UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Sanidad Animal

TESIS DOCTORAL

Estudio comparativo de la respuesta inmune inducida por dos tipos de vacunas (VLP e inactivada) frente al virus de la lengua azul en el ganado ovino

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ana Cristina Pérez de Diego Camacho

Directores

José Manuel Sánchez-Vizcaíno Rodríguez
Pedro José Sánchez Cordón

Madrid, 2012

© Ana Cristina Pérez de Diego Camacho, 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Centro VISAVET. Grupo SUAT

Departamento de Sanidad Animal

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

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Ana Cristina Pérez de Diego Camacho

Bajo la dirección de los Doctores:

José Manuel Sánchez-Vizcaíno Rodríguez
Pedro José Sánchez Cordón

Madrid, 2012

El Dr. José Manuel Sánchez-Vizcaíno Rodríguez, Doctor en Veterinaria y Catedrático del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid y

El Dr. Pedro José Sánchez Cordón, Doctor en Veterinaria y contratado del programa Ramón y Cajal en la Universidad de Córdoba

CERTIFICAN:

Que Dª Ana Cristina Pérez de Diego, licenciada en Veterinaria, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado ***"ESTUDIO COMPARATIVO DE LA RESPUESTA INMUNE INDUCIDA POR DOS TIPOS DE VACUNAS (VLP E INACTIVADA) FRENTE AL VIRUS DE LA LENGUA AZUL EN GANADO OVINO"***, que reúne los requisitos necesarios para ser presentado como Tesis Doctoral (con mención Europea).

En Madrid, a 16 de Abril de 2012

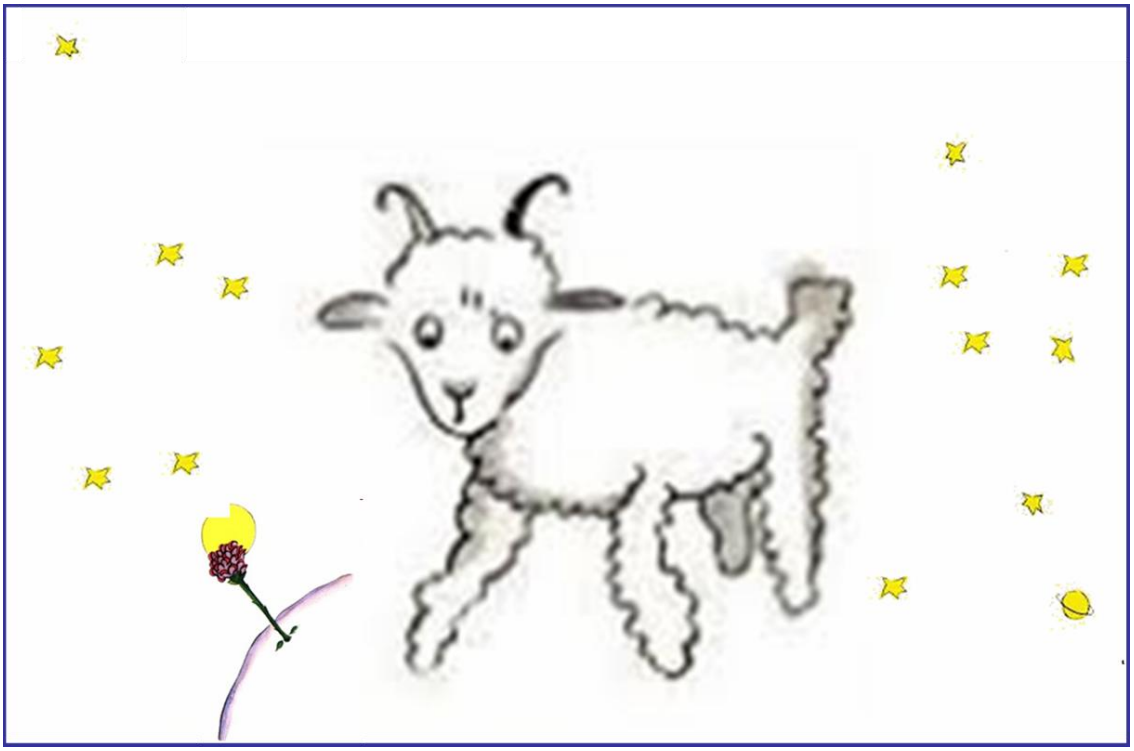
Prof. Dr. José Manuel Sánchez-Vizcaíno Rodríguez

Prof. Dr. Pedro José Sánchez Cordón

A mi familia

"Siempre que enseñes, enseña a la vez a dudar de lo que enseñas"

José Ortega y Gasset



AGRADECIMIENTOS

Imagen Agradecimientos: “El Principito” (Antoine de Saint-Exupéry)

Esta aventura del doctorado nunca hubiera llegado a buen puerto de no ser por mis directores, el Dr. José Manuel Sánchez-Vizcaíno, a quien debo agradecer entre otras muchas cosas, la confianza depositada y la oportunidad brindada y el Dr. Pedro José Sánchez Cordón, del que quiero destacar la paciencia demostrada durante las experiencias en el P3 y en la corrección de artículos. Gracias a los dos por haberme enseñado tanto de la ciencia y de la vida.

Con tan magníficos directores, no es de extrañar, que detrás haya un equipo de personas de cualidades excepcionales, el equipo “SUAT” Ana, Beatriz, Belén Ri, Belén Ro, Debo, Facundo, Guo, Irene, Luis, Mª Carmen, Marta, Raquel, Roci, Víctor, Chelo, Mar, Lina, Almu, Marina, Fer, Abby, Andrés y Esperón (para mí eres SUAT). Gracias por vuestra colaboración y vuestro apoyo en todos los momentos, gracias por todo chicos, y en especial a Irene por hacerme la vida más fácil en Madrid. A todos los CISA, que para mí son como una prolongación SUAT, Maria Jesús, Marisa, Nina (gracias por la ayuda con el Français), Ana, Jaime, Matilde…

Este trabajo de tesis ha podido realizarse gracias al proyecto BTVAC (SSPE-CT-2006-044211), de la Unión Europea, así como al convenio de colaboración entre la UCM y CZ Veterinaria S.A. y por supuesto gracias al programa FPU del Ministerio de Educación.

Agradezco también la ayuda de toda la gente que en algún momento ha colaborado con este trabajo, a la Asociación Nacional de Ganado selecto Churro (ANCHE), por el envío de sangres de animales vacunados, a la gente del Departamento de Producción, por dejarme sacar sangre a sus ovejas, y a Raquel Pérez, por explicarme cosas básicas de la expresión de genes. A Amalia y a Santiago Cano, por su ayuda con la Citometría de Flujo y con la Estadística respectivamente, porque las cosas son mucho más fáciles si alguien que sabe te ayuda. A Pfizer, CZ, la profesora Roy, Merial y al CISA, porque sin vacunas y sin virus, esto no hubiera sido posible.

A toda la gente que forma parte de VISAVET, en especial al equipo de Bioseguridad: María, Lauras, Pedro, y David ¿Qué sería de nosotros sin esas noches de sábado “pasadas por agua”?

A toutes les personnes qui travaillent dans le département de virologie UMR61 à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort/ANSES/INRA (Stephan, Coraline, Emmanuel, Damien, Bernard, Margot, Muhammad, Xiaocui Zhou, Jerome, Elodie, Dragan, Sylvie...), parce que vous êtes tous exceptionnels et que j'ai beaucoup appris de vous tous pendant mon séjour. Merci de m'avoir accueillie à bras ouverts.

A todos los compis del departamento de Sanidad Animal, Victorio, Verena, Carmen, Lola, Cutuli los Brunos, Lucas, Joaquín, Reyes, Flora, Reme, Sergio… Al equipo de la Hemeroteca, por esa efectividad a la hora de facilitarme artículos que de otra manera nunca hubiera conseguido, y a todas las personas que en la facultad (véase cafetería) te saludan con una sonrisa, es algo que se agradece.

A todos los alumnos internos (Cris, Laura, Almudena…), por el interés mostrado y en especial, a Pablo y Javi por su dedicación y buen hacer en el animalario. A los alumnos de prácticas de Inmunología (2010/2011), de Micro e Inmunología (2011/2012) y de Infecciosas (2011/2012), porque de manera anónima y sin saberlo han aportado su granito de arena, mostrándome uno de los motivos por los que me embarqué en esta aventura de la Tesis Doctoral.

A todos esos amigos que he ido haciendo por el camino: los chicos del "chorro" por esos ratitos de desconexión en el campo, esos tentaderos, esas capeas, los domingos en las Ventas y en el Nino, gracias, he aprendido muchísimo con vosotros del campo y de la vida. A Pilar y a Victorino, porque esta aventura comenzó en un marco excepcional; un sábado de tentadero en vuestra casa. A mi equipo de "Alcobendas", chicas, no tengo palabras, gracias por enseñarme que la vida es como el rugby, si te caes, te levantas, si te haces daño, te sacrificas, y si necesitas ayuda, ahí está "el hombro" de tus compañeras. A mis compis de la UAX: María Marí, Lidia Grande, Nana, Aloa, María, Sonso, Ana Galicia, Ana Tabera, Desi, Blanca… a todos mis compañeros de carrera (incluidos profesores) que aunque algunos pasaron por mi vida y se fueron, otros se han quedado a mi lado. Gracias por confiar en mí. A Pitu, porque fui a un curso de toros y me llevé una amiga para siempre, que siempre tiene una "pregunta" amable: ¿Cómo va el doctorado? A mis "niños" de Paris (Isabel, Rocio, Sandra, Palmira, Guanche, Patata, Melania, Cris, Nieves, Fer, Xavi…), por hacer de Alfort mi casa, por esas cervecitas y esas hamburguesas para cenar al salir del laboratorio, y por esos crêpes en Montparnasse, sois la mejor fotografía que se puede sacar en Paris!!!! A mi gente de Palencia, porque aunque pasen los años, volver es cómo no haber partido nunca, en especial a Carlos T y a Bea, por esos cafés para ordenar la cabeza. A la gente de la cofradía, en concreto a los de la banda, y en especial a Carlos, por esos ratitos de navidad en la biblioteca del Campus de la Yutera y esos reencuentros en Madrid. A los "Don Canes" por esas cañas, esas cenas, fiestas… A esa gran familia de la JMJ, sois tantos que no os puedo nombrar, gracias por todos los recuerdos, por compartir conmigo instantes únicos, por el apoyo, por los momentos de paz (y los de guerra, jejeje) y por hacerme ver las cosas de otra manera.

A Tite, porque hay veces que es difícil encontrar las palabras de agradecimiento por miedo a que no agradezcan lo suficiente… Gracias por todo, Maestro!!!

Y por último, pero no por ello menos importante, a mi FAMILIA, por haber creído siempre en mí.

A mis abuelos, los que se fueron, que siempre están en mi memoria, y a los que están. A mi abuelo Costan, por tener una palabra amable, y alegre que demuestra que la vida tiene el color que le quieras ver, y a mi abuela Tina, porque los hechos valen mucho más que las palabras, y me has enseñado que merece la pena aferrarse a la vida cada día.

A toda mi familia paterna y materna, en especial a mi tía Mayka y a la Curra… os debo tanto. A mi hermana, por ser tan diferente a mí y a la vez tan cómplice. A Beltrán, el peque de la casa, por traer la alegría. Y por su puesto a mis padres, sin vosotros no soy nada, gracias por

demostrarme que la vida merece la pena, que cada día es una batalla, que hay que estar ahí, que hay que luchar y que todo lo que merece la pena cuesta trabajo. Gracias porque con el paso de los años, me habéis enseñado que puedo ir con la cabeza muy alta y sentirme más que orgullosa de quien soy.

A todos los que he nombrado y a todos los que me he dejado en el tintero…GRACIAS.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS XIII

ÍNDICE DE FIGURAS XV

ÍNDICE DE TABLAS XX

RESUMEN/ABSTRACT/RÉSUMÉ 1

I. INTRODUCCIÓN 11

I.1. ENFERMEDAD DE LA LENGUA AZUL 13

I.1.1. AGENTE ETIOLÓGICO 13

I.1.2. EPIDEMIOLOGÍA 15

I.1.2.1. TRANSMISIÓN DE LA ENFERMEDAD 15

I.1.2.2. ESPECIES AFECTADAS 18

I.1.2.3. EVOLUCIÓN HISTÓRICA 19

I.1.3. PATOGENIA, SINTOMATOLOGÍA Y LESIONES 22

I.1.3.1 PATOGENIA 22

I.1.3.2 SINTOMATOLOGÍA 23

I.1.3.3 LESIONES 25

I.1.4. IMPORTANCIA ECONÓMICA 26

I.1.5. DIAGNÓSTICO 27

I.1.5.1. IDENTIFICACIÓN DEL AGENTE 27

I.1.5.2. PRUEBAS SEROLÓGICAS 29

I.1.6. PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA ENFERMEDAD 29

I.1.6.1 MEDIDAS PARA LA LUCHA CONTRA LA LENGUA AZUL 30

I.1.6.2. VACUNACIÓN DE LAS ESPECIES SENSIBLES 30

I.1.6.2.1. VACUNAS CONVENCIONALES 31

I.1.6.2.1.A. VACUNAS ATENUADAS 31

I.1.6.2.1.B. VACUNAS INACTIVADAS 32

I.1.6.2.2. VACUNAS DE NUEVA GENERACIÓN 33

I.1.6.2.2.A. VACUNAS DE SUBUNIDADES DESARROLLADAS MEDIANTE TECNOLOGÍA VLP. 33

I.2. RESPUESTA INMUNE DEL GANADO OVINO 35

I.2.1. RESPUESTA INMUNE INNATA 35

I.2.1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA 35

I.2.1.2. CÉLULAS IMPLICADAS EN LA RESPUESTA INMUNE INNATA 36

I.2.1.3. CITOQUINAS PRESENTES EN LA RESPUESTA INMUNE INNATA 38

I.2.1.4. RESPUESTA INMUNE INNATA FRENTE A VIRUS 39

I.2.2. RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA 39

I.2.2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA 39

I.2.2.2. INMUNIDAD CELULAR 40

I.2.2.2.1. CÉLULAS IMPLICADAS EN LA INMUNIDAD CELULAR 40

I.2.2.2.2. CITOQUINAS RELACIONADAS CON LA INMUNIDAD CELULAR 40

I.2.2.3. INMUNIDAD HUMORAL 41

I.2.2.3.1. CÉLULAS IMPLICADAS EN LA RESPUESTA HUMORAL 42

I.2.2.3.2. CITOQUINAS PRESENTES EN LA RESPUESTA HUMORAL 42

I.2.2.4. RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA FRENTE A VIRUS 43

I.2.3. RESPUESTA INMUNE ESPECÍFICA FRENTE AL VIRUS DE LA LENGUA AZUL 44

I.2.4. RESPUESTA INMUNE GENERADA POR VACUNAS FRENTE A LA LENGUA AZUL 45

I.3. ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE 46

I.3.1. RT-PCR EN TIEMPO REAL PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES QUE CODIFICAN PARA CITOQUINAS 46

I.3.1.1. BASES DE LA RT-PCR EN TIEMPO REAL 47

I.3.1.2. CUANTIFICACIÓN MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL 48

I.3.1.2.1. CUANTIFICACIÓN ABSOLUTA 50

I.3.1.2.2. CUANTIFICACIÓN RELATIVA 50

I.3.2. CITOMETRÍA DE FLUJO PARA LA DETECCIÓN DE POBLACIONES CELULARES DEL SISTEMA INMUNE 51

I.3.2.1. PRINCIPIOS BÁSICOS DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO 51

I.3.2.2. APLICACIONES DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO 52

I.3.3. TERMOGRAFÍA INFRARROJA COMO HERRAMIENTA PARA LA DETECCIÓN DE FIEBRE 53

I.3.3.1. PRINCIPIOS BÁSICOS DE LA TERMOGRAFÍA INFRARROJA 53

I.3.3.2. APLICACIONES DE LA TERMOGRAFÍA INFRARROJA 54

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS 55

II.1. JUSTIFICACIÓN 57

II.2. OBJETIVOS 58

III. MATERIAL Y MÉTODOS 61

III.1. ADAPTACIÓN DE HERRAMIENTAS PARA EL ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE 63

III.1.1. RT-PCR EN TIEMPO REAL PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS EN OVEJAS. 63

III.1.1.1. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA DE ARN 63

III.1.1.1.1. OBTENCIÓN DE ARN A PARTIR DE LINFOCITOS ESTIMULADOS *IN VITRO* 63

III.1.1.1.1.A. EXTRACCIÓN DE ARN DE LINFOCITOS ESTIMULADOS *IN VITRO*, UTILIZANDO TRIZOL. 65

III.1.1.1.1.B. EXTRACCIÓN DE ARN DE LINFOCITOS ESTIMULADOS *IN VITRO*, UTILIZANDO COLUMNAS CON MEMBRANA DE SILICA. 66

III.1.1.1.2. OBTENCIÓN DE ARN A PARTIR DE SANGRE ENTERA EN EDTA. 67

III.1.1.2. PROTOCOLO DE RT-PCR PARA DETECCIÓN DE ARNM QUE CODIFICA PARA CITOQUINAS 67

III.1.1.2.1. RT-PCR EN UN PASO, UTILIZADA DURANTE LA PUESTA A PUNTO 67

III.1.1.2.2. RT-PCR EN DOS PASOS COMO HERRAMIENTA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES 68

III.1.1.2.3. CEBADORES 69

III.1.1.2.4. SECUENCIACIÓN 70

III.1.1.2.5. EFICIENCIA DE AMPLIFICACIÓN DE LAS PCRS 70

III.1.1.2.6. COMPROBACIÓN DE LA UTILIDAD DE LA RT-PCR EN DOS PASOS PARA LA DETECCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS EN ANIMALES CON EL SISTEMA INMUNE ESTIMULADO. 70

III.1.2. ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO DE POBLACIONES CELULARES DEL SISTEMA INMUNE EN SANGRE DE OVEJA. 71

III.1.2.1. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA 71

III.1.2.2. ANTICUERPOS UTILIZADOS 71

III.1.2.3. SEÑALIZACIÓN CELULAR 72

III.1.2.4. LISIS DE LOS ERITROCITOS Y FIJACIÓN DE LOS LEUCOCITOS. 73

III.1.2.5. ANÁLISIS EN EL CITÓMETRO DE FLUJO 73

III.1.3. TERMOGRAFÍA INFRARROJA 74

III.2. EXPERIMENTACIÓN *IN VIVO* 74

III.2.1. ANIMALES E INSTALACIONES 75

III.2.1.1. ANIMALES 75

III.2.1.2. INSTALACIONES 75

III.2.2. VACUNACIÓN 75

III.2.2.1. VACUNAS VLPS 76

III.2.2.2. VACUNA COMERCIAL INACTIVADA 77

III.2.2.3. DESAFÍO 77

III.2.3.OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS 77

III.2.3.1.SUERO 77

III.2.3.2.SANGRE 78

III.2.3.3.SACRIFICIO Y NECROPSIA DE LOS ANIMALES 78

III.2.4.MONITORIZACIÓN DE LOS ANIMALES 78

III.2.4.1. REGISTRO DE TEMPERATURA RECTAL Y TERMOGRÁFICA 78

III.2.4.2. SEGUIMIENTO CLÍNICO DE LA ENFERMEDAD 79

III.2.5. DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS DEL VIRUS DE LA LENGUA AZUL 80

III.2.5.1. EXTRACCIÓN DE ARN VÍRICO 80

III.2.5.2. RT-PCR A TIEMPO REAL 81

III.3. ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE 81

III.3.1. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES QUE CODIFICAN PARA CITOQUINAS 81

III.3.2. ESTUDIO DE LAS POBLACIONES CELULARES DEL SISTEMA INMUNE POR CITOMETRÍA DE FLUJO 83

III.3.3.DETECCIÓN DE ANTICUERPOS FRENTE A VP7 83

III.3.3.1. ELISA DE COMPETICIÓN 84

III.3.3.2.ELISA DE DOBLE RECONOCIMIENTO 85

IV. RESULTADOS 87

IV.1. EXPERIMENTACIÓN *IN VIVO* 89

IV.1.1. MONITORIZACIÓN DE LOS ANIMALES 89

IV.1.1.1. REGISTRO DE TEMPERATURA RECTAL Y TERMOGRÁFICA 89

IV.1.1.1.1. VACUNAS VLPS 89

IV.1.1.1.1.A. GRUPO A (VLP1, DESAFÍO LA1) 89

IV.1.1.1.1.B. GRUPO B (VLP1+4, DESAFÍO LA1) 90

IV.1.1.1.1.C. GRUPO C (VLP1+4, DESAFÍO LA4) 90

IV.1.1.1.2. VACUNA COMERCIAL INACTIVADA (GRUPO D: ZULVAC1, DESAFÍO LA1) 91

IV.1.1.1.3. ANIMALES DESAFIADOS NO VACUNADOS. 92

IV.1.1.1.3.A. GRUPO E (DESAFÍO FRENTE A LA1) 92

IV.1.1.1.3.B. GRUPO F (DESAFÍO FRENTE A LA4) 92

IV.1.1.1.4. RELACIÓN ENTRE LA TEMPERATURA RECTAL Y LA TEMPERATURA TERMOGRÁFICA. 93

IV.1.1.2. SEGUIMIENTO CLÍNICO DE LA ENFERMEDAD 95

IV.1.1.2.1. VACUNAS VLPS 95

IV.1.1.2.2. VACUNA COMERCIAL INACTIVADA 96

IV.1.1.2.3. ANIMALES DESAFIADOS NO VACUNADOS. 97

IV.1.1.2.3.A. GRUPO E (DESAFÍO LA1) 97

IV.1.1.2.3.B. GRUPO F (DESAFÍO LA4) 98

IV.1.1.3. SACRIFICIO Y NECROPSIA DE LOS ANIMALES 99

IV.1.2. DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS DEL VIRUS DE LA LENGUA AZUL 100

IV.1.2.1. VACUNA VLP 100

IV.1.2.2. VACUNA COMERCIAL INACTIVADA 101

IV.1.2.3. ANIMALES DESAFÍADOS NO VACUNADOS. 101

IV.2. ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE 102

IV.2.1. PUESTA A PUNTO DE LA RT-PCR PARA DETECCIÓN DE ARN QUE CODIFICA PARA CITOQUINAS 102

IV.2.1.1. ORIGEN DE LA MUESTRA DE ARN 102

IV.2.1.1.1. OBTENCIÓN DE ARN A PARTIR DE LINFOCITOS ESTIMULADOS IN VITRO 102

IV.2.1.1.2. OBTENCIÓN DE ARN A PARTIR DE MUESTRAS DE SANGRE ENTERA TOMADAS EN EDTA. 104

IV.2.1.2. RT-PCR 104

IV.2.2. EXPRESIÓN DE GENES QUE CODIFICAN PARA CITOQUINAS 108

IV.2.2.1. EXPRESIÓN DE CITOQUINAS EN LOS ANIMALES VACUNADOS CON VLPS 109

IV.2.2.1.1. VLP MONOVALENTE SEROTIPO 1 (GRUPO A). 109

IV.2.2.1.2. VLP BIVALENTE SEROTIPOS 1 Y 4. 110

IV.2.2.1.2.A. ANIMALES DESAFIADOS CON EL SEROTIPO 1 (GRUPO B). 110

IV.2.2.1.2.B. ANIMALES DESAFIADOS CON EL SEROTIPO 4 (GRUPO C). 112

IV.2.2.2. ANIMALES DESAFÍADOS NO VACUNADOS. 113

IV.2.2.2.1. ANIMALES DESAFIADOS CON EL SEROTIPO 1. GRUPO E 113

IV.2.2..2.2. ANIMALES DESAFIADOS CON EL SEROTIPO 4. GRUPO F 114

IV.2.3. PUESTA A PUNTO DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO, PARA EL ESTUDIO DE PBMCS A PARTIR DE SANGRE OVINA 116

IV.2.4.DETECCIÓN DE POBLACIONES CELULARES DEL SISTEMA INMUNE POR CITOMETRÍA DE FLUJO 117

IV.2.4.1. VACUNA VLP 117

IV.2.4.1.1. VLP MONOVALENTE SEROTIPO 1 (GRUPO A). 117

IV.2.4.1.2. VLP BIVALENTE SEROTIPOS 1 Y 4 (GRUPO B). 118

IV.2.4.2. VACUNA COMERCIAL INACTIVADA 119

IV.3.2.4.3. ANIMALES DESAFÍADOS NO VACUNADOS. 122

IV.2.5.DETECCIÓN DE ANTICUERPOS FRENTE A VP7 123

IV.2.5.1. ELISA DE COMPETICIÓN 124

IV.2.5.1.1. VACUNA VLP 124

IV.2.5.1.2. VACUNA COMERCIAL INACTIVADA 124

IV.2.5.1.3. ANIMALES DESAFÍADOS NO VACUNADOS. 125

IV.2.5.2.ELISA DE DOBLE RECONOCIMIENTO 126

IV.2.5.2.1. VACUNA VLP 126

IV.2.5.2.2. VACUNA COMERCIAL INACTIVADA 126

IV.2.5.2.3. ANIMALES DESAFIADOS NO VACUNADOS. 127

IV.3.COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS DISTINTOS GRUPOS. 128

V. DISCUSIÓN 135

V.1. EXPERIMENTACIÓN *IN VIVO* 137

V.1.1.MONITORIZACIÓN DE LOS ANIMALES 137

V.1.1.1. REGISTRO DE LA TEMPERATURA RECTAL Y DE LA TEMPERATURA TERMOGRÁFICA 137

V.1.1.2. SEGUIMIENTO CLÍNICO Y LESIONES 140

V.1.2.DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS DEL VIRUS DE LA LENGUA AZUL 141

V.2. ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE 142

V.2.1. PUESTA A PUNTO DE LA RT-PCR PARA DETECCIÓN DE ARN QUE CODIFICA PARA CITOQUINAS 142

V.2.1.1. OBTENCIÓN DEL ARN 143

V.2.1.2. RT-PCR EN DOS PASOS 145

V.2.1.3. CEBADORES 147

V.2.2. PUESTA A PUNTO DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO PARA EL ESTUDIO DE PBMCS A PARTIR DE SANGRE OVINA 148

V.2.3. ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE EN EL ENSAYO *IN VIVO* DE VACUNAS 149

V.2.3.1. VACUNA VLP 150

V.2.3.1.1. VLP MONOVALENTE (SEROTIPO 1) 150

V.2.3.1.2. VLP BIVALENTE (SEROTIPOS 1 Y 4) 152

V.2.3.2. VACUNA COMERCIAL INACTIVADA (SEROTIPO 1) 152

V.2.3.3. ANIMALES DESAFIADOS NO VACUNADOS 154

V.2.3.3.1. ANIMALES DESAFIADOS CON EL SEROTIPO 1 (GRUPO E) 154

V.2.3.3.2. ANIMALES DESAFIADOS CON EL SEROTIPO 4 (GRUPO F) 155

V.2.3.4. COMPARACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE OBSERVADA EN LOS DISTINTOS GRUPOS 156

VI. CONCLUSIONES 159

VII. BIBLIOGRAFÍA 167

VIII. ANEXOS 187

VIII. 1. PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS 189

VIII. 2. PUBLICACIONES TÉCNICAS 193

VIII. 3. COMUNICACIONES A CONGRESOS 199

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AGID	Inmunodifusión en gel de agar
ARN	Ácido ribonucleico
ARNds	ARN de doble cadena
CD	Cluster de diferenciación
CID	Coagulación intravascular diseminada
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
Con A	Concanavalina A
Ct	ciclo umbral
DIVA	Diferenciar animales vacunados de animales infectados
ECP	Efecto citopático
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EHD	Enfermedad hemorrágica del ciervo
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ELISAc	ELISA de competición
FITC	Isotiocianato de fluoresceina
GAPDH	Glicer-aldehído tres-fosfato
GM-CSF	Factor estimulador de granulocitos-macrófagos
IFNγ	Interferón-γ
IL	Interleuquina
LA	Lengua azul
LPS	Lipopolisacarido
NK	Células asesinas naturales
NS	Proteínas no estructurales
OIE	Organización mundial de sanidad animal
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	R-Phycoerythrin
PEA	Peste equina africana
PEI	Periodo extrínseco de incubación
RI	Respuesta inmune
RT	Retrotranscripción
SFB	Suero fetal bovino
SRAS	Síndrome respiratorio agudo severo
Tc ($CD8^+$)	Linfocitos T citotóxicos
Th ($CD4^+$)	Linfocitos T colaboradores
TI	Termografía infrarroja
Tm	Temperatura de anillamiento o de fusión
TNFα	Factor de necrosis tumoral-α
UE	Unión Europea
VLP	Virus like particles
VP	Proteína estructural

ÍNDICE DE FIGURAS

I. INTRODUCCIÓN.

Figura 1. Esquema del virus en el que se muestra la localización de las VP2, VP5, VP3, y VP7. (modificado de Nason et al., 2004).

Figura 2. Morfología tipo de insectos del género *Culicoides* (Dr. Jean Claude Delecolle 1985).

Figura 3. Mecanismos potencialmente involucrados en la supervivencia al invierno del virus de la LA.

Figura 4. Mapa de la Unión Europea en el que se muestran las zonas de restricción para los diferentes serotipos del virus de la Lengua Azul (DG Health and Consumers UE. Marzo de 2012).

Figura 5. Sintomatología de LA. Congestión de mucosas, alteraciones digestivas, apatía, edemas faciales, alteraciones oculares, y dolor en las extremidades.

Figura 6. Lesiones en ovino producidas por el virus LA: espuma en tráquea a consecuencia del edema alveolar, hidrotórax, edema intersticial, hidropericardio, hemorragia subepicárdica en aurícula, hemorragia en la base de la arteria pulmonar, ascitis.

Figura 7. Esquema de la hibridación de los vectores de transferencia con el vector de expresión *(Baculovirus)* para la producción de las VLPs (Stewart et al., 2010).

Figura 8. Resumen esquemático de las células y citoquinas más representativas en cada uno de los tipos de RI.

Figura 9. Esquema de un ciclo de PCR.

Figura 10. La sonda inespecífica SYBR Green intercalada en la doble hebra de ADN que compone el producto de la PCR.

Figura 11. Imagen de una PCR en tiempo real en la que cada una de las muestras presenta un Ct diferente.

Figura 12. Ejemplo de curva de disociación. Gráfica que representa la cantidad inversa de fluorescencia según la temperatura.

Figura 13. Obtención de la recta patrón tras la realización una PCR a partir de diluciones de una muestra positiva.

Figura 14. Esquema del citómetro de flujo (Adaptado de *http://www.biotechspain.com*).

Figura 15. Citograma de dispersión donde se observa la separación de las diferentes poblaciones celulares.

Figura 16. Comparación entre la imagen digital normal y la imagen termográfica de una oveja.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

Figura 17. Gradiente de densidades con Histopaque.

Figura 18. Esquema comparativo de las extracciones de ARN con ambos protocolos: Trizol y RNeasy mini kit.

Figura 19. Esquema de trabajo para la RT-PCR a partir de sangre de oveja.

Figura 20. Esquema del procesado de muestras para citometría de flujo

Figura 21. Esquema de trabajo para el análisis de PBMC mediante citometría de flujo.

Figura 22. Esquema cronológico del experimento en el que se reseñan los días de vacunación, revacunación, desafío y fin de experimento así como de revisión clínica de los animales (Sintomatología y Temperatura), de toma de imágenes termográficas (TI) y de necropsias.

Figura 23. Imágenes de microscopía electrónica del virus de la LA y de VLPs frente al serotipo 4. Imagen de la validación de la expresión de las proteínas por SDS-PAGE (Stewart et al., 2010).

Figura 24. Pantalla del programa del termociclador Mx3000 de Stratagene, en el que se indican con el nombre en gris, en la fila A, las muestras que corresponden al calibrador (día 0). Se observa que las muestras se analizan en todos los casos por triplicado para la expresión de cada gen, y que las tres columnas donde aparece la abreviatura NORM (1, 2 y 3) se corresponden con las muestras en las que se analiza el gen normalizador.

Figura 25. Esquema del ELISA de competición para detección de anticuerpos frente a VP7 de LA.

Figura 26. Esquema del ELISA de doble reconocimiento para detección de anticuerpos frente a VP7 de LA.

IV. RESULTADOS

Figura 27. Representación de la temperatura rectal media del grupo A. (V) vacunación, (D) desafío.

Figura 28. Representación de la temperatura rectal media del grupo B. (V) vacunación, (D) desafío.

Figura 29. Representación de la temperatura rectal media del grupo C. (V) vacunación, (D) desafío.

Figura 30. Representación de la temperatura rectal media del grupo D. (V) vacunación, (D) desafío.

Figura 31. Representación de la temperatura rectal media del grupo E. (D) desafío.

Figura 32. Representación de la temperatura rectal media del grupo F. (D) desafío.

Figura 33. En la parte superior se muestran las imágenes de los días 48 y 55 del animal 1E, siendo la temperatura máxima del ojo 38.3ºC y 40.1ºC respectivamente. En las imágenes inferiores se compara el perfil izquierdo de la oveja 1F los días 23 y 57 siendo la temperatura máxima del ojo 37.4ºC y 38.7ºC respectivamente.

Figura 34. Temperaturas rectal y termográfica medias del grupo D. Correlación (r) 0.67 y diferencia media (Δ) 1.62ºC. (V) vacunación, (D) desafío.

Figura 35. Temperaturas rectal y termográfica medias del grupo E. Correlación (r) 0.85 y diferencia media (Δ) 1.97ºC. (D) desafío.

Figura 36. Temperaturas rectal y termográfica medias del grupo F. Correlación (r) 0.54 y diferencia media (Δ) 1.85ºC. (D) desafío.

Figura 37. Sintomatología compatible con LA en el animal 5C. Apatía, disnea, palidez de mucosas, hipersalivación.

Figura 38. Síntomas compatibles con LA observados en los animales del grupo E. Apatía, edema, congestión de mucosas, cojera y descarga nasal.

Figura 39. Representación gráfica de la puntuación individual de los animales del grupo E desde el desafío (D) hasta fin de experimento.

Figura 40. Síntomas compatibles con LA observados en los animales del grupo F. Apatía, edema, y descarga nasal.

Figura 41. Representación gráfica de la puntuación individual de los animales del grupo F desde el desafío (D) hasta fin de experimento.

Figura 42. Imágenes tomadas durante la necropsia del animal 5C donde se observa: espuma en tráquea que indica edema alveolar, hidrotórax, hemorragias epicárdicas en aurícula, hemorragia petequial en la arteria pulmonar e hiperemia cerebral.

Figura 43. Representación de los Ct resultantes en la RT-PCR de detección de virus de la LA en cada una de las muestras de sangre tomadas de los animales de los grupos A (izquierda), B (centro) y C (derecha).

Figura 44. Representación de los Ct resultantes en la RT-PCR de detección de virus LA, de cada una de las muestras tomadas de los animales del grupo D.

Figura 45. Representación de los Ct resultantes en la RT-PCR de detección de virus LA en cada una de las muestras de sangre de los animales de los grupos E y F.

Figura 46. Imagen de diferentes geles, en los que se evidencia la presencia de los fragmentos específicos una vez finalizada la RT-PCR. IL2 (217pb), IL10 (186pb), GAPDH (153pb), IFNγ (442pb), IL4 (311pb), TNFα (238pb), β-Actina (227pb), IL12 (186pb).

Figura 47. Alineamiento de cada una de las secuencias de los amplicones con la correspondiente secuencia de referencia publicada en *GenBank*. Por orden de aparición: GAPDH, β-Actina, IFNγ, TNFα, IL2, IL4, IL10, IL12.

Figura 48. Representación de la cuantificación relativa media de la expresión de IFNγ, TNFα, IL2, IL10 e IL12 en el grupo A. (V) vacunación, (D) desafío.

Figura 49. Representación de la cuantificación relativa media de la expresión de TNFα, IL2, IL10 e IL12 en el grupo B. (V) vacunación, (D) desafío.

Figura 50. Cuantificación relativa de la expresión del ARNm que codifica para TNFα (centro), IL2 (izquierda) e IL12 (derecha) en el animal 6 del grupo C. (V) vacunación, (D) desafío.

Figura 51. Representación de la cuantificación relativa media de la expresión de IFNγ, TNFα, IL2, IL10 e IL12 en el grupo E. (D) desafío.

Figura 52. Representación de la cuantificación relativa media de la expresión de IFNγ, TNFα, IL2, IL10 e IL12 en el grupo F. (D) desafío.

Figura 53. Imagen de la detección de diferentes poblaciones celulares a partir de las PBMC de sangre de oveja mediante citometría de flujo.

Figura 54. Grupo A: porcentajes de PBMC que pertenecen a las poblaciones $CD25^+$ y γδ TCR1-$N6^+$. (V) vacunación, (D) desafío.

Figura 55. Grupo B: porcentajes de PBMC que pertenecen a las poblaciones $CD25^+$ y γδ TCR1-$N6^+$. (V) vacunación, (D) desafío.

Figura 56. Evolución del porcentaje medio de PBMC $CD4^+$, $CD8^+$ y $WC1^+$ en el grupo D. (V) vacunación, (D) desafío.

Figura 57. Se muestra la evolución del porcentaje medio de PBMC $CD25^+$, linfocitos B y $CD14^+$ en el grupo D. (V) vacunación, (D) desafío.

Figura 58. Grupo E: porcentajes de PBMC que pertenecen a las poblaciones $CD4^+$, $CD8^+$ y γδ-TCR1-$N6^+$. (D) desafío.

Figura 59. Grupo E: porcentajes de PBMC que pertenecen a las poblaciones $CD25^+$, $CD14^+$y linfocitos B. (D) desafío.

Figura 60. Representación de los resultados obtenidos en el ELISA de competición para los grupos A, B y C. Los valores situados por encima del eje X son los valores positivos que indican presencia de anticuerpos en la muestra. (V) vacunación, (D) desafío.

Figura 61. Representación de los resultados obtenidos en el ELISA de competición para el grupo D en conjunto. Los valores situados por encima del eje X son los valores positivos que indican presencia de anticuerpos en la muestra. (V) vacunación, (D) desafío.

Figura 62. Representación de los resultados obtenidos en el ELISA de competición para los grupos E y F. Los valores situados por encima del eje X son los valores positivos que indican presencia de anticuerpos en la muestra. (D) desafío.

Figura 63. Representación de los resultados obtenidos en el ELISA de doble reconocimiento, para los grupos A, B y C. Se consideran positivos los valores de densidad óptica > 0.25. (V) vacunación, (D) desafío.

Figura 64. Representación de los resultados obtenidos en el ELISA de doble reconocimiento, para el grupo D. Se consideran positivos los valores de densidad óptica > 0.25. (V) vacunación, (D) desafío.

Figura 65. Representación de los resultados obtenidos en el ELISA de doble reconocimiento, para los grupos E y F. Se consideran positivos los valores de densidad óptica > 0.25. (D) desafío.

Figura 66. Representación de la temperatura rectal media de cada uno de los grupos. (V) Vacunación, (D) desafío.

Figura 67. Representación de puntuación de la sintomatología media observada en cada uno de los grupos. (V) Vacunación, (D) desafío.

Figura 68. Representación de los Cts. obtenidos en la RT-PCR para detección de ARN vírico desde el día del desafío (D).

Figura 69. Representación de la cuantificación relativa media de la expresión de IFNγ en cada uno de los grupos. (V) Vacunación, (D) desafío.

Figura 70. Representación de la cuantificación relativa media de la expresión de TNFα en cada uno de los grupos. (V) Vacunación, (D) desafío.

Figura 71. Representación de la cuantificación relativa media de la expresión de IL2 en cada uno de los grupos. (V) Vacunación, (D) desafío.

Figura 72. Representación de la cuantificación relativa media de la expresión de IL10 en cada uno de los grupos. (V) Vacunación, (D) desafío.

Figura 73. Representación de la cuantificación relativa media de la expresión de IL12 en cada uno de los grupos. (V) Vacunación, (D) desafío.

Figura 74. Representación de evolución de los porcentajes medios de PBMCs $CD4^+$, en cada uno de los grupos. (V) Vacunación, (D) desafío.* grupo D: días 10 y 14 en gráfico, son muestras de los días 14 y 16.

Figura 75. Representación de evolución de los porcentajes medios de PBMCs $CD8^+$, en cada uno de los grupos. (V) Vacunación, (D) desafío. * grupo D: días 10 y 14 en gráfico, son muestras de los días 14 y 16.

Figura 76. Representación de evolución de los porcentajes medios de PBMCs $CD25^+$, en cada uno de los grupos. (V) Vacunación, (D) desafío. * grupo D: días 10 y 14 en gráfico, son muestras de los días 14 y 16.

Figura 77. Representación de evolución de los porcentajes medios linfocitos B dentro de las PBMCs en cada uno de los grupos. (V) Vacunación, (D) desafío. * grupo D: días 10 y 14 en gráfico, son muestras de los días 14 y 16.

Figura 78. Representación de evolución de los porcentajes medios monocitos ($CD14^+$) dentro de las PBMCs en cada uno de los grupos. (V) Vacunación, (D) desafío. * grupo D: días 10 y 14 en gráfico, son muestras de los días 14 y 16.

Figura 79. Representación de los resultados obtenidos en el ELISA de doble reconocimiento, para todos los grupos. Se consideran positivos los valores de densidad óptica > 0.25. (V) vacunación, (D) desafío.

ÍNDICE DE TABLAS

I. INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Resumen de las operaciones que se deben llevar a cabo en la lucha frente a la LA.

Tabla 2. Mecanismos del sistema inmune involucrados en la respuesta frente a virus.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 3. Mitógenos utilizados para la estimulación de los linfocitos junto con las concentraciones y tiempos de cultivo que fueron utilizados.

Tabla 4. Programa de ciclos y temperaturas a los que se sometieron las muestras de ARN para la realización de la RT-PCR en un paso.

Tabla 5. Programa de ciclos y temperaturas para las PCRs de las muestras sometidas a una RT previa en otro paso.

Tabla 6. Descripción de los cebadores utilizados para amplificar el ADNc procedente del ARNm codificante para las diferentes citoquinas así como de los genes de expresión constante (Glicer-aldehído tres-fosfato (GAPDH) y β-actina) utilizados en el estudio, indicando la cantidad utilizada, la longitud del producto, la temperatura de anillamiento así como la referencia bibliográfica de los estudios anteriores en los que se probaron estos cebadores.

Tabla 7. Relación de los anticuerpos monoclonales utilizados

Tabla 8. Grupos en los que fueron divididas las ovejas, atendiendo a la vacuna utilizada, así como al serotipo del virus de la LA utilizado en el desafío.

Tabla 9. Signos clínicos asociados con la enfermedad de la LA y la puntuación aplicada en el estudio (Perrin et al. 2007).

Tabla 10. Cebadores y sonda utilizados en la RT-PCR a tiempo real para la detección de ARN vírico (Toussaint et al., 2007).

IV. RESULTADOS

Tabla 11. Temperaturas de fusión (Tm) obtenidas durante la curva de disociación para cada uno de los fragmentos amplificados durante la RT-PCR, indicando el tamaño de cada uno de ellos.

Tabla 12. Eficiencias obtenidas para cada una de las RT- PCRs tras la realización de la curva estándar.

Tabla 13. Porcentajes basales para las diferentes poblaciones celulares obtenidos mediante citometría de flujo. *Calculado a partir de muestras de 6 animales. # Calculado a partir de muestras de 5 animales.

RESUMEN

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

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

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

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

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

Con el fin de resolver los problemas anteriormente citados se han desarrollado las denominadas vacunas VLP (virus like particles). Se trata de complejos de proteínas estructurales (VP2, VP3, VP5, VP7), carentes de material genético lo que conlleva incapacidad replicativa, que se ensamblan formando estructuras semejantes al virus auténtico. Para su producción se utilizan vectores de expresión basados en la utilización de *Baculovirus*. Este tipo de vacunas presentan grandes ventajas como su alto nivel de seguridad, la posibilidad de diferenciar animales vacunados de infectados, gracias a la ausencia de proteínas no estructurales como NS1, y la

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRACT

"Comparative study of the immune response induced by two types of vaccines (VLP and inactivated) against Bluetongue virus in sheep"

The Bluetongue (BT) is an infectious, not contagious disease transmitted by midges of genus *Culicoides* that concerns different species of ruminants. The animals that develop the disease are mainly the sheep, where BT is able to reach high rates of morbidity and mortality. The BT disease does not affect humans, but it receives great importance due to its high power of transmission and diffusion provoking serious socioeconomic and sanitary consequences, which have influence in the international trade of animals and products of animal origin. For all this, BT is included in the notifiable list diseases of the World Organization for Animal Health (OIE).

This disease is caused by a virus belonging to the *Orbivirus* genus (*Reoviridae* family*),* which is composed by 7 structural proteins (VP1-VP7) and five non-structural (NS 1, 2, 3, 3A and 4). A particularly important protein in the immune response is the VP2, since it is responsible for the formation of neutralizing antibodies and serotype-specific.

In the current context of Europe, where 6 serotypes are present (1,2,4,8,9,16), the vaccination has demonstrated to be a basic tool for the control and the eradication of this disease since it has been observed in Spain by the eradication of the serotypes 2 and 4.

The absence of cross immunity between serotypes, supposes a great problem since it implies immunizing to the whole livestock for each serotype. Vaccines currently available are mainly monovalent and only bivalent in some cases. To date it has not been able to develop a diagnostic method that allows differentiation between vaccinated animals with inactivated vaccine and infected animals.

To solve the problems previously described, VLP vaccines (virus like particles) have been developed. These vaccines are composed by a complex of structural proteins (VP2, VP3, VP5, VP7), that assemble into virus-like structures, lacking the genetic material, which involves replicative inability. In their production, expression vectors based in Baculovirus are used. Such vaccines show great advantages such as high level of safety, the ability to distinguish vaccinated animals from infected, thanks to the absence of NS1 nonstructural proteins, and the ability to generate multivalent vaccines by including in them different VP2 from different serotypes . These are the reasons why they have great potential to become the future vaccines, but it is necessary to prove that these vaccines induce a good immune response and provide effective protection in animals, given current conditions in Europe.

The aim of this thesis is the assessment of humoral and cellular response produced by VLP vaccines against the BT virus and its comparison with the inactivated vaccines, assessing the advantages and disadvantages of both types of vaccines in the environment of control and eradication of disease. To that purpose, techniques have been adapted to characterize the immune system of sheep under physiological conditions, and in the immune response that occurs as a result of the vaccination or after the virus challenge.

To characterize the immune response produced by vaccines, we have studied different parameters such as production of antibodies, viremia levels, or cytokines kinetics. To carry out this work we have optimized the techniques for the detection of 6 cytokines encoding mRNA by real time RT-PCR (IL2, IL4, IL10, IL12, IFNγ and TNF) and the detection of different cell populations of the immune system in peripheral blood of sheep by flow cytometry ($CD4^+$, $CD8^+$, $CD25^+$, $CD14^+$, B lymphocytes, the subpopulation of T lymphocytes γδ TCR1-N6 and $WC1^+$).

Within the European project BTVAC (FP6-2005-SSP-5), a trial of two VLPs vaccines (monovalent BTV1VLP, and bivalent BTV1+BTV4VLPs) as well as a monovalent inactivated vaccine against serotype 1 has been realized in sheep. In this vaccine trial, it has been carried out a daily monitoring of the animals with the registration of clinical symptoms, rectal temperature and surface temperature by infrared thermography. Also periodic blood samples were taken for virus detection by real time RT-PCR, for analyzing the antibody levels by ELISA, for detection of PBMCs cell populations by flow cytometry and mRNA extraction to analyze the expression of genes encoding for cytokines by real time RT- PCR.

The results of this thesis indicate that the immune response generated prevents the onset of symptoms, lesions and viremia after exposure to the homologous virulent virus, with the use of either monovalent vaccines (inactivated and VLP) or with the bivalent VLP vaccine, indicating the safety of both types of vaccine to be used even in the presence of the vector. In the detection of clinical symptoms, the possible use of infrared thermogrphy as a screening tool for fever has been analyzed, yielding results with an enough sensitivity and specificity for its use as a tool for mass detection, this tool can be used in monitoring sentinel animals.

The evolution of cytokine expression has shown the importance of IL2 in response to monovalent VLP vaccine and IL12 in response to vaccination with bivalent VLP and after challenge of control animals with their respective homologous virulent virus. On the other hand, cytokines such as IFNγ, whose importance in the response against BTV has been previously described, have not been shown in some cases, due to the variability introduced by the technique as well the variability between animals. The analysis of PBMCs populations showed for both VLP vaccines the increase in the $CD25^+$ population after vaccination, being more evident in the case of animals vaccinated with monovalent VLPs. Animals vaccinated with inactivated vaccine showed a significant increase in the percentage of B lymphocytes. Both animals, vaccinated with inactivated

vaccine and non-vaccinated, showed an increase in $CD8^+$ T cells after challenge with the virus, while significant variation was not observed in the case of those vaccinated with VLPs.

The response generated by both types of vaccine is enough to generate protective antibodies in the case of monovalent vaccines for serotype 1 (VLP and inactivated) and in the case of the bivalent VLP vaccine for serotypes 1 and 4. Finally, the results obtained in the control groups indicated that serotype 1 has a greater pathogenic capacity, than the serotype 4.

RÉSUMÉ

"Etude comparative de la réponse immunitaire induite par deux types de vaccins (VLP e inactivé) face au virus de la fièvre catarrhale du mouton"

La fièvre catarrhale du mouton (FCM) est une maladie infectieuse, non contagieuse, transmise par des moucherons du genre Culicoides qui affectent différentes espèces de ruminants, à la fois domestiques et sauvages. Les animaux qui développent la maladie sont surtout les moutons, les taux de morbidité et de mortalité pouvant être élevés. La maladie de la FCM n'a pas d'incidence sur l'être humain, mais devient très important en raison de son haut pouvoir de transmission et de diffusion qui entraînent de graves conséquences socio-économiques et sanitaires, avec des répercutions dans le commerce international des animaux et des produits d'origine animale. Par conséquent, la FCM est inclue dans la liste des maladies à notification obligatoire pour l'Organisation mondiales de la santé animale (OIE).

Cette maladie est causée par un virus appartenant au genre *Orbivirus* (famille *Reoviridae*), qui possède 7 protéines structurelles (VP1-VP7) et cinq non-structurelles (NS 1, 2, 3, 3A et 4). La VP2 est particulièrement importante dans la réponse immunitaire, puisqu'elle est responsable de la formation d'anticorps neutralisants, et elle est spécifique à chaque sérotype.

Dans le contexte actuel de l'Europe, où il ya jusqu'à 6 sérotypes différents (1, 2, 4, 8, 9, 16), la vaccination s'est révélée être un outil de base pour le contrôle et l'éradication de cette maladie comme on peut observer en l'Espagne pour l'éradication des sérotypes 2 et 4.

L'absence d'immunité croisée entre les différents sérotypes est un problème majeur, car cela implique le besoin d'immuniser la totalité du troupeau pour chacun des sérotypes. Actuellement, les vaccins disponibles sont monovalents et seulement dans certains cas bivalents. Jusqu'à ce jour, il n'a pas été posible de développer une méthode de diagnostic permettant de différencier les animaux vaccinés avec un vaccin inactivé, de ceux infectés.

Pour résoudre les problèmes ci-dessus exposés, il a été mis au point les vaccins appelés VLP (*virus like particles*). Ceux-ci sont des complexes de protéines structurelles (VP2, VP3, VP5, VP7), qui n'ont pas de matériel génétique, ce qui implique une incapacité réplicative, qui s'assemblent formant des structures semblables au virus authentique. Pour leur production, sont utilisés des vecteurs d'expression basés sur l'utilisation de baculovirus. Ce type de vaccins montre de grands avantages tels qu'un haut niveau de sécurité, la possibilité de distinguer les animaux vaccinés de ceux infectés, grâce à l'absence de protéines non structurelles comme NS1, et la capacité de générer des vaccins multivalentsen y intégrant différentes VP2 appartenant à

différents sérotypes. Par conséquent, ils présentent un grand potentiel pour devenir des vaccins dans le future, ce qui entraîne le besoin de démontrer que ce type de vaccins induisent une bonne réponse immunitaire et offrent une protection efficace chez les animaux, tenant compte des conditions actuelles en Europe.

L'objectif de cette thèse est l'évaluation de la réponse humorale et cellulaire produite par les vaccins VLP contre le virus de la FCM et sa comparaison avec les vaccins inactivés, évaluant les avantages et les inconvénients que présentent les deux types de vaccins dans un contexte de contrôle et d'éradication de la maladie. À cette fin, des techniques ont été adaptées qui permettent la caractérisation du système immunitaire des moutons, en conditions physiologiques normales, et la réponse immunitaire qui survient à la suite de l'application des vaccins ou après une exposition au virus.

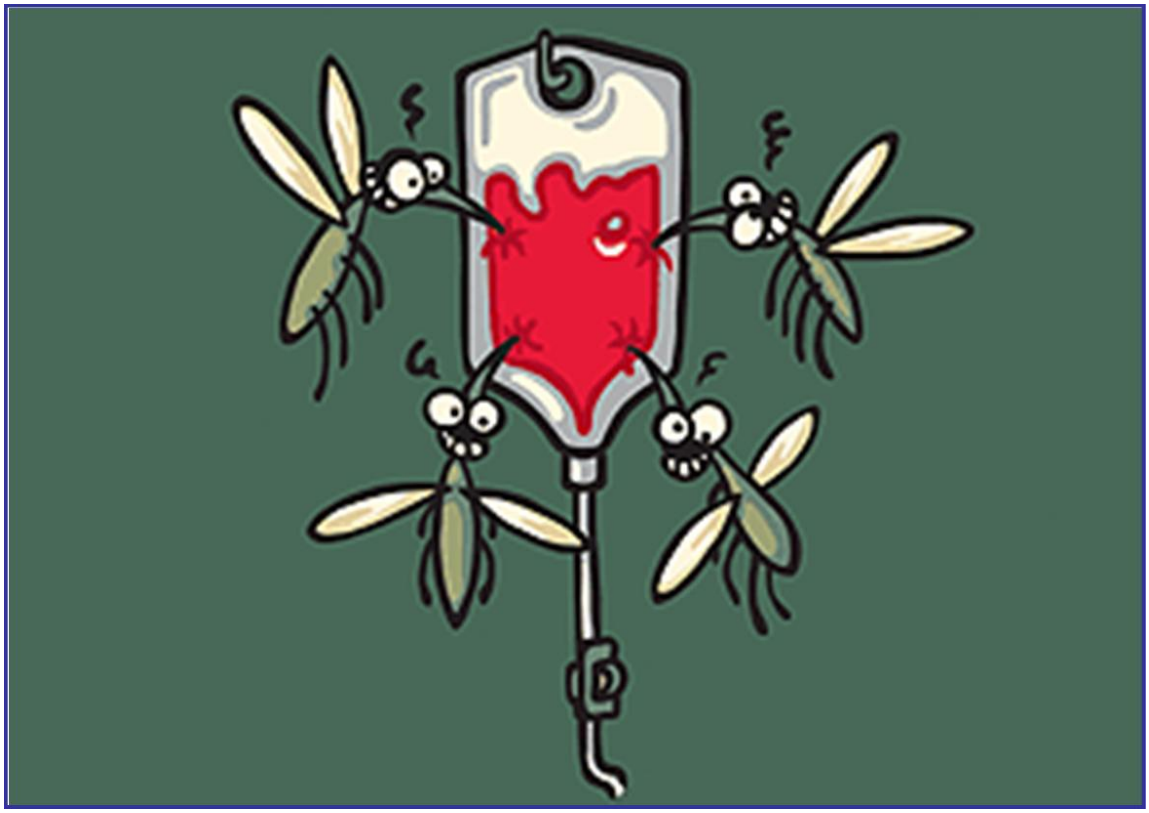
Pour caractériser la réponse immunitaire produite par les vaccins, différents paramètres ont été étudiés, tels que: la production d'anticorps, les taux de virémie, ou les taux de cytokines induites. Pour mener à terme ce travail, des techniques de détection de RT-PCR en temps réel ont été mises au point, d'ARN messager codificant pour 6 cytokines différentes chez les ovins (IL2, IL4, IL10, IL12, IFNγ et TNFα) ainsi que la détection de différentes populations cellulaires du système immunitaire dans le sang périphérique des moutons, par le biais de la cytométrie en flux ($CD4^+$, $CD8^+$, $CD25^+$, $CD14^+$, lymphocytes B, la sous-population de lymphocytes T γδ TCR1-N6 et $WC1^+$).

Sur le plan expérimental et au sein du projet européen FP6-2005-SSP-5A BTVAC, deux vaccins VLPs ont été testés, un vaccin monovalent face au sérotype 1 et un autre bivalent face aux serotypes 1 et 4 du virus de la FMC, ainsi que le test d'un vaccin monovalent inactivé face au sérotype 1 dans les ovins. Dans ce test des vaccins, la surveillance et le contrôle des animaux s'est effectuée au quotidien, avec enregistrement des symptômes cliniques, de la température rectale et de la température superficielle par thermographie infrarouge. Des prélèvements sanguins périodiques ont également été effectués pour la détection du virus par RT-PCR en temps réel, la présence et les taux d'anticorps par ELISA, la détection des populations cellulaires par cytométrie en flux, et l'extraction d'ARNm pour analyser l'expression de gènes codant des cytokines par PCR en temps réel.

Les résultats de cette thèse indiquent que la réponse immunitaire générée prévient l'apparition des symptômes, des lésions et de virémie après une exposition au virus homologue virulent, à la fois après utilisation des vaccins monovalents (inactivé et VLP) comme le bivalent, indiquant la sécurité qu'offrent ces deux types de vaccin pour être utilisés même en présence du vecteur. Dans la détection des symptômes cliniques, il a été analysé la possibilité d'utiliser la thermographie infrarouge comme outil de dépistage de la fièvre, donnant des résultats d'une sensibilité et une spécificité suffisantes pour son utilisation comme outil d' utilité massive, pouvant cet outil être utilisé dans le suivi des animaux sentinelles.

L'évolution de l'expression des cytokines a montré l'importance de l'IL2 en réponse au vaccin VLP monovalent et de l'IL12 en réponse au vaccin VLP bivalent, ainsi qu' après le défis des animaux contrôle face a leur respectifs virus homologues virulents. Au contraire, l'importance d'autres cytokines telles que l'IFNγ, dont l'importance dans la réponse au virus de la FCM a été décrite précédemment, n'a pas été démontrée dans certains cas, en raison de la variabilité présentée tant par la technique que par les animaux. L'analyse des populations cellulaires a démontré dans le cas des deux vaccins VLP, l'augmentation de la population $CD25^+$ post-vaccination, étant plus évidente dans le cas des animaux vaccinés avec le vaccin VLP monovalent. Les animaux vaccinés avec un vaccin inactivé ont montré une augmentation significative du pourcentage de lymphocytes B. Les animaux vaccinés avec un vaccin inactivé et ceux non vaccinés, ont montré une augmentation du taux de lymphocytes T $CD8^+$ après infection par le virus, sans qu'il ne soit observée de variation significative dans le cas des animaux vaccinées avec VLP.

La réponse générée par les deux types de vaccins est suffisante pour générer des anticorps protecteurs à la fois dans le cas des vaccins monovalents pour le sérotype 1 (VLP et inactivé) comme dans le cas du vaccin VLP bivalent pour les sérotypes 1 et 4. Finalement, les résultats obtenus au sein des groupes témoins ont indiqué que le sérotype 1 présente une capacité pathogène plus grande que le serotype 4.



I. INTRODUCCIÓN

Imagen Introducción: Kukuxumuxu (fuente desconocida: Internet)

I.1. ENFERMEDAD DE LA LENGUA AZUL

La Lengua Azul (LA) es una enfermedad vírica, transmitida por vectores del género *Culicoides* que afecta a diferentes especies de rumiantes tanto domésticos como silvestres (Wilson y Mellor, 2009). Se trata de una enfermedad que, a pesar de no afectar al ser humano y de no tener repercusión para la salud pública, cobra gran importancia debido a su elevado poder de transmisión y difusión, lo que provoca graves consecuencias socioeconómicas y sanitarias (Velthuis et al., 2010). La presencia de esta enfermedad repercute en el comercio internacional de animales y productos de origen animal. Por todo ello, la LA está incluida dentro de la lista de enfermedades de declaración obligatoria (antigua lista A) de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Debido a su importancia, ante su presencia se establecen distintas medidas para su control y erradicación, destacando la vacunación, como herramienta fundamental para frenar la enfermedad (Caporale et al., 2004).

I.1.1. AGENTE ETIOLÓGICO

La enfermedad de la LA, también denominada Fiebre Catarral Ovina (Spreull, 1905), es una enfermedad infecciosa, no contagiosa causada por un virus perteneciente al género *Orbivirus* de la Familia *Reoviridae,* del que se han descrito 26 posibles serotipos distintos (Hofmann et al., 2008; Chaignat et al., 2009; Maan et al., 2011a; Maan et al., 2011b) entre los que apenas existe inmunidad cruzada.

Se trata de un virus que se encuentra entre los denominados ARNds (ácido ribonucleico de doble cadena) (Verwoerd, 1969), cuyo genoma está constituido por 10 segmentos, que codifican para 7 proteínas estructurales (VP1- VP7) y 4 proteínas no estructurales (NS1, NS2, NS3, NS3A) (Howell y Verwoerd, 1971). El hecho de poseer un genoma fragmentado favorece la recombinación entre diferentes serotipos, fenómeno que ha sido descrito en el transcurso de inoculaciones experimentales conjuntas con varios serotipos (Samal et al., 1987).

El virus de la LA presenta una morfología icosaédrica (Mertens et al., 2004). La capa externa de la cápside del virus está formada por las proteínas VP2 y VP5 (**Figura 1**). En el interior de la cápside, se pueden diferenciar dos capas, la constituida por las VP de mayor presencia, VP3 y VP7 (Roy, 1992; Grimes et al., 1998), y la constituida por las proteínas menores (VP1, VP4, VP6).

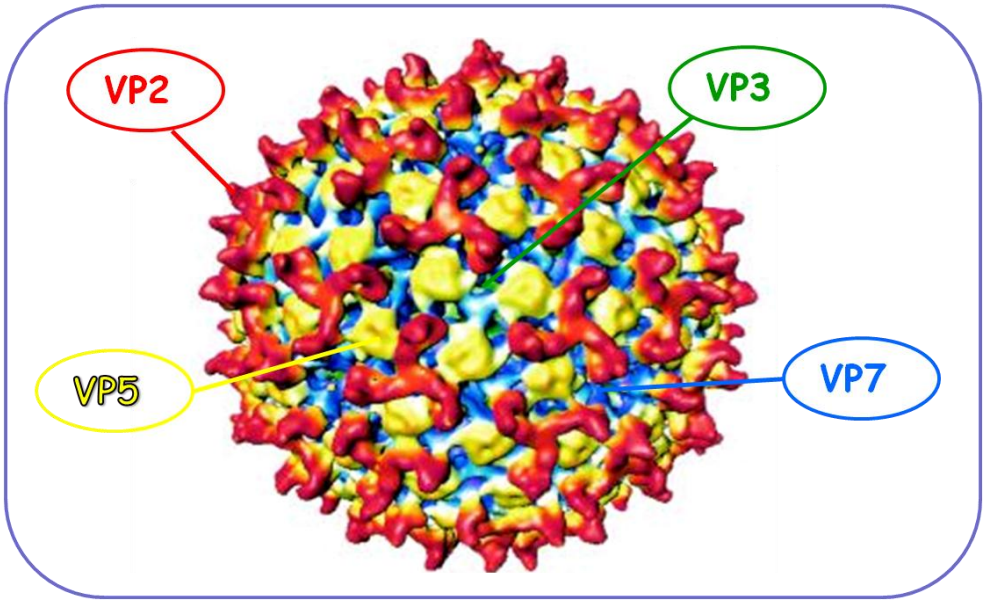


Figura 1. Esquema del virus en el que se muestra la localización de las VP2, VP5, VP3, y VP7. (modificado de (Nason et al., 2004).

Entre las proteínas estructurales cabe destacar la VP2, que siendo la proteína más variable del virus, presenta una gran importancia en la respuesta inmune, ya que además de ser específica de cada serotipo, es la responsable de la formación de anticuerpos neutralizantes (Huismans y Erasmus, 1981). La VP2 es una hemaglutinina que participa además en la adhesión del virus a las células de mamíferos (Cowley y Gorman, 1987; Hassan y Roy, 1999). La VP5 también presenta gran variabilidad, aunque inferior a la de la VP2. De hecho, entre algunos serotipos la VP5 presenta una homología de hasta el 94% (Oldfield et al., 1991). Pese a que la principal responsable de inducir los anticuerpos neutralizantes es la VP2, la VP5 también participa en la generación de dichos anticuerpos (Roy, 1992). Otra VP mayor es la VP3, de gran importancia para la integridad del virus, destacando además como antígeno de serogrupo (Inumaru et al., 1987). Finalmente, destacar a la proteína VP7 como responsable de la unión del virus a las células de insectos (Xu et al., 1997). Además, dicha proteína es específica de serogrupo, lo que permite diferenciar la LA de otras enfermedades producidas por *Orbivirus* como la Enfermedad Hemorrágica del Ciervo (EHD) o la Peste Equina Africana (PEA). No obstante, presenta una alta homología entre diferentes serotipos (Huismans y Bremer, 1981), siendo común a todos los serotipos de LA.

En el virus existen otras tres VP denominadas minoritarias o menores (VP1, VP4 y VP6). Entre ellas destaca la VP1, proteína de mayor tamaño del virus de la LA, a la que inicialmente se le adjudicó actividad de ARN-polimerasa (Roy et al., 1988) debido a su homología con las polimerasas de otros virus, describiéndose posteriormente su posible actividad transcriptasa (Roy, 1996). La VP4 presenta actividad guanidil-transferasa (Le Blois et al., 1992) mientras que la VP6 ha sido señalada como una probable helicasa asociada al genoma viral, que participa en la encapsidación del ARN (Roy et al., 1990a).

Históricamente se han descrito 4 proteínas no estructurales (NS1, NS2, NS3, NS3A), codificadas por los segmentos 5, 8 y 10 respectivamente (Van Dijk y Huismans, 1988). Cada segmento codifica para una proteína excepto el segmento 10 que codifica para las NS3 y NS3A. Recientemente se ha descrito la presencia de la NS4 codificada por el segmento 9, que originalmente solo se creía que codificaba para la VP6 (Belhouchet et al., 2011). Las proteínas NS participan en el plegado y montaje de las partículas víricas en el citoplasma, así como en la liberación del virus (Hyatt et al., 1993). La NS2 además destaca por ser la única fosfoproteína del virus de la LA (Huismans et al., 1987).

I.1.2. EPIDEMIOLOGÍA

La LA se transmite a través de jejenes del género *Culicoides,* y puede afectar a diferentes especies de rumiantes tanto domésticos como silvestres. La presencia del vector es fundamental para la aparición y diseminación de la enfermedad. En este apartado de epidemiología, una vez descrita la transmisión y las especies susceptibles, se describirá la evolución histórica así como su importancia económica.

I.1.2.1 TRANSMISIÓN DE LA ENFERMEDAD

La transmisión del virus LA se produce principalmente a través de insectos del género *Culicoides* (Du Toit, 1944) **(Figura 2**). Sin embargo, también se ha demostrado la capacidad de transmisión del virus por vía transplacentaria, como ocurre en el caso del serotipo 8 tanto en ovejas (Worwa et al., 2009) como en ganado vacuno (De Clercq et al., 2008; Desmecht et al., 2008). También ha sido descrita la transmisión a través del semen y embriones infectados. En el caso del semen, dicha capacidad ha sido observada en cepas adaptadas de laboratorio, habiéndose descrito en animales mayores, en los momentos de máxima viremia, estando implicada además la presencia de sangre en el semen. (Kirkland et al., 2004). Teniendo en cuenta estos datos y que los animales mayores no suelen utilizarse como donadores de semen, se pone en evidencia la escasa importancia epidemiológica de esta vía de transmisión (Bowen et al., 1983; Bowen et al., 1985).

Por tanto, son los jejenes del género *Culicoides* los principales transmisores de la LA. Sin embargo, no todas las especies de *Culioides* pueden actuar como vectores eficientes del virus, sólo 50 de las 1500 especies de *Culicoides* descritas, parecen ser capaces de transmitir la enfermedad.

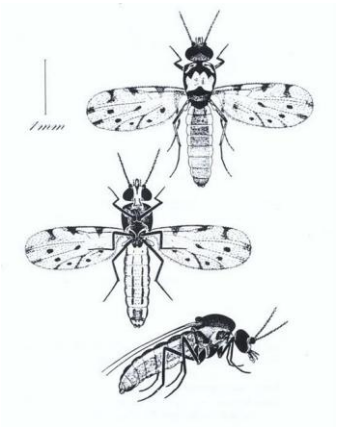


Figura 2. Morfología tipo de insectos del género *Culicoides* (Dr. Jean Claude Delecolle 1985).

El *Culicoides* presenta un ciclo biológico que puede durar entre 7 días y 7 meses dependiendo del clima de la región. En este ciclo podemos distinguir 4 etapas distintas: huevo, larva, pupa y adulto. El adulto vive generalmente menos de 20 días. En la transmisión del virus solo están implicadas las hembras adultas, pues son las que necesitan proteínas para la producción de los huevos (Wittmann y Baylis, 2000).

Una vez que el vector se alimenta de sangre contaminada con el virus, han de pasar unos 10 días (a 25ºC) para que este *Culicoides* sea infectivo, periodo al que se denomina periodo extrínseco de incubación (PEI) y durante el cual se produce la replicación del virus en la glándula salival del *Culicoides* (Mellor, 1990).

Es importante destacar que dentro de una población de vectores, el número de *Culicoides* capaces de transmitir la infección es muy pequeño. Esto se debe a la baja probabilidad de que un jején se alimente en un animal virémico, que sea un jején competente, que sobreviva al PEI y que vuelva a alimentarse sobre un animal susceptible. Aunque el número de *Culicoides* que cumplen estos requisitos es bajo, existen factores climáticos que favorecen que ese número de individuos aumente. Entre estos factores destaca la existencia de temperaturas elevadas, que incrementan la frecuencia de alimentación de las hembras (Kramer et al., 1985). Las altas temperaturas favorecen también que vectores que eran considerados incompetentes para la transmisión del virus pasen a ser vectores efectivos. Además, una temperatura elevada favorece la supervivencia al PEI, de modo que si la temperatura se acerca a los 30ºC la acción de la polimerasa se acelera, facilitando así la replicación del virus y disminuyendo el PEI. En definitiva, un aumento de la temperatura (27-30º) favorece la transmisión de la enfermedad (Wittmann y Baylis, 2000). Pero no solo la temperatura afecta a las poblaciones de *Culicoides*, otros factores como las precipitaciones y el viento también influyen sobre ellos. Teniendo en cuenta que los factores climáticos son importantes en la ecología del vector y que una alteración de los mismos afectará a su

presencia, el estudio de estos factores, permite conocer el riesgo de que el vector *Culicoides* esté presente en una región (Calistri et al., 2003).

Dada la necesidad de vector para que se produzca la transmisión de la enfermedad, es evidente que la prevalencia de la enfermedad está directamente relacionada con las condiciones ecológicas y climáticas. Además, estos factores climáticos también limitan la presencia de diferentes especies de *Culicoides*, puesto que las distintas especies de *Culicoides* presentan diferentes requerimientos ambientales, lo que influye en su distribución geográfica. Así por ejemplo en África, Oriente próximo, Sureste asiático y Suroeste europeo la especie predominante es *C. imicola* (Mellor et al., 1985), mientras que en zonas de norte-América *C. sonorensis* constituye la especie principal (Schmidtmann et al., 2011), siendo el *C.brevitarsis* la predominante en Australia (Standfast et al., 1985).

En principio, el hábitat natural de este género de insecto se creía limitado a las regiones situadas entre los paralelos 35S y 40N. Sin embargo, la presencia de *C. obsoletus* y *C. pulicaris*, ambos implicados en la transmisión de LA, ha sido descrita en el norte de Europa llegando incluso a detectarse en latitudes cercanas a los 65ºN (Nielsen et al., 2010). Otro ejemplo de la variación en la distribución de estas especies, lo constituye *C. imicola*, principal vector implicado en la transmisión del virus en la Península Ibérica, que fue descrito por primera vez en Córdoba en 1982 y el cual se creía limitado a zonas del sur, si bien su presencia ha sido descrita en áreas cercanas a los 41ºN (Calvete et al., 2006).

Dado que los factores climáticos afectan a la distribución geográfica del *Culicoides,* debe tenerse en cuenta también la posible estacionalidad tanto de los vectores como del virus. Los periodos de mayor actividad del vector suceden a finales de verano o principios de otoño. Los adultos de *Culicoides* sólo pueden sobrevivir al invierno si la temperatura media se mantiene por encima de los 12.5 ºC (Sellers y Mellor, 1993), por tanto en las zonas en las que no debería sobrevivir el vector, el virus tampoco debería ser detectado. Sin embargo, pese a la ausencia del vector, la presencia de la enfermedad ha sido confirmada tras el periodo invernal, lo que ha generado numerosos interrogantes acerca de cómo puede sobrevivir el virus de la LA a las bajas temperaturas. Se han propuesto varios mecanismos, que tratan de explicar la capacidad del virus para invernar (**Figura 3**). Entre estos destaca la presencia de viremias prolongadas en bovino (Nevill, 1971), o la presencia de linfocitos T-γδ persistentemente infectados en la piel, que actuarían como fuente del virus para el jején (Takamatsu et al., 2003). Otro posible mecanismo es la infección transplacentaria ocurrida a finales de otoño o principios de invierno que afectaría a vacas en el último tercio gestación, y que conlleva el nacimiento de terneros virémicos. Dicha trasmisión vertical, no sólo se ha descrito en los rumiantes (Menzies et al., 2008), sino también en vectores, donde distintas pruebas de campo han evidenciado la presencia de fragmentos de ARN en larvas (White et al., 2005), si bien, la presencia del virus completo no ha podido ser demostrada. Finalmente, también se ha señalado la posibilidad de

que ciertos *Culicoides* adultos pueden sobrevivir al invierno en muy bajas densidades de población (Losson et al., 2007). Sin embargo, todos estos mecanismos no dejan de ser especulativos y no explican por completo como el virus permanece entre estaciones.

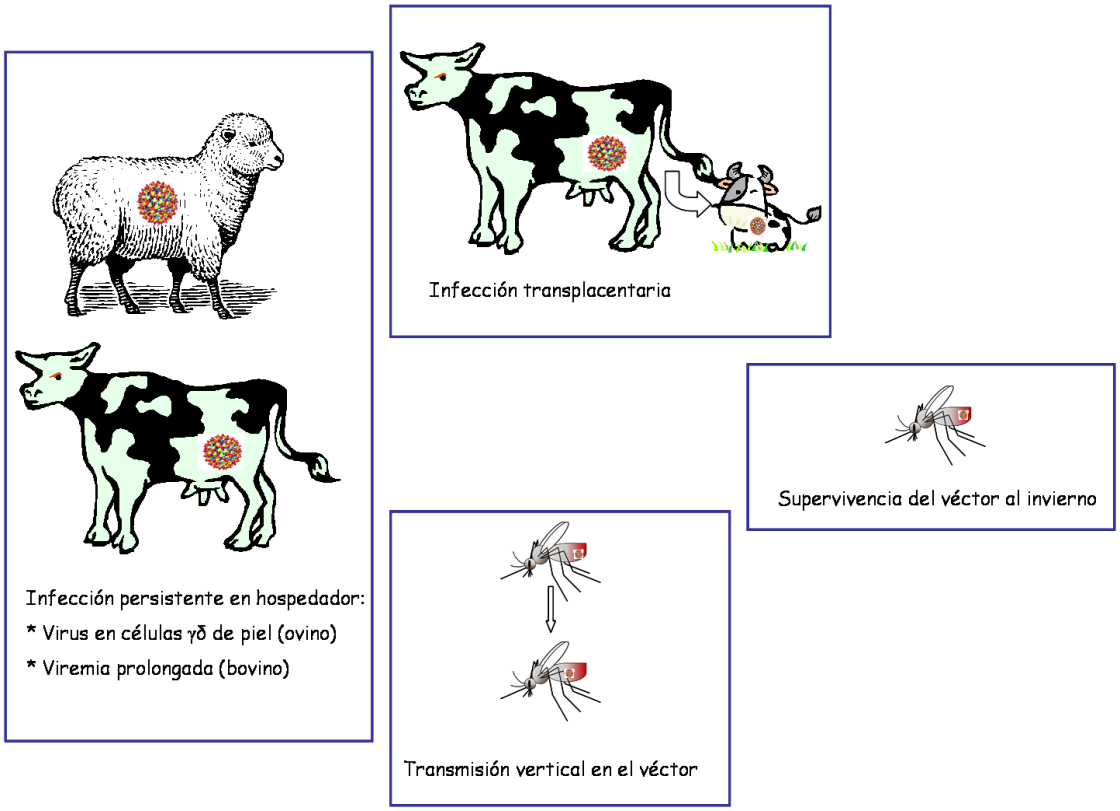


Figura 3. Mecanismos potencialmente involucrados en la supervivencia al invierno del virus de la LA.

I.1.2.2. ESPECIES AFECTADAS

La LA afecta principalmente a rumiantes, tanto domésticos, como silvestres. Los animales que desarrollan la enfermedad son las ovejas fundamentalmente, pudiéndose alcanzar altas tasas de morbilidad y mortalidad (Martínez y Sánchez-Vizcaíno, 2005). Además, dentro de las ovejas, existen razas como la raza de oveja mutón o la merina, que presentan mayor susceptibilidad en comparación con aquellas donde la enfermedad es endémica.

En general, la respuesta serológica que se origina en los rumiantes aparece entre los 7 y 14 días tras la infección y es una respuesta duradera, que ha servido para demostrar la presencia de anticuerpos en diferentes especies de rumiantes salvajes como el Ciervo Rojo, el Corzo, el Muflón, el Gamo, el Arruí (Davidson et al., 1985; Ruiz-Fons et al., 2008), la Cabra montesa**,** el Antílope(Frolich et al., 2005), el Búfalo, el Ñú (Anderson y Rowe, 1998) y diferentes especies de Gacela (Davies y Walker, 1974). Además, se ha comprobado la presencia de anticuerpos en otras especies de herbívoros tales como la Jirafa, la Cebra (House et al., 1982),

el Rinoceronte blanco y el Rinoceronte negro (Fischer-Tenhagen et al., 2000). Finalmente, existen otros posibles hospedadores en los que se ha detectado la presencia de anticuerpos, como ha sucedido en el caso del Oso negro en Florida (Dunbar et al., 1998).

Además de la detección de anticuerpos, también ha sido posible la detección del virus de la LA en rumiantes silvestres como el Muflón, (Rodriguez-Sanchez et al., 2010) y en animales no rumiantes, como las musarañas (Kemp et al., 1974) y en carnívoros africanos, cuya infección parece tener su origen en la ingestión de rumiantes infectados con el virus de la LA (Alexander et al., 1994). La importancia y el papel que estos animales no rumiantes juegan en la epidemiología de la LA se desconocen. Finalmente, en cuanto a lo que a especies afectadas se refiere, debe comentarse que también está descrita, la presencia del virus de la LA en perro doméstico como consecuencia de la contaminación de una vacuna viva modificada frente al moquillo canino (Evermann et al., 1994; Wilbur et al., 1994).

I.1.2.3. EVOLUCIÓN HISTÓRICA

La primera descripción de la LA tuvo lugar tras la introducción de ovejas procedentes de Europa, en Sudáfrica (Spreull, 1905). A lo largo del siglo XX se han producido diferentes brotes, como los acaecidos en Chipre en 1924. Sin embargo, la segunda mitad del siglo XX fue la época de mayor dispersión alrededor del mundo. A principios de los años 50 se suceden los brotes en Israel así como en EEUU aunque en éste país, en un primer momento no se habló de LA sino de una nueva enfermedad a la que se denominó "*Soremuzzle*" (dolor de boca) (Hardy y Price, 1952; McKercher et al., 1953). Entre los años 1956 y 1960, la Península Ibérica sufre la primera aparición de la enfermedad, siendo el serotipo 10 el descrito en este momento. Al año siguiente (1961) la enfermedad es descrita en la India y en 1975 el virus es aislado en Australia. En 1977 el serotipo 4 del virus se localiza en la zona de Chipre y Turquía, llegando a las Islas Griegas en el año 1979. A finales de los 80 (1987-1988) el serotipo 11 fue aislado en Canadá (Sellers y Maarouf, 1991).

En Europa, a partir de 1998, se producen brotes de forma reiterada. De hecho, ese año el serotipo 9 fue detectado en las Islas Griegas. En 1999 los serotipos 4 y 16 aparecen también en Grecia. En el año 2000 es Turquía la que se ve afectada por una cepa del serotipo 16. Ese mismo año 2000 el serotipo 2 hace acto de presencia en Túnez debido a movimientos de animales ilegales, siendo posteriormente detectado en Argelia y Marruecos, llegando posteriormente a Cerdeña así como a Baleares en Octubre de 2000. En 2001, el serotipo 9 llegó a la región de Kosovo, dato de especial relevancia, pues en esta región no habitaba el *C.imicola,* por lo que la presencia de la enfermedad implicaba la participación de otras especies de *Culicoides* (*C. obsoletus, C. pulicaris*). En ese mismo año 2001, Grecia se ve afectada también por el serotipo 1 procedente de India y Malasia. Entre los años 2003 y 2006 el serotipo 4 del virus LA se localiza en las Islas Baleares, la Península ibérica y Córcega.

Hasta la actualidad (2012), de los 26 serotipos del virus de la LA conocidos, en Europa, se ha descrito, por orden cronológico, la presencia de los serotipos 10, 4, 9, 16, 2, 8, 1, 6, 11, 25, siendo de entre los últimos en llegar, los serotipos 8 y 1 los que debido a su virulencia y capacidad de expansión merecen una mención aparte.

La primera detección del serotipo 8 en el norte de Europa sucede en Agosto de 2006 y estableciéndose la procedencia del virus en África subsahariana (Elbers et al., 2008). La expansión que sufre le lleva en pocos meses a distribuirse por Holanda, Bélgica, Francia, Alemania y Luxemburgo. A pesar de que se esperaba su desaparición durante el invierno debido a las bajas temperaturas y a la ausencia de vector, en octubre de 2007 se confirmó su presencia en vacas de Suiza. A continuación, se sucedieron los casos en Dinamarca, República Checa y Reino Unido. Al año siguiente, en enero de 2008, el serotipo 8 fue detectado por primera vez en España, en Cantabria. Como posibles causas involucradas en la aparición del serotipo 8 en Europa se han apuntado diferentes hipótesis que van desde el comercio de ganado, hasta un mecanismo desconocido, pasando por el movimiento pasivo de *Culicoides* por el viento, sin que hasta la fecha se haya podido establecer conclusión alguna sobre el mecanismo de entrada en Europa.

En lo relativo al serotipo 1, cabe destacar su presencia en 2006 en el Magreb, su llegada a España en Julio de 2007 así como su rápida expansión por la Península, detectándose en Septiembre de ese mismo año en Portugal y en Noviembre en la Bretaña francesa.

Otros serotipos con una especial particularidad también descritos en Europa han sido los serotipos 6 y 11. El serotipo 6 se detectó por primera vez en Holanda y Alemania en Octubre de 2008, mientras que el serotipo 11 fue detectado en Enero de 2009 en Bélgica. Ambos serotipos fueron controlados rápidamente (Vandenbussche et al., 2009). Según los informes de estos países, su origen parece estar en la utilización de vacunas vivas atenuadas importadas y aplicadas de forma ilegal.

Finalmente destacar que en 2008 y a partir de muestras tomadas en cabras de Suiza se describió un Orbivirus, que supuso el serotipo número 25 de virus LA (Hofmann et al., 2008).

El panorama actual de la Unión Europea (**Figura 4**), muestra la presencia de los serotipos 1, 2, 4, 8, 9 y 16.

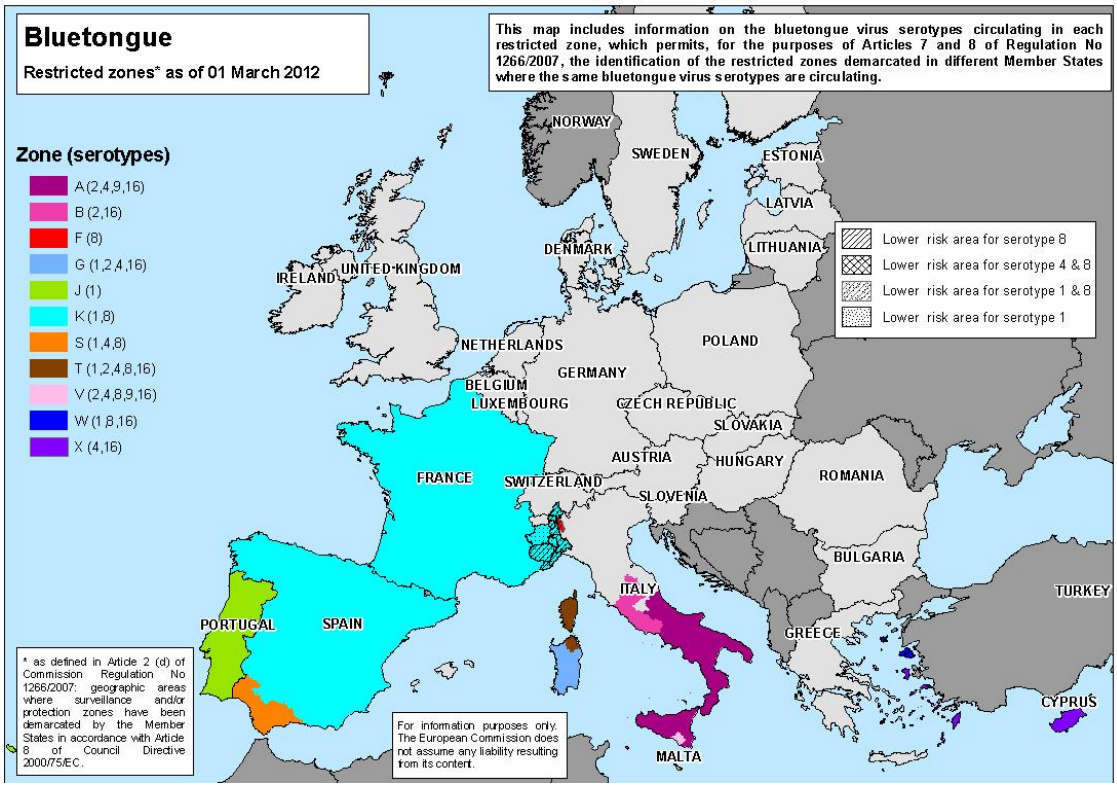


Figura 4. Mapa de la Unión Europea en el que se muestran las zonas de restricción para los diferentes serotipos del virus de la Lengua Azul (DG Health and Consumers UE. Marzo de 2012).

Con respecto a la evolución de la enfermedad en España, el primer brote se produjo en los años 1956-1960, identificándose el serotipo 10. La siguiente incursión de este virus en territorio español, se produjo en el año 2000, momento en el que apareció en Baleares el serotipo 2. La vía de entrada se produjo o bien a través del movimiento de animales infectados, o bien a través de vectores transportados por el viento. Se comprobó que la cepa viral era similar a la circulante en las zonas de Córcega, Cerdeña, Argelia y Túnez. En la política de erradicación, se optó por la vacunación del 100% del ganado ovino con vacuna viva atenuada. A continuación y también en las Islas Baleares, en el año 2003 sucedió otro brote, esta vez del serotipo 4 afectando exclusivamente a Menorca.

En el caso de la Península, la primera incursión de la LA desde la epidemia de los 50, tuvo lugar en octubre de 2004, cuando se detecta la presencia del serotipo 4 en Cádiz. Su origen está en Marruecos, donde se encontraba previamente y desde donde difundió debido al viento. Este serotipo se expandió rápidamente al resto de Andalucía y a Extremadura, afectando en el año 2005 a Castilla-La Mancha, Madrid y a zonas de Castilla y León.

En Julio de 2007 se detecta el primer caso del serotipo 1 en el municipio gaditano de Tarifa, que al igual que sucedió con el serotipo 4, tuvo su origen en el norte de África el año anterior (2006) llegando en 2007 a zonas próximas al estrecho.

Mientras se estaba luchando contra los serotipos 1 y 4 en la Península, en Enero de 2008 se detecta por primera vez el serotipo 8 en Cantabria, serotipo que llevaba desde 2006 circulando por Europa. La evolución del serotipo 8 y la política de vacunación condujeron a que entre abril de 2009 y diciembre de 2011 sólo se detectara un nuevo foco de este serotipo en España concretamente en la provincia de Cádiz, en Noviembre de 2010, siendo hasta la fecha el último foco de este serotipo declarado en España.

La situación actual respecto a los serotipos 1 y 4 resulta algo más compleja. En el caso del serotipo 1, en 2010 se produjo un importante descenso en el número de focos, registrándose sólo 80, mientras que en el año 2008 se notificaron 2861 focos. La tendencia a la baja continuó en el año 2011 donde sólo se notificaron 8 focos, mientras que hasta febrero de 2012 sólo se notificaron dos nuevos focos que tuvieron lugar la primera semana del año.

En el caso del serotipo 4, el último foco durante la primera década del siglo XXI, se produjo en Noviembre de 2006 en Ávila, y la ausencia de detección viral entre Noviembre de 2006 y Diciembre de 2008 condujo a la declaración, en 2009, de España como país libre del serotipo 4. Sin embargo, en octubre de 2010 se produjeron nuevas detecciones de este serotipo en animales centinela en la provincia de Cádiz, notificándose por última vez en marzo de 2011.

I.1.3. PATOGENIA, SINTOMATOLOGÍA Y LESIONES

I.1.3.1 PATOGENIA

Tras la picadura del *Culicoides* al hospedador, el virus viaja al nódulo linfoide regional, donde tiene lugar la replicación primaria. Desde ahí, se disemina a diferentes órganos tales como el bazo o los pulmones. El virus infecta a macrófagos, células dendríticas y linfocitos (Hemati et al., 2009), en los que replica e induce la producción de citoquinas, produciendo además daño celular y necrosis (Schwartz-Cornil et al., 2008). El tropismo celular del virus es similar en ovinos y bovinos, si bien, la sintomatología clínica no es la misma en ambas especies. En el ganado ovino, la permeabilidad vascular producida a consecuencia del daño endotelial da lugar a edemas (MacLachlan, 2004) y se puede producir, en los casos fatales, un síndrome de Coagulación Intravascular Diseminada (CID). Sin embargo, este tipo de daños vasculares no se observan en bovino.

El virus de la LA, se asocia también a eritrocitos (Nunamaker et al., 1992) y plaquetas (MacLachlan, 2004), hecho que implica una mayor supervivencia en bovino que en ovino, pues la vida media de los eritrocitos del ganado vacuno es mayor.

En cuanto a la posibilidad de afectar a linfocitos, se ha observado que los linfocitos T son más susceptibles que los linfocitos B, pudiendo jugar un papel importante en la infección

del virus LA (Sánchez-Cordon et al., 2010b). La asociación con los linfocitos bovinos (Stott et al., 1990) puede estar relacionada también con la viremia prolongada en esta especie, si bien, cabe recordar que la duración de la viremia no sólo es diferente según especies, sino que también existen variaciones intra-especie (Koumbati et al., 1999).

I.1.3.2 SINTOMATOLOGÍA

El cuadro clínico originado por el virus de la LA puede ser muy variable, observándose desde formas de enfermedad subclínica que pasa totalmente desapercibida, hasta la muerte del animal, la cual suele producirse mayoritariamente en ovejas. Al igual que la variabilidad en la duración de la viremia, la variabilidad de la sintomatología clínica puede deberse a la especie afectada, al serotipo del virus, o a la edad y el estrés al que estén sometidos los animales infectados. Atendiendo a la especie ovina, las razas de zonas endémicas no sufren de la misma manera la enfermedad. Además, diferentes cepas del mismo serotipo de LA, pueden presentar diferente morbilidad y mortalidad (Maclachlan, 2009).

El cuadro clínico clásico es aquel que presentan las ovejas. Así, tras la infección de los animales se produce la viremia a los 3 o 4 días y tras un periodo de incubación que dura de 7 a 10 días comienzan a aparecer los síntomas. El primer signo que se observa, es la fiebre que puede llegar a alcanzar los 42ºC en algunos casos, si bien, la gravedad de la fiebre no se correlaciona con la severidad de la enfermedad (Erasmus, 1975). Otros signos clínicos comunes son depresión, emaciación y degeneración muscular (**Figura 5**).

Entre los síntomas más característicos destaca la aparición de edemas subcutáneos en cara, párpados, orejas, y zona ventral del cuello junto a la presencia de descarga nasal, hipersalivación, inflamación y úlceras en la mucosa oral y lengua cianótica. Además durante la LA pueden producirse complicaciones pneumónicas, cojeras generadas por coronitis con hemorragia de la banda coronaria y abortos.

Figura 5. Sintomatología de LA. Congestión de mucosas, alteraciones digestivas, apatía, edemas faciales, alteraciones oculares y dolor en las extremidades.

En el caso de enfermedad grave, ésta puede presentar distintos cursos clínicos que pueden concluir con la recuperación total del animal, la muerte o la aparición de cuadros de desgaste crónico. En el caso de producirse la muerte, ésta generalmente sucede en un plazo de 8-10 días. Los animales que presentan cuadros de desgaste crónico, suelen presentar pérdida de lana como consecuencia de la dermatitis, así como debilidad por necrosis muscular. La recuperación suele ser lenta manteniéndose la pérdida de lana y produciéndose esterilidad y retraso en el crecimiento. Asimismo, en animales que aparentemente se encuentran en fase de recuperación, es frecuente el colapso y la muerte por edema pulmonar.

En bovinos, pese a presentar mayor tasa de infección, los cuadros suelen ser moderados o subclínicos, a excepción de los casos de infección con el serotipo 8, donde se observan lesiones nasales, erosiones en los labios, erosiones en la mucosa oral, hiper-salivación, conjuntivitis, necrosis muscular, coronitis y cojera. (Elbers et al., 2008). Otras manifestaciones de la enfermedad son la esterilidad temporal en los toros, y la aparición de efectos teratogénicos. Además, en terneros infectados preparto, se puede observar una lesión denominada “ojo blanco”, que aparece tras la toma del calostro y que se produce como consecuencia de la presencia de inmunocomplejos. Además, y aunque no relacionado con el serotipo 8, en bovino se ha descrito el denominado “síndrome de sensibilización” caracterizado por la aparición de dermatitis eosinofílica como consecuencia de una reacción de hipersensibilidad tipo 1 mediada por IgE (Anderson et al., 1987).

En cabras, generalmente no se produce sintomatología, aunque puede darse un cuadro subagudo caracterizado por la aparición de fiebre así como por la presencia de una

ligera hiperemia en conjuntiva y mucosa nasal. Sin embargo, en otros casos como en el transcurso de brotes descritos en Israel, en India e incluso en Europa, se observó la aparición de cuadros clínicos con la aparición de los síntomas clásicos de la enfermedad (Luedke y Anakwenze, 1972; Allepuz et al., 2010; Sánchez-Cordon et al., 2010b).

Habitualmente, en las especies de rumiantes silvestres, la enfermedad se desarrolla de manera subclínica o inaparente. En el caso de aparición de sintomatología, se puede observar disminución de peso, fiebre, descarga nasal, exceso de salivación, dificultad respiratoria, edema facial, glositis y cojeras. En presencia de sintomatología en rumiantes silvestres, esta enfermedad puede confundirse con la EHD cuyo agente etiológico es un Orbivirus próximo al causante de la LA y causante de síntomas similares (Parsonson, 1990).

I.1.3.3 LESIONES

Entre las principales lesiones macroscópicas destaca la presencia de un intenso edema subcutáneo a nivel de la cara, en la base de las orejas, a nivel intermandibular y en la zona ventral del cuello junto a la presencia de congestión, edema y úlceras en mucosa oral, hiperemia, hemorragias, erosiones y ulceración de la mucosa del tracto digestivo superior, linfadenitis con presencia de hemorragias, hiperemia pulmonar junto a la presencia de edema alveolar y la aparición de espuma en tráquea y árbol bronquial, hidrotórax, hidropericardio y hemorragias petequiales en el saco pericárdico. Además se observan hemorragias subendoteliales en grandes vasos como la arteria y vena pulmonar así como necrosis del músculo esquelético y cardiaco, en especial del músculo papilar del ventrículo izquierdo. (**Figura 6**).

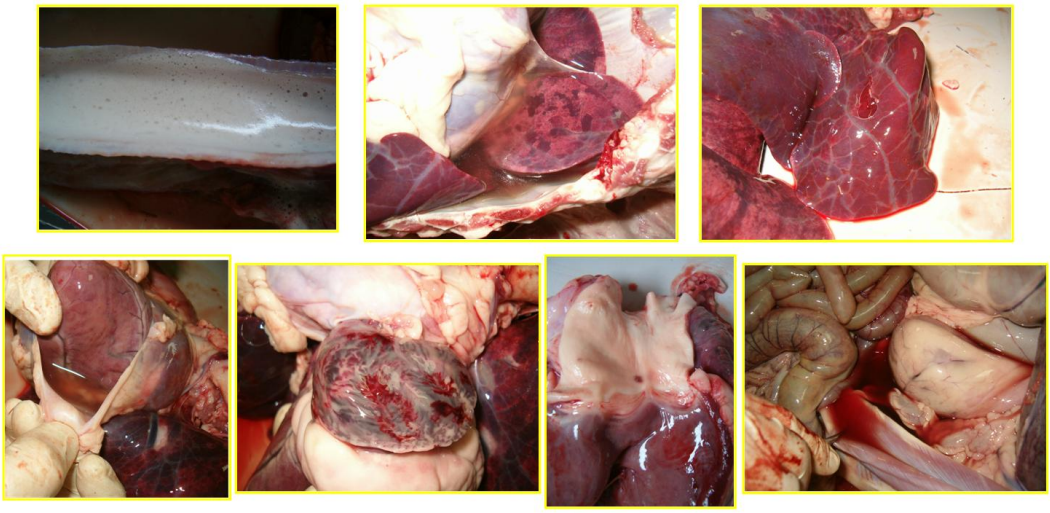


Figura 6. Lesiones en ovino producidas por el virus LA: espuma en tráquea a consecuencia del edema alveolar, hidrotórax, edema intersticial, hidropericardio, hemorragia subepicárdica en aurícula, hemorragia en la base de la arteria pulmonar, ascitis.

En los bovinos afectados por el serotipo 8 entre las principales lesiones observadas destacó la presencia de rinitis, descarga nasal, epífora, inflamación periocular, efusiones pleural, pericárdica y abdominal, llegándose a observar edema pulmonar importante en los casos más graves de enfermedad aguda.

I.1.4. IMPORTANCIA ECONÓMICA

Para valorar la importancia y la repercusión de esta enfermedad en España, es fundamental tener en cuenta cual es la situación actual de la producción de Ovino y Bovino en nuestro país, pues se trata de los dos sectores que se ven afectados en caso de aparición de la enfermedad.

Dentro de la Unión Europea (UE) de los 27, el sector ovino español, es el segundo en importancia con casi 20 millones de cabezas, solo superado por Reino Unido con cerca de 22 millones de cabezas. En España la producción ovina supone más del 10% de la Renta Final Agraria, indicando el balance del comercio exterior que España es un país netamente exportador de carne de Ovino (MARM, 2009a).

En cuanto al otro gran sector que se ve afectado por esta enfermedad, el sector vacuno, y dentro de éste, el vacuno de carne, que sufre un gran número de movimientos de animales vivos, es especialmente importante, pues en España, tras el porcino, éste es el segundo sector ganadero en importancia económica. Aunque España se encuentra por orden de importancia como el quinto de Europa, cabe destacar la gran cantidad de movimientos que se producen entre el resto de países comunitarios y España. En lo que a exportación se refiere desde nuestro país se envían 148.000 animales al año, mientras que recibimos unos 700.000 animales (MARM, 2009b).

La importancia económica de esta enfermedad radica no sólo en las pérdidas directas que ocasiona la muerte de animales, sino también en la pérdida de condición corporal de los animales, el retraso en el envío a matadero o la disminución del rendimiento canal, la degradación de la lana o el retraso en el crecimiento de esta, así como los fallos reproductivos, los abortos o el nacimiento de corderos débiles o malformados (Erasmus, 1975). Además aunque el ganado bovino en principio sufre menos la enfermedad, en caso de que aparezca, se producirán pérdidas económicas directas, pero sobre todo descenso en la producción de leche, pérdida de peso en terneros así como malformaciones. Además, la aparición de la enfermedad implica la restricción de movimientos o de exportación de semen, con las pérdidas económicas que esto conlleva (Hourrigan y Klingsporn, 1975).

Sirvan como ejemplo los datos de mortalidad del brote del serotipo 10 en los años 50 en el que murieron más de 180.000 animales (Mellor y Boorman, 1995) o el brote del serotipo 2, que tuvo lugar exclusivamente en Baleares, pero que produjo la muerte de 10.000

animales a consecuencia de la enfermedad o de su erradicación (Martínez et al., 2005). En conjunto, el cálculo de las perdidas tanto directas como indirectas por explotación, conduce a la estimación de que la LA entre los años 2005 y 2009 le ha costado a España 115 millones de Euros (Martinez-Lopez, 2009). Pero a nivel económico no sólo debe tenerse en cuenta el número de muertes o de pérdidas por explotación, pues las medidas de control y erradicación suponen un coste que debe tenerse en cuenta. Como ejemplos de estos gastos, cabe destacar que en el brote del serotipo 2, se vacunó a todo el ganado ovino, con un esfuerzo tal, que en tan sólo 6 semanas se vacunó a más de 300.000 ovejas (Aguero et al., 2002; Alba et al., 2004). Otro dato que facilita la comprensión de los gastos generados en la erradicación, es el hecho de que en 2008, España compró 80 millones de dosis vacunales, con un coste de 50 millones de euros. Además dentro de las medidas de control y erradicación, no sólo genera costes la vacunación, pues también se generan otros gastos como los derivados de análisis integrados en la vigilancia serológica, teniendo en cuanta que entre 2006 y 2009 en España se analizaron 270.144 muestras.

I.1.5. DIAGNÓSTICO

Ante la aparición de un brote, el primer diagnóstico que se realiza es el diagnóstico clínico. Además existen una serie de herramientas diagnósticas disponibles y atendiendo a la clasificación realizada por la OIE para ésta enfermedad, estas se dividen en aquellas que están enfocadas a la identificación del agente y las denominadas pruebas serológicas.

I.1.5.1. IDENTIFICACIÓN DEL AGENTE

Para llevar a cabo la identificación del agente se suelen emplear distintos métodos entre los que destaca el aislamiento de virus, la aplicación de métodos inmunológicos (Clavijo et al., 2000a), y el empleo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Aislamiento del virus:

Aislamiento en huevos embrionados de pollo de 10 a 12 días de edad. Se considera el método de aislamiento vírico más efectivo. Para ello se inoculan los huevos, con el virus aislado a partir de las muestras, y se incuban a 32-33ºC. Si estos mueren en menos de 24h, se considera que la muerte se debe a una causa inespecífica, mientras que todos aquellos que mueren entre los días 2 y 7, son analizados.

Aislamiento en cultivos celulares: Esta técnica presenta menor eficacia que el aislamiento en huevo embrionado y se basa en el análisis del efecto citopático (ECP) que el virus provoca en células de mamíferos. Para esta prueba se utilizan cultivos de líneas celulares susceptibles al virus de la LA como la línea celular BHK 21.

Aislamiento en ovejas. Esta técnica es la de elección cuando se supone que la carga viral es baja como sucede, por ejemplo, en ciertos brotes tras varias semanas de infección. Una vez inoculadas las ovejas a los 7 - 14 días se puede aislar el virus de la sangre de estas ovejas. En esta prueba se debe monitorizar la presencia de fiebre diariamente, así como sintomatología clínica durante 28 días, comprobándose además la presencia de anticuerpos una vez a la semana.

Este tipo de pruebas de identificación del agente, basadas en el aislamiento del virus, se realizan tanto en brotes de animales domésticos como de silvestres.

Métodos inmunológicos

Continuando con las pruebas de diagnóstico enfocadas a la identificación del agente el siguiente tipo son los métodos inmunológicos que se basan en la capacidad de evidenciar la presencia del virus gracias a reacciones inmunológicas.

Estudio de la presencia de virus de un serogrupo. En este caso se utilizan anticuerpos monoclonales frente a proteínas conservadas dentro del serogrupo como la VP7. Para la realización de esta técnica se debe conocer el serogrupo al que pertenece el virus del que se sospecha. Las diferentes herramientas de que se dispone para realizar el estudio de serogrupo son la Inmuno-Fluorescencia, el Enzimunoensayo de captura de antígeno, o la prueba inmune puntual.

Serotipificación por neutralización del virus. Este método es específico de serotipo y permite estudiar aislados. Además se puede modificar para llevar a cabo el estudio de la especificidad de los anticuerpos presentes a fin de confirmar el serotipo frente al que se produce la reacción. Existen diferentes técnicas que permiten serotipificar como son: la reducción de placas, la inhibición de placas, la neutralización en microtitulación (Clavijo et al., 2000b) y la inhibición de la fluorescencia (Blacksell y Lunt, 1996).

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR es una técnica basada en la amplificación de ácidos nucleicos del virus, con el objetivo de evidenciar su presencia a partir de muestras biológicas de distinto origen (Rodriguez-Sanchez et al., 2010). Esta técnica se realiza de manera dirigida, y dependiendo del objetivo diagnóstico de la prueba, el fragmento a amplificar se seleccionará de una región u otra, atendiendo por ejemplo, a la necesidad de identificar el serotipo o sólo el serogrupo. Dicha técnica también puede emplearse para llevar a cabo distintos estudios epidemiológicos, permitiendo diferenciar entre virus vacuna y virus campo (Aguero et al., 2002). Cuando dicha prueba se lleva a cabo sobre muestras de animales sospechosos debe tenerse en cuenta, que la reacción positiva no implica viremia, sino simplemente detección de ácidos nucleicos del virus LA. Así, distintos trabajos han descrito resultados positivos en terneros y ovejas obtenidos

30 y 90 días respectivamente, tras el último aislamiento vírico, no siendo considerados dichos animales fuente de infección (Singer et al., 2001).

I.1.5.2. PRUEBAS SEROLÓGICAS

Puesto que tras la exposición al virus, los animales generan anticuerpos específicos, tanto de serogrupo como de serotipo, el estudio de la presencia de anticuerpos permite indirectamente diagnosticar el contacto de los animales con el virus. Para tal fin se emplean distintas herramientas entre las que destacan:

Inmunodifusión en Gel de Agar (AGID): Se basa en la capacidad para evidenciar la precipitación de los complejos antígeno-anticuerpo en un gel de Agar. Esta técnica es inespecífica, y puede dar lugar a reacciones cruzadas con la EHD. Por tanto, otras técnicas con mayor especificidad deben considerarse, como la técnica del Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) y en concreto el ELISA de competición (ELISAc) (Afshar et al., 1989) y el ELISA de doble reconocimiento.

ELISAc: Este método se basa en la competición de los sueros problema con unos anticuerpos monoclonales (3-17-a3, 20e9, 6c5f4d7) que se unen a la región amino terminal de la VP7. Este tipo de ELISA, presenta alta especificidad, pero no elevada sensibilidad, pues se obtienen numerosos falsos negativos, debido a la gran afinidad del anticuerpo monoclonal de competición por la VP7. En la actualidad se está utilizando otro tipo de ELISA: ELISA de Doble Reconocimiento.

ELISA de doble reconocimiento. Se basa en la capacidad de cada uno de los anticuerpos del suero problema, para unirse simultáneamente a dos antígenos (VP7) del virus.

I.1.6. PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA ENFERMEDAD

La LA es una enfermedad de declaración obligatoria, con graves repercusiones económicas, que ha presentado una difusión preocupante en los últimos años, con el agravante de ser una enfermedad transmitida por vectores cuyo hábitat se ha expandido considerablemente. Por tanto, es imprescindible la implementación de programas de prevención, control y erradicación para esta enfermedad.

La OIE señala qué medidas deben llevarse a cabo frente a esta enfermedad. Estas medidas se recogen en la legislación de la UE (Consejo de la Unión Europea, 2000; Comisión de la Unión Europea, 2002) y a nivel nacional se establece la normativa propia (MAPA., 2001, 2007) cuyas medidas se resumen en la **tabla 1.**

Sospecha	*Confirmación*	*Prevención*
Vigilancia de la explotación	**Sacrificio si es necesario**	**Control de movimientos**
Recuento lugares propicios para el vector	**Destrucción de cadáveres**	**Inspección**
Estudio epidemiológico	**Vacunación**	**Rápida notificación de sospecha**
Estudio clínico / necropsia	**Estudio epidemiológico**	**Desinsectación de transportes**
No trasladar animales	**Establecer zonas libres y de cuarentena.**	**Vigilancia serológica y entomológica**
Desinsectación	**Vigilancia Serológica**	**Vacunación**
Retirada de cadáveres	**Control de vectores**	

Tabla 1. Resumen de las operaciones que se deben llevar a cabo en la lucha frente a la LA.

I.1.6.1.MEDIDAS PARA LA LUCHA CONTRA LA LENGUA AZUL.

De acuerdo con las directrices europeas e internacionales, las medidas para luchar contra esta enfermedad en España se basan en la rápida notificación de los casos, la restricción de movimientos, el establecimiento de áreas de protección y vigilancia, el confinamiento de los animales durante las horas de máxima actividad de los vectores, así como en medidas de control del vector, investigaciones clínicas, serológicas, virológicas, epidemiológicas y entomológicas y el sacrificio de animales está contemplado como medida de lucha frente a la LA, si bien, resulta evidente que en el caso de una enfermedad transmitida por vectores, como la LA, el vacío sanitario no es una medida efectiva (Caporale et al., 2004). Así mismo se recomienda la vacunación de las especies sensibles frente a la enfermedad (MARM., 2008), siendo ésta una de las actuaciones más recomendables y efectivas para su control y erradicación.

I.1.6.2. VACUNACIÓN DE LAS ESPECIES SENSIBLES

La vacunación es una medida encaminada a evitar la aparición de signos clínicos de la enfermedad y a disminuir la circulación viral, lo que conducirá a la erradicación de la LA permitiendo además el movimiento de animales (Zientara et al., 2010). Para proceder a la declaración de un país como libre de la enfermedad, la OIE requiere la ausencia de casos en el ganado y la ausencia de circulación viral en los *Culicoides* durante 24 meses. Además, requiere la no vacunación en los últimos 12 meses, lo que implica que en el caso de solicitar la declaración como libre de un país que está vacunando, se debe demostrar la negatividad en los animales centinelas, tanto mediante serología como mediante virología.

Puesto que no existe inmunidad cruzada entre serotipos del virus de la LA, la vacunación se llevará a cabo frente a los serotipos específicamente identificados en cada una

de las regiones. Desde 2006, en España se han utilizado vacunas inactivadas, siendo estas las únicas autorizadas en la actualidad para el control de la enfermedad. La vacunación llevada a cabo frente a los serotipos 1, 4 y 8 se rige por las órdenes ministeriales ARM/3373/2010 y ARM/1614/2011 en las que se determinó que la vacunación sería obligatoria sólo hasta el 30 de junio de 2011 dependiendo de las zonas restringidas, pasando a ser voluntaria a partir de esa fecha. En el caso del serotipo 1 para toda la península y Ceuta y Melilla. Para el serotipo 4 solo en la zona de restricción localizada en el suroeste del país (de color naranja en la **Figura 4**), mientras que la vacunación frente al serotipo 8 se llevaría a cabo sólo en las provincias de Cádiz y Málaga.

El futuro de la vacunación y de la producción de vacunas, pasa por la obtención de vacunas con capacidad para diferenciar animales vacunados de animales infectados (DIVA). Otro aspecto importante en el desarrollo futuro de vacunas es la dificultad para conseguir vacunas multivalentes que permitan controlar un gran número de serotipos al mismo tiempo.

I.1.6.2.1. VACUNAS CONVENCIONALES

La característica común que presentan todos los tipos de vacunas convencionales, tanto atenuadas como inactivadas, es su capacidad para generar una repuesta eficaz, y duradera, en la que se generan linfocitos B así como linfocitos T de memoria. Cabe destacar que las vacunas atenuadas constituyen una herramienta encaminada al control de la enfermedad, mientras que las vacunas inactivadas son fundamentales en la erradicación. A continuación se describen de forma breve sus características más importantes.

I.1.6.2.1.A. VACUNAS ATENUADAS

Las vacunas vivas atenuadas pueden ser monovalentes (un sólo serotipo) o polivalentes (varios serotipos). Para su producción, los virus atenuados se obtienen mediante pases seriados del virus natural en huevos embrionados de pollo o en células cultivadas. Tras varios pases seriados, la virulencia se atenúa, lo que permitirá una replicación del virus con títulos más bajos. Estas vacunas atenuadas presentan una inmunidad efectiva y duradera, siendo necesaria sólo una dosis para conferir protección. Su coste de producción no es elevado, siendo capaces de generar una buena respuesta inmune (RI).

Entre los posibles inconvenientes que generan este tipo de vacunas, cabe destacar su potencial recombinación génica, o la existencia de virulencia residual, así como la capacidad de provocar viremia, inducir fallos reproductivos, o provocar efectos teratológicos (MacLachlan, 2004). Su aplicación en hembras gestantes durante la primera mitad de la gestación, puede causar muerte fetal con poca presencia de virus en los fetos, llegando a inducir malformaciones cerebrales en ovino. Además estas vacunas pueden provocar la disminución de la calidad del semen (Breard et al., 2007) y la disminución de la producción de leche en ovejas. Al tratarse de vacunas vivas, y dada su posible capacidad de replicación, no puede descartarse la posibilidad

de que el virus pueda ser transmitido por vectores a otras zonas no afectadas tras la picadura de animales vacunados, generando la difusión de la enfermedad (Savini et al., 2008). Debido a esta teórica difusión del virus vacunal, resulta fundamental que se utilicen sólo vacunas frente a los serotipos presentes en cada momento con el fin de evitar la introducción de nuevos serotipos, así como utilizarlas en los meses fríos para evitar la transmisión. Un posible ejemplo de esta capacidad se produjo durante la campaña de vacunación en Islas Baleares para controlar el serotipo 2. En este caso se pudo detectar la presencia del serotipo 2 en las vacas no vacunadas. Sin embargo, se comprobó que se trataba de virus campo, no llegándose a demostrar la presencia del virus vacunal en estos animales, descartándose así la posibilidad de diseminación del mismo a partir de las ovejas vacunadas con vacuna viva atenuada frente al serotipo 2 (Aguero et al., 2002).

A pesar de los inconvenientes señalados, las vacunas atenuadas siguen siendo una herramienta de gran utilidad sobre todo en situaciones de emergencia, en zonas endémicas, así como en aquellos momentos en los que es necesario vacunar gran cantidad de animales en cortos periodos de tiempo. Tras su utilización, los movimientos de animales son totalmente seguros tras 28 días en ovinos y 60 días en bovinos. En general, las vacunas vivas atenuadas son más inmunógenas que las inactivadas, superioridad que se atribuye a la mayor presencia antigénica debida a la replicación viral (Pearson y Roy, 1993).

Finalmente señalar que la utilización de vacunas atenuadas polivalentes, ha sido muy discutida, debido a que la RI se produce principalmente frente a uno o máximo dos de los serotipos incluidos, siendo además elevada la posibilidad de recombinación génica entre los diferentes virus empleados, lo que podría teóricamente dar lugar a la aparición de nuevos serotipos (Batten et al., 2008).

I.1.6.2.1.B. VACUNAS INACTIVADAS

En el desarrollo de vacunas frente a la LA, y teniendo en cuenta los inconvenientes de las vacunas atenuadas, el siguiente paso fue el de producir vacunas inactivadas sin capacidad de replicación en los animales vacunados (Pérez de Diego et al., 2012). Dichas vacunas son más seguras con respecto a la virulencia residual, si bien generan una inmunidad de menor duración y de aparición más lenta. De hecho, para inducir una RI eficaz con vacunas inactivadas, se necesitan normalmente 2 dosis vacunales. Además, en la mayoría de los casos se trata de vacunas de tipo monovalente y por tanto sólo efectivas frente a un serotipo (Savini et al., 2008), aunque en la actualidad existen disponibles algunas vacunas bivalentes frente a los serotipos 2 y 4, así como frente a los serotipos 1 y 8 del virus LA.

Este tipo de vacunas se producen en cultivo a gran escala y bajo condiciones de esterilidad. Para su producción, se realizan el menor número de pases celulares posible, y la inactivación de virus se realiza con etilenimina binaria o cualquier inactivador que garantice su

muerte. A continuación, el virus muerto se purifica, añadiéndose distintos adyuvantes. El proceso de obtención y fabricación en grandes cantidades es más caro que en el caso de las vacunas atenuadas, pero a su favor está el hecho de que no presentan reacciones adversas ni manifestación de cuadros clínicos con fiebre (Savini et al., 2008).

En origen, las vacunas inactivadas fueron aprobadas sólo para su utilización en ovejas, demostrándose posteriormente su seguridad y eficacia también en el ganado bovino (Savini et al., 2009; Calistri et al., 2010). Al contrario de lo que sucede con las vacunas atenuadas, las vacunas inactivadas pueden ser usadas en época de actividad vectorial, no produciendo efectos secundarios. Generan una RI basada en anticuerpos neutralizantes, aunque se ha demostrado que los animales vacunados que no desarrollaron anticuerpos neutralizantes, quedaron protegidos frente al virus (Eschbaumer et al., 2009; García, 2010). A pesar de que en vacuno es necesaria una segunda dosis vacunal a fin de generar una RI suficiente, en ovino se ha comprobado que una sola dosis es capaz de conferir suficiente protección a los animales durante al menos 12 meses (Hamers et al., 2009; Oura et al., 2009; Paradell et al., 2010), aunque con variaciones en la respuesta incluso entre animales pertenecientes a la misma raza (Stott et al., 1985; Wackerlin et al., 2010).

I.1.6.2.2. VACUNAS DE NUEVA GENERACIÓN

Las vacunas de nueva generación han demostrado capacidad para generar una protección suficiente similar a la mostrada por las vacunas convencionales, no siendo transmisibles a otros animales al no presentar virus vivo. Además, existe la posibilidad de generar vacunas polivalentes. En las últimas décadas se han realizado numerosos estudios sobre desarrollo de vacunas recombinantes para la LA en *Vaccinia virus* (Lobato et al., 1997), en *Capripoxvirus* (Wade-Evans et al., 1996), y en *Canary pox virus* (Boone et al., 2007). En este sentido, y no sólo para la LA también para PEA, las más estudiadas o cuyo desarrollo ha mostrado resultados más esperanzadores son las Virus Like Particles (VLP).

I.1.6.2.2.A. VACUNAS DE SUBUNIDADES DESARROLLADAS MEDIANTE TECNOLOGÍA VLP

Las nuevas vacunas VLPs, que se encuentran en fase de desarrollo y estudio, contienen sólo las proteínas estructurales VP2, VP3, VP5 y VP7 del virus (Roy et al., 1997), y permiten realizar quimeras en las que se pueden teóricamente incluir proteínas VP2 de diferentes serotipos en una sola vacuna (Roy, 2003), generando así vacunas polivalentes. Además, es posible asociar VP externas de un serotipo a las VP internas de otro (Loudon et al., 1991).

La técnica de producción de las vacunas VLP frente a la LA, consiste en insertar genes del virus de la LA que codifican para 4 proteínas estructurales (VP2, VP3, VP5 y VP7) en un vector, en este caso un *Baculovirus* (**Figura 7**). El objetivo de esta inserción es que el *Baculovirus* recombinante exprese las 4 VP y sintetice estas proteínas (Noad y Roy, 2003).

Éstas 4 VPs se ensamblan formando una estructura similar a la del virus, que se denomina VLP pero sin presencia del genoma (Pearson y Roy, 1993). Posteriormente la purificación de las VLPs se realiza en un sólo paso debido a sus propiedades físicas.

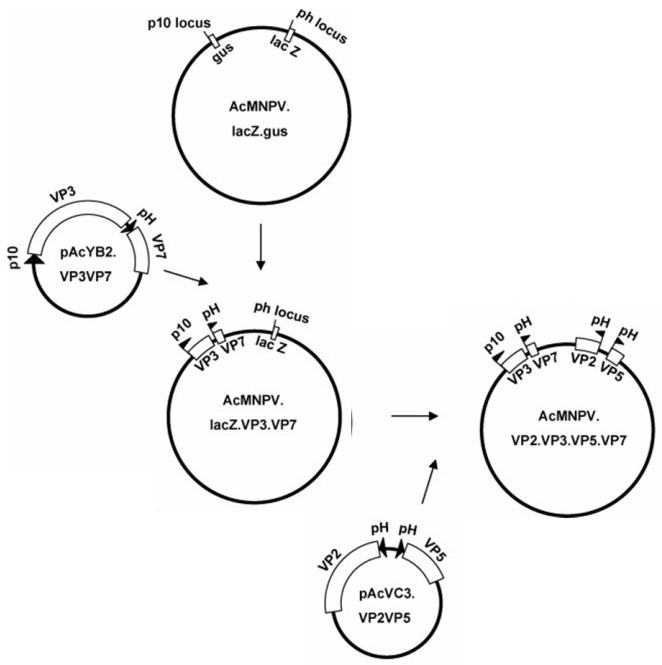


Figura 7. Esquema de la hibridación de los vectores de transferencia con el vector de expresión *(Baculovirus)* para la producción de las VLPs (Stewart et al., 2010).

La coexpresión de las 4 VP mayores en células de insecto utilizando como vector un *Baculovirus* recombinante, resulta en la formación de las VLPs, las cuales son estructuralmente auténticas y estimulan una RI protectora en ovejas (Stewart et al., 2010). Según estudios previos, la vacuna generada por tecnología VLP, estará formada por 60 copias de VP3, 780 copias de VP7, 120 copias of VP5, 180 copias VP2 (Belyaev y Roy, 1993). Se expresan así las 4 proteínas a la vez obteniendo una estructura externa idéntica a la del virus (French et al., 1990). Esta similitud con la estructura del virus, pero sin genoma, es la razón por la cual la cantidad de VP2 necesaria para inducir una respuesta, en este tipo de vacunas es mucho menor que si se utilizara VP2 purificada de manera individual. De hecho, se ha descrito la capacidad de la VP5 para disminuir la cantidad de VP2 necesaria para conferir inmunidad, que se cree puede deberse a la conformación estructural, la cual facilita la exposición de epítopos de VP2 (Roy et al., 1990b).

Este tipo de vacunas VLPs son capaces de estimular una RI celular y humoral duradera, siendo tan efectivas como las atenuadas o inactivadas, pero más seguras que

aquellas que presentan el virus vivo (Pearson y Roy, 1993; Noad y Roy, 2003). Además se ha estudiado su utilización combinada con ciertos adyuvantes oleosos con capacidades para estimular tanto la respuesta celular como humoral (Roy et al., 1992). Finalmente, otra característica fundamental de las VLPs es la posibilidad de distinguir los animales infectados de los vacunados, ya que estos últimos no presentarán anticuerpos frente a proteínas NS puesto que en la vacuna sólo se encuentran 4 VP (Noad y Roy, 2003; Pérez de Diego et al., 2011).

I.2. RESPUESTA INMUNE DEL GANADO OVINO

En la RI típica de mamíferos frente a cualquier patógeno, la primera respuesta defensiva que se produce es la RI innata. A partir de diferentes mediadores producidos durante la RI innata y del propio antígeno, se condiciona la evolución de la RI adaptativa, de hecho, ésta RI, varía dependiendo de la naturaleza del patógeno. En todos los casos, en la RI cobran gran importancia las citoquinas que son las moléculas mensajeras que conectan inmunidad innata con específica y unas células con otras.

I.2.1. RESPUESTA INMUNE INNATA

Entre los mecanismos presentes en la RI innata se encuentran diferentes barreras físicas, químicas y biológicas así como otros mecanismos que incluyen células y citoquinas. Puesto que para el objetivo de ésta tesis las barreras físicas, químicas y biológicas carecen de importancia, en los próximos apartados la revisión se centra en las células que intervienen en la respuesta inmune innata, así como en las citoquinas implicadas.

I.2.1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA

La RI innata es la primera línea de defensa ante la agresión de un patógeno, se produce de manera muy rápida y es inespecífica. Esta respuesta innata se genera frente a cualquier amenaza infecciosa, pero no tiene capacidad para diferenciar, siendo por tanto antígeno independiente e inespecífica. A pesar de sus deficiencias de especificidad, ésta respuesta suele ser muy efectiva concluyendo en la eliminación de la infección (Cutuli de Simón, 2006). Una vez superada la infección, no se establece una memoria inmunológica, lo que implica que en posteriores exposiciones al mismo patógeno la RI innata será igual que si del primer contacto se tratara por lo que no se producirán variaciones en el tipo de RI innata, ni ésta RI será de mayor intensidad (Tizard, 2009d).

I.2.1.2. CÉLULAS IMPLICADAS EN LA RESPUESTA INMUNE INNATA

Monocito / macrófago: Los monocitos, son células inmaduras circulantes que se encuentran en el torrente sanguíneo, desde donde pasan al intersticio tisular pasando a ser macrófagos maduros. Atendiendo al tejido en el que se encuentren reciben diferentes nombres (microglia, histiocito, osteoclasto, macrófago alveolar y célula de Kupffer) (Abbas, 2003b). En el ganado ovino, los monocitos suponen alrededor de un 3% de los leucocitos sanguíneos (Kramer, 2000). Su principal función es la de captar y eliminar agentes infecciosos, o lo que es lo mismo, la fagocitosis (Arjona, 2006). Dentro de la RI innata, están implicados no sólo en la fagocitosis, sino también en la instauración de los fenómenos de inflamación, cicatrización así como en los procesos de presentación de antígeno. Estas células sintetizan Interleuquina (IL) 1, IL12 y factor de necrosis tumoral-α (TNFα). De hecho, esta expresión de TNFα puede inducirse por lipopolisacárido (LPS), para el que existe un receptor en la membrana del macrófago, denominado cluster de diferenciación (CD)14 (Sopp et al., 1996). Puesto que se trata de células presentadoras de antígeno, los macrófagos presentan complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) tanto de tipo I como de tipo II. El CMH tipo I, participa en la presentación de antígenos endógenos, como de proteínas sintetizadas como consecuencia de la infección viral, a los linfocitos T citotóxicos. Por otro lado, la presencia de CMH tipo II en la membrana de los macrófagos es esencial para la presentación de antígenos exógenos a los linfocitos T colaboradores (Th).

Granulocitos: Son las células fagocíticas que constituyen la primera línea de defensa que aparece en la inflamación. Su núcleo es lobulado de ahí el nombre de polimorfonucleares y se dividen en tres categorías: neutrófilos, basófilos y eosinófilos.

Los neutrófilos son la población leucocitaria mayoritaria en humanos y carnívoros en los que suponen el 60-75% de los glóbulos blancos, pero en el caso de los rumiantes y en concreto en el de la especie ovina solo suponen el 30% de los leucocitos (Kramer, 2000). Este tipo celular presenta receptores para factores opsonizantes y la capacidad para fagocitar inmunocomplejos.

Dentro de los Granulocitos, los Eosinófilos son los implicados en la RI frente a parásitos y en la hipersensibilidad de tipo I. Esta población celular supone alrededor del 4% de los leucocitos en sangre periférica (Arjona, 2006).

Los basófilos son el tercer tipo celular dentro de los granulocitos. Estos no presentan capacidad fagocítica pero sus gránulos contienen sustancias que se liberan en presencia de alérgenos. Se cree que los basófilos circulantes son precursores de los mastocitos. En condiciones fisiológicas, este tipo celular representa una mínima cantidad del total de leucocitos en ovejas a lo largo de toda la vida del animal (Ullrey et al., 1965).

Células asesinas naturales (NK). Suponen entre un 3% y un 9% de los leucocitos ovinos y aunque proceden de un precursor de linfocitos T, su maduración no depende del timo Del total de linfocitos circulantes representan entre el 7.5 y 12.6%, y se caracterizan por no presentar receptor TCR ni BCR (Elhmouzi-Younes et al., 2010). Sin exposición previa al antígeno, las células NK son capaces de reconocer células infectadas por virus. Su función es la destrucción de células infectadas, para lo que liberan sustancias citotóxicas y favorecen la activación de receptores pro-apoptóticos. Finalmente cabe destacar que estas células liberan TNFα e Interferón-γ (IFNγ), que actúan de manera autocrina sobre las células NK y de manera paracrina sobre los linfocitos T y las células dendríticas (Schoenborn y Wilson, 2007). Dentro de las células NK, existe una subpoblación denominada NK-T que comparte características con los linfocitos T aunque su TCR es diferente. Cuando se activan producen además de TNFα e IFNγ, IL 4, factor estimulador de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) e IL2. Además las células NK-T presentan un receptor de media afinidad para IL2, que permite su activación citotóxica tras el contacto con IL2 (Arjona, 2006).

Células dendríticas. Su nombre procede de su característica forma con ramificaciones citoplasmáticas. Se trata de una población heterogénea, que no comparte proteínas de membrana y en la que a su vez se pueden diferenciar tres poblaciones de células: las células de Langerhans situadas en la piel, que cambian de denominación cuando migran al linfonodo regional pasando a ser células dendríticas interdigitadas, y por último las células dendríticas foliculares, que se encuentran de manera estable en los folículos de los nódulos linfáticos, bazo y tejido linfático asociado a mucosas (Hoefsmit et al., 1982). La función de las células dendríticas dentro de la RI se sitúa entre la RI innata y la RI adaptativa, pues se trata de una célula presentadora de antígeno (Tizard, 2009b). Preferentemente presentan antígenos a las células T colaboradoras ($CD4^+$) y son capaces de inducir cualquier tipo de RI. Además tienen la capacidad de presentación de antígenos cruzada, es decir, de presentar antígenos exógenos asociados a CMH tipo I a los linfocitos T citotóxicos ($CD8^+$) (Gromme et al., 1999). Las células dendríticas cuentan con receptores que les permiten activar una RI innata antivírica (Dalod et al., 2003) además de sintetizar citoquinas inflamatorias e interferones, desempeñando un papel fundamental de unión entre la RI innata y la RI adaptativa (Sánchez-Cordon et al., 2010a).

Linfocitos T γ/δ. El receptor de antígeno denominado TCR presente en todos los linfocitos T puede ser de tipo α/β o de tipo γ/δ. De manera similar a lo que sucede con las células dendríticas, las células T con receptor γ/δ se sitúan en un plano intermedio entre la RI innata y la adaptativa (Tizard, 2009a). En el caso de los bovinos se ha descrito una molécula presente en este tipo de linfocitos denominada WC1 que no está presente en los linfocitos T γ/δ del ser humano (Davis et al., 1996) pero sí en los linfocitos del ganado ovino. Atendiendo a la presencia o ausencia de este receptor de membrana en las células T γ/δ, este tipo de linfocitos en rumiantes se pueden dividir en 2 sub-poblaciones: T γ/δ$WC1^+$, subpoblación mayoritaria en rumiantes, y T γ/δ $WC1^-$ subpoblación minoritaria comparable a la población total de células T

γ/δ, del ser humano. La población de linfocitos T γ/δ puede alcanzar un 60% de los linfocitos T circulantes en rumiantes jóvenes y de manera fisiológica, se ha observado *in vitro* que los linfocitos T γ/δ de ovino presentan CD25 siendo capaces de aumentar su expresión tras la estimulación con el mitógeno Concanavalina A (Con A) o con IL2 (Hanrahan et al., 1997).

I.2.1.3. CITOQUINAS PRESENTES EN LA RESPUESTA INMUNE INNATA

Como citoquinas involucradas en la RI innata, se puede considerar, entre otras, a IFNα, IFNβ, IFNγ, TNFα, IL1, IL6, IL12, e IL16. Cobran especial importancia aquellas que son producidas por los macrófagos (TNFα, IL1, IL12), las células dendríticas (IL1, IL6, IL12) y las células NK (IFNγ, TNFα).

IFNα e IFNβ→ El IFNα es producido por la mayoría de los leucocitos, mientras que el IFNβ es producido por fibroblastos. Ambos actúan sobre todas las células del organismo, teniendo gran importancia en la RI frente a virus (Biron, 1998).

IFNγ → Posee ciertas propiedades antivirales como los IFNα e IFNβ y es producido por las células NK y los linfocitos T-γδ principalmente. Actúa, conjuntamente con el TNFα, sobre macrófagos, linfocitos T, linfocitos B, células NK y células endoteliales, favoreciendo la expresión de CMH tipo II (Tizard, 2009c).

TNFα → Es una citoquina pro-inflamatoria producida por los macrófagos, mastocitos, linfocitos T, linfocitos B, fibroblastos y células endoteliales que induce la muerte por apoptosis de células infectadas por virus o cancerosas (García Cabrera, 2006). A dosis elevadas, puede producir un shock tóxico.

IL1→ Producida por los macrófagos, con acción similar a la del TNFα, es una citoquina involucrada en respuesta de fase aguda, siendo fundamental para la aparición de la fiebre (Dinarello, 1984).

IL6→ La IL6 es producida por distintos tipos celulares incluidos los macrófagos. Su función en la respuesta de fase aguda cobra gran importancia a nivel hepático estimulando la síntesis de proteínas como el fibrinógeno. Además colabora en la sensibilización de las células del sistema inmune frente a otras citoquinas (García Cabrera, 2006).

IL12→ Es producida por células dendríticas y macrófagos, en los que se almacena. Su función está orientada a estimular la producción de IFNγ e IL2, favoreciendo la citotoxicidad de linfocitos T y células NK, siendo fundamental en la RI adaptativa de tipo celular (Trinchieri et al., 1992). Esta citoquina aparece en las primeras etapas de la RI en respuesta a patógenos intracelulares. Dentro de la RI innata, presenta un gran potencial pro-inflamatorio que puede llegar a ocasionar toxicidad y daño tisular. Además favorece la estimulación de las células NK, promoviendo su función antiviral y anticancerosa (Trinchieri, 1997).

IL16→ Producida por los linfocitos T citotóxicos, actúa sobre los eosinófilos, macrófagos y linfocitos Th, en los que induce la expresión del receptor para IL2 (García Cabrera, 2006).

I.2.1.4. RESPUESTA INMUNE INNATA FRENTE A VIRUS

En las primeras horas tras la infección vírica las principales células presentes en el foco de infección son los macrófagos, los cuales participan en la fagocitosis de las células infectadas donde la replicación del virus tiene lugar. Mediante este mecanismo se intenta evitar la diseminación del virus, dependiendo en gran medida la activación de las funciones fagocíticas del IFNγ. Además, los macrófagos, actúan como células presentadoras de antígeno, desarrollando un papel fundamental en la RI adaptativa (Sahagún, 2010).

En el transcurso de la RI innata frente a virus, las células NK también juegan un importante papel en los estadíos iniciales de la infección mediante la producción de IFNγ así como ejerciendo su papel como células con capacidad citotóxica que actúa directamente sobre las células infectadas o bien a través de su participación en los procesos de citotoxicidad dependiente de anticuerpos (Sepulveda y Puente, 2000).

Otras citoquinas fundamentales en la lucha frente a virus son los interferones. Así, podemos distinguir entre los interferones de tipo I, (IFNα e IFNβ), los cuales inhiben la replicación vírica, la síntesis de proteínas e incrementan la actividad de las células NK, y los interferones tipo II (IFNγ) que inducen una respuesta promovida por los linfocitos $TCD4^{+}$ y regulan el equilibrio entre linfocitos Th1 y Th2. Además, los interferones participan en la activación de otras células inmunocompetentes, en la estimulación de los procesos de presentación de antígeno y en la expresión de CMH tipo I (Samuel, 2001).

I.2.2. RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA

Si la RI innata descrita en el apartado anterior, y resumida en la **figura 8**, no consigue eliminar la infección, se desarrolla entonces la RI adaptativa. Esta inmunidad adaptativa tarda varios días en ser eficaz, está mucho más evolucionada que la innata y consta de 3 fases: reconocimiento, expansión clonal de células específicas y fase efectora en respuesta al patógeno.

I.2.2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA

Las características más representativas de la inmunidad adaptativa son la especificidad y la memoria inmunológíca. La especificidad hace referencia a la capacidad para responder y generar respuestas distintas para diferentes antígenos según el tipo de patógeno. Una vez que el antígeno ha sido reconocido de manera específica, se generan linfocitos específicos de

memoria, que en las respuestas posteriores frente al mismo antígeno, hacen que la RI sea de mayor intensidad. De hecho, se distingue una respuesta primaria, que es la que se genera tras el primer contacto, y una secundaria que sucede en la siguiente exposición al antígeno, siendo la respuesta secundaria mucho más intensa. Aunque la inmunidad adaptativa actúa de manera más efectiva que la RI innata, su activación es más lenta. Dentro de la inmunidad adaptativa, clásicamente se han diferenciado dos tipos de respuesta: respuesta inmune celular y respuesta inmune humoral.

I.2.2.2. INMUNIDAD CELULAR

Se trata de una RI basada en la acción de linfocitos T citotóxicos (Tc). En este tipo de inmunidad existen reacciones en las que están involucrados los anticuerpos como es el caso de la inmunidad celular mediada por anticuerpos. Puesto que es una inmunidad enfocada a la eliminación de patógenos endógenos, este tipo de respuesta es la que generan las vacunas compuestas por virus vivo al replicarse en el interior de las células.

I.2.2.2.1. CÉLULAS IMPLICADAS EN LA INMUNIDAD CELULAR

Los linfocitos T suponen un 56-64% de los linfocitos (Thorp et al., 1991) y dentro de los que presentan receptor de antígeno α/β, se pueden distinguir 2 poblaciones de linfocitos T conocidas como $CD4^+$ y $CD8^+$ respectivamente. Los linfocitos T $CD4^+$ suponen un 8-22% de los linfocitos, mientras que los linfocitos $CD8^+$ suponen el 4-22% de los linfocitos circulantes (Tizard, 2009a).

Los linfocitos T CD4+ actúan como linfocitos Th y atendiendo al tipo de respuesta que inducen se subdividen en Th1 y Th2 (Zhu y Paul, 2008). En la RI celular los que desempeñan un papel importante son los linfocitos $TCD4^+$Th1. estos linfocitos responden a IL12 e IL18, y tras la estimulación con el antígeno secretan IFNγ e IL2 (Arjona, 2006).

La otra población de linfocitos T involucrada en la respuesta celular, son los linfocitos T $CD8^{+,}$ también denominados citotóxicos. Esta población es capaz de destruir las células infectadas gracias a la síntesis de perforina y granulisina (Chavez-Galan et al., 2009) que producen una acción lesiva sobre la célula que la incapacita desembocando en la muerte.

I.2.2.2.2. CITOQUINAS RELACIONADAS CON LA INMUNIDAD CELULAR

En esta RI celular están involucradas citoquinas tales como el IFNγ, IL2, IL12, IL16, IL17, IL21 o el TNFβ.

IFNγ→ Estimula la respuesta de tipo celular, así como la síntesis de IL2 y su receptor. Se trata además de un potente estimulador de la inmunidad innata y de las NK, a las que activa para producir más IFNγ. Además, inhibe la síntesis de IL4 (Samuel, 2001).

IL2→ Está producida por los linfocitos Th1 y actúa sobre los linfocitos T, linfocitos B macrófagos y células NK (Hirano, 1983). Destaca por su capacidad para estimular el crecimiento, proliferación y actividad citotóxica de los linfocitos T (Mosmann y Sad, 1996; Stasny et al., 2001), sin embargo, a pesar de estimular a los linfocitos T, para que se produzca esa respuesta citotóxica, éste estímulo por si sólo es insuficiente, ya que para que los linfocitos Tc puedan responder a la IL2, necesitan haber sido previamente activados por la IL12 y el antígeno.

Entre las tres moléculas que componen el receptor de IL2, la molécula CD25 es un receptor de baja afinidad para la IL2, que presenta gran importancia, ya que se expresa principalmente en los linfocitos T activados por la interacción con antígenos (Bujdoso et al., 1993; Zhu y Paul, 2008). De hecho, el tipo celular denominado linfocito T regulador ($CD4^+$ y $CD25^+$) está involucrado en el establecimiento de una RI de tipo celular Th1.

IL12→ Como ya se ha comentado, la IL12 es sintetizada por células implicadas en la inmunidad innata, pero su importancia en la inmunidad adaptativa, radica en su papel regulador de la respuesta celular favoreciendo el paso de linfocitos $TCD4^+$ a linfocitos Th1 (Brunda, 1994; Trinchieri, 1995). La IL12 induce la producción de Il2 e IFNγ así como sus respectivos receptores celulares, e inhibe la producción de IL4. El IFNγ producido por las células NK y los linfocitos T favorece la producción de IL12, generando por tanto un mecanismo de retroalimentación positivo (Kubin et al., 1994; Ma et al., 1996).

Puesto que la sobreproducción de IL12 puede tener efectos letales, como en el shock endotóxico, debe existir algún mecanismo *in vivo* que limite su producción, siendo la IL10 la mayor inhibidora de la producción de la IL12 (D'Andrea et al., 1993; Koch et al., 1996). Existen estudios en los que se sugiere que la IL12 podría estimular por si misma a los linfocitos CD4 Th2 para la producción de IL10, de acuerdo con este modelo, la IL12 podría limitar su propia producción mediante la inducción de su propio inhibidor (Gerosa et al., 1996; Meyaard et al., 1996).

I.2.2.3. INMUNIDAD HUMORAL

La RI de tipo humoral se basa en la actividad de los anticuerpos cuya función de defensa se lleva a cabo bien mediante la neutralización, que evita la unión de los microorganismos a las células, o bien mediante la opsonización de los patógenos, los cuales son recubiertos por anticuerpos con el fin de facilitar su fagocitosis. Además, los anticuerpos están implicados en la activación del complemento por la vía clásica, la cual requiere la unión antígeno-anticuerpo para iniciarse. La respuesta humoral es inducida además por las vacunas inactivadas.

I.2.2.3.1. CÉLULAS IMPLICADAS EN LA RESPUESTA HUMORAL

Entre las principales células involucradas en este tipo de respuesta destacan los linfocitos T $CD4^+$ de tipo Th2. Tras su activación en respuesta al antígeno, este tipo celular sintetiza una serie de citoquinas como la IL4, IL5, IL6 e IL10, las cuales a su vez promueven los procesos de inmunidad humoral (Wood y Seow, 1996). Entre sus principales funciones destaca la estimulación de linfocitos B, responsables de la posterior producción de anticuerpos.

El otro tipo celular mayoritario en la RI humoral, son los linfocitos B, que presentan en su membrana inmunoglobulinas y suponen entre el 15% y el 35% de los linfocitos circulantes siendo los encargados de producir anticuerpos (Arjona, 2006). Para realizar esa función de producción de anticuerpos, el linfocito B que ha sido específicamente estimulado, se transforma en célula plasmática, que presentará la capacidad de secretar anticuerpos. Los anticuerpos son moléculas glucoproteicas con una región variable que les confiere especificidad por el antígeno y una región constante, responsable de la fijación al complemento, a los linfocitos, a los macrófagos, y a otras células. Podemos distinguir dos tipos de linfocitos B. Por un lado se encuentran las células plasmáticas, de mayor tamaño, y por otro los linfocitos B de memoria cuya función es permanecer en el organismo para facilitar una rápida RI en sucesivos contactos con el mismo antígeno (Mosqueda, 2010).

I.2.2.3.2. CITOQUINAS PRESENTES EN LA RESPUESTA HUMORAL

Entre las citoquinas relacionadas con la maduración de los linfocitos B se encuentran el IFNγ, IL1, IL2, IL5, IL6, IL7, IL11, IL12, IL15 e IL21. Junto con éstas existen otras citoquinas involucradas en el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas, entre las que destacan la IL4 y la IL10 (García Cabrera, 2006). Puesto que algunas de las relacionadas con la maduración de los linfocitos B ya han sido comentadas previamente pues su función principal está más relacionada con la respuesta celular que con la humoral como ocurre con IFNγ, IL2 e IL12, a continuación, se expondrán las características de algunas citoquinas relacionadas con el cambio de isotipo.

IL4→ Está producida por los linfocitos Th2 (Gautam et al., 2009), mastocitos y basófilos y actúa sobre linfocitos T, linfocitos B y mastocitos, macrófagos, fibroblastos y células endoteliales. Estimula la proliferación de mastocitos y de linfocitos B, actuando sobre éstos últimos para que produzcan anticuerpos de tipo IgE. Estimula la expresión de CMH tipo II y en ausencia de IL2 puede estimular a linfocitos T. La acción de esta citoquina inhibe la producción por parte de los macrófagos de IL1, IL6 y TNFα, siendo su antagonista el IFNγ que inhibe la proliferación de linfocitos B (Abbas, 2003a).

IL10→ La IL10 está producida por los linfocitos Th2, por los linfocitos B y otros tipos celulares (macrófagos y mastocitos), actuando sobre los mastocitos, linfocitos Th1, así como sobre los macrófagos, inhibiendo su activación y la síntesis de citoquinas como IL2, TNFα, e

IFNγ. De hecho, en ausencia de IL10, las citoquinas proinflamatorias son secretadas en grandes cantidades, lo que puede dar lugar a daño tisular (Hawrylowicz y O'Garra, 2005). Además, actúa disminuyendo la expresión de CMH tipo II.

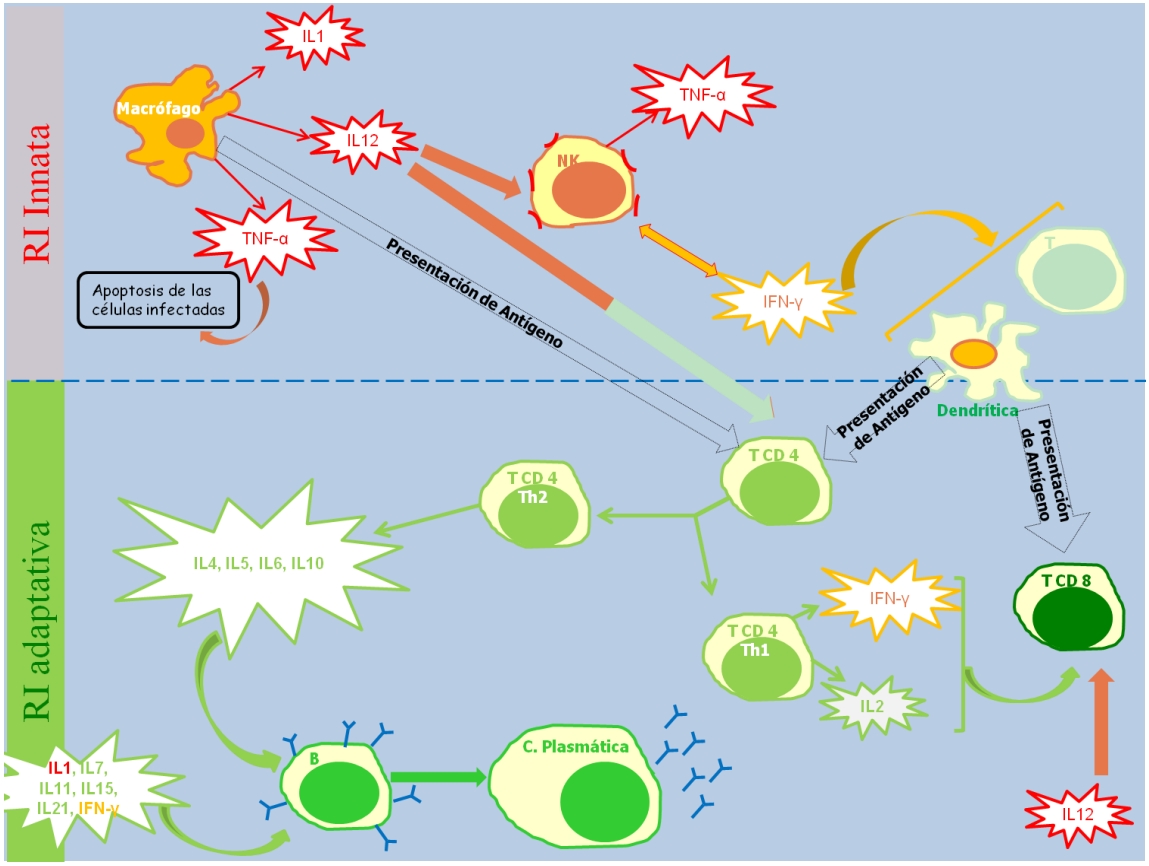


Figura 8. Resumen esquemático de las células y citoquinas más representativas en cada uno de los tipos de RI.

I.2.2.4. RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA FRENTE A VIRUS

Una vez que la infección vírica se ha establecido son los linfocitos T $CD8^+$ los principales responsables de la RI frente a virus gracias a su capacidad citolítica, desempeñando también los $CD4^+$ Th1 un importante papel a trasvés de la producción de citoquinas (TNFα, IFNγ, IL2, e IL8). Los linfocitos T $CD8^+$ generalmente inducen la apoptosis de las células infectadas, pero con la mediación de IFNγ y TNFα, se puede eliminar el virus sin necesidad de que se produzca la muerte celular mediante la destrucción de las nucleocápsides o la desestabilización del ARN vírico (Blanco Gutierrez, 2006).

En la RI adaptativa frente a virus, cobran gran importancia los anticuerpos como agentes neutralizantes en la fase extracelular del virus. Estos anticuerpos neutralizantes se generan de manera específica y actúan evitando la adsorción, la entrada en la célula, e impidiendo la decapsidación efectiva en el interior celular. Además la RI humoral frente a virus

va encaminada a la opsonización, la activación del complemento, la aglutinación de las partículas víricas y a la citotoxicidad dependiente de anticuerpos.

En la **tabla 2** se resumen todos los mecanismos del sistema inmune presentes en la RI tanto innata como adaptativa, frente a virus.

	Respuesta Innata	Respuesta Adaptativa
Respuesta humoral	Complemento Interferones Enzimas y otras proteínas.	Anticuerpos
Respuesta celular	Células NK Macrófagos	Linfocitos $CD8^+$ Linfocitos $CD4^+$

Tabla 2. Mecanismos del sistema inmune involucrados en la respuesta frente a virus.

I.2.3. RESPUESTA INMUNE ESPECÍFICA FRENTE AL VIRUS DE LA LENGUA AZUL

Estudios *in vitro* llevados a cabo sobre células endoteliales infectadas con el virus de la LA, demostraron la existencia de un mecanismo mediado por IFNγ y TNFα secretados por las células endoteliales para disminuir la expresión vírica. Además, se observó un incremento en la presencia de CMH de tipo I, así como la expresión antigénica en el CMH de tipo II (Coen et al., 1991), lo que podría facilitar los procesos posteriores de presentación de antígeno y reconocimiento específico. Coincidiendo con el primer pico de viremia, distintos trabajos han demostrado la existencia de incrementos en los niveles séricos de IFNγ, así como un incremento en la temperatura corporal, cambios que podrían influir en la posterior reducción de los fenómenos de replicación vírica (Foster et al., 1991). La infección *in vitro* de leucocitos bovinos demostró una estimulación de los linfocitos $CD4^+$ en los que se favoreció la expresión del receptor de IL2 (Barratt-Boyes et al., 1992). Otros estudios han demostrado que las células dendríticas migran de manera masiva desde los tejidos donde se localiza el virus de la LA tras la picadura a los nódulos linfoides regionales, donde producen IL1, IL6, IL12, y donde estimulan a los linfocitos T $CD4^+$ y T $CD8^+$, así como la producción de IL10 e IFNγ (Hemati et al., 2009).

Otros estudios *in vitro* han señalado diferencias entre especies en la producción de sustancias vasoactivas a nivel de las células endoteliales, lo que podría influir en la aparición de diferente sintomatología entre especies (DeMaula et al., 2002).

Una vez superada la infección, los linfocitos T $CD8^+$ de memoria presentan una cierta reactividad cruzada entre serotipos, si bien, ésta es diferente a la posible reactividad cruzada que presentan los anticuerpos neutralizantes (Takamatsu y Jeggo, 1989). Esta diferencia podría deberse a la variabilidad existente entre las regiones específicas del virus frente a las que se producen los anticuerpos neutralizantes y las regiones que reconocen los linfocitos $CD8^+$ para iniciar su acción citotóxica.

Las proteínas VP2 y VP5 son las únicas proteínas que han demostrado ser capaces de inducir anticuerpos neutralizantes (Mertens et al., 1989). Estos anticuerpos neutralizantes, que persisten durante toda la vida del animal, pueden conferir protección específica frente a un serotipo, sugiriendo un papel *in vivo* para la neutralización viral mediada por anticuerpos. Los anticuerpos específicos de serogrupo frente a VP7 cuya importancia radica en su utilidad para el diagnóstico más que en su propia función en la RI (Darpel, 2009), persisten sólo durante 6-18 meses (Sánchez-Cordon et al., 2008). En definitiva, los rumiantes infectados de manera natural con un serotipo del virus de la LA muestran una inmunidad sólida de por vida al serotipo homólogo (Sánchez-Cordon et al., 2008).

I.2.4. RESPUESTA INMUNE GENERADA POR VACUNAS FRENTE A LA LENGUA AZUL

Las vacunas atenuadas frente al virus de la LA presentan la capacidad de replicarse en animales vacunados, siendo capaces de inducir una repuesta de tipo celular, pero también de tipo humoral al generar anticuerpos neutralizantes. Una sola dosis confiere inmunidad suficiente para hacer frente al desafío con un virus homólogo (Savini et al., 2008). Esta inmunidad es además duradera presentando células de memoria que podrían tener un papel importante en ausencia de anticuerpos neutralizantes, y que podrían proteger parcialmente frente al desafío con un virus heterólogo (Jeggo et al., 1983; Jeggo et al., 1984a). Con respecto al uso de vacunas atenuadas polivalentes, estudios experimentales en los que se llevó a cabo la inoculación simultánea con varios serotipos, demostraron que en dichos ensayos sólo se produjo la replicación y la producción de anticuerpos frente a un máximo de dos serotipos simultáneamente (Jeggo et al., 1984b; Jeggo et al., 1986).

Sin embargo, el comportamiento del sistema inmune frente a vacunas inactivadas del virus de la LA parece ser diferente. Esta respuesta se apoya principalmente en la respuesta humoral, en concreto en la producción de anticuerpos neutralizantes. La posible reactividad cruzada está relacionada con la homología que presenten las proteínas VP2 de los diferentes serotipos (Maan et al., 2007). Clásicamente se ha descrito la necesidad de dos dosis para estimular una respuesta suficiente, si bien, actualmente se ha demostrado la capacidad de

inducir una inmunidad protectora frente al virus homólogo con solo una dosis (Hamers et al., 2009; Oura et al., 2009). Recientes estudios establecen además el mantenimiento de anticuerpos 12 meses tras la vacunación clásica con dos dosis (Wackerlin et al., 2010).

Las vacunas de nueva generación desarrolladas mediante tecnología VLP, presentan la capacidad de inducir ambos tipos de respuesta (Noad y Roy, 2003). Se ha comprobado que tras la administración de dos dosis de este tipo de vacunas, se produce una excelente respuesta de anticuerpos, quedando los animales protegidos frente a virus homólogo (Stewart et al., 2010). Además, los adyuvantes utilizados en este tipo de vacunas han demostrado su capacidad para favorecer la producción de anticuerpos neutralizantes (Roy, 2003).

I.3. ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE

En el estudio del sistema inmune y de la RI generada frente a diferentes patógenos se utilizan técnicas que detectan anticuerpos o que valoran la funcionalidad de diferentes células. Entre éstas destacan las técnicas de ELISA, inmunofluorescencia, aglutinación, AGID, radioinmunoanálisis, neutralización o fijación del complemento.

I.3.1. RT-PCR EN TIEMPO REAL PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES QUE CODIFICAN PARA CITOQUINAS

La PCR es un método de amplificación de ADN (ácido desoxirribonucleico) *in vitro* a partir de una cadena de ADN. (Mullis et al., 1986; Mullis y Faloona, 1987). La característica básica del ADN que permite esta amplificación se encuentra en la capacidad de las dos hebras de ADN para separarse y unirse mediante variaciones de temperatura. En la PCR se repiten una serie de ciclos de temperaturas que constan de tres fases:

- Desnaturalización de las hebras de ADN a temperatura elevada (90ºC aproximadamente).

- Anillamiento en el que los cebadores, que son secuencias especificas de la región que queremos amplificar, se unen a la cadena de ADN original (temperatura específica de los cebadores).

- Elongación, fase en la que la Polimerasa añade, a continuación de los cebadores, nucleótidos complementarios a los de la cadena original, dando lugar a una copia de ADN complementario a dicha cadena. Este último paso se produce generalmente a 72ªC.

Este conjunto de tres etapas, denominado ciclo y descrito en la **figura 9**, se repite entre 20 y 50 veces dando lugar a una amplificación exponencial del fragmento inicial. Al finalizar

todos los ciclos de la PCR convencional, los resultados se analizan mediante la electroforesis de los fragmentos de ADN obtenidos en un gel de agarosa.

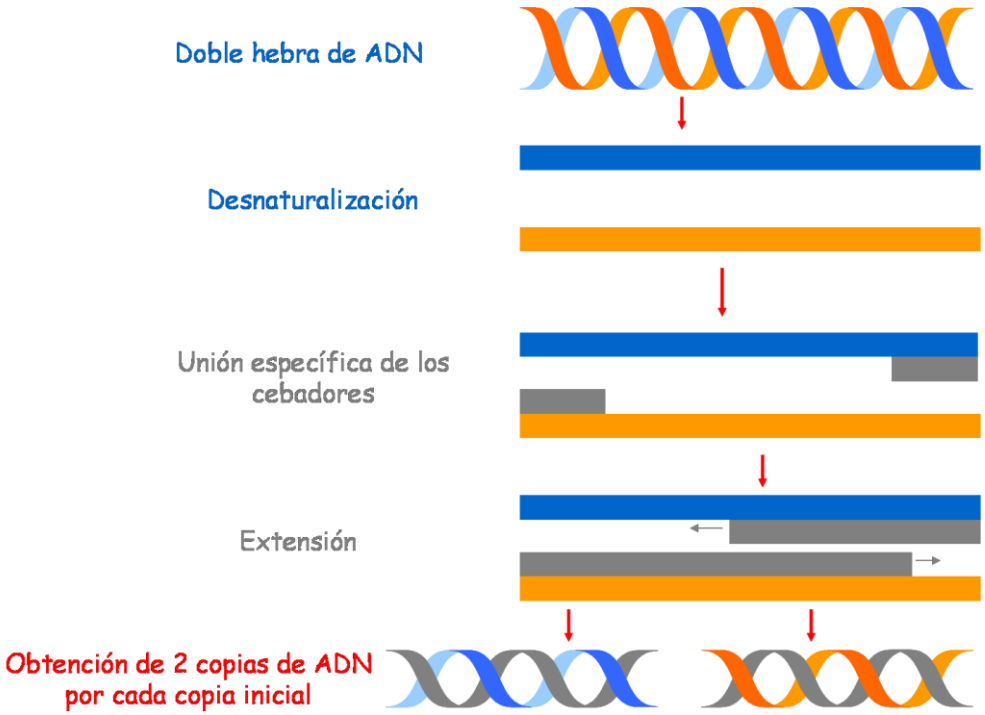


Figura 9. Esquema de un ciclo de PCR.

En el caso de partir de una muestra de ARN, se hace necesario realizar un paso previo en el que se transcribe, de manera inversa, el ARN para obtener ADN. A este paso se le conoce como RT (Retrotranscripción).

I.3.1.1. BASES DE LA RT-PCR EN TIEMPO REAL

La RT-PCR en tiempo real permite la detección y cuantificación de un fragmento de ARN determinado en una muestra. Esta RT-PCR en tiempo real permite monitorizar lo que ocurre en cada ciclo de la reacción de amplificación mediante el uso de fluoróforos inespecíficos como el SYBR GREEN que se une al ADN de doble cadena (Schneeberger et al., 1995) (**Figura 10**). Asimismo, también se pueden emplear sondas específicas como las Taqman, Beacon, Fret o Scorpions. Dichas sondas específicas poseen una molécula emisora de fluorescencia, así como un inhibidor que evita la fluorescencia antes de que se produzca la amplificación y en el caso de que ésta no se lleve a cabo. Entre ambas moléculas existe una secuencia específica del fragmento que se desea amplificar (Giulietti et al., 2001).

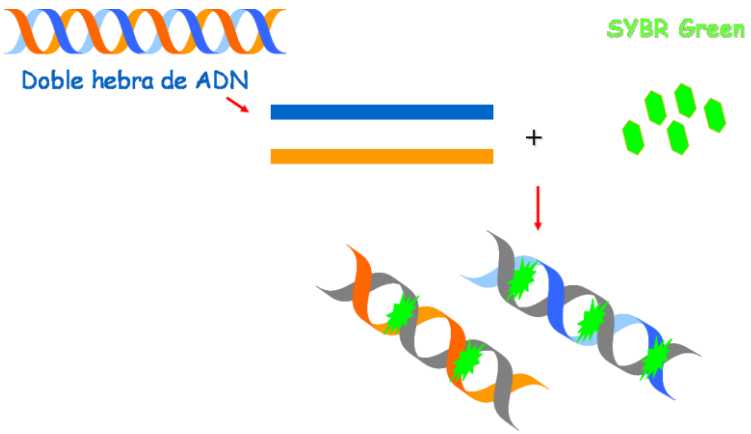


Figura 10. La sonda inespecífica SYBR Green intercalada en la doble hebra de ADN que compone el producto de la PCR.

I.3.1.2. CUANTIFICACIÓN MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL

La intensidad de la fluorescencia emitida en el transcurso de la RT-PCR en tiempo real se mide mediante un espectrofotómetro automatizado integrado en un sistema de detección, obteniendo un valor denominado ciclo umbral ("Ct" threshold cycle) que está directamente correlacionado con la cantidad inicial de ADN buscado en la muestra (Tse y Capeau, 2003)

La representación continua de la fluorescencia emitida por la muestra a lo largo del tiempo, da lugar a una curva sigmoidea, que comienza en la línea basal, donde debido al pequeño número de copias existente la fluorescencia emitida es escasa, y que a continuación muestra un aumento exponencial de la fluorescencia consecuencia de la existencia de un mayor número de copias (**Figura 11**).

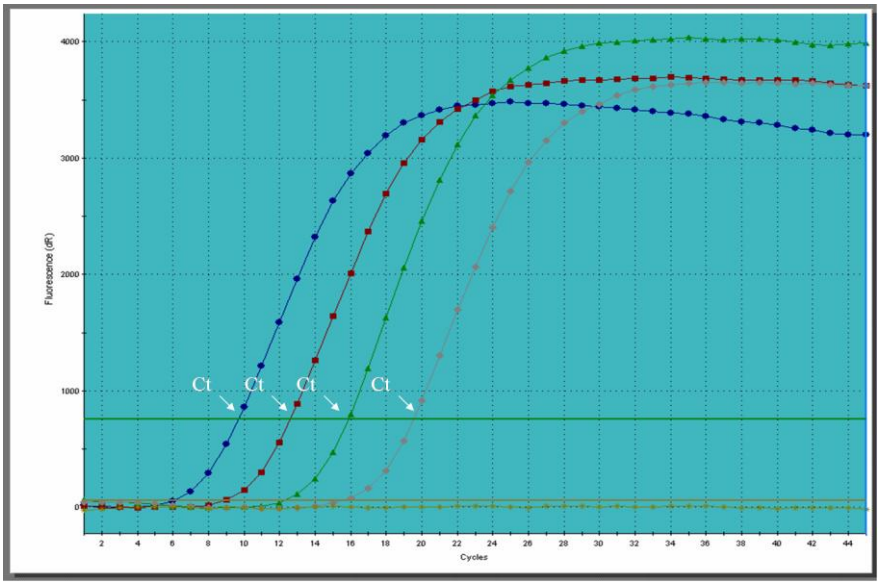


Figura 11. Imagen de una PCR en tiempo real en la que cada una de las muestras presenta un Ct diferente.

El uso del SYBR Green resulta más barato que el de sondas específicas, pero su capacidad para unirse a cualquier ADN de doble cadena implica baja especificidad. En consecuencia, es necesario conocer si la fluorescencia emitida se debe al amplicón esperado, o bien, a otros fragmentos inespecíficos. Para resolver este problema, se lleva a cabo la curva de disociación. Esta curva de disociación consiste en realizar una desnaturalización térmica de la doble hebra de ADN resultante tras la PCR. Para ello se somete el producto de PCR a un incremento de temperatura. En principio, las dos hebras de ADN se mantienen unidas y la fluorescencia emitida permanece constante, hasta alcanzar una temperatura denominda temperatura de anillamiento o de fusión (Tm) del amplicón (fragmento amplificado), en la que ambas hebras se separan, produciéndose una disminución de la intensidad de fluorescencia. Una vez conocida la Tm, se puede determinar en la curva de disociación los picos de descenso de fluorescencia, de manera que si estos se producen a una temperatura diferente a la del amplicón, estaríamos frente a un producto inespecífico o dímero de cebadores **figura 12.**

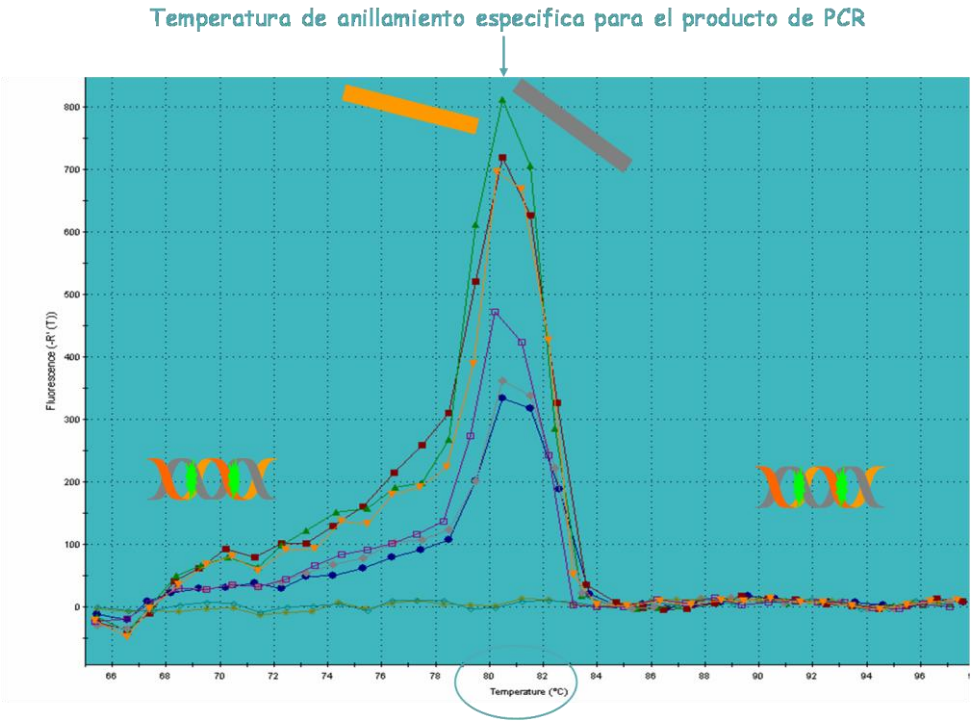


Figura 12. Ejemplo de curva de disociación. Gráfica que representa la cantidad inversa de fluorescencia según la temperatura.

Entre otras ventajas, la RT-PCR en tiempo real permite monitorizar la amplificación a lo largo del proceso, así como valorar posteriormente aquellos ciclos que muestran información valiosa. Permite automatizar el proceso, mejorando la reproducibilidad y disminuyendo la probabilidad de error o de contaminación. Además, no se hace necesaria la realización de electroforesis y permite llevar a cabo ensayos múltiples.

La cuantificación que puede realizarse con esta herramienta puede ser de dos tipos, cuantificación absoluta o cuantificación relativa.

I.3.1.2.1. CUANTIFICACIÓN ABSOLUTA

Para realizar este tipo de cuantificación se necesita una curva de calibración o curva estándar. Para obtener esta curva, se partirá de una muestra con cantidad conocida de ADN. A partir de esta muestra, se realizarán diluciones seriadas, que serán utilizadas como muestras en una PCR. Tras la PCR, obtendremos un valor de Ct para cada una de las diluciones empleadas, correspondiendo el menor valor Ct a la muestra de mayor concentración, mientras que el mayor valor Ct se corresponderá con la muestra más diluida.

Así, una vez conocido el Ct para cada una de las diluciones podremos establecer una "curva estándar" que convertiremos en una "recta patrón" aplicando el logaritmo a la cantidad inicial frente al Ct (Bustin, 2000), lo que nos permitirá conocer a qué cantidad inicial de ADN se corresponde cada valor Ct (**Figura 13**). Una vez obtenida la "recta patrón" podremos conocer la concentración inicial de una muestra problema, utilizando el Ct de dicha muestra y extrapolando los datos con los de la recta patrón.

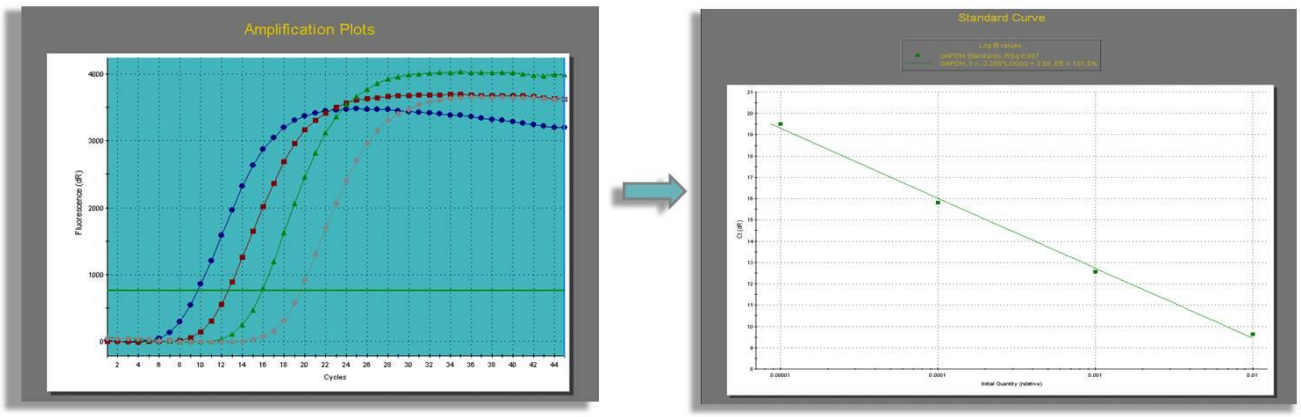


Figura 13. Obtención de la recta patrón tras la realización una PCR a partir de diluciones de una muestra positiva.

I.3.1.2.2. CUANTIFICACIÓN RELATIVA

Se denomina así a la cuantificación de una muestra que se realiza mediante la comparación con un "calibrador". El "calibrador" es una muestra cuya cantidad, conocida o no, se asume como valor 0, de manera que los resultados de cuantificación se expresarán como la cantidad relativa a ese calibrador. Esta técnica se utiliza generalmente para la cuantificación de la expresión de genes, que se expresará como aumento o descenso de la expresión del gen en relación con la cantidad del gen en el calibrador.

Para llevar a cabo este tipo de cuantificación es necesario, además, un control endógeno, que consiste en un gen de expresión constante (ingles: *housekeeping gene*). Éste se conoce como normalizador. El normalizador sirve como control ya que debe amplificarse a partir de todas las muestras de estudio y puesto que su expresión no varía, cualquier variación de la cantidad de normalizador detectada mediante PCR se debe a errores de pipeteo, variaciones en la cantidad inicial de muestra, variaciones en la extracción, o incluso en la RT. Teniendo en cuenta estos datos, el normalizador sirve para estandarizar, de manera que podamos asegurar que una variación en la expresión del gen de interés sea en realidad una variación en la expresión y no un error de la técnica. Los genes más utilizados como normalizadores son rRNA 18S, GAPDH, β-Actina, TBP, HPRT, B-2microglobulina. A la hora de elegir el gen normalizador debe tenerse en cuenta el estudio para el que se va a utilizar, y comprobar que en las condiciones que se van a producir a lo largo del estudio, no se producen variaciones en su expresión (Huggett et al., 2005).

En definitiva, los resultados de la cuantificación relativa para un gen, se expresan como la cantidad relativa detectada respecto a la cantidad del mismo gen en la muestra calibrador, y todo ello estandarizado mediante la medición de un gen normalizador tanto en la muestra problema como en le calibrador.

I.3.2. CITOMETRÍA DE FLUJO PARA LA DETECCIÓN DE POBLACIONES CELULARES DEL SISTEMA INMUNE

Las células del sistema inmune presentes en sangre proporcionan gran cantidad de información sobre el tipo de RI que se desarrolla en respuesta a diferentes estímulos. Con el fin de evaluar la magnitud de la respuesta, las células que están siendo activadas y las vías moleculares que intervienen, es muy importante conocer los niveles basales de la población de células. Todos estos datos pueden obtenerse a través de la citometría de flujo.

I.3.2.1 PRINCIPIOS BÁSICOS DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo es una técnica objetiva, sensible y cuantitativa que permite el análisis rápido y simultáneo de varios parámetros en un gran número de células (Gane, 2002), por lo que se ha convertido en una herramienta importante para la hematología y la investigación inmunológica (Tarrant, 2005).

Para llevar a cabo esta técnica se parte de una solución de células que se hacen pasar a través de un haz de láser de una en una (**Figura 14**). Este paso de manera individual se consigue gracias al flujo laminar que se genera en el citómetro. Cuando el haz de luz incide sobre cada una de las células se obtienen datos sobre las características físicas de éstas ya que se produce una sombra proporcional al tamaño de la célula (dispersión hacia adelante), y además, la luz se desvía lateralmente, proporcionando información sobre su estructura

(dispersión lateral). Estas características denominadas tamaño y complejidad, se utilizan para diferenciar poblaciones celulares (Kania, 2008).

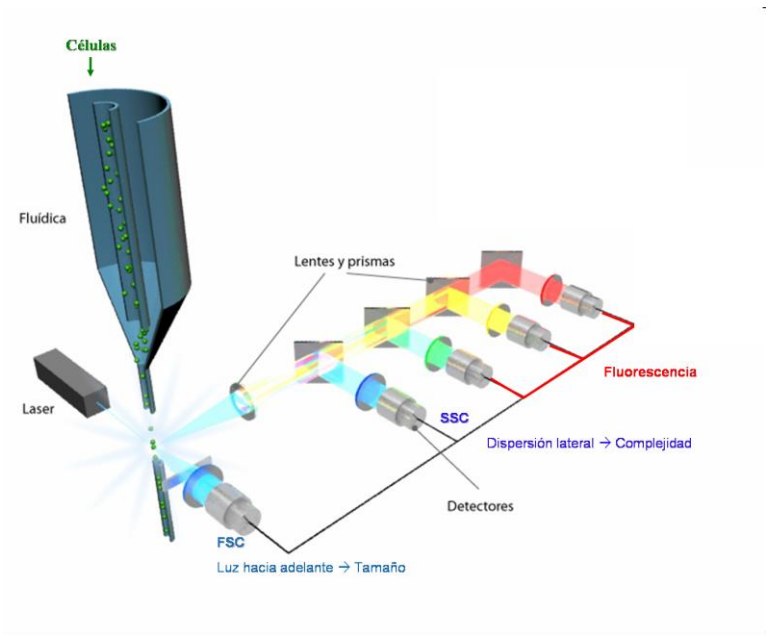


Figura 14. Esquema del citómetro de flujo (Adaptado de *http://www.biotechspain.com*).

Además, basándose en el principio de unión antígeno-anticuerpo se pueden utilizar anticuerpos monoclonales conjugados con un fluorocromo para señalizar las células según sus proteínas de membrana. Esta unión específica del anticuerpo al antígeno se puede detectar mediante la fluorescencia emitida por la célula a su paso por el haz de láser (Tarrant, 2005). La capacidad de la técnica, permite teóricamente analizar hasta 11 parámetros (tamaño, complejidad y la señalización con hasta 9 fluorocromos).

I.3.2.2. APLICACIONES DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo es una herramienta utilizada en diferentes ámbitos tales como la biología molecular, la patología, la inmunología, la biología vegetal y la biología marina, entre otros. Una de las aplicaciones más utilizadas tanto en medicina humana como en veterinaria es el estudio de las diferentes poblaciones de la serie blanca. Para realizar este análisis, se representan los eventos (células) en un citograma de dispersión de acuerdo al tamaño y la complejidad de las células. De esta manera como se observa en la **figura 15** se pueden diferenciar las poblaciones celulares: linfocitos, monocitos, neutrófilos eosinófilos y basófilos (que no dispersan la luz debido a la composición química) además de alguna población anormal de blastos y células. En forma de "ruido" aparecen los restos celulares de los hematíes, plaquetas y la suciedad.

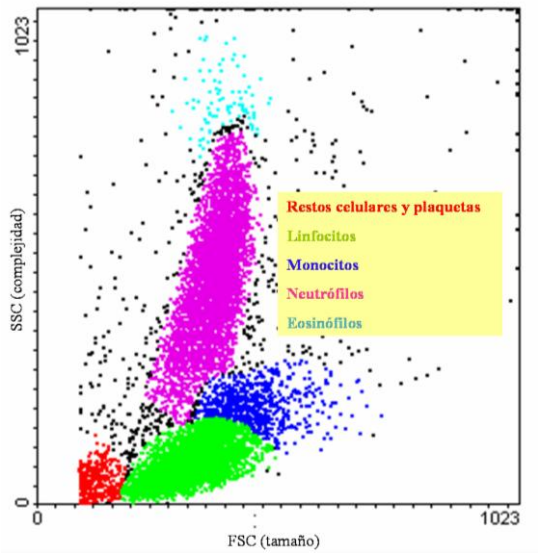


Figura 15. Citograma de dispersión donde se observa la separación de las diferentes poblaciones celulares.

I.3.3. TERMOGRAFÍA INFRARROJA COMO HERRAMIENTA PARA LA DETECCIÓN DE FIEBRE

La Termografía Infrarroja (TI) es una herramienta para la medición de la temperatura y, por tanto, también útil para la detección de fiebre.

I.3.3.1. PRINCIPIOS BÁSICOS DE LA TERMOGRAFÍA INFRARROJA

El movimiento mecánico de las moléculas produce energía en forma de calor, la cual es liberada a través de la superficie corporal en forma de radiación. La TI se fundamenta en el principio de que todos los cuerpos son capaces de emitir y reflejar radiación infrarroja y en que esta radiación es proporcional a la temperatura superficial corporal (Kastberger y Stachl, 2003). Con la TI, el calor es detectado en el espectro infrarrojo (Bitar et al., 2009) a través de una cámara termográfica que genera una imagen con una gama de colores correspondiente con el patrón de las diferentes temperaturas (**Figura 16**).

Figura 16. Comparación entre la imagen digital normal y la imagen termográfica de una oveja.

I.3.3.2. APLICACIONES DE LA TERMOGRAFÍA INFRARROJA

En origen, la TI fue una herramienta utilizada en ingeniería y arquitectura, sobre todo a nivel industrial en la inspección de equipos eléctricos y sistemas de aislamiento térmico. Pero su utilización no está limitada a estos ámbitos. Desde 1950 la TI ha sido utilizada en medicina, siendo descrito su primer uso en este campo para la detección de aumento de temperatura en la piel en tumores de mama (Head et al., 1993; Jiang et al., 2005).

La capacidad de la TI para detectar personas con fiebre es considerada como una característica interesante que puede ser útil también en la medicina preventiva. Destaca como ejemplo su empleo durante la epidemia del síndrome respiratorio agudo severo (SRAS) de 2003 en aeropuertos mediante escáneres térmicos (PublicHealthAgencyofCanada, 2004).

A la hora de recopilar datos de temperatura para la detección de la fiebre el dispositivo ideal debe ser rápido y no invasivo (Ng et al., 2004) siendo éste un punto crucial cuando se trabaja con animales, los cuales pueden padecer estrés con el simple hecho de entrar en contacto con los seres humanos. En el campo de las ciencias veterinarias se debe tener en cuenta que el calentamiento de la superficie corporal depende de factores como el tegumento, ya que se producen grandes variaciones si hay plumas, pelo o púas respecto a la piel desnuda. En el ámbito veterinario, existen estudios relacionados con lesiones del aparato locomotor en caballos (Turner, 1991), detección de inflamaciones en los animales de zoológico, evaluación de la fertilidad de los huevos de aves (Melero M. et al., 2009), el estudio del patrón de aparición de ventanas térmicas en morsas (Rodríguez-Prieto, 2011) y la evaluación de fiebre en terneros infectados con el virus de la diarrea vírica bovina.

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Foto Justificación y Objetivos: Composición de imágenes de diferentes orígenes
(http://www.conmuchagula.com/2010/03/07/quesos-cerrato-el-sabor-de-castilla/)
(http://fotografiajuanjomediavilla.blogspot.com/2010_09_01_archive.html)
(http://www.lechazodecastillayleon.es/)

II.1. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de la LA está incluida dentro de la lista de enfermedades de declaración obligatoria de la OIE. Pese a no tratarse de una enfermedad zoonótica, la LA es una enfermedad con un elevado poder de transmisión y difusión, capaz de provocar graves consecuencias socioeconómicas y sanitarias, que repercuten en el comercio internacional de animales y productos de origen animal.

La vacunación ha demostrado ser una herramienta básica para el control y la erradicación de esta enfermedad, como se ha podido comprobar con la erradicación de los serotipos 2 y 4 en España y el control de la enfermedad en Europa. Entre las características básicas que una buena vacuna debe poseer destacan la capacidad para inducir una RI rápida y segura, así como la posibilidad de su utilización incluso en presencia del vector.

El empleo de vacunas atenuadas puede conllevar ciertos riesgos, ya que dichas vacunas mantienen una cierta capacidad de recombinación genética y replicación, mostrando una virulencia residual que podría provocar la aparición de viremia o de efectos teratológicos en los animales vacunados, pudiendo incluso provocar la transmisión del virus por vectores a zonas no afectadas por la enfermedad. Sin embargo, entre sus ventajas destaca la rápida inducción de una RI protectora de larga duración así como la gran disponibilidad de vacunas de este tipo frente a diferentes serotipos. Por otro lado, en las vacunas inactivadas el virus se encuentra en estado inerte, lo que les confiere una menor virulencia residual. Este tipo de vacunas inducen una inmunidad de menor duración y de aparición más lenta, siendo necesarias en la mayoría de los casos una segunda dosis de vacuna para inducir una respuesta eficaz. La ausencia de inmunidad cruzada entre los distintos serotipos constituye un importante problema a la hora de controlar la enfermedad, ya que la mayoría de las vacunas disponibles en la actualidad son monovalentes, siendo escasa la existencia de vacunas bivalentes. Con el fin de afrontar los problemas anteriormente citados se han desarrollado las denominadas vacunas VLP. Este tipo de vacunas presentan ciertas ventajas como un elevado nivel de seguridad, la posibilidad de diferenciar animales vacunados de infectados, así como la capacidad de generar vacunas polivalentes. Por todo ello presentan un gran potencial para convertirse en las vacunas del futuro, siendo necesario demostrar su capacidad para inducir una buena RI y ofrecer una protección eficaz de los animales.

La importancia de este trabajo radica en los siguientes aspectos:

Actualidad: Desde 1998 Europa ha sufrido una epidemia de LA, en la que se han visto involucrados países en los que nunca antes se había presentado la enfermedad. Esto ha

provocado la puesta en marcha de diferentes campañas de vacunación tanto con vacunas atenuadas como inactivadas, las cuales han mostrado gran eficacia. Sin embargo, existen posibles mejoras en el desarrollo de vacunas y en los planes vacunación.

Repercusión socio-económica: Se trata de una enfermedad que provoca cuantiosas pérdidas económicas a consecuencia de la muerte de los animales y de la disminución en los índices de producción. A estas pérdidas hay que añadir las producidas por las restricciones en los movimientos de animales y los cierres de mercados, así como los gastos derivados de las campañas de prevención.

Impacto científico: Los resultados obtenidos en esta tesis permitirán conocer con mayor detalle distintos aspectos (niveles de citoquinas, evolución de subpoblaciones de PBMCs, etc) relacionados con la RI generada en ovinos tanto por vacunas inactivadas como por vacunas VLP frente al virus de la LA, así como establecer comparaciones entre ambas. La profundización en el conocimiento de la RI generada por las vacunas, podrá ser útil para establecer marcadores biológicos que indiquen una RI protectora y suficiente tras la vacunación, con el fin de conocer la protección conferida por las vacunas sin necesidad de realizar un desafío con el virus virulento en los ensayos de evaluación de eficacia de las vacunas.

II.2. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta la importancia del estudio de la RI en el desarrollo de nuevas vacunas, los objetivos de esta tesis pasan por la puesta a punto de nuevas herramientas para el análisis de dicha respuesta y la realización del estudio comparativo de la RI inducida por vacunas VLP y vacunas convencionales inactivadas, además de profundizar en la RI generada por el propio virus en animales no vacunados, siendo los objetivos concretos de esta tesis los siguientes:

- ✓ Adaptar las técnicas de cuantificación de la expresión de citoquinas mediante RT-PCR en tiempo real, citometría de flujo y termografía infrarroja para el estudio *in vivo* de la RI generada frente al virus de la LA o tras la vacunación con vacunas inactivadas y VLP en ovejas.

- ✓ Caracterizar la evolución clínica y la RI generada por las vacunas VLP monovalente frente al serotipo 1, y VLP polivalente frente a los serotipos 1 y 4 en el ganado ovino, profundizando en aspectos como la expresión de citoquinas y la evolución de diferentes poblaciones celulares del sistema inmune.

- ✓ Describir la evolución clínica y la RI generada por una vacuna comercial inactivada frente al serotipo 1 del virus de la LA en ovejas mediante el estudio de la evolución de diferentes poblaciones celulares del sistema inmune y la respuesta de anticuerpos.

- ✓ Comparar la RI generada frente a las distintas vacunas empleadas en el estudio y evaluar los parámetros que indican que se ha inducido una respuesta protectora frente al desafío con virus homólogo virulento.

- ✓ Caracterizar la evolución clínica y la RI generada en ovejas no vacunadas e inoculadas con los serotipos 1 y 4 del virus de la LA.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

Foto Material y métodos: Composición de imágenes de diferentes orígenes.

(http://noticias.latam.msn.com/co/internacional/articulo_reuters.aspx?cp-documentid=22558128)
(http://www.europarl.europa.eu/sides/getDoc.do?pubRef=-//EP//TEXT+IM-PRESS+20090925STO61221+0+DOC+XML+V0//ES)

III.1. ADAPTACIÓN DE HERRAMIENTAS PARA EL ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE

Con el fin de estudiar la RI y caracterizar la evolución clínica, tanto en ovejas vacunadas como en ovejas no vacunadas e inoculadas con el virus de la LA, se han utilizado y optimizado diferentes técnicas, entre las que destacan la RT-PCR a tiempo real enfocada en el estudio de la evolución de la viremia y la expresión de citoquinas, la citometría de flujo empleada en el estudio de la evolución de las poblaciones celulares del sistema inmune en sangre y la TI como herramienta para la detección de fiebre en el ganado ovino.

III.1.1. RT-PCR EN TIEMPO REAL PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS EN OVEJAS.

Se procedió a realizar diferentes pruebas de laboratorio con el objetivo de establecer las condiciones óptimas para cada reacción. Por otra parte se consideró como un objetivo, la obtención de productos de PCR específicos (amplicones) que pudieran ser almacenados como controles positivos y que finalmente sirvieran como muestra patrón para conocer la eficiencia de cada una de las reacciones.

III.1.1.1. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA DE ARN

Para la puesta a punto de la RT-PCR en tiempo real se utilizó el ARN total extraído de linfocitos de ovejas previamente estimulados *in vitro*. Asimismo, también se utilizó ARN total extraído directamente de sangre completa de ovejas sanas. En ambos casos la sangre fue recogida por veno-punción de la vena yugular en tubos con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético). En los siguientes apartados se describen por orden cronológico los dos métodos empleados.

III.1.1.1.1. OBTENCIÓN DE ARN A PARTIR DE LINFOCITOS ESTIMULADOS *IN VITRO*

Los primeros ensayos se realizaron con linfocitos estimulados *in vitro* obtenidos a partir de sangre procedente de 12 ovejas de raza Rubia del Molar. La obtención de linfocitos se realizó en cabina de flujo laminar para evitar contaminaciones, mediante un gradiente de densidades con ficoll (HISTOPAQUE-1077 *Sigma-aldrich®).* Esta técnica, permite la separación de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs). Para ello, se diluyó la sangre en medio RPMI-1640 en una proporción de 1/1. A continuación se añadió lentamente la sangre diluida a un tubo que contenía un volumen de ficoll previamente calentado a 37ºC. La sangre diluida se añadió lentamente al tubo con el reactivo comercial, evitando en todo momento la mezcla con el mismo. A continuación se centrifugó a 800 x g durante 30 minutos para separar los componentes sanguíneos por gradiente de densidad, de manera que se obtuvieron cuatro

fases: plasma, PBMCs, Ficoll, y granulocitos con glóbulos rojos como se muestra en la **Figura 17**.

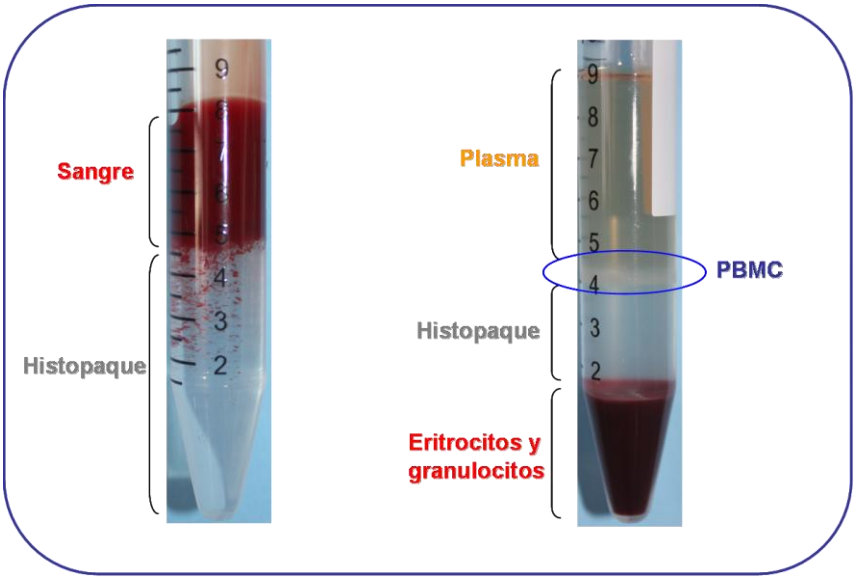


Figura 17. Gradiente de densidades con Histopaque.

Las PBMCs fueron recogidas mediante pipeta y se depositaron en otro tubo limpio, en el que se realizaron 3 lavados con 6 ml de tampón fosfato salino (PBS), seguidos de centrifugación a 200 x g durante 10 minutos. Gracias a la centrifugación, las PBMCs se depositaron en el fondo del tubo, siendo finalmente resuspendidas en 500µl de medio RPMI-1640 suplementado con 1% de L-Glutamina, 1% de piruvato sódico, 1% de una mezcla de penicilina y estreptomicina y 10% de suero fetal bovino (SFB).

Se realizó el recuento celular en cámara de Neubauer y se calculó la proporción de células vivas utilizando el colorante Azul Tripán (Sigma-Aldrich). Dicha técnica se basa en la capacidad del cromóforo, cargado negativamente, para unirse a células con la membrana dañada (Pappenheimer, 1917). Una vez separados los linfocitos, y tras la realización del recuento de linfocitos viables, se ajustó la concentración entre 2 y 5 millones/ml, usando el medio de cultivo RPMI-1640 suplementado. De esta solución se cultivaron 100 µl por pocillo, lo que suponía entre 200.000 y 500.000 PBMCs.

A continuación, estas células en cultivo, mayoritariamente linfocitos, fueron estimuladas con diferentes concentraciones de mitógenos a distintos tiempos (**Tabla 3**), a fin de favorecer la producción de citoquinas. Los mitógenos utilizados fueron Con A , proteína globular de origen vegetal que se obtiene a partir del frijol *Canavalia ensiformis*, la cual presenta gran capacidad de inducción de mitosis en los linfocitos (Schwartz y Wilson, 1971) y LPS de *E.coli* que estimula a los monocitos y a los linfocitos B (Symons y Clarkson, 1979).

MITÓGENO	Con A					LPS		MEZCLA	
								Con A	LPS
CONCENTRACIÓN (µg/ml)	0,5	1	5	10	15	10	15	5 10 10	5 10 5
TIEMPO	16h, 24h y 48h → 24h								

Tabla 3. Mitógenos utilizados para la estimulación de los linfocitos junto con las concentraciones y tiempos de cultivo que fueron utilizados.

III.1.1.1.1.A. EXTRACCIÓN DE ARN, DE LINFOCITOS ESTIMULADOS *IN VITRO*, UTILIZANDO TRIZOL™

Para la extracción del ARNm de los linfocitos estimulados *in vitro*, inicialmente se utilizó Trizol™, método basado en la purificación de ácidos nucleicos mediante la técnica del fenol-cloroformo (Chomczynski y Sacchi, 1987). Para ello, inicialmente se obtuvieron las PBMCs del pocillo en el que fueron cultivadas mediante 2 lavados de arrastre con 500µl de medio RPMI y su posterior centrifugación durante 10 min a 200 x g. Tras retirar el sobrenadante de los tubos de centrífuga de 2 ml (Eppendorf®) en los que se encontraban las suspensiones celulares, se les añadió 1 ml de Trizol™ por cada millón de células y se homogeneizaron las muestras. A continuación se añadieron 200µl de cloroformo (Panreac®) y tras agitarlas en vórtex, se incubaron a temperatura ambiente durante 3 minutos. A continuación, se centrifugaron las muestras a 12.000 x g durante 15 minutos a 4º C, formándose dos fases, una orgánica localizada en la parte inferior del tubo que contenía proteínas y ADN, y otra fase acuosa localizada en la parte superior en la que se encontraba el ARN. La fase acuosa se recogió y se transfirió a un nuevo tubo al que se añadieron 400µl de alcohol isopropílico (Panreac®) con el objetivo de precipitar el ARN. A continuación se incubaron las muestras durante 10 minutos a temperatura ambiente y seguidamente se centrifugaron a 12.000 x g durante 10 minutos a 4ºC, obteniendo así en el fondo del tubo el ARN resultante. Se desechó el sobrenadante y se procedió al lavado del sedimento con etanol frío al 75% (Panreac®), siendo posteriormente centrifugado a 7.500 x g durante 5 minutos a 4ºC. El ARN obtenido se dejó secar a temperatura ambiente, siendo resuspendido en agua libre de enzimas RNAsas y DNAsas (Bioline®).

Asimimso, en la extracción de ARN se pueden emplear kits comerciales de membranas de silica, los cuales fueron testados en nuestro estudio a fin de comprobar su utilidad frente al método Trizol™.

III.1.1.1.1.B. EXTRACCIÓN DEL ARN DE LINFOCITOS ESTIMULADOS *IN VITRO*, UTILIZANDO COLUMNAS CON MEMBRANA DE SILICA.

Para la realización de este tipo de extracción se utilizó el RNeasy Mini Kit® de Quiagen, basado en la capacidad de unión del ARN a una membrana de silica. En la extracción se llevaron a cabo distinto pasos, comenzando por la lisis y homogeneización de la muestra (linfocitos procedentes del cultivo) a la que posteriormente se añadió etanol. Esta mezcla, mediante centrifugación, es la que se hizo pasar a través de una columna que posee una membrana a la que se une el ARN. Una vez unido el ARN a la membrana, se sometió a una digestión con DNAsa, con el fin de eliminar restos genómicos de ADN. Tras la digestión se llevaron a cabo una serie de lavados. Finalmente, se separó el ARN de la membrana, siendo resuspendido en agua libre de RNAsas. En la **figura 18** se muestran los dos protocolos de extracción utilizados.

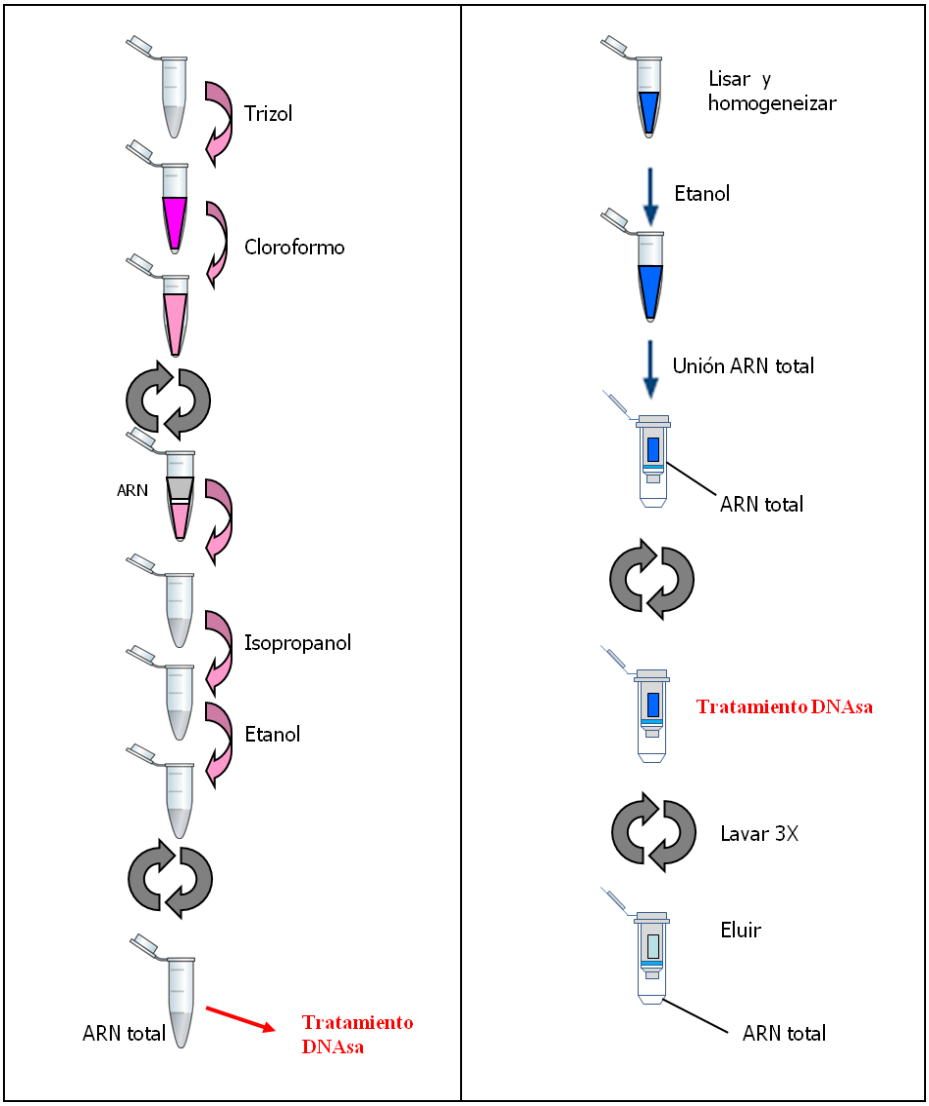


Figura 18. Esquema comparativo de las extracciones de ARN con ambos protocolos: Trizol y RNeasy mini kit.

III.1.1.1.2. OBTENCIÓN DE ARN A PARTIR DE SANGRE ENTERA EN EDTA.

Cronológicamente, el siguiente paso fue comprobar la posibilidad de extraer ARN total, sin necesidad de estimular los linfocitos *in vitro*. Para ello, se llevó a cabo la extracción directamente a partir muestras de sangre recogidas en tubos con anticoagulante (EDTA) de 4 ovejas de raza Churra. En este caso el protocolo es similar al de la extracción de ARN a partir de linfocitos estimulados, con la salvedad de que al tratarse de sangre entera, se llevó a cabo un paso previo, consistente en la lisis de los eritrocitos presentes en la sangre, mediante la adición de un tampón de lisis de eritrocitos y la incubación en frío de la mezcla. Una vez realizado este paso, se llevó a cabo la centrifugación de la mezcla a fin de obtener un *pellet* de leucocitos, eliminándose el sobrenadante compuesto por tampón de lisis y restos de eritrocitos. A continuación se procedió siguiendo el protocolo anteriormente descrito. Para conocer la cantidad de ARN obtenido tras esta purificación, se calculó la concentración mediante espectrofotometría.

III.1.1.2. PROTOCOLO DE RT-PCR PARA DETECCIÓN DE ARNM QUE CODIFICA PARA CITOQUINAS

Puesto que para la realización de la PCR a partir de ARN es necesaria la obtención de ADN complementario (ADNc), el cual se amplificará mediante la PCR, se llevó a cabo un paso previo que conocido como RT. Esta RT previa, puede realizarse en el mismo tubo en que se llevará a cabo también la PCR (RT-PCR en un paso), o como una reacción independiente, cuyo producto será utilizado en parte para la PCR (RT-PCR en dos pasos). A continuación se describe el protocolo correspondiente a ambas técnicas.

III.1.1.2.1.RT-PCR EN UN PASO UTILIZADA DURANTE LA PUESTA A PUNTO

Las primeras pruebas de la puesta a punto de la técnica se realizaron en un paso, es decir, tanto la reacción de RT como la PCR se llevaron a cabo en el mismo tubo. Para realizar esta técnica se utilizó el Brilliant II SYBR® Green QRT-PCR Master Mix Kit (Stratagene), el cual proporciona todos los componentes necesarios para llevar a cabo la síntesis de copias de ADNc a partir del ARN en un único tubo (tampón de reacción, $MgCl_2$, Nucleótidos, SureStar® *Taq* polimersa, SYBR Green, Transcriptasa reversa), salvo los cebadores y la muestra.

Para esta RT-PCR en un paso, la muestra inicial consistió en 40ng - 1µg de ARN procedente de linfocitos estimulados. A esta muestra se le añadió: Master mix de QRT-PCR, la enzima Retrotranscriptasa responsable de la transcripción del ARN en ADNc en las cantidades indicadas por el fabricante y los cebadores en las concentraciones que se describen en la **tabla 6.**

El Termociclador utilizado para la RT-PCR fue el Mx3000p (*Stratagene*), mientras que los programas de temperaturas a los que fueron sometidas las muestras se detallan en la **tabla 4.**

CICLOS	PASO	DURACIÓN	TEMPERATURA
1	Retrotranscripción (RT)	30 minutos	48º
1	Desnaturalización	10 minutos	95º
45	Replicación del ADN	45 segundos	95º
		40 segundos	55º: IL2, IL10, IL12 60º: TNFα, IFNγ, IL4
		30 segundos	72º
1	Elongación	7 segundos	72º

Tabla 4. Programa de ciclos y temperaturas a los que se sometieron las muestras de ARN para la realización de la RT-PCR en un paso.

Una vez finalizada la RT-PCR, se llevó a cabo una curva de disociación que comenzó a 65ºC y que alcanzó 95ºC, lo que permitió asegurar que cada resultado positivo se correspondía con el fragmento deseado, descartando así que se tratara de dímeros de cebadores o bien de fragmentos inespecíficos.

III.1.1.2.2.RT-PCR EN DOS PASOS COMO HERRAMIENTA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES

Al igual que se ha descrito en el apartado anterior, el primer paso consistió en la transcripción inversa del ARN que daría lugar a la síntesis de ADNc. En este caso, mediante el uso de AffinityScript QPCR ADNc Synthesis Kit (Stratagene). El protocolo para llevar a cabo esta reacción consistió en incubar la muestras de ARN con los reactivos necesarios durante 5 minutos a 25ºC para permitir el anillamiento de los cebadores, en este caso Oligo cebadores inespecíficos. A continuación, se realizó la síntesis de ADNc durante 15 minutos a 42º y posteriormente se finalizó la reacción de RT con una fase de 5 minutos a 95ºC

Tras la obtención del ADNc, se procedió a realizar el segundo paso correspondiente a la PCR mediante el uso del Brillant II SYBR Green QPCR mix, el cual poseía todos los componentes necesarios para la amplificación del ADNc. Los cebadores utilizados y las condiciones de uso para la PCR fueron los mismos que los para la RT-PCR en un paso. En este caso, el programa utilizado para la PCR que se muestra en la **tabla 5** carece del ciclo correspondiente a la RT.

CICLOS	PASO	DURACIÓN	TEMPERATURA
1	Desnaturalización	10 minutos	95º
45	Replicación del ADN	45 segundos	95º
		40 segundos	55º: IL2, IL10, IL12 60º: TNFα, IFNγ, IL4
		30 segundos	72º
1	Elongación	7 segundos	72º

Tabla 5. Programa de ciclos y temperaturas para las PCRs de las muestras sometidas a una RT previa en otro paso

Para la obtención de la curva de disociación de la muestra se procedió del mismo modo que en la RT-PCR en un paso.

III.1.1.2.3. CEBADORES.

Los cebadores elegidos para estas reacciones de PCR, procedían de estudios previos (**Tabla 6**). En concreto, las PCRs que se han adaptado para trabajar en las condiciones de nuestro laboratorio corresponden a seis citoquinas y a dos genes de expresión constante.

Gen	Secuencia de cebadores (5'-3')	Concentración	Producto (pb)	Tª de anillamiento	Referencia
GAPDH	F: ATC ACT GCC ACC CAG AAG ACT R: CAT GCC AGT GAG CTT CCC GTT	100 nM	153	60ºC	(Gohin et al., 1997)
β- Actina	F: CGC ACC ACT GGC ATT GTC AT R:TCC AAG GCG ACG TAG CAG AG	100 nM	227	55ºC	(Konnai et al., 2003)
TNFα	F: GAA TAC CTG GAC TAT GCC GA R: CCT CAC TTC CCT ACA TCC CT	100 nM	238	60ºC	(Smeed et al., 2007)
IL 10	F: TGC TGG ATG ACT TTA AGG G R:AGG GCA GAA AGC GAT GAC A	400 nM	186	55ºC	(Konnai et al., 2003)
IL12	F: AAC CTG CAA CTG AGA CCA TT R: ATC CTT GTG GCA TGT GAC TT	400 nM	186	55ºC	(Konnai et al., 2003)
IFNγ	F: GCT TTA CTG CTC TGT GTG CT R: GAC TTC TCT TCC GCT TTC TG	100 nM	442	60ºC	(Gohin et al., 1997)
IL2	F: TTT TAC GTG CCC AAG GTT AA R: CGT TTA CTG TTG CAT CAT CA	400 nM	217	55ºC	(Konnai et al., 2003)
Il4	F: GCC ACT TCG TCC ATG GAC AC R: TTC CAA GAG GTC TCT CAG CG	100 nM	311	60ºC	(Gohin et al., 1997)

Tabla 6. Descripción de los cebadores utilizados para amplificar el ADNc procedente del ARNm codificante para las diferentes citoquinas así como de los genes de expresión constante (Glicer-aldehído tres-fosfato (GAPDH) y β-actina) utilizados en el estudio, indicando la cantidad utilizada, la longitud del producto, la temperatura de anillamiento así como la referencia bibliográfica de los estudios anteriores en los que se probaron estos cebadores.

III.1.1.2.4. SECUENCIACIÓN.

Durante la puesta a punto de la técnica, los productos de las RT-PCRs y PCRs en los que se había amplificado una región de ADNc a partir de los cebadores específicos, y que supuestamente resultaron positivos, fueron purificados mediante un kit de purificación de fragmentos de ADN (QIAquick PCR purification kit). Con el fin de conocer la secuencia de nucleótidos, el producto purificado fue secuenciado mediante el uso de BigDye ® Terminator v3.1 (Secugen SL.) Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las secuencias de referencia publicadas en *Genbank* a fin de comprobar su homología con dichas secuencias.

Para realizar esta comprobación, las secuencias fueron revisadas en el programa Finch TV® (Geospiza) el cual permite eliminar los fragmentos iniciales o finales de las secuencias que son variables e inespecíficos. A continuación, se anillaron con el programa MEGA4© para proceder a la comparación con las secuencias publicadas mediante la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool)* de Pubmed.

III.1.1.2.5. EFICIENCIA DE AMPLIFICACIÓN DE LAS PCRS.

A partir del producto específico de cada PCR purificado, se realizó la curva estándar por triplicado para conocer la eficiencia de cada PCR. Esta curva consistió en una PCR que utilizó como muestra un amplicón cuya concentración inicial fue mayor a 100 ng/µl, así como una serie de diluciones obtenidas a partir de ese positivo purificado. Una vez finalizada la PCR, la curva se representó como una recta, enfrentando el logaritmo de la cantidad inicial de muestra (eje X) con su Ct (eje y), lo que generó una recta con una pendiente. El análisis de esa pendiente es el que permitió conocer le eficiencia de amplificación de cada una de las PCRs. Una eficiencia del 100% indicaría que en cada ciclo se duplica el número de copias de ADN.

III.1.1.2.6. COMPROBACIÓN DE LA UTILIDAD DE LA RT-PCR EN DOS PASOS PARA LA DETECCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS EN ANIMALES CON EL SISTEMA INMUNE ESTIMULADO

Una vez que la técnica en dos pasos había sido probada y optimizada para trabajar en nuestro laboratorio, se procedió a analizar el ARN obtenido, directamente, a partir de la sangre de las 4 ovejas churras vacunadas, cuyo sistema inmune estaba estimulado, pues estas ovejas habían sido vacunadas previamente frente a *Chlamydia*. El esquema seguido para este análisis es el que se muestra en la **figura 19** y fue el esquema de trabajo definitivo para trabajar en el análisis de la expresión de genes que codifican para citoquinas.

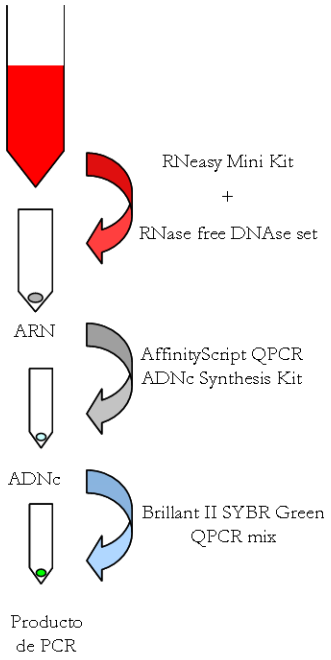


Figura 19. Esquema de trabajo para la RT-PCR a partir de sangre de oveja.

Con este análisis se pretendió comprobar la posibilidad de detectar la presencia del ARNm que codificaba para las seis citoquinas objeto de estudio a partir de muestras de sangre de animales, sin necesidad de llevar a cabo el aislamiento y estimulación de linfocitos *in vitro*.

III.1.2. ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO DE POBLACIONES CELULARES DEL SISTEMA INMUNE EN SANGRE DE OVEJA.

A continuación, se describe por orden cronológico el procesado de muestras para su análisis mediante citometría de flujo y el posterior estudio de los datos obtenidos.

III.1.2.1. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

Se recolectaron muestras de sangre de 15 ovejas de raza Rubia del Molar, a partir de punción en la vena yugular mediante sistema vacutainer, empleando para ello tubos con anticoagulante (EDTA) de 10 ml. Las muestras fueron conservadas a temperatura ambiente siendo procesadas en las dos horas siguientes a su recolección.

III.1.2.2. ANTICUERPOS UTILIZADOS

Para realizar el marcaje de las diferentes poblaciones celulares del sistema inmune se trabajó con los anticuerpos monoclonales de la casa comercial VMRD descritos en la **tabla 7**.

Especificidad	Isotipo	Anticuerpo monoclonal	Refs.
B Lymphocytes	IgM	BAQ44A	**(Hein et al., 1989)**
CD 4	IgG_1	17D1	**(Mackay et al., 1988)**
CD8	IgG_1	CACT80C	**(Larsen et al., 1990)**
TCR1-N6 (γδ WC1⁻)	IgM	CACTB6A	**(Parsons et al., 1993)**
CD25 (cadena α receptor de IL2)	IgG_1	CACT116A	**(Naessens et al., 1992)**
M-M9 (CD 14)	IgG_1	CAM36A	**(Brodersen et al., 1998)**
WC1	IgG1	IL-A29	**(Brodersen et al., 1998)**

Tabla 7. Relación de los anticuerpos monoclonales utilizados

Además, como se verá en el protocolo de señalización celular, fue necesario utilizar anticuerpos secundarios. Los anticuerpos específicos de isotipo utilizados fueron Anti- IgM de ratón conjugado con Isotiocianato de Fluoresceina (FITC) (Sigma-Aldrich), y un anticuerpo Anti-IgG_1 de ratón marcado con *R-Phycoerythrin* (PE) (Invitrogen).

III.1.2.3. SEÑALIZACIÓN CELULAR

Para cada animal se prepararon 6 tubos cuyos marcajes fueron los siguientes: 1. control sin anticuerpos; 2. control con anticuerpos secundarios; 3. anti-CD4; 4. anti-CD8; 5. anti-CD14 y anti-linfocitos B; 6. anti-CD25 y anti-TCR1-N6.

En cada uno de estos tubos específicos para citometría de flujo, que contenían 200µl de PBS, se añadió 200µl de sangre de oveja obtenida como se indica en el apartado III.1.2.1. A esta dilución de sangre se le añadieron 2µl del anticuerpo apropiado anti-proteínas extracelulares de leucocitos (anticuerpo primario). Como se ha enumerado, por cada animal se prepararon al menos 6 tubos, de los cuales 2 no llevaban anticuerpo primario. Estos 2 tubos fueron considerados como controles (Tubos 1 y 2). Una vez añadido el anticuerpo específico en cada tubo, estos se agitaron y se incubaron durante 15 minutos a 4ºC en oscuridad. A continuación, las muestras se lavaron con 600µl de PBS y se centrifugaron durante 10 min a 250 x g. El sobrenadante obtenido fue desechado, repitiendo el lavado con otros 600µl de PBS.

Para poder evidenciar la unión de los anticuerpos primarios, se añadieron 200µl de una dilución 1/500 del anticuerpo secundario marcado con el fluorocromo correspondiente (FITC o PE) a cada tubo. En este caso, al tubo control 1 no se le añadió anticuerpo secundario, mientras que al tubo control 2 si se le añadieron ambos anticuerpos secundarios, de manera que cualquier señal de fluorescencia que se produjo en este tubo, fue originada por uniones inespecíficas. Al igual que en la primera incubación, las muestras fueron agitadas e incubadas durante 15 minutos a 4ºC en oscuridad (**Figura 20**).

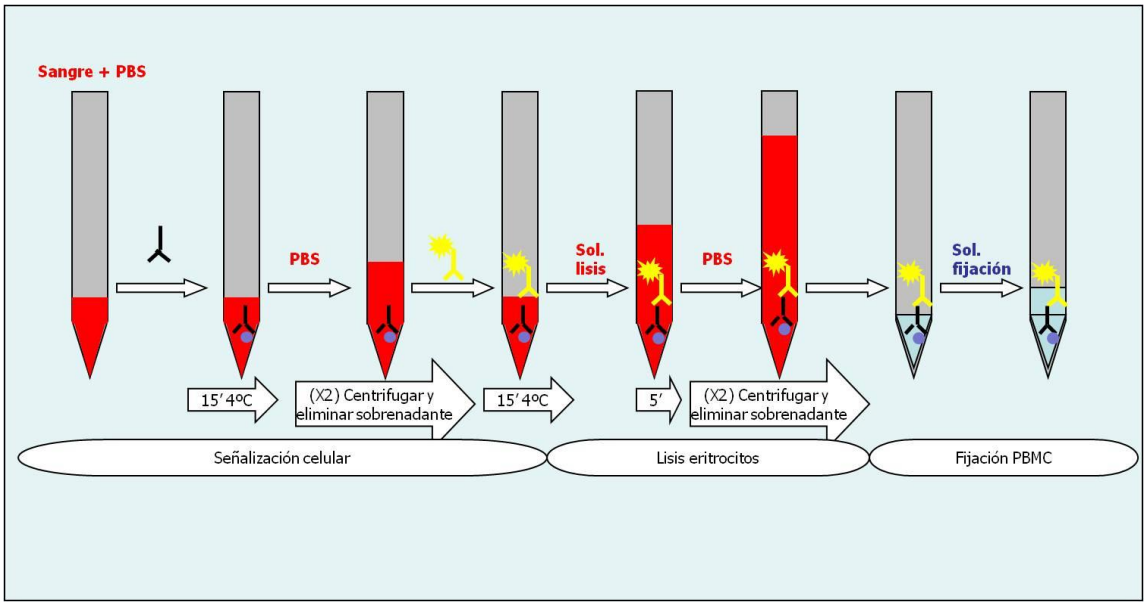


Figura 20. Esquema del procesado de muestras para citometría de flujo

III.1.2.4. LISIS DE LOS ERITROCITOS Y FIJACIÓN DE LOS LEUCOCITOS.

Una vez que las muestras fueron incubadas con los anticuerpos secundarios, se procedió al lisado de los eritrocitos, utilizando 2ml de solución lisante FACS® (Becton Dickinson). Las muestras se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente, tiempo en el que se produjo la lisis de los glóbulos rojos. Para lavar los restos de anticuerpos, así como de células y solución de lisis, se añadieron 2ml de PBS. A continuación se llevó a cabo una centrifugación de 5 min a 250 x g. El pellet localizado en el fondo del tubo contenía los leucocitos. Este cúmulo de células se lavó por segunda vez con PBS, repitiéndose el paso de centrifugación para posteriormente desechar el sobrenadante. Finalmente se añadieron 250µl de una solución al 2% de formaldehido (Becton-Dickinson) que fijó las células con los anticuerpos unidos. Una vez realizada la fijación, los tubos se conservaron a 4ºC en oscuridad hasta su posterior análisis.

III.1.2.5. ANÁLISIS EN EL CITÓMETRO DE FLUJO

Dentro de las 24-48 horas siguientes a su recolección, las muestras se analizaron en el citómetro de flujo FACScan® de BD. De acuerdo a los parámetros de dispersión de la luz hacia delante (sombra) y de la luz lateral, es decir, de acuerdo a los criterios de tamaño y complejidad se seleccionó la región que contenía las células de interés. En este caso, los granulocitos fueron excluidos, correspondiéndose la ventana seleccionada las PBMCs (**Figura 21**). Esta región de PBMCs seleccionada, fue analizada y estudiada mediante los programas CellQuest de BD y Win MDI 2.9.

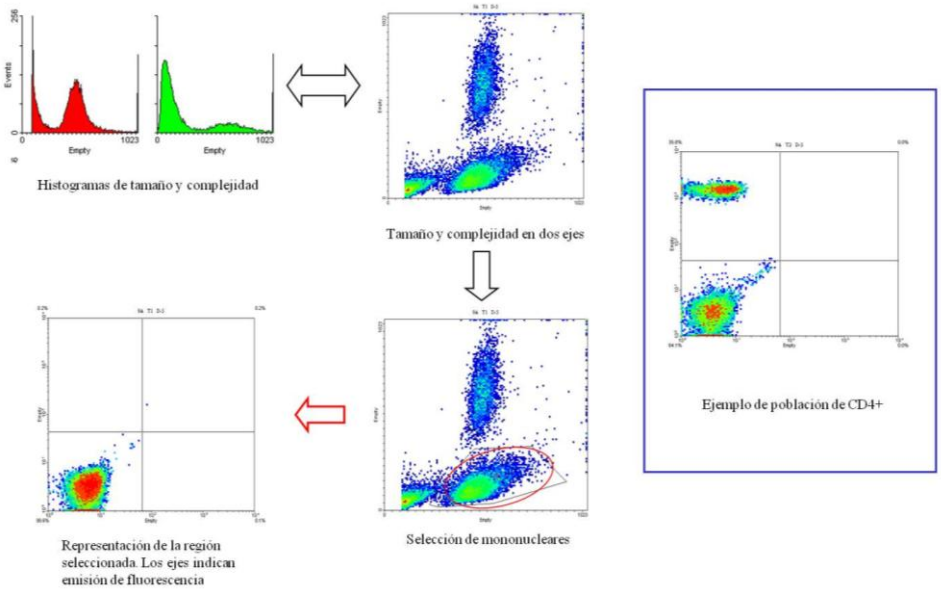


Figura 21. Esquema de trabajo para el análisis de PBMC mediante citometría de flujo.

El análisis del número de células que emiten fluorescencia en cada tubo, permitió conocer el porcentaje de PBMCs que presentan las diferentes proteínas de membrana estudiadas. Las poblaciones celulares estudiadas fueron subpoblaicones de linfocitos T ($CD4^+$, $CD8^+$, $TCR1n6^+$ y $WC1^+$), monocitos ($CD14^+$), células reguladoras ($CD25^+$) y linfocitos B. Además, se calculó el coeficiente de CD4/CD8.

III.1.3. TERMOGRAFÍA INFRARROJA

De manera previa a la realización de los ensayos *in vivo*, se procedió a la puesta a punto de la cámara ThermaCam E-45 mediante la realización de distintas pruebas de campo (Pérez de Diego et al., 2008).

III.2. EXPERIMENTACIÓN *IN VIVO*

Para estudiar la RI en ovejas vacunadas frente a la LA se utilizó un total de 31 ovejas, que fueron divididas en 6 grupos atendiendo a la vacunación y/o al desafío (**Tabla 8**). Se utilizó una vacuna VLP frente al serotipo 1, una vacuna VLP bivalente frente a los serotipos 1 y 4 y una vacuna inactivada frente al serotipo 1. Los grupos control fueron desafiados uno con el serotipo 1 y otro con el serotipo 4. Tras la vacunación y revacunación todos los animales fueron desafiados con el virus homólogo correspondiente. Para la evaluación de la respuesta generada por estas vacunas, se llevó a cabo un seguimiento de la sintomatología clínica y la temperatura de los animales. Además, se tomaron muestras de sangre y suero en distintos momentos del experimento a fin de evaluar la viremia, la presencia de anticuerpos, la evolución de las diferentes poblaciones celulares del sistema inmune y la expresión de genes que codifican para citoquinas.

III.2.1. ANIMALES E INSTALACIONES

III.2.1.1. ANIMALES

Se utilizaron 31 ovejas de raza Merina de ambos sexos, de 7-10 meses de edad al inicio del experimento y libres de anticuerpos frente al virus de la LA.

Los animales fueron asignados de manera aleatoria a 6 grupos siendo vacunados y desafiados según se indica en la **tabla 8.** Los grupos control estuvieron constituidos por 3 animales sin vacunar que fueron desafiados con el serotipo 1 y con el serotipo 4 respectivamente.

Grupo	Vacuna	Desafío (serotipo)	Número de animales
A	VLP 1	1	8
B	VLP 1+4	1	6
C	VLP 1+4	4	6
D	Zulvac® 1	1	5
E	Control, adyuvante	1	3
F	Control, adyuvante	4	3

Tabla 8. Grupos en los que fueron divididas las ovejas, atendiendo a la vacuna utilizada, así como al serotipo del virus de la LA utilizado en el desafío.

III.2.1.2. INSTALACIONES

El estudio se realizó en el animalario de las instalaciones de Bioseguridad de nivel 3 del Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET). Los animales fueron alojados en boxes, con los parámetros de presión y temperatura controlados y con el fin de maximizar el bienestar de los animales se les facilitó pienso, forraje y agua *ad libitum*.

III.2.2. VACUNACIÓN

En los grupos A, B, C y D la vacunación se realizó el día 0 del experimento y la revacunación el día 20 como se establece en el esquema que se muestra en la **figura 22**.

La vía de administración de la vacuna, fue subcutánea tanto en la vacunación como en la revacunación, realizándose en la zona axilar la vacunación y en la región lateral del cuello la revacunación.

Figura 22. Esquema cronológico del experimento en el que se reseñan los días de vacunación, revacunación, desafío y fin de experimento así como de revisión clínica de los animales (Sintomatología y Temperatura), de toma de imágenes termográficas (TI) y de necropsias.

III.2.2.1. VACUNAS VLPS

Se utilizaron dos vacunas desarrolladas mediante tecnología VLP, una monovalente para el serotipo 1 y otra bivalente frente a los serotipos 1 y 4 del virus LA. Ambas vacunas fueron desarrolladas por la Profesora Roy de la Escuela de Higiene y Medicina Tropical de Londres.

El proceso para obtener éstas vacunas consistió en la preparación de *Baculovirus* recombinantes capaces de expresar cuatro proteínas estructurales (VP2, VP3, VP5 y VP7) de los serotipos 1 y 4 del virus de la LA (Noad et al., 2009; Stewart et al., 2010). Se infectaron células Sf9 con los *Baculovirus* recombinantes (AcBTV-1RSA y AcBTV 4Cor). A partir de estas células se recolectaron y se purificaron las VLPs siguiendo el protocolo modificado de Stewart et al., 2010. En dicho protocolo, en lugar de utilizar 5 mM EGTA se utilizó 10 mM EDTA en el tampón de lisis. Además, las muestras no fueron sonicadas. La expresión de las cuatro proteínas se validó por inmunoblotting SDS-PAGE y la morfología de las partículas fue evaluada por microscopía electrónica (**Figura 23**).

El adyuvante utilizado en las vacunas VLP, fue el *Montanide ISA 206 VG*. Este mismo adyuvante fue administrado a los animales control en lugar de la vacuna.

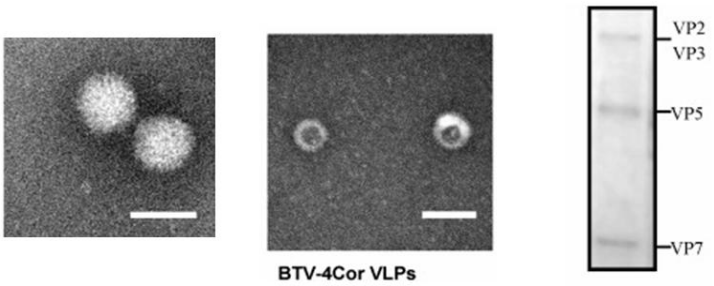


Figura 23. Imágenes de microscopía electrónica del virus de la LA y de VLPs frente al serotipo 4. Imagen de la validación de la expresión de las proteínas por SDS-PAGE (Stewart et al., 2010).

III.2.2.2. VACUNA COMERCIAL INACTIVADA

Se utilizó una vacuna comercial inactivada (Zulvac1) frente al serotipo 1 del virus LA cuyo principio activo por dosis (2ml) fue BTV-1/ALG2006/01 E1≥10 $^{6.4}$ $DICT_{50}$. En la composición de esta vacuna comercial se incluían como adyuvantes hidróxido de aluminio hidratado y corteza de Quillaia. Además a fin de evitar las contaminaciones fúngicas y/o bacterianas, la vacuna poseía Tiomersal (Birner y Garnet, 1964).

III.2.2.3. DESAFÍO

En todos los casos el desafío con el virus se realizó 48 días después de la primera vacunación.

Como agente para el desafío del serotipo 1 se utilizó el aislado denominado "BTV1 Argelia 2006" procedente de un cultivo en pase 3 en células BHK L20, proporcionado por el Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA), vía intravenosa a una concentración de 1,9 x 10^6 $TCID_{50}$ / ml en células vero.

Para llevar a cabo el desafío del serotipo 4 se utilizó un asilado de este serotipo proporcionado por Merial® que fue inoculado vía intradérmica en el área medial de la extremidad posterior.

III.2.3.OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

De acuerdo con el calendario previamente establecido, se tomaron muestras de sangre sin anticoagulante (suero) y con anticoagulante EDTA, de la vena yugular mediante sistema Vacutainer®.

Las muestras de suero se tomaron previamente a la vacunación, el día 0, así como en los días 10, 20, 35, 42, 48, 53, 58 y 68.

Para la obtención de sangre con anticoagulante las fechas elegidas fueron los días 0, 1, 3, 10, 14, 20, 21, 23, 26, 35, 42, 48, 51, 53, 54, 57, 58, 61 y 68.

III.2.3.1. SUERO

Para la obtención de suero se utilizaron tubos de 5ml sin anticoagulante. Durante la hora siguiente a la extracción, los tubos fueron desuerados por centrifugación suave. El suero se separó en tubos eppendorf que permanecieron congelados a -40ºC hasta el momento del análisis.

III.2.3.2. SANGRE

A partir de los tubos de sangre en EDTA, se separaron diferentes alícuotas que fueron procesadas de forma inmediata para la extracción de ARNm codificante para diferentes citoquinas, así como para el estudio de poblaciones celulares del sistema inmune mediante citometría de flujo. Además, dichas muestras fueron empleadas para la extracción de ARN vírico. Para este último propósito se utilizaron las muestras correspondientes a los días 0, 20, 48, 51, 54, 57, 61, 68.

El resto de muestras de sangre fueron almacenadas a -80ºC para posteriores análisis.

III.2.3.3.SACRIFICIO Y NECROPSIA DE LOS ANIMALES

Entre los días 68 y 71 tras la primera vacunación, los animales pertenecientes a los grupos D, E y F y 2 ovejas de cada uno de los grupos vacunados con vacunas VLPs (A, B y C) fueron sacrificados. Asimismo, se llevó a cabo la necropsia reglada de cada uno de estos animales. Finalmente, los animales restantes fueron sacrificados el día 75 del experimento. En todos los casos el sacrificio se realizó mediante inyección letal con T61® (*Intervet/SCHERING-Plough*) siguiendo las instrucciones y dosis recomendadas por el fabricante. Este fármaco contiene embutramida, mebezonio ioduro y tetracaína clorhidrato, produciendo la muerte por colapso circulatorio a consecuencia de la acción curarizante (paralización de los músculos esqueléticos estriados, incluidos los músculos respiratorios) y de la acción paralizante ejercidas sobre el centro de la respiración.

Durante la necropsia se evaluó la presencia de lesiones macroscópicas, llevándose a cabo un muestreo pormenorizado de tejidos y órganos que fueron procesados de forma rutinaria para posteriores estudios histopatológicos.

III.2.4.MONITORIZACIÓN DE LOS ANIMALES

Durante el ensayo clínico, se realizó el seguimiento diario de los animales. El objetivo fue conocer datos básicos como la temperatura o la presencia o ausencia de síntomas clínicos característicos de la LA. A continuación se describe la metodología utilizada para realizar la monitorización de las ovejas incluidas en estos ensayos.

III.2.4.1. REGISTRO DE TEMPERATURA RECTAL Y TERMOGRÁFICA

Desde el día anterior a la vacunación (día -1) y hasta el día 7, desde el día anterior a la revacunación (día 19) y hasta el día 27 y desde el día anterior al desafío (día 47) hasta el día 68, o lo que es lo mismo, durante una semana tras cada administración de vacuna y desde el desafío hasta fin de experimento, se registraron diariamente las temperaturas rectales y termográficas de cada animal.

Para tomar la temperatura rectal de los animales, se utilizó el termómetro "KRUSSE® Termómetro digital instantáneo para animales domésticos Cat. 291110". En combinación con esta técnica, se llevó a cabo la toma de fotografías termográficas con la cámara termográfica ThermaCam™ E45, con el fin de comparar los resultados de ambas técnicas. En todos los casos, el registro de estas temperaturas se hizo de manera sistemática, todos los días a primera hora, estandarizando en la medida de lo posible la recolección de datos.

La distancia entre la cámara y los animales fue de al menos 0.5m y de 2m como máximo. Con el objetivo de conocer la temperatura máxima diaria en la región ocular para cada animal, las imágenes fueron analizadas mediante el uso de los programas ThermaCAM Quick View ™ 1.0 y ThermaCAM Quick Report ™ 1.0. Para el análisis se asume que la emisividad de la superficie del ojo es 0.98 y la temperatura ambiental se fijó en 20º C, ya que siempre se mantuvo entre 20 y 21 ºC en las instalaciones que albergaron los animales.

Los datos obtenidos fueron analizados en el programa SPSS17 (SPSS, Chicago. IL. USA) para Windows. Se estudió la correlación entre las variables, calculando la correlación para la media de cada uno de los grupos D, E y F (qué son los que presentaron fiebre), para la media de las muestras de los tres grupos en conjunto y para todas las mediciones individuales (animales de los grupos D, E y F), mediante el análisis de correlación de Pearson.

Otra prueba que se realizó fue la comparación de las variables que permite saber si la relación entre ellas es siempre la misma. Con esa diferencia media entre ambas técnicas se estableció el valor de temperatura termográfica equivalente a la presencia de fiebre.

Una vez que se calculó el límite en el que se establece si un animal presenta fiebre o no y utilizando el programa Graph Pad InStat, se realizó una tabla de contingencia estableciendo como técnica de diagnóstico de referencia la temperatura rectal para establecer verdaderos y falsos, positivos y negativos, calculándose posteriormente la sensibilidad y especificidad.

III.2.4.2. SEGUIMIENTO CLÍNICO DE LA ENFERMEDAD

Tras un periodo de 7 días de adaptación, los animales fueron evaluados clínicamente. Durante los ensayos, la exploración clínica se realizó los mismos días que el registro de temperaturas como se indica en la **figura 22** del cronograma. Los días siguientes a la vacunación se hizo hincapié en la observación de la región en la que se administró la vacuna con objeto de reseñar posibles reacciones locales de los animales frente a la vacuna. Para llevar a cabo la exploración clínica, nos basamos en experimentos previos (Perrin et al., 2007) donde se describe una tabla con los principales signos clínicos de la LA, asignando a cada uno de ellos, según su importancia, una puntuación (**Tabla 9**). La suma de las puntuaciones diarias

de cada animal refleja de forma objetiva el estado del mismo, así como la evolución a lo largo del tiempo.

1. Estado general bueno = 0 pt apático = 1 pt postración = 2 pts tumbado = 3 pts

2. Signos clínicos

2.1 edema facial (1 pt), nasal (1 pt), mandibular (1 pt), labial (1 pt) lingual (1 pt)

2.2 congestión en piel o rodete coronario (4 pts)

2.3 trastornos locomotores : cojera (2 pts) laminitis (2 pts)

2.4 problemas respiratorios: descarga leve (1 pt), descarga importante (2 pts) tos (1 pt)

2.5 problemas digestivos (1 pt)

2.6 otros: conjuntivitis, ulceras orales, balido de dolor, hipersalivación (1 pt por signo)

2.7 mortalidad (20 pts)

Tabla 9. Signos clínicos asociados con la enfermedad de la LA y la puntuación aplicada en el estudio (Perrin et al. 2007).

III.2.5.DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS DEL VIRUS DE LA LENGUA AZUL

Finalmente, dentro de la experimentación *in vivo*, cabe destacar la utilidad de la RT-PCR como herramienta para la detección de ácidos nucleicos del virus a lo largo del ensayo. La presencia de ARN vírico implica la presencia de virus en sangre, si bien es cierto que la manera de asegurar si existe viremia o no es mediante el aislamiento de virus, si bien la detección de ácidos nucleicos es una metodología más rápida y sencilla. Para la detección del virus de la LA, se extrajo el ARN a partir de sangre completa y se realizó una RT-PCR a tiempo real con sonda Taqman específica. A lo largo de todo el ensayo y especialmente tras el desafío con el virus, se tomaron muestras que se analizaron como se describe a continuación.

III.2.5.1. EXTRACCIÓN DE ARN VÍRICO

Para poder detectar la presencia de ARN vírico en los animales, se realizó la extracción de ARN a partir de las muestras de sangre. En este caso se utilizó un kit de extracción por columnas basado en la afinidad del ARN por una membrana de sílica que se encuentra en la columna. El kit utilizado fue el NucleoSpin® RNA II (*MACHEREY- NAGEL*) siguiendo las instrucciones del fabricante.

III.2.5.2. RT-PCR A TIEMPO REAL

Para la detección del ARN vírico se utilizó una RT-PCR en tiempo real con una sonda específica (Toussaint et al., 2007) diseñada para unirse a la secuencia del segmento S5 de ARN del virus de la LA (**tabla 10**).

Producto de PCR	Cebador/sonda	Secuencia (5'-3')
segmento 5 del virus LA RT-qPCR	LA_S5_F_1_19	GGCAACYACCAAACATGGA
	LA_S5_R_76_57	AAAGTYCTCGTGGCATTWGC
	LA_S5_P_49_27	FAM-CYCCACTGATRTTGTATTTTCTCAA-TAMRA

Tabla 10. Cebadores y sonda utilizados en la RT-PCR a tiempo real para la detección de ARN vírico (Toussaint et al., 2007).

La PCR descrita por Toussaint et al., 2007 fue ligeramente modificada para simplificar la metodología, ya que en origen se trataba de una RT- PCR en dos pasos, y en nuestro laboratorio la realizamos en un paso. Todas las muestras fueron analizadas en el termociclador Mxpro3000 (Stratagene), siendo la temperatura de anillamiento utilizada 58ºC.

III.3. ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE

A partir de las muestras obtenidas se realizó el estudio de la RI, utilizando para la detección de anticuerpos la técnica convencional del ELISA y se implementó el estudio con las metodologías adaptadas en esta Tesis (RT-PCR para detección de expresión de genes que codifican para citoquinas y citometría de flujo para analizar diferentes poblaciones celulares).

III.3.1. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES QUE CODIFICAN PARA CITOQUINAS

A partir de las muestras de sangre, se extrajo el ARNm con el RNeasy mini Kit® de Quiagen como previamente se ha descrito en el apartado III.1. A continuación se procedió a la síntesis del ADNc mediante el uso de AffinityScript® de Stratagene siguiendo los pasos descritos en el apartado III.1.1.2.2. y como se muestra en la **figura 19**. Una vez obtenido el ADNc, éste se almacenó a -20ºC, y tras la realización de todas las pruebas se conservó a -80ºC.

Para realizar la cuantificación relativa fue imprescindible analizar de cada muestra no sólo los genes de interés, sino también la presencia en cada muestra, y de manera simultánea

del ARNm que codifica para un gen de expresión constante. Los genes de expresión constante utilizados fueron GAPDH y β-Actina.

Además, para realizar la cuantificación relativa de la expresión de genes, fue necesario establecer un Calibrador. Este Calibrador es la muestra en función de la que se dan los resultados. Para este estudio el Calibrador fue la muestra inicial, es decir, el ADNc de cada animal a día 0. Por tanto la expresión del resto de días se expresó como la variación de la concentración del gen de estudio el día "x" respecto a la concentración del mismo gen el día 0.

A la hora de realizar las PCRs, la temperatura de anillamiento fue diferente según los pares de cebadores utilizados. Las PCRs fueron agrupadas en dos grupos; las que anillaban a 55ºC (IL2, IL10 e IL12) y aquellas que anillaban a 60ºC (IFNγ, TNFα, e IL4). A cada uno de estos grupos se añadió un gen de expresión constante: β-Actina para las PCRs que anillaban a 55ºC y GAPDH para las que anillaban a 60ºC.

Para que resulte más claro el método de trabajo y las muestras a incluir en cada PCR se ha incluido la **figura 24,** donde se puede observar que todas las muestras se analizan por triplicado, así como que siempre se incluyó la muestra calibrador, y finalmente que siempre se incluyó el normalizador o gen de expresión constante para poder estandarizar.

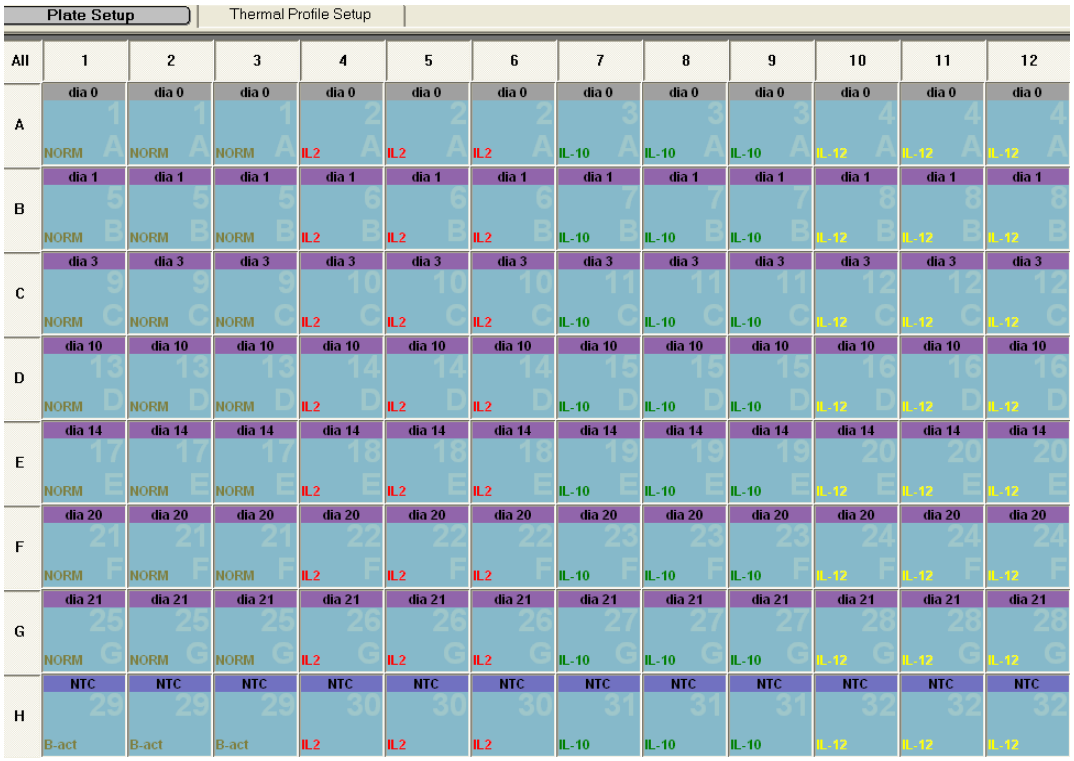


Figura 24. Pantalla del programa del termociclador Mx3000 de Stratagene, en el que se indican con el nombre en gris, en la fila A, las muestras que corresponden al calibrador (día 0). Se observa que las muestras se analizan en todos los casos por triplicado para la expresión de cada gen, y que las tres columnas donde aparece la abreviatura NORM (1, 2 y 3) se corresponden con las muestras en las que se analiza el gen normalizador.

La fórmula utilizada para realizar la cuantificación relativa fue:

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{gen objeto}})^{\Delta Ct \text{ gen objeto (Calibrador-muestra)}}}{(E_{\text{gen referencia}})^{\Delta Ct \text{ normalizador (Calibrador-muestra)}}}$$

Esta metodología de cuantificación se basa en el método comparativo de Ct entre la muestra y el calibrador, la cual fue estandarizada con el normalizador. Para asegurar que no hay diferencias debidas a las eficiencias de cada una de las reacciones, el método que se ha utilizado, permitió introducir en la fórmula la eficiencia de cada reacción de PCR (Pfaffl, 2001).

III.3.2. ESTUDIO DE LAS POBLACIONES CELULARES DEL SISTEMA INMUNE POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Las muestras de sangre de 2 animales de los grupos A, B y E, se procesaron de acuerdo al protocolo de señalización de leucocitos de oveja, para su posterior análisis en el citómetro de flujo.

En todos los tubos se analizaron un mínimo de 20.000 células. Una vez seleccionada la población de PBMCs, se analizó el porcentaje de células que emitían fluorescencia, es decir, que presentaban en su membrana la proteína de interés. Las poblaciones celulares del sistema inmune estudiadas fueron subpoblaicones de linfocitos T ($CD4^+$, $CD8^+$, $TCR1n6^+$ y $WC1^+$), monocitos ($CD14^+$), células reguladoras ($CD25^+$) y linfocitos B.

A esta misma metodología a la que se sometieron las muestras de los animales de los grupos A, B y E fueron sometidas también las muestras de sangre de las 5 ovejas del grupo D, sustituyéndose en este caso el anticuerpo frente a la población $TCR1N6^+$ (subpoblación minoritaria de linfocitos T-γδ) por otro frente a las células $WC1^+$ (subpoblación mayoritaria de los linfocitos T-γδ en rumiantes).

Los resultados de los grupos A, B y E, se analizaron de manera cualitativa debido a que solo se utilizaron dos animales por grupo. Los porcentajes obtenidos del grupo D se analizan en un modelo lineal general de medidas repetidas (ANOVA) para comprobar la existencia de variaciones significativas a lo largo del tiempo respecto al día 0.

III.3.3.DETECCIÓN DE ANTICUERPOS FRENTE A VP7

Se analizó la presencia de anticuerpos específicos del serogrupo LA, para lo que se utilizaron dos kits comerciales que detectan la presencia de anticuerpos frente a la VP7 del virus de la LA. Uno de ellos es un ELISA de competición, mientras que el otro es un ELISA de doble reconocimiento.

III.3.3.1. ELISA DE COMPETICIÓN

Todas las muestras de suero obtenidas, fueron analizadas mediante un kit comercial de ELISA de competición para la detección de anticuerpos frente a la proteína VP7 del virus de la LA (POURQUIER® Bluetongue Competitive ELISA). Como se describe gráficamente en la **figura 25**, este test se basa en la competición entre el suero problema y un suero conjugado con peroxidasa de rábano, por el antígeno que se encuentra tapizando los pocillos de la placa de ELISA. De manera que, la ausencia de color tras la reacción enzimática implica la presencia de anticuerpos específicos frente a VP7 en el suero problema.

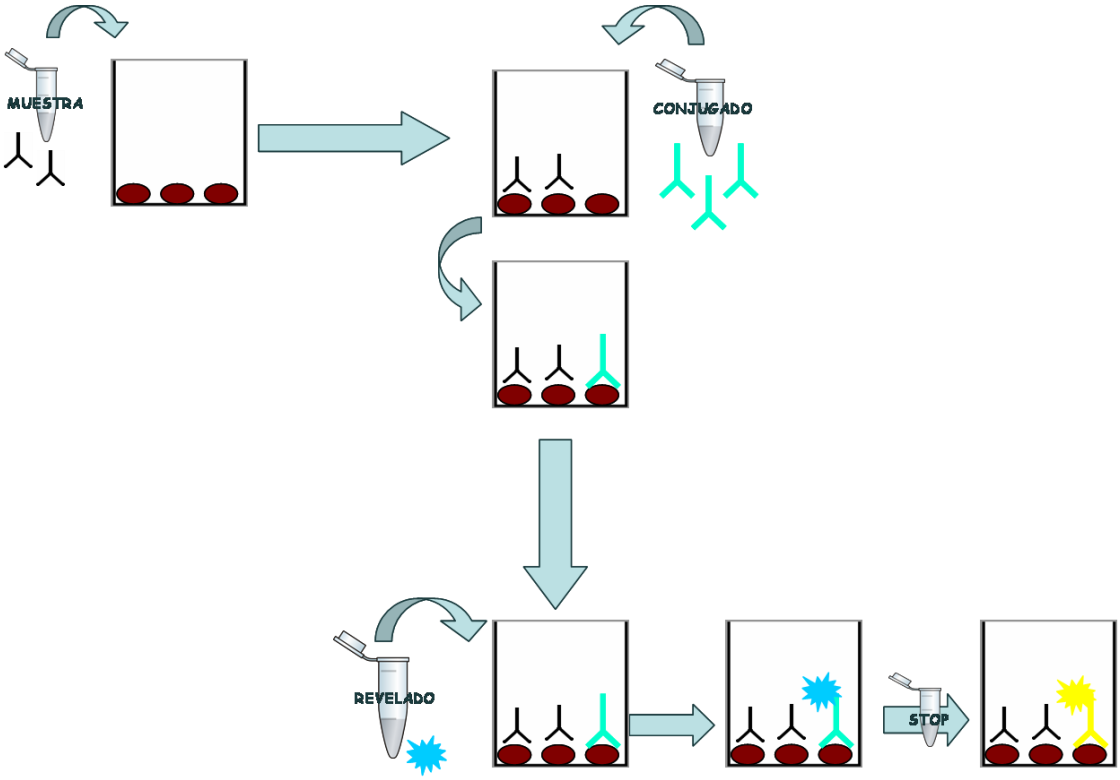


Figura 25. Esquema del ELISA de competición para detección de anticuerpos frente a VP7 de LA.

Una vez procesada la placa de ELISA, se midió la densidad óptica de cada pocillo a 450nm, en un lector de placas Anthos 2001®. A continuación, se calculó el ratio de cada muestra, realizando la división del dato de densidad óptica de la muestra entre la densidad óptica del control negativo, siendo multiplicado el resultado por 100 a fin de obtener el ratio en forma de porcentaje. El criterio de interpretación se basa en las recomendaciones del fabricante, que indican que los resultados mayores de 45% son negativos, y los menores de 35% positivos.

III.3.3.2.ELISA DE DOBLE RECONOCIMIENTO

El ELISA de doble reconocimiento, al igual que el de competición, presenta al antígeno (VP7) adsorbido a la placa de ELISA. La diferencia radica en que una vez añadido el suero, el siguiente paso consiste en la adición de antígeno conjugado. De manera que, si la muestra es positiva y presenta anticuerpos, estos se unen al antígeno de la placa y posteriormente también se unen al antígeno marcado. En definitiva, en este caso, la presencia de color indica positividad como se representa en la **figura 26.**

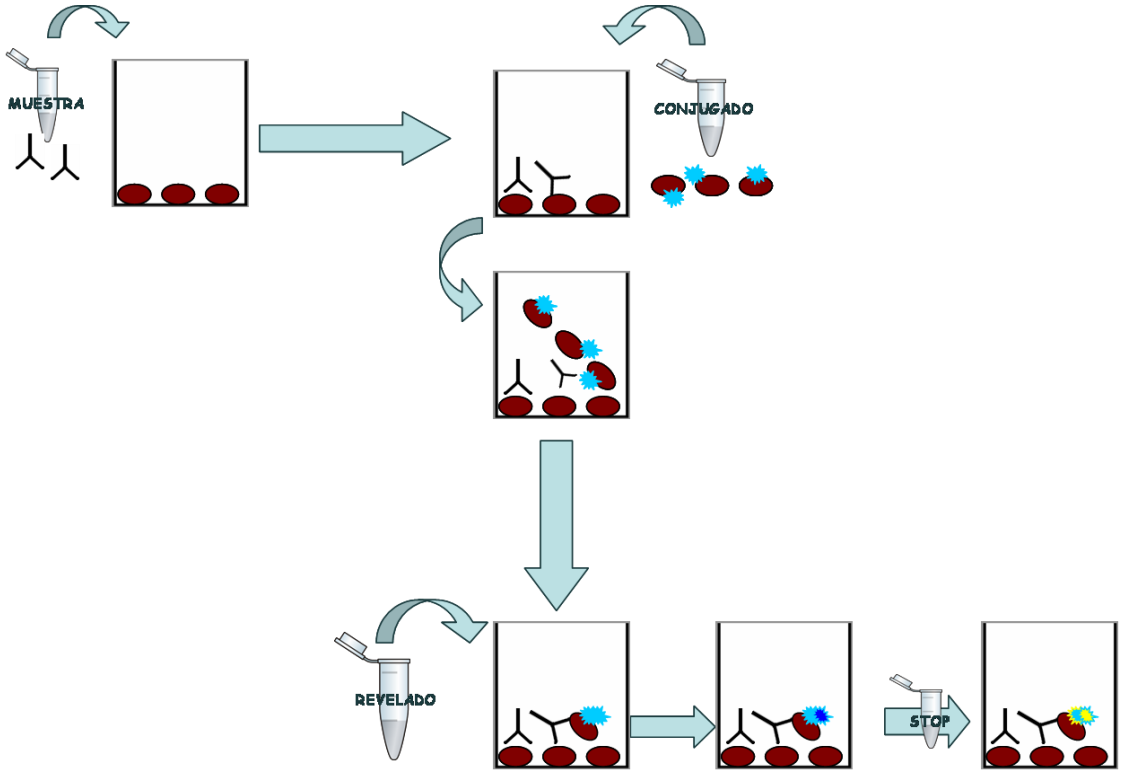
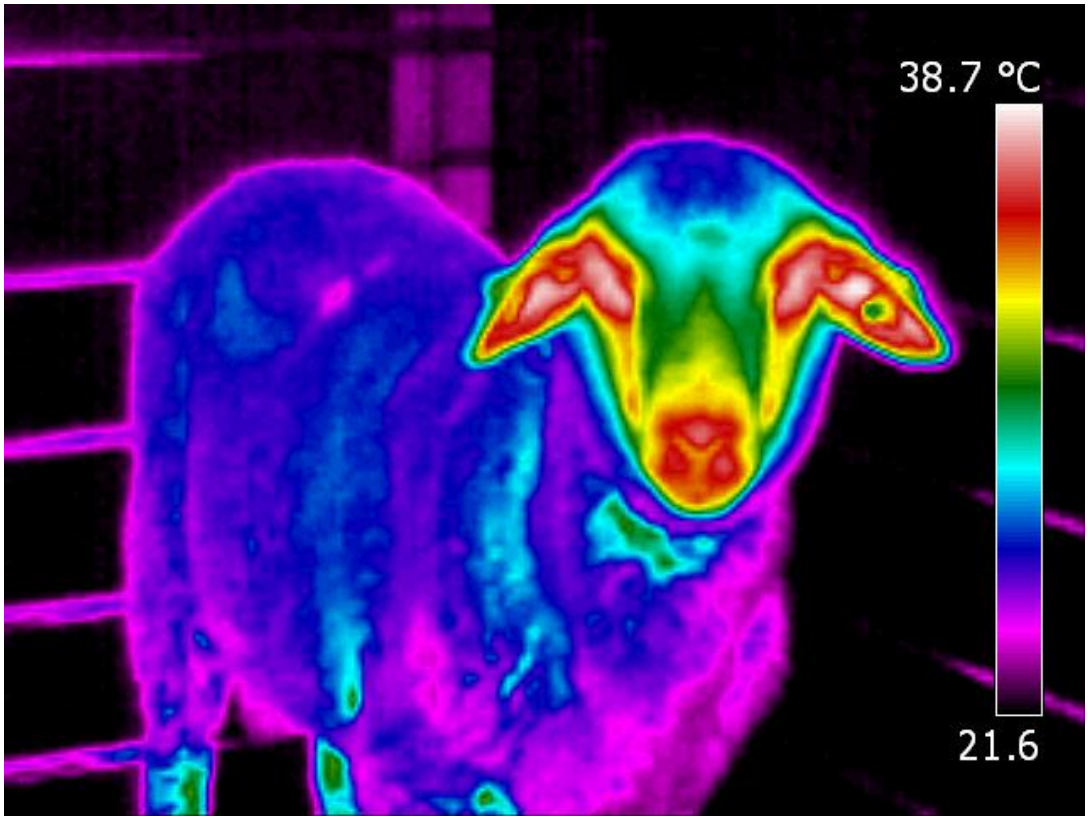


Figura 26. Esquema del ELISA de doble reconocimiento para detección de anticuerpos frente a VP7 de LA.



IV. RESULTADOS

IV.1. EXPERIMENTACIÓN *IN VIVO*

A continuación se describen los principales resultados obtenidos durante el ensayo *in vivo* en cuanto a evolución de las temperaturas, sintomatología, lesiones macroscópicas y detección de ARN del virus de la LA mediante RT-PCR en muestras de sangre.

IV.1.1.MONITORIZACIÓN DE LOS ANIMALES

Todos los animales, tanto vacunados como no vacunados fueron monitorizados, estudiándose, además, la correlación entre las temperaturas termográficas y rectales. Durante la monitorización se observaron síntomas clínicos característicos de LA en los animales control, que fueron variables entre animales así como entre serotipos.

IV.1.1.1. REGISTRO DE TEMPERATURA RECTAL Y TERMOGRÁFICA

IV.1.1.1.1. VACUNAS VLPS

IV.1.1.1.1.A. GRUPO A (VLP1, DESAFÍO LA1)

Tomando los datos del grupo A en conjunto, la máxima temperatura durante la primera semana tras la vacunación se observó el día 0 (39.78º C) (**Figura 27**).

Entre los días 19 y 27, la media del grupo A no sobrepasó en ningún caso los 40ºC, aunque se llegaron a alcanzar a los 21 días registros cercanos (39.97ºC).

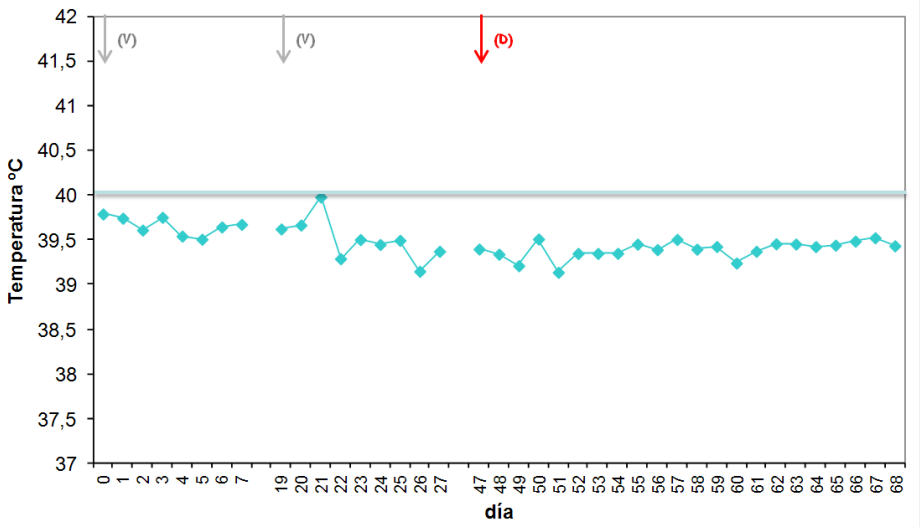


Figura 27. Representación de la temperatura rectal media del grupo A. (V) vacunación, (D) desafío.

De manera excepcional, se registró una temperatura de 41.09º C en el animal 2A el día de su revacunación (día 20), alcanzándose una temperatura ligeramente superior a los 40ºC el

día 21. Tras la inoculación del serotipo 1 del virus LA el día 48, se observó la aparición de fiebre en este mismo animal en los días 57 (40.42ºC), 60 (40ºC) y 62 (40.3ºC) del experimento.

IV.1.1.1.1.B. GRUPO B (VLP1+4, DESAFÍO LA1)

La media del grupo B durante la primera semana (días 1- 7) se situó por debajo de 40ºC, siendo el valor medio más alto a lo largo de esta semana de 39.96ºC, el cual se alcanzó 6 días después de la vacunación (**Figura 28**). Tras la revacunación, se observó que el valor medio de temperatura sólo superó ligeramente los 40ºC el día 21, justo un día después de la revacunación (40.01ºC). En conjunto, los animales de este grupo B no superaron los 40ºC en ningún caso tras el desafío con el virus LA.

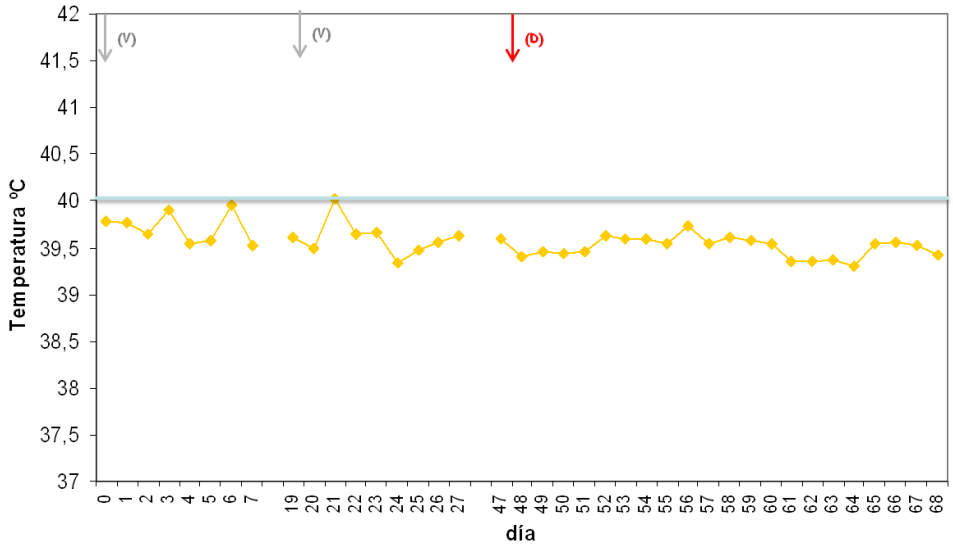


Figura 28. Representación de la temperatura rectal media del grupo B. (V) vacunación, (D) desafío.

IV. 1.1.1.1.C GRUPO C (VLP1+4, DESAFÍO LA4)

Sólo el animal 5C presentó una temperatura de 40,4ºC el día de la vacunación (día 0), mientras que el resto de animales del grupo C presentaron valores normales de temperatura fisiológica en dicha fecha. La vacunación provocó un incremento de los valores rectales por encima de los 40ºC en 2 animales (1C y 5C), alcanzándose la mayor temperatura media del grupo (39.87ºC) el día 4 (**Figura 29**). La revacunación indujo la aparición de fiebre el día 21 en el conjunto del grupo (40.26ºC). Tras el desafío con el serotipo 4 del virus, sólo se observó fiebre en el animal 5C durante los días 54, 55 y 56, llegándose a superar los 42ºC.

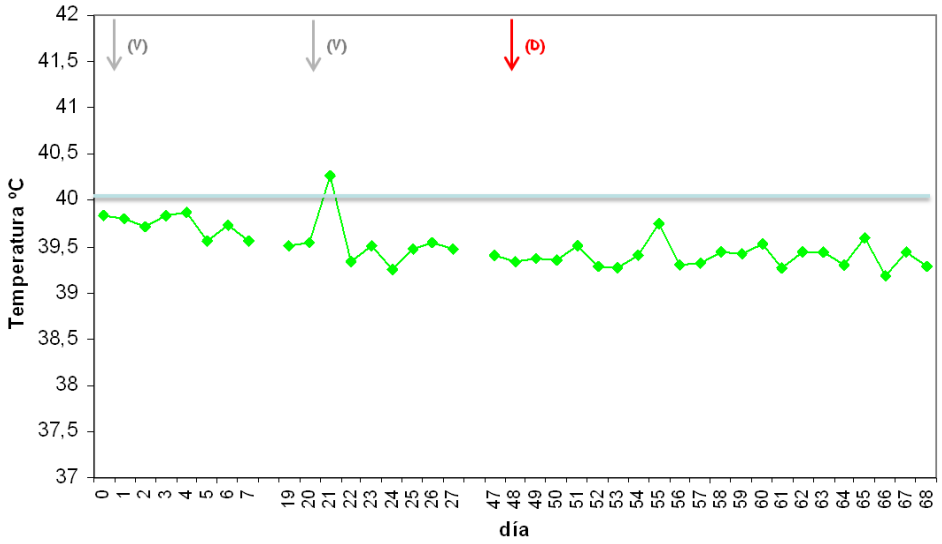


Figura 29. Representación de la temperatura rectal media del grupo C. (V) vacunación, (D) desafío.

IV.1.1.1.2. VACUNA COMERCIAL INACTIVADA (GRUPO D: ZULVAC1, DESAFÍO LA1)

Tanto las temperaturas previas como las del día 0 fueron normales en los 5 animales de este grupo D. A las 24 horas de la vacunación (día 1) se registró un valor medio de 40.07ºC. Una tendencia similar fue observada tras la revacunación, alcanzándose una temperatura media el día 21 de 40.2 ºC (**Figura 30**). En este grupo, la inoculación del virus homólogo virulento no indujo ninguna variación en la temperatura rectal.

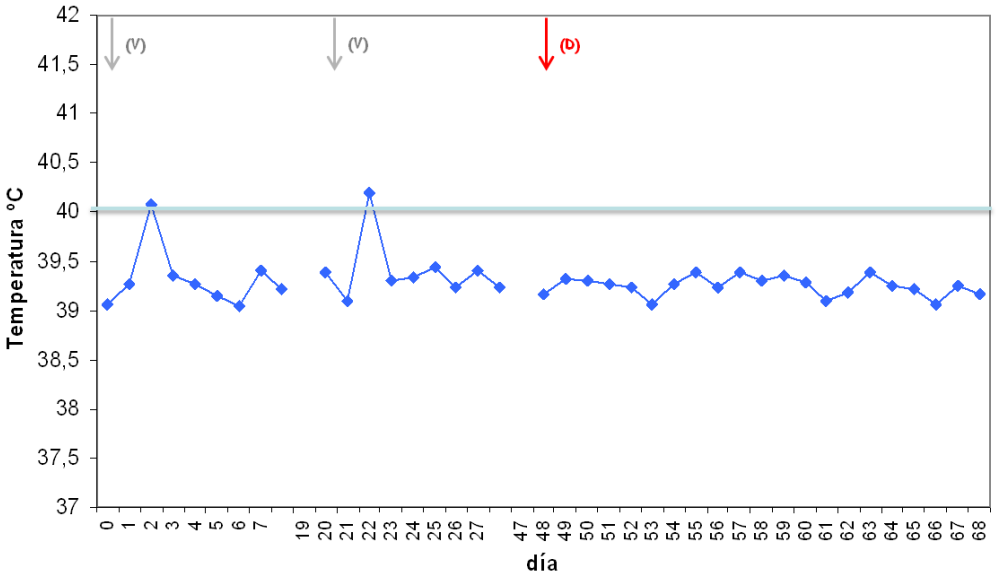


Figura 30. Representación de la temperatura rectal media del grupo D. (V) vacunación, (D) desafío.

IV.1.1.1.3. ANIMALES DESAFIADOS NO VACUNADOS.

IV.1.1.1.3.A. GRUPO E (DESAFÍO FERNTE A LA1)

El desafío con el virus LA1 produjo fiebre en los animales 1E y 2E. Los valores máximos se observaron el día 55, situándose el valor medio de la temperatura rectal en 41.21º C (**Figura 31**).

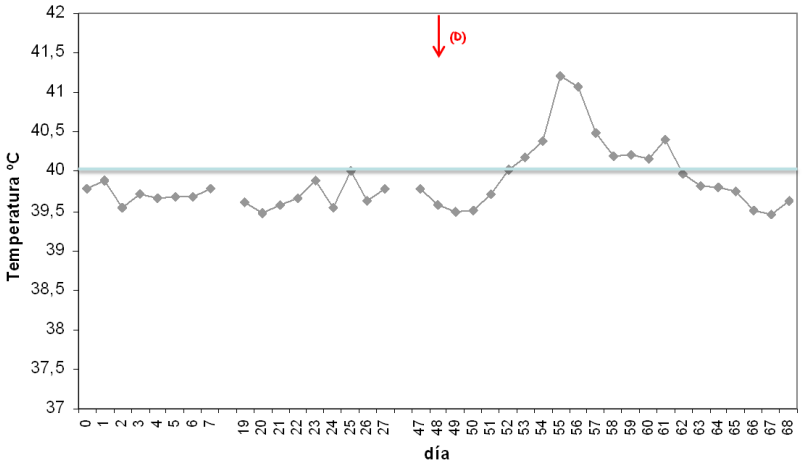


Figura 31. Representación de la temperatura rectal media del grupo E. (D) desafío.

IV.1.1.1.3.B. GRUPO F (DESAFÍO FRENTE A LA4)

Tras el desafío, sólo las ovejas 1F y 3F presentaron fiebre, alcanzando temperaturas de 41.11ºC y 40.88ºC en los días 56 y 57, respectivamente. En conjunto, la media del grupo F, entre los días 55 y 57 mostró un ligero aumento alcanzándose una temperatura media de 40.48ºC (**Figura 32**).

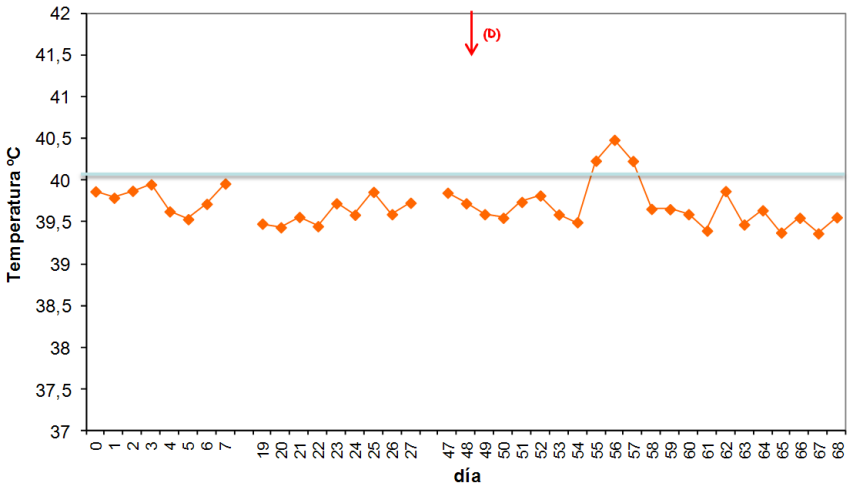


Figura 32. Representación de la temperatura rectal media del grupo F. (D) desafío.

IV.1.1.1.4. RELACIÓN ENTRE LA TEMPERATURA RECTAL Y LA TEMPERATURA TERMOGRÁFICA.

El estudio de las imágenes de TI tomadas a lo largo del experimento demostró la existencia de cambios (**Figura 33**). Además, se observó que la temperatura elevada en el ojo coincidió con el incremento de la temperatura rectal. Sirva como ejemplo el análisis de las imágenes mostradas en la **figura 33**, donde una temperatura de TI de 40.1ºC (Día 55) coincidió con una temperatura rectal de 41.9ºC, mientras que en el día 57, la oveja 1F presentó una temperatura de TI 38.7ºC que se correspondió con una temperatura rectal de 41.11ºC.

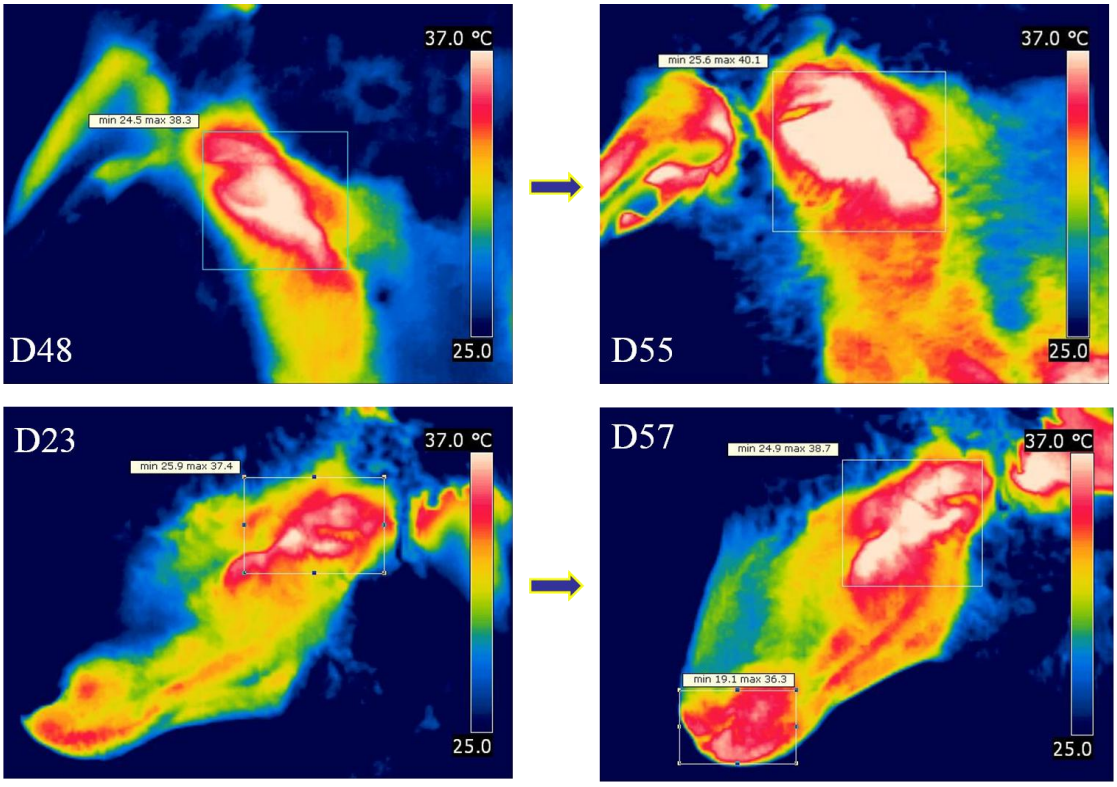


Figura 33. En la parte superior se muestran las imágenes de los días 48 y 55 del animal 1E, siendo la temperatura máxima del ojo 38.3ºC y 40.1ºC respectivamente. En las imágenes inferiores se compara el perfil izquierdo de la oveja 1F los días 23 y 57 siendo la temperatura máxima del ojo 37.4ºC y 38.7ºC respectivamente.

El análisis de la correlación, así como el estudio de la diferencia media entre la temperatura rectal y la temperatura obtenida mediante TI para cada uno de los serotipos, dio lugar a los resultados que se muestran en las **figuras 34, 35 y 36**.

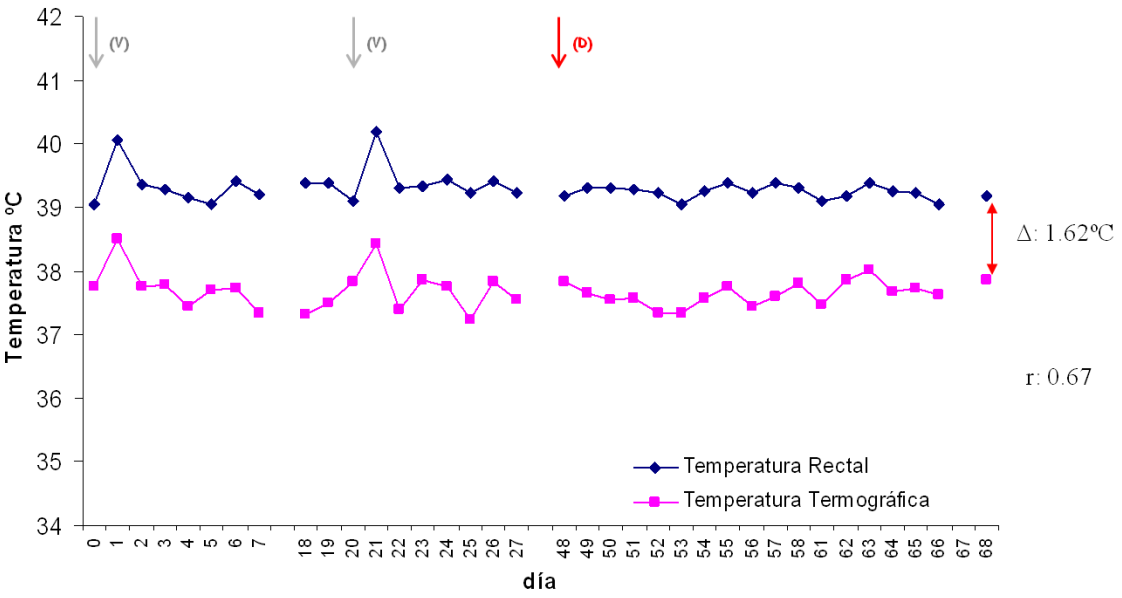


Figura 34. Temperaturas rectal y termográfica medias del grupo D. Correlación (r) 0.67 y diferencia media (Δ) 1.62ºC. (V) vacunación, (D) desafío.

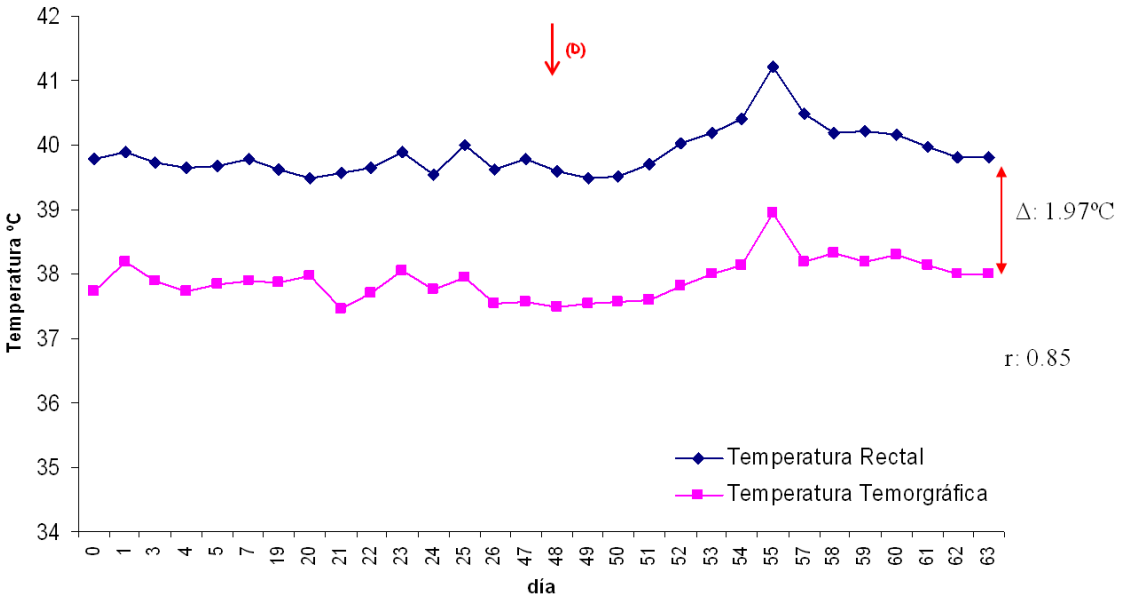


Figura 35. Temperaturas rectal y termográfica medias del grupo E. Correlación (r) 0.85 y diferencia media (Δ) 1.97ºC. (D) desafío.

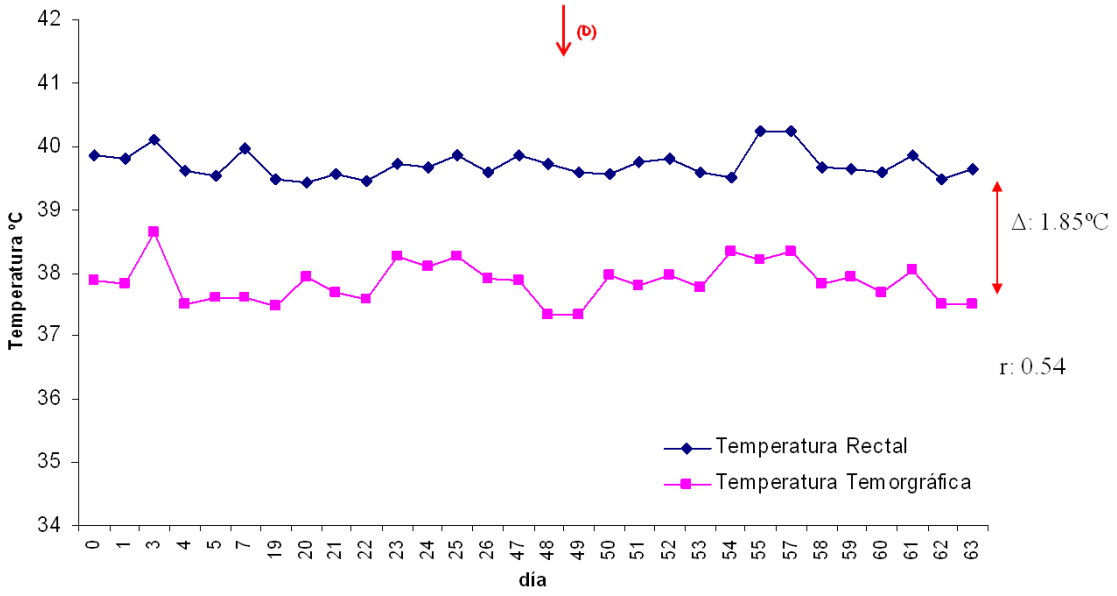


Figura 36. Temperaturas rectal y termográfica medias del grupo F. Correlación (r) 0.54 y diferencia media (Δ) 1.85ºC. (D) desafío.

Si atendemos a los resultados que arrojó el estudio de todas las temperaturas de los grupos D, E y F en conjunto, obtuvimos una correlación (r) de 0.7 y una diferencia media entre la temperatura termográfica y la temperatura rectal de 1.80ºC. Si bien, el análisis de los datos de cada animal tratados de manera individual, reveló una correlación de 0.56 y una diferencia media de 1.768.

Al utilizar la diferencia media (1.80 ºC) como factor de corrección para calcular la temperatura rectal a partir de la TI, y sabiendo que una temperatura rectal de 40ºC se corresponde con fiebre, se calcularon los verdaderos y falsos, positivos y negativos. Se obtuvieron en total 25 verdaderos positivos, 287 verdaderos negativos, 35 falsos positivos y 11 falsos negativos. Tras el análisis de estos datos se obtuvo una sensibilidad del 69.44% y una especificidad del 89.13% para la TI como herramienta para la detección de fiebre.

IV.1.1.2. SEGUIMIENTO CLÍNICO DE LA ENFERMEDAD

IV.1.1.2.1. VACUNAS VLPS

En el grupo A (VLP1, desafío frente a LA1), algunos animales presentaron una ligera descarga nasal inespecífica previa al desafío. Tras el desafío con el virus LA1, no se detectaron síntomas clínicos a lo largo del experimento.

En el grupo B (VLP1+4, desafío frente a LA1), el animal 3B presentó una ligera tos acompañada de una leve descarga nasal desde el día de llegada a las instalaciones de Nivel 3.

Esta sintomatología inespecífica se mantuvo en esta oveja durante todo el experimento. El resto de animales del grupo B también presentaron una ligera descarga nasal en algún momento previo al desafío. Tras el desafío no se apreciaron signos clínicos característicos de LA en ninguno de los animales.

El grupo C (VLP1+4, desafío frente a LA4) se comportó de manera muy similar al grupo B con la excepción del animal 5C. Dicha oveja presentó súbitamente una clara sintomatología compatible con LA el día 65 (17 días post-desafío), mostrando apatía, hipersalivación y disnea. En la mañana del día 66 este animal muere presentando una sintomatología propia de la LA (**Figura 37**).

Figura 37. Sintomatología compatible con LA en el animal 5C. Apatía, disnea, palidez de mucosas, hipersalivación.

IV.1.1.2.2. VACUNA COMERCIAL INACTIVADA

En el grupo D (Zulvac 1, desafío frente a LA1) el animal 1D presentó diarrea inespecífica desde el día de llegada a las instalaciones, la cual se mantuvo a lo largo de todo el experimento. Por otro lado, el animal 2D mostró una ligera descarga nasal inespecífica que también se mantuvo a lo largo del experimento. Se comprobó que ninguno de los 5 animales

del grupo D mostró reacción local alguna en el punto de la inoculación de la vacuna, ni reacciones adversas de carácter general. Tras el desafío con el virus LA1 no se observó sintomatología clínica propia de la LA en ningún animal.

IV.1.1.2.3. ANIMALES DESAFIADOS NO VACUNADOS.

En ambos grupos de animales no vacunados empleados como controles se comprobó, tras el desafío con el virus virulento, la aparición de enfermedad clínica. Los resultados obtenidos en cada uno de los grupos control mostraron diferencias en cuanto al tipo, intensidad y duración de los síntomas clínicos.

IV.1.1.2.3.A. GRUPO E (DESAFÍO LA1)

La sintomatología de los animales control desafiados con el virus LA1 fue de duración variable y diferente dependiendo de cada animal. Los síntomas observados fueron apatía (2/3), descarga nasal (3/3), tos (1/3), diarrea (1/3), edema labial y facial/nasal (3/3), conjuntivitis (2/3), congestión en las mucosas (1/3), hipersalivación (1/3) y cojera (1/3) (**Figura 38**).

Figura 38. Síntomas compatibles con LA observados en los animales del grupo E. Apatía, edema, congestión de mucosas, cojera y descarga nasal.

Puesto que a cada uno de estos síntomas le corresponde una puntuación de acuerdo a lo establecido en protocolos previos (Perrin et al., 2007), se calculó la puntuación diaria de cada animal, así como la media diaria del grupo E. El incremento de los síntomas clínicos se produjo a partir del día 56, alcanzando el máximo el día 62 (**Figura 39**).

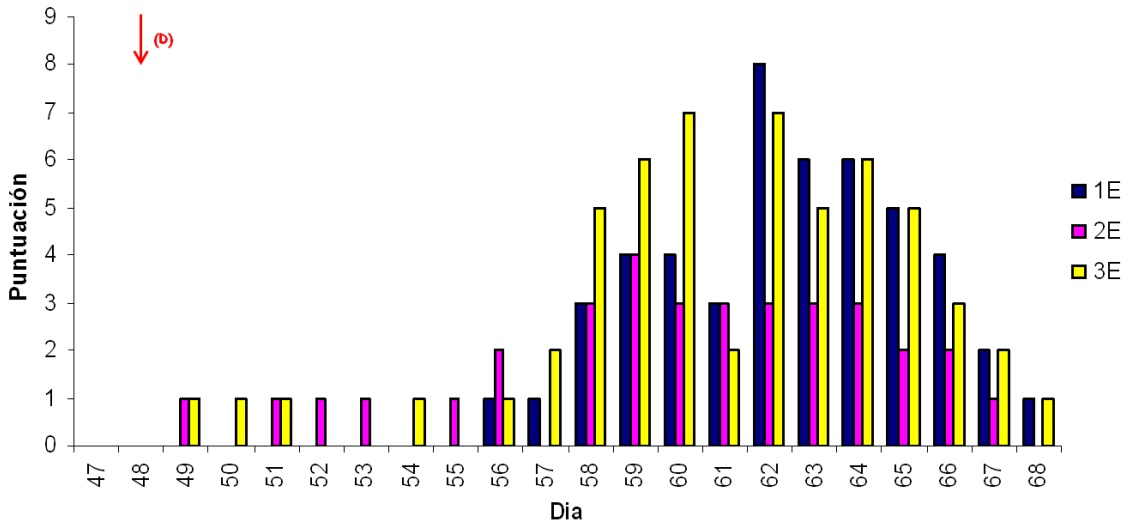


Figura 39. Representación gráfica de la puntuación individual de los animales del grupo E desde el desafío (D) hasta fin de experimento.

IV.1.1.2.3.B. GRUPO F (DESAFÍO LA4)

Figura 40. Síntomas compatibles con LA observados en los animales del grupo F. Apatía, edema, y descarga nasal.

El desafío con el virus LA4 de los animales pertenecientes a este grupo produjo escasos síntomas clínicos. Los animales presentaron apatía (1/3), descarga nasal leve (3/3), congestión en mucosas (2/3), edema labial (1/3) (**Figura 40**). Las manifestaciones clínicas aparecieron alrededor del día 59 llegando a su máximo el día 62 al igual que sucedió en el grupo E (**Figura 41**).

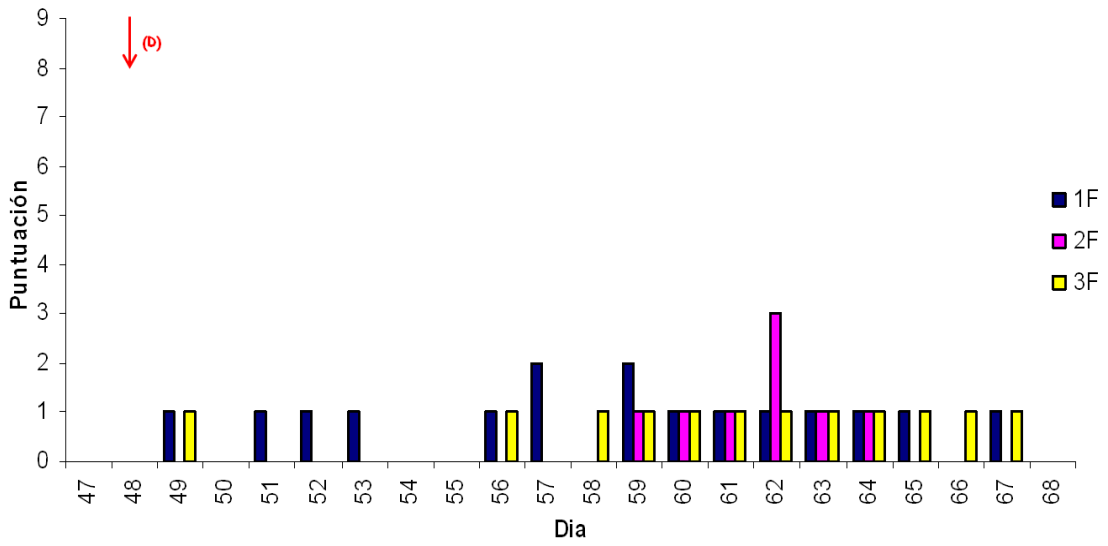


Figura 41. Representación gráfica de la puntuación individual de los animales del grupo F desde el desafío (D) hasta fin de experimento.

IV.1.1.3. SACRIFICIO Y NECROPSIA DE LOS ANIMALES

En el grupo A, tras la necropsia de los animales 1A, 2A y 3A, no se observaron lesiones macroscópicas significativas. El dato más llamativo de las necropsias de estos animales fue la presencia de timo no involucionado en el animal 2A.

En los grupos B y C, no se detectaron lesiones en ninguno de los 4 animales a los que se les realizó la necropsia a fin de experimento. En cambio, en la necropsia del animal 5C que murió el día 66 se observaron lesiones destacando la presencia de linfadenitis hemorrágica en ganglios cervicales, hidrotórax, edema intersticial en pulmón, hidropericardio, hemorragia subepicárdica en ambas aurículas, edema alveolar, hemorragia petequial en base de la arteria pulmonar, hemorragia en miocardio, ascitis, arena y piedras en vejiga, ligero aumento de tamaño en las glándulas adrenales e hiperemia en cerebro. Algunas de estas lesiones se muestran en la **figura 42.**

La necropsia realizada a los animales del grupo D, no reveló la presencia de lesiones macroscópicas reseñables.

Pese a la ausencia de lesiones, en todos los casos se tomaron muestras para su posterior análisis mediante RT-PCR, a fin de determinar la presencia del virus de la LA.

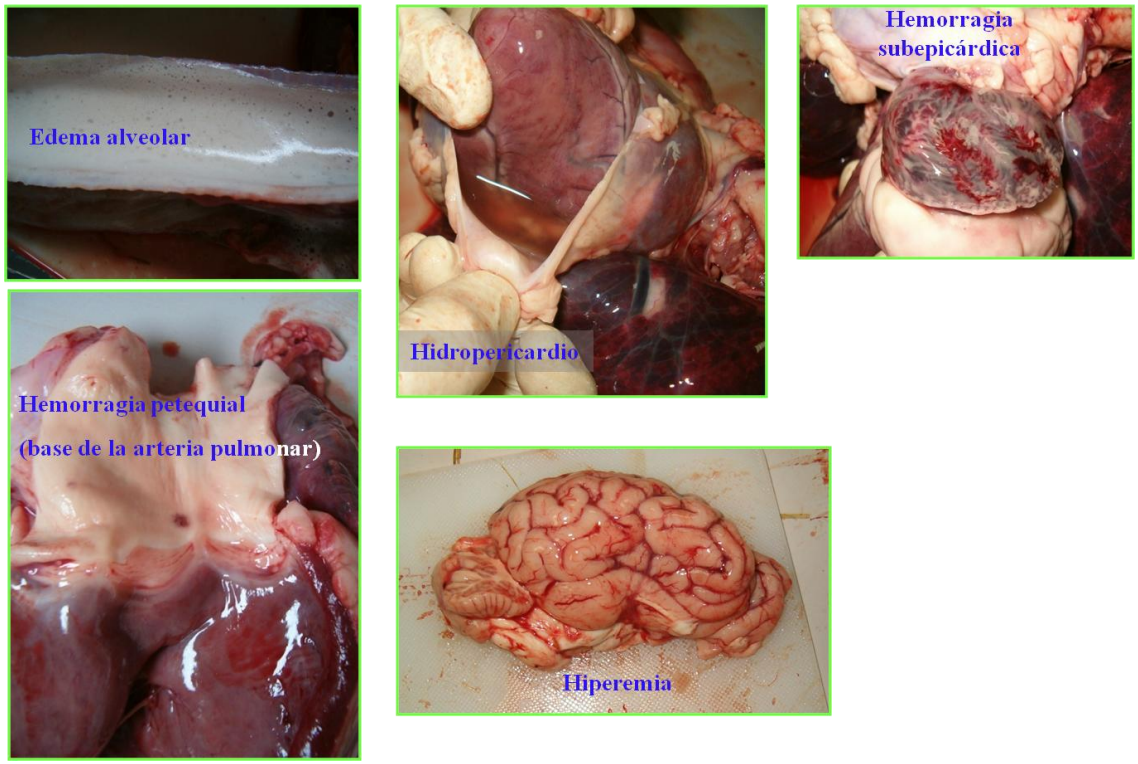


Figura 42. Imágenes tomadas durante la necropsia del animal 5C donde se observa: espuma en tráquea que indica edema alveolar, hidrotórax, hemorragias epicárdicas en aurícula, hemorragia petequial en la arteria pulmonar e hiperemia cerebral.

Entre las lesiones macroscópicas observadas en los animales del grupo E (desafiados con LA1) cabe destacar la existencia de un predominio de pulpa esplénica blanca (2/3), médula ósea reactiva (1/3), linfadenitis generalizada (3/3) y ligero edema alveolar (2/3).

En el caso del grupo F, los animales presentaron predominio de pulpa esplénica blanca (1/3), e linfadenitis generalizada (2/3).

IV.1.2. DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS DEL VIRUS DE LA LENGUA AZUL

A fin de determinar la presencia de ARN del virus de la LA, se empleó la RT-PCR como método de diagnóstico. A continuación se describen los resultados obtenidos tanto en muestras de sangre como en muestras de tejidos procedentes de animales vacunados y no vacunados.

IV.1.2.1. VACUNA VLP

En el grupo A, tan solo el animal 2A mostró resultados positivos a la presencia de ARN vírico en sangre entre los días 51 y 61, siendo negativa la presencia de ARN vírico al final del experimento (**Figura 43**). Todos los animales del grupo B mostraron resultados negativos tanto en sangre como en tejidos. En el grupo C, sólo el animal 5C, presentó resultados positivos a la

presencia de ARN vírico, detectándose la presencia de virus en sangre desde el día 54. En los tejidos tomados tras su muerte el día 66, la presencia del virus fue detectada en pulmón, hígado, bazo, rodete coronario, lengua, corazón y diferentes nódulos linfáticos. En este mismo grupo, el animal 6C también presentó positividad frente al virus de la LA de manera puntual el día 61.

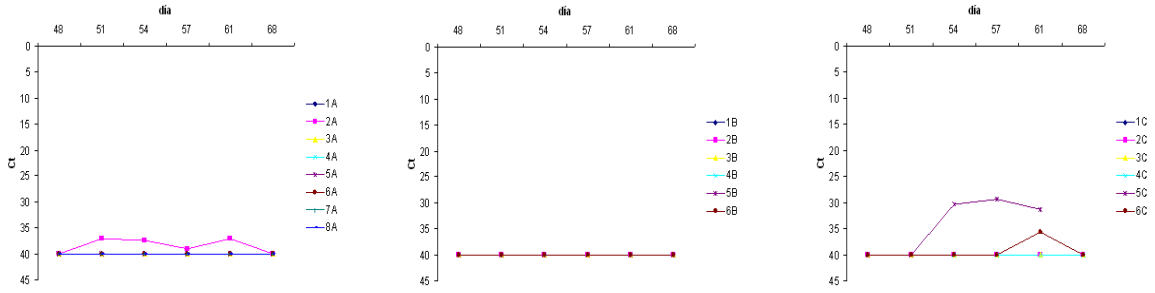


Figura 43. Representación de los Ct resultantes en la RT-PCR de detección de virus de la LA en cada una de las muestras de sangre tomadas de los animales de los grupos A (izquierda), B (centro) y C (derecha).

IV.1.2.2. VACUNA COMERCIAL INACTIVADA

En el grupo D, no se detectó la presencia de ARN vírico en ninguna de las muestras de sangre de los animales a lo largo del experimento (**Figura 44**).

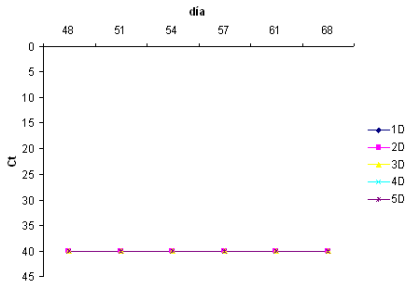


Figura 44. Representación de los Ct resultantes en la RT-PCR de detección de virus LA, de cada una de las muestras tomadas de los animales del grupo D.

IV.1.2.3. ANIMALES DESAFIADOS NO VACUNADOS.

En el grupo E, la detección del virus en los tres animales mediante RT-PCR fue posible desde el día 51 hasta el final del experimento a los 68 días. Por otro lado, en el grupo F la primera detección vírica se produjo en uno de los animales el día 51, siendo los tres animales positivos a partir del día 61 (**Figura 45**). En ambos grupos, las muestras tomadas de bazo, pulmón y nódulos linfáticos resultaron positivas.

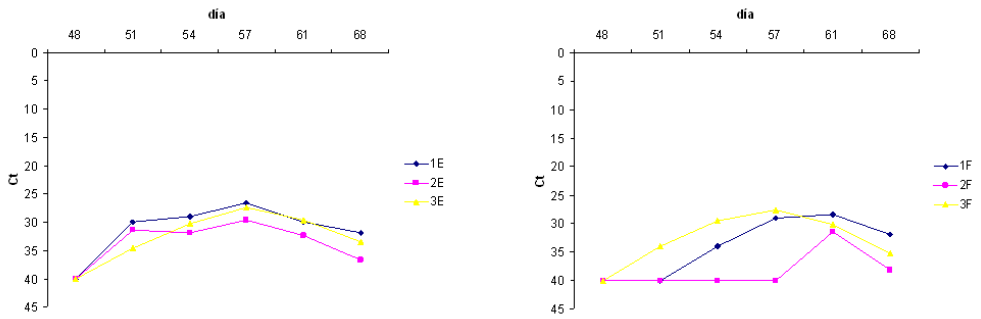


Figura 45. Representación de los Ct resultantes en la RT-PCR de detección de virus LA en cada una de las muestras de sangre de los animales de los grupos E y F.

IV.2. ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE

En esta sección se exponen los resultados obtenidos en los estudios del sistema inmune, tanto mediante técnicas convencionales como mediante las técnicas adaptadas en esta tesis. Asimismo se muestran los principales resultados obtenidos durante la puesta a punto de las diferentes técnicas.

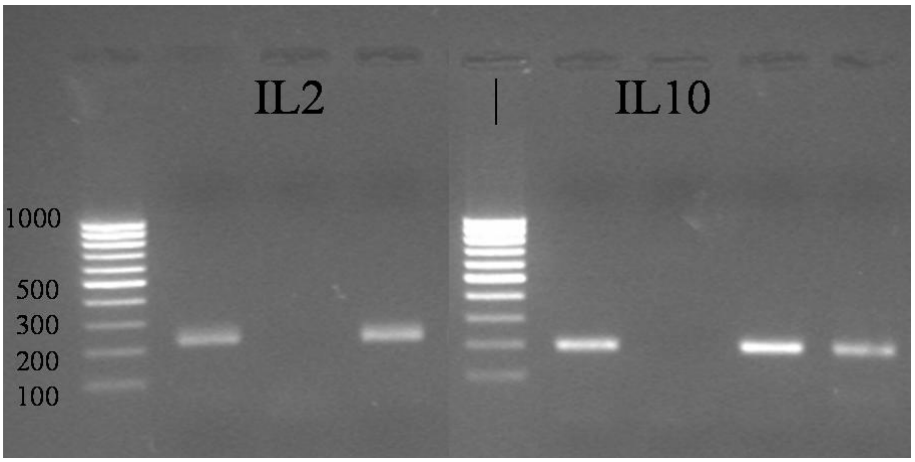
IV.2.1. PUESTA A PUNTO DE LA RT-PCR PARA DETECCIÓN DE ARN QUE CODIFICA PARA CITOQUINAS

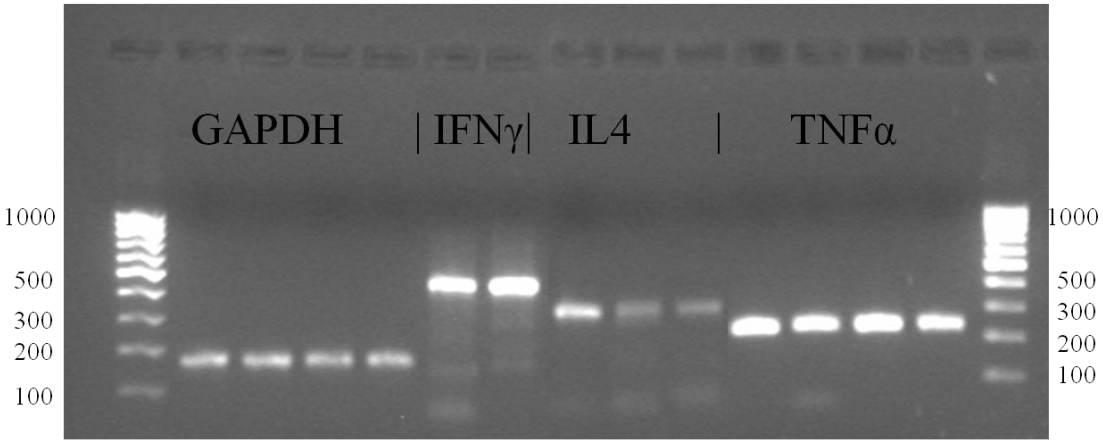
IV.2.1.1. ORIGEN DE LA MUESTRA DE ARN

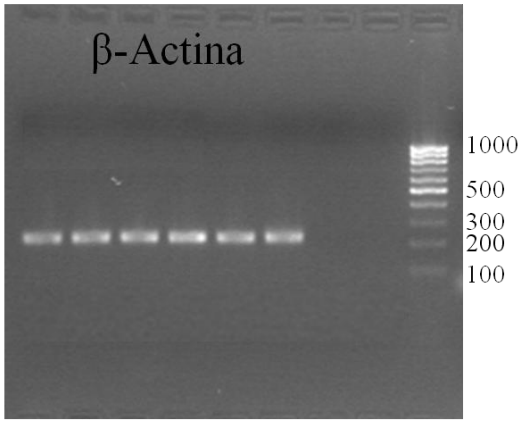
A partir de los linfocitos estimulados *in vitro* obtenidos de muestras de sangre tomadas con anticoagulante (EDTA), así como directamente a partir de dichas muestras, se pudo extraer ARNm codificante para las 6 citoquinas.

IV.2.1.1.1. OBTENCIÓN DE ARN A PARTIR DE LINFOCITOS ESTIMULADOS IN VITRO

Cuando los linfocitos procedentes de sangre periférica fueron estimulados mediante el uso de Con A como mitógeno, se pudo detectar la presencia del ARNm para IFNγ (442pb), IL2 (217pb) e IL4 (311pb) mediante la aplicación de las PCRs. La estimulación con LPS de *E.coli* dio lugar a resultados positivos para las PCRs diseñadas con el objetivo de amplificar regiones del ARNm para TNFα (228pb), IL10 (186pb) e IL12 (186pb). Finalmente, la estimulación conjunta con concentraciones de 10 µg/ml de Con A y 5 µg/ml de LPS permitió la detección mediante RT-PCR de todas las citoquinas estudiadas, como se puede observar en la **figura 46**.







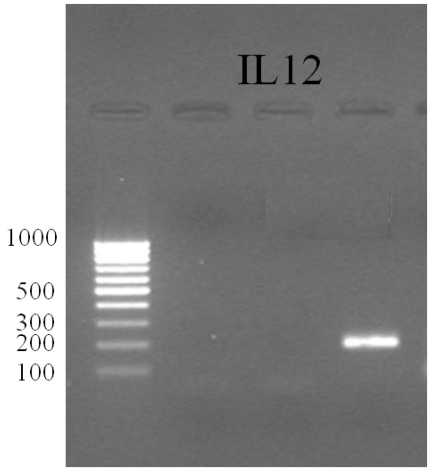


Figura 46. Imagen de diferentes geles, en los que se evidencia la presencia de los fragmentos específicos una vez finalizada la RT-PCR. IL2 (217pb), IL10 (186pb), GAPDH (153pb), IFNγ (442pb), IL4 (311pb), TNFα (238pb), β-Actina (227pb), IL12 (186pb).

La extracción de ARNm a partir de linfocitos estimulados *in vitro* presentó resultados positivos tanto con el uso del reactivo TRIZOL® como con la utilización del RNeasy Mini Kit® (Quiagen).

IV.2.1.1.2. OBTENCIÓN DE ARN A PARTIR DE MUESTRAS DE SANGRE ENTERA TOMADAS EN EDTA.

El protocolo de extracción de ARN mediante columnas fue el elegido para la extracción llevada a cabo a partir de muestras de sangre entera tomadas con EDTA, obteniéndose ratios de pureza de ARN cercanos a 1.8 mediante espectrofotometría.

La cantidad de ARN que se obtuvo tras esta purificación, fue calculada mediante espectrofotometría, obteniéndose concentraciones que oscilaron entre los 20ng/µl y los 400ng/µl.

IV.2.1.2. RT-PCR

Los genes de expresión constante utilizados en este estudio como normalizadores fueron GAPDH y β-Actina, los cuales fueron detectados por PCR tanto en la puesta a punto a partir de muestras de linfocitos estimulados y no estimulados *in vitro*, como a partir de las muestras de sangre entera procedentes de ovejas vacunadas frente a *Chlamydia* (**Figura 46**).

A partir de la RT-PCR realizada tanto en un paso como en dos, se elaboraron dos programas de PCR, los cuales se diferenciaron únicamente en la temperatura de anillamiento de los cebadores, la cual se produjo en un caso a 55ºC (β-Actina, IL 2, IL 10 e IL 12) y en otro a 60ºC (GAPDH, IL 4, TNFα e IFNγ). Se calcularon las temperaturas de fusión/anillamiento en la curva de disociación para cada uno de los amplicones. Estas temperaturas se muestran en la **tabla 11.**

Fragmento	Longitud (pb)	Tm (ºC)
GAPDH	153	86
IFNγ	442	79
TNFα	228	82
IL4	311	82
β-ACTINA	227	86
IL2	217	76
IL10	186	85
IL12	186	81

Tabla 11. Temperaturas de fusión (Tm) obtenidas durante la curva de disociación para cada uno de los fragmentos amplificados durante la RT-PCR, indicando el tamaño de cada uno de ellos.

En el caso de la RT-PCR en dos pasos, el ADNc obtenido tras la RT presentó una concentración que osciló entre los 2µg/µl y los 5µg/µl.

Siguiendo las bases descritas en los manuales de PCR cuantitativa para la realización de curvas estándar o curvas patrón (Stratagene, 2007; Invitrogen, 2008), se obtuvieron las

eficiencias para cada una de las PCRs adaptadas en esta tesis. Las eficiencias obtenidas se muestran en la **tabla 12.**

RT-PCR	Eficiencia (%)	RT-PCR	Eficiencia (%)
GAPDH	101.6	β-ACTINA	94.9
IFNγ	98.9	IL2	93.8
TNFα	115.2	IL10	97.2
IL4	91.4	IL12	108.5

Tabla 12. Eficiencias obtenidas para cada una de las RT- PCRs tras la realización de la curva estándar.

En la fase de validación, la técnica permitió detectar la expresión de ARNm de las seis citoquinas, utilizando como muestra el ARN procedente directamente de la sangre de animales vacunados frente a *Chlamydia*. Esta detección específica en animales estimulados fue demostrada mediante la secuenciación de los productos de PCR, los cuales presentaron homología con las secuencias de ARNm que codifican para citoquinas en ovino previamente publicadas (*GenBank*) (**Figura 47**).

```
Ovis aries GAPDH: GACTTATGACCACTGTCCACGCCATCACTGCCACCCAGAAGACTGTGGAT 600
Producto RT-PCR GAPDH: ------------------------ATCACTGCCACCCAGAAGACTGTGGAT 27
                                                ****************************

                  GGCCCTTCCGGGAAGCTGTGGCGTGATGGCCGAGGGGCTGCCCAGAACAT 650
                  GGCCCTTCCGGGAAGCTGTGGCGTGATGGCCGAGGGGCTGCCCAGAACAT 77
                  **************************************************

                  CATCCCTGCTTCTACTGGCGCTGCCAAGGCCGTGGGCAAGGTCATCCCTG 700
                  CATCCCTGCTTCTACTGGCGCTGCCAAGGCCGTGGGCAAGGTCATCCCTG 127
                  **************************************************

                  AGCTCAACGGGAAGCTCACTGGCATGGCCTTCCGCGTCCCCACCCCCAAC 750
                  AGCTCAACGGGAAGCTCACTGGCATG------------------------ 153
                  **************************
```

```
Ovis aries β-Actina: GTGCTGTCCCTGTACGCCTCTGGCCGCACCACTGGCATCGTGATGGACTC 550
Producto RT-PCR β-Actina: ------------------------CGCACCACTGGCATTGTCATGGACTC 26
                                                  ************** ** ********

                  CGGTGACGGGGTCACCCACACGGTGCCCATCTACGAGGGGTACGCCCTCC 600
                  TGGGGACGGGGTCACCCACACGGTGCCCATCTACGAGGGGTACGCCCTCC 76
                  ** *********************************************

                  CCCACGCCATCCTGCGTCTGGACCTGGCTGGCCGGGACCTGACGGACTAC 650
                  CCCACGCCATCCTGCGTCTGGACCTGGCTGGCCGGGACCTGACAGACTAC 126
                  ****************************************** ******

                  CTCATGAAGATCCTCACGGAGCGTGGCTACAGCTTCACCACCACGGCCGA 700
                  CTCATGAAGATCCTCACGGAACGTGGTTACAGCTTTACCACCACAGCCGA 176
                  ******************** ***** ******** ******** *****

                  GCGGGAAATCGTCCGTGACATCAAGGAGAAGCTCTGCTACGTGGCCCTGG 750
                  GCGGGAAATTGTGCGTGACATCAAGGAGAAGCTCTGCTACGTCGCCTTGG 226
                  ********* ** ****************************** *** ***

                  ACTTCGAGCAGGAGATGGCCACCGCGGCCTCCAGCTCCTCCCTGGAGAAG 800
                  A------------------------------------------------- 227
                  *
```

```
Ovis aries IFNγ:      AAACGATGAAATACACAAGCTCCTTCTTAGCTTTACTGCTCTGTGTGCTT 100
Producto RT-PCR IFNγ: ----------------------------GCTTTACTGCTCTGTGTGCTT 21
                                                  ********************

                      TTGGGTTTTTCTGGTTCTTATGGCCAGGGCCCATTTTTTAAAGAAATAGA 150
                      TTGGGTTTTTCTGGTTCTTATGGCCAGGGCCCATTTTTTAAAGAAATAGA 71
                      **************************************************

                      AAACTTAAAGGAGTATTTTAATGCAAGTAACCCAGATGTAGCTAAGGGTG 200
                      AAACTTAAAGGAGTATTTTAATGCAAGTAACCCAGATGTAGCTAAGGGTG 121
                      **************************************************

                      GGCCTCTTTTCTCAGAAATTTTGAAGAATTGGAAAGAGGAGAGTGACAAA 250
                      GGCCTCTTTTCTCAGAAATTTTGAAGAATTGGAAAGAGGAGAGTGACAAA 171
                      **************************************************

                      AAGATTATTCAGAGCCAAATTGTCTCCTTCTACTTCAAACTCTTTGAAAA 300
                      AAGATTATTCAGAGCCAAATTGTCTCCTTCTACTTCAAACTCTTTGAAAA 221
                      **************************************************

                      CCTCAAAGATAACCAGGTCATTCAAAGGAGCATGGATATCATCAAGCAAG 350
                      CCTCAAAGATAACCAGGTCATTCAAAGGAGCATGGATATCATCAAGCAAG 271
                      **************************************************

                      ACATGTTTCAGAAGTTCTTGAACGGCAGCTCTGAGAAACTGGAGGACTTC 400
                      ACATGTTTCAGAAGTTCTTGAACGGCAGCTCTGAGAAACTGGAGGACTTC 321
                      **************************************************

                      AAAAGGCTGATTCAAATTCCGGTGGATGATCTGCAGATCCAGCGCAAAGC 450
                      AAAAGGCTGATTCAAATTCCGGTGGATGATCTGCAGATCCAGCGCAAAGC 371
                      **************************************************

                      CATCAATGAACTCATCAAGGTGATGAATGACCTGTCGCCAAAATCTAACC 500
                      CATCAATGAACTCATCAAGGTGATGAATGACCTGTCGCCAAAATCTAACC 421
                      **************************************************

                      TCAGAAAGCGGAAGAGAAGTCAGAATCTCTTTCGAGGCCGGAGAGCATCA 550
                      TCAGAAAGCGGAAGAGAAGTC----------------------------- 442
                      ********************
```

```
Ovis aries TNFα:      GATCAACCTGCCGGAATACCTGGACTATGCCGAGTCTGGGCAGGTCTACT 1750
Producto RT-PCR TNFα: -------------GAATACCTGGACTATGCCGAGTCTGGGCAGGTCTACT 37
                                    ************************************

                      TTGGGATCATCGCCCTGTGAGGGCGCAGGACATGCATCCTCTCCCACCTC 1800
                      TTGGGATCATCGCCCTGTGAGGGCGCAGGACATGCATCCTCTCCCACCTC 87
                      **************************************************

                      AGTTACCTTATTATTTACTCCTTCAGACCCTCCTCATCCCCTTCTGGTTT 1850
                      AGTTACCTTATTATTTACTCCTTCAGACCCTCCTCATCCCCTTCTGGTTT 137
                      **************************************************

                      AGAAAGGGAATTAGGGGCTCAGGGCTGGGCTCCAAGCGTCCAACTTTAAA 1900
                      AGAAAGGGAATTAGGGGCTCAGGGCTGGGCTCCAAGCGTCCAACTTTAAA 187
                      **************************************************

                      CAACAGCTGCACTTAGAAATTAGGGATGTAGGGAAGTGAGGCCTGGACAA 1950
                      CAACAGCTGCACTTAGAAATTAGGGATGTAGGGAAGTGAGG--------- 228
                      ****************************************
```

```
Ovis aries IL2:      TCAAGCTCTCCAGGATGCATACATTTAACTTCTACATGCCCAAGGTTAAC 150
Producto RT-PCR IL2: ----------------------------TTTTACGTGCCCAAGGTTAAC 21
                                                 ** *** **************

                     GCTACAGAATTGAAACATCTTAAGTGTTTACTAGAAGAACTCAAACTTCT 200
                     GCTACAGAATTGAAACATCTTAAGTGTTTACTAGAAGAACTCAAACTTCT 71
                     **************************************************

                     AGAGGAAGTGCTAGATTTAGCTCCAAGCAAAAACCTGAACACCAGAGAGA 250
                     AGAGGAAGTGCTAGATTTAGCTCCAAGCAAAAACCTGAACACCAGAGAGA 121
                     **************************************************

                     TCAAGGATTCAATGGACAATATCAAGAGAATAGTTTTGGAACTACAGGGA 300
                     TCAAGGATTCAATGGACAATATCAAGAGAATAGTTTTGGAACTACAGGGA 171
                     **************************************************

                     TCTGAAACAAGATTCACATGTGAATATGATGATGCGACAGTAAAGGCTGT 350
                     TCTGAAACAAGATTCACATGTGAATATGATGATGCAACAGTAAACG---- 217
                     ********************************** ******** *
```

```
Ovis aries IL4:      TACCAGCCACTTCGTCCATGGACACAAGTGTGATATTACCTTAGAAGAGA 100
Producto RT-PCR IL4: -----GCCACTTCGTCCATGGACACAAGTGTGATATTACCTTAGAAGAGA 45
                           *******************************************

                     TCATCAAAACGCTGAACATCCTCACATCGAGAAAGAATTCATGCATGGAG 150
                     TCATCAAAACGCTGAACATCCTCACATCGAGAAAGAATTCATGCATGGAG 95
                     **************************************************

                     CTGCCTGTAGCAGACGTCTTTGCTGCCCCAAAGAACGCAACTGAGAAGGA 200
                     CTGCCTGTAGCAGACGTCTTTGCTGCCCCAAAGAACGCAACTGAGAAGGA 145
                     **************************************************

                     AACCTTCTGCAGGGCTGGAATTGAGCTTAGGCGTATCTACAGGAGCCACA 250
                     AACCTTCTGCAGGGCTGGAATTGAGCTTAGGCGTATCTACAGGAGCCACA 195
                     **************************************************

                     TGTGCTTGAACAAATTCCTGGGCGGACTTGACAGGAATCTCAGCAGCCTG 300
                     TGTGCTTGAACAAATTCCTGGGCGGACTTGACAGGAATCTCAGCAGCCTG 245
                     **************************************************

                     GCAAGCAAGACCTGTTCTGTGAATGAAGCCAAGACGAGTACAAGTACGCT 350
                     GCAAGCAAGACCTGTTCTGTGAATGAAGCCAAGACGAGTACAAGTACGCT 295
                     **************************************************

                     GAGAGACCTCTTGGAAAGGCTAAAGACTATTATGAGGGAGAAATACTCAA 400
                     GAGAGACCTCTTGGAA--------------------------------- 311
                     ****************
```

```
Ovis aries IL10:  ACTGAACAGCATGCTGTTGACCCAGTCTCTGCTGGATGACTTTAAGGGTT 300
Producto RT-PCR IL10: ----------------------------TGCTGGATGACTTTAAGGGTT 21
                                                  *********************

                  ACCTGGGTTGCCAAGCCTTGTCGGAAATGATCCAGTTTTACCTGGAGGAG 350
                  ACCTGGGTTGCCAAGCCTTGTCGGAAATGATCCAGTTTTACCTGGAGGAG 71
                  **************************************************

                  GTGATGCCACAGGCTGAGAACCATGGGCCTGACATCAAGGAGCACGTGAA 400
                  GTGATGCCACAGGCTGAGAACCATGGGCCTGACATCAAGGAGCACGTGAA 121
                  **************************************************

                  CTCGCTGGGGGAGAAGCTGAAGACCCTCCGGCTGCGGCTGCGGCGCTGTC 450
                  CTCGCTGGGGGAGAAGCTGAAGACCCTCCGGCTGCGGCTGCGGCGCTGTC 171
                  **************************************************

                  ATCGCTTTCTGCCCTGCGAAAACAAGAGCAAGGCGGTGGAGCAGGTGAAG 500
                  ATCGCTTTCTGCCCT---------------------------------- 186
                  ***************
```

```
Ovis aries IL12:  AACCTGCAACTGAGACCACTAAAGAATTCTCGGCAGGTGGAAGTCAGCTGGGAGTACCCT 780
Producto RT-PCR IL 12: AACCTGCAACTGAGACCATTAAAGAATTCTCGGCAGGTGGAGGTCAGCTGGGAGTACCCT 60
                  ****************** ********************** ******************

                  GACACGTGGAGCACCCCACATTCCTACTTCTCCCTGACGTTTTGTGTTCAGGTCCAGGGA 840
                  GACACGTGGAGCACCCCGCATTCCTACTTCTCCCTGACGTTTTGTGTTCAGGTCCAGGGA 120
                  **************** ****************************************

                  AAGAACAAGAGAGAAAAGAAACTCTTCACAGACCAAACCTCAGCCAAAGTCACATGCCAC 900
                  AAGAACAAGAGAGAAAAGAAACTCTTCATGGACCAAACCTCAGCCAAAGTCACATGCCAC 180
                  ***************************  ******************************

                  AAGGATGCCAACATCCGCGTGCAAGCCCGGGACCGCTACTACAGCTCATTCTGGAGTGAA 960
                  AAGGAT------------------------------------------------------ 186

                  ******
```

Figura 47. Alineamiento de cada una de las secuencias de los amplicones con la correspondiente secuencia de referencia publicada en *GenBank*. Por orden de aparición: GAPDH, β-Actina, IFNγ, TNFα, IL2, IL4, IL10, IL12.

IV.2.2. EXPRESIÓN DE GENES QUE CODIFICAN PARA CITOQUINAS

Una vez adaptada la técnica y comprobada la capacidad de detección del ARNm que codifica para las citoquinas IL2, IL4, IL10, IL12, TNFα e IFNγ, se utilizó esta herramienta en el análisis de las muestras de sangre obtenidas de los animales vacunados y no vacunados a lo largo del experimento. A partir de los niveles basales que mostraron los animales el día 0, se establecieron las cantidades relativas de la expresión de dichos genes, llevándose a cabo una cuantificación relativa de la expresión de estas citoquinas, lo que permitió conocer la evolución de cada una de ellas en cada animal a lo largo de todo el experimento. Durante la cuantificación relativa, la cantidad detectada en el calibrador (día 0) fue asumida como valor 0. Por tanto, si la expresión de un gen en la muestra problema fue mayor que en el día 0, dicha

expresión se representó como un valor positivo, mientras que una expresión génica menor que la del día 0 fue representada como un valor negativo.

El ARNm codificante para IL4 no pudo detectarse el día 0 en ninguno de los animales analizados, aunque su detección si fue posible en días posteriores. Puesto que para la IL4 no existía calibrador, en esta sección no se hará referencia a la cinética de dicha citoquina.

IV.2.2.1. EXPRESIÓN DE CITOQUINAS EN LOS ANIMALES VACUNADOS CON VLPS

IV.2.2.1.1. VLP MONOVALENTE SEROTIPO 1 (GRUPO A).

Dentro del Grupo A (VLP1) se analizaron las muestras de los animales 1A, 2A, 7A y 8A. A continuación, se expone la evolución que se observó en el conjunto del grupo para la expresión de cada una de las citoquinas.

La valoración en conjunto de la expresión de IFNγ en los animales seleccionados del grupo A, con respecto a los valores basales obtenidos el día 0, demostró la existencia de un ligero aumento en la expresión de IFNγ tras la vacunación (día 3), así como un moderado incremento en la expresión de IFNγ hacia el final del experimento (**Figura 48**).

La evolución media de la expresión del TNFα en el grupo A mostró un descenso en la expresión de esta citoquina, con respecto al día 0, justo antes de la revacunación. Sin embargo, a partir del día 23 se produjo un incremento en los niveles de expresión de TNFα, los cuales se mantendrían hasta el final del experimento.

La evolución de la expresión de la IL2 en el conjunto del grupo A mostró un aumento 3 días después de la vacunación. Sin embargo, tras la revacunación hubo un descenso seguido de un incremento en la expresión de esta citoquina a los 35 días del experimento manteniéndose los valores positivos en la expresión de IL2 tras el desafío y llegándose a alcanzar los máximos valores el día 61.

La evolución de la expresión de la IL10 en el conjunto del grupo A no mostró variaciones importantes relacionadas con la vacunación, la revacunación o el desafío, respecto a la expresión basal del día 0.

En cuanto a la evolución en el conjunto del grupo A de la expresión de la IL12 se observaron, en general, unos niveles de expresión inferiores a los basales desde el inicio del experimento, alcanzándose los valores mínimos a los 42 días del experimento.

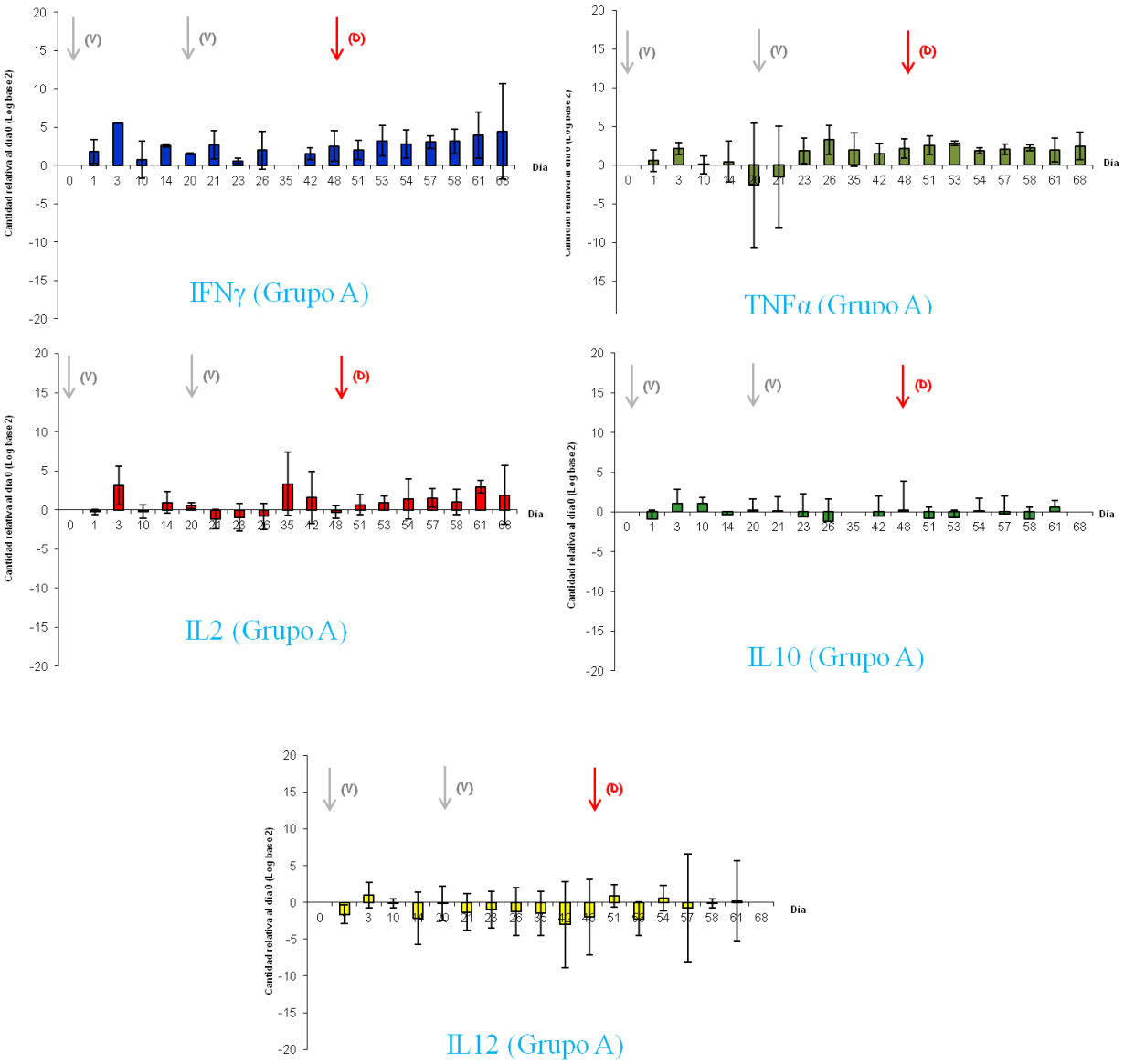


Figura 48. Representación de la cuantificación relativa media de la expresión de IFNγ, TNFα, IL2, IL10 e IL12 en el grupo A. (V) vacunación, (D) desafío.

IV.2.2.1.2. VLP BIVALENTE SEROTIPOS 1 Y 4.

IV.2.2.1.2.A. ANIMALES DESAFIADOS CON EL SEROTIPO 1 (GRUPO B).

En el grupo B (VLP1+4, desafío LA1) se analizaron las muestras de los 6 animales y los resultados se exponen de manera similar a los del grupo A. En este grupo no fue posible llevar a cabo la cuantificación relativa del IFNγ en la muestra calibrador (día 0) de ninguno de los animales, lo que impidió llevar a cabo una cuantificación relativa de esta citoquina en el resto de muestras tomadas a lo largo del experimento.

El análisis en conjunto de la expresión de TNFα en el grupo B mostró una evolución variable en la expresión de esta citoquina, no observándose aumentos o descensos reseñables

respecto al día 0 que pudieran ser asociados a la vacunación, revacunación, o desafío con el virus (**Figura 49**).

Tras la vacunación se observó un descenso en la expresión de IL2 con respecto a los niveles basales obtenidos el día 0, el cual se mantuvo tras la revacunación hasta el día 23 del experimento, momento en el que se observó un incremento en la expresión de IL2 que se mantendría hasta el final del experimento y que alcanzaría sus máximos niveles tras el desafío con el virus entre los días 54 y 57.

El análisis de la evolución media de la expresión de la IL10 para el grupo B mostró unos niveles inferiores a los del día 0 a lo largo del experimento, observándose un aumento sólo hacia el final del ensayo (día 68).

El análisis de la expresión media de la IL12 en el grupo B, mostró un aumento respecto al valor basal del día 0 tras la vacunación y la revacunación (días 3 y 21 respectivamente), el cual precedió a un descenso en la expresión de ésta citoquina que se mantuvo, salvo excepciones como las del día 54, hasta el final del experimento.

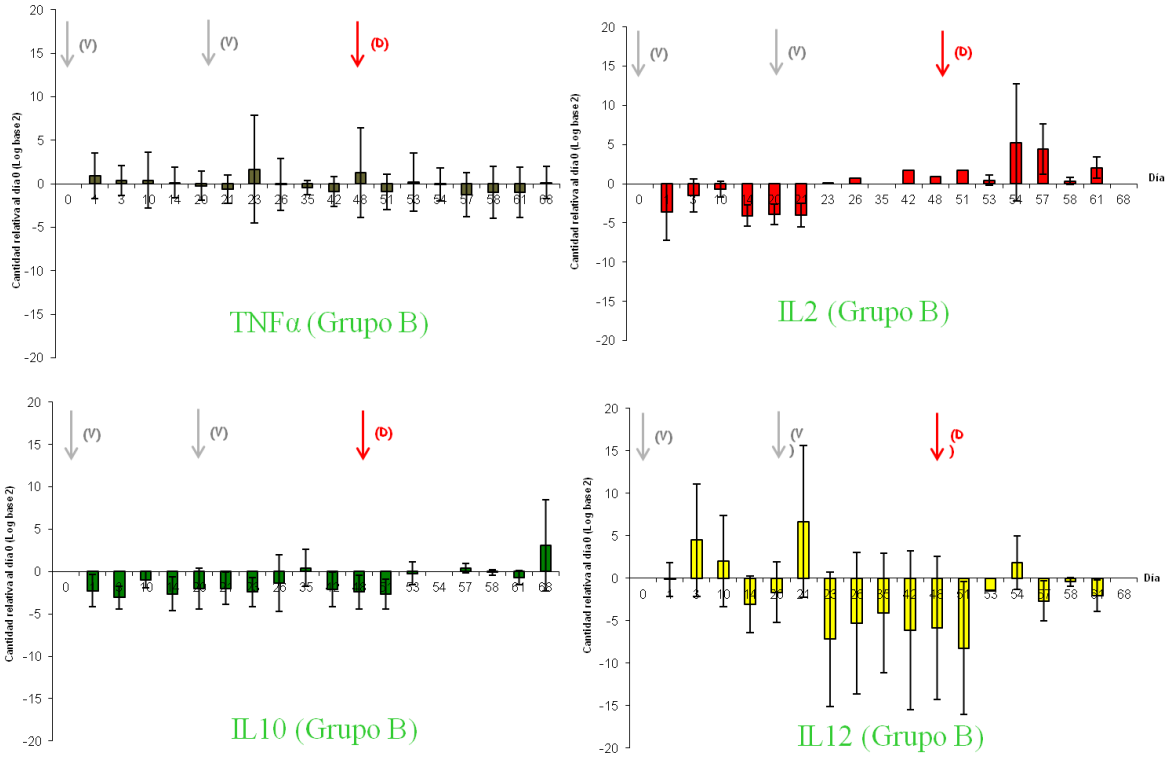


Figura 49. Representación de la cuantificación relativa media de la expresión de TNFα, IL2, IL10 e IL12 en el grupo B. (V) vacunación, (D) desafío.

IV.2.2.1.2.B. ANIMALES DESAFIADOS CON EL SEROTIPO 4 (GRUPO C).

En el caso del grupo C sólo se analizó el animal 6C, en el que no fue posible detectar el ARNm de IFNγ e IL10 en la muestra calibrador (día 0), lo que impidió llevar a cabo una cuantificación relativa de estas citoquinas en el resto de muestras tomadas a lo largo del experimento.

Cabe destacar el incremento en la expresión de TNFα observado tras la vacunación y especialmente tras el desafío, alcanzándose los niveles máximos entre los días 53 y 54 del experimento (**Figura 50**).

Salvo excepciones (días 3 y 61), la IL2 presentó unos niveles de expresión negativos o poco destacables con respecto al nivel basal de expresión (día 0). Sin embargo, se produjeron dos incrementos llamativos, que tuvieron lugar post-vacunación (día 3) y post-desafío (día 61).

Con respecto a la IL12, tras la vacunación y el desafío se produjo un incremento en los niveles de expresión de dicha citoquina observándose, en general, unos niveles de expresión poco destacables o negativos en el periodo comprendido entre la revacunación y el desafío.

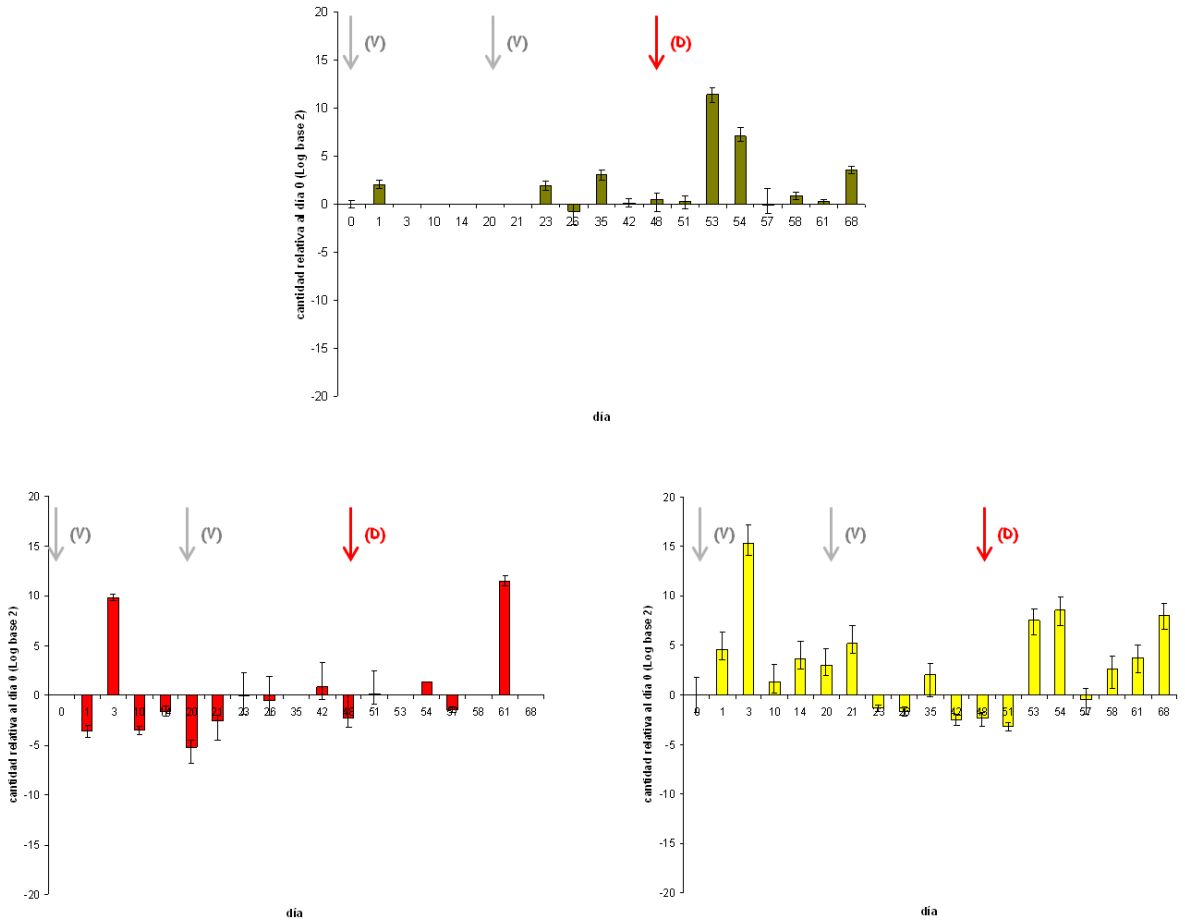


Figura 50. Cuantificación relativa de la expresión del ARNm que codifica para TNFα (centro), IL2 (izquierda) e IL12 (derecha) en el animal 6 del grupo C. (V) vacunación, (D) desafío.

IV.2.2.2. ANIMALES DESAFÍADOS NO VACUNADOS

IV.2.2.2.1. ANIMALES DESAFIADOS CON EL SEROTIPO 1. GRUPO E

La expresión de genes que codifican para citoquinas fue estudiada en los tres animales del Grupo E.

Los niveles de expresión de IFNγ se mantuvieron prácticamente sin variaciones a lo largo del experimento, no observándose cambios reseñables tras el desafío con el serotipo 1 del virus de la LA (**Figura 51**).

A pesar de presentar unos niveles de expresión de TNFα ligeramente superiores a los niveles basales (día 0), dichos niveles se mantuvieron prácticamente sin cambios a lo largo del experimento, no apreciándose variaciones importantes tras el desafío.

En conjunto, se observó un ligero incremento en la expresión de IL2 desde el día 26, alcanzándose los máximos valores de expresión tras el desafío (día 57).

La IL10 mostró unos niveles de expresión inferiores a los niveles basales, los cuales se mantuvieron desde el inicio del experimento hasta el desafío, punto a partir del cual se observó un ligero incremento en la expresión de esta citoquina que alcanzaría sus niveles máximos a los 68 días.

La expresión de la IL12 en el conjunto de los animales del grupo E fue, en general, negativa con respecto a los niveles basales (día 0). Sin embargo, tras el desafío, a partir del día 57, se observó un incremento en la expresión de esta citoquina que se mantuvo hasta el final del experimento.

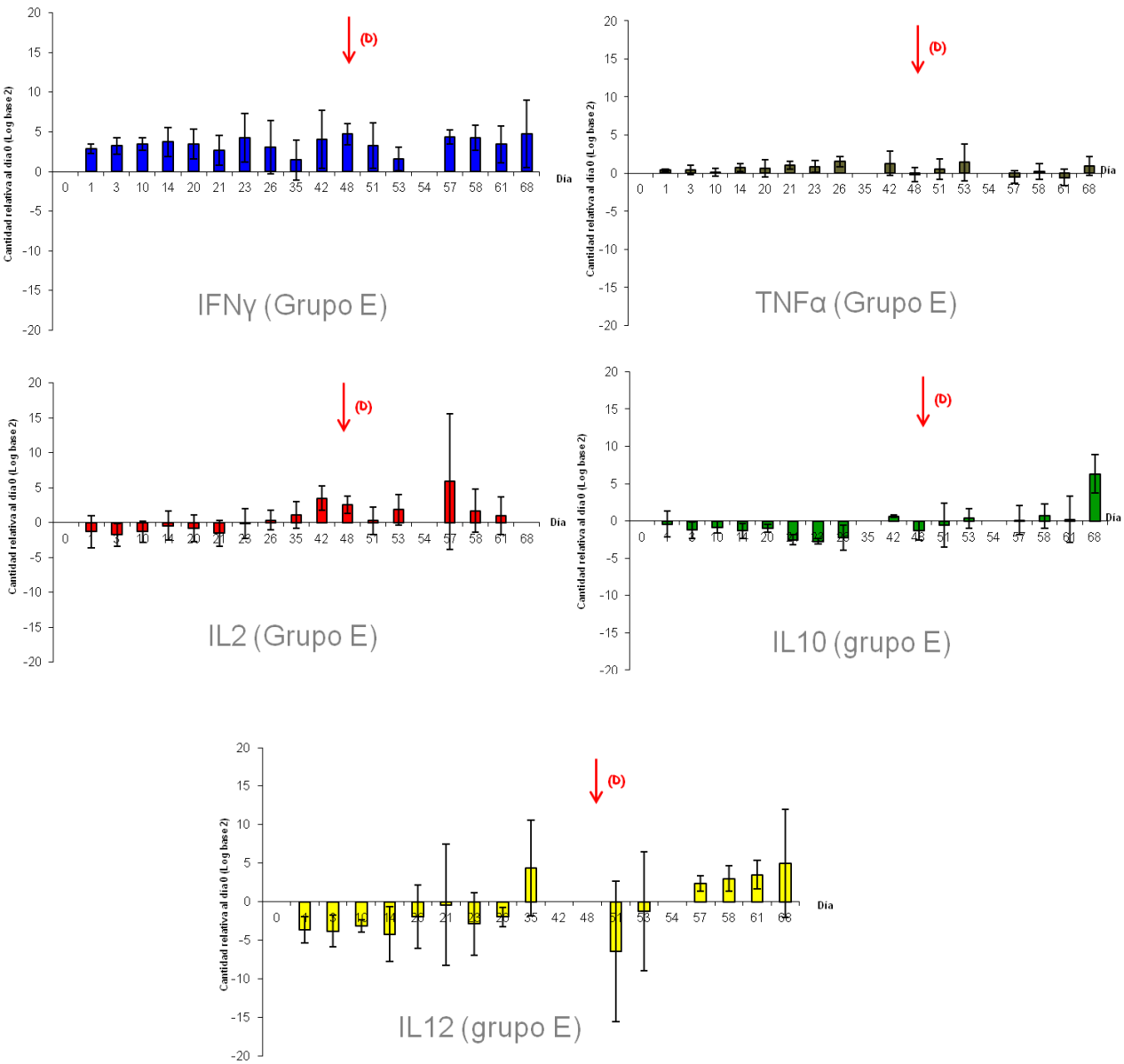


Figura 51. Representación de la cuantificación relativa media de la expresión de IFNγ, TNFα, IL2, IL10 e IL12 en el grupo E. (D) desafío.

IV.2.2.2.2. ANIMALES DESAFIADOS CON EL SEROTIPO 4. GRUPO F

En el conjunto de los tres animales, se observó desde el inicio del experimento, unos niveles de expresión de IFNγ superiores a los niveles basales, alcanzándose los niveles de expresión máximos tras el desafío (día 53) (**Figura 52**).

Una evolución similar a la observada en la expresión de IFNγ mostró la expresión de TNFα en los animales del grupo F, alcanzándose los niveles de expresión máximos tras el desafío (día 53).

También la IL2 presentó una evolución en su expresión muy similar a la observada para IFNγ e TNFα, alcanzándose los niveles de expresión máximos tras el desafío (día 54).

Los niveles de expresión de la IL10 no mostraron cambios reseñables a lo largo del experimento ni tras el desafío con el serotipo 4 del virus de la LA.

Los cambios en los niveles de expresión de la IL12 fueron poco importantes, así como muy variables a lo largo del experimento, no observándose cambios en dicha tendencia tras el desafío.

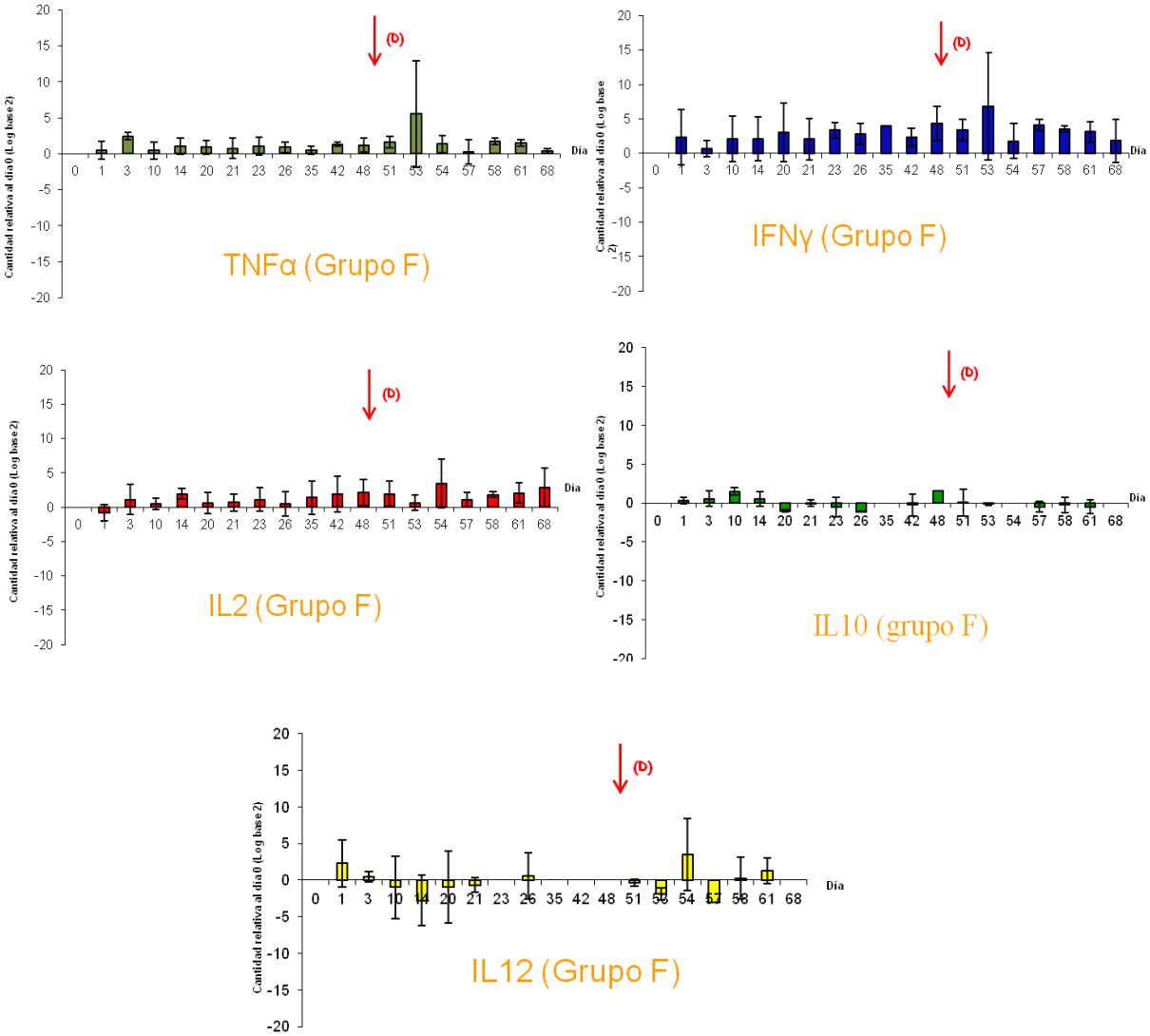


Figura 52. Representación de la cuantificación relativa media de la expresión de IFNγ, TNFα, IL2, IL10 e IL12 en el grupo F. (D) desafío.

IV.2.3. PUESTA A PUNTO DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO, PARA EL ESTUDIO DE PBMCS A PARTIR DE SANGRE OVINA

En base a parámetros de tamaño y complejidad, el análisis de las células sanguíneas ovinas mediante citometría de flujo, mostró que las células mononucleares se situaron en el área inferior centro izquierda como se muestra en la **figura 15,** mientras que los restos celulares se situaron en la zona inferior izquierda, y los granulocitos formaron una nube dispersa que ocupaba gran espacio del gráfico.

La adaptación del protocolo de inmunofenotipaje permitió analizar 7 poblaciones celulares. Las poblaciones celulares estudiadas fueron subpoblaicones de linfocitos T ($CD4^+$, $CD8^+$, $TCR1n6^+$ y $WC1^+$), monocitos ($CD14^+$), células reguladoras ($CD25^+$) y linfocitos B. Ésta detección se llevó a cabo gracias a la medición de la fluorescencia emitida por las células que presentaron en su membrana las proteínas de interés. Las poblaciones de células del sistema inmune que emitieron fluorescencia fueron analizadas en referencia a la población total de PBMCs. En la **figura 53** se muestra el ejemplo de los resultados obtenidos con los diferentes anticuerpos monoclonales.

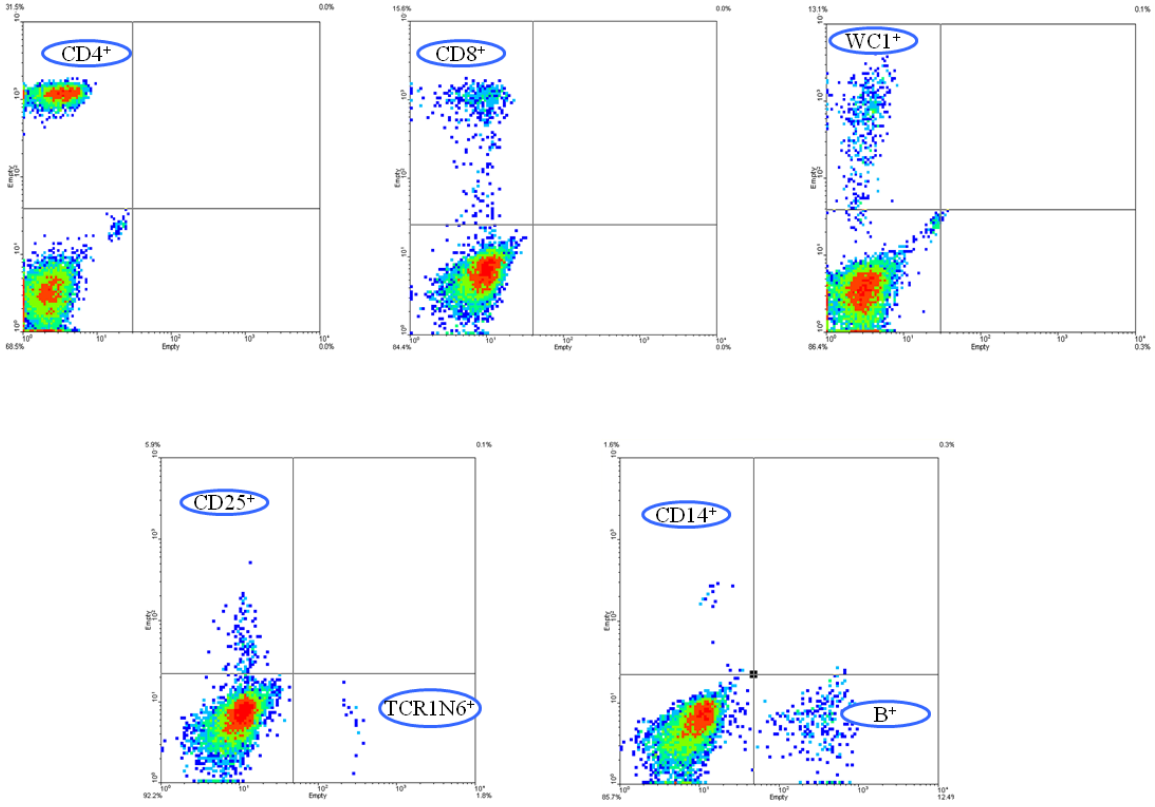


Figura 53. Imagen de la detección de diferentes poblaciones celulares a partir de las PBMC de sangre de oveja mediante citometría de flujo.

IV.2.4.DETECCIÓN DE POBLACIONES CELULARES DEL SISTEMA INMUNE POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Con el objetivo de establecer los valores basales de diferentes poblaciones celulares del sistema inmune en ovejas de raza merina de 7-10 meses de edad, se llevó a cabo el análisis mediante citometría de flujo, de los porcentajes de PBMCs en un total de 11 ovejas (1A, 2A, 1B, 2B, 1D, 2D, 3D, 4D, 5D, 1E, 2E). Los resultados obtenidos se muestran en la **tabla 13.**

	MEDIA	LÍMITE SUPERIOR	LÍM ITE INFERIOR
$CD4^+$	29,51	36,67	22,36
$CD8^+$	10,54	13,84	7,25
$CD14^+$	4,21	6,15	2,27
$CD25^+$	5,98	8,18	3,78
LINFOCITOS B	22,27	27,41	17,14
γδ TCR1-N6	1,04*	1,43	0,65
$WC1^+$	15,40#	21,51	9,28

Tabla 13. Porcentajes basales para las diferentes poblaciones celulares obtenidos mediante citometría de flujo. *Calculado a partir de muestras de 6 animales. # Calculado a partir de muestras de 5 animales.

IV.2.4.1. VACUNA VLP

IV.2.4.1.1. VLP MONOVALENTE SEROTIPO 1 (GRUPO A).

Se estudió la evolución de las poblaciones celulares del sistema inmune en sangre de los animales 1A y 2A vacunados con VLP1. Los datos fueron analizados cualitativamente. Tras la vacunación se observó un aumento, con respecto a los valores basales del día 0, en la población de células $CD25^+$ entre los días 10 y 14. Tras el desafío se produjo un aumento de la subpoblación de linfocitos T-γδ TCR1-N6, que se mantuvo hasta el final del experimento (**Figura 54**).

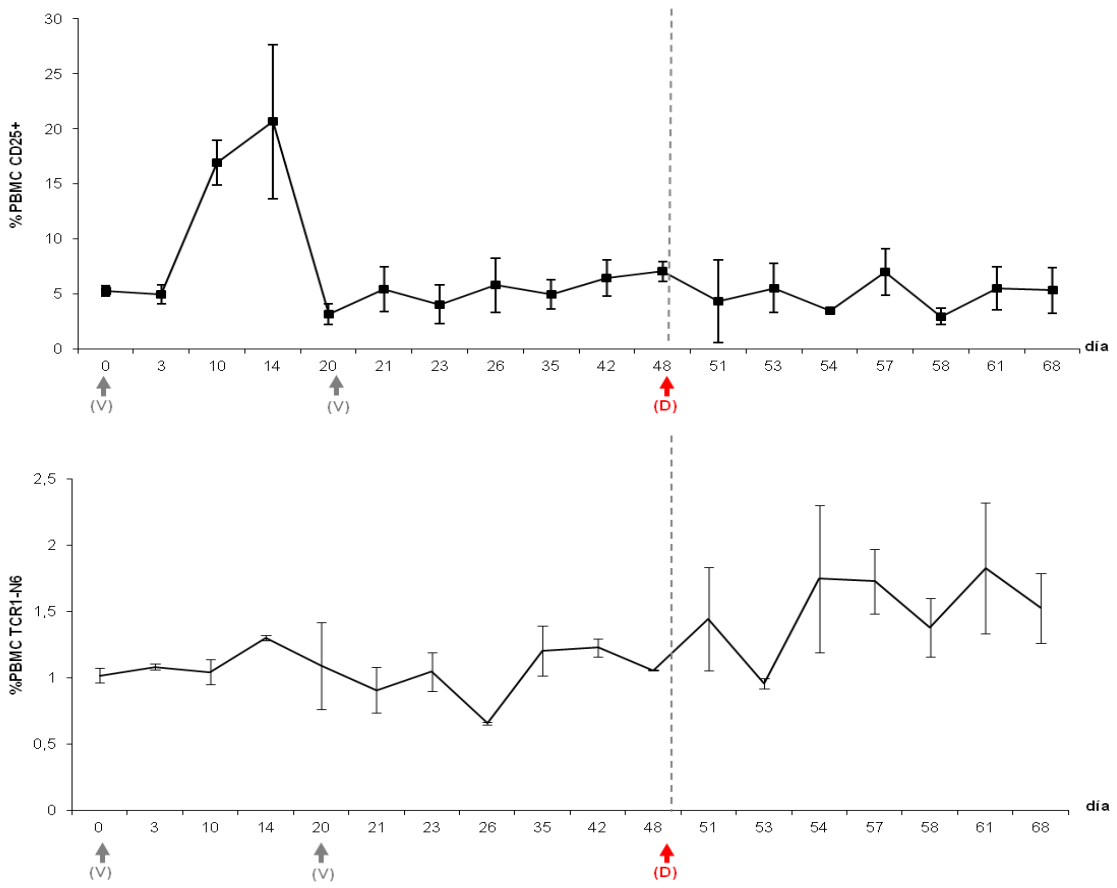


Figura 54. Grupo A: porcentajes de PBMC que pertenecen a las poblaciones $CD25^+$ y γδ $TCR1\text{-}N6^+$. (V) vacunación, (D) desafío.

IV.2.4.1.2. VLP BIVALENTE SEROTIPOS 1 Y 4 (GRUPO B).

De los animales vacunados con vacuna bivalente (VLP 1+4) se analizaron las poblaciones celulares del sistema inmune mediante citometría de flujo de las ovejas 1B y 2B. El análisis cualitativo mostró resultados similares a los del grupo A. Se observó un ligero aumento de la población $CD25^+$ tras la vacunación, mientras que los linfocitos T-γδ TCR1-N6 mostraron un incremento progresivo tras el desafío, alcanzándose los valores máximos el día 61 (**Figura 55**).

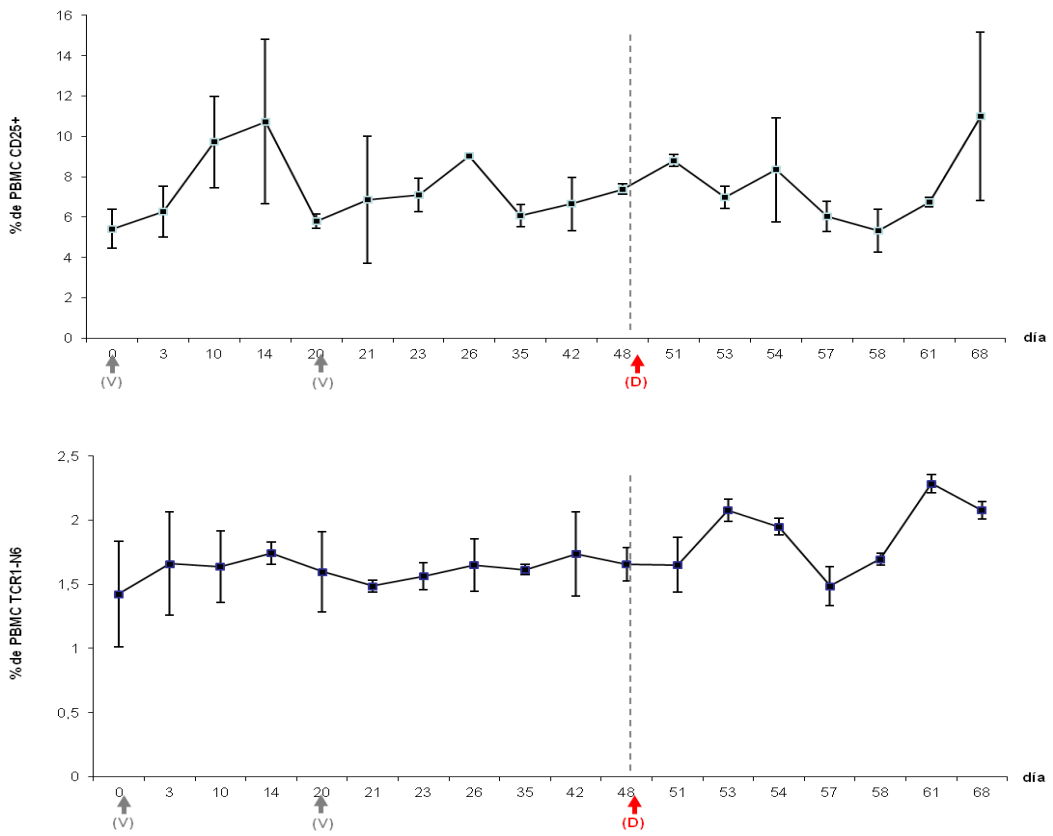


Figura 55. Grupo B: porcentajes de PBMC que pertenecen a las poblaciones CD25$^+$ y γδ TCR1-N6$^+$. (V) vacunación, (D) desafío.

Tanto en los animales estudiados del grupo A como en los del B, no se observaron variaciones relevantes en las poblaciones de linfocitos TCD4$^+$ y TCD8$^+$, monocitos CD14$^+$ o linfocitos B, ni tras las vacunaciones ni tras el desafío con el virus.

IV.2.4.2. VACUNA COMERCIAL INACTIVADA

Las diferencias entre los porcentajes de las poblaciones de PBMCs en diferentes fechas a lo largo del experimento, con respecto a los valores pre-vacunación (día 0), fueron analizados mediante un modelo lineal general de medidas repetidas de tipo ANOVA con la corrección H-F (Huynh-Feldt).

Entre los días 14 y 21, el porcentaje de células CD4$^+$ descendió significativamente, alcanzándose un valor mínimo de 21.7% el día 14 (**Figura 56**). Posteriormente, dicho porcentaje se recuperó hasta alcanzar niveles pre-vacunación. Tras el desafío, el porcentaje de CD4$^+$ experimentó otro descenso significativo entre los días 51 y 53, alcanzándose el valor mínimo post-desafío (22.7%) el día 53 del experimento. A partir de esta fecha los niveles volvieron a valores pre-vacunación hasta el final del experimento.

El porcentaje de células CD8$^+$ no presentó variaciones tras la vacunación o la revacunación. Sin embargo, se produjo un aumento significativo a partir del día 57 alcanzando los valores máximos entre los días 62 y 68.

El porcentaje de linfocitos T-γδ marcados con el anticuerpo anti-WC1$^+$ no varió significativamente respecto a los valores pre-vacunación a lo largo del experimento.

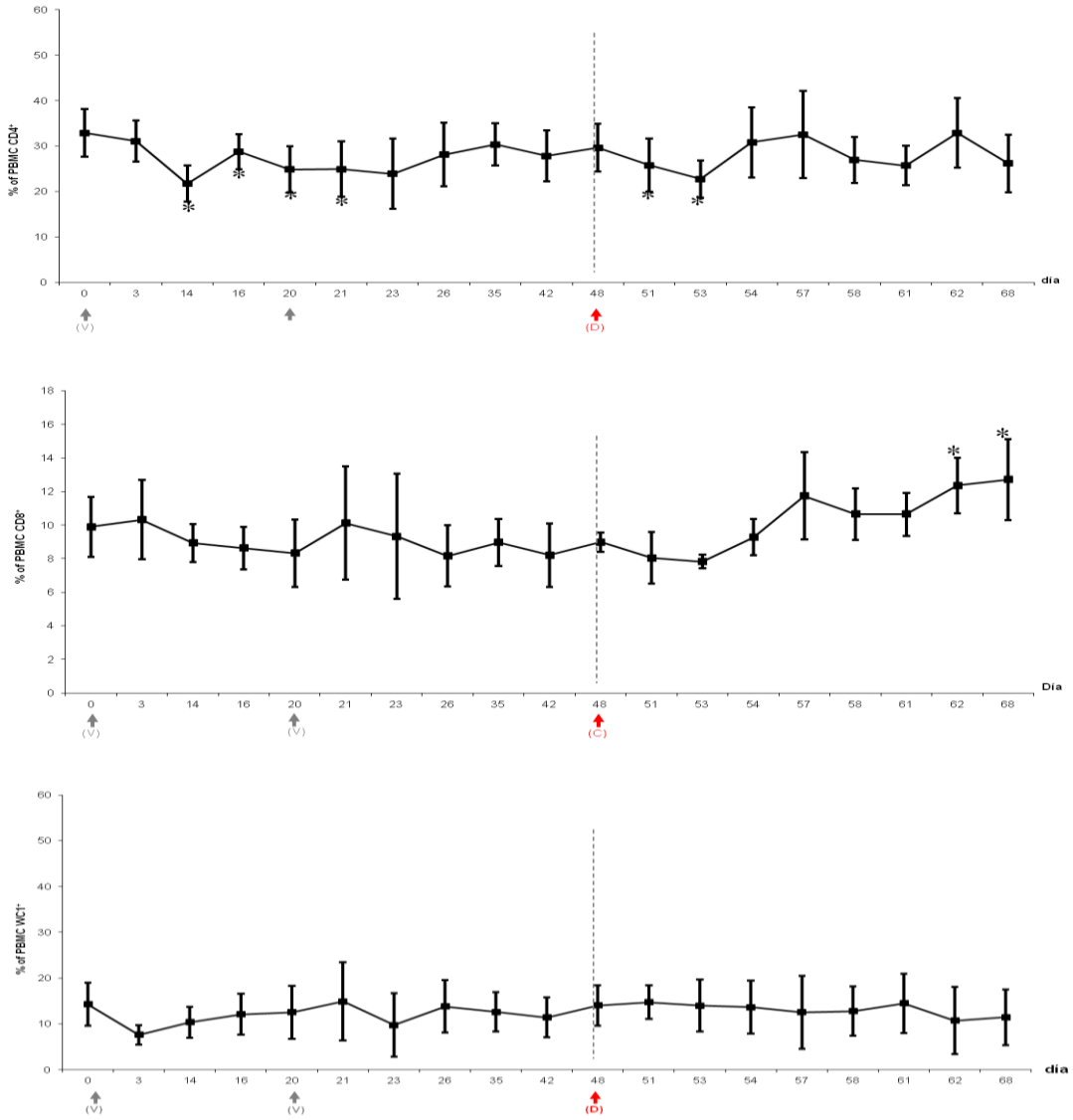


Figura 56. Evolución del porcentaje medio de PBMC CD4$^+$, CD8$^+$ y WC1$^+$ en el grupo D. (V) vacunación, (D) desafío.

Tras la vacunación (día 14), se produjo un ligero incremento no significativo en el porcentaje de células CD25$^+$ (**Figura 57**). Dicho porcentaje no mostró variaciones significativas tras la revacunación. Sin embargo, tras el desafío todos los animales del grupo mostraron un aumento en el porcentaje de células CD25$^+$, incremento que sería significativo entre los días 54

y 57, fechas en las que se alcanzaron los niveles máximos (día 54, 31.2%). Posteriormente los niveles descendieron progresivamente y volvieron a valores pre-vacunación hacia final del experimento.

El porcentaje de linfocitos B disminuyó significativamente tras la vacunación, alcanzándose los porcentajes más bajos de linfocitos B (15.4%) a los 14 días del experimento. Posteriormente, se produjo un aumento significativo entre los días 16 y 21, así como tras la revacunación entre los días 35 y 48. Tras el desafío, el porcentaje aumentó ligeramente, mostrando un incremento significativo el día 58.

El porcentaje de monocitos marcado por el anticuerpo anti-CD14^{+} no varió significativamente tras la vacunación o la revacunación. En cambio, tras el desafío se produjo un aumento significativo alcanzándose porcentajes del 10.28% el día 57. Posteriormente, dichos porcentajes disminuyeron hasta alcanzar valores pre-vacunación entre los días 62 y 68.

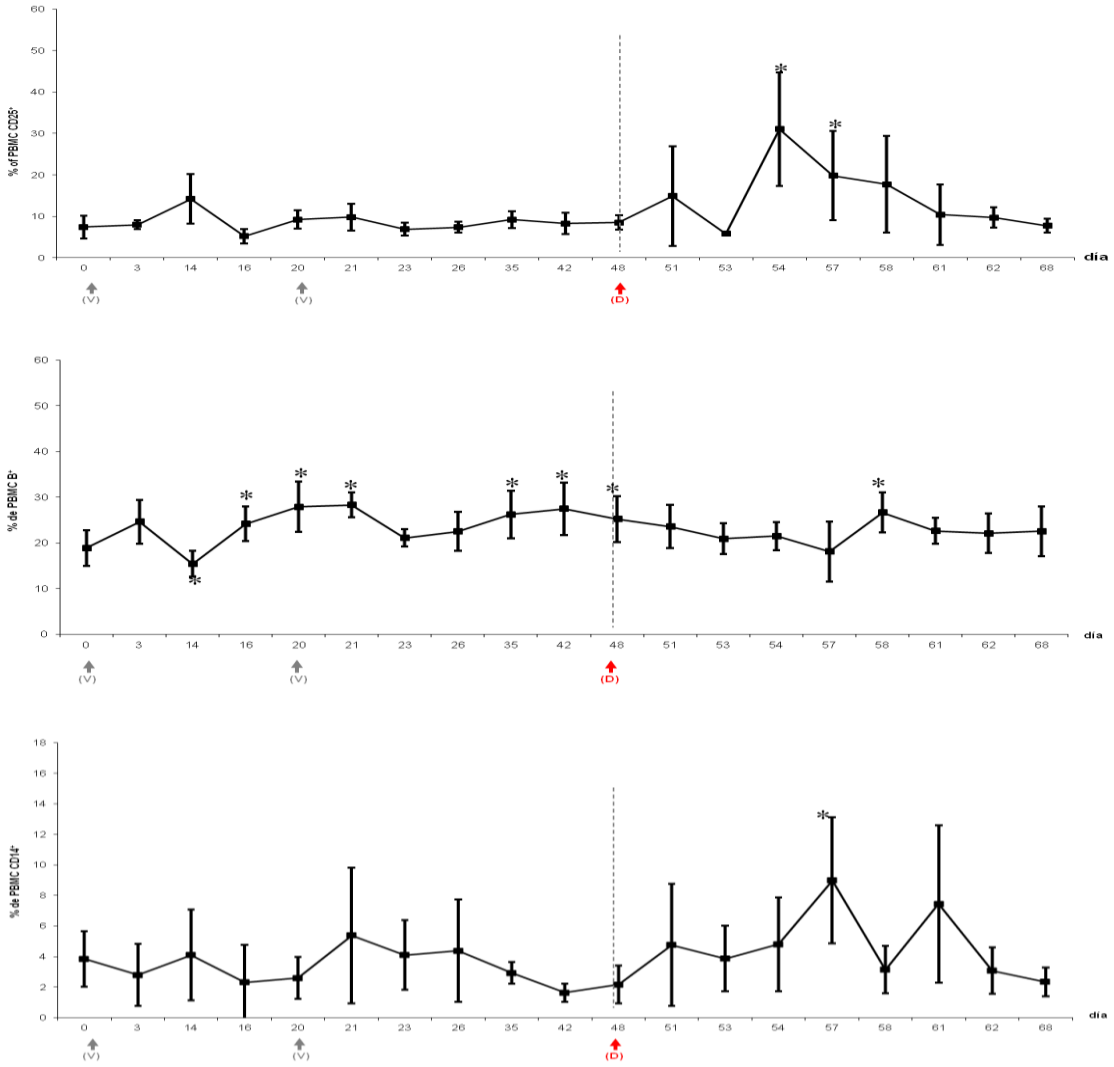


Figura 57. Se muestra la evolución del porcentaje medio de PBMC CD25^{+}, linfocitos B y CD14^{+} en el grupo D. (V) vacunación, (D) desafío.

IV.2.4.3. ANIMALES DESAFÍADOS NO VACUNADOS.

Los animales 1E y 2E fueron los controles elegidos para estudiar la evolución de las poblaciones de células del sistema inmune. Sólo tras el desafío con el virus LA1, se observaron algunas variaciones reseñables en los porcentajes de linfocitos CD4$^+$, destacando un ligero aumento a los 54 días, seguido de un descenso progresivo a partir del día 58, hasta alcanzarse los porcentajes más bajos hacía el final del experimento (**Figura 58**). Similar comportamiento se observó en el porcentaje de linfocitos TCD8$^+$ y T-γδ TCR1-N6$^+$, los cuales alcanzaron sus valores más elevados a los 57 y 54 días respectivamente, para a continuación disminuir progresivamente hasta el final del experimento.

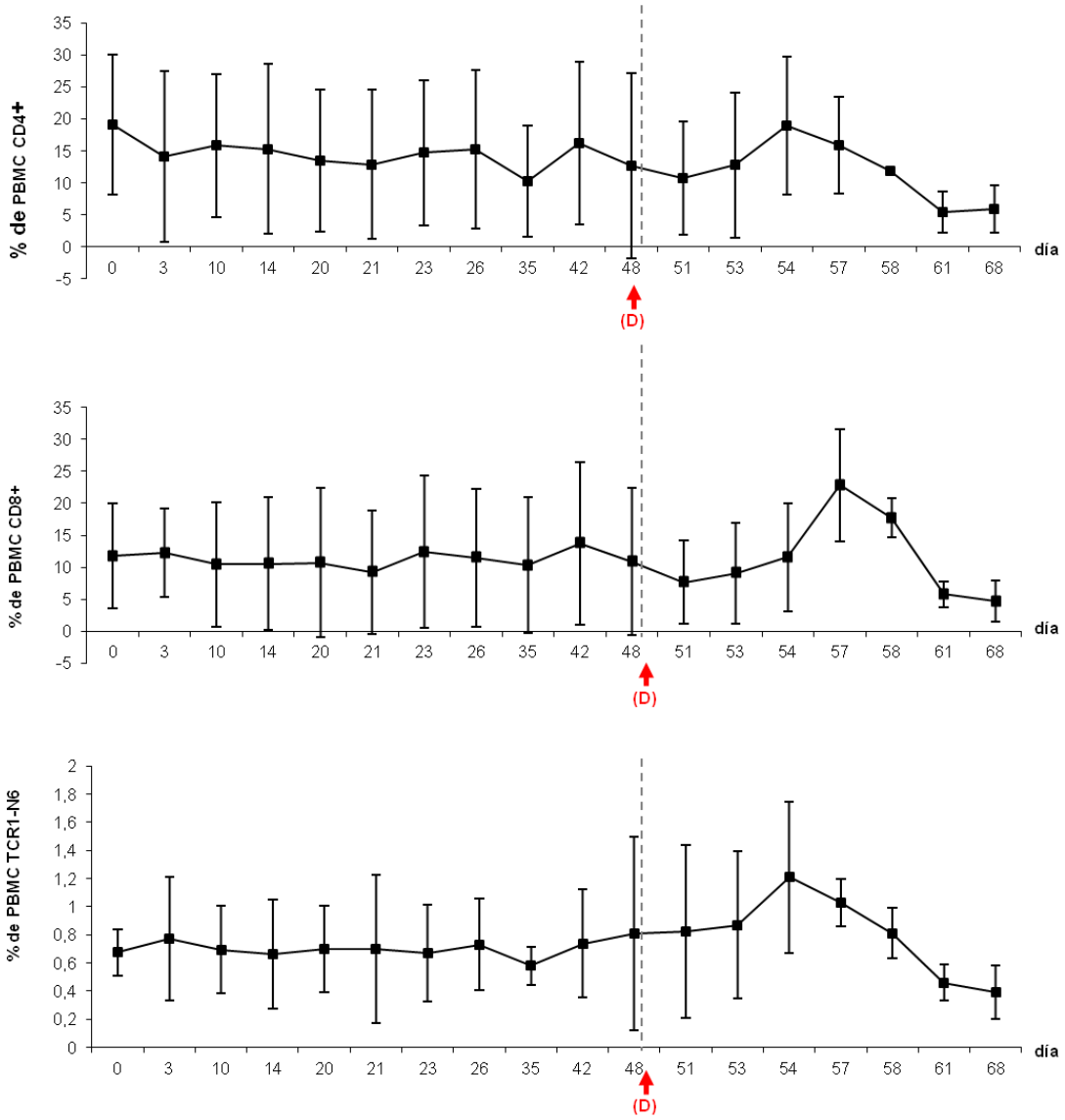


Figura 58. Grupo E: porcentajes de PBMC que pertenecen a las poblaciones CD4$^+$, CD8$^+$y γδ TCR1-N6$^+$. (D) desafío.

En este grupo no se observaron variaciones destacables en las poblaciones de linfocitos CD25$^+$, monocitos (CD14$^+$) ni linfocitos B (**Figura 59**).

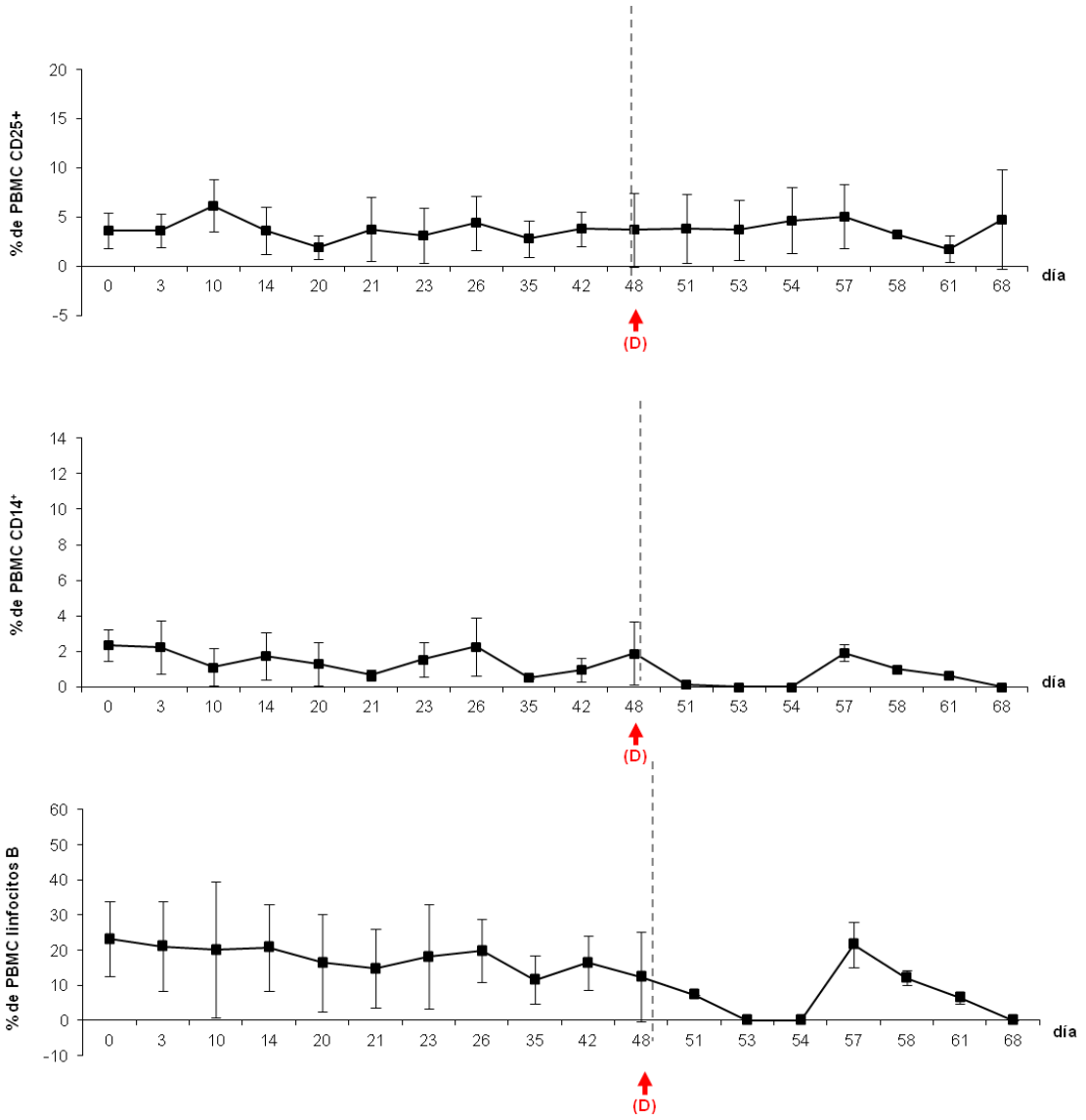


Figura 59. Grupo E: porcentajes de PBMC que pertenecen a las poblaciones CD25$^+$, CD14$^+$y linfocitos B. (D) desafío.

IV.2.5.DETECCIÓN DE ANTICUERPOS FRENTE A VP7

Los resultados de los ensayos de ELISA realizados, permitieron analizar la evaluación en la producción de anticuerpos a lo largo del ensayo. Estos resultados indicaron el momento en el que se produjo la seroconversión tanto en los animales vacunados como en los no vacunados.

IV.2.5.1. ELISA DE COMPETICIÓN

IV.2.5.1.1. VACUNA VLP

Al analizar los valores medios para el grupo A obtenidos con el ELISA de competición, se observó presencia de anticuerpos a partir del día 35 (**Figura 60**). En este grupo, la oveja 2A no mostró respuesta de anticuerpos detectable hasta el día 58.

Los resultados del grupo B fueron similares a los del grupo A, detectándose una respuesta en forma de anticuerpos desde el día 35.

En el grupo C también se detectó la respuesta de anticuerpos a partir del día 35. En este grupo el animal 5C mostró un resultado dudoso el día 35, siendo positivo el día 42.

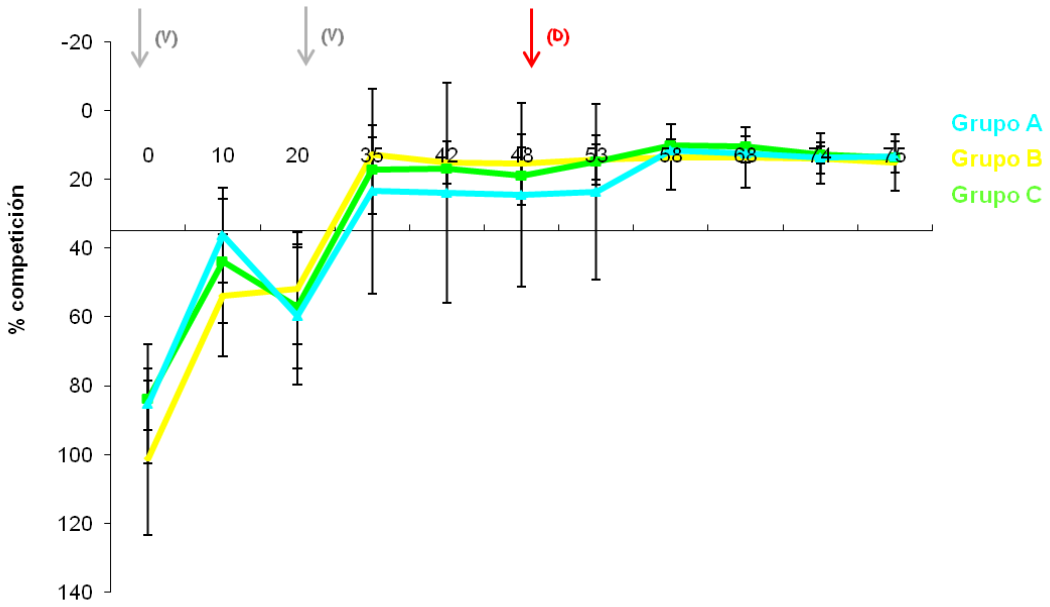


Figura 60. Representación de los resultados obtenidos en el ELISA de competición para los grupos A, B y C. Los valores situados por encima del eje X son los valores positivos que indican presencia de anticuerpos en la muestra. (V) vacunación, (D) desafío.

IV.2.5.1.2. VACUNA COMERCIAL INACTIVADA

Los animales del grupo D mostraron respuesta de anticuerpos a partir de los 35 días. Sin embargo, no fue posible la detección de anticuerpos específicos frente al virus de la LA mediante el ELISA de competición tras el primer muestreo post-desafío (día 53) (**Figura 61**).

Cabe destacar que el ELISA de competición empleado sólo permitió la detección de anticuerpos frente al virus LA el día del desafío, en 3 de los 5 animales de este grupo (1D, 3D, y 4D).

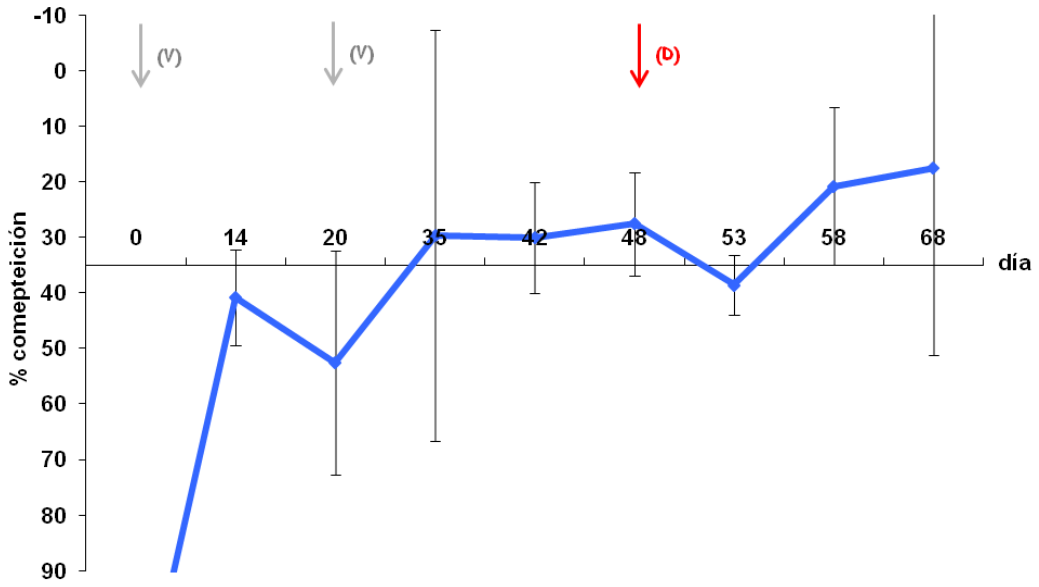


Figura 61. Representación de los resultados obtenidos en el ELISA de competición para el grupo D en conjunto. Los valores situados por encima del eje X son los valores positivos que indican presencia de anticuerpos en la muestra. (V) vacunación, (D) desafío.

IV.2.5.1.3. ANIMALES DESAFIADOS PERO NO VACUNADOS.

La respuesta de anticuerpos fue detectada en todos los animales del grupo E 10 días después del desafío (día 58). Sin embargo, dicha respuesta fue observada en un animal del grupo F a los 58 días, no siendo todos los animales del grupo F positivos hasta el día 68 (**Figura 62**).

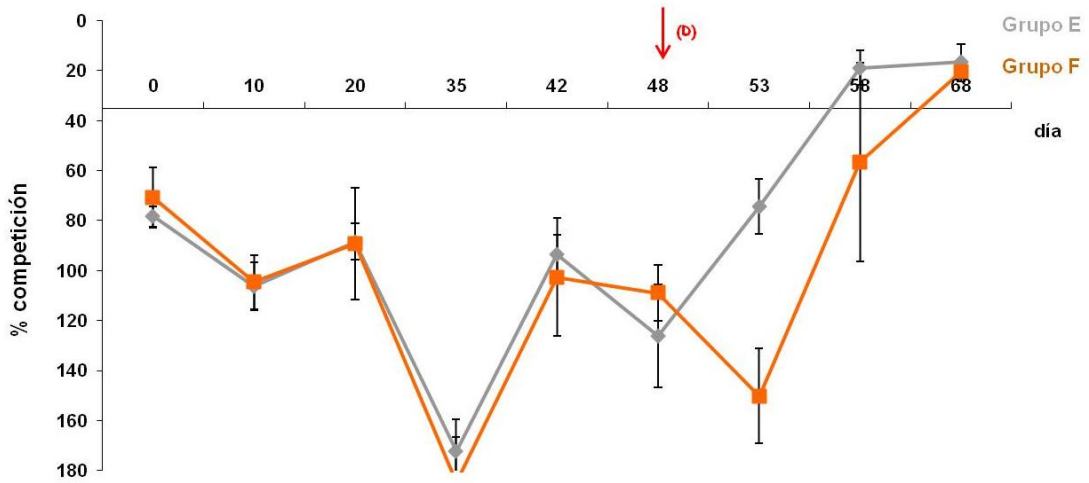


Figura 62. Representación de los resultados obtenidos en el ELISA de competición para los grupos E y F. Los valores situados por encima del eje X son los valores positivos que indican presencia de anticuerpos en la muestra. (D) desafío.

IV.2.5.2.ELISA DE DOBLE RECONOCIMIENTO

IV.2.5.2.1. VACUNA VLP

El análisis de los resultados obtenidos con la aplicación del ELISA de doble reconocimiento, mostró la presencia de anticuerpos anti-VP7 en los tres grupos de animales vacunados con VLPs (A, B y C) a partir de los 10 post-vacunación (**Figura 63**).

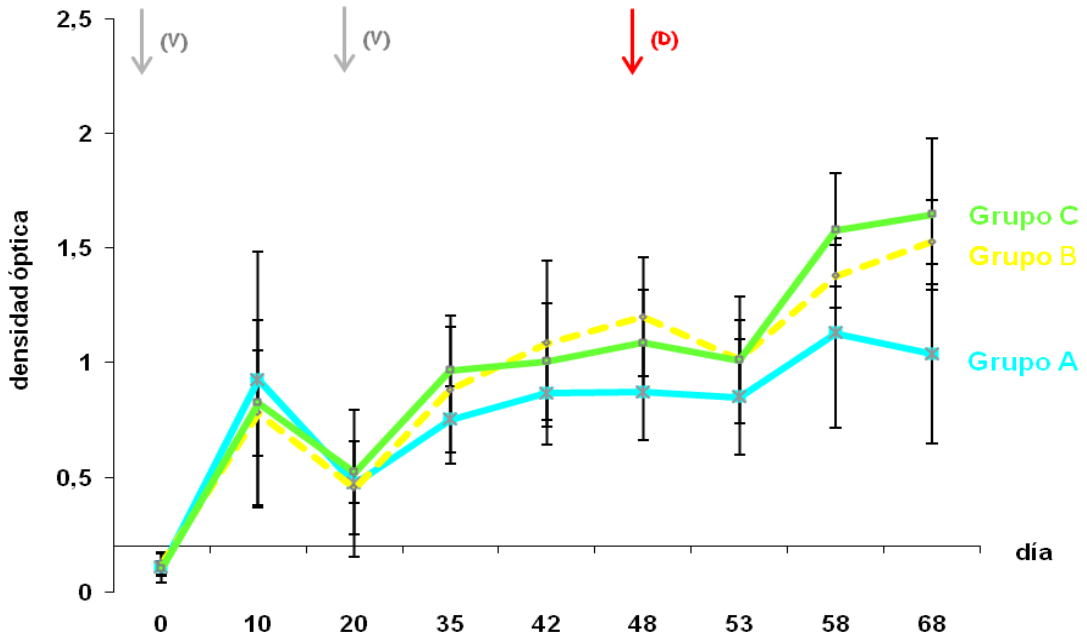


Figura 63. Representación de los resultados obtenidos en el ELISA de doble reconocimiento, para los grupos A, B y C. Se consideran positivos los valores de densidad óptica > 0.25. (V) vacunación, (D) desafío.

IV.2.5.2.2. VACUNA COMERCIAL INACTIVADA

La presencia de anticuerpos en los animales del grupo D fue detectada en todos los animales vacunados desde el día 14 hasta el final del experimento, alcanzando en esta fecha sus niveles más elevados, disminuyendo posteriormente de forma moderada para volver a incrementarse a partir del día 26. Desde esta fecha, los niveles de anticuerpos se mantuvieron relativamente constantes hasta el día 51. A partir de este día, y hasta el día 62, los valores volvieron a incrementarse, mostrando un ligero descenso solo al final del estudio (**Figura 64**).

Los valores medios obtenidos en cada etapa fueron comparados y analizados estadísticamente, no observándose diferencias significativas entre los niveles medios de anticuerpos detectados en la etapa post-vacunación (días 0-20) y la etapa post-revacunación (días 21-48). Tras el desafío, el nivel de anticuerpos aumentó significativamente respecto a los valores post-revacunación (**$P \leq 0.05$; Mann–Whitney *U*-test para distribuciones no paramétricas).

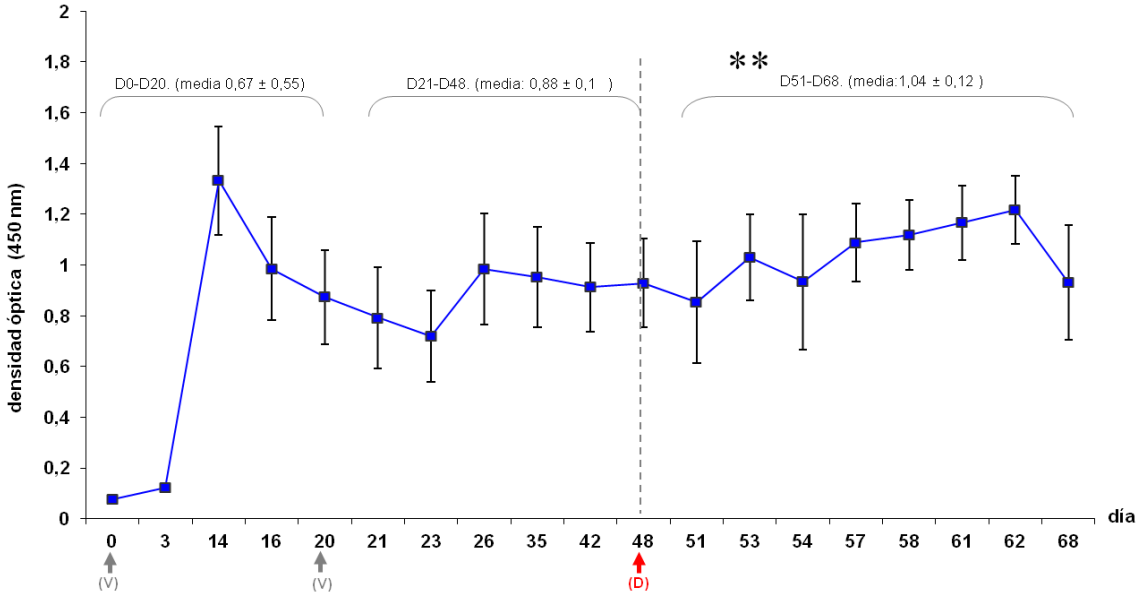


Figura 64. Representación de los resultados obtenidos en el ELISA de doble reconocimiento, para el grupo D. Se consideran positivos los valores de densidad óptica > 0.25. (V) vacunación, (D) desafío.

IV.2.5.2.3. ANIMALES DESAFÍADOS PERO NO VACUNADOS.

Atendiendo a los resultados del ELISA de doble reconocimiento, se observó que en los dos grupos de animales control (E y F) se detectó la presencia de anticuerpos anti-VP7 desde el día 58 (**Figura 65**).

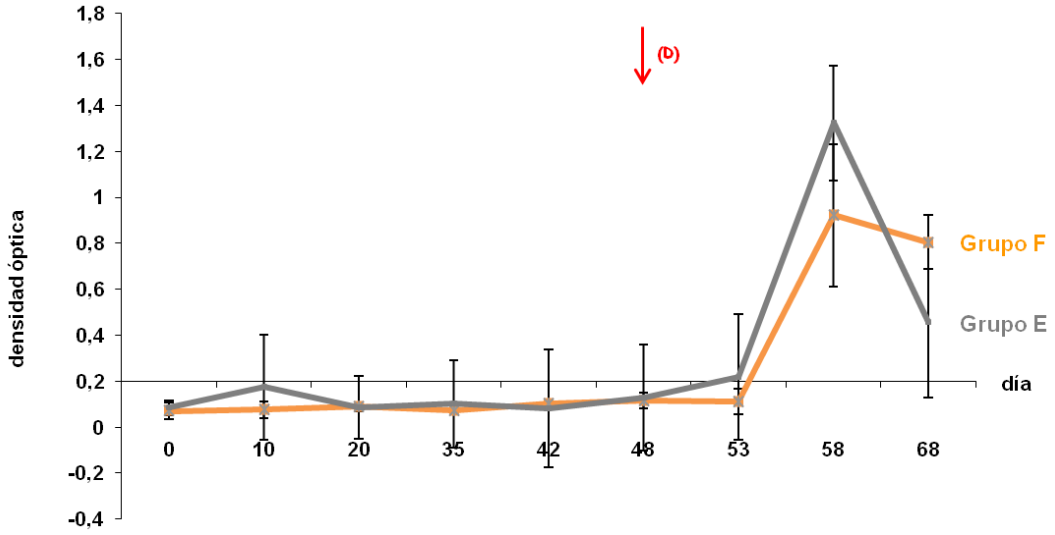


Figura 65. Representación de los resultados obtenidos en el ELISA de doble reconocimiento, para los grupos E y F. Se consideran positivos los valores de densidad óptica > 0.25. (D) desafío.

IV.3.COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS DISTINTOS GRUPOS.

A continuación se exponen los valores medios de cada uno de los grupos a lo largo del experimento para la temperatura rectal (**Figura 66**), la sintomatología (**Figura 67**), la detección de ARN vírico en sangre (**Figura 68**), así como las diferentes citoquinas (**Figuras 69 - 73**) y poblaciones celulares del sistema inmune (**Figuras 74-78**) y la presencia de anticuerpos (**Figura 79**).

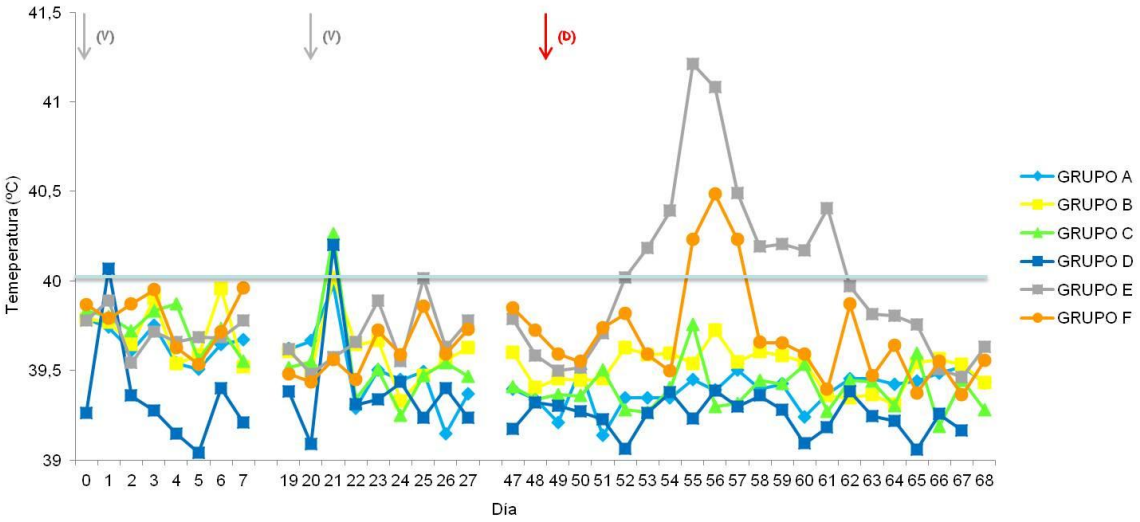


Figura 66. Representación de la temperatura rectal media de cada uno de los grupos. (V) Vacunación, (D) desafío.

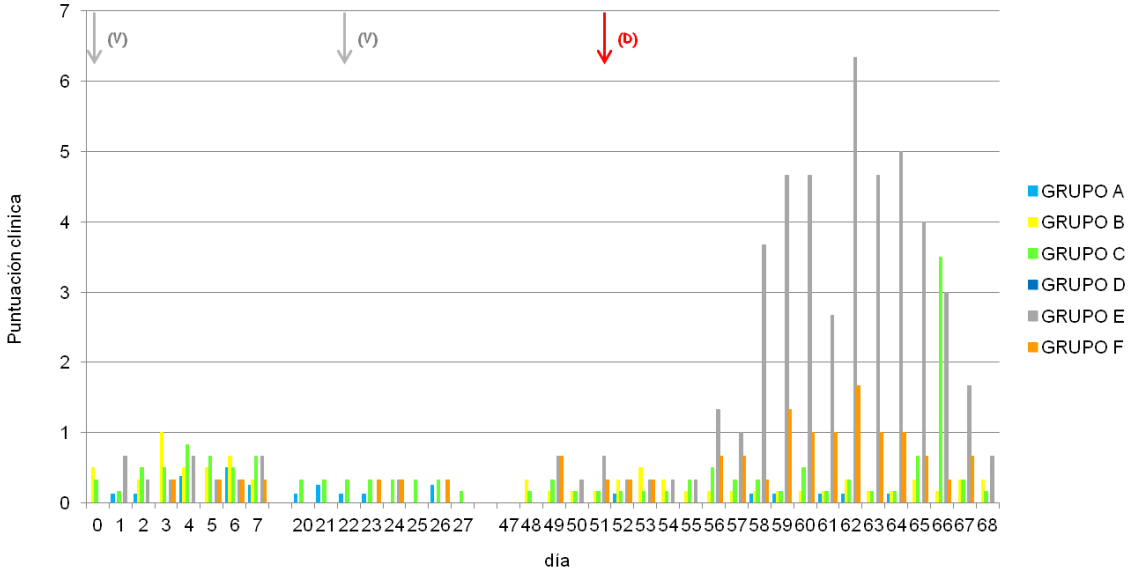


Figura 67. Representación de puntuación de la sintomatología media observada en cada uno de los grupos. (V) Vacunación, (D) desafío.

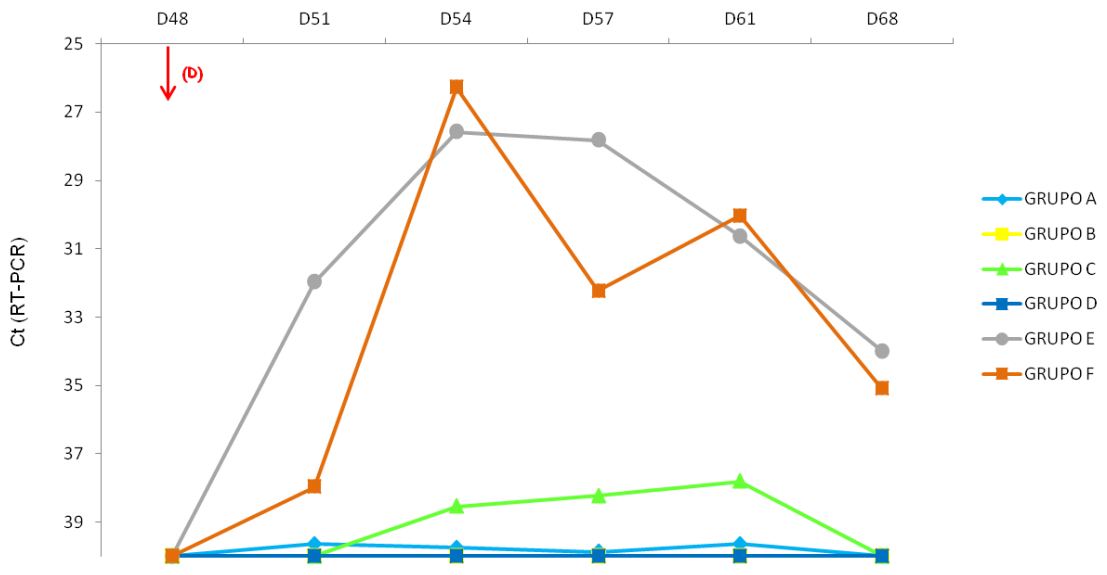


Figura 68. Representación de los Cts. obtenidos en la RT-PCR para detección de ARN vírico desde el día del desafío (D).

La comparación de la evolución del IFNγ, mostró un aumento en la expresión de esta citoquina tras la vacunación en el grupo A y tras el desafío en el grupo F (**Figura 69**).

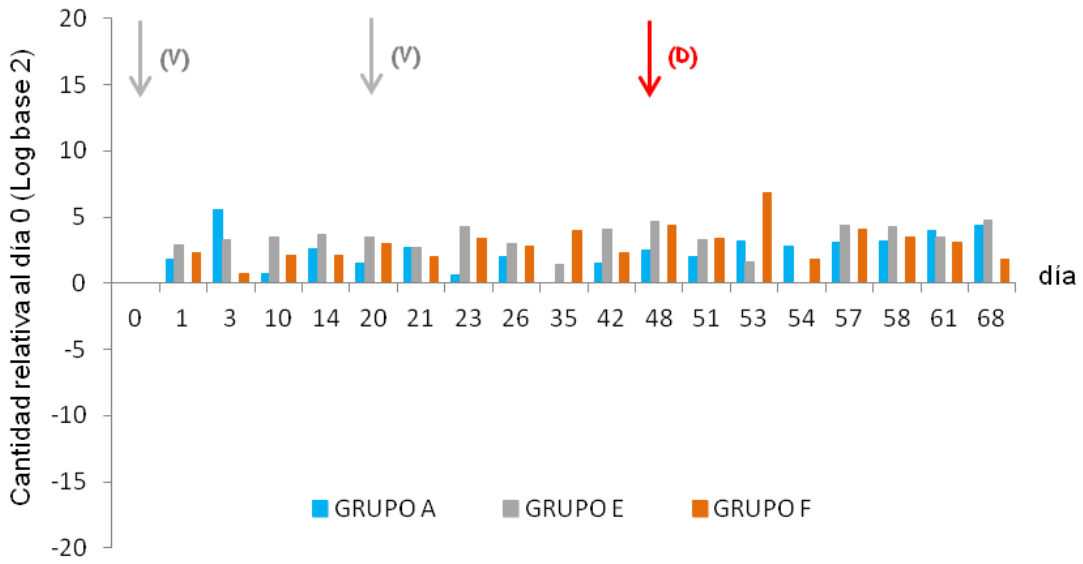


Figura 69. Representación de la cuantificación relativa media de la expresión de IFNγ en cada uno de los grupos. (V) Vacunación, (D) desafío.

La comparación de la expresión del TNFα mostró que los dos grupos desafiados con LA4 (grupos C y F) sufrieron un aumento en la expresión de esta citoquina el día 53, como consecuencia del desafío (**Figura 70**).

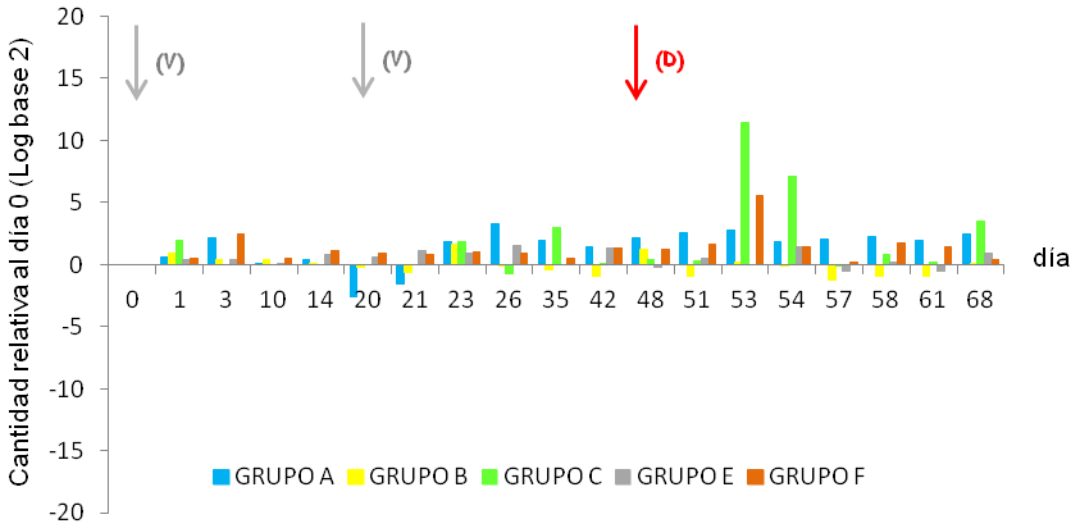


Figura 70. Representación de la cuantificación relativa media de la expresión de TNFα en cada uno de los grupos. (V) Vacunación, (D) desafío.

La evolución de la IL2 fue diferente dependiendo de cada grupo, de manera que mientras la VLP monovalente (grupo A) estimula la IL2 tras cada vacunación, en el caso de la vacuna bivalente solo se estimula en el grupo C tras la primera dosis vacunal. El desafío produjo un incremento en la expresión de esta citoquina en todos los grupos, pero en diferentes días y cantidades (**Figura 71**).

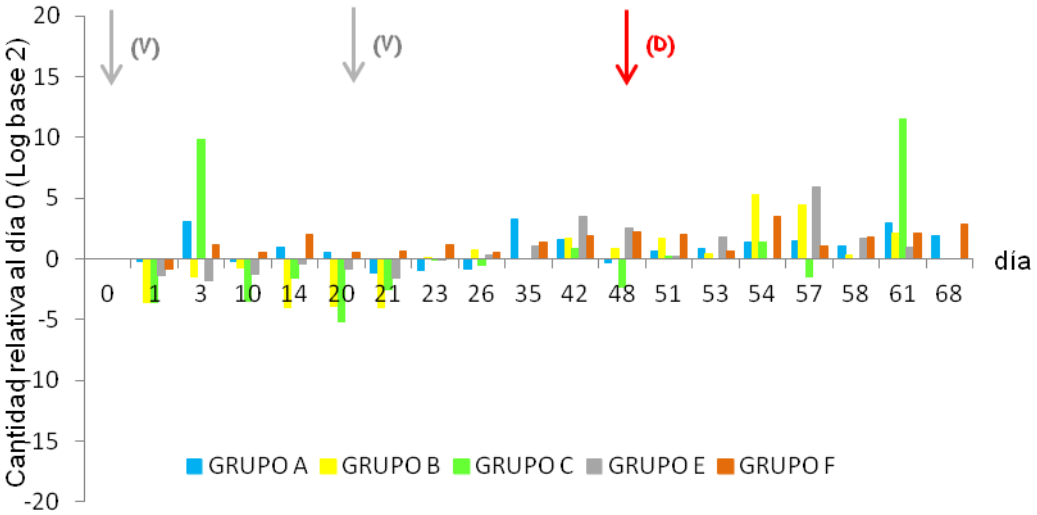


Figura 71. Representación de la cuantificación relativa media de la expresión de IL2 en cada uno de los grupos. (V) Vacunación, (D) desafío.

La IL10 mostró niveles inferiores a los basales, tras la vacunación y revacunación con VLP bivalente (Grupos B y C), mientras que la evolución del grupo A presenta ligeros aumentos y descensos. Tras el desafío se observa aumento en la expresión de IL10 en los grupos B, C y E pero en diferentes momentos (**Figura 72**).

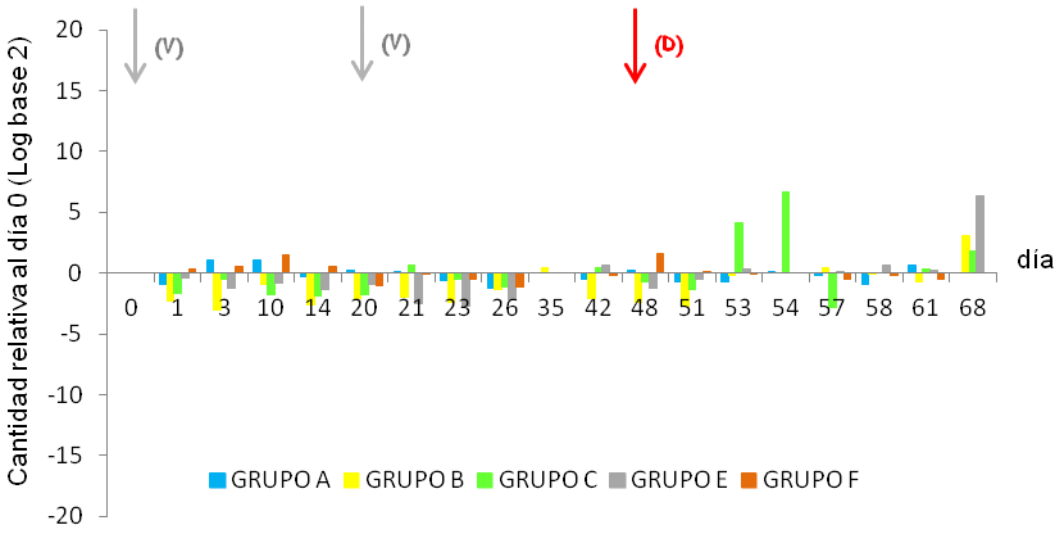


Figura 72. Representación de la cuantificación relativa media de la expresión de IL10 en cada uno de los grupos. (V) Vacunación, (D) desafío.

La vacunación con la VLP bivalente estimuló la expresión de IL12 en ambos grupos (grupos B y C), mientras que el desafío indujo un aumento en la expresión de IL12 en los dos grupos control (**Figura 73**).

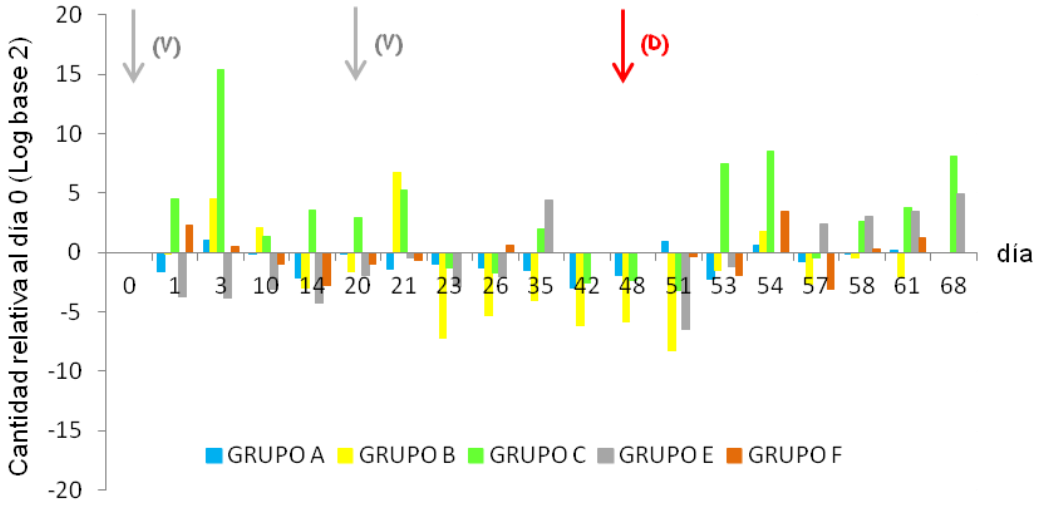


Figura 73. Representación de la cuantificación relativa media de la expresión de IL12 en cada uno de los grupos. (V) Vacunación, (D) desafío.

La evolución de los porcentajes de PBMCs, mostró que en el grupo control (Grupo E) se produjo un descenso en la población $CD4^+$ tras el desafío (**Figura 74**), coincidiendo con el descenso de las células $CD8^+$ (**Figura 75**).

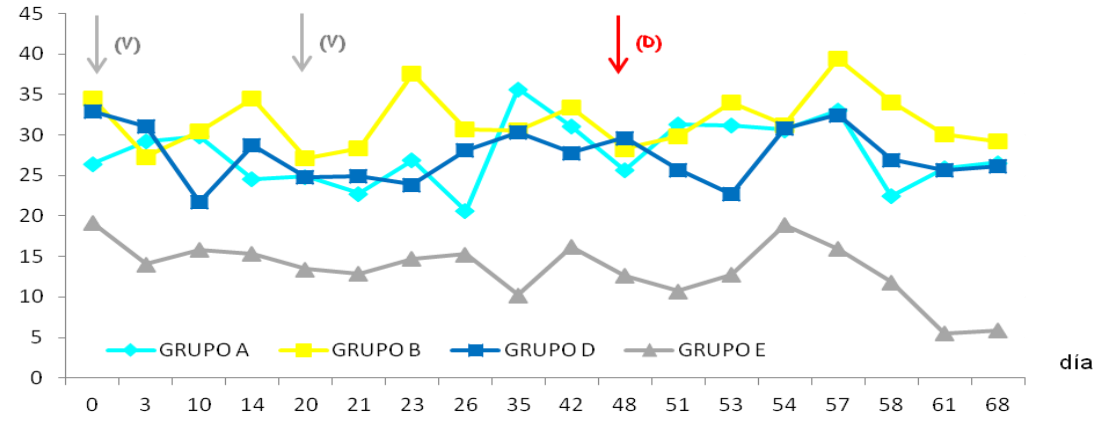


Figura 74. Representación de evolución de los porcentajes medios de PBMCs $CD4^+$, en cada uno de los grupos. (V) Vacunación, (D) desafío.* grupo D: días 10 y 14 en gráfico, son muestras de los días 14 y 16.

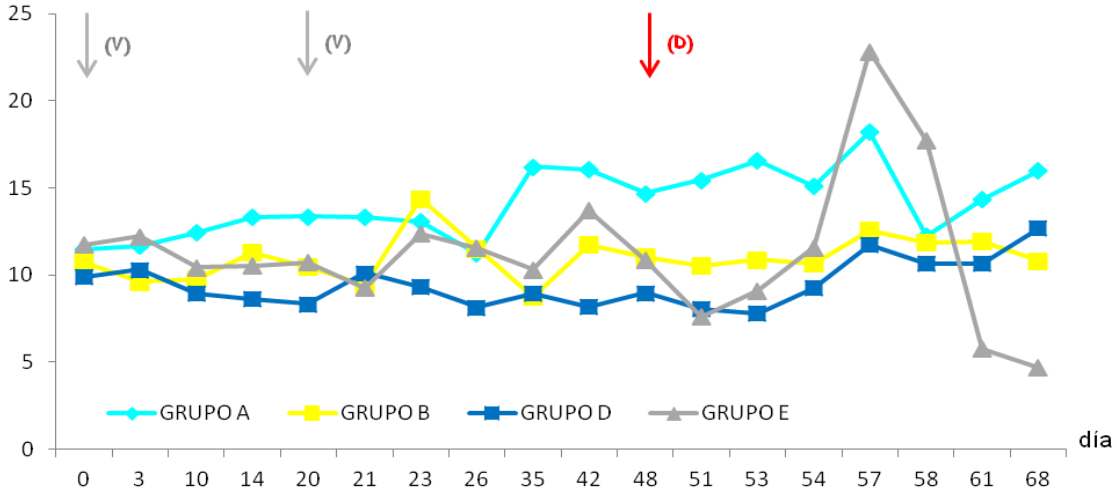


Figura 75. Representación de evolución de los porcentajes medios de PBMCs $CD8^+$, en cada uno de los grupos. (V) Vacunación, (D) desafío. * grupo D: días 10 y 14 en gráfico, son muestras de los días 14 y 16.

En lo referente a las células reguladoras $CD25^+$, se observa que la vacunación indujo un aumento en todos los grupos vacunados (grupos A, B y D). Además en el grupo D se observó el mayor aumento en esta población tras el desafío (**Figura 76**). Los linfocitos B aumentaron tras la primera vacuna en los grupos A, B y D, mostrando a lo largo del experimento una evolución variable (**Figura 77**).

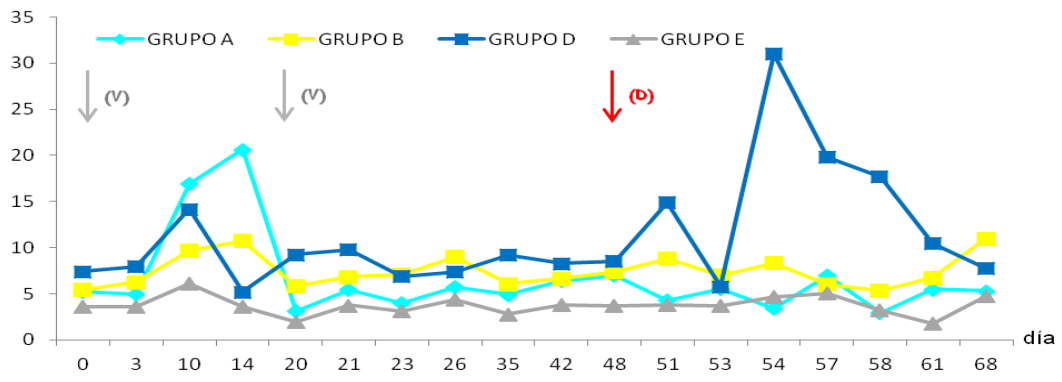


Figura 76. Representación de evolución de los porcentajes medios de PBMCs CD25^{+}, en cada uno de los grupos. (V) Vacunación, (D) desafío. * grupo D: días 10 y 14 en gráfico, son muestras de los días 14 y 16.

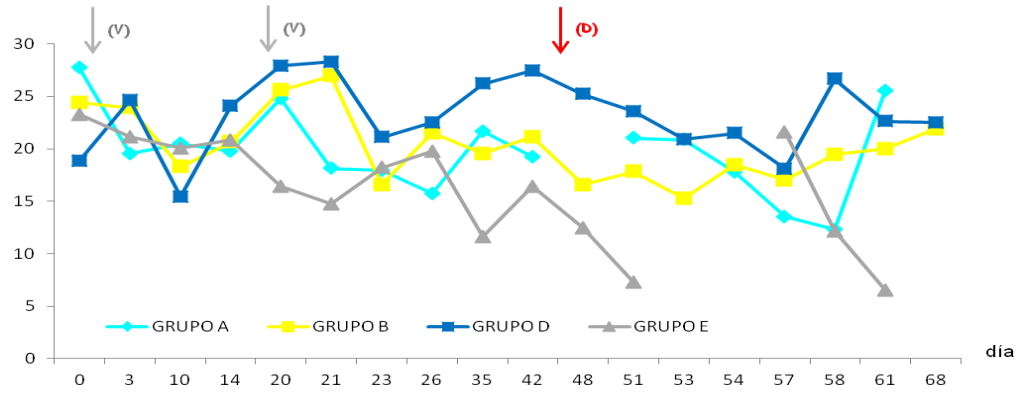


Figura 77. Representación de evolución de los porcentajes medios linfocitos B dentro de las PBMCs en cada uno de los grupos. (V) Vacunación, (D) desafío. * grupo D: días 10 y 14 en gráfico, son muestras de los días 14 y 16.

La vacunación con VLP monovalente indujo un aumento de los monocitos (CD14^{+}), mientras que en el resto de grupos, solo se observan ligeras variaciones pre-desafío (**Figura 78**).

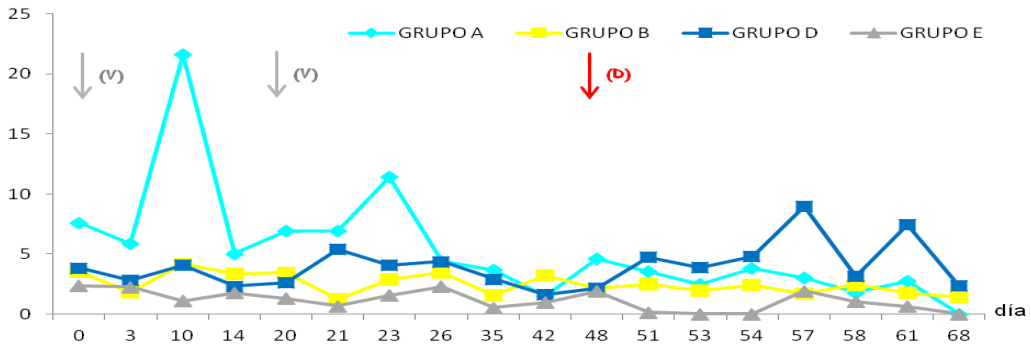


Figura 78. Representación de evolución de los porcentajes medios monocitos (CD14^{+}) dentro de las PBMCs en cada uno de los grupos. (V) Vacunación, (D) desafío. * grupo D: días 10 y 14 en gráfico, son muestras de los días 14 y 16.

La comparación de la presencia de anticuerpos detectados mediante ELISA de doble reconocimiento, muestra en todos los grupos vacunados resultados positivos tras la primera vacunación (**Figura 79**).

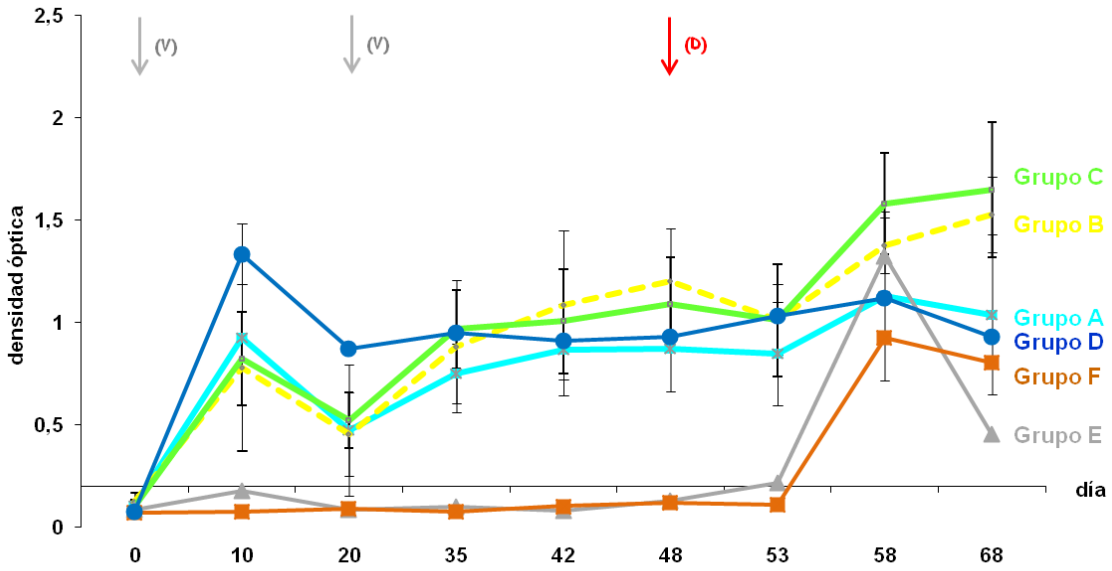


Figura 79. Representación de los resultados obtenidos en el ELISA de doble reconocimiento, para todos los grupos. Se consideran positivos los valores de densidad óptica > 0.25. (V) vacunación, (D) desafío.

V. DISCUSIÓN

Foto Discusión: “Black sheep” **(http://photography.nationalgeographic.com/photography/photo-of-the-day/black-sheep/)**

V.1. EXPERIMENTACIÓN *IN VIVO*

El ensayo *in vivo* se realizó a fin de evaluar la RI generada por diferentes vacunas, así como por los serotipos 1 y 4 del virus de la LA, en ganado ovino, concretamente en ovejas de raza Merina. Se trata de una raza especialmente sensible a la acción del virus de la LA (Maclachlan et al., 2009), siendo además una de las principales razas del sector ovino español, donde representa el 18% de la cabaña ovina, y constituyendo alrededor 20% del censo mundial ovino (ANCGM., 2011).

V.1.1.MONITORIZACIÓN DE LOS ANIMALES

En el transcurso de este experimento, los animales de cada grupo (grupos A, B, C y D) fueron vacunados y revacunados, siendo sometidos posteriormente a un seguimiento clínico a fin de evaluar la aparición de reacciones adversas, tanto locales como generalizadas, que pudieran aparecer como consecuencia de la vacunación. Dicha monitorización también se llevó a cabo en todos los grupos de animales, vacunados y no vacunados (grupos A, B, C, D, E y F), tras el desafío llevado cabo a los 48 días del experimento con virus virulento de serotipo homólogo. Los protocolos de vacunación, desafío y monitorización se establecieron siguiendo las pautas establecidas en trabajos previos con vacunas de tipo VLP (Pearson y Roy, 1993; Stewart et al., 2010).

V.1.1.1. REGISTRO DE LA TEMPERATURA RECTAL Y DE LA TEMPERATURA TERMOGRÁFICA

Diferentes guías de referencia enfocadas hacia el examen clínico del ganado ovino señalan que, una temperatura de 40ºC marcaría el límite entre la temperatura rectal fisiológica y la temperatura rectal patológica. De este modo, valores superiores a 40ºC serían indicativos de un estado febril de los animales (Ramos y Ferrer, 2007; MAF, 2009).

Los valores medios de temperatura rectal detectados en los animales del grupo A (vacuna monovalente VLP1), mostraron que ni la vacunación ni la revacunación indujeron fiebre, observándose sólo valores cercanos a los 40ºC poco después de la revacunación (día 21). En los grupos de animales vacunados con vacuna VLP bivalente (grupo B y C), la temperatura media evolucionó de manera similar, acercándose o sobrepasando sólo de forma puntual los 40ºC después de la revacunación (día 21). Dicho incremento puntual de temperatura tras la revacunación no había sido descrito hasta la fecha en ensayos previos con este tipo de vacunas VLPs, ni tras la vacunación ni tras la revacunación de ovejas (Stewart et al., 2010).

El incremento de temperatura observado en la mayoría de los animales del grupo D (vacuna inactivada frente al serotipo 1) tras la vacunación y revacunación, podría reflejar una activación/estimulación del sistema inmune. Aunque tradicionalmente se ha defendido la ausencia de reacciones tales como fiebre tras la aplicación de vacunas inactivadas (Savini et al., 2008), incrementos similares a los observados en nuestro estudio han sido descritos tras la administración de vacunas inactivadas frente a diferentes serotipos del virus de la LA (Gethmann et al., 2009; Steinrigl et al., 2010). Dichas vacunas poseen similares adyuvantes a los presentes en la vacuna administrada en nuestro ensayo y, pese a la ausencia de virus vivo en dichas vacunas, parecen poseer una gran capacidad de estimulación del sistema inmune desde etapas muy tempranas tras su administración. Dicha capacidad de estimulación podría atribuirse a los potentes adyuvantes presentes más que al propio virus, como se ha podido comprobar en otros ensayos donde, en ausencia de adyuvantes, el virus inactivado presente en la vacuna no fue capaz de inducir fiebre (Di Emidio et al., 2004).

Cabe destacar que tras el desafío al que fueron sometidos los animales de los distintos grupos vacunales (grupo A, B, C y D), salvo algunas excepciones individuales, no se apreció fiebre, estando dichos resultados en concordancia con los obtenidos en estudios previos tanto con vacunas VLPs como con vacunas inactivadas (Eschbaumer et al., 2009; Hamers et al., 2009; Stewart et al., 2010).

En los grupos de animales control no vacunados y desafiados frente al serotipo 1 (grupo E) y al serotipo 4 (grupo F), se apreció un marcado incremento de la temperatura que alcanzaría sus valores máximos entre los 7 y 9 días tras la inoculación, siguiendo un evolución similar a la descrita en el transcurso de inoculaciones experimentales con distintos serotipos (LA17, LA2, LA8) (Ellis et al., 1990; Hamers et al., 2009; Worwa et al., 2010). Los animales inoculados con el serotipo 1 mostraron un incrementó de temperatura en fechas más tempranas y alcanzaron valores más elevados, prolongándose durante un mayor periodo de tiempo que en el grupo de ovejas inoculadas con el serotipo 4. Dichas diferencias podrían atribuirse a las distintas vías de inoculación empleadas (intravenosa para el serotipo 1 e intradérmica para el serotipo 4). Sin embargo, trabajos recientes en las que un mismo serotipo (serotipo 23) fue inoculado en ovejas por ambas vías, puso de manifiesto un mayor incremento de la temperatura en los animales inoculados por vía intradérmica, hecho que podría ser atribuido a la similitud con la ruta de infección natural (Umeshappa et al., 2011b).

Por tanto, la mayor capacidad pirógena del serotipo 1 podría relacionarse con la mayor capacidad patógena de dicho serotipo, cualidad señalada en numerosos estudios (Allepuz et al., 2010), y que explicaría la elevada prevalencia de dicho serotipo en especies de vida salvaje (Garcia-Bocanegra et al., 2011), así como su enorme capacidad para difundirse por Europa (Wilson y Mellor, 2009) e inducir enfermedad en especies rumiantes (cabras, alpacas, llamas) cuya sensibilidad había sido subestimada (Meyer et al., 2009).

La TI es una herramienta ampliamente utilizada en ciencias veterinarias para la detección de fiebre en animales de producción. Así, la TI ha sido empleada para la detección de lesiones del aparato locomotor en caballos (Turner, 1991; Eddy et al., 2001), vacuno (Nikkhah et al., 2005), así como para la evaluación de lesiones en piel causadas por sarna sarcóptica en rumiantes de vida salvaje (Arenas et al., 2002). Otros estudios han empleado dicha técnica para la detección temprana de animales de producción afectados por diferentes procesos víricos mediante el análisis facial (Schaefer et al., 2007; Rainwater-Lovett et al., 2009).

A la hora de realizar estudios con esta herramienta enfocados a la detección de fiebre, es fundamental tener en cuenta que distintos parámetros externos pueden alterar los resultados (Gerss-Dülmer et al.). La estandarización de la toma de imágenes con la cámara infrarroja en un ambiente controlado, como el existente en el interior de las instalaciones de bioseguridad donde se llevó a cabo nuestro estudio, influiría favorablemente en la buena correlación existente entre las técnicas de medición de la temperatura empleadas en este trabajo, así como en la sensibilidad y especificidad de la TI. Por tanto, cualquier factor ambiental que pudiera influir en la temperatura corporal de los animales quedó descartado. Así, los cambios observados durante el experimento serían atribuibles a variaciones reales en la temperatura de los animales inducidas por la vacuna inactivada o por los distintos serotipos del virus de la LA.

El objetivo del empleo de la TI fue el de determinar su posible uso para la detección de casos febriles inducidos por el virus de la LA siguiendo para ello las pautas marcadas en estudios previos en los que se detectó fiebre en bovinos afectados con el síndrome respiratorio bovino (Schaefer et al., 2007). El análisis de las imágenes termográficas obtenidas y su comparación con las temperaturas rectales (grupos D, E y F), determinaron la existencia de una correlación entre la temperatura termográfica y la rectal. Dicha correlación nos muestra la potencial capacidad de la TI como método para la detección de animales febriles afectados por el virus de la LA. Además, se muestra como una técnica excelente para su uso tanto en granjas centinelas como para la detección de fiebre en animales de vida libre, dado que se suprime la necesidad de manipular a los animales para la toma de temperatura, reduciéndose además el estrés generado (Grandin, 1997).

La correlación observada fue muy variable entre grupos. Destacó el hecho de que en el grupo donde se detectó un mayor número de mediciones de la temperatura rectal, con valores superiores a los 40 ºC (un total de 20), fue además el grupo que presentó un mayor coeficiente de correlación (grupo E, r: 0.85). En cambio, en los otros dos grupos donde se llevaron a cabo mediciones para establecer dicha correlación (grupo D y F), el número de mediciones de la temperatura rectal con valores superiores a los 40 ºC fue menor (un total de 9 en el grupo F y sólo 7 en el grupo D). Por tanto, a mayor número de valores de temperatura superiores a 40 ºC

mayor correlación, siendo dicha correlación mayor cuando se presentan casos de fiebre que cuando los valores de temperatura se aproximan a valores fisiológicos. Por tanto, dado que el principal objetivo perseguido con el uso de esta herramienta fue el posible uso de la TI para la detección de casos de fiebre inducidos por el virus de la LA, y no la detección de animales sanos con valores cercanos a los fisiológicos, queda demostrado su potencial uso para dicho fin.

Los niveles de sensibilidad y especificidad que mostró la TI para la detección de animales febriles infectados con el virus de la LA fueron bajos. Sin embargo, estos resultados han servido como base en un posterior estudio con animales infectados experimentalmente con el virus de la LA (Pérez de Diego, 2011), en el que se han llevado a cabo un mayor número de mediciones que en el transcurso de nuestro experimento. En dicho estudio, se ha podido establecer mediante TI, en condiciones ambientales controladas, los casos de fiebre por LA con una sensibilidad del 82% y una especificidad de 90%. Por tanto, estos resultados corroborarían el potencial de la TI para la detección de fiebre en animales afectados por la LA.

V.1.1.2. SEGUIMIENTO CLÍNICO Y LESIONES

Aunque la aparición de reacciones locales tras la administración tanto de vacunas VLPs como con la vacuna inactivada ha sido descrita (Savini et al., 2007; Savini et al., 2008; Gethmann et al., 2009), dichas reacciones no fueron observadas en ninguno de los animales empleados en nuestro estudio. Este hecho podría atribuirse a las medidas higiénicas tomadas durante la vacunación (limpieza y desinfección con alcohol al 70% del área de aplicación de la vacuna, uso de agujas desechables tras cada aplicación), y a que la zona de inoculación elegida en cada caso se correspondió con áreas de piel sin lana o con la lana muy corta.

Coincidiendo con estudios previos (Di Emidio et al., 2004; Eschbaumer et al., 2009; Stewart et al., 2010), en ninguno de los grupos vacunales (grupo A, B, C y D) se observó sintomatología clínica característica de LA tras la vacunación, revacunación o desafío con la excepción de una animal perteneciente al grupo C. Dicho animal fue vacunado con la vacuna VLP bivalente para los serotipos 1 y 4. Tras el desafío con el serotipo 4, dicho animal desarrolló una forma aguda de enfermedad con sintomatología característica de LA que provocó su muerte. Cabe destacar que ninguno de los animales no vacunados del grupo control (grupo F) y desafiados con el serotipo 4, desarrollaron una sintomatología tan grave como la observada en este animal, no produciéndose la muerte de ninguno de ellos. La excepcional muerte de dicho animal pudo ser debida a factores individuales no determinados que afectaran negativamente en la generación de una RI protectora, ya que tanto las pautas seguidas durante la vacunación como durante el desafío fueron similares a las aplicadas en los demás animales de su grupo.

En ambos grupos control (E y F), se observó sintomatología clínica típica de LA. La sintomatología fue variable no solo entre individuos del mismo grupo sino también entre ambos grupos, si bien no resultó sorprendente, pues la diferencia de sintomatología entre diferentes serotipos es de sobra conocida (Maclachlan et al., 2009). A pesar de que tradicionalmente no se ha considerado la relación existente entre el aumento de la temperatura y la gravedad de la sintomatología en el transcurso de la LA (Erasmus, 1975), nuestros resultados mostraron que aquellos animales con un mayor aumento de temperatura también presentaron mayor sintomatología, hecho que coincidió con los resultados apuntados en trabajos recientes (Worwa et al., 2010).

Las necropsias realizadas a 9 de los 20 animales vacunados con vacunas VLP (grupos A, B y C), salvo en una de las ovejas del grupo C (5C) que presentó lesiones características de LA (Maclachlan, 2011), no mostraron lesiones macroscópicas compatibles con esta enfermedad. Igualmente, ninguno de los 5 animales pertenecientes al grupo D, mostró lesiones macroscópicas reseñables. Salvo en el animal 5C, los posteriores estudios histopatológicos no revelaron la presencia de lesiones compatibles con LA.

En lo que se refiere a los grupos control (E y F), las lesiones tanto macroscópicas como histopatológicas características de LA (Worwa et al., 2010), fueron de moderada intensidad. Dichos animales fueron sacrificados al final del experimento en una fase de recuperación de la enfermedad, en la que la sintomatología clínica fue muy escasa o ausente, lo que influiría en la escasez de lesiones observadas.

V.1.2.DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS DEL VIRUS DE LA LENGUA AZUL

La ausencia de ARN vírico en sangre indica que no se ha producido viremia, mientras que la presencia de ARN vírico no siempre implica la presencia de viremia, ya que puede producirse un resultado positivo a RT-PCR sin que se pueda llevar a cabo el aislamiento del virus. De hecho, se han descrito resultados positivos a RT-PCR hasta 90 días después del último aislamiento vírico (Singer et al., 2001).

En los animales vacunados con vacunas VLP, la aplicación de la RT-PCR para la detección de ARN del virus de la LA, mostró la existencia de resultados positivos en 3 de los 20 animales empleados (2A, 5C y 6C) en algún momento puntual del experimento tras el desafío, fenómeno también descrito en trabajos previos tras el desafío de animales previamente inmunizados con VLPs (Savini et al., 2007). Sin embargo, nuestros resultados no estarían en línea con los obtenidos en un estudio reciente, en el que se apuntó la ausencia de virus en sangre en todos los animales vacunados con VLPs (Stewart et al., 2010). Como se ha señalado con anterioridad, la presencia de ARN vírico no implica la existencia de viremia (Katz et al., 1994). En consecuencia, la detección de ácidos nucleicos en varios animales vacunados

que no mostraron sintomatología clínica, como fue el caso de los animales 2A y 6C, sería atribuible al desafío pero no al desarrollo de enfermedad.

Por otro lado, no se detectó genoma vírico en ninguno de los animales del grupo D a lo largo del experimento. Estos resultados, acordes con trabajos previos (Di Emidio et al., 2004; Eschbaumer et al., 2009; Hamers et al., 2009; Oura et al., 2009; Paradell et al., 2010) ponen de manifiesto que la administración subcutánea de vacunas inactivadas no produce la aparición ARN vírico en sangre. Además, dichas vacunas previenen la replicación vírica tras el desafío con virus homólogo (Eschbaumer et al., 2009; Wackerlin et al., 2010) evitando así la diseminación del virus y la expansión de la enfermedad a partir de animales vacunados.

Aunque como ya hemos apuntado, un resultado positivo obtenido con la aplicación de la RT-PCR para la detección del virus de la LA no implica viremia, nuestros resultados demuestran que en aquellos animales donde los síntomas clínicos fueron más intensos (grupo E) se detectó una Ct menor tras la aplicación de la RT-PCR, lo que implicaría la existencia de mayor número de copias del ARN del virus en la muestra de sangre. Este hecho pone de manifiesto, de nuevo, la mayor capacidad patógena del serotipo 1 frente al serotipo 4, lo que explicaría que en todos los animales del grupo E (desafiados con el serotipo 1) se detectara el ARN vírico 3 días después del desafío, mientras que hubiera que esperar hasta 13 días después del desafío para encontrar positividad en todos los animales del grupo F (desafiados con el serotipo 4).

V.2. ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE

V.2.1. PUESTA A PUNTO DE LA RT-PCR PARA DETECCIÓN DE ARN QUE CODIFICA PARA CITOQUINAS

A la hora de afrontar el estudio del papel desempeñado por las citoquinas en el transcurso de la RI, se pueden emplear distintas técnicas para su detección como la citometría de flujo o diferentes técnicas de ELISA (Arora, 2002). Distintos estudios han empleado técnicas de ELISA para detectar y cuantificar citoquinas presentes en el suero en el transcurso de procesos infecciosos animales (Niborski et al., 2006; Flynn y Mulcahy, 2008; Li et al., 2010). Sin embargo, dichas técnicas requieren de anticuerpos específicos aplicables en la especie ovina, los cuales no estuvieron disponibles comercialmente al inicio de nuestro estudio. Además, la utilización de kits ELISA o anticuerpos desarrollados para la detección de citoquinas en otras especies, no garantizaba un resultado positivo al desconocerse la reactividad cruzada de los mismos (Cámara-Pellisó, 2007). El uso de la RT-PCR para la detección y cuantificación de la expresión de genes se presenta como una herramienta que ha cobrado gran importancia en los últimos años (Klein, 2002), siendo numerosos los estudios que han empleado dichas técnicas

con éxito no sólo sobre muestras de sangre, sino también sobre tejidos en el transcurso de distintos procesos patológicos (Montagne et al., 2001; Smeed et al., 2007; Wattegedera et al., 2010). Para la aplicación de dicha técnica, por tanto, no son necesarios reactivos específicos, pudiéndose desarrollar fácilmente nuevos protocolos de detección en los laboratorios convencionales, simplemente a partir de cebadores específicos fácilmente sintetizables.

Otro de los inconvenientes que presentan las técnicas de ELISA frente a la RT-PCR para la detección de citoquinas se refiere al hecho de que, con las técnicas de ELISA, no es posible comparar cantidades de diferentes citoquinas, no sólo por la posible diferencia de medición que presentan las técnicas de ELISA debidas, por ejemplo, a estandarizaciones diferentes según el kit, o a mediciones en diferentes unidades, sino también por la diferente afinidad y cantidad de receptores presentes en las células. Así, una citoquina producida en grandes cantidades también puede ser captada en grandes cantidades por su receptor celular, lo que dificultaría su detección, mientras que otra citoquina con menor producción y afinidad pueda presentar elevados niveles en suero (Wattegedera et al., 2010).

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que los cebadores empleados para la detección en bovino de β- Actina, IL2, IL10 e IL12 (Konnai et al., 2003) también se pueden utilizar en ovino; asimismo, aquellos descritos para la detección en ovino de GAPDH, TNFα, IFNγ e IL4 también permiten amplificar estas citoquinas en bovino (Gohin et al., 1997; Smeed et al., 2007). En conclusión, mientras que con el empleo de técnicas de ELISA necesitaríamos un anticuerpo específico para detectar cada citoquina en cada una de las especies, mediante la RT-PCR puesta a punto en nuestro trabajo es posible aplicar la misma herramienta para la detección y cuantificación de dichas citoquinas con independencia de la especie en la que se pretende estudiar (ovino y bovino).

V.2.1.1. OBTENCIÓN DEL ARN

La obtención del ARNm supone un paso clave en la cuantificación de la expresión de citoquinas, de modo que un protocolo de extracción mal ejecutado podría influir negativamente en la pureza del ARNm extraído debido a la existencia de fenómenos de degradación o a la presencia de inhibidores, afectando así al resultado final de la RT-PCR (Ho-Pun-Cheung et al., 2008).

Los amplicones que se obtienen tras la PCR pueden provenir tanto del ARNm que se está transcribiendo, y que posteriormente será traducido a proteínas, como directamente del ADN genómico (Crick, 1970). En ambos casos, el resultado de la PCR es positivo. La diferencia radica en el hecho de que en el genoma encontramos intrones y exones, de manera que si los cebadores se localizan en dos exones diferentes, el amplicón será de mayor tamaño (exones más intrones), mientras que en el caso de amplificar el ARNm dado que éste no

contiene intrones, sólo llevará a cabo la amplificación de los exones, lo que dará lugar a un amplicón de menor tamaño.

Para evitar este posible error de “contaminación” o de falta de pureza en el producto extraído de la muestra, existen dos estrategias a seguir. La primera consistiría en la utilización de cebadores localizados en diferentes exones, de manera que el tamaño del amplicón variará dependiendo de si sólo se están amplificando los exones de interés, o si por el contrario, se está amplificando algún intrón. En nuestro caso, sólo los cebadores para la detección de IL10 estuvieron situados en exones diferentes. En este caso, el amplicón de ARNm fue de 186 pb mientras que en caso de amplificar ADN genómico sería de más de 1000pb.

La segunda estrategia consiste en realizar un tratamiento con DNAsa durante la extracción de ARN, o bien una vez finalizada dicha extracción, siendo ésta última la práctica más común llevada a cabo en la mayoría de los protocolos a fin de digerir y eliminar los restos de ADN genómico. Dicho tratamiento al final de la extracción, necesita de la dilución de la muestra en un tampón de reacción de la DNAsa, lo que provoca una disminución de la concentración final del ARN. A fin de evitar dicha reducción de concentración, en nuestro estudio se optó por el uso de un kit de extracción de ARN comercial (RNeasy Mini Kit® de Quiagen) que incluía un paso intermedio de digestión con DNAsa. Una dilución de la concentración final del ARN, hubiera obligado al empleo de un mayor volumen de reacción durante la RT, lo que hubiera impedido el uso del kit comercial de RT que posteriormente fue utilizado.

Una vez comprobada la efectividad de la extracción de ARN mediante el uso del kit de columnas RNeasy mini kit de Quiagen a partir de linfocitos estimulados *in vitro*, se procedió a la extracción del ARNm a partir de sangre de ovejas. Las cantidades de ARN utilizadas para la realización de la RT-PCR, fueron variables a lo largo del periodo de puesta a punto de la técnica de RT-PCR, no siendo el objetivo principal durante dicho proceso la cuantificación, sino la adaptación de la RT-PCR cualitativa a las condiciones de nuestro laboratorio, así como la comprobación de la especificidad y la purificación de los amplicones para su secuenciación y almacenamiento como stock de controles positivos. Por tanto, las variaciones en las cantidades de ARN utilizado para cada reacción, no supuso un problema a la hora de interpretar los resultados.

Nuestros resultados demostraron que durante esta fase de puesta a punto, la estimulación de linfocitos *in vitro* con 10µg/ml de Con A indujo la expresión de genes de IL4, IL2 e IFNγ. Estos resultados estarían de acuerdo con los obtenidos en trabajos previos (Gohin et al., 1997), en los que se indicó que para la producción de estas citoquinas sería necesaria la utilización de Con A (7,5 µg/ml) junto con *Phorbol Triacetate* (5 ng/ml). Sin embargo, en muestro estudio sólo fue necesaria la utilización de Con A para la obtención de resultados similares. Por otro lado, trabajos previos habían demostrado que para la obtención de TNFα e

IL10, sería recomendable la aplicación como mitógeno de LPS (10 µg/ml) (Gohin et al., 1997), resultados que coinciden con los obtenidos en el presente trabajo. Asimismo, trabajos previos habían demostrado la inducción de la producción de IL12 utilizando únicamente LPS (Budhia et al., 2006). Nuestros resultados demostraron una estimulación en la expresión de IL12 mediante el uso combinado de Con A y LPS, no siendo necesaria la utilización de otros mitógenos, como el *pokweed mitogen* sugerida en estudios previos (Konnai et al., 2003).

V.2.1.2. RT-PCR EN DOS PASOS

Una vez comprobado que la técnica en un paso se mostraba como una herramienta específica que permitía la amplificación y por tanto la detección del ARNm que codificaba para las seis citoquinas estudiadas (TNFα, IFNγ, IL2, IL4, IL10, IL12), se procedió a la puesta a punto de la técnica de RT-PCR en dos pasos.

La utilización inicial de la técnica en un solo paso, previamente aplicada con éxito en nuestro laboratorio (Kukielka et al., 2008; Kukielka y Sanchez-Vizcaino, 2009) se debió al hecho de que éste procedimiento minimiza la contaminación de la muestra de ARNm. Tras la obtención de los primeros resultados positivos con la técnica anterior, se procedió a la realización de la técnica en dos pasos, ya que dicho procedimiento nos permitía realizar un mayor número de PCRs con la misma cantidad inicial de ARNm que la técnica en un paso. Así, a partir de 1µl de muestra inicial se podían llevar a cabo hasta 20 PCRs, mientras que en el caso de RT-PCR en un solo paso, 1µl de muestra inicial, sólo permitía la realización de una reacción de RT-PCR.

Los resultados obtenidos con la utilización de RT-PCRs en tiempo real llevadas a cabo con sonda inespecífica SYBR Green fueron satisfactorios, siendo comprobada la especificidad de las parejas de cebadores mediante la comparación de los productos de PCR con las secuencias publicadas en las bases de datos. La mayor ventaja del uso de la sonda SYBR Green radica en su coste, ya que se trata de una sonda más barata que las sondas específicas, pudiendo utilizarse para diferentes amplicones. Además, dicha sonda necesita unas parejas de cebadores de menor coste que las sondas específicas, siendo por lo general la utilización de un kit comercial de SYBR con cebadores específicos más rentable económicamente que la utilización de un kit comercial con sonda Taqman y cebadores.

En distintos trabajos previamente publicados se llevó a cabo el estudio de la expresión de citoquinas en ovino mediante RT-PCR convencional, empleándose sustancias altamente cancerígenas como el bromuro de etidio para comprobar la intensidad de la señal fluorescente emitida por las muestras en los geles (Gohin et al., 1997; Montagne et al., 2001; IPCS, 2006; Craig et al., 2007). Otros estudios recurrieron al empleo de sondas Taqman para el estudio de la expresión de genes que codifican para citoquinas, siendo dichas sondas altamente específicas, a la vez que costosas (Budhia et al., 2006; Wattegedera et al., 2010). Asimismo,

algunos trabajos han empleado la sonda SYBR Green a fin de estudiar la expresión de citoquinas a partir de tejidos (Smeed et al., 2007; Verret et al., 2011). Pese a que las muestras sobre las que se llevaron a cabo dichos estudios fueron distintas a las empleadas en nuestro trabajo, así como las citoquinas estudiadas, nuestros resultados estarían en línea con los obtenidos en estas investigaciones previas, poniendo así de manifiesto la aplicabilidad y eficacia de los protocolos desarrollados. En este sentido cabe señalar recientes trabajos *in vivo* publicados donde se llevaron a cabo protocolos muy similares a los descritos en nuestro trabajo y en los que se estudiaron, a partir de PBMCs y de muestras de ganglio linfático pre-escapular, los niveles de expresión y evolución de citoquinas en animales vacunados con vacuna inactivada tras el desafío con virus heterólogo de la LA (Umeshappa et al., 2010). Otro trabajo estudió la expresión de dichas citoquinas a partir de PBMCs procedentes de animales vacunados frente a LA y posteriormente estimuladas *in vitro* con virus heterólogo de la LA (Umeshappa et al., 2011a).

En trabajos previos en los que se emplearon células sanguíneas como origen del ARNm, dichas células fueron estimuladas *in vitro* previamente a la detección y cuantificación de citoquinas (Konnai et al., 2003). Sin embargo, existen trabajos llevados a cabo en otras especies, distintas de la ovina, en los que se describe el empleo de RT-PCRs en tiempo real con la sonda SYBR Green para la cuantificación de la expresión de citoquinas, en los que no fue necesaria la estimulación previa de las PBMCs (Vernel-Pauillac y Merien, 2006; Salguero et al., 2008).

La puesta a punto de las PCRs para los genes de expresión constante GAPDH y β-Actina, supuso una herramienta imprescindible para llevar a cabo la cuantificación de la expresión de genes que codifican para las citoquinas estudiadas, ya que fueron utilizadas para llevar a cabo la normalización en la cuantificación (Huggett et al., 2005). En todas las muestras analizadas durante la fase de puesta a punto de la RT-PCR tanto en un paso como en dos, se obtuvieron resultados positivos para dichos genes. A la hora de cuantificar, y en el caso de no producirse la amplificación para estos genes, las muestras no fueron consideradas válidas, ya que la no detección de dichos genes en la muestra podría relacionarse con distintos problemas surgidos durante la ejecución de la técnica (errores de extracción, errores en la digestión del ADN, degradación del ARN, problemas en la realización de la RT o de la PCR). De hecho, la reacción de RT ha sido descrita como una fuente de variabilidad en la RT-PCR en tiempo real (Stahlberg et al., 2004), siendo éste uno de los motivos por los que se eligió la RT-PCR en dos pasos para ser empleada en nuestro estudio. En nuestro trabajo, la realización de la RT en un paso previo, nos permitió la utilización del ADNc procedente de una misma reacción en diferentes PCRs, asegurándonos así que la concentración inicial de ADNc fue la misma en todas las PCRs (Wong y Medrano, 2005).

Para evitar un posible error dirigido, no se utilizaron los cebadores diseñados para la PCR en la reacción de RT, pues esto hubiera producido diferentes cantidades de ADNc dependiendo de las afinidades y eficiencias de los cebadores. Además, distintos trabajos han apuntado que la utilización de cebadores específicos no conlleva una mejora en la reacción de RT si comparamos dichos resultados con los obtenidos mediante la utilización de cebadores inespecíficos de tipo “random” u “Oligo dt” (Stahlberg et al., 2004). En los protocolos desarrollados en nuestro estudio se emplearon cebadores inespecíficos, a partir de los cuales fue posible obtener copias de todo el ARNm presente en la muestra, de manera que la proporción de la expresión que se obtuvo fue equivalente a la que se encontraba en la sangre inicial. Además, la utilización de cebadores específicos hubiera obligado a la realización de 8 RT diferentes, lo que complicaría y multiplicaría el trabajo laboratorial. Además, de esta manera nos hubiéramos visto obligados a utilizar la RT-PCR en un solo paso, lo que hubiera provocado un aumento de la variabilidad. En los casos en los que se opta por la utilización de ARNm como muestra, se recomienda la utilización de oligo (dT), ya que dichos cebadores se unen a la cola Poly A del ARNm, evitando así la RT de otros tipos de ARN como el ARNr o ARN vírico, siendo necesario para ello una muestra inicial de alta calidad (Bustin y Nolan, 2004).

Finalmente, en lo que a RT-PCR en dos pasos se refiere es importante recordar que aunque se trata de una técnica cuyo uso se encuentra muy extendido para el estudio de la expresión de genes, constituyendo una importante herramienta para la cuantificación de niveles celulares de ARNm, debe tenerse en cuenta que se trata de una técnica compleja, con problemas asociados como la repetibilidad y la sensibilidad real (Bustin, 2000). En este sentido, a fin de evitar variabilidad, así como de minimizar errores, se recomienda la automatización de las reacciones (Bustin, 2002), posibilidad esta última que no fue posible llevar a cabo durante la realización de este trabajo. Este hecho podría explicar, en parte, la existencia de errores que podrían haber influido en los resultados obtenidos a partir de las muestras procedentes de los animales durante el estudio *in vivo*.

V.2.1.3. CEBADORES

En el transcurso de este trabajo se han utilizado y adaptado 3 parejas de cebadores (GAPDH, IFNγ e IL4) para su utilización en la técnica de PCR en tiempo real, cebadores que previamente habían sido empleados en técnicas de PCR convencional (Gohin et al., 1997). Además, se han utilizado otros 5 pares de cebadores cuyo uso había sido previamente descrito en técnicas de RT-PCR en tiempo real, llevándose a cabo una optimización de las concentraciones y de las temperaturas a fin de facilitar la ejecución de los protocolos a nivel laboratorial, obteniéndose resultados satisfactorios para seis citoquinas (IFNγ, TNFα, IL2, IL4, IL10, IL12) y dos genes de expresión constante (GAPDH, β- Actina). Así, cabe destacar la utilización de dos temperaturas de anillamiento diferentes, lo que ha permitido la utilización de un mismo programa para la realización de las PCRs de tres citoquinas y de un gen de

expresión constante simultáneamente. De las 5 parejas de cebadores descritas para PCR en tiempo real, 4 (β-Actina, IL2, IL10 e IL12) habían sido diseñadas para bovino aunque, con posibilidades de uso también en ovino (Konnai et al., 2003), posibilidad que nuestros resultados han demostrado.

La elección de las parejas de cebadores para los genes de expresión constante (GAPDH, β-Actina) se realizó teniendo en cuenta su temperatura de anillamiento (60ºC y 55ºC), a fin de facilitar la realización del máximo número de PCRs reduciendo así el trabajo a realizar. Se trataba de dos de los genes de expresión constante más utilizados en los estudios de cuantificación de expresión de genes (Vandesompele et al., 2002; Huggett et al., 2005), hecho que fue tenido en cuenta a la hora de su elección. Es un hecho conocido que su expresión podría variar y, por tanto, dar lugar a resultados erróneos en la cuantificación (Glare et al., 2002; Li et al., 2005).

V.2.2. PUESTA A PUNTO DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO PARA EL ESTUDIO DE PBMCS A PARTIR DE SANGRE OVINA

En el transcurso de este estudio, el procesado de leucocitos ovinos para su inmunofenotipaje se llevó a cabo utilizando soluciones de lisis y de fijación comerciales (solución lisante FACS® y cell FIX® Becton-Dickinson), lo que permitió el almacenamiento de las muestras (48h a 4ºC) una vez procesadas. De esta manera se evitaron variaciones en el procesado de las muestras, a la vez que se estandarizaron protocolos que permitirían la comparación de muestras tomadas a lo largo del ensayo *in vivo* con vacunas. El protocolo estandarizado elegido para nuestro estudio minimizó la manipulación de las muestras, a la vez que redujo la cantidad de sangre necesaria durante la técnica.

Los anticuerpos seleccionados no sólo han sido utilizados con éxito en muestras procedentes de sangre ovina sino también a partir de muestras bovinas y caprinas (Larsen et al., 1990; Harbo et al., 2004). Incluso se ha podido demostrar la reactividad del anticuerpo anti CD14 con células procedentes de perro, gato, cabra, oveja vaca y humano (Brodersen et al., 1998).

Además, estos anticuerpos han sido utilizados para diferentes técnicas, que van desde la citometría de flujo hasta el estudio histoquímico en tejidos bovinos fijados e incluidos en parafina (Gutierrez et al., 1999).

En el caso de la identificación de los linfocitos T-γδ, se utilizaron dos anticuerpos diferentes, puesto que existen dos sub-poblaciones de este tipo celular en rumiantes, siendo la población minoritaria la equivalente a los linfocitos T-γδ presentes en el ser humano, mientras que la mayoritaria, y a la que se le supone un importante papel en rumiantes, estuvo

representada por aquellas células que presentaron la molécula WC1, población celular no presente en el ser humano (Davis et al., 1996).

En estudios previos se ha analizado por citometría de flujo la evolución de las poblaciones CD4 y CD8 en ovino y bovino tras la infección con el virus de la LA (Ellis et al., 1990), también se he estudiado la respuesta en forma de células CD8 en los nódulos linfáticos regionales tras la infección con LA en terneros (Barratt-Boyes et al., 1995). Incluso, se ha analizado la evolución de todos los tipos celulares estudiados en nuestro trabajo ($CD4^+$, $CD8^+$, $CD25^+$, linfocitos B, monocitos y linfocitos T-γδ) tras la inoculación *in vitro* de PBMCs obtenidos de sangre bovina (Barratt-Boyes et al., 1992). Sin embargo, éste es el primer estudio en el que se analiza la evolución de éstas seis poblaciones celulares del sistema inmune simultáneamente, en un ensayo *in vivo* de vacunas (VLPs e inactivada) frente al virus de la LA y en ganado ovino.

V.2.3. ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE EN EL ENSAYO *IN VIVO* DE VACUNAS

Son numerosos los trabajos en los que se estudia la respuesta de anticuerpos generada tras inoculaciones con el virus de la LA (Koumbati et al., 1999; Umeshappa et al., 2011b), en respuesta a vacunas inactivadas (Di Emidio et al., 2004; Eschbaumer et al., 2009; Gethmann et al., 2009; Oura et al., 2009; Wackerlin et al., 2010), así como tras la inmunización con vacunas VLPs (Savini et al., 2007; Stewart et al., 2010).

Asimismo, trabajos previos *in vitro* (Barratt-Boyes et al., 1992; Umeshappa et al., 2011a) como *in vivo* (Ellis et al., 1990; Foster et al., 1991; Umeshappa et al., 2010), han evaluado tanto la respuesta de citoquinas, como la evolución de poblaciones celulares inmunocompetentes tras la exposición al virus de la LA, resultando escasos los trabajos en los que se afronta el estudio de dichos parámetros tras la aplicación de vacunas (VLPs o inactivadas) frente al virus de la LA en ganado ovino. Nuestros resultados, gran parte de ellos cualitativos, muestran la tendencia en la evolución de dichos parámetros, estableciendo una base sólida para futuras investigaciones en las que se deberían evaluar un mayor número de animales y muestras.

Como ya hemos indicado con anterioridad, durante la realización de este trabajo tan sólo se analizó la evolución de la expresión de genes que codifican para citoquinas en 11 de las 20 ovejas vacunadas con VLPs, así como en las 6 ovejas repartidas entre los dos grupos control (E y F). Asimismo, se decidió no llevar a cabo dicho estudio de expresión de citoquinas en el grupo D (animales vacunados con vacuna inactivada frente a serotipo 1), ya que investigaciones similares, recientemente publicadas, han demostrado un incremento en la expresión de IL2, IL12, IFNγ tras el desafío de ovejas inmunizadas con una vacuna inactivada frente al serotipo 1 (Umeshappa et al., 2010; Umeshappa et al., 2011a).

Previamente a la ejecución de los ensayos *in vivo*, se llevó a cabo el fenotipaje de las diferentes PBMCs, a fin de establecer unos niveles basales de dichas poblaciones en los animales objeto de estudio. En lo que se refiere a las distintas subpoblaciones de linfocitos T, los T $CD4^+$ constituyeron entre el 22.36% y el 36.67% del total de PBMCs, presentando unos valores superiores a los esperados (7.6% - 21.2%), mientras que los $TCD8^+$ supusieron entre un 7.25%y un 13.84% del total de PBMCs, porcentajes dentro de los límites fisiológicos en ovejas (Smith et al., 1994). Los linfocitos T reguladores $CD25^+$ constituyeron alrededor del 6% de las PBMC, valores inferiores a los descritos para esta población celular, que distintos trabajos sitúan alrededor del 10% de las PBMC (Bujdoso et al., 1993)

De manera fisiológica la población de linfocitos T-γδ muestra unos rangos muy variables, que van desde el 18 o 20% del total de linfocitos señalado por algunos autores (Boppana et al., 2004), al 22-68% apuntado en otros trabajos (Smith et al., 1994). Los resultados basales obtenidos en nuestro estudio indicaron grandes variaciones atendiendo al tipo de anticuerpo empleado. De hecho uno de los anticuerpos empleados ($TCR1n6^+$) sólo marcó al 1% de las PBMCs, mientras que el otro se unió al 15.4% de las PBMCs, siendo la suma de ambos porcentajes inferior a los valores basales establecidos.

En lo que se refiere a la población de linfocitos B, los valores obtenidos (22.27%) se situaron dentro del rango fisiológico esperado, aunque debe recordarse que se trata de una población muy variable, cuyos porcentajes pueden oscilar entre 11 - 50%, y donde podemos dos poblaciones mediante citometría de flujo (Smith et al., 1994).

Finalmente señalar que los resultados obtenidos tras el marcaje de la población de monocitos circulantes con el anticuerpo anti-CD14 (4.21%) se situaron dentro de los valores normales en ovino (3.8%) para dicha población celular (Kramer, 2000).

Las pequeñas variaciones en los porcentajes de algunas de las subpobalciones celulares estudiadas con respecto a valores previamente señalados, podrían ser atribuidas a distintos factores como la afinidad de los anticuerpos empleados, los protocolos de marcaje, el citómetro empleado para el recuento celular, las condiciones experimentales de los animales, la variabilidad de la raza, etc.

V.2.3.1. VACUNA VLP

V.2.3.1.1. VLP MONOVALENTE (SEROTIPO 1)

La vacunación de los animales del grupo A provocó un incremento de la expresión de de IL2, IFNγ y TNFα, expresión que se mantuvo positiva para estas citoquinas durante la mayor parte del experimento, destacando de nuevo el incremento observado tras la revacunación, así como el mantenimiento de dichos niveles de expresión hasta el final del experimento. Sin embargo, los niveles de expresión de IL10 e IL12 apenas mostraron cambios relevantes a lo

largo del experimento, siendo únicamente destacable un ligero descenso observado en la expresión de IL12 tras la revacunación. Estos resultados ponen de manifiesto la existencia de un perfil de citoquinas asociado con una respuesta inmune de tipo 1 (Th1) que favorecería, además, la activación de los linfocitos T reguladores CD25+, subpoblación celular cuya inducción estaría asociada con la activación de una respuesta de tipo celular tras la vacunación (Bujdoso et al., 1993; Zhu y Paul, 2008). Así, además de la capacidad de las vacunas VLPs de inducir una RI basada en la producción de anticuerpos (Pearson y Roy, 1993; Roy, 2003), nuestros resultados, acordes con trabajos previos (Roy et al., 1992; Noad y Roy, 2003), demostrarían la capacidad de las vacunas VLPs para estimular una RI de tipo celular.

Tanto el IFNγ como la IL2, destacan por su capacidad para estimular el crecimiento, proliferación y actividad citotóxica de los linfocitos T (Mosmann y Sad, 1996; Stasny et al., 2001), favoreciendo así la proliferación de células B y la estimulación de la producción de inmunoglobulinas (Boehm et al., 1997; Samuel, 2001). En este sentido cabe destacar la capacidad del IFNγ para inducir un efecto autocrino sobre la síntesis de IL2, así como el efecto sinérgico existente entre el IFNγ y el TNFα (Bach et al., 1997; Van Reeth et al., 1998). Por tanto, el incremento en la expresión de estas citoquinas observado en la primera etapa del experimento tras la vacunación, junto al incremento de linfocitos T $CD25^{+}$, influiría en la temprana respuesta de anticuerpos frente al virus de la LA detectada transcurridos 10 días de la vacunación mediante la técnica de ELISA de doble reconocimiento. Así, nuestros resultados ponen de manifiesto el importante papel desempeñado por ciertas citoquinas en la activación de la RI celular y en la posterior RI humoral protectora generada tras la aplicación, en ovejas, de una vacuna monovalente VLP frente al serotipo 1.

El importante papel que podría desempeñar la respuesta celular en animales vacunados frente al virus de la LA, ya fue apuntado en trabajos previos (Jeggo et al., 1984a, 1985; Umeshappa et al., 2010). De hecho, la ausencia de respuesta humoral específica en forma de anticuerpos neutralizantes tras la vacunación, como se comprobó en el caso de ensayos llevados a cabo con vacuna bivalente inactivada frente a los serotipos 2 y 4 en terneros, o en ovejas vacunadas con vacuna inactivada frente al serotipo 8, no implicaría ausencia de protección frente al virus (Eschbaumer et al., 2009; Savini et al., 2009).

Finalmente cabría destacar que, en inoculaciones experimentales previas llevadas a cabo en animales no vacunados (Foster et al., 1991), se había señalado una caída en los niveles de IFNγ alrededor da la segunda semana tras la inoculación. Sin embargo, nuestros resultados mostraron los mayores niveles de expresión para esta citoquina precisamente en la etapa final del experimento, tras el desafío con el virus de la LA. El mantenimiento de los niveles de expresión de esta citoquina hacia el final del experimento podría, por tanto, atribuirse a los niveles previos generados tras la vacunación y revacunación.

V.2.3.1.2. VLP BIVALENTE (SEROTIPOS 1 Y 4)

En las ovejas vacunadas con la vacuna bivalente VLP frente a los serotipos 1 y 4, y desafiadas con el serotipo 1 (grupo B) y con el serotipo 4 (grupo C) respectivamente, el principal cambio destacable fue un incremento en los niveles de expresión de IL12 tras la vacunación y revacunación, así como un aumento de IL2 tras la revacunación.

En los animales del grupo B, dichos incrementos estuvieron asociados con el aumento inicial de linfocitos T reguladores $CD25^+$, poniéndose de manifiesto de nuevo la activación de una respuesta de tipo celular tras la vacunación (Bujdoso et al., 1993; Zhu y Paul, 2008). Dicha activación sería atribuible a la IL12, citoquina con una importante capacidad de estimulación de la respuesta inmune Th1, en la que participaría estimulando la diferenciación de las células T colaboradoras y la inducción de IL2 por dichas células (Trinchieri et al., 1992; Trinchieri, 1995, 1997). Por tanto, la IL12 podría ser responsable de la activación de los linfocitos T reguladores CD25+, pese a la ausencia de un incremento en la expresión de otras citoquinas relacionadas con la RI Th1 (IFNγ o TNFα) tras la vacunación.

Asimismo, el incremento en la expresión de IL12 tras la revacunación podría estimular el incremento de IL2 observado también tras la revacunación tanto en los animales del grupo B como en los animales del grupo C (Trinchieri et al., 1992; Trinchieri, 1995, 1997). En ambos grupos, dicha citoquina (IL2) alcanzaría sus niveles máximos de expresión tras el desafío, pudiendo también influir el virus inoculado en el incremento observado en esta fase final del experimento, fenómeno que ha sido señalado en trabajos previos, donde animales previamente inmunizados mostraron un incremento en la producción de IL2 tras la exposición al virus de la LA (Umeshappa et al., 2010).

Estos resultados ponen una vez más en evidencia que el incremento en la expresión de estas citoquinas, y en especial de la IL12, observado en la primera etapa del experimento tras la inmunización, junto al incremento de linfocitos T $CD25^+$, influiría en la temprana respuesta de anticuerpos frente al virus de la LA detectada mediante técnicas de ELISA a los 10 días del experimento.

V.2.3.2. VACUNA COMERCIAL INACTIVADA (SEROTIPO 1)

La vacuna inactivada frente al serotipo 1 indujo una RI efectiva en las 5 ovejas del grupo D. La protección específica conferida por este tipo de vacunas parece estar relacionada con el importante papel desempeñado por la VP2 en la estimulación de la inmunidad protectora mediada por linfocitos B y linfocitos T (Takamatsu et al., 1990; Andrew et al., 1995). No obstante, los mecanismos inmunológicos involucrados en la protección observada en los animales vacunados, incluido el posible papel de la RI celular, permanecen sin aclarar.

14 días después de la vacunación, una respuesta de anticuerpos específica frente al virus LA fue observada en todas las ovejas del grupo D, la cual se mantendría hasta el final del experimento. Ésta respuesta de anticuerpos se presentó como la principal responsable de la protección de las ovejas frente al virus de la LA. Los resultados obtenidos en este trabajo estarían en concordancia con los obtenidos en estudios previos, donde los anticuerpos específicos detectados mediante ELISA tras la administración de una vacuna inactivada frente al virus de la LA en ovejas, mostraron una evolución similar a la de los anticuerpos neutralizantes con capacidad protectora frente al virus (Savini et al., 2008; Oura et al., 2009), cuya evolución en el tiempo es similar. A pesar de los intentos para demostrar una citotoxicidad celular dependiente anticuerpos, el mecanismo por el cual los anticuerpos neutralizan al virus de la LA *in vivo* permanece sin resolver (Jeggo et al., 1984a, 1985).

En nuestro estudio, la respuesta de anticuerpos detectada en las ovejas del grupo D tras la vacunación y tras la revacunación, no estuvo relacionada con incrementos en las poblaciones de células T ($CD4^+$, $CD8^+$ y $WC1^+$), ni con cambios en las células reguladoras $CD25^+$. Además, tampoco se observaron cambios significativos en la población de monocitos ($CD14^+$).

La falta de una respuesta mediada por células tras la vacunación y la revacunación observada en este grupo de animales, podría ser atribuida a los diferentes componentes de la vacuna, en la cual el virus inactivado estuvo acompañado de adyuvante que contenía aluminio en su composición. Estos adyuvantes retrasan la eliminación de antígenos tras la administración de la vacuna, prologando por tanto el estímulo antigénico. Además, estos adyuvantes también promueven la respuesta de anticuerpos, a pesar de poseer poca capacidad de estimular la respuesta mediada por células (Aucouturier et al., 2001; Ramakrishnan et al., 2005; Iglesias et al., 2006). Dicha incapacidad para estimular una fuerte respuesta mediada por células, junto con la variabilidad de respuestas que pueden generar las células presentadoras de antígeno tras la exposición al virus de la LA, atenuado o inactivado, presente en las vacunas (Cresswell y Lanzavecchia, 2001; Singh y O'Hagan, 2003), podría explicar la moderada participación de la respuesta mediada por células tras la vacunación y la revacunación, así como la ausencia de cambios significativos en los porcentajes de estas poblaciones de células inmunocompetentes.

Por otro lado, las células B son capaces de reconocer a la mayoría de los antígenos sin necesidad de procesamiento previo, y ciertos antígenos pueden provocar la formación de anticuerpos en ausencia de células T auxiliares, proporcionando una señal suficiente que favorezca la proliferación y diferenciación de células B hacia células plasmáticas productoras de anticuerpos (Gold, 2002; Tizard, 2009e). Este hecho podría explicar por qué el aumento

significativo de los linfocitos B observado tras la vacunación y la revacunación estaría relacionado con un aumento de anticuerpos específicos frente al virus de la LA.

Tras el desafío, no se detectó ARN vírico en las ovejas del grupo D, lo que confirmaría la protección específica inducida por la respuesta de anticuerpos. De hecho, la respuesta de anticuerpos después de la exposición al virus, fue significativamente superior que la observada tras la revacunación, y éste aumento se asoció con un aumento significativo de los monocitos $CD14^+$, de las células $CD25^+$, de los linfocitos B y de los linfocitos T $CD8^+$. La molécula CD14 se presenta como fundamental en los procesos de reconocimiento de antígeno y de interacción celular, donde juega un papel clave en la activación de células T mediada por monocitos (Andrew et al., 1995; Antal-Szalmas, 2000). Además junto con las células dendríticas (Hemati et al., 2009), los monocitos-macrófagos juegan un importante papel en los procesos de presentación de antígeno, así como en la propagación del virus LA durante la infección (Barratt-Boyes et al., 1995; Sánchez-Cordon et al., 2010b).

CD25 se ha definido como un receptor de baja afinidad para la IL2 que se expresa principalmente en los linfocitos T activados por la interacción con antígenos (Bujdoso et al., 1993; Zhu y Paul, 2008). Por lo tanto, el aumento de monocitos $CD14^+$ y de células reguladoras $CD25^+$ observado tras el desafío con el virus LA1 podría co-estimular a las células B, favoreciendo así su activación, proliferación y diferenciación hacía células plasmáticas productoras de anticuerpos.

Finalmente, tras el desafío con LA 1, se observó un aumento de linfocitos T $CD8^+$, que llegó a ser significativo hacia el final del ensayo. Aumentos similares en linfocitos T $CD8^+$ y en la expresión de IL2, asociados ambos con un aumento en la expresión de $CD25^+$, han sido descritos tras la exposición de ovejas vacunadas frente a LA1 (Umeshappa et al., 2010). Tales aumentos se han observado también durante infecciones experimentales (Jeggo et al., 1985; Ellis et al., 1990; Hemati et al., 2009). Así, la activación y proliferación de linfocitos $TCD8^+$, que desempeñan un papel clave en la respuesta Th1, también puede estar asociada con el aumento de monocitos $CD14^+$ y de células reguladoras $CD25^+$ observado tras del desafío.

V.2.3.3. ANIMALES DESAFIADOS NO VACUNADOS

V.2.3.3.1. ANIMALES DESAFIADOS CON EL SEROTIPO 1 (GRUPO E)

En el grupo de ovejas no vacunadas y desafiadas frente al serotipo 1 del virus de la LA, la inoculación de dicho serotipo provocó, principalmente, un incremento en la expresión de IL2 e IL12. Además, los niveles observados de IL12 fueron superiores en todo momento a los observados para la IL10, poniéndose de manifiesto el predominio de una RI de tipo Th1. Dada la capacidad pro-inflamatoria y pirógena de la IL12 (Trinchieri et al., 1992; Trinchieri, 1995, 1997), su incremento podría estar relacionado con el aumento de la temperatura y el incremento de sintomatología clínica observada en estos animales durante este periodo.

Los incrementos en la expresión de estas citoquinas, se vieron acompañados de incrementos en los porcentajes de linfocitos T $CD4^+$, $TCD8^+$ y Tγδ (TCR1-N6), los cuales alcanzaron sus valores máximos entre los 54 y 58 días del experimento, no observándose cambios reseñables en el resto de poblaciones celulares del sistema inmune estudiadas (linfocitos T reguladores $CD25^+$, monocitos $CD14^+$ y linfocitos B). Por tanto, la inoculación del virus indujo un incremento en la expresión de citoquinas asociadas con una respuesta Th1 que favorecería un incremento de la sintomatología clínica, así como una respuesta de tipo celular en la que participarían células T con capacidades reguladoras y citotóxicas, y cuyo objetivo sería el control de la infección (Germain, 1994; Jondal et al., 1996).

A partir de los 58 días del experimento (10 días después de la inoculación), se detectó una respuesta de anticuerpos mediante el ELISA de doble reconocimiento que se mantendría hasta el final del ensayo. Dicha respuesta de anticuerpos coincidió con la descrita en trabajos previos en los que la presencia de anticuerpos frente a VP7 en animales no vacunados se detectó en las primeras semanas tras la inoculación (Wade-Evans et al., 1996; Koumbati et al., 1999; Oura et al., 2009). La instauración de esta respuesta humoral podría estar relacionada con la respuesta celular previamente observada, la cual podría ejercer su capacidad para estimular la producción de inmunoglobulinas (Mosmann y Sad, 1996; Stasny et al., 2001). Fue a partir de esta fecha cuando los niveles de expresión del virus en sangre comenzaron a disminuir, lo que evidencia la efectividad de la respuesta humoral y el papel desempeñado por la respuesta celular en la regulación y activación de la misma. Además, cabe destacar que la máxima expresión de IL10, citoquina reguladora con efectos anti-inflamatorios, así como con capacidad para desactivar la RI celular (Hawrylowicz and O'Garra, 2005), se produjo al final del experimento, una vez superada la fase clínica de la enfermedad.

V.2.3.3.2. ANIMALES DESAFIADOS CON EL SEROTIPO 4 (GRUPO F)

En el grupo de ovejas no vacunadas y desafiadas frente al serotipo 4 del virus de la LA, resultó destacable el incremento observado en la expresión de IFNγ, IL2 e IL12, así como de TNFα entre 5 y 6 días después de la inoculación (días 53-54), poniéndose de manifiesto la existencia de una respuesta de citoquinas asociadas con una RI de tipo Th1, así como un predomino de citoquinas con propiedades proinflamatorias. La presencia de estas citoquinas sería la responsable tanto del incremento de la temperatura como de la aparición de síntomas característicos de la LA (Channappanavar et al., 2011), cambios clínicos que en ambos casos fueron menos intensos que los observados en los animales inoculados frente al serotipo 1. Dichas diferencias sólo pudieron atribuirse a los menores niveles de expresión de IL12 mostrados por los animales de este grupo con respecto a los animales no vacunados e inoculados con el serotipo 1, ya que el resto de citoquinas con capacidades proinflamatorias (TNFα e IFNγ) mostraron unos niveles de expresión similares o incluso superiores, lo que pone de manifiesto el importante papel de la IL12 tanto en la inducción de la respuesta inflamatoria como en la regulación de la RI de tipo th1 (Trinchieri et al., 1992; Trinchieri, 1995, 1997).

Como en el resto de grupos, la detección de anticuerpos específicos frente al virus de la LA mediante el kit de doble reconocimiento fue posible en fechas más tempranas del experimento que con el ELISA de competición, mostrando éste último una menor sensibilidad previamente descrita (Oura et al., 2009). Pese a que la respuesta de anticuerpos generada frente al serotipo 4 del virus de la LA, al igual que para el serotipo 1, se detectó mediante el ELISA de doble reconocimiento a partir de los 58 días del experimento (10 días después de la inoculación), los niveles de anticuerpos generados fueron menores que en el caso de los animales inoculados frente al serotipo 1. Este hecho pone de manifiesto que una RI celular más moderada, donde ciertas citoquinas presentaron unos niveles de expresión más bajos, podría influir en el establecimiento, así como en la intensidad y eficacia, de la respuesta humoral generada frente al virus.

V.2.3.4. COMPARACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE OBSERVADA EN LOS DISTINTOS GRUPOS

La aparición de fiebre como consecuencia de la vacunación con la vacuna inactivada, puede tener más relación con los adyuvantes, que con el propio virus, pues al ser inactivadas no existe replicación y por tanto no es esperable la aparición de fiebre (Foster et al., 1991). Esta ausencia de replicación, es la responsable también en las VLPs de la ausencia de fiebre.

Atendiendo a la evolución de las citoquinas y de las poblaciones celulares, y a pesar de que si miramos los grupos de animales vacunados estos presentan variaciones especificas como el aumento de IL2, IFNγ tras la vacunación en el grupo A, el aumento de IL12 tras vacunación en el grupo B, o el estímulo de TNFα tras el desafío en el animal del grupo C, lo que si se observa en todos los casos es la importancia de la IL2 tras el desafío. Además, parece evidente que tanto la VLP monovalente como la VLP bivalente, han sido capaces de estimular la RI celular. En ambos casos la evolución de la IL2 y de la población $CD25^+$ es fundamental, lo que da una idea de la importancia de la RI celular en respuesta a las vacunas VLPs. El aumento en la expresión de IL2 tras el desafío en los animales vacunados podría además estar relacionado con un proceso de sensibilización previa como se ha comprobado en estudios previos (Umeshappa et al., 2010; Umeshappa et al., 2011a). La estimulación de la expresión de esta citoquina fue observada también en los controles tras el desafío, lo que evidencia la importancia de esta citoquina no sólo en respuesta al desafío en animales previamente inmunizados sino también tras el primer contacto de los animales con el virus.

La importancia de la IL2 radica en su papel en la RI celular (García Cabrera, 2006), siendo una útil herramienta en el estudio de la RI por su importancia en la repuesta de los linfocitos T tras la exposición al antígeno (Buchan et al., 1991). La cinética de la IL2 observada en los animales vacunados con VLP monovalente, así como la observada en la IL12 en los vacunados con VLP bivalente, muestran una vez más que las VLPs son capaces de estimular la respuesta celular (Roy et al., 1992; Pearson y Roy, 1993; Noad y Roy, 2003).

Parece evidente que en un mecanismo tan complejo como es la RI frente al virus de la LA o frente a una vacuna, las citoquinas involucradas sean varias, aunque en este estudio los resultados de todos los grupos coincidan sólo en la importancia de una, la IL2. Esto se debe, entre otros posibles factores, a que se trata de un número pequeño de animales para tratar de hacer análisis estadísticos. Por otro lado, existe gran variabilidad en la RI dependiente del individuo. A esto se une, la variabilidad observada en los análisis debida a variaciones en la expresión de los genes de expresión constante, que pueden haber provocado variaciones erróneas en los valores de la expresión de citoquinas (Schmittgen y Zakrajsek, 2000; Glare et al., 2002).

La utilización de adyuvantes en las vacunas está encaminada a favorecer la estimulación del sistema inmune, de hecho se sabe que en casos de adyuvantes tipo agua/aceite/agua estos favorecen la RI humoral como es el caso del *montanide ISA 206* (Aucouturier et al., 2001). Cabe por tanto pensar que en los grupos E y F a los que se les administró el adyuvante de las VLPs, la evolución de las citoquinas previa al desafío sea consecuencia de la estimulación del adyuvante. Si bien, esto complica la comparación con los grupos vacunados, pues no parece lógico que los niveles de expresión sean superiores en los controles que en los animales vacunados, como sucede con el caso del IFNγ en el grupo E, siendo además una citoquina de RI celular más que de RI humoral que es la que se supone estimula adyuvante empleado.

Entre los grupos vacunados cabe recordar que la IL2 se estimuló tras las dos vacunaciones sólo en el grupo A, fallando esta estimulación en alguna de las vacunaciones en los grupos B y C. El aumento de $CD25^+$ en el grupo A presentó buena concordancia con la expresión del ARNm que codifica para IL2, no sucediendo lo mismo en el grupo B que presentó un aumento menor. Estos datos inducen a pensar que la RI celular generada fue menor en el caso de la vacuna VLP bivalente que en el de la VLP monovalente.

A pesar de lo que se podía esperar de estos análisis, la citoquina más enfocada a la producción de anticuerpos por su papel en la RI humoral, la IL4 no produjo ningún incremento significativo. Aunque ésta falta de respuesta se debió a la ausencia de amplificación de las muestras obtenidas el día 0, por tanto la ausencia de calibrador en relación al cual analizar un posible incremento impidió que se describieran posibles variaciones en esta IL4, pero no se puede descartar que hayan existido.

Comparando los datos de las VLPs con los de la vacuna inactivada, queda claro, que en ambos tipos de vacunas se estimuló la población de células que presentan receptor de IL2, es decir, que tanto en los grupos A y B como en el D, la vacunación indujo una RI de tipo celular.

En el caso de la vacuna inactivada no sólo se observó el estimulo de la RI celular, sino que la evolución de los linfocitos B, implicó la demostración de la estimulación de la RI humoral. Pero no cabe pensar que las VLPs no hayan estimulado la RI humoral, pues en realidad tanto con las VLPS, como con la vacuna inactivada, se ha comprobado que la producción de anticuerpos fue efectiva desde el día 10-14 posterior a la primera dosis vacunal.

En todos los grupos vacunados (grupos A, B, C y D) se ha comprobado la ausencia de viremia tras el desafío, aunque en el caso de los animales vacunados con VLP se han observado excepciones en los grupos A y C, en los que se obtuvieron sólo algunos resultados positivos a la RT-PCR de manera excepcional (3/20) y con posible viremia sólo en el animal que murió (5C). Estos resultados indican la capacidad que presentan ambos tipos de vacunas para generar una RI suficiente que protege a los animales frente al desafío con virus homólogo virulento.

La evolución de los grupos control, demuestra una vez más, la variabilidad en la RI de ovejas frente al virus, así como una diferencia en la capacidad patógena entre serotipos observadose una mayor capacidad patógena del serotipo 1, que podría estar relacionada con la mayor expresión de IL12 observada en los animales inoculados con el serotipo 1 en comparación con aquellos animales control inoculados con el serotipo 4

A pesar de que tradicionalmente se establece que las vacunas vivas atenuadas estimulan principalmente una RI de tipo celular, mientras que las inactivadas y por tanto también las VLPs estimulan principalmente una RI de tipo humoral (Sánchez-Vizcaíno, 2006), los resultados obtenidos mostraron que ambos tipos de RI han sido estimulados tanto con las VLPs como con la vacuna inactivada. En el caso de la vacuna inactivada, puede deberse a la inclusión de adyuvantes pues el hidróxido de aluminio favorece la RI celular, gracias a la liberación lenta de los antígenos, favoreciendo la quimiotaxis y la presentación de antígeno (Sánchez-Vizcaíno, 2006). En el caso de las VLPs no resulta sorprendente que tanto la vacuna monovalente como la bivalente, sean capaces de estimular ambas respuestas, puesto que esta estimulación de ambos tipos de respuesta ya había sido descrita (Pearson y Roy, 1993; Noad y Roy, 2003).

VI. CONCLUSIONES

PRIMERA

Las RT-PCR en tiempo real adaptadas en este trabajo permiten cuantificar la expresión de TNFα, IFNγ, IL2, IL4, IL10 e IL12 a partir de muestras sanguíneas tanto en los animales vacunados con VLPs como en los infectados con el virus de la LA.

FIRST

The real time RT-PCRs adapted in this study, allowed to quantify the expression of TNFα, IFNγ, IL2, IL4, IL10 and IL12 from blood samples in animals immunized with VLPs as in those infected with the BT virus.

PREMIÈRE

Les RT-PCRs en temps réel adaptées dans cette étude permettent de quantifier l'expression de TNFα, IFNy, IL2, IL4, IL10 et IL12 à partir d'échantillons de sang d' animaux immunisés avec des VLP et de ceux infectés par le virus de la FCM.

SEGUNDA

Se ha demostrado la correlación entre la temperatura rectal y la temperatura ocular obtenida mediante termografía infrarroja en ovejas merinas infectadas con el virus de la LA (r = 0.7).

SECOND

The correlation between rectal temperature and the eye surface temperature obtained by infrared thermography has been demonstrated on merino sheep infected with the BTV (r = 0.7).

DEUXIÈME

Il a été démontré la corrélation entre la température rectale et la température oculaire obtenue par thermographie infrarouge de moutons mérinos infectés par le virus la fièvre catarrhale du mouton (r = 0.7).

TERCERA

Las vacunas utilizadas en este estudio indujeron una respuesta de anticuerpos específicos frente al virus de la LA tras la primera vacunación, tanto en animales vacunados con monovalente (VLP e inactivada) como con vacuna VLP bivalente, no generando sintomatología secundaria a la vacunación, a excepción de la aparición de fiebre 24 horas después de cada vacunación (40.07ºC y 40.2ºC) en los animales vacunados con vacuna inactivada (Zulvac LA1).

THIRD

The vaccines used in this study induced a specific antibody response against BTV after the first vaccination in animals vaccinated with monovalent vaccines (VLP and inactivated) as in animals vaccinated bivalent VLP vaccine, generating no symptoms related to vaccination, except the onset of fever 24 hours after each vaccination (40.07 º C and 40.2 ° C) in animals vaccinated with inactivated vaccine (Zulvac BTV1).

TROISIÈME

Les vaccins utilisés dans cette étude ont induit une réponse d' anticorps spécifiques contre le virus de fièvre catarrhale du mouton après la première vaccination chez les animaux vaccinés avec le vaccin monovalent (VLP et inactivé) et chez ceux vaccinés par le vaccin VLP bivalent, sans générer de symptômes secondaires liés à la vaccination, à l'exception de l'apparition de fièvre 24 heures après chaque vaccination (40.07 º C et 40.2 ° C) chez les animaux vaccinés avec un vaccin inactivé (Zulvac BTV1).

CUARTA

Tanto la vacuna inactivada (Zulvac LA1) como las vacunas VLPs, indujeron una RI efectiva que impidió la replicación del virus y su diseminación sanguínea, así como la aparición de sintomatología, lesiones macroscópicas e histopatológicas compatibles con LA tras el desafío con el virus homólogo virulento.

FOURTH

Both the inactivated vaccine (Zulvac BTV1) as the VLPs vaccines induced an effective immune response that prevents the virus replication and spread through the blood and the onset of symptoms, gross and histopathologic lesions compatible with BT after challenge with homologous virulent virus.

QUATRIÈME

Le vaccin inactivé (Zulvac LA1) et les vaccins VLPs, ont induit une réponse immunitaire efficace qui a empêché la réplication du virus et sa propagation dans le sang, ainsi que l'apparition des symptômes, et des lésions macroscopiques et histopathologiques compatibles avec la FCM après défi face au virus virulent homologue.

QUINTA

Las vacunas VLPs produjeron una RI de tipo 1 (Th1) estimulando la vacuna VLP monovalente (LA1) la expresión de IL2 y la vacuna bivalente (LA1 y LA 4) la expresión de IL12. Asimismo, se produjo tras la vacunación con ambas VLPs la activación de los linfocitos que presentan en su membrana el receptor para IL2 (linfocitos T reguladores $CD25^+$), siendo esta activación mayor con la VLP monovalente que con la VLP bivalente.

FIFTH

VLP vaccines produced a Th1 immune response, in which monovalent VLP vaccine (BTV1) stimulates the expression of IL2 whereas the bivalent VLP vaccine (BTV1 +BTV4) stimulates the expression of IL12. Also after immunization with VLPs in both cases occurred the activation of lymphocytes that express the IL2r in membrane ($CD25^+$ regulatory T cells), being this activation greater with the monovalent VLP vaccine than with the bivalent VLP vaccine.

CINQUIÈME

Les vaccins VLPs ont produit une réponse immunitaire de type 1 (Th1) puisque le vaccin VLP monovalent (BTV1) a stimulé l'expression de l'IL2 et le vaccin bivalent (BTV1 et BTV4) a stimulé l'expression de l'IL12. Il s'est également produit, après la vaccination avec ces deux VLPs, l'activation des lymphocytes présentant dans leur membrane le récepteur pour IL2 (cellules T régulatrices $CD25^+$), cette activation étant supérieure avec la VLP monovalente qu'avec la VLP bivalente.

SEXTA

La vacunación con Zulvac LA1 indujo una respuesta de anticuerpos protectora frente al serotipo 1 junto a un incremento de linfocitos B, a diferencia de las vacunas VLPs en las que no se observó el incremento en los linfocitos B.

SIXTH

Vaccination with inactivated vaccine (Zulvac BTV1) induced a protective antibody response against serotype 1 together with an increase in B lymphocytes, unlike VLPs vaccines in which no increase on B lymphocytes was observed.

SIXIÈME

La vaccination avec Zulvac LA1 a induit une réponse d' anticorps protectrice contre le sérotype 1, avec une augmentation des lymphocytes B, contrairement aux vaccins VLP avec lesquels aucune croissance du taux de lymphocytes B n'a été observée.

SÉPTIMA

A diferencia de los sucedido en los animales vacunados con VLPs, tras el desafío con el virus homólogo virulento, las ovejas inmunizadas con la vacuna inactivada (Zulvac LA1), presentaron un nuevo incremento en los niveles de anticuerpos, asociado a un aumento en el porcentaje de linfocitos B, monocitos $CD14^+$, células T reguladoras $CD25^+$ y linfocitos T $CD8^+$, sin que la RT-PCR para detección de ARN vírico fuera positiva en ninguno de los grupos vacunados.

SEVENTH

Unlike the case in animals vaccinated with VLPs, after challenge with the homologous virulent virus, the sheep immunized with inactivated vaccine (ZULVAC LA1) showed again an increase in antibody levels associated with an increase in the percentage of B lymphocytes, CD14 +, CD25 + regulatory T cells and CD8 + T lymphocytes, without positive results for the RT-PCR for detection of viral RNA in any of the vaccinated groups.

SEPTIÈME

A la différence de ce qui a été observé dans le cas des animaux vaccinés avec des VLPs, après le défis avec le virus homologue virulent, les moutons vaccinés avec le vaccin inactivé (Zulvac BTV1), ont montré une nouvelle augmentation des taux d'anticorps, associée à une

augmentation du pourcentage de lymphocytes B, monocytes CD14 +, célules T régulatrices $CD25^+$ et lymphocytes T $CD8^+$, sans que la RT-PCR pour la détection de l'ARN viral soit positive dans aucun des groupes vaccinés.

OCTAVA

Tanto el grupo control de ovejas no vacunadas y desafiadas con serotipo 1 como las desafiadas con el serotipo 4, presentaron síntomas clínicos, lesiones macroscópicas e histopatológicas compatibles con LA, presentado un cuadro más grave las ovejas inoculadas con el serotipo 1 que las ovejas inoculadas con el serotipo 4.

EIGHTH

Both the control group of unvaccinated sheep challenged with serotype 1 and the control group challenged with the serotype 4, showed clinical signs, gross and histopathologic lesions compatible with BT, with presenting a more severe disease in sheep inoculated with serotype 1 that in sheep inoculated with serotype 4.

HUITIÈME

Le groupe de contrôle de moutons non vaccinés ainsi que celui défiés par le sérotype 1 et le sérotype 4, ont montré des signes cliniques, des lésions macroscopiques et histopathologiques compatibles avec la fièvre catarrhale du mouton, présentant une pathologie plus grave les moutons inoculés avec le sérotype 1 que les moutons inoculés avec le sérotype 4.

NOVENA

Las tres vacunas utilizadas en este trabajo (VLP monovalente, VLP bivalente e inactivada monovalente), son capaces de estimular una RI efectiva tanto a nivel celular como humoral, siendo más intensa la respuesta celular observada con la vacuna VLP monovalente que con la VLP bivalente. La RI estimulada por las tres vacunas confiere protección suficiente a los animales para enfrentarse a un desafío con el virus homólogo virulento, presentando mayor eficacia a la hora de evitar la viremia las vacunas monovalentes (VLP e inactivada) que la vacuna VLP bivalente.

NINTH

The three vaccines used in this work (monovalent VLP, bivalent VLP and monovalent inactivated) are capable of stimulating an effective cellular and humoral immune response, being more intense the cellular response observed with monovalent VLP vaccine that with the bivalent VLP. The immune response stimulated by all three vaccines confer enough protection to face the challenge with homologous virulent virus, being more effective in preventing viraemia monovalent vaccines (VLP and inactivated) than the bivalent VLP vaccine.

NEUVIÈME

Les trois vaccins utilisés dans ce travail (VLP monovalent, VLP bivalent et monovalent inactivé) sont capables de stimuler une réponse immunitaire effective au niveau cellulaire et humorale, étant plus intense la réponse cellulaire observée avec le vaccin VLP monovalent que celle avec le vaccin VLP bivalent. La RI stimulée par les trois vaccins confère une protection suffisante aux animaux pour qu'ils fasse face à un défit par virus virulent homologue, présentant une plus grande efficacité dans la prévention de virémie les vaccins monovalents (VLP et inactivés) que le vaccin VLP bivalent.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Abbas, A., Lichtman, AH:, 2003a, Citocinas, In: Inmunología celular y molecular. Elsevier España SA., Madrid, pp. 243-274.

Abbas, A., Lichtman, AH:, 2003b, Células y tejidos del Sistema Inmunitario, In: Inmunología celular y molecular. Elsevier España SA., Madrid, pp. 16-40.

Afshar, A., Thomas, F.C., Wright, P.F., Shapiro, J.L., Anderson, J., 1989, Comparison of competitive ELISA, indirect ELISA and standard AGID tests for detecting blue-tongue virus antibodies in cattle and sheep. Vet Rec 124, 136-141.

Aguero, M., Arias, M., Romero, L.J., Zamora, M.J., Sanchez-Vizcaino, J.M., 2002, Molecular differentiation between NS1 gene of a field strain Bluetongue virus serotype 2 (BTV-2) and NS1 gene of an attenuated BTV-2 vaccine. Vet Microbiol 86, 337-341.

Alba, A., Casal, J., Domingo, M., 2004, Possible introduction of bluetongue into the Balearic Islands, Spain, in 2000, via air streams. Vet Rec 155, 460-461.

Alexander, K.A., MacLachlan, N.J., Kat, P.W., House, C., O'Brien, S.J., Lerche, N.W., Sawyer, M., Frank, L.G., Holekamp, K., Smale, L., et al., 1994, Evidence of natural bluetongue virus infection among African carnivores. Am J Trop Med Hyg 51, 568-576.

Allepuz, A., Garcia-Bocanegra, I., Napp, S., Casal, J., Arenas, A., Saez, M., Gonzalez, M.A., 2010, Monitoring bluetongue disease (BTV-1) epidemic in southern Spain during 2007. Prev Vet Med 96, 263-271.

ANCGM. 2011. **http://www.razamerina.com/laraza/laraza.html** (Madrid).

Anderson, E.C., Rowe, L.W., 1998, The prevalence of antibody to the viruses of bovine virus diarrhoea, bovine herpes virus 1, rift valley fever, ephemeral fever and bluetongue and to Leptospira sp in free-ranging wildlife in Zimbabwe. Epidemiol Infect 121, 441-449.

Anderson, G.A., Stott, J.L., Gershwin, L.J., Osburn, B.I., 1987, Identification of bluetongue virus-specific immunoglobulin E in cattle. J Gen Virol 68 (Pt 9), 2509-2514.

Andrew, M., Whiteley, P., Janardhana, V., Lobato, Z., Gould, A., Coupar, B., 1995, Antigen specificity of the ovine cytotoxic T lymphocyte response to bluetongue virus. Vet Immunol Immunopathol 47, 311-322.

Antal-Szalmas, P., 2000, Evaluation of CD14 in host defence. Eur J Clin Invest 30, 167-179.

Arenas, A.J., Gomez, F., Salas, R., Carrasco, P., Borge, C., Maldonado, A., O'Brien, D.J., Martinez-Moreno, F.J., 2002, An evaluation of the application of infrared thermal imaging to the tele-diagnosis of sarcoptic mange in the Spanish ibex (Capra pyrenaica). Vet Parasitol 109, 111-117.

Arjona, A., 2006, Células implicadas en la Respuesta Inmune, In: Manual de Inmunologia Veterinaria. Pearson Educación S.A., Madrid, pp. 41-62.

Arora, S.K., 2002, Analysis of intracellular cytokines using flowcytometry. Methods Cell Sci 24, 37-40.

Aucouturier, J., Dupuis, L., Ganne, V., 2001, Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. Vaccine 19, 2666-2672.

Bach, E.A., Aguet, M., Schreiber, R.D., 1997, The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. Annu Rev Immunol 15, 563-591.

Barratt-Boyes, S.M., Rossitto, P.V., Stott, J.L., MacLachlan, N.J., 1992, Flow cytometric analysis of in vitro bluetongue virus infection of bovine blood mononuclear cells. J Gen Virol 73 (Pt 8), 1953-1960.

Barratt-Boyes, S.M., Rossitto, P.V., Taylor, B.C., Ellis, J.A., MacLachlan, N.J., 1995, Response of the regional lymph node to bluetongue virus infection in calves. Vet Immunol Immunopathol 45, 73-84.

Batten, C.A., Maan, S., Shaw, A.E., Maan, N.S., Mertens, P.P., 2008, A European field strain of bluetongue virus derived from two parental vaccine strains by genome segment reassortment. Virus Res 137, 56-63.

Belhouchet, M., Mohd Jaafar, F., Firth, A.E., Grimes, J.M., Mertens, P.P., Attoui, H., 2011, Detection of a fourth orbivirus non-structural protein. PLoS One 6, e25697.

Belyaev, A.S., Roy, P., 1993, Development of baculovirus triple and quadruple expression vectors: co-expression of three or four bluetongue virus proteins and the synthesis of bluetongue virus-like particles in insect cells. Nucleic Acids Res 21, 1219-1223.

Birner, J., Garnet, J.R., 1964, Thimerosal as a Preservative in Biological Preparations. 3. Factors Affecting the Concentration of Thimerosal in Aqueous Solutions and in Vaccines Stored in Rubber-Capped Bottles. J Pharm Sci 53, 1424-1426.

Biron, C.A., 1998, Role of early cytokines, including alpha and beta interferons (IFN-alpha/beta), in innate and adaptive immune responses to viral infections. Semin Immunol 10, 383-390.

Bitar, D., Goubar, A., Desenclos, J.C., 2009, International travels and fever screening during epidemics: a literature review on the effectiveness and potential use of non-contact infrared thermometers. Euro Surveill 14.

Blacksell, S.D., Lunt, R.A., 1996, A simplified fluorescence inhibition test for the serotype determination of Australian bluetongue viruses. Aust Vet J 73, 33-34.

Blanco Gutierrez, M., 2006, Inmunidad frente a virus, In: Manual de Inmunologia Veterinaria. Pearson Educación S.A., Madrid.

Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., Howard, J.C., 1997, Cellular responses to interferon-gamma. Annu Rev Immunol 15, 749-795.

Boone, J.D., Balasuriya, U.B., Karaca, K., Audonnet, J.C., Yao, J., He, L., Nordgren, R., Monaco, F., Savini, G., Gardner, I.A., Maclachlan, N.J., 2007, Recombinant canarypox virus vaccine co-expressing genes encoding the VP2 and VP5 outer capsid proteins of bluetongue virus induces high level protection in sheep. Vaccine 25, 672-678.

Boppana, D.K., Dhinakar Raj, G., John, L., Wikel, S.K., Latha, B.R., Gomathinayagam, S., 2004, In vivo immunomodulatory effects of ixodid ticks on ovine circulating T- and B-lymphocytes. Parasite Immunol 26, 83-93.

Bowen, R.A., Howard, T.H., Entwistle, K.W., Pickett, B.W., 1983, Seminal shedding of bluetongue virus in experimentally infected mature bulls. Am J Vet Res 44, 2268-2270.

Bowen, R.A., Howard, T.H., Pickett, B.W., 1985, Seminal shedding of bluetongue virus in experimentally infected bulls. Prog Clin Biol Res 178, 91-96.

Breard, E., Pozzi, N., Sailleau, C., Durand, B., Catinot, V., Sellem, E., Dumont, P., Guerin, B., Zientara, S., 2007, Transient adverse effects of an attenuated bluetongue virus vaccine on the quality of ram semen. Vet Rec 160, 431-435.

Brodersen, R., Bijlsma, F., Gori, K., Jensen, K.T., Chen, W., Dominguez, J., Haverson, K., Moore, P.F., Saalmuller, A., Sachs, D., Slierendrecht, W.J., Stokes, C., Vainio, O., Zuckermann, F., Aasted, B., 1998, Analysis of the immunological cross reactivities of 213 well characterized monoclonal antibodies with specificities against various leucocyte surface antigens of human and 11 animal species. Vet Immunol Immunopathol 64, 1-13.

Brunda, M.J., 1994, Interleukin-12. J Leukoc Biol 55, 280-288.

Buchan, G.S., Grimmett, D.J., Griffin, J.F., 1991, Cervine T-lymphocyte growth factors and their measurement in tuberculosis. Vet Immunol Immunopathol 29, 115-126.

Budhia, S., Haring, L.F., McConnell, I., Blacklaws, B.A., 2006, Quantitation of ovine cytokine mRNA by real-time RT-PCR. J Immunol Methods 309, 160-172.

Bujdoso, R., Lund, B.T., Evans, C.W., McConnell, I., 1993, Different rates of interleukin 2 receptor expression by ovine gamma/delta and alpha/beta T cells. Vet Immunol Immunopathol 39, 109-114.

Bustin, S.A., 2000, Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. J Mol Endocrinol 25, 169-193.

Bustin, S.A., 2002, Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. J Mol Endocrinol 29, 23-39.

Bustin, S.A., Nolan, T., 2004, Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. J Biomol Tech 15, 155-166.

Calistri, P., Goffredo, M., Caporale, V., Meiswinkel, R., 2003, The distribution of Culicoides imicola in Italy: application and evaluation of current Mediterranean models based on climate. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 50, 132-138.

Calistri, P., Giovannini, A., Savini, G., Bonfanti, L., Cordioli, P., Lelli, R., Caporale, V., 2010, Antibody response in cattle vaccinated against bluetongue serotype 8 in Italy. Transbound Emerg Dis 57, 180-184.

Calvete, C., Miranda, M.A., Estrada, R., Borras, D., Sarto i Monteys, V., Collantes, F., Garcia-de-Francisco, J.M., Moreno, N., Lucientes, J., 2006, Spatial distribution of Culicoides imicola, the main vector of bluetongue virus, in Spain. Vet Rec 158, 130-131.

Cámara-Pellisó, S., 2007. Evaluación de los oefectos inmunotoxicológicos de contaminates ambientales en las células del delfín mular Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

Caporale, V., Giovannini, A., Patta, C., Calistri, P., Nannini, D., Santucci, U., 2004, Vaccination in the control strategy of bluetongue in Italy. Dev Biol (Basel) 119, 113-127.

Clavijo, A., Heckert, R.A., Dulac, G.C., Afshar, A., 2000a, Isolation and identification of bluetongue virus. J Virol Methods 87, 13-23.

Clavijo, A., Munroe, F., Zhou, E.M., Booth, T.F., Roblesky, K., 2000b, Incursion of bluetongue virus into the Okanagan Valley, British Columbia. Can Vet J 41, 312-314.

Coen, M.L., Ellis, J.A., O'Toole, D.T., Wilson, W.C., 1991, Cytokine modulation of the interaction between bluetongue virus and endothelial cells in vitro. Vet Pathol 28, 524-532.

Comisión de la Unión Europea 2002. Decisión 2002/906/CE por la que se modifica la Decisión 2001/783/CE relativa a las zonas de protección y de vigilancia en relación con la fiebre catarral ovina en Italia (Diario Oficial de las Comunidades Europeas).

Consejo de la Unión Europea 2000. Directiva 2000/75 por la que se aprueban disposiciones específicas relativas a las medidas de lucha y erradicación de la fiebre catarral ovina (Diario Oficial de las Comunidades Europeas).

Cowley, J.A., Gorman, B.M., 1987, Genetic reassortants for identification of the genome segment coding for the bluetongue virus hemagglutinin. J Virol 61, 2304-2306.

Craig, N.M., Miller, H.R., Smith, W.D., Knight, P.A., 2007, Cytokine expression in naive and previously infected lambs after challenge with Teladorsagia circumcincta. Vet Immunol Immunopathol 120, 47-54.

Cresswell, P., Lanzavecchia, A., 2001, Antigen processing and recognition. Curr Opin Immunol 13, 11-12.

Crick, F., 1970, Central dogma of molecular biology. Nature 227, 561-563.

Cutuli de Simón, M., 2006, Inmunidad innata, In: Manual de Inmunologia Veterinaria. Pearson Educación S.A., Madrid.

Chaignat, V., Worwa, G., Scherrer, N., Hilbe, M., Ehrensperger, F., Batten, C., Cortyen, M., Hofmann, M., Thuer, B., 2009, Toggenburg Orbivirus, a new bluetongue virus: initial detection, first observations in field and experimental infection of goats and sheep. Vet Microbiol 138, 11-19.

Channappanavar, R., Singh, K.P., Singh, R., Umeshappa, C.S., Ingale, S.L., Pandey, A.B., 2011, Enhanced proinflammatory cytokine activity during experimental bluetongue virus-1 infection in Indian native sheep. Vet Immunol Immunopathol.

Chavez-Galan, L., Arenas-Del Angel, M.C., Zenteno, E., Chavez, R., Lascurain, R., 2009, Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. Cell Mol Immunol 6, 15-25.

Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 162, 156-159.

D'Andrea, A., Aste-Amezaga, M., Valiante, N.M., Ma, X., Kubin, M., Trinchieri, G., 1993, Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. J Exp Med 178, 1041-1048.

Dalod, M., Hamilton, T., Salomon, R., Salazar-Mather, T.P., Henry, S.C., Hamilton, J.D., Biron, C.A., 2003, Dendritic cell responses to early murine cytomegalovirus infection: subset functional specialization and differential regulation by interferon alpha/beta. J Exp Med 197, 885-898.

Darpel, K., Monaghan, P., Anthony, SJ., Takamatsu, H., Mertens, PC., 2009, Bluetongue virus in the mammalian host and the induced immune response, In: Mertens, P.P., Baylis, M., Mellor, P. (Ed.) Bluetongue. Academic Press, Saint Louis, pp. 265-284.

Davidson, W.R., Crum, J.M., Blue, J.L., Sharp, D.W., Phillips, J.H., 1985, Parasites, diseases, and health status of sympatric populations of fallow deer and white-tailed deer in Kentucky. J Wildl Dis 21, 153-159.

Davies, F.G., Walker, A.R., 1974, The distribution in Kenya of bluetongue virus and antibody, and the Culicoides vector. J Hyg (Lond) 72, 265-272.

Davis, W.C., Brown, W.C., Hamilton, M.J., Wyatt, C.R., Orden, J.A., Khalid, A.M., Naessens, J., 1996, Analysis of monoclonal antibodies specific for the gamma delta TcR. Vet Immunol Immunopathol 52, 275-283.

De Clercq, K., Vandenbussche, F., Vandemeulebroucke, E., Vanbinst, T., De Leeuw, I., Verheyden, B., Goris, N., Mintiens, K., Meroc, E., Herr, C., Hooybergs, J., Houdart, P., Sustronck, B., De Deken,

R., Maquet, G., Bughin, J., Saulmont, M., Lebrun, M., Bertels, G., Miry, C., 2008, Transplacental bluetongue infection in cattle. Vet Rec 162, 564.

DeMaula, C.D., Leutenegger, C.M., Bonneau, K.R., MacLachlan, N.J., 2002, The role of endothelial cell-derived inflammatory and vasoactive mediators in the pathogenesis of bluetongue. Virology 296, 330-337.

Desmecht, D., Bergh, R.V., Sartelet, A., Leclerc, M., Mignot, C., Misse, F., Sudraud, C., Berthemin, S., Jolly, S., Mousset, B., Linden, A., Coignoul, F., Cassart, D., 2008, Evidence for transplacental transmission of the current wild-type strain of bluetongue virus serotype 8 in cattle. Vet Rec 163, 50-52.

Di Emidio, B., Nicolussi, P., Patta, C., Ronchi, G.F., Monaco, F., Savini, G., Ciarelli, A., Caporale, V., 2004, Efficacy and safety studies on an inactivated vaccine against bluetongue virus serotype 2. Vet Ital 40, 640-644.

Dinarello, C.A., 1984, Interleukin-1. Rev Infect Dis 6, 51-95.

Du Toit, R., 1944, The transmission of bluetongue and horse-sickness by Culicoides. Onderstepoort J. Vet. Sci. Anim. Ind. 19, 7-16.

Dunbar, M.R., Cunningham, M.W., Roof, J.C., 1998, Seroprevalence of selected disease agents from free-ranging black bears in Florida. J Wildl Dis 34, 612-619.

Eddy, A.L., Van Hoogmoed, L.M., Snyder, J.R., 2001, The role of thermography in the management of equine lameness. Vet J 162, 172-181.

Elbers, A.R., Backx, A., Ekker, H.M., van der Spek, A.N., van Rijn, P.A., 2008, Performance of clinical signs to detect bluetongue virus serotype 8 outbreaks in cattle and sheep during the 2006-epidemic in The Netherlands. Vet Microbiol 129, 156-162.

Elhmouzi-Younes, J., Boysen, P., Pende, D., Storset, A.K., Le Vern, Y., Laurent, F., Drouet, F., 2010, Ovine CD16+/CD14- blood lymphocytes present all the major characteristics of natural killer cells. Vet Res 41, 4.

Ellis, J.A., Luedke, A.J., Davis, W.C., Wechsler, S.J., Mecham, J.O., Pratt, D.L., Elliott, J.D., 1990, T lymphocyte subset alterations following bluetongue virus infection in sheep and cattle. Vet Immunol Immunopathol 24, 49-67.

Erasmus, B.J., 1975, Bluetongue in sheep and goats. Aust Vet J 51, 165-170.

Eschbaumer, M., Hoffmann, B., Konig, P., Teifke, J.P., Gethmann, J.M., Conraths, F.J., Probst, C., Mettenleiter, T.C., Beer, M., 2009, Efficacy of three inactivated vaccines against bluetongue virus serotype 8 in sheep. Vaccine 27, 4169-4175.

Evermann, J.F., McKeirnan, A.J., Wilbur, L.A., Levings, R.L., Trueblood, E.S., Baldwin, T.J., Hughbanks, F.G., 1994, Canine fatalities associated with the use of a modified live vaccine administered during late stages of pregnancy. J Vet Diagn Invest 6, 353-357.

Fischer-Tenhagen, C., Hamblin, C., Quandt, S., Frolich, K., 2000, Serosurvey for selected infectious disease agents in free-ranging black and white rhinoceros in Africa. J Wildl Dis 36, 316-323.

Flynn, R.J., Mulcahy, G., 2008, The roles of IL-10 and TGF-beta in controlling IL-4 and IFN-gamma production during experimental Fasciola hepatica infection. Int J Parasitol 38, 1673-1680.

Foster, N.M., Luedke, A.J., Parsonson, I.M., Walton, T.E., 1991, Temporal relationships of viremia, interferon activity, and antibody responses of sheep infected with several bluetongue virus strains. Am J Vet Res 52, 192-196.

French, T.J., Marshall, J.J., Roy, P., 1990, Assembly of double-shelled, viruslike particles of bluetongue virus by the simultaneous expression of four structural proteins. J Virol 64, 5695-5700.

Frolich, K., Hamblin, C., Jung, S., Ostrowski, S., Mwanzia, J., Streich, W.J., Anderson, J., Armstrong, R.M., Anajariyah, S., 2005, Serologic surveillance for selected viral agents in captive and free-ranging populations of Arabian oryx (Oryx leucoryx) from Saudi Arabia and the United Arab Emirates. J Wildl Dis 41, 67-79.

Gane, P., 2002, [Flow cytometry in immunohematology]. Transfus Clin Biol 9, 271-279.

Garcia-Bocanegra, I., Arenas-Montes, A., Lorca-Oro, C., Pujols, J., Gonzalez, M.A., Napp, S., Gomez-Guillamon, F., Zorrilla, I., Miguel, E.S., Arenas, A., 2011, Role of wild ruminants in the epidemiology of bluetongue virus serotypes 1, 4 and 8 in Spain. Vet Res 42, 88.

García Cabrera, J., 2006, Citoquinas, In: Manual de Inmunologia Veterinaria. Pearson Educación S.A., Madrid, pp. 210-228.

García, L., Paradell, H., Mouriño, M., Urniza, A., Vila, A,. Tarrats, M., Alberca, B., San Miguel, E., Agüero, M., Ruano, MJ., Gómez-Tejedor, C., Plana-Durán, J., 2010. Is there a correlation between neutralizing antibody titers in animals vaccinated with different bluetongue Zulvac ® vaccines and prevention of viremia? In: EPIZONE Meeting., Saint Malo, France, 7-10 June 2010.

Gautam, M., Saha, S., Bani, S., Kaul, A., Mishra, S., Patil, D., Satti, N.K., Suri, K.A., Gairola, S., Suresh, K., Jadhav, S., Qazi, G.N., Patwardhan, B., 2009, Immunomodulatory activity of Asparagus racemosus on systemic Th1/Th2 immunity: implications for immunoadjuvant potential. J Ethnopharmacol 121, 241-247.

Germain, R.N., 1994, MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. Cell 76, 287-299.

Gerosa, F., Paganin, C., Peritt, D., Paiola, F., Scupoli, M.T., Aste-Amezaga, M., Frank, I., Trinchieri, G., 1996, Interleukin-12 primes human CD4 and CD8 T cell clones for high production of both interferon-gamma and interleukin-10. J Exp Med 183, 2559-2569.

Gerss-Dülmer, H., Krmaer, M., Beer, M., Blome, S., Moenning, V., Infrared Thermography - a reliable tool to select suspicius animals during animal disease outbreaks?

Gethmann, J., Huttner, K., Heyne, H., Probst, C., Ziller, M., Beer, M., Hoffmann, B., Mettenleiter, T.C., Conraths, F.J., 2009, Comparative safety study of three inactivated BTV-8 vaccines in sheep and cattle under field conditions. Vaccine 27, 4118-4126.

Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., Mathieu, C., 2001, An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. Methods 25, 386-401.

Glare, E.M., Divjak, M., Bailey, M.J., Walters, E.H., 2002, beta-Actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels. Thorax 57, 765-770.

Gohin, I., Olivier, M., Lantier, I., Pepin, M., Lantier, F., 1997, Analysis of the immune response in sheep efferent lymph during Salmonella abortusovis infection. Vet Immunol Immunopathol 60, 111-130.

Gold, M.R., 2002, To make antibodies or not: signaling by the B-cell antigen receptor. Trends Pharmacol Sci 23, 316-324.

Grandin, T., 1997, Assessment of stress during handling and transport. J Anim Sci 75, 249-257.

Grimes, J.M., Burroughs, J.N., Gouet, P., Diprose, J.M., Malby, R., Zientara, S., Mertens, P.P., Stuart, D.I., 1998, The atomic structure of the bluetongue virus core. Nature 395, 470-478.

Gromme, M., Uytdehaag, F.G., Janssen, H., Calafat, J., van Binnendijk, R.S., Kenter, M.J., Tulp, A., Verwoerd, D., Neefjes, J., 1999, Recycling MHC class I molecules and endosomal peptide loading. Proc Natl Acad Sci U S A 96, 10326-10331.

Gutierrez, M., Forster, F.I., McConnell, S.A., Cassidy, J.P., Pollock, J.M., Bryson, D.G., 1999, The detection of CD2+, CD4+, CD8+, and WC1+ T lymphocytes, B cells and macrophages in fixed and paraffin embedded bovine tissue using a range of antigen recovery and signal amplification techniques. Vet Immunol Immunopathol 71, 321-334.

Hamers, C., Rehbein, S., Hudelet, P., Blanchet, M., Lapostolle, B., Cariou, C., Duboeuf, M., Goutebroze, S., 2009, Protective duration of immunity of an inactivated bluetongue (BTV) serotype 2 vaccine against a virulent BTV serotype 2 challenge in sheep. Vaccine 27, 2789-2793.

Hanrahan, C.F., Kimpton, W.G., Howard, C.J., Parsons, K.R., Brandon, M.R., Andrews, A.E., Nash, A.D., 1997, Cellular requirements for the activation and proliferation of ruminant gammadelta T cells. J Immunol 159, 4287-4294.

Harbo, S.J., Barrington, G.M., Allen, A.J., Sample, G.L., Parish, S.M., Hamilton, M.J., Davis, W.C., 2004, Characterization of lymphocyte populations by flow cytometry in a calf with sporadic juvenile lymphoma. Vet Clin Pathol 33, 163-167.

Hardy, W.T., Price, D.A., 1952, Soremuzzle of sheep. J Am Vet Med Assoc 120, 23-25.

Hassan, S.S., Roy, P., 1999, Expression and functional characterization of bluetongue virus VP2 protein: role in cell entry. J Virol 73, 9832-9842.

Hawrylowicz, C.M., O'Garra, A., 2005, Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. Nat Rev Immunol 5, 271-283.

Head, J.F., Wang, F., Elliott, R.L., 1993, Breast thermography is a noninvasive prognostic procedure that predicts tumor growth rate in breast cancer patients. Ann N Y Acad Sci 698, 153-158.

Hein, W.R., Dudler, L., Mackay, C.R., 1989, Surface expression of differentiation antigens on lymphocytes in the ileal and jejunal Peyer's patches of lambs. Immunology 68, 365-370.

Hemati, B., Contreras, V., Urien, C., Bonneau, M., Takamatsu, H.H., Mertens, P.P., Breard, E., Sailleau, C., Zientara, S., Schwartz-Cornil, I., 2009, Bluetongue virus targets conventional dendritic cells in skin lymph. J Virol 83, 8789-8799.

Hirano, T., 1983, [Interleukin 2]. Gan To Kagaku Ryoho 10, 1909-1918.

Ho-Pun-Cheung, A., Cellier, D., Lopez-Crapez, E., 2008, [Considerations for normalisation of RT-qPCR in oncology]. Ann Biol Clin (Paris) 66, 121-129.

Hoefsmit, E.C., Duijvestijn, A.M., Kamperdijk, E.W., 1982, Relation between langerhans cells, veiled cells, and interdigitating cells. Immunobiology 161, 255-265.

Hofmann, M.A., Renzullo, S., Mader, M., Chaignat, V., Worwa, G., Thuer, B., 2008, Genetic characterization of toggenburg orbivirus, a new bluetongue virus, from goats, Switzerland. Emerg Infect Dis 14, 1855-1861.

Hourrigan, J.L., Klingsporn, A.L., 1975, Bluetongue: the disease in cattle. Aust Vet J 51, 170-174.

House, J.A., Groocock, C.M., Campbell, C.H., 1982, Antibodies to bluetongue viruses in animals imported into United States zoological gardens. Can J Comp Med 46, 154-159.

Howell, P.G., Verwoerd, D.W., 1971, Bluetongue virus. Virol Monogr 9, 35-74.

Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., Zumla, A., 2005, Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. Genes Immun 6, 279-284.

Huismans, H., Bremer, C.W., 1981, A comparison of an australian bluetongue virus isolate (CSIRO 19) with other bluetongue virus serotypes by cross-hybridization and cross-immune precipitation. Onderstepoort J Vet Res 48, 59-67.

Huismans, H., Erasmus, B.J., 1981, Identification of the serotype-specific and group-specific antigens of bluetongue virus. Onderstepoort J Vet Res 48, 51-58.

Huismans, H., van Dijk, A.A., Bauskin, A.R., 1987, In vitro phosphorylation and purification of a nonstructural protein of bluetongue virus with affinity for single-stranded RNA. J Virol 61, 3589-3595.

Hyatt, A.D., Zhao, Y., Roy, P., 1993, Release of bluetongue virus-like particles from insect cells is mediated by BTV nonstructural protein NS3/NS3A. Virology 193, 592-603.

Iglesias, E., Franch, O., Carrazana, Y., Lobaina, Y., Garcia, D., Sanchez, J., Garcia, J., Urquiza, D., Muzio, V., Guillen, G., Aguilar, J.C., 2006, Influence of aluminum-based adjuvant on the immune response to multiantigenic formulation. Viral Immunol 19, 712-721.

Inumaru, S., Ghiasi, H., Roy, P., 1987, Expression of bluetongue virus group-specific antigen VP3 in insect cells by a baculovirus vector: its use for the detection of bluetongue virus antibodies. J Gen Virol 68 (Pt 6), 1627-1635.

Invitrogen 2008. Real-Time PCR: From theory to practice.

IPCS 2006. Bromuro de Etidio. In Fichas Internacionales de Seguridad Química (INSHT).

Jeggo, M.H., Gumm, I.D., Taylor, W.P., 1983, Clinical and serological response of sheep to serial challenge with different bluetongue virus types. Res Vet Sci 34, 205-211.

Jeggo, M.H., Wardley, R.C., Brownlie, J., 1984a, A study of the role of cell-mediated immunity in bluetongue virus infection in sheep, using cellular adoptive transfer techniques. Immunology 52, 403-410.

Jeggo, M.H., Wardley, R.C., Taylor, W.P., 1984b, Clinical and serological outcome following the simultaneous inoculation of three bluetongue virus types into sheep. Res Vet Sci 37, 368-370.

Jeggo, M.H., Wardley, R.C., Brownlie, J., 1985, Importance of ovine cytotoxic T cells in protection against bluetongue virus infection. Prog Clin Biol Res 178, 477-487.

Jeggo, M.H., Wardley, R.C., Brownlie, J., Corteyn, A.H., 1986, Serial inoculation of sheep with two bluetongue virus types. Res Vet Sci 40, 386-392.

Jiang, L.J., Ng, E.Y., Yeo, A.C., Wu, S., Pan, F., Yau, W.Y., Chen, J.H., Yang, Y., 2005, A perspective on medical infrared imaging. J Med Eng Technol 29, 257-267.

Jondal, M., Schirmbeck, R., Reimann, J., 1996, MHC class I-restricted CTL responses to exogenous antigens. Immunity 5, 295-302.

Kania, S.A., 2008, Flow cytometry applications for exotic animals. Vet Clin North Am Exot Anim Pract 11, 583-595, viii.

Kastberger, G., Stachl, R., 2003, Infrared imaging technology and biological applications. Behav Res Methods Instrum Comput 35, 429-439.

Katz, J., Alstad, D., Gustafson, G., Evermann, J., 1994, Diagnostic analysis of the prolonged bluetongue virus RNA presence found in the blood of naturally infected cattle and experimentally infected sheep. J Vet Diagn Invest 6, 139-142.

Kemp, G.E., Causey, O.R., Setzer, H.W., Moore, D.L., 1974, Isolation of viruses from wild mammals in West Africa, 1966-1970. J Wildl Dis 10, 279-293.

Kirkland, P.D., Melville, L.F., Hunt, N.T., Williams, C.F., Davis, R.J., 2004, Excretion of bluetongue virus in cattle semen: a feature of laboratory-adapted virus. Vet Ital 40, 497-501.

Klein, D., 2002, Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. Trends Mol Med 8, 257-260.

Koch, F., Stanzl, U., Jennewein, P., Janke, K., Heufler, C., Kampgen, E., Romani, N., Schuler, G., 1996, High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. J Exp Med 184, 741-746.

Konnai, S., Usui, T., Ohashi, K., Onuma, M., 2003, The rapid quantitative analysis of bovine cytokine genes by real-time RT-PCR. Vet Microbiol 94, 283-294.

Koumbati, M., Mangana, O., Nomikou, K., Mellor, P.S., Papadopoulos, O., 1999, Duration of bluetongue viraemia and serological responses in experimentally infected European breeds of sheep and goats. Vet Microbiol 64, 277-285.

Kramer, J., 2000, Normal Hematology of Cattle, Sheep, and Goats, In: Publishers, B. (Ed.) Schalm's Veterinary Hematology.philadelphia.

Kramer, W.L., Greiner, E.C., Gibbs, E.P., 1985, Seasonal variations in population size, fecundity, and parity rates of Culicoides insignis (Diptera: Ceratopogonidae) in Florida, USA. J Med Entomol 22, 163-169.

Kubin, M., Chow, J.M., Trinchieri, G., 1994, Differential regulation of interleukin-12 (IL-12), tumor necrosis factor alpha, and IL-1 beta production in human myeloid leukemia cell lines and peripheral blood mononuclear cells. Blood 83, 1847-1855.

Kukielka, D., Esperon, F., Higes, M., Sanchez-Vizcaino, J.M., 2008, A sensitive one-step real-time RT-PCR method for detection of deformed wing virus and black queen cell virus in honeybee Apis mellifera. J Virol Methods 147, 275-281.

Kukielka, D., Sanchez-Vizcaino, J.M., 2009, One-step real-time quantitative PCR assays for the detection and field study of Sacbrood honeybee and Acute bee paralysis viruses. J Virol Methods 161, 240-246.

Larsen, R.A., Monaghan, M.L., Park, Y.H., Hamilton, M.J., Ellis, J.A., Davis, W.C., 1990, Identification and characterization of monoclonal antibodies reactive with bovine, caprine and ovine T-lymphocyte determinants by flow microfluorimetry. Vet Immunol Immunopathol 25, 195-208.

Le Blois, H., French, T., Mertens, P.P., Burroughs, J.N., Roy, P., 1992, The expressed VP4 protein of bluetongue virus binds GTP and is the candidate guanylyl transferase of the virus. Virology 189, 757-761.

Li, B., Oledzka, G., McFarlane, R.G., Spellerberg, M.B., Smith, S.M., Gelder, F.B., Kur, J., Stankiewicz, M., 2010, Immunological response of sheep to injections of plasmids encoding Toxoplasma gondii SAG1 and ROP1 genes. Parasite Immunol 32, 671-683.

Li, Y.P., Bang, D.D., Handberg, K.J., Jorgensen, P.H., Zhang, M.F., 2005, Evaluation of the suitability of six host genes as internal control in real-time RT-PCR assays in chicken embryo cell cultures infected with infectious bursal disease virus. Vet Microbiol 110, 155-165.

Lobato, Z.I., Coupar, B.E., Gray, C.P., Lunt, R., Andrew, M.E., 1997, Antibody responses and protective immunity to recombinant vaccinia virus-expressed bluetongue virus antigens. Vet Immunol Immunopathol 59, 293-309.

Losson, B., Mignon, B., Paternostre, J., Madder, M., De Deken, R., De Deken, G., Deblauwe, I., Fassotte, C., Cors, R., Defrance, T., Delecolle, J.C., Baldet, T., Haubruge, E., Frederic, F., Bortels, J., Simonon, G., 2007, Biting midges overwintering in Belgium. Vet Rec 160, 451-452.

Loudon, P.T., Hirasawa, T., Oldfield, S., Murphy, M., Roy, P., 1991, Expression of the outer capsid protein VP5 of two bluetongue viruses, and synthesis of chimeric double-shelled virus-like particles using combinations of recombinant baculoviruses. Virology 182, 793-801.

Luedke, A.J., Anakwenze, E.I., 1972, Bluetongue virus in goats. Am J Vet Res 33, 1739-1745.

Ma, X., Chow, J.M., Gri, G., Carra, G., Gerosa, F., Wolf, S.F., Dzialo, R., Trinchieri, G., 1996, The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells. J Exp Med 183, 147-157.

Maan, S., Maan, N.S., Samuel, A.R., Rao, S., Attoui, H., Mertens, P.P., 2007, Analysis and phylogenetic comparisons of full-length VP2 genes of the 24 bluetongue virus serotypes. J Gen Virol 88, 621-630.

Maan, S., Maan, N.S., Nomikou, K., Batten, C., Antony, F., Belaganahalli, M.N., Samy, A.M., Reda, A.A., Al-Rashid, S.A., El Batel, M., Oura, C.A., Mertens, P.P., 2011a, Novel bluetongue virus serotype from Kuwait. Emerg Infect Dis 17, 886-889.

Maan, S., Maan, N.S., Nomikou, K., Veronesi, E., Bachanek-Bankowska, K., Belaganahalli, M.N., Attoui, H., Mertens, P.P., 2011b, Complete genome characterisation of a novel 26th bluetongue virus serotype from kuwait. PLoS One 6, e26147.

Mackay, C.R., Hein, W.R., Brown, M.H., Matzinger, P., 1988, Unusual expression of CD2 in sheep: implications for T cell interactions. Eur J Immunol 18, 1681-1688.

MacLachlan, N.J., 2004, Bluetongue: pathogenesis and duration of viraemia. Vet Ital 40, 462-467.

Maclachlan, N.J., Drew, C.P., Darpel, K.E., Worwa, G., 2009, The pathology and pathogenesis of bluetongue. J Comp Pathol 141, 1-16.

Maclachlan, N.J., 2011, Bluetongue: history, global epidemiology, and pathogenesis. Prev Vet Med 102, 107-111.

Maclachlan, N.J., Gard, G., 2009, Clinical signs and pathology, In: Mertens, P.P., Baylis, M., Mellor, P. (Ed.) Bluetongue. Academic Press, Saint Louis, pp. 285-293.

MAF, 2009, Exotic disease focus: bluetongue. Surveillance 36, 3-5.

MAPA. 2001. Real Decreto 1228/2001, por el que se establecen medidas específicas de lucha y erradicación de la fiebre catarral ovina o lengua azul. (Boletin Oficial del Estado).

MAPA. 2007. Real Decreto 617/2007,por el que se establece la lista de las enfermedades de los animales de declaración obligatoria y se regula su notificación. (Boletin Oficial del Estado).

MARM 2009a. Caracterización del sector ovino y caprino en España., GANADEROS, S.G.D.P., ed. (MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE Y MEDIO RURAL Y MARINO).

MARM 2009b. Caracterización del sector vacuno de carne en España., GANADEROS, S.G.D.P., ed. (MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE Y MEDIO RURAL Y MARINO).

MARM. 2008. Manual práctico de operaciones en la lucha contra la Lengua Azul (LA).

Martinez-Lopez, B., Linares F., Martinez, M., Mur, L., Rodriguez, V., Sánchez-Vizcaíno, JM. 2009. Evaluación y cuantificación de las consecuencias de la enfermedad de la Lengua Azul en España. In Convenio de Colaboración ENESA-UCM (Madrid).

Martínez, A., De la Torre, A., Sánchez-Vizcaíno, J.M. 2005. Distribución geográfica de la Lengua Azul. In Ovis.

Martínez, A., Sánchez-Vizcaíno, J.M. 2005. Características epidemiológicas de la Lengua Azul. In Ovis.

McKercher, D.G., McGowan, B., Howarth, J.A., Saito, J.K., 1953, A preliminary report on the isolation and identification of the bluetongue virus from sheep in California. J Am Vet Med Assoc 122, 300-301.

Melero M., Casado S., Sánchez-Vizcaíno JM., 2009, Application of the thermography for the valuation of the fertility in eggs of *falco naumanni*. Revista Complutense de Ciencias Veterinarias 3, 60-68.

Mellor, P.S., Jennings, D.M., Wilkinson, P.J., Boorman, J.P., 1985, Culicoides imicola: a bluetongue virus vector in Spain and Portugal. Vet Rec 116, 589-590.

Mellor, P.S., 1990, The replication of bluetongue virus in Culicoides vectors. Curr Top Microbiol Immunol 162, 143-161.

Mellor, P.S., Boorman, J., 1995, The transmission and geographical spread of African horse sickness and bluetongue viruses. Ann Trop Med Parasitol 89, 1-15.

Menzies, F.D., McCullough, S.J., McKeown, I.M., Forster, J.L., Jess, S., Batten, C., Murchie, A.K., Gloster, J., Fallows, J.G., Pelgrim, W., Mellor, P.S., Oura, C.A., 2008, Evidence for transplacental and contact transmission of bluetongue virus in cattle. Vet Rec 163, 203-209.

Mertens, P.P., Pedley, S., Cowley, J., Burroughs, J.N., Corteyn, A.H., Jeggo, M.H., Jennings, D.M., Gorman, B.M., 1989, Analysis of the roles of bluetongue virus outer capsid proteins VP2 and VP5 in determination of virus serotype. Virology 170, 561-565.

Mertens, P.P.C., Maan, S., Samuel A., Attoui., H., 2004, Orbivirus, Reoviridae., In: In: Virus Taxonomy. Elsevier/Academic Press, , London pp. pp. 466–483.

Meyaard, L., Hovenkamp, E., Otto, S.A., Miedema, F., 1996, IL-12-induced IL-10 production by human T cells as a negative feedback for IL-12-induced immune responses. J Immunol 156, 2776-2782.

Meyer, G., Lacroux, C., Leger, S., Top, S., Goyeau, K., Deplanche, M., Lemaire, M., 2009, Lethal bluetongue virus serotype 1 infection in llamas. Emerg Infect Dis 15, 608-610.

Montagne, A., Menanteau, P., Boivin, R., Bernard, S., Lantier, F., Lalmanach, A.C., 2001, Cytokine gene expression in lymph node and spleen of sheep in response to Salmonella infection by two serotypes displaying different host specificity. Vet Immunol Immunopathol 82, 257-272.

Mosmann, T.R., Sad, S., 1996, The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. Immunol Today 17, 138-146.

Mosqueda, J., 2010, Respuesta inmune humoral, In: Inmunologia Veterinaria. El manual moderno, Mexico, pp. 117-128.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., 1986, Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 51 Pt 1, 263-273.

Mullis, K.B., Faloona, F.A., 1987, Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol 155, 335-350.

Naessens, J., Sileghem, M., MacHugh, N., Park, Y.H., Davis, W.C., Toye, P., 1992, Selection of BoCD25 monoclonal antibodies by screening mouse L cells transfected with the bovine p55-interleukin-2 (IL-2) receptor gene. Immunology 76, 305-309.

Nason, E.L., Rothagel, R., Mukherjee, S.K., Kar, A.K., Forzan, M., Prasad, B.V., Roy, P., 2004, Interactions between the inner and outer capsids of bluetongue virus. J Virol 78, 8059-8067.

Nevill, E.M., 1971, Cattle and Culicoides biting midges as possible overwintering hosts of bluetongue virus. Onderstepoort J Vet Res 38, 65-71.

Ng, E.Y., Kaw, G.J., Chang, W.M., 2004, Analysis of IR thermal imager for mass blind fever screening. Microvasc Res 68, 104-109.

Niborski, V., Li, Y., Brennan, F., Lane, M., Torche, A.M., Remond, M., Bonneau, M., Riffault, S., Stirling, C., Hutchings, G., Takamatsu, H., Barnett, P., Charley, B., Schwartz-Cornil, I., 2006, Efficacy of particle-based DNA delivery for vaccination of sheep against FMDV. Vaccine 24, 7204-7213.

Nielsen, S.A., Nielsen, B.O., Chirico, J., 2010, Monitoring of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae: Culicoides Latreille) on farms in Sweden during the emergence of the 2008 epidemic of bluetongue. Parasitol Res 106, 1197-1203.

Nikkhah, A., Plaizier, J.C., Einarson, M.S., Berry, R.J., Scott, S.L., Kennedy, A.D., 2005, Short communication: infrared thermography and visual examination of hooves of dairy cows in two stages of lactation. J Dairy Sci 88, 2749-2753.

Noad, R., Roy, P., 2003, Virus-like particles as immunogens. Trends Microbiol 11, 438-444.

Noad, R.J., Stewart, M., Boyce, M., Celma, C.C., Willison, K.R., Roy, P., 2009, Multigene expression of protein complexes by iterative modification of genomic Bacmid DNA. BMC Mol Biol 10, 87.

Nunamaker, R.A., Ellis, J.A., Wigington, J.G., MacLachlan, N.J., 1992, The detection of intracellular bluetongue virus particles within ovine erythrocytes. Comp Biochem Physiol Comp Physiol 101, 471-476.

Oldfield, S., Hirasawa, T., Roy, P., 1991, Sequence conservation of the outer capsid protein, VP5, of bluetongue virus, a contrasting feature to the outer capsid protein VP2. J Gen Virol 72 (Pt 2), 449-451.

Oura, C.A., Wood, J.L., Sanders, A.J., Bin-Tarif, A., Henstock, M., Edwards, L., Floyd, T., Simmons, H., Batten, C.A., 2009, Seroconversion, neutralising antibodies and protection in bluetongue serotype 8 vaccinated sheep. Vaccine 27, 7326-7330.

Pappenheimer, A.M., 1917, Experimental Studies Upon Lymphocytes : I. The Reactions of Lymphocytes under Various Experimental Conditions. J Exp Med 25, 633-650.

Paradell, H., Garcia, L., Mouriño, M., Vila, A., Urniza, A., Alberca, B., Tarrats, M., Juanola, S., Gómez-Tejedor, C., Agüero, M., San Miguel, E., Ruano, M., Plana-Durán, J., 2010. Duration of immunity of one year for Zulvac ® 8 Ovis, iactivated and adjuvanted vaccine, against bluetongue virus serotype 8. In: EPIZONE Meeting., Saint Malo, France, 7-10 June 2010.

Parsons, K.R., Crocker, G., Sopp, P., Howard, C.J., Davis, W.C., 1993, Identification of monoclonal antibodies specific for the gamma/delta TCR. Vet Immunol Immunopathol 39, 161-167.

Parsonson, I.M., 1990, Pathology and pathogenesis of bluetongue infections. Curr Top Microbiol Immunol 162, 119-141.

Pearson, L.D., Roy, P., 1993, Genetically engineered multi-component virus-like particles as veterinary vaccines. Immunol Cell Biol 71 (Pt 5), 381-389.

Pérez de Diego, A.C., Ortega , C., Domínguez, L., Sánchez-Vizcaíno, J. 2008. Potencial utilización de la termografía infrarroja para la lectura de la IDTB en cabras In RCCV, p. 6.

Pérez de Diego, A.C., Athmaram, T.N., Stewart, M., Rodriguez-Sanchez, B., Sanchez-Vizcaino, J.M., Noad, R., Roy, P., 2011, Characterization of protection afforded by a bivalent virus-like particle vaccine against bluetongue virus serotypes 1 and 4 in sheep. PLoS One 6, e26666.

Pérez de Diego, A.C., Sánchez-Cordón, P., de las Heras, A., Sánchez-Vizcaíno, J., 2012, Characterization of the Immune Response Induced by a Commercially Available Inactivated Bluetongue Virus Serotype 1 Vaccine in Sheep. The scientificWorldJOURNAL.

Pérez de Diego, A.C., de las Heras, A.I., Sánchez Cordón, P.J., Sánchez-Vizcaíno Rodríguez J.M. , 2011. Aplicación de la Termografía Infrarroja para la detección de fiebre producida en respuesta al virus de la Lengua Azul. In: XI CONGRESO NACIONAL D VIROLOGÍA GRANADA 2011, p. 61.

Perrin, A., Albina, E., Breard, E., Sailleau, C., Prome, S., Grillet, C., Kwiatek, O., Russo, P., Thiery, R., Zientara, S., Cetre-Sossah, C., 2007, Recombinant capripoxviruses expressing proteins of bluetongue virus: evaluation of immune responses and protection in small ruminants. Vaccine 25, 6774-6783.

Pfaffl, M.W., 2001, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res 29, e45.

PublicHealthAgencyofCanada, 2004, Thermal image scanners to detect fever in airline passengers, Vancouver and Toronto, 2003. Canada communicable disease report = Releve des maladies transmissibles au Canada 30, 165-167.

Rainwater-Lovett, K., Pacheco, J.M., Packer, C., Rodriguez, L.L., 2009, Detection of foot-and-mouth disease virus infected cattle using infrared thermography. Vet J 180, 317-324.

Ramakrishnan, M.A., Pandey, A.B., Singh, K.P., Singh, R., Mehrotra, M.L., 2005, Immune response and protective efficacy in sheep immunised with hydroxylamine-inactivated bluetongue virus vaccine. Vet Ital 41, 149-155.

Ramos, J.J., Ferrer, L.M., 2007, Historia Clínica, In: La exploración clínica del ganado ovino y su entorno. Servet ®, Zaragoza.

Rodríguez-Prieto, V., Rubio-García, A., Melero, M., García, D. and Sánchez-Vizcaíno, J. M., , 2011, Identification of the pattern of appearance and development of thermal windows in the skin of juvenile Pacific walruses (Odobenus rosmarus divergens) in a controlled environment. . Marine Mammal Science.

Rodriguez-Sanchez, B., Sanchez-Cordon, P.J., Molina, V., Risalde, M.A., Perez de Diego, A.C., Gomez-Villamandos, J.C., Sanchez-Vizcaino, J.M., 2010, Detection of bluetongue serotype 4 in mouflons (Ovis aries musimon) from Spain. Vet Microbiol 141, 164-167.

Roy, P., Fukusho, A., Ritter, G.D., Lyon, D., 1988, Evidence for genetic relationship between RNA and DNA viruses from the sequence homology of a putative polymerase gene of bluetongue virus with that of vaccinia virus: conservation of RNA polymerase genes from diverse species. Nucleic Acids Res 16, 11759-11767.

Roy, P., Adachi, A., Urakawa, T., Booth, T.F., Thomas, C.P., 1990a, Identification of bluetongue virus VP6 protein as a nucleic acid-binding protein and the localization of VP6 in virus-infected vertebrate cells. J Virol 64, 1-8.

Roy, P., Urakawa, T., Van Dijk, A.A., Erasmus, B.J., 1990b, Recombinant virus vaccine for bluetongue disease in sheep. J Virol 64, 1998-2003.

Roy, P., 1992, Bluetongue virus proteins. J Gen Virol 73 (Pt 12), 3051-3064.

Roy, P., French, T., Erasmus, B.J., 1992, Protective efficacy of virus-like particles for bluetongue disease. Vaccine 10, 28-32.

Roy, P., 1996, Orbivirus structure and assembly. Virology 216, 1-11.

Roy, P., Mikhailov, M., Bishop, D.H., 1997, Baculovirus multigene expression vectors and their use for understanding the assembly process of architecturally complex virus particles. Gene 190, 119-129.

Roy, P., 2003, Nature and duration of protective immunity to bluetongue virus infection. Dev Biol (Basel) 114, 169-183.

Ruiz-Fons, F., Reyes-Garcia, A.R., Alcaide, V., Gortazar, C., 2008, Spatial and temporal evolution of bluetongue virus in wild ruminants, Spain. Emerg Infect Dis 14, 951-953.

Sahagún, A., 2010, Respuesta inmune contra virus, In: Inmunologia Veterinaria. El manual moderno, Mexico, pp. 129-140.

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.

Samal, S.K., Livingston, C.W., Jr., McConnell, S., Ramig, R.F., 1987, Analysis of mixed infection of sheep with bluetongue virus serotypes 10 and 17: evidence for genetic reassortment in the vertebrate host. J Virol 61, 1086-1091.

Samuel, C.E., 2001, Antiviral actions of interferons. Clin Microbiol Rev 14, 778-809, table of contents.

Sánchez-Cordon, P., Rodríguez-Sánchez, B., Pedrera, M., Risalde, M., Molina, V., Ruíz-Villamor, E., Sánchez-Vizcaíno, J., Gómez-Villamandos, J., 2008, El virus de la Lengua Azul como modelo para el estudio de los Orbivirus. . Anales. Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental. 21.

Sánchez-Cordon, P., Pedrera, M., Pérez de Diego, A., Rodríguez-Sáncehz, B., Ruíz-Villamor, E., Pleguezuelos, F., Sánchez-Vizcaíno, J., Gómez-Villamandos, J., 2010a, Células presentadoras de antígeno: Células Dendríticas y su papel en la Lengua Azul. Anales. Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental. 23.

Sánchez-Cordon, P.J., Rodriguez-Sanchez, B., Risalde, M.A., Molina, V., Pedrera, M., Sanchez-Vizcaino, J.M., Gomez-Villamandos, J.C., 2010b, Immunohistochemical detection of bluetongue virus in fixed tissue. J Comp Pathol 143, 20-28.

Sánchez-Vizcaíno, J., 2006, Vacunas y sueroterapia, In: Manual de Inmunologia Veterinaria. Pearson Educación S.A., Madrid.

Savini, G., Nicolussi, P., Pilo, G., Colorito, P., Fresi, S., Teodori, L., Leone, A., Bonfini, B., Patta, C., 2007, Study of the safety and efficacy of a recombinant vaccine for bluetongue virus serotype 2. Vet Ital 43, 807-820.

Savini, G., MacLachlan, N.J., Sanchez-Vizcaino, J.M., Zientara, S., 2008, Vaccines against bluetongue in Europe. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 31, 101-120.

Savini, G., Hamers, C., Conte, A., Migliaccio, P., Bonfini, B., Teodori, L., Di Ventura, M., Hudelet, P., Schumacher, C., Caporale, V., 2009, Assessment of efficacy of a bivalent BTV-2 and BTV-4 inactivated vaccine by vaccination and challenge in cattle. Vet Microbiol 133, 1-8.

Schaefer, A.L., Cook, N.J., Church, J.S., Basarab, J., Perry, B., Miller, C., Tong, A.K., 2007, The use of infrared thermography as an early indicator of bovine respiratory disease complex in calves. Res Vet Sci 83, 376-384.

Schmidtmann, E.T., Herrero, M.V., Green, A.L., Dargatz, D.A., Rodriquez, J.M., Walton, T.E., 2011, Distribution of Culicoides sonorensis (Diptera: Ceratopogonidae) in Nebraska, South Dakota, and North Dakota: clarifying the epidemiology of bluetongue disease in the Northern great Plains region of the United States. J Med Entomol 48, 634-643.

Schmittgen, T.D., Zakrajsek, B.A., 2000, Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. J Biochem Biophys Methods 46, 69-81.

Schneeberger, C., Speiser, P., Kury, F., Zeillinger, R., 1995, Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain. PCR Methods Appl 4, 234-238.

Schoenborn, J.R., Wilson, C.B., 2007, Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. Adv Immunol 96, 41-101.

Schwartz-Cornil, I., Mertens, P.P., Contreras, V., Hemati, B., Pascale, F., Breard, E., Mellor, P.S., MacLachlan, N.J., Zientara, S., 2008, Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity. Vet Res 39, 46.

Schwartz, H.J., Wilson, F., 1971, Target cell destruction in vitro by concanavalin A-stimulated lymphoid cells. Am J Pathol 64, 295-304.

Sellers, R.F., Maarouf, A.R., 1991, Possible introduction of epizootic hemorrhagic disease of deer virus (serotype 2) and bluetongue virus (serotype 11) into British Columbia in 1987 and 1988 by infected Culicoides carried on the wind. Can J Vet Res 55, 367-370.

Sellers, R.F., Mellor, P.S., 1993, Temperature and the persistence of viruses in Culicoides spp. during adverse conditions. Rev Sci Tech 12, 733-755.

Sepulveda, C., Puente, J., 2000, [Natural killer cells and the innate immune system in infectious pathology]. Rev Med Chil 128, 1361-1370.

Singer, R.S., MacLachlan, N.J., Carpenter, T.E., 2001, Maximal predicted duration of viremia in bluetongue virus-infected cattle. J Vet Diagn Invest 13, 43-49.

Singh, M., O'Hagan, D.T., 2003, Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. Int J Parasitol 33, 469-478.

Smeed, J.A., Watkins, C.A., Rhind, S.M., Hopkins, J., 2007, Differential cytokine gene expression profiles in the three pathological forms of sheep paratuberculosis. BMC Vet Res 3, 18.

Smith, H.E., Jacobs, R.M., Smith, C., 1994, Flow cytometric analysis of ovine peripheral blood lymphocytes. Can J Vet Res 58, 152-155.

Sopp, P., Kwong, L.S., Howard, C.J., 1996, Identification of bovine CD14. Vet Immunol Immunopathol 52, 323-328.

Spreull, J., 1905, Malarial catarrhal fever (Bluetongue) of sheep in South Africa Journal of Comparative Pathology and Therapeutics 18, 321–337

Stahlberg, A., Hakansson, J., Xian, X., Semb, H., Kubista, M., 2004, Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification. Clin Chem 50, 509-515.

Standfast, H.A., Dyce, A.L., Muller, M.J., 1985, Vectors of bluetongue virus in Australia. Prog Clin Biol Res 178, 177-186.

Stasny, B.R., De Guise, S., Rompato, G., Garmendia, A.E., 2001, Functional characterization of a swine CD4(+)/CD8(+) double positive lymphoblastoid T-cell line with a CD25(+)/CD45RA(-) phenotype generated in vitro with interleukin-2. Vet Immunol Immunopathol 78, 57-70.

Steinrigl, A., Revilla-Fernandez, S., Eichinger, M., Koefer, J., Winter, P., 2010, Bluetongue virus RNA detection by RT-qPCR in blood samples of sheep vaccinated with a commercially available inactivated BTV-8 vaccine. Vaccine 28, 5573-5581.

Stewart, M., Bhatia, Y., Athmaran, T.N., Noad, R., Gastaldi, C., Dubois, E., Russo, P., Thiery, R., Sailleau, C., Breard, E., Zientara, S., Roy, P., 2010, Validation of a novel approach for the rapid production of immunogenic virus-like particles for bluetongue virus. Vaccine 28, 3047-3054.

Stott, J.L., Barber, T.L., Osburn, B.I., 1985, Immunologic response of sheep to inactivated and virulent bluetongue virus. Am J Vet Res 46, 1043-1049.

Stott, J.L., Blanchard-Channell, M., Scibienski, R.J., Stott, M.L., 1990, Interaction of bluetongue virus with bovine lymphocytes. J Gen Virol 71 (Pt 2), 363-368.

Stratagene 2007. Mx3000P System Experiments: Comparative Quantitation. In Mx3000P™ Real-Time PCR System Instruction Manual Software version 2.0, pp. 159-189.

Symons, D.B., Clarkson, C.A., 1979, Acinetobacter and E. coli lipopolysaccharide preparations comparative mitogenicity and induction in vitro of immunoglobulin synthesis in adult and neonatal pig lymphocytes. Immunology 38, 601-607.

Takamatsu, H., Jeggo, M.H., 1989, Cultivation of bluetongue virus-specific ovine T cells and their cross-reactivity with different serotype viruses. Immunology 66, 258-263.

Takamatsu, H., Burroughs, J.N., Wade-Evans, A.M., Mertens, P.P., 1990, Identification of a bluetongue virus serotype 1-specific ovine helper T-cell determinant in outer capsid protein VP2. Virology 177, 396-400.

Takamatsu, H., Mellor, P.S., Mertens, P.P., Kirkham, P.A., Burroughs, J.N., Parkhouse, R.M., 2003, A possible overwintering mechanism for bluetongue virus in the absence of the insect vector. J Gen Virol 84, 227-235.

Tarrant, J.M., 2005, The role of flow cytometry in companion animal diagnostic medicine. Vet J 170, 278-288.

Thorp, B.H., Seneque, S., Staute, K., Kimpton, W.G., 1991, Characterization and distribution of lymphocyte subsets in sheep hemal nodes. Dev Comp Immunol 15, 393-400.

Tizard, I., 2009a, Los linfocitos, In: Introducción a la Inmunología Veterinaria. Saunders. Elsevier Imprint, Barcelona, p. 128/138.

Tizard, I., 2009b, Las células dendrtíticas y el procesamiento de antígenos, In: Introducción a la Inmunología Veterinaria. Saunders. Elsevier Imprint, Barcelona, pp. 89-100.

Tizard, I., 2009c, El complejo mayor de histocompatibilidad., In: Introducción a la Inmunología Veterinaria. Saunders. Elsevier Imprint, Barcelona, p. 102/111.

Tizard, I., 2009d, La defensa del organismo, In: Introducción a la Inmunología Veterinaria. Saunders. Elsevier Imprint, Barcelona, pp. 1-10.

Tizard, I., 2009e, Linfocitos B y respuesta al antígeno, In: Introducción a la Inmunología Veterinaria. Saunders. Elsevier Imprint, Barcelona, p. 152/169.

Toussaint, J.F., Sailleau, C., Breard, E., Zientara, S., De Clercq, K., 2007, Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments. J Virol Methods 140, 115-123.

Trinchieri, G., Wysocka, M., D'Andrea, A., Rengaraju, M., Aste-Amezaga, M., Kubin, M., Valiante, N.M., Chehimi, J., 1992, Natural killer cell stimulatory factor (NKSF) or interleukin-12 is a key regulator of immune response and inflammation. Prog Growth Factor Res 4, 355-368.

Trinchieri, G., 1995, Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. Annu Rev Immunol 13, 251-276.

Trinchieri, G., 1997, Function and clinical use of interleukin-12. Curr Opin Hematol 4, 59-66.

Tse, C., Capeau, J., 2003, [Real time PCR methodology for quantification of nucleic acids]. Ann Biol Clin (Paris) 61, 279-293.

Turner, T.A., 1991, Thermography as an aid to the clinical lameness evaluation. Vet Clin North Am Equine Pract 7, 311-338.

Ullrey, D.E., Miller, E.R., Long, C.H., Vincent, B.H., 1965, Sheep Hematology from Birth to Maturity. Ii. Leukocyte Concentration and Differential Distribution. J Anim Sci 24, 141-144.

Umeshappa, C.S., Singh, K.P., Pandey, A.B., Singh, R.P., Nanjundappa, R.H., 2010, Cell-mediated immune response and cross-protective efficacy of binary ethylenimine-inactivated bluetongue virus serotype-1 vaccine in sheep. Vaccine 28, 2522-2531.

Umeshappa, C.S., Singh, K.P., Ahmed, K.A., Pandey, A.B., Nanjundappa, R.H., 2011a, The measurement of three cytokine transcripts in naive and sensitized ovine peripheral blood mononuclear cells following in vitro stimulation with bluetongue virus serotype-23. Res Vet Sci 90, 212-214.

Umeshappa, C.S., Singh, K.P., Channappanavar, R., Sharma, K., Nanjundappa, R.H., Saxena, M., Singh, R., Sharma, A.K., 2011b, A comparison of intradermal and intravenous inoculation of bluetongue virus serotype 23 in sheep for clinico-pathology, and viral and immune responses. Vet Immunol Immunopathol 141, 230-238.

Van Dijk, A.A., Huismans, H., 1988, In vitro transcription and translation of bluetongue virus mRNA. J Gen Virol 69 (Pt 3), 573-581.

Van Reeth, K., Nauwynck, H., Pensaert, M., 1998, Bronchoalveolar interferon-alpha, tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1, and inflammation during acute influenza in pigs: a possible model for humans? J Infect Dis 177, 1076-1079.

Vandenbussche, F., De Leeuw, I., Vandemeulebroucke, E., De Clercq, K., 2009, Emergence of bluetongue serotypes in Europe, part 1: description and validation of four real-time RT-PCR assays for the serotyping of bluetongue viruses BTV-1, BTV-6, BTV-8 and BTV-11. Transbound Emerg Dis 56, 346-354.

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002, Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol 3, RESEARCH0034.

Velthuis, A.G., Saatkamp, H.W., Mourits, M.C., de Koeijer, A.A., Elbers, A.R., 2010, Financial consequences of the Dutch bluetongue serotype 8 epidemics of 2006 and 2007. Prev Vet Med 93, 294-304.

Vernel-Pauillac, F., Merien, F., 2006, Proinflammatory and immunomodulatory cytokine mRNA time course profiles in hamsters infected with a virulent variant of Leptospira interrogans. Infect Immun 74, 4172-4179.

Verret, V., Bevilacqua, C., Schwartz-Cornil, I., Pelage, J.P., Wassef, M., Namur, J., Bedouet, L., Lewis, A.L., Martin, P., Laurent, A., 2011, IL6 and TNF expression in vessels and surrounding tissues after embolization with ibuprofen-loaded beads confirms diffusion of ibuprofen. Eur J Pharm Sci 42, 489-495.

Verwoerd, D.W., 1969, Purification and characterization of bluetongue virus. Virology 38, 203-212.

Wackerlin, R., Eschbaumer, M., Konig, P., Hoffmann, B., Beer, M., 2010, Evaluation of humoral response and protective efficacy of three inactivated vaccines against bluetongue virus serotype 8 one year after vaccination of sheep and cattle. Vaccine 28, 4348-4355.

Wade-Evans, A.M., Romero, C.H., Mellor, P., Takamatsu, H., Anderson, J., Thevasagayam, J., Fleming, M.J., Mertens, P.P., Black, D.N., 1996, Expression of the major core structural protein (VP7) of bluetongue virus, by a recombinant capripox virus, provides partial protection of sheep against a virulent heterotypic bluetongue virus challenge. Virology 220, 227-231.

Wattegedera, S.R., Watson, D.M., Hope, J.C., Kaiser, P., Sales, J., McInnes, C.J., Entrican, G., 2010, Relative quantitative kinetics of interferon-gamma and interleukin-10 mRNA and protein production by activated ovine peripheral blood mononuclear cells. Vet Immunol Immunopathol 136, 34-42.

White, D.M., Wilson, W.C., Blair, C.D., Beaty, B.J., 2005, Studies on overwintering of bluetongue viruses in insects. J Gen Virol 86, 453-462.

Wilbur, L.A., Evermann, J.F., Levings, R.L., Stoll, I.R., Starling, D.E., Spillers, C.A., Gustafson, G.A., McKeirnan, A.J., 1994, Abortion and death in pregnant bitches associated with a canine vaccine contaminated with bluetongue virus. J Am Vet Med Assoc 204, 1762-1765.

Wilson, A.J., Mellor, P.S., 2009, Bluetongue in Europe: past, present and future. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 364, 2669-2681.

Wittmann, E.J., Baylis, M., 2000, Climate change: effects on culicoides--transmitted viruses and implications for the UK. Vet J 160, 107-117.

Wong, M.L., Medrano, J.F., 2005, Real-time PCR for mRNA quantitation. Biotechniques 39, 75-85.

Wood, P.R., Seow, H.F., 1996, T cell cytokines and disease prevention. Vet Immunol Immunopathol 54, 33-44.

Worwa, G., Hilbe, M., Ehrensperger, F., Chaignat, V., Hofmann, M.A., Griot, C., Maclachlan, N.J., Thuer, B., 2009, Experimental transplacental infection of sheep with bluetongue virus serotype 8. Vet Rec 164, 499-500.

Worwa, G., Hilbe, M., Chaignat, V., Hofmann, M.A., Griot, C., Ehrensperger, F., Doherr, M.G., Thur, B., 2010, Virological and pathological findings in Bluetongue virus serotype 8 infected sheep. Vet Microbiol 144, 264-273.

Xu, G., Wilson, W., Mecham, J., Murphy, K., Zhou, E.M., Tabachnick, W., 1997, VP7: an attachment protein of bluetongue virus for cellular receptors in Culicoides variipennis. J Gen Virol 78 (Pt 7), 1617-1623.

Zhu, J., Paul, W.E., 2008, CD4 T cells: fates, functions, and faults. Blood 112, 1557-1569.

Zientara, S., MacLachlan, N.J., Calistri, P., Sanchez-Vizcaino, J.M., Savini, G., 2010, Bluetongue vaccination in Europe. Expert Rev Vaccines 9, 989-991.

VIII. ANEXOS

Foto Anexos: Una oveja con corderos recién nacidos en un campo en el Reino Unido
(http://es.123rf.com/photo_894380_una-oveja-con-corderos-recien-nacidos-en-un-campo-en-el-reino-unido.html)

VIII. 1. PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS

Rodríguez-Sánchez B, Sánchez-Cordón PJ, Molina V, Risalde MA, Pérez de Diego AC, Gómez-Villamandos JC, Sánchez-Vizcaíno JM. 2010. **Detection of bluetongue serotype 4 in mouflons (Ovis aries musimon) from Spain.** Veterinary Microbiology. 141 (1-2): 164-167.

Veterinary Microbiology 141 (2010) 164–167

Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetmic

Short communication

Detection of bluetongue serotype 4 in mouflons (*Ovis aries musimon*) from Spain

Belén Rodríguez-Sánchez [a,*], Pedro J. Sánchez-Cordón [b], Verónica Molina [b], María A. Risalde [b], Ana Cristina Pérez de Diego [a], José C. Gómez-Villamandos [b], José M. Sánchez-Vizcaíno [a]

[a] Animal Health Department, Veterinary Faculty, Universidad Complutense de Madrid, Avenida Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain
[b] Department of Comparative Pathology, Veterinary Faculty, University of Córdoba, Edificio de Sanidad Animal, Campus de Rabanales, 14014 Córdoba, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 8 April 2009
Received in revised form 17 July 2009
Accepted 3 August 2009

Keywords:
Bluetongue
Serotype-4
Mouflons
Wild ruminants
RT-PCR
Paraffin-embedded tissues

ABSTRACT

Bluetongue serotype 4 (BTV4) has been detected for the first time in tissue samples from 2 mouflons (*Ovis aries musimon*) from the South of Spain, in a retrospective study. The samples included in this study had been fixed and paraffin-embedded for over a year prior to their analysis using a BTV group-specific and a BTV4-specific RT-PCR test. Lung and lymphatic nodes were found positive in both specimens. The amplified DNA was confirmed to be BTV4 by sequencing the RT-PCR products and comparing them with other sequences from GenBank. The combination of RNA extraction from paraffin-embedded samples and serotype-specific real-time RT-PCR assays provides the tools for the detection of BTV from samples stored for a long time. The results shown in this study set out the basis for a greater survey with fixed samples from different species of wild ruminants that the veterinary services have been collecting for years.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Bluetongue (BT) is a noncontagious, vector-borne disease of domestic and wild ruminants caused by an *Orbivirus* (Family *Reoviridae*) that includes at least 24 different serotypes (Mathews, 1982; Mertens and Diprose, 2004). Traditionally, sheep have been considered the most severely affected livestock species, whereas cattle and goats usually appeared as asymptomatic reservoir hosts (MacLachlan, 1994). However, the recent outbreaks of BT occurred in both southern and northern Europe caused by different serotypes, some of them never described previously in these countries, displayed severe clinical signs in cattle, goats and different species of wild ruminants characterized by fever, depression, nasal discharge, respiratory distress, oral ulceration and haemorrhages, subcutaneous oedema and cyanotic tongue (Backx et al., 2007; Dercksen et al., 2007; MacLachlan et al., 2008; Saegerman et al., 2008). Wild ruminants have been considered for a long time as asymptomatic hosts. However, recent studies have reported BT characteristic symptoms (Mauroy et al., 2008) and the presence of the virus (Fernandez-Pacheco et al., 2008) or BT specific antibodies (Linden et al., 2008; Ruiz-Fons et al., 2008) in wild species like yaks (*Bos grunniens grunniens*), mouflons (*Ovis aries musimon*) or wild red deer (*Cervus elaphus*), respectively. The role of wildlife in the prevalence and spreading of BT is beginning to be elucidated (Ruiz-Fons et al., 2008).

The analysis of samples from wild ruminants is becoming increasingly important in order to develop control programs and to elucidate the role of wildlife in the spreading and persistence of the disease. Recently, a study on the presence of BTV antibodies in wild ruminants in Spain (Ruiz-Fons et al., 2008) and the characterization of BTV1 in mouflons (*O. aries musimon*) (Fernandez-Pacheco et al., 2008) have been published. The adaptation of rapid

* Corresponding author. Tel.: +34 91 3943702; fax: +34 91 3943908.
E-mail address: belenrodriguez@sanidadanimal.info
(B. Rodríguez-Sánchez).

0378-1135/$ – see front matter © 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.vetmic.2009.08.008

Pérez de Diego AC, Athmaram TN, Stewart M, Rodríguez-Sánchez B, Sánchez-Vizcaíno JM, Noad R, Roy P. 2011. **Characterization of protection afforded by a bivalent virus-like particle vaccine against bluetongue virus serotypes 1 and 4 in sheep.** Plos One 6 (10): e26666. doi:10.1371/journal.pone.0026666

OPEN ACCESS Freely available online

PLoS one

Characterization of Protection Afforded by a Bivalent Virus-Like Particle Vaccine against Bluetongue Virus Serotypes 1 and 4 in Sheep

Ana Cristina Pérez de Diego[2], Thimmasandra N. Athmaram[1], Meredith Stewart[1], Belén Rodríguez-Sánchez[2], José Manuel Sánchez-Vizcaíno[2], Robert Noad[1¤], Polly Roy[1*]

1 Department of Infectious Diseases, London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, United Kingdom, 2 Centre for Animal Health Surveillance, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

Abstract

Background: Bluetongue virus (BTV) is an economically important, arthropod borne, emerging pathogen in Europe, causing disease mainly in sheep and cattle. Routine vaccination for bluetongue would require the ability to distinguish between vaccinated and infected individuals (DIVA). Current vaccines are effective but are not DIVA. Virus-like particles (VLPs) are highly immunogenic structural mimics of virus particles, that only contain a subset of the proteins present in a natural infection. VLPs therefore offer the potential for the development of DIVA compatible bluetongue vaccines.

Methodology/Principal Findings: Merino sheep were vaccinated with either monovalent BTV-1 VLPs or a bivalent mixture of BTV-1 VLPs and BTV-4 VLPs, and challenged with virulent BTV-1 or BTV-4. Animals were monitored for clinical signs, antibody responses, and vital RNA. 19/20 animals vaccinated with BTV-1 VLPs either alone or in combination with BTV-4 VLPs developed neutralizing antibodies to BTV-1, and group specific antibodies to BTV VP7. The one animal that showed no detectable neutralizing antibodies, or group specific antibodies, had detectable viral RNA following challenge but did not display any clinical signs on challenge with virulent BTV-1. In contrast, all control animals' demonstrated classical clinical signs for bluetongue on challenge with the same virus. Six animals were vaccinated with bivalent vaccine and challenged with virulent BTV-4, two of these animals had detectable viral levels of viral RNA, and one of these showed clinical signs consistent with BTV infection and died.

Conclusions: There is good evidence that BTV-1 VLPs delivered as monovalent or bivalent immunogen protect from bluetongue disease on challenge with virulent BTV-1. However, it is possible that there is some interference in protective response for BTV-4 in the bivalent BTV-1 and BTV-4 VLP vaccine. This raises the question of whether all combinations of bivalent BTV vaccines are possible, or if immunodominance of particular serotypes could interfere with vaccine efficacy.

Citation: Pérez de Diego AC, Athmaram TN, Stewart M, Rodríguez-Sánchez B, Sánchez-Vizcaíno JM, et al. (2011) Characterization of Protection Afforded by a Bivalent Virus-Like Particle Vaccine against Bluetongue Virus Serotypes 1 and 4 in Sheep. PLoS ONE 6(10): e26666. doi:10.1371/journal.pone.0026666

Editor: Jianming Qiu, University of Kansas Medical Center, United States of America

Received July 11, 2011; **Accepted** September 30, 2011; **Published** October 21, 2011

Copyright: © 2011 Pérez de Diego et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by funding from European Commission FP6 (FP6-2005-SSP-SA)(http://ec.europa.eu/research/fp6/index_en.cfm). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: polly.roy@lshtm.ac.uk

¤ Current address: Centre for Emerging, Endemic and Exotic Diseases, Royal Veterinary College, Hatfield, United Kingdom

Introduction

Bluetongue is a vector-borne disease of ruminants caused by a double-stranded RNA (dsRNA) virus of the genus *Orbivirus* in the family *Reoviridae*. In southern Africa, where bluetongue is endemic, bluetongue virus (BTV) cycles between midges of the *Culicoides* genus and wild and domestic ruminants [1]. In livestock, sheep and cattle can both be affected but sheep generally show the most severe clinical signs [2,3,4]. Historically, 24 different serotypes of BTV have been characterized. In addition, Toggenburg virus was described in 2008 and is considered as a putative 25th BTV serotype [5,6], and there has been a recent report of a 26th serotype in Kuwait [7]. Before 1998, outbreaks of bluetongue in Europe were sporadic and relatively small scale. However, since then there have been sustained and repeated incursions into the continent of different serotypes that have had substantial economic, political and animal welfare impacts [8,9,10,11,12,13]. A consequence of these outbreaks has been a renewed interest in the development of vaccines to BTV.

Vaccination is an effective measure to control bluetongue disease [10]; immunisation with a number of different vaccines including attenuated virus, inactivated virus, pox-based vaccines and recombinant protein immunogens result in the induction of neutralising antibodies and protection against disease and viraemia [3,10,11,14]. One of the vaccine approaches is the production of BTV virus like particles (VLPs). VLPs are non-infectious mimics of the virus formed from expression of only virus structural proteins in a heterologous expression system [14,15,16]. As these particles do not contain viral genetic material and their production does not involved the expression of viral transcription

Pérez de Diego AC, Sánchez-Cordón PJ, de las Heras AI, Sánchez-Vizcaíno JM. 2012. **Characterization of the Immune Response Induced by a Commercially Available Inactivated Bluetongue Virus Serotype 1 Vaccine in Sheep.** The ScientificWorld Journal: doi:10.1100/2012/147158

The Scientific World Journal
Volume 2012, Article ID 147158, 8 pages
doi:10.1100/2012/147158

The ScientificWorldJOURNAL

Research Article

Characterization of the Immune Response Induced by a Commercially Available Inactivated Bluetongue Virus Serotype 1 Vaccine in Sheep

Ana Cristina Pérez de Diego,[1] Pedro José Sánchez-Cordón,[2] Ana Isabel de las Heras,[1] and José Manuel Sánchez-Vizcaíno[1]

[1] *VISAVET Health Surveillance Centre and Animal Health Department, Veterinary Faculty, Complutense University of Madrid, Avenida Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain*
[2] *Department of Comparative Pathology, Veterinary Faculty, University of Córdoba, Animal Health Building, Rabanales Campus, 14014 Córdoba, Spain*

Correspondence should be addressed to Ana Cristina Pérez de Diego, anacristina@sanidadanimal.info

Received 18 October 2011; Accepted 22 December 2011

Academic Editors: E. Carrillo and K. E. Kester

Copyright © 2012 Ana Cristina Pérez de Diego et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The protective immune response generated by a commercial monovalent inactivated vaccine against bluetongue virus serotype 1 (BTV1) was studied. Five sheep were vaccinated, boost-vaccinated, and then challenged against BTV1 ALG/2006. RT-PCR did not detect viremia at any time during the experiment. Except a temperature increase observed after the initial and boost vaccinations, no clinical signs or lesions were observed. A specific and protective antibody response checked by ELISA was induced after vaccination and boost vaccination. This specific antibody response was associated with a significant increase in B lymphocytes confirmed by flow cytometry, while significant increases were not observed in T lymphocyte subpopulations ($CD4^+$, $CD8^+$, and $WC1^+$), $CD25^+$ regulatory cells, or $CD14^+$ monocytes. After challenge with BTV1, the antibody response was much higher than during the boost vaccination period, and it was associated with a significant increase in B lymphocytes, $CD14^+$ monocytes, $CD25^+$ regulatory cells, and $CD8^+$ cytotoxic T lymphocytes.

1. Introduction

Bluetongue virus (BTV), a member of the *Orbivirus* genus in the Reoviridae family [1], shows considerable genetic and antigenic variability, with at least 25 different serotypes characterized to date [2, 3]. These serotypes do not confer cross-protective immunity, which means that specific vaccines must be developed for each serotype [4].

Vaccination has proven very effective in BTV control and eradication strategies [5, 6]. A wide range of vaccines, based on either inactivated or modified live virus, are available against different BTV serotypes [7]. Inactivated vaccines are considered safer than vaccines based on modified live virus because they do not allow the possibility of viral replication. Therefore, they are useful for avoiding virus circulation among susceptible species [8, 9]. Indeed, inactivated vaccines have already been used successfully in field trials, and they are the vaccines most recommended by EU authorities [8, 10].

Several inactivated BTV vaccines have been shown to confer protection mainly by inducing production of neutralizing antibodies [11–14]. These antibodies protect primarily against homologous serotypes, and they appear ineffective at cross-protecting against heterologous serotypes [15, 16]. Some studies reveal that cell-mediated immunity could play an important role [17] when vaccinating with individual antigens [18], or concretely just in some sheep [19]. Also, inactivated vaccines have been shown to protect against BTV in the absence of neutralizing antibodies [4, 20], but it is well known that the main effective response against BT is capable to generate neutralizing antibodies [11].

Evaluating the cell-mediated immunity in animals vaccinated against BTV could provide valuable information for

Pérez de Diego AC, Sánchez-Cordón PJ, Sánchez-Vizcaíno JM. **History of Bluetongue disease in Spain: From the first outbreak to the situation in 2012.**

Transboundary and Emerging Diseases - submission proof

Transboundary and Emerging Diseases

History of Bluetongue disease in Spain: From the first outbreak to the situation in 2012

Journal:	*Transboundary and Emerging Diseases*
Manuscript ID:	TBED-RW-068-12
Manuscript Type:	Review
Date Submitted by the Author:	28-Mar-2012
Complete List of Authors:	Pérez de Diego, Ana Cristina; Veterinary School. Complutense University of Madrid, VISAVET centre and Animal Health Department Sánchez-Cordón, Pedro; Faculty of Veterinary Medicine. University of Córdoba, Dartament of Comparative Pathology Sanchez-Vizcaino, Jose Manuel; Veterinary School. Complutense University of Madrid, VISAVET centre and Animal Health Department
Subject Area:	Emerging diseases, Disease control, Veterinary epidemiology

SCHOLARONE™
Manuscripts

For Review Only

Transboundary and Emerging Diseases - submitted manuscript

VIII. 2. PUBLICACIONES TÉCNICAS

Pérez de Diego, AC., Ortega, C., Domínguez, L., Sánchez-Vizcaíno, JM. 2008. **Potencial utilización de la Termografía infrarroja para la lectura de la IDTB en cabras.** Revista Complutense de Ciencias Veterinarias. 2 (2): 54-59**.**

ISSN: 1988-2688
RCCV Vol. 2 (2). 2008

RCCV

POTENCIAL UTILIZACIÓN DE LA TERMOGRAFÍA INFRARROJA PARA LA LECTURA DE LA IDTB EN CABRAS

POTENTIAL USE OF INFRARED TERMOGRAPHY FOR MEASUREMENT OF PPD TEST IN GOATS

A. C. Pérez de Diego Camacho, C. Ortega Martín, L. Domínguez Rodríguez y J. M. Sánchez-Vizcaíno Rodríguez

Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria VISAVET. Universidad Complutense de Madrid

Resumen

En este trabajo se pretende estudiar la potencial utilización de la TI (Termografía infrarroja) en la lectura de la IDTB (intradermotuberculinización) en cabras.

El análisis de las temperaturas mostró un aumento significativo a las 24h post-inoculación de la tuberculina en el conjunto de los individuos, no observándose influencia significativa de la capa de los animales sobre las temperaturas. La comparación de los resultados de ambas técnicas no evidenció asociación significativa.

Summary

The aim of this experiment is to study the potential use of IT (infrared termography) for measurement of PPD (Purified protein derivate) test in goats.

The study of the temperatures showed a significant increase at 24hours post-inoculation of the PPD in the set of all the individuals, not being observed significant influence of the colour of the animals on the temperatures. The comparison of the results from the PPD skin test, and IT did not demonstrate significant association.

Palabras clave: Termografía infrarroja; tuberculosis; intradermotuberculinización; cabras.

Key Words: Infrared termography, tuberculosis; Ppd skin test; goats

Introducción

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa de Declaración Obligatoria causada por *Mycobacterium Bovis* (OIE, 2004) y descrita en ganado caprino por *Mycobacterium Caprae* (Javed M.T et al ,2007) Su importancia radica en que produce grandes pérdidas económicas, y en que se trata de una zoonosis que cuenta con un amplio espectro de hospedadores; entre los que cabe destacar el ganado bovino y caprino; y en el caso de las especies silvestres los jabalíes y ciervos. (Philips C.J.C. et al. 2003)

Rodriguez Sánchez B, Pérez de Diego, AC., Kukielka, D., Sánchez-Vizcaíno, JM. 2008. **Detección de patógenos mediante PCR.** ANAPORC. 51. 24-26.

DETECCIÓN DE PATÓGENOS MEDIANTE PCR

Belén Rodríguez Sánchez, Ana Pérez de Diego Camacho, Deborah Kukielka Zunzunegui y José Manuel Sánchez-Vizcaíno
Departamento de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.

Gráfico 1

1. El material de partida para realizar un ensayo de PCR (Polymerase Chain Reaction, Reacción en Cadena de Polimerasa) suele ser sangre o suero del animal que se quiere analizar, pero en algunos casos también se puede utilizar otro tipo de muestras

2. como orina, heces, hisopos nasales, tejidos, etc., que requieren un menor manejo del animal y pueden aportar información adicional.

3. Una vez obtenida la muestra, se procede a su homogenización, en caso de tejidos o heces. En los demás casos, la muestra se puede conservar en frío hasta que se realice la extracción de ácidos nucleicos

4. Uno de los métodos más utilizados para la extracción de ARN es el reactivo Trizol, que contiene una mezcla de solventes orgánicos que facilitan la separación de los componentes de la muestra estudiada en dos fases: fase orgánica, en la que se encuentran restos de membranas celulares, orgánulos y otros compuestos con alto contenido lipídico y fase acuosa, donde se encuentra el ARN debido a su fuerte carga iónica.

5. Una alternativa al Trizol, son los kits de extracción por columnas de sílice. Existen en el mercado distintos kits que permiten extraer tanto ADN como ARN a partir de distintas muestras biológicas. Las columnas

Otra manera de monitorizar el incremento de ADN amplificado es mediante la incorporación de moléculas que emiten fluorescencia, como el SYBR-Green

están cargadas positivamente, lo que permite una fuerte interacción con las cargas negativas del DNA. Los kits para extracción de ARN utilizan isotiocianato de guanidina, una molécula que proporciona un ambiente acídico en el que permanece el ARN, mientras que le ADN precipita.

6. El ácido nucleico purificado y resuspendido en agua ultrapura está en condiciones óptimas para ser amplificado por PCR

Gráfico 2

A. La amplificación de ácidos nucléicos a partir de ARN requiere un paso previo a la PCR, en el que, mediante la enzima Transcriptasa Reversa (RT), se copia el ARN de la muestra en ADN, única molécula a la que se une la enzima polimerasa durante la PCR.

B. Una vez obtenido ADN en el paso A, se procede a la realización de la PCR, que puede tener lugar en un solo paso. La PCR consta de 3 etapas:

✓**Desnaturalización:** en la que las dos cadenas del ADN se separan mediante calor. Una vez separadas las cadenas, la muestra se enfría rapidamente para evitar que las cadenas puedan volver a unirse.

✓ **Anillamiento:** entre 50-60ºC se produce la unión de los oligonucleótidos o primers a sus secuencias complementarias, que flanquean la región del ADN que se va a amplificar.

✓ **Elongación:** la enzima ADN polimerasa es una molécula termoestable que tiene máxima actividad a 72ºC y que es capaz de amplificar un fragmento de ADN a partir del extremo 3' libre de cada uno de los primers.

Se repite este proceso desde el paso 1 entre 30 y 40 veces, lo que permite un aumento logarítmico del número de copias de ADN de interés.

Gráfico 3

1. Para poder visualizar el producto de PCR obtenido, se utilizan de manera habitual geles de agarosa al 1-2% (peso/volumen) que permiten separar los fragmentos de ADN por su tamaño molecular. Estos geles se tiñen con colorantes

Gráfico 1

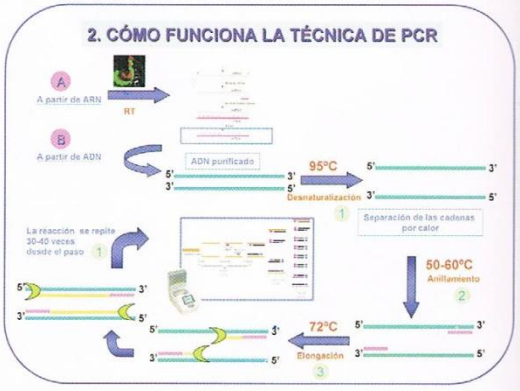


Gráfico 2

Pérez de Diego A.C., del Carmen P, Carvajal J., Sánchez-Vizcaíno JM. 2009. **Seguimiento clínico del ensayo de una vacuna VLP para os serotipos 1 y 1+4 de la lengua azul en ganado ovino.** Revista Complutense de Ciencias Veterinarias. 3 (2): 69-78.

ISSN: 1988-2688
RCCV VOL. 3 (2). 2009

RCCV

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

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

Ana Cristina Pérez de Diego, Pablo del Carmen, Javier Carvajal, José Manuel Sánchez-Vizcaíno
Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET), UCM
Departamento de Sanidad Animal. Faculta de Veterinaria. UCM

Resumen

La Lengua azul es una enfermedad vírica sometida a un control sanitario compuesto por varias medidas de prevención, entre ellas la vacunación de las especies sensibles. En el desarrollo de vacunas frente a esta enfermedad, una nueva tendencia es la producción de vacunas polivalentes mediante la técnica de VLP (*virus like particles*). Este trabajo ha tenido como objetivo valorar mediante seguimiento clínico 2 vacunas VLP, frente al serotipo1 y frente a los serotipos 1+4. Los resultados confirman la falta de fiebre, sintomatología y lesiones anatomopatológicas en los animales vacunados frente a los controles, lo que indica que estas nuevas vacunas protegen frente a la aparición de sintomatología clínica.

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

Abstract

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

Keywords: Virus Like Particles vaccines, Bluetongue virus, sheep

Pérez de Diego A.C., Espinosa L., Sánchez-Vizcaíno JM. 2009. **Valoración de la producción de anticuerpos en un ensayo de vacunas VLP frente a los serotipos 1 y 4 de la lengua azul.** Revista Complutense de Ciencias Veterinarias. 3 (2): 184-191.

ISSN: 1988-2688
RCCV VOL. 3 (2). 2009

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

Ana Cristina Pérez de Diego, Laura Espinosa, José Manuel Sánchez-Vizcaíno
Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria VISAVET. UCM.
Departamento de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria.UCM.

RESUMEN

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

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

PALABRAS CLAVE: VLP, lengua azul, anticuerpos, ovino

ABSTRACT

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

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

KEYWORDS: VLP, Bluetongue virus, Antibodies, sheep.

INTRODUCCIÓN

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

Pérez de Diego A.C., Sánchez Matamoros A., Sánchez-Vizcaíno JM. 2009. **Detección de la expresión de citoquinas mediante RT-PCR en tiempo real en ganado ovino.** Revista Complutense de Ciencias Veterinarias. 3 (2): 129-138.

ISSN: 1988-2688
RCCV VOL. 3 (2). 2009

DETECCIÓNES DE LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS MEDIANTE RT-PCR EN TIEMPO REAL EN GANADO OVINO

CYTOKINES GENE EXPRESSION DETECTION BY REAL TIME RT-PCR IN SHEEP

Ana Cristina Pérez de Diego Camacho, Almudena Sánchez Matamoros, José Manuel Sánchez-Vizcaíno Rodríguez
Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET)
Departamento de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria.UCM.

RESUMEN

Las citoquinas son moléculas proteicas secretadas por diferentes células, fundamentalmente del sistema inmunitario, como respuesta a una estimulación inmunológica. Existen diferentes técnicas para estudiar la producción y acción de éstas en los individuos. Este estudio consiste en la puesta a punto de una técnica de Retrotranscripción- Reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) en tiempo real para la detección de la expresión del ARNm que codifica seis citoquinas (TNF-α, IFNγ, IL-4, IL2, IL-10, IL-12). Los resultados preliminares se obtuvieron tras la aplicación de la técnica a linfocitos estimulados *in vitro* con ConA (Concanavalina A) y LPS (Lipopolisacárido de *E.coli*) demostrando la detección de ARNm para IL-4, IL-2 e IFNγ y TNF-α, IL-12 e IL-10, respectivamente; posteriormente se realizó el estudio en ovejas inmunizadas frente a *Chlamydophyla abortus*, permitiendo la detección de la expresión de ARNm de las seis citoquinas. Estos resultados demuestran que es una técnica rápida, sensible y fiable para la detección de citoquinas.

Palabras clave: Citoquinas, RT-PCR, ovino

ABSTRACT

Cytokines are protein molecules that cells from the immune system secrete in response to immune stimulation. There are different techniques to study their production and their action on individuals. This study consists of the development of a real time RT-PCR method for the detection of the expression of mRNA coding for six cytokines (TNF-α, IFNγ, IL-4, IL2, IL-10, IL-12). The preliminary results were obtained from the study of lymphocites stimulated with Con A and LPS, showing the detection of ARNm, IL-4, IL-2, IFNγ and TNF-α, IL-12, IL-10, respectively. Its subsequent application in sheep that were vaccinated against *Chlamydophila abortus*, allowed the detection of mRNA expression for the six cytokines.

Sánchez-Cordón PJ, Pedrera M, Pérez de Diego AC, Rodríguez-Sánchez B, Ruíz-Villamor E, Pleguezuelos FJ, Sánchez Vizcaíno JM, Gómez-Villamandos JC. 2010. **Células presentadoras de antígeno: Células dendríticas y su papel en la Lengua Azul.** Anales. Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental. 23 (1).

CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENO: CÉLULAS DENDRÍTICAS Y SU PAPEL EN LA LENGUA AZUL

P. J. Sanchez Cordon[1*], M. Pedrera[1], A.C. Perez De Diego[2], B. Rodriguez-Sanchez[2], E. Ruiz-Villamor[3], F.J. Pleguezuelos[1], J.M. Sanchez-Vizcaino[2], J.C. Gomez-Villamandos[1]

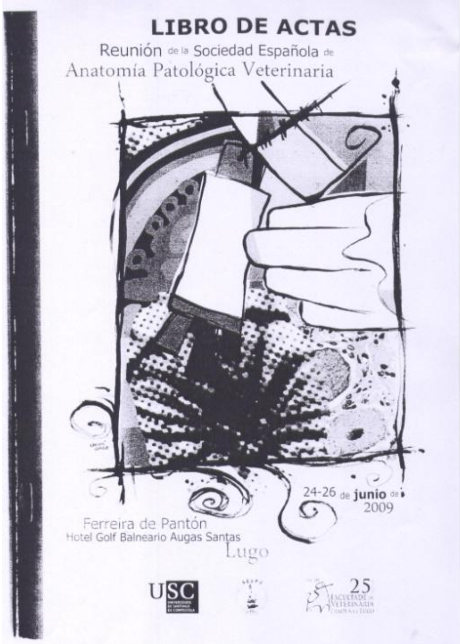
RESUMEN

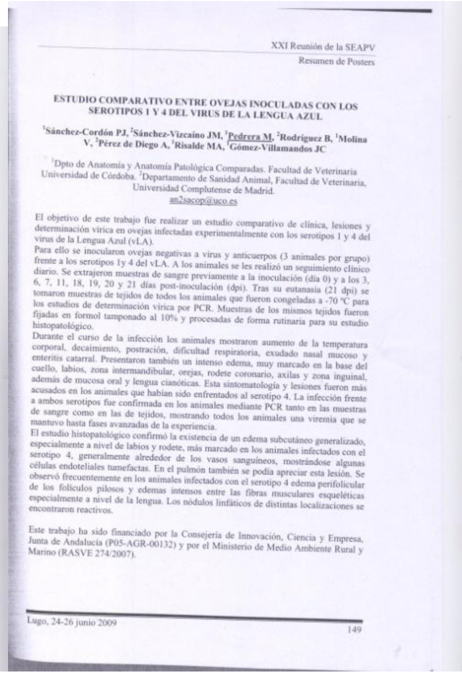
Las células presentadoras de antígeno (CPA) desempeñan un papel fundamental en el desarrollo de la respuesta inmunitaria mediante el procesamiento y la presentación de antígenos, así como a través de distintos estímulos que favorecen la proliferación y diferenciación linfocitaria. Entre las CPA, las células dendríticas (CDs) son consideradas como las más eficientes en las funciones de presentación. En este trabajo se abordan aspectos generales relacionados con la localización, estructura y función de estas células, así como con su importante papel en la instauración de la repuesta inmunitaria. Junto a las células endoteliales y a los macrófagos, las CDs son consideradas células blanco del virus de la lengua azul (vLA), desempeñando un importante papel en la diseminación orgánica de éste. Además, las CDs parecen jugar un importante papel como productoras o inductoras de sustancias vasoactivas responsables de los cambios vasculares que caracterizan a la enfermedad, quedando aún por determinar la influencia de estos mediadores químicos en la instauración de la respuesta inmunológica frente al virus, aspecto fundamental para el desarrollo y mejora de vacunas.

[1]Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba, Edificio Sanidad Animal, Campus de Rabanales, 14014, Córdoba, España.
[2]Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avda Puerta de Hierro s/n 28040 Madrid, España.
[3]*Laboratorio Central de Veterinaria de Santa Fe, Camino del Jau s/n, 18320, Santa Fe, Granada, España*
*E-mail: an2sacop@uco.es

VIII. 3. COMUNICACIONES A CONGRESOS

Jun. 2009. Sánchez-Cordón, PJ., Sánchez-Vizcaíno, JM., Pedrera, M., Rodríguez-Sánchez, B., Molina, V., Pérez de Diego, AC., Risalde, MA., Gómez-Villamandos, JC. **Estudio Comparativo entre ovejas inoculadas con los serotipos 1 y 4 del virus de la Lengua Azul.** Poster. XXI Reunión de la SEAVP. Lugo. España.





XXI Reunión de la SEAPV
Resumen de Posters

ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE OVEJAS INOCULADAS CON LOS SEROTIPOS 1 Y 4 DEL VIRUS DE LA LENGUA AZUL

[1]Sánchez-Cordón PJ, [2]Sánchez-Vizcaino JM, [1]Pedrera M, [2]Rodríguez B, [1]Molina V, [2]Pérez de Diego A, [1]Risalde MA, [1]Gómez-Villamandos JC

[1]Dpto de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas. Facultad de Veterinaria Universidad de Córdoba. [2]Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid.
an2sacop@uco.es

El objetivo de este trabajo fue realizar un estudio comparativo de clínica, lesiones y determinación vírica en ovejas infectadas experimentalmente con los serotipos 1 y 4 del virus de la Lengua Azul (vLA).
Para ello se inocularon ovejas negativas a virus y anticuerpos (3 animales por grupo) frente a los serotipos 1y 4 del vLA. A los animales se les realizó un seguimiento clínico diario. Se extrajeron muestras de sangre previamente a la inoculación (día 0) y a los 3, 6, 7, 11, 18, 19, 20 y 21 días post-inoculación (dpi). Tras su eutanasia (21 dpi) se tomaron muestras de tejidos de todos los animales que fueron congeladas a -70 ºC para los estudios de determinación vírica por PCR. Muestras de los mismos tejidos fueron fijadas en formol tamponado al 10% y procesadas de forma rutinaria para su estudio histopatológico.
Durante el curso de la infección los animales mostraron aumento de la temperatura corporal, decaimiento, postración, dificultad respiratoria, exudado nasal mucoso y enteritis catarral. Presentaron también un intenso edema, muy marcado en la base del cuello, labios, zona intermandibular, orejas, rodete coronario, axilas y zona inguinal, además de mucosa oral y lengua cianóticas. Esta sintomatología y lesiones fueron más acusados en los animales que habían sido enfrentados al serotipo 4. La infección frente a ambos serotipos fue confirmada en los animales mediante PCR tanto en las muestras de sangre como en las de tejidos, mostrando todos los animales una viremia que se mantuvo hasta fases avanzadas de la experiencia.
El estudio histopatológico confirmó la existencia de un edema subcutáneo generalizado, especialmente a nivel de labios y rodete, más marcado en los animales infectados con el serotipo 4, generalmente alrededor de los vasos sanguíneos, mostrándose algunas células endoteliales tumefactas. En el pulmón también se podía apreciar esta lesión. Se observó frecuentemente en los animales infectados con el serotipo 4 edema perifolicular de los folículos pilosos y edemas intensos entre las fibras musculares esqueléticas especialmente a nivel de la lengua. Los nódulos linfáticos de distintas localizaciones se encontraron reactivos.

Este trabajo ha sido financiado por la Consejeria de Innovación, Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía (P05-AGR-00132) y por el Ministerio de Medio Ambiente Rural y Marino (RASVE 274/2007).

Lugo, 24-26 junio 2009 149

Ag. 2009. Pérez de Diego, AC., Rodríguez, B., Noad, R., Atmaran, TN., Stewart, M., Sánchez-Vizcaíno, JM., Roy, P. **Evaluation of the response induced by VLP Vaccines for Bluetongue Virus serotypes 1 and 1&4 in sheep.** Presentación Oral. 8th International congress of Veterinary Virology. Budapest-Hungría.

Oral presentations – Vaccines and viral immunology

EVALUATION OF THE RESPONSE INDUCED BY VLP VACCINES FOR BLUETONGUE VIRUS SEROTYPES 1 AND 1&4 IN SHEEP

Ana C. Pérez de Diego[1], Belén Rodríguez[1], Rob Noad[2], T.N. Athmaran[2], Meredith Stewart[2], José M. Sánchez-Vizcaíno[1], Polly Roy[2]

[1]*Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria, VISAVET, Animal Health Department, Faculty of Veterinary Science, Universidad Complutense de Madrid, Spain;* [2]*London School of Hygiene & Tropical Medicine, London, UK*

Keywords: bluetongue virus, VLP vaccine

Introduction and objectives
Vaccination is a basic measure to control Bluetongue Disease *(Savini et al., 2008)* as it has been demonstrated recently in Spain after the eradication of BTV serotype 4.
The novel Virus Like Particles (VLP) vaccines present two fundamental advantages: the possibility to create polyvalent vaccines with different VP2 proteins from different serotypes and the capability to distinguish between infected and vaccinated animals, since vaccinated animals will not present antibodies for non structural proteins, due to the fact that the vaccine only contains 4 structural proteins. *(Noad and Roy, 2003)*
The aim of this study was to evaluate the response to a monovalent VLP vaccine for BTV serotype 1 and a polyvalent VLP vaccine for BTV serotypes 1&4, by the clinical survey, ELISA test to detect antibodies, and RT-PCR to detect the viraemia.

Materials and methods
The vaccines used were developed by VLP technology, and were a monovalent vaccine for serotype 1 and a bivalent vaccine for serotypes 1 & 4. The adjuvant administered instead of the vaccine, in the control animals, was the Montanide ISA 296 VG which is the one used also in the VLP vaccines. The animals for this study were 26 Merino sheep, male and female, about 7-8 month old at the beginning of the experiment. They were separated in 5 groups. Group A, 8 animals vaccinated with VLP for BTV serotype 1 (BTV1) and challenged with the same serotype. Group B, 6 animals vaccinated with VLP for BTV1&4 and challenged with BTV1. Group C, 3 animals that were not vaccinated and they were challenged with BTV1. Group D, 6 animals vaccinated with VLP for BTV 1&4 and challenged with BTV4. Finally Group E: 3 animals that were not vaccinated but challenged with BTV 4. Following a previously established calendar the vaccination was carried out on day 0 of the experiment and the revaccination on day 20, the challenge was performed on day 48 and the trial ended with the euthanasia of the animals on day 75. Groups A, B and C were challenged with BTV1 and the groups D and E with BTV4. Following the calendar the temperature was measured with rectal thermometer and with infrared thermography, and sera and blood samples were collected. To carry out the clinical exploration, we based on previous experiments (Perrin et to., 2007) from which, a table was developed with the main clinical signs of BTV disease, assigning different scores to each of them, according to its importance. Sera samples were analyzed by a competitive ELISA test for the detection of antibodies against VP7 protein (POURQUIER Bluetongue Competitive ELISA). Blood was analyzed by RT-PCR, by the use of primers and a specific probe following the protocol established by Toussaint et al. (2007). Between days 69 and 71 the sheep from gropus C and E were sacrificed and the necropsy of these animals and 2 animals from each vaccinated groups (A, B and D) was performed. The clinical trial was completed at day 75, when the remaining animals were sacrificed.

Results
The information of clinical exploration recorded from the groups A, B and D indicates that the vaccinated animals do not present the clinical disease. The animals of the groups C and E showed symptomatology, and it was more pronounced in the animals of the group C. In both groups the clinical symptomatology appeared about days 8 and 11 post infection (pi) and it lasted in some cases until day 19 pi. The rectal temperature average of the groups C and E suffered an increase since day 8 after the challenge. For infrared thermography temperatures, the results obtained from one of the animals from group C, indicated that the temperature registered in the eyes, was 38,4 ºC and remained the same until the challenge. However, it was raised up to the 40,1 ºC on day 5 pi, coinciding with the moment of the maximum rectal temperature (41,9 ºC). At the necropsy, the pathological signs observed in the Group C were: predominance of white splenic zones (2/3), reactive bone marrow (1/3), generalized lymphnodes hypertrophy (3/3) and alveolar oedema (2/3). Group E presented predominance of white splenic zones (1/3), and generalized lymphnodes hypertrophy (2/3) .In groups A and B the animals presented positive results to the ELISA test from day 15 after the revaccination, with the exception of an individual (1/8), from wich antibodies were not detected until day 10 pi. In the group C antibodies were detected from day 10 pi. The average of the animals of the group D shows the presence of antibodies since day 15 after the revaccination and since day 20 pi in group E. In the group A only six animals (6/8) show positive results to the RT-PCR, on day 6 pi. All the animals of the group B show negative results except on day 6 pi. The control group for serotype 1 (Group C) shows positive results since day 3 until day 20 pi. In 3 of the animals from group D (3/6) positive results were obtained on day 6 pi. 2 animals of this group (2/6) were also positive 13 days pi. In the Group E positive results were detected from day 5 up to day 20 pi.

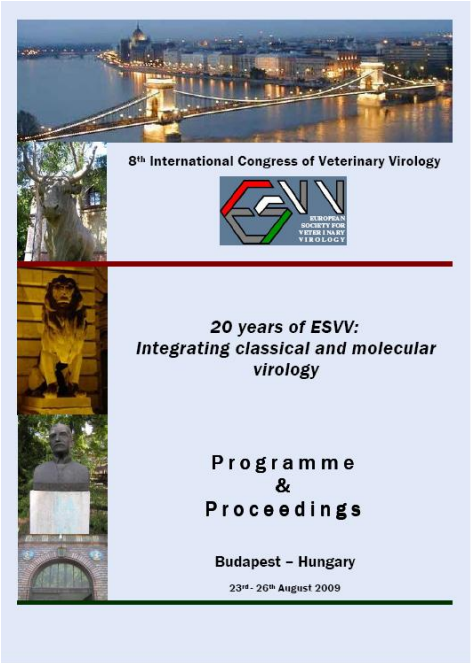
Discussion and conclusions
The use of a score to evaluate the symptoms appears to be a suitable form to compare the results among different studies. The animals from the control groups showed variable BTV specific symptomatology. The observed symptomatology was more severe in the animals infected with BTV 1 that in those infected with BTV 4, which coincides with field observations in Spain. The high temperature in the non-vaccinated animals and its marked increase from day 8 post-inoculation were expected. The preliminary information from infrared thermography, indicates that this technique is a rapid and effective tool that reduces the level of stress in the animals, and it will be suitable to detect the changes of temperature derived from feverish processes specially registering the temperature from the eyes. The pathologic findings at the necropsy are not obvious; it is probably due to the fact that the time chosen for the assessment of the necropsies was not the most appropriate since the animals were in the phase of recovery from the disease. The absence of clinical symptomatology, as well as of fever and of pathologic signs compatible with Bluetongue in the vaccinated animals, indicates the capacity of the VLP1 and VLP 1&4 vaccines to avoid the appearance of the clinical signs. In some vaccinated animals the presence of antibodies against VP7 were detected from day 10 post vaccination, in others from day 20 post vaccination and the major result of antibodies was obtained on day 35 post vaccination. Previous studies developed with BTV 2 inactivated vaccine in which the presence of VP2 neutralizing antibodies was analyzied, yielded similar results. (Hamers et al. 2009) Thus our data demonstrates that that the temporary development of the immune response of the VLP vaccines is similar to that of the inactivated vaccines. The presence of antibodies in the vaccinated animals indicates the capacity of the VLP vaccines to stimulate the humoral response. RT-PCR's results indicate a clear difference between vaccinated animals, with a brief peak of viraemia that lasts only one day, and not vaccinated, whose viraemia is longer. The VLP vaccines proved to be effective to diminish the viraemia after the challenge with BTV.

Acknowledgements
This study has been financed thanks to the European project BTVAC FP6-2005-SSP-5A and thanks to the Education Ministry of Spain FPU programme. The authors also would like to thank the technicians Belen and Rocio for their laboratory work and Pedro Sánchez Cordón for his pathologic study.

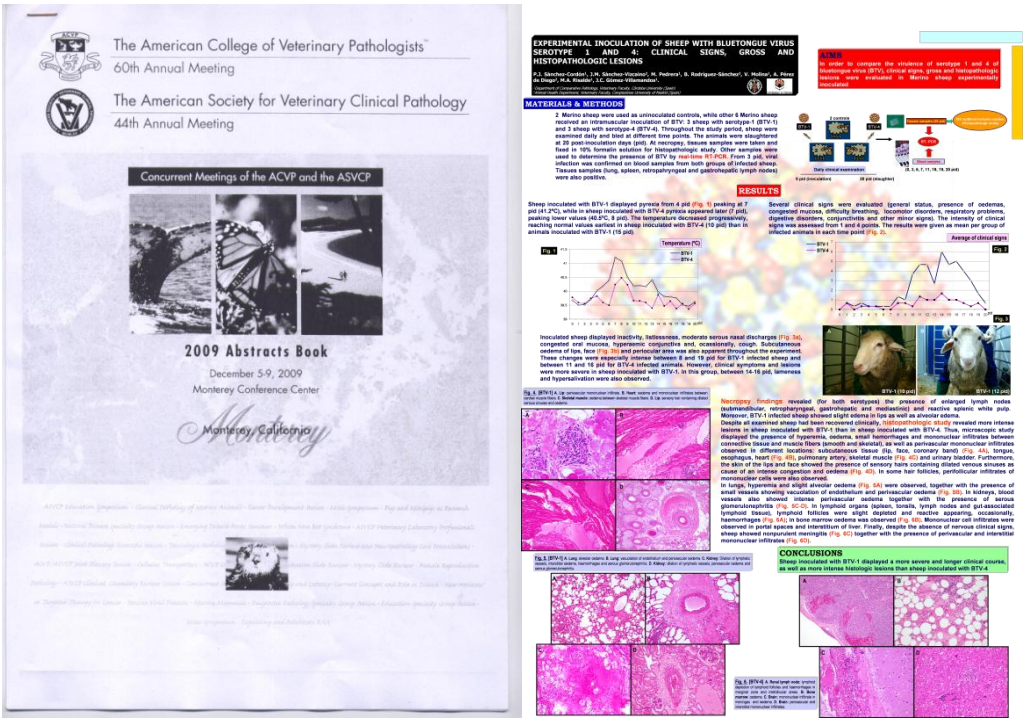
References
1. Hamers, C., Rehbein, S., Hudelet, P., Blanchet, M., Lapostolle, B., Cariou, C., Duboeuf, M., Goutebroze, S. (2009) Protective duration of immunity of an inactivated bluetongue (BTV) serotype 2 vaccine against a virulent BTV serotype 2 challenge in sheep. Vaccine. 27, 2789-2793.
2. Noad, R., Roy, P. (2003) Virus-like particles as immunogens. Trends in microbiology 11, 438-444.
3. Perrin, A., Albina, E., Breard, E., Sailleau, C., Prome, S., Grillet, C., Kwiatek, O., Russo, P., Thiery, R., Zientara, S., Cetre-Sossah, C. (2007) Recombinant capripoxviruses expressing proteins of bluetongue virus: evaluation of immune responses and protection in small ruminants. Vaccine 25, 6774-6783.
4. Savini, G., MacLachlan, N.J., Sanchez-Vizcaino, J.M., Zientara, S. (2008) Vaccines against bluetongue in Europe. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 31, 101-120.
5. Toussaint, J.F., Sailleau, C., Breard, E., Zientara, S., De Clercq, K. (2007) Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments. Journal of Virological Methods 140, 115-123.

52 ESVV - 8th International Congress of Veterinary Virology – August 2009 – Budapest - Hungary

Ag. 2009. Rodríguez, B., Sáncehez-Cordón, PJ., Molina, V., Risalde, MA., Pérez de Diego, AC., Gómez-Villamandos, JC., Sánchez-Vizcaíno, JM. **Detection of Bluetongue Serotype 4 in wx embedded tissues from wild ruminants in the south of Spain.** Poster. 8th International congress of Veterinary Virology. Budapest-Hungría.



Dec. 2009. Sánchez-Cordón, PJ., Sánchez-Vizcaíno, JM., Pedrera, M., Rodríguez-Sánchez, B., Molina, V., Pérez de Diego, AC., Risalde, MA., Gómez-Villamandos, JC. **Experimental inoculation of sheep with bluetongue virus serotype 1 and 4: Clinical signs, gross and histopathologic lesions.** Poster. 44th Annual Meeting. The American Society for Veterinary Clinical Pathology. Moterey California. EEUU.



Ab. 2010. Perez de diego, AC., del Carmen, P., Sánchez-Vizcaíno, JM. **Evaluación de la temperatura corporal mediante termografía infrarroja en una infección experimental con lengua azul en ovejas merinas.** Presentación Oral. V Jornadas Complutenses. IV Congreso Nacional de investigación para alumnos de pregrado en ciencias de la salud y IX congreso de ciencias veterinarias y biomédicas. Madrid. España

El Comité Organizador de las
V JORNADAS COMPLUTENSES, IV CONGRESO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN PARA ALUMNOS DE PREGRADO EN CIENCIAS DE LA SALUD Y IX CONGRESO DE CIENCIAS VETERINARIAS Y BIOMÉDICAS

V Jornadas Complutenses, IV Congreso Nacional de

CERTIFICA

IX Congreso de Ciencias Veterinarias y Biomédicas

Que Dª **Ana Cristina Pérez de Diego Camacho**

ha presentado durantes dichas Jornadas, celebradas los días 22, 23 y 24 de abril de 2010 en la Facultad de Medicina de la Universidad complutense de Madrid, el trabajo titulado:

EVALUACIÓN DE LA TEMPERATURA CORPORAL MEDIANTE TERMOGRAFÍA INFRARROJA EN UNA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON LENGUA AZUL EN OVEJAS MERINAS

tutorizado por:

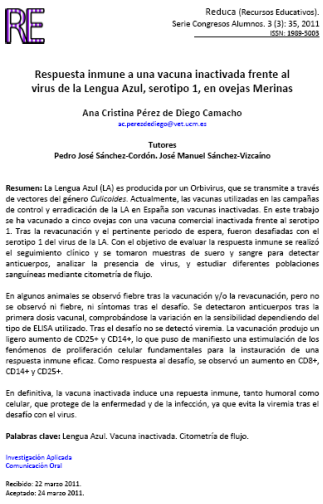
Prof. Dr. D. José Manuel Sánchez-Vizcaíno Rodríguez

Para que conste y surta los efectos oportunos, firman el presente certificado en Madrid, a 24 de abril de 2010.

Prof. Dr. D. Joaquín Goyache Goñi
Decano de la Facultad de Veterinaria

Profª Dra Dª Marta González Huecas
Coordinadora

Mar 2011. Pérez de Diego, AC., Sánchez-Cordón, PJ., Sánchez-Vizcaíno, JM. **Respuesta inmune a una vacuna inactivada frente al virus de la Lengua Azul, serotipo1, en ovejas merinas.** Presentación oral. VI Jornadas Complutenses. V Congreso Nacional de investigación para alumnos de pregrado en ciencias de la salud y X congreso de ciencias veterinarias y biomédicas. Madrid. España.



Reduca (Recursos Educativos).
Serie Congresos Alumnos. 3 (3): 35, 2011
ISSN: 1989-5003

Respuesta inmune a una vacuna inactivada frente al virus de la Lengua Azul, serotipo 1, en ovejas Merinas

Ana Cristina Pérez de Diego Camacho
ac.perezdiego@vet.ucm.es

Tutores
Pedro José Sánchez-Cordón. José Manuel Sánchez-Vizcaíno

Resumen: La Lengua Azul (LA) es producida por un Orbivirus, que se transmite a través de vectores del género *Culicoides*. Actualmente, las vacunas utilizadas en las campañas de control y erradicación de la LA en España son vacunas inactivadas. En este trabajo se ha vacunado a cinco ovejas con una vacuna comercial inactivada frente al serotipo 1. Tras la revacunación y el pertinente periodo de espera, fueron desafiadas con el serotipo 1 del virus de la LA. Con el objetivo de evaluar la respuesta inmune se realizó el seguimiento clínico y se tomaron muestras de suero y sangre para detectar anticuerpos, analizar la presencia de virus, y estudiar diferentes poblaciones sanguíneas mediante citometría de flujo.

En algunos animales se observó fiebre tras la vacunación y/o la revacunación, pero no se observó ni fiebre, ni síntomas tras el desafío. Se detectaron anticuerpos tras la primera dosis vacunal, comprobándose la variación en la sensibilidad dependiendo del tipo de ELISA utilizado. Tras el desafío no se detectó viremia. La vacunación produjo un ligero aumento de CD25+ y CD14+, lo que puso de manifiesto una estimulación de los fenómenos de proliferación celular fundamentales para la instauración de una respuesta inmune eficaz. Como respuesta al desafío, se observó un aumento en CD8+, CD14+ y CD25+.

En definitiva, la vacuna inactivada induce una repuesta inmune, tanto humoral como celular, que protege de la enfermedad y de la infección, ya que evita la viremia tras el desafío con el virus.

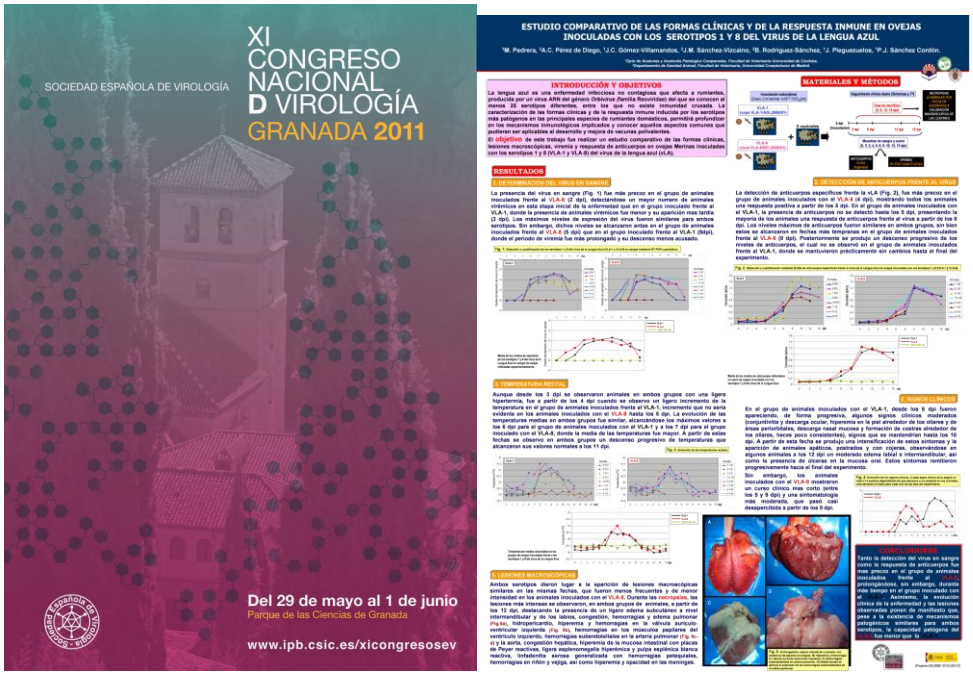
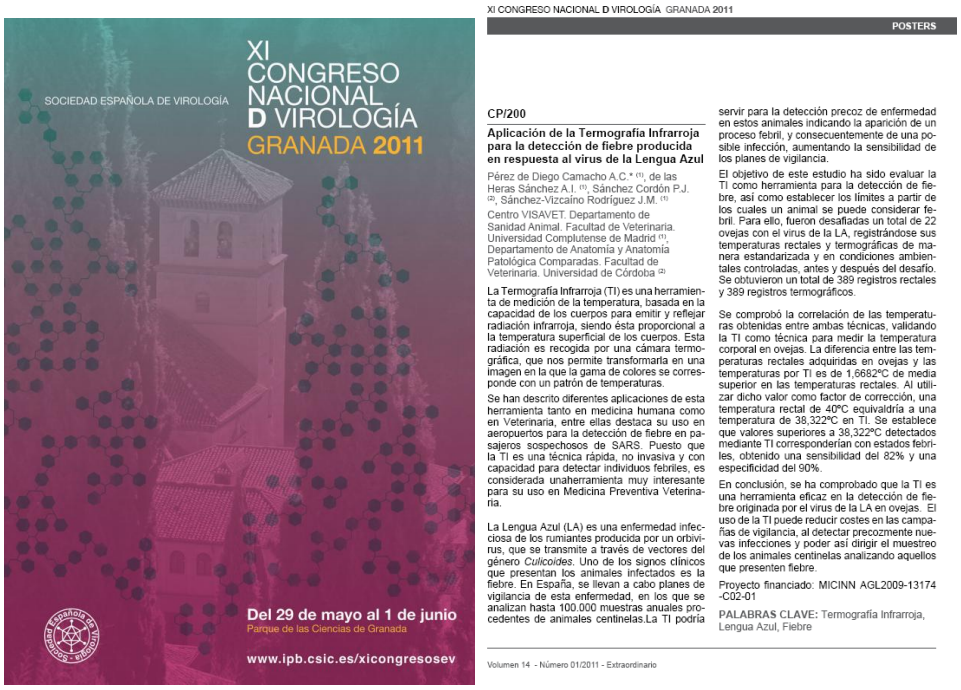
Palabras clave: Lengua Azul. Vacuna inactivada. Citometría de flujo.

Investigación Aplicada
Comunicación Oral

Recibido: 22 marzo 2011.
Aceptado: 24 marzo 2011.

35

May. 2011. Pedrera, M., Pérez de Diego, AC., Gómez-Villamandos, JC., Sánchez-Vizcaíno, JM., Rodríguez-Sánchez, B., Sánchez-Cordón, PJ., Pleguezuelos, J. **Estudio comparativo de las formas clínicas y de la respuesta inmune en ovejas inoculadas con los serotipos 1 y 8 del virus de la Lengua Azul.** Poster. XI Congreso Nacional de Virología. Granada. España.



May. 2011. Pérez de Diego Camacho AC., de las Heras Sánchez AI. , Sánchez Cordón P.J., Sánchez-Vizcaíno Rodríguez J.M. **Aplicación de la Termografía Infrarroja para la detección de fiebre producida en respuesta al virus de la Lengua Azul.** Poster. XI Congreso Nacional de Virología. Granada. España.