., Kalinovskiy, T., Kolbasov, D. V., Niedzwiecki, A., Rath, M. (2011). Vaccination with viral protein-mimicking peptides postpones mortality in domestic pigs infected by African swine fever virus. *Mol. Med. Rep.*, 4, 395–401.
- Jabbal-Gill, I. (2010). Nasal vaccine innovation. *J. Drug Target.*, 18, 771–786.
- Jankovich, J. K., Chapman, D., Hansen, D. T., Robida, M. D., Loskutov, A., Craciunescu, F., Borovkov, A., Kibler, K., Goatley, L., King, K., Netherton, C. L., Taylor, G., Jacobs, B., Sykes, K., Dixon, L. K. (2018). Immunisation of pigs by DNA prime and recombinant vaccinia virus boost to identify and rank African swine fever virus immunogenic and protective proteins. *J. Virol.*, 92, JVI.02219-17.
- Jimenez-Periañez, A., Abos Gracia, B., Lopez Relación, J., Diez-Rivero, C. M., Reche, P. A., Martínez-Naves, E., Matveyeva, E., Gómez del Moral, M. (2013). Mesoporous Silicon Microparticles Enhance MHC Class I Cross-Antigen Presentation by Human Dendritic Cells. *Clin. Dev. Immunol.*, 2013, 1–9.
- Jori, F., Vial, L., Penrith, M. L., Perez-Sanchez, R., Etter, E., Albina, E., Michaud, V., Roger, F. (2013). Review of the sylvatic cycle of African swine fever in sub-Saharan Africa and the Indian ocean. *Virus Res.*, 173, 212–227.
- Jouvenet, N., Monaghan, P., Way, M., Wileman, T. (2004). Transport of African Swine Fever Virus from Assembly Sites to the Plasma Membrane Is Dependent on Microtubules and Conventional Kinesin. *Journal Virol.*, 78, 7990–8001.
- Jurado, C., Fernández-Carrión, E., Mur, L., Rolesu, S., Laddomada, A., Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2018). Why is African swine fever still present in Sardinia? *Transbound. Emerg. Dis.*, 65, 557–566.
- Kay-Jackson, P. C., Goatley, L. C., Cox, L., Miskin, J. E., Parkhouse, R. M. E., Wienands, J., Dixon, L. K. (2004). The CD2v protein of African swine fever virus interacts with the actin-binding adaptor protein SH3P7. *J. Gen. Virol.*, 85, 119–130.
- Khomenko, S., Beltran-Alcrudo, D., Rozstalnyy, A., Gogin, A., Kolbasov, D., Pinto, J., Lubroth, J., Martin, V. (2013). African swine fever in the Russian Federation: risk factors for Europe and beyond. *FAO Empres. Watch*, 28, 14.
- King, K., Chapman, D., Argilaguët, J. M., Fishbourne, E., Hutet, E., Cariolet, R., Hutchings, G., Oura, C. A. L. L., Netherton, C. L., Moffat, K., Taylor, G., Le Potier, M. F., Dixon, L. K., Takamatsu, H. H. (2011). Protection of European domestic pigs from virulent African isolates of African swine fever virus by experimental immunisation. *Vaccine*, 29, 4593–4600.
- Kleiboeker, S. B., Scoles, G. A. (2001). Pathogenesis of African swine fever virus in *Ornithodoros* ticks. *Anim. Heal. Res. Rev.*, 2, 121–128.
- Kleiboeker, S. B. (2002). Swine fever: classical swine fever and African swine fever. *Vet. Clin. North Am. - Food Anim. Pract.*, 18, 431–451.
- Kollnberger, S. D., Parkhouse, R. M. E., Gutierrez-Castañeda, B., Foster-Cuevas, M., Corteyn, A. (2002). Identification of the principal serological immunodeterminants of African swine fever virus by screening a virus cDNA

Bibliografía

- library with antibody. *J. Gen. Virol.*, *83*, 1331–1342.
- Korenkov, D., Isakova-Sivak, I., Rudenko, L. (2018).** Basics of CD8 T-cell immune responses after influenza infection and vaccination with inactivated or live attenuated influenza vaccine. *Expert Rev. Vaccines*, *17*, 977–987.
- Lacasta, A., Ballester, M., Monteagudo, P. L., Rodriguez, J. M., Salas, M. L., Accensi, F., Pina-Pedrero, S., Bensaid, A., Argilaguuet, J., Lopez-Soria, S., Hutet, E., Le Potier, M. F., Rodriguez, F. (2014).** Expression Library Immunization Can Confer Protection against Lethal Challenge with African Swine Fever Virus. *J. Virol.*, *88*, 13322–13332.
- Lacasta, A., Monteagudo, P. L., Jiménez-Marín, Á., Accensi, F., Ballester, M., Argilaguuet, J., Galindo-Cardiel, I., Segalés, J., Salas, M. L., Domínguez, J., Moreno, Á., Garrido, J. J., Rodríguez, F. (2015).** Live attenuated African swine fever viruses as ideal tools to dissect the mechanisms involved in viral pathogenesis and immune protection. *Vet. Res.*, *46*, 135.
- Larghi, O. P., Nebel, A. E. (1980).** Rabies virus inactivation by binary ethylenimine: New method for inactivated vaccine production. *J. Clin. Microbiol.*, *11*, 120–122.
- Leitão, A., Cartaxeiro, C., Coelho, R., Cruz, B., Parkhouse, R. M. E., Potugal, F., Vigário, J. D., Martin, L. (2001).** The non-haemadsorbing African swine fever virus isolate ASFV/NH/P68 provides a model for defining the protective anti-virus immune response. *J. Gen. Virol.*, *82*, 513–523.
- Lewis, T., Zsak, L., Burrage, T. G., Lu, Z., Kutish, G. F., Neilan, J. G., Rock, D. L. (2000).** An African swine fever virus ERV1-ALR homologue, 9GL, affects virion maturation and viral growth in macrophages and viral virulence in swine. *J. Virol.*, *74*, 1275–85.
- Lokhandwala, S., Waghela, S. D., Bray, J., Martin, C. L., Sangewar, N., Charendoff, C., Shetti, R., Ashley, C., Chen, C. H., Berghman, L. R., Mwangi, D., Dominowski, P. J., Foss, D. L., Rai, S., Vora, S., Gabbert, L., Burrage, T. G., Brake, D., Neilan, J., Mwangi, W. (2016).** Induction of robust immune responses in swine by using a cocktail of adenovirus-vectored African swine fever virus antigens. *Clin. Vaccine Immunol.*, *23*, 888–900.
- Lopera-Madrid, J., Osorio, J. E., He, Y., Xiang, Z., Adams, L. G., Laughlin, R. C., Mwangi, W., Subramanya, S., Neilan, J., Brake, D., Burrage, T. G., Brown, W. C., Clavijo, A., Bounpheng, M. A. (2017).** Safety and immunogenicity of mammalian cell derived and Modified Vaccinia Ankara vectored African swine fever subunit antigens in swine. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, *185*, 20–33.
- Lubisi, B. A., Bastos, A. D. S., Dwarka, R. M., Vosloo, W. (2005).** Molecular epidemiology of African swine fever in East Africa. *Arch. Virol.*, *150*, 2439–2452.
- Lubisi, B. A., Bastos, A. D. S., Dwarka, R. M., Vosloo, W. (2007).** Intra-genotypic resolution of African swine fever viruses from an East African domestic pig cycle: A combined p72-CVR approach. *Virus Genes*, *35*, 729–735.
- Macleod, M. K. L., Mckee, A. S., David, A., Wang, J., Mason, R., Kappler, J. W., Marrack, P. (2011).** Vaccine adjuvants aluminum and monophosphoryl lipid A provide distinct signals to generate protective cytotoxic memory CD8 T cells. *108*, 7914–7919.

- Mair, K. H., Koinig, H., Gerner, W., Höhne, J., Bretthauer, J., Kroll, J. J., Roof, M. B., Saalmüller, A., Stadler, K., Libanova, R. (2015).** Carbopol improves the early cellular immune responses induced by the modified-live vaccine Ingelvac PRRS 1 MLV, *176*, 352–357.
- Malmquist W.A. (1960).** Hemadsorption and cytopathic effect produced by African Swine Fever virus in swine bone marrow and buffy coat cultures. *Am J Vet Res*, *21*, 104–108.
- Malmquist, W. A. (1963).** Serologic and immunologic studies with African swine fever virus. *Am. J. Vet. Res.*, *24*, 450–459.
- Malogolovkin, A., Yelsukova, A., Gallardo, C., Tsybanov, S., Kolbasov, D. (2012).** Molecular characterization of African swine fever virus isolates originating from outbreaks in the Russian Federation between 2007 and 2011. *Vet. Microbiol.*, *158*, 415–419.
- Malogolovkin, A., Burmakina, G., Titov, I., Sereda, A., Gogin, A., Baryshnikova, E., Kolbasov, D. (2015a).** Comparative analysis of african swine fever virus genotypes and serogroups. *Emerg. Infect. Dis.*, *21*, 312–315.
- Malogolovkin, A., Burmakina, G., Tulman, E. R., Delhon, G., Diel, D. G., Salnikov, N., Kutish, G. F., Kolbasov, D., Rock, D. L. (2015b).** African swine fever virus CD2v and C-type lectin gene loci mediate serological specificity. *J. Gen. Virol.*, *96*, 866–873.
- Manso-Ribeiro, J., Azevedo, J. A. R., Teixeira, M. J. O., Braco Forte, M. C., Rodrigues Ribeiro, A. M., Oliveira Noronha, F., Grave Pereira, C., Dias Vigarrio, J. (1958).** An atypical strain of swine fever virus in Portugal. FT Peste porcine provoquée par une souche différente (Souche L) de la souche classique. *Bull. l'Office Int. Des Epizoot.*, *50*, 516–534.
- Martins, C. L. V., Leitão, A. C. (1994).** Porcine immune responses to African swine fever virus (ASFV) infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, *43*, 99–106.
- McKercher, P. D., Hess, W. R., Hamdy, F. (1978).** Residual viruses in pork products. *Appl. Environ. Microbiol.*, *35*, 142–145.
- McVicar, J. W. (1984).** Quantitative aspects of the transmission of African swine fever. *Am. J. Vet. Res.*, *45*, 1535–1541.
- Mebus, C. A. (1988).** African swine fever. *Adv. Virus Res.*, *35*, 251–269.
- Mebus, C. A., Dardiri, A. H. (1980).** Western hemisphere isolates of African swine fever virus: asymptomatic carriers and resistance to challenge inoculation. *Am. J. Vet. Res.*, *41*, 1867–1869.
- Mebus, C. A., House, C., Ruiz-Gonzalvo, F., Pineda, J. M., Tapiador, J., Pire, J. J., Bergada, J., Yedloutschnig, R. J., Sahu, S., Becerra, V., Sanchez-Vizcaino, J. M. (1993).** Survival of foot and mouth disease, African swine fever, and hog cholera viruses in Spanish serrano cured hams and Iberian cured hams, shoulders and loins. *Food Microbiol.*, *10*, 133–143.
- Meireles, M., Costa, J. V. (1994).** Nucleotide sequence of the telomeric region of the African swine fever virus genome. *Virology*, *203*, 193–196.

Bibliografía

- MINISTERIO DE AGRICULTURA, P. Y. A. (2019).** Programa Nacional De Vigilancia Sanitaria Porcina Adaptado Al Incremento De Riesgo De Incursión De Peste Porcina Africana en La UE (pp. 1–18).
- Misinzó, G., Kasanga, C. J., Mpelumbe-Ngeleja, C., Masambu, J., Kitambi, A., van Doorselaere, J. (2012).** African swine fever virus, Tanzania, 2010–2012. *Emerg. Infect. Dis.*, *18*, 2081–2083.
- Monteagudo, P. L., Lacasta, A., López, E., Bosch, L., Collado, J., Pina-pedrero, S., Correa-fiz, F., Accensi, F. (2017).** BA71ΔCD2: a New Recombinant Live Attenuated African Swine Fever Virus with Cross-Protective Capabilities. *Journal Virol.*, *91*, 1–17.
- Montgomery, E. R. (1921).** On A Form of Swine Fever Occurring in British East Africa (Kenya Colony). *J. Comp. Pathol. Ther.*, *34*, 159–191.
- Muangkram, Y., Sukmak, M., Wajjwalku, W. (2015).** Phylogeographic analysis of African swine fever virus based on the p72 gene sequence. *Genet. Mol. Res.*, *14*, 4566–4574.
- Mulumba-Mfumú, L. K., Goatley, L. C., Saegerman, C., Takamatsu, H. H., Dixon, L. K. (2016).** Immunization of African Indigenous Pigs with Attenuated Genotype I African Swine Fever Virus OURT88/3 Induces Protection Against Challenge with Virulent Strains of Genotype I. *Transbound. Emerg. Dis.*, *63*, e323–e327.
- Mulumba-Mfumú, L. K., Achenbach, J. E., Mauldin, M. R., Dixon, L. K., Tshilenge, C. G., Thiry, E., Moreno, N., Blanco, E., Saegerman, C., Lamien, C. E., Diallo, A. (2017).** Genetic assessment of african swine fever isolates involved in outbreaks in the Democratic Republic Of Congo between 2005 and 2012 reveals co-circulation of p72 genotypes I, IX and XIV, including 19 variants. *Viruses*, *9*, 15.
- Mur, L., Atzeni, M., Martínez-López, B., Feliziani, F., Rolesu, S., Sanchez-Vizcaino, J. M. (2016).** Thirty-Five-Year Presence of African Swine Fever in Sardinia: History, Evolution and Risk Factors for Disease Maintenance. *Transbound. Emerg. Dis.*, *63*, e165–e177.
- Neilan, J. G., Lu, Z., Kutish, G. F., Zsak, L., Burrage, T. G., Borca, M. V., Carrillo, C., Rock, D. L. (1997).** A BIR motif containing gene of African swine fever virus, 4CL, is nonessential for growth in vitro and viral virulence. *Virology*, *230*, 252–264.
- Neilan, J. G., Zsak, L., Lu, Z., Kutish, G. F., Afonso, C. L., Rock, D. L. (2002).** Novel Swine Virulence Determinant in the Left Variable Region of the African Swine Fever Virus Genome. *J. Virol.*
- Neilan, J. G., Zsak, L., Lu, Z., Burrage, T. G., Kutish, G. F., Rock, D. L. (2004).** Neutralizing antibodies to African swine fever virus proteins p30, p54, and p72 are not sufficient for antibody-mediated protection. *Virology*, *213*, 337–342.
- Netherton, C. L., Wileman, T. E. (2013).** African swine fever virus organelle rearrangements. *Virus Res.*, *173*, 76–86.
- Nix, R. J., Gallardo, C., Hutchings, G., Blanco, E., Dixon, L. K. (2006).** Molecular epidemiology of African swine fever virus studied by analysis of four variable

- genome regions. *Arch. Virol.*, 151, 2475–2494.
- Nogal, M. L., González de Buitrago, G., Rodríguez, C., Cubelos, B., Carrascosa, A. L., Salas, M. L., Revilla, Y. (2001).** African swine fever virus IAP homologue inhibits caspase activation and promotes cell survival in mammalian cells. *J. Virol.*, 75, 2535–43.
- Norley, S. G., Wardley, R. C. (1983).** Investigation of porcine natural-killer cell activity with reference to African swine-fever virus infection. *S. Immunology*, 49, 593.
- Nunes-Correia, I., Rodríguez, J. M., Eulálio, A., Carvalho, A. L., Citovsky, V., Simões, S., Faro, C., Salas, M. L., Pedroso de Lima, M. C. (2008).** African swine fever virus p10 protein exhibits nuclear import capacity and accumulates in the nucleus during viral infection. *Vet. Microbiol.*, 130, 47–59.
- O'Donnell, V., Holinka, L. G., Krug, P. W., Gladue, D. P., Carlson, J., Sanford, B., Alfano, M., Kramer, E., Lu, Z., Arzt, J., Reese, B., Carrillo, C., Risatti, G. R., Borca, M. V. (2015a).** African Swine Fever Virus Georgia 2007 with a Deletion of Virulence-Associated Gene 9GL (B119L), when Administered at Low Doses, Leads to Virus Attenuation in Swine and Induces an Effective Protection against Homologous Challenge. *J. Virol.*, 89, 8556–66.
- O'Donnell, V., Holinka, L. G., Gladue, D. P., Sanford, B., Krug, P. W., Lu, X., Arzt, J., Reese, B., Carrillo, C., Risatti, G. R., Borca, M. V. (2015b).** African Swine Fever Virus Georgia Isolate Harboring Deletions of MGF360 and MGF505 Genes Is Attenuated in Swine and Confers Protection against Challenge with Virulent Parental Virus. *J. Virol.*, 89, 6048–6056.
- O'Donnell, V., Holinka, L. G., Sanford, B., Krug, P. W., Carlson, J., Pacheco, J. M., Reese, B., Risatti, G. R., Gladue, D. P., Borca, M. V. (2016).** African swine fever virus Georgia isolate harboring deletions of 9GL and MGF360/505 genes is highly attenuated in swine but does not confer protection against parental virus challenge. *Virus Res.*, 221, 8–14.
- O'Donnell, V., Risatti, G. R., Holinka, L. G., Krug, P. W., Carlson, J., Velazquez-Salinas, L., Azzinaro, P. A., Gladue, D. P., Borca, M. V. (2017).** Simultaneous Deletion of the 9GL and UK Genes from the African Swine Fever Virus Georgia 2007 Isolate Offers Increased Safety and Protection against Homologous Challenge. *J. Virol.*, 91, e01760-16.
- OIE Terrestrial Manual. (2018).** Chapter 3.8.1. African Swine Fever. *Suidae 3.8*, 1525–1539.
- Oliveros, M., Garcia-Escudero, R., Alejo, A., Vinuela, E., Salas, M. L., Salas, J. (1999).** African swine fever virus dUTPase is a highly specific enzyme required for efficient replication in swine macrophages. *J. Virol.*, 73, 8934–8943.
- Onisk, D. V., Borca, M. V., Kutish, S., Kramer, E., Irusta, P., Rock, D. L. (1994).** Passively Transferred African Swine Fever Virus Antibodies Protect Swine against Lethal Infection. *Virology*, 198, 350–354.
- Oura, C. A. L., Powell, P. P., Parkhouse, R. M. E. (1998).** African swine fever: A disease characterized by apoptosis. *J. Gen. Virol.*, 79, 1427–1438.

Bibliografia

- Oura, C., Denyer, M. S., Takamatsu, H., Parkhouse, R. M. E. (2005).** In vivo depletion of CD8+ T lymphocytes abrogates protective immunity to African swine fever virus. *J. Gen. Virol.*, *86*, 2445–2450.
- Owolodun, O. A., Bastos, A. D. S., Antiabong, J. F., Ogedengbe, M. E., Ekong, P. S., Yakubu, B. (2010).** Molecular characterisation of African swine fever viruses from Nigeria (2003-2006) recovers multiple virus variants and reaffirms CVR epidemiological utility. *Virus Genes*, *41*, 361–368.
- Pan, I. C., Hess, W. R. (1984).** Virulence in African swine fever: its measurement and implications. *Am. J. Vet. Res.*, *45*, 361–366.
- Penrith, M. L., Vosloo, W., Vosloo, W. (2009).** Review of African swine fever: transmission, spread and control. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, *80*, 58–62.
- Penrith, M. L., Vosloo, W., Jori, F., Bastos, A. D. (2013).** African swine fever virus eradication in Africa. *Virus Res.*, *173*, 228–246.
- Perez, J., Fernandez, A. I., Sierra, M. A., Herraes, P., Fernandez, A. I., Martin de las Mulas, J. (1998).** Serological and immunohistochemical study of African swine fever in wild boar in Spain. *Vet. Rec.*, *143*, 136–139.
- Petrini, S., Feliziani, F., Casciari, C., Giammarioli, M., Torresi, C., Mia, G. M. De. (2019).** Survival of African swine fever virus (ASFV) in various traditional Italian dry-cured meat products. *Prev. Vet. Med.*, *162*, 126–130.
- Plowright, W., Parker, J., Peirce, M. A. (1969).** African swine fever virus in ticks (*Ornithodoros moubata*, murray) collected from animal burrows in Tanzania. *Nature*, *221*, 1071–1073.
- Polo-Jover, F., Sanchez Botija, C. (1961).** African swine fever in Spain. FT II. Informe sobre la peste porcina Africana en Espana. Enero-Abril 1961 (evolucion, diagnostico y profilaxis). *Bull. l'Office Int. Des Epizoot.*
- Powell, P. P., Dixon, L. K., Parkhouse, R. M. E., Al, P. E. T., Irol, J. V. (1996).** An Ikb Homolog Encoded by African Swine Fever Virus Provides a Novel Mechanism for Downregulation of Proinflammatory Cytokine Responses in Host Macrophages. *Journal Virol.*, *70*, 8527–8533.
- Quembo, C. J., Jori, F., Vosloo, W., Heath, L. (2018).** Genetic characterization of African swine fever virus isolates from soft ticks at the wildlife/domestic interface in Mozambique and identification of a novel genotype. *Transbound. Emerg. Dis.*, *65*, 420–431.
- Reis, A. L., Parkhouse, R. M. E., Penedos, A. R., Martins, C., Leitão, A. (2007).** Systematic analysis of longitudinal serological responses of pigs infected experimentally with African swine fever virus. *J. Gen. Virol.*, *88*, 2426–2434.
- Reis, A. L., Abrams, C. C., Goatley, L. C., Netherton, C., Chapman, D. G., Sanchez-Cordon, P., Dixon, L. K. (2016).** Deletion of African swine fever virus interferon inhibitors from the genome of a virulent isolate reduces virulence in domestic pigs and induces a protective response. *Vaccine*.
- Reis, A. L., Netherton, C., Dixon, L. K. (2017a).** Unraveling the Armor of a Killer: Evasion of Host Defenses by African Swine Fever Virus. *J. Virol.*, *91*, e02338-16.

- Reis, A. L., Goatley, L. C., Jabbar, T., Sanchez-Cordon, P. J., Netherton, C. L., Chapman, D. G., Dixon, L. K. (2017b). Deletion of the African swine fever virus gene DP148R does not reduce virus replication in culture but reduces virus virulence in pigs and induces high levels of protection against challenge. *J. Virol.*, *91*, JVI.01428-17.
- Revilla, Y., Gonzalez de Buitrago, G., Carrascosa, A. L. (2004). The C-type lectin homologue gene (EP153R) of African swine fever virus inhibits apoptosis both in virus infection and in heterologous expression. *Virology*, *326*, 160–170.
- Rodriguez, F., Ley, V., Gómez-Puertas, P., García, R., Rodriguez, J. F., Escribano, J. M. (1996). The structural protein p54 is essential for African swine fever virus viability. *Virus Res.*, *40*, 161–167.
- Rodriguez, I., Nogal, M. L., Redrejo-Rodriguez, M., Bustos, M. J., Salas, M. L. (2009). The African Swine Fever Virus Virion Membrane Protein pE248R Is Required for Virus Infectivity and an Early Postentry Event. *J. Virol.*, *83*, 12290–12300.
- Rodriguez, J. M., Almazán, F., Viñuela, E., Rodriguez, J. F. (1992). Genetic manipulation of African swine fever virus: Construction of recombinant viruses expressing the β -galactosidase gene. *Virology*, *188*, 67–76.
- Rodriguez, J. M., Yáñez, R. J., Almazán, F., Viñuela, E., Rodriguez, J. F. (1993). African swine fever virus encodes a CD2 homolog responsible for the adhesion of erythrocytes to infected cells. *J. Virol.*, *67*, 5312–20.
- Rodriguez, J. M., Salas, M. L., Viñuela, E. (1996). Intermediate class of mRNAs in African swine fever virus. *J. Virol.*, *70*, 8584–8589.
- Rodriguez, J. M., Garcia-Escudero, R., Salas, M. L., Andres, G. (2004). African Swine Fever Virus Structural Protein p54 Is Essential for the Recruitment of Envelope Precursors to Assembly Sites. *J. Virol.*, *78*, 4299–4313.
- Rodriguez, J. M., Salas, M. L. (2013). African swine fever virus transcription. *Virus Res.*, *173*, 15–28.
- Rodriguez, J. M., Moreno, L. T., Alejo, A., Lacasta, A., Rodriguez, F., Salas, M. L. (2015). Genome sequence of african swine fever virus BA71, the virulent parental strain of the nonpathogenic and tissue-culture adapted BA71V. *PLoS One*, *10*, 1–22.
- Rojo, G., Garcia-Beato, R., Viñuela, E., Salas, M. L., Salas, J. (1999). Replication of African swine fever virus DNA in infected cells. *Virology*, *257*, 524–536.
- Rowlands, R. J., Michaud, V., Heath, L., Hutchings, G., Oura, C., Vosloo, W., Dwarka, R., Onashvili, T., Albina, E., Dixon, L. K. (2008). African swine fever virus isolate, Georgia, 2007. *Emerg. Infect. Dis.*, *14*, 1870–1874.
- Ruiz-Gonzalvo, F., Carnero, M. E., Bruyel, V. (1981). Immunological responses of pigs to partially attenuated African swine fever virus and their resistance to virulent homologous and heterologous viruses. *Wilkinson, P.J. African Swine Fever, Proc. EUR 8466 EN, CEC/FAO, Res. Semin, Sardinia*, 206–216.
- Ruiz-Gonzalvo, F., Carnero, M. E., Caballero, C., Martínez, J. (1986). Inhibition of African swine fever infection the presence of immune sera in vivo and in vitro.

Bibliografía

- Am. J. Vet. Res.*, 47, 1249–1252.
- Ruiz-Gonzalvo, F., Coll, J. M. (1993).** Characterization of a soluble Hemagglutinin induced in African Swine Fever Virus-infected cells. *Virology*, 196, 769–777.
- Ruiz-Gonzalvo, F., Rodríguez, F., Escribano, J. M. (1996).** Functional and immunological properties of the baculovirus-expressed hemagglutinin of African swine fever virus. *Virology*, 218, 285–289.
- Rweyemamu, M. M., Umehara, O., Giorgi, W., Medeiros, R., Lucca Neto, D., Baltazar, M. (1989).** Effect of formaldehyde and binary ethyleneimine (BEI) on the integrity of foot and mouth disease virus capsid. *Rev. Sci. Tech. - Off. Int. Des Epizoot.*, 8, 747–764.
- Salas, M. L., Kuznar, J., Viñuela, E. (1981).** Polyadenylation, methylation, and capping of the RNA synthesized in vitro by African swine fever virus. *Virology*, 113, 484–491.
- Salas, M. L., Andres, G. (2013).** African swine fever virus morphogenesis. *Virus Res.*, 173, 29–41.
- Salguero, F. J., Sanchez-Cordon, P. J., Núñez, A., Fernández de Marco, M., Gomez-Villamandos, J. C. (2005).** Proinflammatory cytokines induce lymphocyte apoptosis in acute African swine fever infection. *J. Comp. Pathol.*, 132, 289–302.
- Salguero, F. J., Gil, S., Revilla, Y., Gallardo, C., Arias, M., Martins, C. (2008).** Cytokine mRNA expression and pathological findings in pigs inoculated with African swine fever virus (E-70) deleted on A238L. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 124, 107–119.
- Sanchez-Botija, C. (1963).** Reservorios del virus de la peste porcina africana. Investigación del virus de la P.P.A en los artrópodos mediante la prueba de hemadsorción. *Bull. l'Office Int. Des Epizoot.*, 68, 895–899.
- Sanchez-Botija, C. (1982).** African swine fever. New developments. *Rev. Sci. Tech. l'Office Int. Des Epizoot.*, 1, 1065–1094.
- Sanchez-Cordon, P. J., Chapman, D., Jabbar, T., Reis, A. L., Goatley, L., Netherton, C. L., Taylor, G., Montoya, M., Dixon, L. (2017).** Different routes and doses influence protection in pigs immunised with the naturally attenuated African swine fever virus isolate OURT88/3. *Antiviral Res.*, 138, 1–8.
- Sanchez-Cordon, P. J., Jabbar, T., Berrezaie, M., Chapman, D., Reis, A., Sastre, P., Rueda, P., Goatley, L., Dixon, L. K. (2018).** Evaluation of protection induced by immunisation of domestic pigs with deletion mutant African swine fever virus Benin Δ MGF by different doses and routes. *Vaccine*, 36, 707–715.
- Sanchez-Vellisco, C. (1996).** ERRADICACIÓN DE LA PESTE PORCINA AFRICANA: Una larga historia de esfuerzos humanos y materiales en la lucha contra una enfermedad.
- Sanchez-Vizcaino, J. M., Mur, L., Martínez-López, B. (2012).** African Swine Fever: An Epidemiological Update. *Transbound. Emerg. Dis.*, 59, 27–35.
- Sanchez-Vizcaino, J. M., Mur, L., Gomez-Villamandos, J. C., Carrasco, L. (2015).** An Update on the Epidemiology and Pathology of African Swine Fever. *J. Comp.*

- Pathol.*, 152, 9–21.
- Sanchez-Vizcaino, J. M., Mur, L., Bastos, A. D. S., Penrith, M. L. (2016).** New insights into the role of ticks in African swine fever epidemiology. *Rev. Sci. Tech. l'OIE*, 34, 503–511.
- Sanchez, E. G., Quintas, A., Pérez-Núñez, D., Nogal, M., Barroso, S., Carrascosa, Á. L., Revilla, Y. (2012).** African swine fever virus uses macropinocytosis to enter host cells. *PLoS Pathog.*, 8, e1002754.
- Sanford, B., Holinka, L. G., O'Donnell, V., Krug, P. W., Carlson, J., Alfano, M., Carrillo, C., Wu, P., Lowe, A., Risatti, G. R., Gladue, D. P., Borca, M. V. (2016).** Deletion of the thymidine kinase gene induces complete attenuation of the Georgia isolate of African swine fever virus. *Virus Res.*, 213, 165–171.
- Sanna, G., Dei Giudici, S., Bacciu, D., Angioi, P. P., Giammarioli, M., De Mia, G. M., Oggiano, A. (2017).** Improved Strategy for Molecular Characterization of African Swine Fever Viruses from Sardinia, Based on Analysis of p30, CD2V and I73R/I329L Variable Regions. *Transbound. Emerg. Dis.*, 64, 1280–1286.
- Schlafer, D. H., Mebus, C. A., McVicar, J. W. (1984).** African swine fever in neonatal pigs: passively acquired protection from colostrum or serum of recovered pigs. *Am. J. Vet. Res.*, 45, 1367–1372.
- Schloer, G. M. (1982).** Kinetics of inactivation of African swine fever antigen with Binary Ethylemine. *States, United Heal. Anim.*, 86, 253–260.
- Schloer, G. M. (1985).** Polypeptides and structure of African swine fever virus. *Virus Res.*, 3, 295–310.
- Schulz, K., Staubach, C., Blome, S. (2017).** African and classical swine fever: Similarities, differences and epidemiological consequences. *Vet. Res.*, 48, 1–13.
- Sereda, A. D., Imatdinov, A. R., Makarov, V. V. (2016).** The Haemadsorption at African swine fever (review). *Sel'skokhozyaistvennaya Biol.*, 51, 763–774.
- Silk, R. N., Bowick, G. C., Abrams, C. C., Dixon, L. K. (2007).** African swine fever virus A238L inhibitor of NF- κ B and of calcineurin phosphatase is imported actively into the nucleus and exported by a CRM1-mediated pathway. *J. Gen. Virol.*, 88, 411–419.
- Simulundu, E., Chambaro, H. M., Sinkala, Y., Kajihara, M., Ogawa, H., Mori, A., Ndebe, J., Dautu, G., Mataa, L., Lubaba, C. H., Simuntala, C., Fandamu, P., Simuunza, M., Pandey, G. S., Samui, K. L., Misinzo, G., Takada, A., Mweene, A. S. (2018).** Co-circulation of multiple genotypes of African swine fever viruses among domestic pigs in Zambia (2013–2015). *Transbound. Emerg. Dis.*, 65, 114–122.
- Sogo, J. M., Almendral, J. M., Talavera, A., Viñuela, E. (1984).** Terminal and internal inverted repetitions in African swine fever virus DNA. *Virology*, 133, 271–275.
- Sridhar, S., Brokstad, K., Cox, R. (2015).** Influenza Vaccination Strategies: Comparing Inactivated and Live Attenuated Influenza Vaccines, 3, 373–389.
- Steyn, D. G. (1932).** East African Virus Disease in Pigs. *18th Report, Dir. Vet. Serv. Anim. Ind. Union South Africa*, 99–109.

Bibliografía

- Stone, S. S., Hess, W. R. (1967).** Antibody response to inactivated preparations of African swine fever virus in pigs. *Am. J. Vet. Res.*, 28, 475–481.
- Suarez, C., Gutierrez-Berzal, J., Andres, G., Salas, M. L., Rodriguez, J. M. (2010).** African Swine Fever Virus Protein p17 Is Essential for the Progression of Viral Membrane Precursors toward Icosahedral Intermediates. *J. Virol.*, 84, 7484–7499.
- Sunwoo, S.-Y., Pérez-Núñez, D., Morozov, I., Sánchez, E., Gaudreault, N., Trujillo, J., Mur, L., Nogal, M., Madden, D., Urbaniak, K., Kim, I., Ma, W., Revilla, Y., Richt, J. (2019).** DNA-Protein Vaccination Strategy Does Not Protect from Challenge with African Swine Fever Virus Armenia 2007 Strain, 7, 12.
- Takamatsu, H. H., Denyer, M. S., Lacasta, A., Stirling, C. M. A., Argilaguët, J. M., Netherton, C. L., Oura, C. A. L., Martins, C., Rodríguez, F. (2013).** Cellular immunity in ASFV responses. *Virus Res.*, 173, 110–121.
- Thomson, G. R., Gainaru, M. D., van Dellen, A. F. (1979).** African swine fever: pathogenicity and immunogenicity of two non-haemadsorbing viruses. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 46, 149–154.
- Uittenbogaard, J. P., Zomer, B., Hoogerhout, P., Metz, B. (2011).** Reactions of β -propiolactone with nucleobase analogues, nucleosides, and peptides: Implications for the inactivation of viruses. *J. Biol. Chem.*, 286, 36198–36214.
- Valdeira, M. L., Geraldes, A. (1985).** Morphological study on the entry of African swine fever virus into cells. *Biol. Cell*, 55, 35–40.
- Vial, L., Wieland, B., Jori, F., Etter, E., Dixon, L., Roger, F. (2007).** African swine fever virus DNA in soft ticks, Senegal. *Emerg. Infect. Dis.*, 13, 1928–1931.
- Viñuela, E. (1985).** African swine fever virus. *Curr Top Microbiol Immunol.*, 116, 151–170.
- Vlasova, N., Varentsova, A., Shevchenko, I., Zhukov, I., Remyga, S., Gavrilova, V., Puzankova, O., Shevtsov, A., Zinyakov, N., Gruzdev, K., Shevchenko, I., Gruzdev, K. (2015).** Comparative Analysis of Clinical and Biological Characteristics of African Swine Fever Virus Isolates from 2013 Year Russian Federation. *Br. Microbiol. Res. J.*, 5, 203–215.
- Wang, X., Wu, J., Wu, Y., Chen, H., Zhang, S., Li, J., Xin, T., Jia, H., Hou, S., Jiang, Y., Zhu, H., Guo, X. (2018).** Inhibition of cGAS-STING-TBK1 signaling pathway by DP96R of ASFV China 2018/1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 506, 437–443.
- Wardley, R. C., Wilkinson, P. J., Hamilton, F. (1977).** African swine fever virus replication in porcine lymphocytes. *J. Gen. Virol.*, 37, 425–427.
- Wardley, R. C., Hamilton, F., Wilkinson, P. J. (1979).** The replication of virulent and attenuated strains of African swine fever virus in porcine macrophages. *Arch. Virol.*, 61, 217–225.
- Wardley, R. C., Norley, S. G., Wilkinson, P. J., Williams, S. (1985).** The role of antibody in protection against African swine fever virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 9, 201–212.
- Wesley, R. , Tuthill, A. . (1984).** Genome relatedness among African swine fever

- virus field isolates by restriction endonuclease analysis, 2, 53–62.
- Wilkinson, P. J. (1984).** The persistence of African swine fever in Africa and the Mediterranean. *Prev. Vet. Med.*, 2, 71–82.
- Wilkinson, P. J., Wardley, R. C., Williams, S. M. (1981).** African swine fever virus (Malta/78) in pigs. *J. Comp. Pathol.*, 91, 277–284.
- Yañez, R. J., Rodriguez, J. M., Nogal, M. L., Yuste, L., Enriquez, C., Rodriguez, J. F., Viñuela, E. (1995).** Analysis of the complete nucleotide sequence of African swine fever virus. *Virology*, 208, 249–78.
- Zaman, M., Chandrudu, S., Toth, I. (2013).** Strategies for intranasal delivery of vaccines. *Drug Deliv. Transl. Res.*, 3, 100–109.
- Zani, L., Forth, J. H., Forth, L., Nurmoja, I., Leidenberger, S., Henke, J., Carlson, J., Breidenstein, C., Viltrop, A., Höper, D., Sauter-Louis, C., Beer, M., Blome, S. (2018).** Deletion at the 5'-end of Estonian ASFV strains associated with an attenuated phenotype. *Sci. Rep.*, 8, 1–11.
- Zhang, J., Wang, M., Zhou, N., Shen, Y., Li, Y. (2018).** Evaluation of carbopol as an adjuvant on the effectiveness of progressive atrophic rhinitis vaccine. *Vaccine*, 36, 4477–4484.
- Zsak, L., Onisk, D. V., Afonso, C. L., Rock, D. L. (1993).** Virulent African Swine Fever Virus Isolates Are Neutralized by Swine Immune Serum and by Monoclonal Antibodies Recognizing a 72-kDa Viral Protein. *Virology*, 196, 596–602.
- Zsak, L., Caler, E., Lu, Z., Kutish, G. F., Neilan, J. G., Rock, D. L. (1998).** A nonessential African swine fever virus gene UK is a significant virulence determinant in domestic swine. *J. Virol.*, 72, 1028–35.

