

La eliminación del gen CD2v del aislado virulento BA71 del Virus de la Peste Porcina Africana provoca su atenuación *in vivo*, permitiendo disponer de una vacuna experimental con capacidad protectora frente a virus homólogos y heterólogos

Memoria presentada por **Paula López Monteagudo**
para optar al grado de Doctora en Inmunología

Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología
Universidad Autónoma de Barcelona

Los directores

La tutora

Dr. Fernando Rodríguez

Dra. María Luisa Salas

Dra. Dolores Jaraquemada

La doctoranda

Paula López Monteagudo

Junio 2015



CReSA

UAB
Universitat Autònoma
de Barcelona

RESUMEN.....	IV
ABREVIATURAS.....	VI
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. La enfermedad: Peste Porcina Africana (PPA).....	3
1.1.1. Breve historia sobre la enfermedad	3
1.1.2. Estado actual de la enfermedad en Europa	7
1.1.3. Situación epidemiológica en África	11
1.1.4. Patogenia de la PPA.....	14
1.1.5. Diagnóstico de la PPA.....	18
1.2. El virus de la peste porcina africana (VPPA).....	20
1.2.1. Genoma viral	20
1.2.2. Morfología del VPPA	21
1.2.3. Ciclo infectivo del VPPA en una célula	24
1.2.3.1. <i>Entrada del virus en la célula diana.....</i>	<i>24</i>
1.2.3.2. <i>Transcripción y replicación</i>	<i>25</i>
1.2.3.3. <i>Morfogénesis viral y posterior salida de la célula huésped</i>	<i>27</i>
1.2.3.4. <i>La tecnología inducible, una herramienta para el conocimiento de las funciones de las proteínas del VPPA</i>	<i>29</i>
1.3. Interacción del VPPA con el sistema inmunitario: Historia de un equilibrio inestable.....	33
1.3.1. VPPA: Un virus con tropismo por el sistema inmunitario del huésped.....	33
1.3.2. VPPA: un maestro de la evasión del sistema inmunitario	35
1.3.3. Estudios de la interacción del VPPA con el sistema inmunitario: “No sólo de macrófagos vive el VPPA”	36
1.3.4. Mecanismos implicados en la protección contra el VPPA.....	38
1.3.4.1. <i>Las células NK.....</i>	<i>38</i>
1.3.4.2. <i>Papel de los anticuerpos específicos en protección.....</i>	<i>39</i>
1.3.4.3. <i>Papel de la respuesta T-específica en protección.....</i>	<i>41</i>
1.4. Desarrollo de vacunas experimentales frente al VPPA.....	42
1.4.1. Antecedentes.....	42
1.4.2. Nuevos horizontes, virus modificados genéticamente	45
2. OBJETIVOS.....	47
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
3.1. Líneas celulares	55
3.1.1. Líneas celulares estables.....	55
3.1.2. Líneas celulares primarias	55

3.1.2.1.	<i>Células mononucleares de sangre periférica (PBMC)</i>	55
3.1.2.2.	<i>Macrófagos alveolares porcinos (MAP)</i>	56
3.2.	Aislados virales y métodos de titulación	56
3.2.1.	Aislados del VPPA utilizados.....	56
3.2.2.	Titulación del VPPA mediante hemadsorción.....	56
3.2.3.	Titulación del VPPA mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)	56
3.2.4.	Titulación del VPPA mediante la técnica de formación de placas de lisis.....	58
3.2.5.	Preparación de stocks virales para su uso <i>in vivo</i> como vacunas experimentales...59	
3.3.	Manipulación genética del aislado virulento BA71 del VPPA	60
3.3.1.	Generación de los virus inducibles BA71.ΔTK.pp220i, BA71.ΔCD2.pp220i y BA71. ΔCD2.PKi.....	60
3.3.2.	Caracterización <i>in vitro</i> de los virus inducibles.....	64
3.3.2.1.	<i>Cuantificación de la inducción y represión de la PK por Western blotting</i>	64
3.3.2.2.	<i>Caracterización fenotípica del BA71.ΔCD2.PKi por microscopia electrónica</i> ...65	
3.4.	Ensayos <i>in vivo</i>	65
3.4.1.	Animales y diseño experimental de los ensayos de inmunización e infección.....	65
3.4.2.	Seguimiento clínico de la PPA.....	66
3.4.3.	Cinética cuantitativa de la carga viral en sangre en hisopos nasales.....	66
3.4.4.	Valoración de la respuesta inmunológica.....	67
3.4.4.1.	<i>Detección de anticuerpos frente al VPPA mediante un ELISA específico</i>	67
3.4.4.2.	<i>Detección de respuesta celular específica frente al VPPA</i>	67
3.4.4.2.1.	<u>ELISPOT para la detección de células T específicas secretoras de IFN-γ</u>	68
3.4.4.2.2.	<u>Linfoproliferación y caracterización fenotípica de los linfocitos T específicos mediante citometría de flujo</u>	69
4.	RESULTADOS	71
4.1.	Caracterización del potencial vacunal de VPPA inducibles	73
4.1.1.	Generación de virus mutantes: no es lo mismo <i>in vitro</i> que <i>in vivo</i>	73
4.1.2.	BA71 no pierde virulencia en células COS-1.....	73
4.1.3.	Generación de BA71.ΔTK.pp220i, virus inducible para la poliproteína esencial pp220 utilizando el aislado virulento del VPPA BA71 como virus parental	75
4.1.4.	BA71.ΔTK.pp220i no confiere protección frente a la infección letal con el virus homólogo BA71.....	77
4.2.	BA71.ΔCD2: de la Timidina Quinasa a la Hemaglutinina	80
4.2.1.	El virus virulento BA71 se atenúa al perder el gen CD2: BA71.ΔCD2.....	81
4.2.2.	4.2.2 La inoculación con BA71.ΔCD2 puede proteger frente al desafío letal con virus homólogos y heterólogos.....	82
4.2.3.	BA71.ΔCD2 produce una respuesta policlonal.....	90

4.2.4.	4.2.4 La protección conferida por BA71.DCD2 es dosis dependiente.....	91
4.2.5.	BA71.DCD2 estimula una potente respuesta humoral y celular.....	96
4.3.	BA71.DCD2 protege frente a la infección con Georgia07.....	97
4.3.1.	Eligiendo una dosis letal óptima de Georgia07 para los ensayos de protección.....	97
4.3.2.	Evaluación del potencial protector de Ba71.DCD2 frente a Georgia07.....	99
4.3.3.	BA71.DCD2; un prototipo vacunal experimental que necesita mejorar su bioseguridad.....	102
4.3.4.	Análisis de la respuesta humoral y celular.....	102
4.4.	Virus inducibles como potenciales vacunas frente a la PPA: Datos preliminares.....	104
4.4.1.	BA71.DCD2.pp220i.....	104
4.4.2.	BA71.ΔCD2.PKi; un nuevo virus virulento inducible y el primero carente de CD2.....	104
5.	DISCUSIÓN.....	109
	• Vacunas Vivas: pasado, presente y futuro.....	111
	• PPA, una enfermedad considerada exótica y erradicada en nuestras fronteras	111
	• Mejorando la seguridad y trazabilidad de BA71.DCD2: Una tarea no tan sencilla de llevar a cabo.....	113
	– Utilización de VPPA inducibles como vacunas	
	– Generación de virus delecionados en más de un locus	
	• BA71ΔCD2. Un modelo ideal para identificar antígenos croprotectores	117
	• La vacuna ideal.....	118
	• Otros hallazgos y misterios sin resolver.....	119
	– La muerte inesperada de un animal tras la vacunación con BA71.ΔCD2	
	– Las causas que explican la croprotección	
6.	CONCLUSIONES	123
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	129

RESUMEN

La peste porcina africana (PPA) es una enfermedad hemorrágica altamente infecciosa de declaración obligatoria a la Organización Mundial de la Salud Animal (OIE) y que provoca grandes pérdidas económicas en los países afectados. El agente causal de la enfermedad es el virus de la peste porcina africana (VPPA), un virus para el que todavía hoy no existe vacuna. El VPPA permanece endémico desde su origen en el África subsahariana, mantenido en un ciclo silvestre entre los cerdos salvajes y las garrapatas, infectando ocasionalmente a cerdos domésticos, altamente susceptibles a la enfermedad. Desde que en el año 2007 el virus volviera a entrar en la Europa continental, no ha parado de expandirse desde Georgia por todo el Cáucaso y Rusia, alcanzando en 2014 a varios países de la Unión Europea.

El principal objetivo de esta Tesis fue desarrollar una nueva vacuna frente a la PPA basada en la manipulación genética del virus. Estos fueron los principales logros conseguidos: i) la delección del gen de la hemaglutinina o CD2 viral del genoma de la cepa virulenta BA71, atenúa dramáticamente su patogenicia *in vivo*.; ii) El virus delecionado de CD2v, BA71.ΔCD2, es capaz de conferir protección frente a la infección letal con el virus homólogo virulento BA71, así como frente al virus heterólogo virulento E75, de una manera dosis dependiente; iii) La dosis más elevada ensayada de BA71.ΔCD2: 10^6 UFP, protegió totalmente a los animales frente a la infección letal con uno u otro aislado de VPPA; iv) La protección cruzada observada tras inmunizar con BA71.ΔCD2 correlaciona con la capacidad que este virus tiene de inducir células T-CD8⁺ que *in vitro* reconocen tanto a BA71 como a E75, mientras que los virus atenuados hasta ahora probados sólo protegían y reconocían únicamente a virus homólogos; iv) La inoculación de 10^6 UFP de BA71.ΔCD2 fue capaz de proteger al 100% de los cerdos vacunados frente a la infección con una dosis letal del virus heterólogo Georgia07, actualmente circulando por Europa.

Los resultados obtenidos durante esta Tesis avalan la idea de que obtener una vacuna frente a PPA es posible, si bien es esencial aumentar su seguridad y dotarla de la capacidad de inducir una respuesta inmunológica que permita diferenciar a los animales vacunados de los infectados; clave sobre todo pensando en su utilización en zonas libres de la enfermedad.

SUMMARY

African swine fever (ASF) is a highly infectious hemorrhagic disease of compulsory declaration to the World Animal Health (OIE) and causes important economical losses in affected countries. The causative agent of the disease is African swine fever virus (ASFV), a large and complex virus against which there is no effective vaccine available and therefore, its control and eradication relies on the rapid diagnostic of the disease and culling of infected and/or exposed animals to the virus. ASF remains endemic in sub-Saharan Africa where the virus is in a sylvatic cycle between wild pigs and ticks, occasionally infecting highly susceptible domestic pigs. The virus re-entered Continental Europe in 2007 and since then, the virus has circulated from Georgia to the rest of the Caucasian Regions, Russia and more recently has entered the European Union borders.

The main objective of this Thesis was developing a new vaccine strategy against ASF, based on the genetic manipulation of the ASFV genome. The main findings obtained can be summarized as follows: i) the deletion of the hemagglutinin gene or viral CD2, strongly attenuated the ASFV-BA71 virulent strain *in vivo*; ii) BA71.ΔCD2, a live attenuated virus defective for CD2v, is able to confer *in vivo* protection in a dose-dependent manner against the lethal challenge with either the homologous BA71 virus or the heterologous E75 virus; iii) Inoculation with the higher dose tested of BA71.ΔCD2, 10^6 PFU, conferred complete protection against BA71 and E75; iv) the cross-protection induced by BA71.ΔCD2 correlated with its ability to induce specific CD8⁺ T-cells capable to *in vitro* recognize both BA71 and E75 viruses; an effect observed for the first time for ASFV-attenuated viruses, capable only to confer protection against homologous viruses; v) Inoculation of 10^6 PFU of BA71.ΔCD2 protected 100% of the immunized pigs against lethal challenge with the virulent strain Georgia07, currently circulating in Europe.

The encouraging results obtained during this Thesis open new expectations and strength our opinion about the possibility of obtaining a vaccine against ASFV. Despite these promising findings, this vaccine prototype should be refined to obtain a safer vaccine capable also of inducing a differential immune response from circulating ASF viruses; a must in Veterinary vaccines against diseases of compulsory declarations.

ABREVIATURAS

aa: aminoácido
ADN: ácido desoxirribonucleico
ARN: ácido ribonucleico
ARNm: ARN mensajero
ARRIAH: del inglés All-Russian Institute for Animal Health
AT: adenina-timina
ATCC: colección americana de cultivos tipo (del inglés American Type Culture Collection)
BSA: albúmina sérica bovina (del inglés Bovine Serum Albumina)
CAV: virus e la anemia del pollo (del inglés *Chicken Anemia Virus*)
CFSE: carboxiluoresceína succinimidil éster
CGE: Copias Genómicas Equivalentes
CID: Coagulación Intravascular Diseminada
CMV: Citomegalovirus humano
COS-1: células semejantes a fibroblastos de riñón de mono verde africano
CPA: Célula Presentadora de Antígeno
CS: Célula Secretora
CTL: linfocito T citotóxicos (del inglés Cytotoxic T Lymphocytes)
CV1: fibroblastos de riñón de mono verde
DIVA: del inglés Differentiating Infected from Vaccinated Animals
DMEM: medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco (del inglés Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DMSO: dimetil sulfóxido
DO: densidad óptica
dpi: día post-infección
dpv: día post-vacunación
dsADN: ADN de doble cadena
EDTA: ácido etilendiaminotetracético (del inglés Ethylenediamine Tetraacetic Acid)
EFSA: agencia europea de seguridad alimentaria (del inglés European Food Safety Agency)
ELI: inmunización con librería de expresión (del inglés Expression Library Immunization)
ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima (del inglés Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay)
ELISPOT: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima mediante recuento de spots (del inglés Enzyme-Linked Immunoabsorbent Spot assay)
ER: retículo endoplasmático (del inglés Endoplasmic Reticulum)
FA: Fiebre Aftosa
FAT: test de inmunofluorescencia directa (del inglés Fluorescent Antibody Test)
FB: fibroblasto
HA: hemaglutinina
HN: hisopo nasal
HVB-1: Herpesvirus Bovino de tipo 1
INIA: Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria
IFA: test de inmunofluorescencia indirecta (del inglés Indirect Fluorescent Antibody test)
IFN: interferón
IL: interleuquina
IPTG: isopropil β -D-1-thiogalactopiranosido
IPAM: del inglés Porcine Macrophage-derived cell lines
Kpb: kilopares de bases
L: linaje
LD₅₀: dosis letal 50 (del inglés Lethal Dose 50)

MAP: Macrófagos Alveolares Porcinos
MGF: familias multigénicas (del inglés Multigenic Families)
MHC: complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés Major Histocompatibility Complex)
MOI: multiplicidad de infección (del inglés Multiplicity Of Infection)
NCLDV: virus núcleo-citoplasmático de ADN grande (del inglés NucleoCytoplasmic Large DNA Virus)
NK: células asesinas naturales (del inglés Natural Killer)
NFkB: factor nuclear kappa B (del inglés Nuclear Factor kappa B)
NFAT: factor nuclear de células T-activadas (del inglés Nuclear Factor of Activated T-cells)
OIE: organización mundial de sanidad animal (del francés Office International des Epizooties)
ORF: fase de lectura abierta (del inglés Open Reading Frame)
PBMC: células mononucleares de sangre periférica (del inglés Peripheral Blood Mononuclear Cells)
pb: pares de bases
PBS: tampón fosfato salino (del inglés Phosphate Buffered Saline)
PCR: reacción en cadena de la polimerasa (del inglés Polymerase Chain Reaction)
pCMV: vector comercial para expresar genes en sistemas eucariotas bajo el control del promotor del Citomegalovirus
PHA: fitohemaglutinina (del inglés phytohemagglutinin)
pi: post-infección
PK: Serina Proteína Quinasa
PMSF: fenilmetilsulfonilfluorido (del inglés phenylmethylsulfonylfluoride)
PPA: Peste Porcina Africana
PPC: Peste Porcina Clásica
PRR: receptores de reconocimiento de patrones (del inglés Pattern Recognition Receptors)
pv: post-vacunación
PMI: medio de cultivo del Roswell Park Memorial Institute
RT-qPCR: PCR cuantitativa a tiempo real
SDS: dodecilsulfato sódico (el inglés sodium dodecyl sulfate)
SFB: suero fetal bovino
SLA: antígeno leucocitario porcino (del inglés Swine Leukocyte Antigen)
SPF: libre de patógenos específicos (del inglés Specific Pathogen Free)
TAP: transportador asociado al procesamiento antigénico (del inglés Transporter associated with Antigen Processing)
TGF: factor de crecimiento transformante (del inglés Transforming Growth Factor)
TIR: repeticiones invertidas terminales (del inglés Terminal-Inverted Repeats)
TK: timidina quinasa
TLR: receptor tipo Toll (del inglés Toll Like Receptor)
TMB: 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina
TNF: factor de necrosis tumoral (del inglés Tumor Necrosis Factor)
UE: Unión Europea
UHA: Unidad Hemadsorbente
UFP: Unidad Formadora de Placa
Vero: célula epitelial de riñón de mono verde
VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VPPA: Virus de la Peste Porcina Africana
VSH-1: Virus del Herpes Simplex tipo 1
WSL: del inglés wild boar lung cells
X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
X-gluc: ácido 5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónico
 β -gal: β -galactosidasa
 β -gus: β -glucuronidasa

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La enfermedad: Peste Porcina Africana (PPA)

1.1.1 Breve historia sobre la enfermedad

La peste porcina africana (PPA) es una enfermedad hemorrágica altamente infecciosa que afecta tanto a suidos domésticos como salvajes. La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) la integra dentro del capítulo de enfermedades de declaración obligatoria debido al impacto devastador que tiene, tanto a nivel sanitario como socioeconómico, en los países a los que afecta (capítulo 1.1- Notificación de enfermedades y datos epidemiológicos).

La PPA fue descrita por primera vez en Kenia (Montgomery, 1921) tras la aparición de brotes de una enfermedad hemorrágica, hasta ese momento desconocida, registrados en 1910 y 1915. Esta enfermedad, que afectaba a cerdos domésticos europeos recién introducidos en el continente africano causaba una mortalidad cercana al 100%.

Inicialmente se consideró como una variante de la Peste Porcina Clásica (PPC) debido a la similitud en las lesiones generadas, recibiendo así el nombre de Peste Porcina del Este Africano. Sin embargo, pronto se demostró que cerdos recuperados de la PPC no quedaban protegidos frente al nuevo agente infeccioso, demostrándose así que se trataba de una enfermedad totalmente distinta. Adicionalmente, se pudo demostrar que, a diferencia de lo que ocurre con la PPC, los suidos salvajes africanos (*Phacochoerus aethiopicus* y *Potamochoerus porcus*), podían actuar como reservorios del patógeno pese a no sufrir la enfermedad, explicando con toda probabilidad el origen de los primeros brotes declarados en cerdos domésticos (Montgomery, 1921).

En 1932 se aisló por primera vez el agente causal de la enfermedad, el virus de la Peste Porcina Africana (VPPA), a partir de cerdos salvajes infectados de forma natural y capturados en las proximidades de granjas de cerdos domésticos afectados por la enfermedad (Steyn, 1932). A pesar de estas evidencias, la transmisión directa de la enfermedad entre los cerdos salvajes y los cerdos domésticos no pudo ser demostrada experimentalmente a pesar de los numerosos ensayos realizados (Detray, 1957). El descubrimiento a mediados los años sesenta de que las garrapatas blandas del género *Ornithodoros* podían ser portadoras del virus resultó esencial, demostrándose que estos artrópodos jugaban un papel fundamental en el ciclo silvestre de transmisión del virus entre los cerdos salvajes y domésticos (Heuschele & L. Coggins, 1965; Plowright *et al.*, 1969; Sanchez Botija, 1963).

A pesar de resultar un constante problema para el continente africano desde la introducción de cerdos domésticos, la PPA no despertó interés fuera de ese continente, hasta que en 1957 un brote de la enfermedad afectó a Portugal, originado por la utilización de desechos de

comida de un avión procedente de Angola para alimentar a cerdos domésticos. A pesar de que este primer brote de PPA fue eficientemente controlado y erradicado (Manso Ribeiro *et al.*, 1958), en 1960 surgió un nuevo episodio de la enfermedad, que se extendió por toda la Península Ibérica. Estudios recientes discriminan entre los aislados virales que provocaron estos dos brotes y sugieren dos introducciones distintas de la enfermedad desde el Suroeste Africano (Gallardo *et al.*, 2009).

Una vez introducida la PPA en España, el virus se expandió con rapidez a través del país causando inicialmente unos signos clínicos muy claros y agudos acompañados de una elevada mortalidad. Con el paso de los años, esta situación cambió y la enfermedad pasó a ser endémica con una tasa de mortalidad baja, con formas de la enfermedad que iban desde moderadas a subclínicas.

Durante los años setenta y ochenta, la PPA se extendió desde la Península Ibérica a distintos países europeos, incluyendo Malta, Italia, Francia, Bélgica y Holanda, y también por el continente americano, afectando a Cuba, República Dominicana, Haití y Brasil, siendo erradicada en todos estos lugares, con la excepción de la isla de Cerdeña, donde permanece endémica desde su introducción en 1982. En todos estos casos, el programa de erradicación consistió en el sacrificio masivo de los animales infectados o potencialmente expuestos, política que implicaba grandes pérdidas económicas en los países afectados. En España no se consiguió erradicar la PPA hasta el año 1995.

Debido al periodo de tiempo tan largo que transcurrió desde el primer caso de PPA en España, hasta que el país pudo declararse libre de PPA, merece la pena profundizar en la historia de la lucha contra la enfermedad en España (Arias & Sanchez-Vizcaino, 2002).

La PPA llegó a España en el momento en el que la industrialización de la producción porcina empezaba a desarrollarse, implicando grandes pérdidas económicas a los productores que veían limitado el tráfico de animales, productos cárnicos procesados y carne fresca entre comunidades dentro del propio país y prohibición del mismo fuera de nuestras fronteras. Además de los productores y familias afectadas, el gobierno español también sufrió numerosas pérdidas económicas derivadas de esta limitación en el comercio, pero además también debido a los continuos programas llevados a cabo para el control y erradicación de la enfermedad que se fueron desarrollando durante décadas sin éxito y que supusieron grandes cantidades de dinero invertido. Llegado cierto punto, en 1985 se estableció un programa coordinado para la erradicación de la PPA que resultó financiado por la Comunidad Europea

con más de 43 millones de euros.

El programa de acción frente a la PPA implementó en España las siguientes medidas:

1. La formación de una red de veterinarios dedicados exclusivamente al diagnóstico y control de la enfermedad en el campo. Estos grupos de veterinarios se encargaron del control sanitario de las explotaciones, identificación de los animales, recogida de muestras para la vigilancia serológica en granjas de cría y en mataderos, así como de la realización de investigaciones epidemiológicas y la promoción para la creación de asociaciones sanitarias por parte de los productores.
2. Vigilancia serológica del 100% de las explotaciones porcinas. Para lograr este objetivo, fue necesario poner en marcha una prueba diagnóstica simple, rápida, precisa y específica así como un laboratorio de referencia para armonizar las técnicas. El mejor ensayo para la obtención de un diagnóstico rápido y fiable de la enfermedad fue el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) (Sanchez-Vizcaino et al. 1982). El Departamento de Salud Animal del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) se convirtió en el laboratorio de referencia nacional y en la actualidad es el laboratorio de referencia para PPA de la OIE y la Unión Europea (UE). Al principio del programa, los laboratorios realizaban un ELISA indirecto seguido de una inmunofluorescencia indirecta (IFA) para confirmar los resultados. En la etapa final, se desarrolló un ELISA mejorado, que estaba basado en un nuevo antígeno soluble, el cual contenía todas las proteínas del VPPA (Sanchez-Vizcaino, 1986). Más adelante se desarrolló una nueva prueba de confirmación serológica en lugar de la IFA, la inmunotransferencia (Arias & Sánchez-Vizcaíno JM., 1992; Pastor *et al.*, 1989) que permitió una interpretación más sencilla y objetiva de los resultados así como un mejor reconocimiento de las muestras débilmente positivas.
3. Mejoras en las instalaciones para los animales, siendo el primer objetivo mejorar las barreras sanitarias para prevenir la dispersión de la enfermedad. Se tomaron medidas básicas de higiene remodelando las explotaciones y dotándolas, entre otras medidas, de un sistema seguro de procesado de los excrementos. Más de 2.175 explotaciones fueron mejoradas desde 1985 hasta 1990.
4. Eliminación de todos los focos de PPA, sacrificando a los portadores del virus y desorganizando los rebaños infectados. Las autoridades responsables se encargaron de la indemnización inmediata y adecuada de los productores de cerdos de las explotaciones infectadas.

Las medidas tomadas fueron estrictas y aún así se tardaron 10 años en poder declarar a España como un país libre de PPA. Un punto clave para la erradicación de la enfermedad fue evitar el contacto entre rebaños, pues estudios epidemiológicos revelaron que el 84% y el 93% de los brotes surgidos en 1989 y 1990 respectivamente, se debían a contactos entre rebaños vecinos (Bech-Nielsen *et al.* 1995).

Otra medida importante fue el exhaustivo control de los movimientos del ganado; los animales en tránsito debían de estar censados y con una ficha veterinaria individual, y los vehículos también eran sometidos a desinfección. Programas de concienciación poblacional fueron de gran utilidad y llegaron a todos los sectores de la sociedad para así poder luchar de forma activa contra el problema.

A finales de 1989 se declararon dos regiones diferenciadas dentro de España, la región libre de PPA y la región infectada por PPA, de modo que en ciertas áreas de España estaba permitido el transporte de animales vivos, carne fresca y ciertos procesados cárnicos de las áreas libres al resto de países europeos. La región libre de PPA, en la cual el último brote constaba de 1987, abarcaba la mayoría del territorio español y representaba el 70% de la población de cerdos del país. La zona infectada con PPA cubría total o parcialmente áreas de las provincias de Salamanca, Cáceres, Badajoz, Huelva, Córdoba, Sevilla, Cádiz y Málaga.

La zona infectada poco a poco fue reduciéndose, pero en 1993 aún quedaban zonas infectadas donde persistía el virus debido, principalmente, a que las instalaciones de producción carecían del saneamiento y de la bioseguridad básicas, a la presencia de garrapatas blandas *O. erraticus* que actuaron como vectores del VPPA y a la existencia de una población de jabalíes incontrolada.

Finalmente en 1994, Portugal y España presentaron un programa coordinado para la definitiva erradicación de la PPA, puesto que los últimos brotes habían tenido lugar en la región portuguesa de Alentejo, cuyos sistemas de producción mixtos eran comunes. Tras esta actuación conjunta, a finales de 1995 España pudo declararse libre de PPA.

Una vez conocido todo el esfuerzo que supuso la erradicación de la enfermedad, queremos reflexionar sobre el porqué de su dificultad. Desde 1987 no aparecieron nuevos brotes de PPA en las zonas donde los sistemas de producción eran de tipo confinados (96% del territorio español), propiciando que la erradicación fuese más sencilla y rápida debido también a la ausencia de vectores y fauna salvaje. Por el contrario, en las regiones donde utilizaban sistemas de producción abiertas (como en el suroeste del país) la erradicación fue especialmente difícil, y no fue definitiva hasta la actuación conjunta con Portugal a partir de 1994.

Una vez superado el problema en la Península Ibérica, la preocupación por la PPA en Europa prácticamente desapareció, pero el virus en África continuaba activo y el número de brotes fue en aumento afectando no sólo al Sureste africano, sino que poco a poco fue avanzando hacia países del oeste del continente, incluyendo Chad, Costa de Marfil, Nigeria, Togo, Ghana y Burkina Faso; además de extenderse también a las islas de Madagascar y Mauricio (OIE, 2011). La situación epidemiológica actual de la PPA en África junto al complejo ciclo silvestre del virus en la región, que incluye reservorios naturales que se infectan de forma inaparente (cerdos salvajes y artrópodos) y cerdos domésticos altamente susceptibles a la enfermedad, dificultan enormemente el control y la erradicación de la enfermedad, aún más teniendo en cuenta la ausencia de vacunas eficaces contra la enfermedad. Pese a que, como hemos visto en el caso de España y Portugal, la erradicación de la enfermedad se llevó a cabo sin tratamientos ni vacunas frente al virus, cuando la situación epidemiológica de la zona es compleja, la erradicación se vuelve difícil y económicamente muy costosa, es por ello que una vacuna o un tratamiento eficaces son necesarios.

1.1.2 Estado actual de la enfermedad en Europa

Tras más de una década de silencio epidemiológico, la PPA volvió a aparecer en el continente europeo en el año 2007 con la declaración del primer brote en Georgia. El virus saltó desde África a Europa, desembarcando en la ciudad de Poti (Georgia) en la costa oriental del mar Negro a principios de Junio de 2007 y desde ese momento la enfermedad ha estado en continua expansión en Europa (Figura 1).

La cepa que provocó el primer brote de PPA en Georgia (Georgia 2007/1) resultó ser muy cercana filogenéticamente a un aislado de VPPA circulante en aquel momento en Mozambique, Madagascar y Zambia (Rowlands *et al.*, 2008), por lo que parece más que probable que el origen del brote residiera en productos porcinos contaminados con el virus transportados en barco, que se utilizaron para la alimentación de cerdos en granjas cerca de Poti.

Sólo unos meses después de este brote de la enfermedad, en Agosto de 2007, Armenia reportó los primeros casos de PPA que afectaron tanto a cerdos domésticos como salvajes en un área muy cercada a la frontera con Georgia (menos de 30 km) desvelando la persistencia de esta enfermedad en el área (Sánchez-Vizcaíno *et al.* 2013). Cabe recordar que a diferencia de lo que ocurre con los cerdos salvajes africanos, los jabalíes europeos son totalmente susceptibles a la enfermedad, cursando con una morbilidad y mortalidad prácticamente idéntica, tanto tras la infección natural como experimental (Blome *et al.*, 2013).

Diferentes factores adversos hacen que la erradicación de esta enfermedad en el Cáucaso sea especialmente difícil, lo que ha hecho que en los siguientes años la enfermedad se haya ido expandiendo a los países vecinos del sur del Cáucaso y Rusia. Dentro de los factores que dificultan esta erradicación se encuentra el régimen de alimentación de los cerdos de granja (basado en restos cárnicos de cerdos infectados), la ausencia de controles veterinarios estrictos, el gran volumen de comercio porcino ilegal y la ausencia de infraestructuras para la producción cárnica adecuadas han favorecido la expansión de forma imparable del virus. Además, la ausencia de una política de compensaciones económicas a los ganaderos afectados, provocó que muchos de los casos no sean declarados.

En Julio del año 2012 Ucrania reportó su primer brote de PPA y en 2013 Bielorrusia notificó dos brotes de la enfermedad, uno de ellos muy próximo a la frontera con Lituania y Polonia. También resultaron positivos a PPA otros 27 casos de suidos salvajes (OIE, 2013).

El riesgo de que el VPPA entrase en la UE desde Rusia o Bielorrusia era cuestión de tiempo. Ya en 2009, la Comisión Europea se hizo eco a través de la EFSA (European Food Safety Agency), del riesgo real que existía de que la PPA pasase a ser endémica en los países Caucásicos y en Rusia, y de que el riesgo de que la enfermedad acabase entrando en la UE era muy elevado (EFSA AHAW Panel, 2010). Desde el primer caso de PPA reportado en Rusia en 2007, se han declarado más de 400 focos infecciosos a lo largo de su territorio, con más de 12.500 cerdos domésticos infectados y más de 600 casos declarados en suidos salvajes.

Actualmente, la PPA está considerada como una enfermedad endémica en el sur de Rusia, afectando tanto a los cerdos domésticos como a los jabalíes, y el riesgo de que se expanda al resto del país y a los países vecinos ya fue de nuevo denunciado por la ARRIAH (All-Russian Institute for Animal Health) en la previsión que hizo para el año 2014.

Haciendo bueno el pronóstico, Ucrania declaró un nuevo brote de PPA en Enero de 2014, confirmado tanto en cerdos domésticos como salvajes. Del mismo modo, Ucrania confirmó por primera vez en su país, la presencia de VPPA en jabalíes (OIE, 2014). En Febrero de ese mismo año Polonia se vio afectada por la enfermedad y en Junio y Septiembre de 2014, Letonia y Estonia también reportaron sendos casos de PPA. Definitivamente, el VPPA había aterrizado en la UE (Figura 1).

Los datos de secuenciación obtenidos de los virus aislados en Estonia, Letonia, Lituania y Polonia, revelaron una homología del 100% con las cepas de virus circulantes en Bielorrusia y Rusia (laboratorio de referencia de la UE), confirmando todos los datos epidemiológicos disponibles hasta el momento.

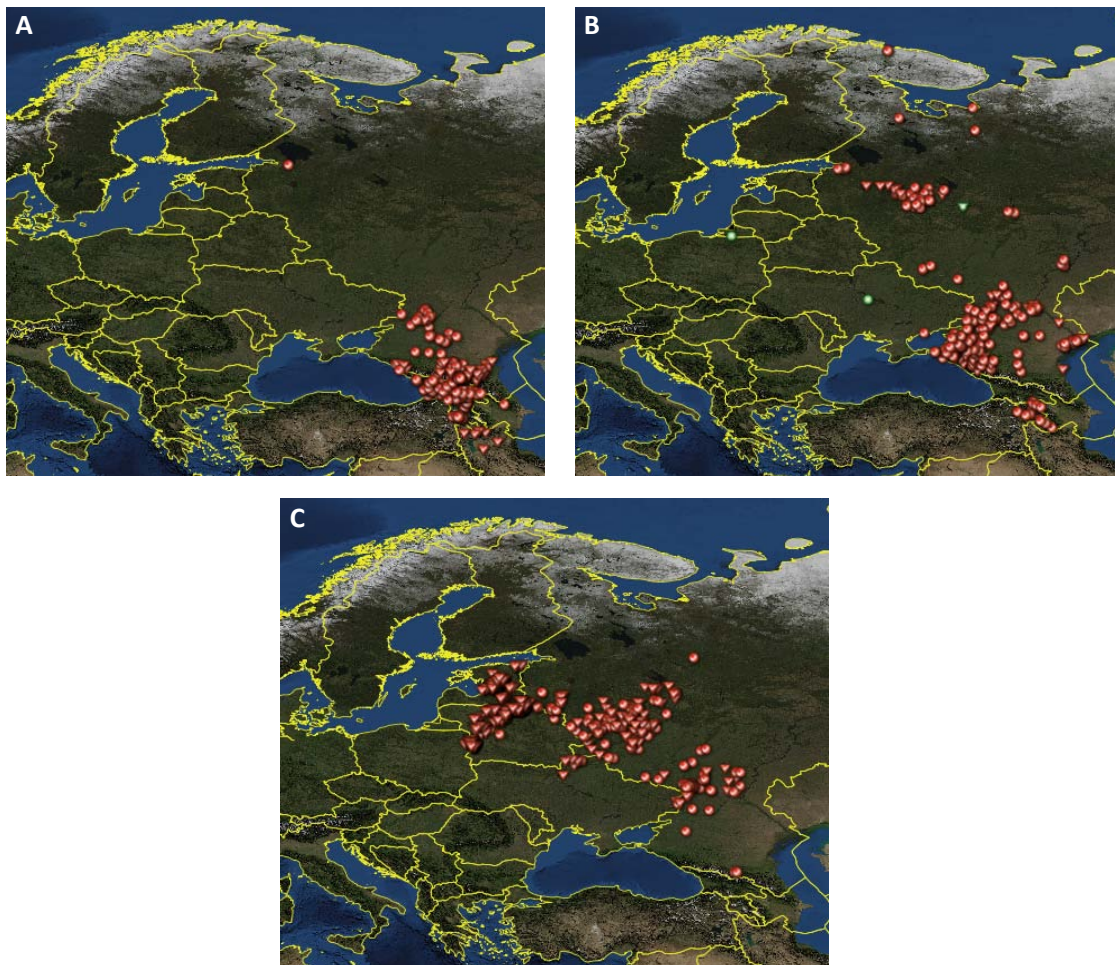


Figura 1: Evolución de los casos reportados de PPA en la zona del Cáucaso, Rusia y la UE desde el año 2007 hasta finales del 2009 (A), desde el 2010 y hasta finales del 2012 (B) y desde comienzos del 2013 y hasta la actualidad, Junio 2015 (C). Fuente <http://empres-i.fao.org>

Cabe hacer una mención especial a la situación epidemiológica de la PPA en Rusia, donde se ha determinado un patrón espacio-temporal de recurrencia de la PPA desde la entrada del virus en Chechenia a finales de 2007, tanto en la población de jabalíes como de cerdos domésticos (Oganesyan *et al.*, 2013). De acuerdo con estos autores, desde la entrada del virus a finales de 2007 en Chechenia se pueden distinguir tres fases en la evolución del virus a través del territorio ruso.

Una primera fase que se corresponde con el desarrollo de un área endémica al sur de Rusia entre los años 2008 y 2010, comenzando con la infección de jabalíes y su posterior transmisión a cerdos domésticos en régimen de libre pastoreo (Gogin *et al.*, 2013). El primer brote en cerdos domésticos tuvo lugar en Junio del 2008 y en la segunda mitad del año, la OIE reportó 44 brotes más, llegando a contabilizar un total de 177 en los siguientes 3 años.

La segunda fase se corresponde con la expansión del virus hacia el norte, saliendo de la zona endémica y llegando hasta la parte europea de Rusia, afectando a un mayor número de áreas dentro de Rusia (Oganesyan *et al.*, 2013).

La última fase se relaciona con la formación de una segunda área endémica en Tverskaya Oblast, al norte de Moscú en el año 2012. Durante los primeros seis meses del año, la mayoría de los brotes fueron registrados en esta zona (Oganesyan *et al.*, 2013) pero en 2013 los brotes alcanzaron zonas fronterizas de Lituania y Ucrania.

Desafortunadamente, y como ya se ha mencionado con anterioridad, los programas de control y erradicación de la PPA en Rusia se ven complicados por múltiples causas, siendo una de las principales (a nuestro juicio), la ausencia de un programa de compensación de las pérdidas que incentive a los afectados a declarar cada caso sospechoso, facilitando de este modo la toma de medidas inmediatas. Ante la imposibilidad material de controlar la enfermedad, las autoridades de la zona han preferido declarar el área afectada como endémica de PPA, asumiendo las limitaciones comerciales que esto acarrea. La disponibilidad de una vacuna eficaz contra el VPPA podría contribuir sin lugar a dudas a cambiar esta percepción en el futuro.

La situación en la UE, pese a ser preocupante, se encuentra lejos de ser alarmante, principalmente debido a su enorme capacidad para responder ante el problema, tanto con recursos humanos altamente cualificados y entrenados para combatir ésta y otras emergencias, como con recursos económicos, incluyendo políticas compensatorias a los granjeros afectados. Las exitosas experiencias de erradicación de la enfermedad a mediados de los noventa en la UE, incluso en situaciones epidemiológicas altamente complejas como la que afectó a la Península Ibérica (Arias & Sanchez-Vizcaino, 2002) así como el control que durante décadas se ha ejercido sobre la isla de Cerdeña (Mur *et al.*, 2014), representan una garantía para la región.

Independientemente de lo recién mencionado, existe lugar para la crítica, cuando todas estas políticas, basadas en el conocimiento y en el dinero, no han servido para evitar que la enfermedad entrara en nuestro continente apenas 10 años después de su última erradicación y casi de la misma forma que por primera vez entró en Europa hace 50 años desde el continente africano. Cualquier medida que en el futuro pretenda erradicar la enfermedad de una vez por todas, habrá de contemplar el problema de frente y solucionar el problema en su origen, en un continente africano en el que el virus se encuentra más fuerte que nunca, con

más de 22 genotipos distintos (Bastos *et al.*, 2003) circulando de este a oeste y dispuesto a seguir traspasando fronteras.

1.1.3 Situación epidemiológica en África

A diferencia de lo que ocurre en Europa actualmente, donde el virus circula entre miembros de la familia *Suidae* altamente susceptibles a la enfermedad, entre los que se encuentran los cerdos domésticos y los jabalíes, con un papel mucho más residual de las garrapatas, la situación en África resulta mucho más compleja, dificultando aún más cualquier plan de control de la enfermedad. El VPPA encuentra en África un único huésped susceptible a la enfermedad, que es el cerdo doméstico europeo, circulando continuamente entre éstos y sus huéspedes naturales: los cerdos salvajes africanos (*Hylochoerus meinertzagani*, *Phacochoerus aethiopicus*, *Potamochoerus larvatus* y *Potamochoerus porcus*) y las garrapatas blandas del género *Ornithodoros* (*O. moubata* y *O. Sonrai*)

El virus se mantiene en un ciclo silvestre entre los cerdos salvajes y las garrapatas *O. moubata* y *O. Sonrai* (Vial *et al.*, 2007), a lo largo del sur y del este de África, donde la enfermedad es endémica en muchos países (Jori *et al.*, 2013).

Los suidos salvajes africanos pueden estar infectados de por vida sin mostrar signos de la enfermedad. A diferencia de Europa, tanto la transmisión de forma directa entre suidos salvajes, como la transmisión directa de suido salvaje a suido doméstico se consideran altamente infrecuentes (Anderson *et al.*, 1998; Heuschele & Coggins, 1969). El papel de las garrapatas resulta fundamental en el ciclo, facilitando la transmisión por el continuo contacto existente entre ambas especies en las madrigueras infestadas (Plowright *et al.* 1969) y por la capacidad de estos artrópodos de amplificar el virus exponencialmente (Basto *et al.*, 2006; Kleiboeker *et al.*, 1998) y de transmitirse transtadial (entre los estadios pupa-larva-adulto), transovarial y sexualmente dentro de la misma especie (Plowright *et al.*, 1969, 1974; Rennie *et al.*, 2001), ocasionalmente saltando al cerdo doméstico. De nuevo en comparación con Europa, los mayores estragos económicos de la PPA afectan a granjeros que cuentan con un bajo número de cerdos domésticos pastoreando en semi-libertad que en ocasiones representan su única fuente de proteína. La falta de sistemas de compensación por parte de los gobiernos y la escasez de controles efectivos hacen que la situación no haga sino empeorar (Edelsten & Chinombo, 1995).

Este ejemplo ilustra a la perfección la diferente percepción que de la enfermedad se tiene fuera de África, sobre todo en países ricos de la UE y América donde los programas de

vigilancia suponen una enorme inyección de dinero y recursos destinados a evitar la entrada del virus en zonas libres, la consiguiente pérdida del estatus de las marcas porcinas y el sacrificio masivo de los animales, única medida existente para erradicar la enfermedad.

La epidemiología del VPPA basada en la secuenciación parcial del gen B646L que codifica para la proteína p72, la mayoritaria de la cápsida viral (Bastos *et al.*, 2003), ha permitido identificar 22 genotipos principales del VPPA, 20 de los cuales están restringidos al este (14 genotipos) y sur de África (13 genotipos). La secuenciación de parte de la Región Central Variable (proteína J9L) u otras regiones génicas como por ejemplo E183L (p54) y CP204L (p30) de cepas relacionadas, permite distinguir subgrupos dentro de los genotipos (Gallardo *et al.*, 2009; Nix *et al.*, 2006; de Villiers *et al.*, 2010). Similitudes o diferencias entre cepas aisladas de fauna salvaje y cerdos domésticos en diferentes áreas geográficas ratifican la existencia de tres tipos de ciclos de transmisión (ciclo silvestres, ciclo garrapata-cerdo domestico y ciclo doméstico) que ya previamente comentamos.

De los dos 22 genotipos, el Genotipo I engloba a todas las cepas del oeste de África y además históricamente, era el único genotipo encontrado fuera de África, siendo identificado en Europa, América y Caribe, hasta la reciente introducción del virus en el Cáucaso y Rusia, puesto que éste pertenece al Genotipo II.

A pesar de que el virus ha estado más de 50 años circulando por los tres continentes, la limitada acumulación de cambios genéticos sigue permitiendo que todos los aislados de estas zonas sigan perteneciendo al Genotipo I, aunque recientemente se pudo demostrar la existencia de cierta variación dentro del grupo gracias a estudios moleculares. En contraste con esta estabilidad genética, en el este y sur de África las cepas son más diversas y se dividen en 21 genotipos.

En 2013 Michaud y colaboradores construyeron árboles filogenéticos con las diferentes secuencias del gen B646L y revelaron la existencia de 4 linajes mayoritarios (L) que engloban a los diversos genotipos del siguiente modo: L1 incluye los Genotipos I, II, XVII y XVIII, L2 incluye los Genotipos III, IV, V, VI, VII, XIX, XX, XXI y XXII y un sub-genotipo (Cro3.5) (Zsak *et al.*, 2005), L3 incluye los Genotipos VIII, XI, XII, XIII, XV y XVI además del aislado TAN/08/MAZIMBU, que previamente se había incluido en el Genotipo XV (Misinzo *et al.*, 2011) y finalmente L4 que engloba a los Genotipos IX y X. Resulta interesante que en este estudio el aislado NYA/1/2, previamente adscrito al Genotipo XIV, no se pudo incluir en ninguno de los cuatro linajes.

Cabe una mención especial al Genotipo II, pues a través de a los análisis moleculares se pudo demostrar que la cepa Georgia07 provenía del este de África (Rowlands *et al.*, 2008) y que efectivamente pertenecía al a este genotipo. El estudio evolutivo de los diferentes aislados recolectados entre 2007 y 2011 a lo largo del territorio ruso reveló que una única variante del VPPA provocó los brotes en toda esta zona durante esos 4 años (Malogolovkin *et al.*, 2012). Este Genotipo II, fue mayoritariamente introducido en Madagascar desde Mozambique (Bastos *et al.*, 2003; Gonzague *et al.*, 2001) y permaneció como el único genotipo en la isla. También se vio que la cepa de VPPA introducida en Mauritania pertenecía de igual modo al Genotipo II, pero a otro grupo de virus los cuales fueron aislados en Mozambique y Madagascar entre 1998 y 2007.

Estas técnicas permiten rescatar mucha información acerca de aislados virales a lo largo de la historia de la enfermedad, por ejemplo, permitieron confirmar lo que desde hacía años se sospechaba, el aislado portugués Lisbon57 también provenía del este de África (Gallardo *et al.*, 2009) aunque se englobaba en otro genotipo diferente.

La diversidad genética del VPPA focalizada en el este y sur de África se ha atribuido al largo periodo de evolución del VPPA dentro de los huéspedes salvajes, lo que contrasta con la estabilidad de los virus del Genotipo I. Esta estabilidad se ha interpretado como una indicación de la ausencia del ciclo salvaje del virus (Costard *et al.*, 2009), lo que se relaciona con la presión selectiva ejercida cuando solamente los cerdos y/o *O. erraticus* están implicadas en el ciclo, favoreciendo una baja variación genética (Chapman *et al.*, 2008; de Villiers *et al.*, 2010). Se podría argumentar que la diversidad genética también puede estar influenciada por la co-infección con diferentes cepas, seguida de una redistribución y evolución del virus, pero parece que ciertos mecanismos evitan tales co-infección (Bastos *et al.*, 2004).

La figura 2 muestra la distribución del virus a lo largo de África, limitada durante mucho tiempo el este y sur de África desde donde se ha ido expandiendo hacia el oeste. Cabe mencionar que en Abril de 2015, se reportó en la isla de Boa Vista (Cabo Verde) de primer caso de PPA en el archipiélago, y desde ese momento la enfermedad ya ha afectado a cerdos domésticos en las islas vecinas de Santiago y Fogo debido al tráfico marítimo dentro del archipiélago.



Figura 2: Distribución de los casos reportados de PPA a lo largo del continente africano, principalmente en el Sur, Este y Oeste del mismo. Fuente <http://empres-i.fao.org>

1.1.4 Patogenia de la PPA

La PPA puede presentar diferentes signos clínicos y lesiones dependiendo de la virulencia de la cepa, la ruta y dosis infectiva así como de las características del huésped. Atendiendo a la virulencia de los aislados, las cepas del VPPA se clasifican como altamente virulentas, moderadamente virulentas y de baja virulencia (Pan & Hess, 1984).

Como se ha comentado anteriormente, el VPPA causa infecciones persistentes sin mostrar síntomas clínicos de enfermedad, tanto en cerdos salvajes africanos como en las garrapatas del género *Ornithodoros* (Heuschele and Coggins 1969; Plowright et al. 1969). No obstante, se ha demostrado que las garrapatas infectadas con el VPPA tienen una tasa de mortalidad más elevada que las no infectadas (Hess *et al.*, 1989).

En cerdos domésticos (*Sus scrofa domesticus*) y jabalíes (*Sus scrofa ferus*), la PPA puede presentarse en un amplio rango de formas clínicas, llegando a causar una mortalidad cercana al 100% en pocos días en las formas hiperagudas o agudas, hasta formas subclínicas o inaparentes (Kleiboeker 2002).

Con cepas de moderada virulencia la mortalidad se reduce al 30-60%, y en cepas de baja virulencia el virus causa una infección crónica sin apenas mortalidad. En estos casos, los

animales que se recuperan de la infección pueden permanecer persistentemente infectados largos periodos de tiempo, siendo una fuente continua de excreción de virus al medio ambiente (Wilkinson et al. 1981; Villeda et al. 1993; Leitão et al. 2001).

En el caso de los cerdos salvajes africanos, resistentes a la enfermedad, solo se ha observado un ligera leucopenia en linfonodo, afectando más a los folículos que a la zona difusa pero, en cualquier caso, no dando lugar a la patogenia que se observa en cerdos domésticos (Oura et al., 1998a)

En todas sus formas, la morbilidad de la PPA es elevada, debido a la naturaleza altamente contagiosa del virus (Kleiboeker 2002).

En las formas hiperagudas, causadas por aislados muy virulentos, se puede reducir el curso de la infección hasta tan solo 2-4 días, muriendo los animales sin haber presentado signos clínicos, excepto la presencia de un pico de fiebre (Konno et al., 1972; Mebus & Dardiri, 1979). El periodo de incubación de las formas agudas y subagudas de la PPA varía entre 7-10 días, momento en el que aparecen los primeros signos clínicos, como anorexia, fiebre, hemorragias nasales, eritemas cutáneos, cianosis, diarrea y disnea (Kleiboeker 2002).

En la forma aguda de la enfermedad, la muerte del animal suele ocurrir entre 12-14 días tras la infección y las lesiones macroscópicas más características son: edema pulmonar, esplenomegalia hemorrágica, hipertrofia y hemorragia en linfonodos y petequias en riñones (Carrasco et al., 1996a, 1997; Mebus, 1988). En la forma subaguda, las lesiones son similares pero menos severas y la muerte suele ocurrir entre los 15-20 días tras la infección (Mebus, 1988). Se caracteriza por la presencia de grandes hemorragias en nódulos linfáticos y riñones, y de un bazo hemorrágico e incrementado de tamaño (Mebus, 1988). Esta fue la forma de enfermedad más comúnmente encontrada en la Península Ibérica y actualmente aparece raramente, a excepción de en la isla de Cerdeña, donde el virus permanece de forma endémica desde su entrada en el año 1978.

Finalmente, la forma crónica de la enfermedad no causa a penas mortalidad y se produce por la infección con aislados de baja virulencia; en estos casos los animales son portadores del virus durante largos periodos de tiempo y excretan continuamente virus al medio ambiente (Leitão et al. 2001; Villeda et al. 1993; Wilkinson et al. 1981; de Carvalho Ferreira et al. 2012). Los signos clínicos se limitan a lesiones en el aparato respiratorio, lo que dificulta el diagnóstico *in vivo* de la enfermedad (Gómez-Villamandos et al., 1995; Mebus, 1988), teniendo que recurrir a estudios *post-mortem*. Las lesiones más típicamente encontradas en estos casos incluyen pleuritis fibrinosa, adhesiones pleurales, neumonía, e hiperplasia de los tejidos

linforeticulares, aunque también es común encontrar pericarditis fibrinosa y necrosis en la piel (Moulton and Coggins 1968; J. E. Moulton et al. 1975).

No podemos olvidarnos de los cerdos asintomáticos, ellos también juegan un papel muy importante dentro de la patogenia viral, pues llegado el momento de erradicar la enfermedad de una región pueden suponer una dificultad. Estudios más recientes realizados con muestras de sueros recogidas en Mbeya (Tanzania) a finales de 2011 y principios del 2012, una vez que el brote que afectaba a ese área fue declarado como resuelto por la OIE, permitieron detectar una prevalencia de anticuerpos del 3-5% en cerdos negativos al virus (Uttenthal *et al.*, 2013). La cepa que causó el brote en Tanzania tiene mucha homología con la circulante en Europa, por lo que hay que prestar mucha atención ante la posible existencia de cerdos asintomáticos en la región Caucásica donde la enfermedad ya es endémica, puesto que estos animales no pueden detectarse por medio de signos clínicos visuales al carecer de ellos (Gogin *et al.*, 2013).

Centrándonos en la patogenia hemorrágica aguda, la teoría más aceptada para explicarla reside en la interacción entre el virus y las células del sistema mononuclear fagocítico (monocitos/macrófagos y células dendríticas), que son la diana principal de replicación del virus y el elemento clave para su diseminación por todo el organismo (Colgrove *et al.*, 1969; Fernandez *et al.*, 1992a; Gregg *et al.*, 1995; Mebus, 1988; Sánchez-Torres *et al.*, 2003). Una vez que el aislado virulento infecta a monocitos y macrófagos se activa una cascada de señalización que culmina con la liberación de factores solubles como el factor de necrosis tumoral (TNF)- α , interleuquina (IL)-1 α e IL-6 (Gómez del Moral *et al.*, 1999; Gómez-Villamandos *et al.*, 1998; Salguero *et al.*, 2002, 2005) que, a su vez, produce dos efectos devastadores: el daño irreparable en las células endoteliales vasculares y la apoptosis masiva de células infectadas y de linfocitos no infectados. Petrov y colaboradores (2014) desarrollaron y validaron una técnica que permite cuantificar la expresión de un perfil de citoquinas porcinas implicadas en diferentes cascadas de señalización relacionadas con la patogénesis del VPPA a través de una RT-qPCR. El perfil de citoquinas analizado incluye IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, TNF- α y el interferón (IFN)- α .

El daño producido en las células endoteliales por la liberación de dichos factores contribuye a aumentar la permeabilidad vascular y a provocar alteraciones de la hemostasia. En consecuencia, se produce una coagulación intravascular diseminada (CID) que lleva al consumo de factores de coagulación y plaquetas y a la activación de la fibrinólisis, dando lugar a hemorragias generalizadas (Gómez-Villamandos *et al.*, 1996; Villeda *et al.*, 1993a, b).

Por otro lado, la apoptosis masiva de células infectadas y de linfocitos no infectados causa la

destrucción de los órganos linfoides (los más afectados son el bazo y los linfonodos renal y gastrohepático), lo que contribuye a la patología hemorrágica.

Esta hipótesis se ve apoyada por el hecho de que el área con apoptosis más extensa es el tejido linfoide difuso, donde se encuentra una gran densidad de macrófagos infiltrados (Carrasco et al. 1996; Gómez-Villamandos et al. 1995; Oura et al. 1998; Ramiro-Ibáñez et al. 1996). Este tipo de apoptosis inducida de células no infectadas, llamada *by-stander*, no es exclusiva del VPPA; de igual modo, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Lu et al., 1994), el virus de la anemia del pollo (CAV) (Jeurissen et al., 1992), el herpesvirus bovino tipo I (HVB-1) (Griebel et al., 1990) y el virus del herpes simplex tipo I (VSH-1) (Ito et al., 1997), entre otros, también la provocan.

Otro efecto provocado por la infección con el VPPA, es la activación de la hematopoyesis, hecho que tiene connotaciones positivas y negativas. Positivas, evitando una profunda trombocitopenia al inicio de la infección al activar la proliferación de megacariocitos; y negativa, al estimular la proliferación de neutrófilos, sensibles a la infección y potenciales diseminadores del virus (Carrasco et al. 1996) (Carrasco et al. 1996; Gómez-Villamandos et al. 1997; Karalyan et al. 2012). Esta alteración de la hematopoyesis induce el aumento de formas celulares inmaduras y linfocitos atípicos en el torrente sanguíneo (Karalyan et al., 2012). En fases tardías de la infección, el virus también es capaz de infectar y replicar en otros tipos celulares, que más adelante comentaremos.

Por último, en las infecciones con aislados menos virulentos, en las que se desarrolla PPA subaguda, no se observa daño endotelial ni CID, asociándose la presencia de hemorragias a una intensa vasodilatación e incremento de la permeabilidad vascular (Kleiboeker 2002; Mebus 1988).

Con esto aislados tan atenuados no se observa apoptosis en órganos linfoides sino cierta proliferación celular (Ramiro-Ibáñez et al., 1997), sobre todo de células B, pudiendo llegar a provocar una hiper- γ -globulinemia (De Boer et al. 1972; Leitão et al. 2001; Pan et al. 1970). En estos casos, las lesiones típicamente encontradas obedecen a la formación de inmunocomplejos (Fernandez et al. 1992).

1.1.5 Diagnóstico de la PPA

Debido a la ausencia de una vacuna eficaz frente a la PPA, como ya hemos comentados con anterioridad, las campañas de erradicación han tenido que basarse en medidas sanitarias y de control estrictas, implicando un diagnóstico diferencial rápido de los brotes, seguido del sacrificio masivo de los animales infectados o potencialmente expuestos (Kleiboeker 2002).

Dichas medidas son del todo imposibles de aplicar en las zonas tradicionalmente endémicas, principalmente del África Subsahariana, donde se vive en situación de extrema pobreza (Penrith *et al.*, 2013).

Tampoco está resultando sencillo el control de la enfermedad en todo el Cáucaso, incluyendo Rusia, principalmente debido a la escasez de medios y a la ausencia de una política de compensaciones que anime a declarar los brotes de la enfermedad, lo que ha hecho que la enfermedad se haya ido expandiendo a lo largo de los últimos años en esa región. Una campaña de concienciación ciudadana a todos los niveles es imprescindible, para que de este modo granjeros y cazadores (que son quienes antes entran en contacto con un posible caso de PPA) informen inmediatamente ante cualquier sospecha de PPA, ya que a día de hoy no siempre es la actitud a seguir (Vergne *et al.*, 2014). Además de la importancia de informar sobre los posibles casos de PPA, las compensaciones económicas por parte de los gobiernos o de la UE deben de ser acordes e inmediatas. Ejemplos precedentes como el de España apoyan el funcionamiento de estas dos medidas, puesto que, aparte de cumplirse estrictamente las medidas sanitarias y de bioseguridad impuestas en los años 90 en España, la concienciación ciudadana y las políticas compensatorias fueron indispensables a la hora de erradicar la enfermedad del país (Arias & Sanchez-Vizcaino, 2002).

Cuando aparece la sospecha de un brote de PPA aguda, el primer procedimiento que se adopta es la realización de la necropsia de los animales afectados, en busca de las lesiones típicas de la enfermedad en su forma aguda, tales como edema pulmonar, esplenomegalia hemorrágica, hipertrofia y hemorragia en linfonodos y petequias en riñones (Gómez-Villamandos *et al.* 1997; Carrasco *et al.* 1996; Mebus 1988). Es sencillo confundir dichas lesiones con las causadas por otras enfermedades hemorrágicas como la Peste Porcina Clásica o septicemias bacterianas (OIE, 2012).

En países libres de la enfermedad o en zonas con brotes esporádicos, el aislamiento del virus resulta esencial tanto para el diagnóstico como para la caracterización epidemiológica de la cepa viral en circulación y así poder establecer las medidas de control pertinentes. El

aislamiento del VPPA se consigue gracias a la capacidad del virus de replicar y provocar un efecto citopático claro en cultivos primarios de macrófagos porcinos que, además, puede ser confirmado gracias al test de hemadsorción, basado en la adherencia de eritrocitos a las células infectadas formando las denominadas rosetas (Malmquist & Hay, 1960). No obstante, no todos los VPPA son hemadsorbentes, teniendo que recurrir a la detección de antígenos virales o del genoma del virus. En estos casos, se realiza un análisis por inmunofluorescencia directa (FAT) sobre los tejidos afectados para la detección de antígenos virales (Bool et al. 1969) o bien el uso de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tanto convencional como a tiempo real (RT-qPCR), para la detección de ADN viral (Agüero et al. 2003; Agüero et al. 2004; King et al. 2003; Ronish et al. 2011). Esta última técnica es muy sensible y permite detectar ADN viral en estadios muy tempranos de la infección y también en infecciones crónicas, donde la FAT pierde mucha sensibilidad debido a los inmunocomplejos que se forman en los tejidos en este tipo de infecciones (Sanchez-Vizcaino 2006). Además permite la secuenciación del material genético amplificado y su clasificación filogenética.

En los países donde la PPA es endémica entre los cerdos domésticos, con casos de enfermedad crónica o inaparente, el diagnóstico macroscópico a través de la observación de lesiones en tejidos resulta complicado, debiéndose recurrir al diagnóstico en el laboratorio (Kleiboeker, 2002). El método más efectivo de diagnóstico en estos casos es el análisis serológico mediante ELISA (Escribano et al. 1989; Gallardo et al. 2006; Pastor et al. 1990), inmunoblotting (Escribano et al. 1990; Pastor et al. 1989) o el test de IFA (Pan *et al.*, 1974), para la detección de anticuerpos específicos frente al virus. Estudios recientes (Gallardo *et al.*, 2013) han demostrado que el ELISA indirecto que la OIE emplea es altamente específico y sensible de modo que permite el diagnóstico adecuado de la enfermedad independiente del genotipo viral circulante en la región de estudio.

Estas técnicas han resultado esenciales en los casos históricamente más exitosos de erradicación de la enfermedad, como ocurrió a mediados de los años noventa en la Península Ibérica, donde prácticamente las formas predominantes de la enfermedad eran subagudas y los animales desarrollaban anticuerpos específicos (Pastor et al. 1992; Pastor et al. 1990). Existen muchas otras técnicas de diagnóstico de la PPA, pero nos hemos basado en las que han sido validadas por la OIE (Capítulo 2.8.1: African swine fever, de la última edición del OIE: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals).

1.2. El Virus de la Peste Porcina Africana (VPPA)

El VPPA es el único miembro de la familia *Asfarviridae*, del género *Asfavirus* (Dixon *et al.*, 2000; Salas, 1999). Años más tarde se propuso incluir al VPPA dentro de una super-familia de virus de ADN grandes núcleo-citoplasmáticos (NCLDV), en la que se incluyen además a las familias *Poxviridae*, *Iridoviridae*, *Phycodnaviridae* y *Mimiviridae* (Iyer *et al.*, 2006). Más recientemente, estudios basados en el análisis de las secuencias y repertorios genéticos de estas familias han revelado que estos virus deben compartir un ancestro común más allá de la super-familia de NCLDV, es por ello que se ha propuesto un nuevo orden viral, el de los Megavirales en el que el VPPA está incluido (Colson *et al.*, 2013). Si bien estructuralmente el VPPA se asemeja a los Iridovirus por su simetría icosaédrica, su estructura genética los acerca mucho más a los Poxvirus, coincidiendo su ambigua clasificación con el hecho de haber sido filogenéticamente encuadrado como un clado separado entre *Poxviridae* e *Iridoviridae* (Raoult *et al.*, 2004). El VPPA es un virus grande, icosaédrico, con envuelta y con un genoma de ADN de cadena doble, siendo el único Arbovirus conocido con ADN como material genético. Como vemos, la ubicación del VPPA dentro del árbol filogenético viral se ha ido modificando en los últimos años a medida que se iba profundizando en el conocimiento del virus; posiblemente la complejidad del mismo ha hecho que no fuese sencilla una clasificación definitiva.

A continuación describiremos en profundidad el genoma viral, la morfología del VPPA y los aspectos más relevantes del ciclo infectivo a nivel celular: desde la entrada del virus en la célula hasta la salida del mismo tras haber completado su ciclo de infección.

1.2.1 Genomal viral

Actualmente se han secuenciado 12 genomas completos del VPPA, aislados en distintos momentos y lugares a partir de brotes en cerdos domésticos y fauna salvaje (jabalíes y garrapatas blandas) con grados de virulencia diversos, incluyendo una única secuencia completa de un virus del este de África (Bishop *et al.*, 2015); en ellos se han identificado entre 150 y 175 fases de lectura abiertas (ORF) (de Villiers *et al.*, 2010) separadas por regiones intergénicas cortas y que se distribuyen a lo largo de ambas cadenas de ADN. Cerca de la mitad de estas ORF no poseen una función conocida ni predecible.

El primer genoma secuenciado fue el del aislado BA71V (PRJNA15242), adaptado a crecer en células Vero y totalmente apatógeno. El genoma está constituido por una única molécula lineal de ADN de cadena doble con una longitud de 170.101 pb y extremos unidos de forma covalente, como en el genoma de los poxvirus (González *et al.*, 1986). Cerca de ambos extremos se encuentran las repeticiones invertidas terminales (TIR) y los miembros de las

familias multigénicas (MGF) zona altamente variable entre los distintos aislados del VPPA (Yáñez *et al.*, 1995). El genoma resultó ser rico en AT (alrededor de un 61%) y se identificaron 151 ORF, que codifican unas 50 proteínas estructurales y multitud de enzimas relacionados con la replicación del ADN viral, la transcripción de genes y modificación post-traducciona de proteínas, así como proteínas implicadas en la interacción virus-huésped (Yáñez *et al.*, 1995). Todas éstas ORF están reguladas temporalmente a nivel transcripcional por cuatro tipos de promotores distintos, que permiten dividir los genes del VPPA en inmediatamente tempranos, tempranos, intermedios y tardíos (Almazán *et al.*, 1992, 1993; Rodríguez *et al.*, 1996; Rodríguez & Salas, 2013).

De las otras 11 cepas de VPPA aisladas de campo cuyo genoma ha sido secuenciado, 8 de ellas proceden de África (aisladas de cerdos domésticos o salvajes) y otras 3 son europeas: la cepa portuguesa OUR/T88/3, la española E75 (de Villiers *et al.*, 2010) y la georgiana Georgia 2007/1 (Chapman *et al.*, 2011). De acuerdo con los datos obtenidos con BA71V, las secuencias de los genomas varían entre 170 y 192 Kpb y están constituidas por una región central muy conservada y dos regiones variables situadas en los extremos. La variación en la longitud existente entre aislados del VPPA se debe principalmente a la pérdida o ganancia de secuencias en estas regiones variables. En dichas regiones se encuentran, como se indicó antes, los miembros de las MGF, a los que se les atribuye una evolución mediante mecanismos de duplicación y divergencia de secuencias (Almendral *et al.*, 1990; Blasco *et al.*, 1989; Vydellingum *et al.*, 1993; Yozawa *et al.*, 1994), asociándose algunas de ellas con el grado de patogenicidad del VPPA (Afonso *et al.* 2004; Chapman *et al.* 2008; Dixon *et al.* 2013; Zsak *et al.* 2001).

Como ya hemos comentado con anterioridad, la secuencia del gen B646L, que codifica la proteína mayoritaria de la cápside p72, ha permitido identificar hasta el momento 22 genotipos distintos del VPPA, 21 de los cuales (del II al XXII) pertenecen al este y sur de África.

1.2.2 Morfología del VPPA

Al microscopio electrónico las partículas virales muestran una clara simetría icosaédrica, con una estructura compleja formada por múltiples capas concéntricas. En el centro de la partícula se distingue un núcleo interno que contiene el genoma viral cubierto de una capa proteica denominada *core shell* (G Andrés *et al.* 1997; Andrés *et al.* 2002). Esta estructura central núcleo-proteica (*core*) tiene un diámetro de unos 110 nm y contiene, además del genoma, enzimas y otras proteínas que son empaquetadas en la partícula viral y que serán utilizadas en

etapas tempranas de la infección después de la entrada del virus en la célula huésped. El *core* se encuentra rodeado por una envuelta lipídica interna que proviene del retículo endoplásmico (ER) (Cobbold et al. 1996; Andrés et al. 1998; Rouiller et al. 1998) sobre la cual se dispone la cápsida proteica (Carrascosa et al. 1984; Andrés et al. 1997) que es la capa más externa de los virus intracelulares (Figura 3A).

La cápsida está formada por entre 1.892 y 2.172 capsómeros en forma de prismas hexagonales de 13 nm de longitud con un canal central (Carrascosa *et al.*, 1984). Asimismo, está constituida por distintas proteínas, siendo la p72 (pB646L) la mayoritaria (Andrés et al. 1997). Los viriones extracelulares están rodeados por una envuelta externa que adquieren de la membrana plasmática al salir de la célula infectada (Breese & DeBoer, 1966), alcanzando un diámetro de 175-215 nm (Almeida et al. 1967; Carrascosa et al. 1984; Schloer 1985) (Figura 3B).

Mediante análisis por electroforesis bidimensional se han podido identificar 54 proteínas estructurales en virus extracelulares purificados (Esteves et al. 1986).

También se ha descrito la presencia en el virión de una proteína quinasa codificada por el gen R298L (Baylis *et al.*, 1993) dos nucleósido trifosfato fosfohidrolasas, una fosfatasa ácida y una desoxirribonucleasa (Salas, 1999).

A día de hoy se conocen 19 genes que codifican para proteínas estructurales (Yáñez et al. 1995; Dixon et al. 2013b) así como la localización de varias de ellas en la partícula viral (Figura 3C).

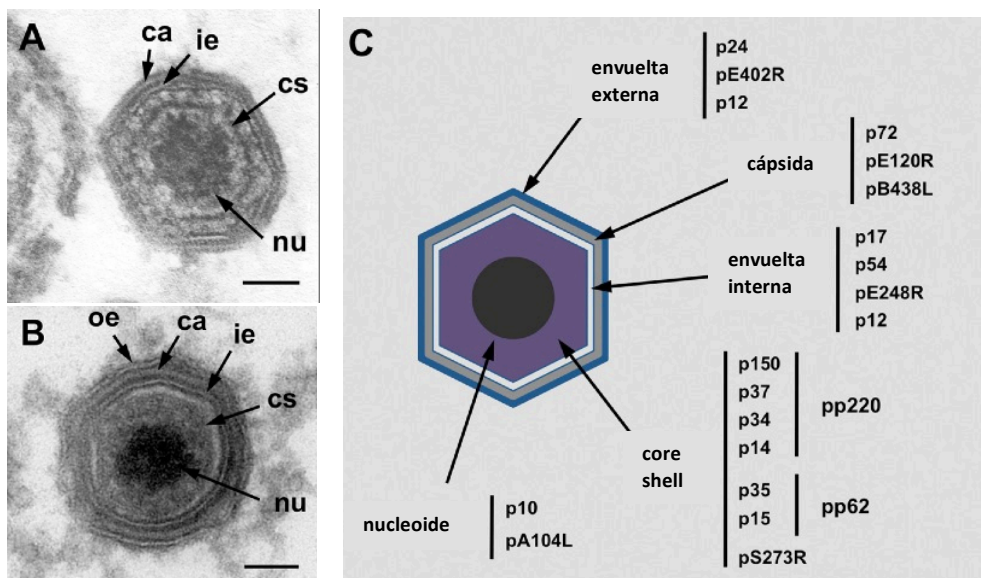


Figura 3: Imágenes mediante microscopía electrónica de un virión intracelular (A) y extracelular (B) y una representación esquemática de la estructura del VPPA (C). Envuelta externa (oe); cápsida (ca); envuelta interna (ie); *core shell* (cs); nucleoide (nu) (Salas and Andrés, 2013).

Entrando en profundidad en la distribución de dichas proteínas en las diferentes capas que conforman el virus, la envuelta externa es similar a la membrana plasmática celular, puesto que es adquirida durante la salida del virus de la célula por gemación (Breese & DeBoer, 1966), pero contiene proteínas virales como la proteína p12, implicada en la adhesión viral (Carrascosa et al. 1995) y la proteína CD2 viral o hemaglutinina (CD2v o HA) (pE402R) que es homóloga del CD2 celular (Dixon et al. 2004) y que media la hemadsorción en las células infectadas (Rodríguez et al. 1993). Otra proteína que se ha identificado en la envuelta externa es la proteína celular p24 (Sanz *et al.*, 1985).

En la cápsida nos encontramos con la proteína p72, que es la proteína mayoritaria de los capsómeros y que está codificada por el gen B646L (García-Escudero *et al.*, 1998). Esta proteína supone alrededor de un tercio de la masa proteica de la partícula viral. Otro componente es la proteína pE120R la cual está relacionada con el proceso de transporte de las partículas maduras del virus desde la factoría viral hasta la membrana para la salida del virus de la célula (Andrés et al. 2001). La proteína estructural pB438L es probablemente un componente de la cápsida que forma parte de los vértices de la partícula viral (Epifano *et al.*, 2006a).

La envuelta interna de los virus maduros, parece estar formada por una membrana lipídica simple cuando se visualiza por métodos convencionales de microscopía electrónica (Carrascosa et al. 1984; Andrés et al. 1998b) y criotécnicas modernas (Hawes *et al.*, 2008). Las proteínas de membrana p54 (Rodríguez et al. 2004), p17 (Suárez *et al.*, 2010) y pE248R (Rodríguez et al. 2009) forman parte de este dominio. La proteína p12, además de encontrarse en la envuelta externa del virus, se localiza también en la envuelta interna. Además, la p12 y la p17 se detectan en las partículas virales que salen de la factoría y están distribuidas por el citoplasma (Salas and Andrés 2013).

El *core shell* está constituido principalmente por los productos resultantes del procesamiento proteolítico de las poliproteínas pp220 y pp62, que es llevado a cabo por la proteasa codificada por el gen S273R (Andrés, Alejo, et al. 2001). Tras el procesamiento, se generan las proteínas p150, p37, p34 y p14, derivadas de la poliproteína pp220 y las proteínas p35 y p15, como producto del procesamiento de la pp62 (Andrés et al. 1997; Andrés et al. 2002; Simón-Mateo et al. 1993; Simón-Mateo et al. 1997). Este mecanismo de expresión génica es único entre los virus de ADN y debe reflejar la necesidad de mantener un cierto orden en la disposición de dichas proteínas en los viriones maduros.

El nucleoide, es una estructura electrodensa de 80 nm que contiene el genoma viral (Andrés et al. 1997) y ciertas nucleoproteínas como la p10 (Nunes-Correia *et al.*, 2008) y la proteína pA104R (Alejo et al. 2003) similar a las *histone-like proteins* de las bacterias.

Además, el nucleoide debe contener también una ARN polimerasa dependiente de ADN, un enzima encargado del *capping* del ARN mensajero (ARNm) y un enzima de poliadenilación, junto con otros factores requeridos para la transcripción temprana de los genes del VPPA (Salas 1999).

1.2.3 Ciclo infeccioso del VPPA en una célula

Las principales dianas de replicación del VPPA son los macrófagos porcinos que expresan marcadores celulares característicos de etapas intermedias y tardías de diferenciación. Solo en estadios más avanzados de la enfermedad se han visto infectados otros tipos celulares, tales como células endoteliales (Edwards et al. 1984; Fernandez et al. 1992; Sierra et al. 1989; Vallée, Tait, and Powell 2001), megacariocitos (Edwards et al. 1984; Gómez-Villamandos et al. 1998), plaquetas (Gómez-Villamandos *et al.*, 1996), neutrófilos (Carrasco *et al.*, 1996b), fibroblastos (Gómez-Villamandos *et al.*, 1995), hepatocitos (Sánchez-Cordón *et al.*, 2008; Sierra *et al.*, 1987) e incluso linfocitos (Ballester *et al.*, 2010).

A nivel experimental se ha podido adaptar el crecimiento del VPPA a diversas líneas celulares como Vero, COS-1, IPAM y WSL (Santurde et al. 1988; Carvalho and Rodrigues-Pousada 1986; Hurtado et al. 2010; Keil et al. 2014), facilitando así la caracterización de múltiples aspectos de la biología del virus, de entre ellos los que a continuación pasamos a describir.

1.2.3.1 Entrada del virus en la célula diana

La teoría más aceptada sobre el sistema de entrada del virus en la célula (tanto en macrófagos como en células Vero), describe una introducción vía endocitosis mediada por receptor mediante uno o varios receptores proteicos, (Alcamí et al. 1989). El estudio de la entrada del VPPA en la célula huésped siempre ha despertado un gran interés, en ocasiones no exento de polémica (Sánchez *et al.*, 2012). Así, mientras que algunos autores apuestan por la macropinocitosis como mecanismo de entrada principal del virus (Sánchez *et al.*, 2012), otros describen la entrada del virus como un proceso dinámico de endocitosis dependiente de clatrina y colesterol, confirmado tanto en líneas celulares establecidas (Basta *et al.*, 2010; Hernaez & Alonso, 2010), como más recientemente en macrófagos, demostrándose el bloqueo de la entrada del VPPA con inhibidores de clatrina (Galindo *et al.*, 2015).

La entrada del virus es un proceso complejo en el cual las partículas virales deben cruzar la

membrana celular y asegurarse de liberar su genoma en el lugar adecuado para su posterior transcripción y replicación. Además, la entrada del virus en la célula no solo consiste en traspasar la membrana celular, sino que, el modo de entrada determinará si el virus será capaz de producir una infección exitosa o no. Así pues, intentar desentrañar los mecanismos exactos mediante los cuales el VPPA entra en la célula no sólo resulta esencial para comprender la biología del virus, sino también para el diseño futuro de estrategias terapéuticas y/o preventivas contra el mismo.

Pese a que los receptores de los macrófagos no han sido definitivamente caracterizados, se ha asociado la susceptibilidad de infección con el VPPA a la expresión de los marcadores celulares de superficie asociados a la maduración de macrófagos, SWC9 y CD163 (McCullough *et al.*, 1999; Sánchez-Torres *et al.*, 2003), habiéndose postulado este último como un potencial receptor de entrada del virus. De nuevo, mucho queda por hacer en este sentido, pues el virus es capaz de entrar en células carentes de este receptor, apuntando a un mecanismo mucho más complejo de interacción con las membranas de lo que inicialmente se había previsto.

En lo que se refiere a las proteínas del virus implicadas en la entrada a la célula, estudios *in vitro* han demostrado que la proteína p12 (pO61R) participa en la entrada en células Vero (Angulo *et al.* 1993), mientras que las proteínas p54 (pE183L), p72 (pB646L) y p30 (pCP204L) participan en la entrada del virus tanto en células Vero como en macrófagos. Estas proteínas están implicadas en diferentes etapas, de modo que p54 (pE183L) y p72 (pB646L) parecen implicadas en la unión del virus a la célula, mientras que p30 (pCP204L) parece intervenir en la internalización del mismo (Borca *et al.*, 1994; Gómez-Puertas *et al.*, 1998). No hay duda de que el mecanismo de entrada del virus en el macrófago es complejo y de que muy probablemente participen varias proteínas del virus así como más de un receptor celular. Desafortunadamente, el papel de las proteínas virales en la entrada del virus a la célula es un evento muy poco estudiado (como tantos otros aspectos de la biología del VPPA), y cuyas últimas referencias corresponden a trabajos realizados hace casi 20 años.

1.2.3.2 Transcripción y replicación

Una vez que el virus ha entrado en la célula y se ha deshecho de la membrana lipídica que le rodeaba, el VPPA se desencapsida en compartimentos endocíticos, concretamente en endosomas tardíos con pH ácido, permitiéndose la liberación del genoma viral al citoplasma celular (Cuesta-Geijo *et al.*, 2012). Tras su llegada al citoplasma, el genoma viral, unido a proteínas estructurales del virus (*cores* virales), es transportado por la red de microtúbulos a los puntos de ensamblaje perinucleares, adyacentes al centro organizador de microtúbulos

(Alonso *et al.*, 2001). El transporte mediado por microtúbulos es crucial, así como la activación de Rac1 que promueve la estabilización de los microtúbulos en las etapas tempranas de la infección (Quetglas *et al.*, 2012). Como vemos, la mayor parte del ciclo replicativo del virus dentro de la célula, junto con la morfogénesis viral, tiene lugar en el citoplasma de las células infectadas, pero no podemos olvidarnos de que son varios los autores que han propuesto una breve fase nuclear para el VPPA (Ballester *et al.*, 2011; García-Beato *et al.*, 1992; Rojo *et al.*, 1999).

La transcripción de genes virales sigue una regulación temporal similar a la de los poxvirus (Law & Smith, 2004), empezando con la transcripción de los genes tempranos por los *cores* virales citoplasmáticos, utilizando la ARN polimerasa, el enzima encargado del *capping* del ARNm, enzimas de poliadenilación y factores de transcripción que se encuentran formando parte del núcleo proteico del virus (Salas *et al.* 1981; M. L. Salas 1999). La expresión de los genes tempranos da lugar a enzimas involucrados en el metabolismo de los nucleótidos y la replicación del ADN, así como otros factores necesarios para la expresión de los genes tardíos, que codifican, entre otros, las proteínas estructurales, enzimas y factores que serán empaquetados en el virión (Rodríguez and Salas 2013).

La replicación del VPPA tampoco está exenta de polémica, con muchos autores todavía hoy describiendo al VPPA como exclusivamente citoplasmático. Sin embargo, y a pesar de ser un virus de replicación predominantemente citoplasmática, claramente existe una etapa temprana de replicación en el núcleo, ya descrita hace décadas (García-Beato *et al.*, 1992; Tabares & Sánchez Botija, 1979). Más recientemente, en nuestro laboratorio se han podido extender estas evidencias, demostrándose que el virus afecta profundamente a la organización nuclear, produciendo la reorganización de la lamina y la redistribución de varias proteínas nucleares, provocando la defosforilación y la subsiguiente degradación de la ARN polimerasa II (Ballester *et al.* 2011). Además, el impacto de la desorganización nuclear se evidencia por la presencia en el citoplasma de lamina y otros marcadores de la envuelta nuclear a tiempos tardíos de la infección (Ballester *et al.* 2011). La teoría más aceptada a día de hoy es que el virus utiliza el núcleo para poder iniciar la replicación de su genoma, acumulando pequeños fragmentos de ADN que posteriormente se ensamblarán en las factorías víricas, donde el resto de la replicación tiene lugar (Rojo *et al.*, 1999).

El virus codifica para muchas enzimas y proteínas que intervienen en la replicación y reparación del ADN como la ADN polimerasa de tipo B (G1211R), la proteína PCNA-like (E301R) que ayuda al anclaje de la ADN polimerasa al ADN (Iyer *et al.*, 2006), la ADN ligasa (NP419L), la ADN topoisomerasa tipo II (P1192R), la superfamilia de las helicasas o la ampliamente estudiada ADN polimerasa X (O174L) (Yáñez *et al.*, 1995).

1.2.3.3 Morfogénesis viral y posterior salida de la célula huésped

La morfogénesis del virus es un proceso complejo que tiene lugar en las factorías virales perinucleares (Breese and DeBoer, 1966) que se localizan junto al centro organizador de microtúbulos (Heath et al. 2001; Salas and Andrés 2013). Estas factorías virales son grandes estructuras construidas por componentes celulares y virales, donde los virus insertan los complejos macromoleculares necesarios para la replicación del genoma y la morfogénesis de nuevas partículas virales.

La formación *de novo* de viriones empieza con el reclutamiento de estructuras membranosas procedentes del ER, proceso en el cual es crucial la presencia de la proteína estructural p54 (pE183L) (Rodríguez et al. 2004), así como probablemente la proteína pXP124L (miembro de la MGF 110) (Netherton et al. 2004). Estas membranas del ER modificadas son incorporadas como una envuelta interior en las partículas virales, sobre las que se ensambla la proteína p72 (pB646L), proteína mayoritaria de la cápsida, formando la típica estructura icosaédrica del VPPA (Cobbold & Wileman, 1998; García-Escudero *et al.*, 1998). La proteína pB602L, que actúa como chaperona de la proteína p72, juega también un papel fundamental en este proceso (Cobbold *et al.*, 2001; Epifano *et al.*, 2006a).

La poliproteína pp220 se une a la membrana interna por miristoilación y seguidamente se puede proponer que la proteína viral pB438L, se encargaría de la progresiva formación, a partir de estas estructuras lineales membranosas, de los vértices de la estructura icosaédrica (Epifano et al. 2006b). Como ya hemos comentado, las poliproteínas pp220 (pCP2475L) y pp62 (pCP530R) son procesadas por la proteasa viral pS273R dando lugar a los componentes mayoritarios del *core shell* (Figura 4).

El último paso en la maduración del virión consiste en la incorporación del genoma a la partícula viral. Dos modelos han sido descritos, en uno de ellos se propone que los pronucleoides se generan en las factorías víricas cerca de las partículas de virus vacías, para a continuación ser encapsidados en las partículas virales ya ensambladas (Brookes *et al.*, 1996, 1998); mientras que el otro modelo propone que el ADN se encapsida primeramente, seguramente junto con las nucleoproteínas para, a continuación, condensarse dentro de la partícula viral ya totalmente formada.

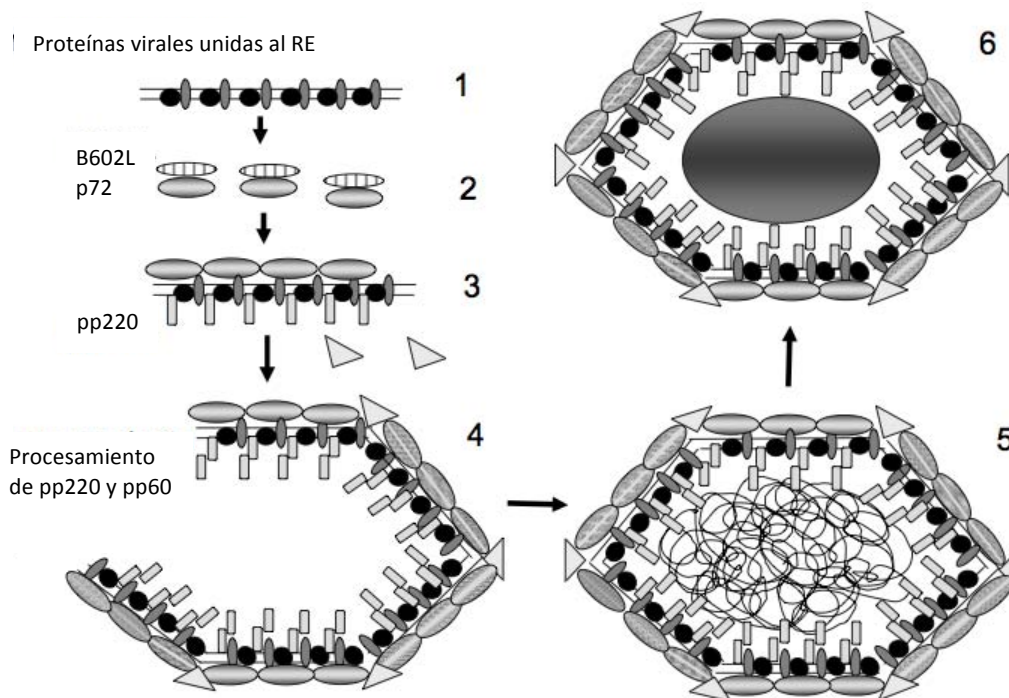


Figura 4: Ensamblaje de las partículas virales del VPPA. 1. El retículo endoplasmático (RE) es modificado por la inserción de proteínas virales. 2. La proteína mayoritaria de la cápsida p72, se asocia con la chaperona viral B602L. 3. La p72 se asocia con las membranas modificadas del retículo endoplasmático. La pp220 se une a la cara interna por miristoilación. 4. La expresión de la proteína pB438L forma las estructuras virales icosaédricas. El procesamiento de la pp220 y la pp62 da lugar al *core shell*. 5. Inserción del ADN y cierre de la cápsida. 6. Condensación del nucleoide y transporte de las partículas virales hacia la membrana plasmática celular para su posterior salida.

Para que las partículas víricas sean liberadas de la célula al medio extracelular, los viriones deben ser transportados desde las factorías víricas a la membrana plasmática, excepto cuando la célula muere por necrosis o apoptosis, tras lo cual las partículas de virus son liberadas directamente. El movimiento de las partículas virales hasta la membrana plasmática es dependiente de la red de microtúbulos (Hernaez et al. 2006; Jouvenet et al. 2004). La proteína pE120R parece jugar un papel importante en el transporte de los viriones desde la factoría vírica hasta la membrana plasmática, aunque el mecanismo de acción no se conoce totalmente. Durante su salida, el VPPA adquiere una última envuelta lipídica que procede de la membrana externa celular y que no es imprescindible para la infección (Andrés et al. 2001) (Figura 5).

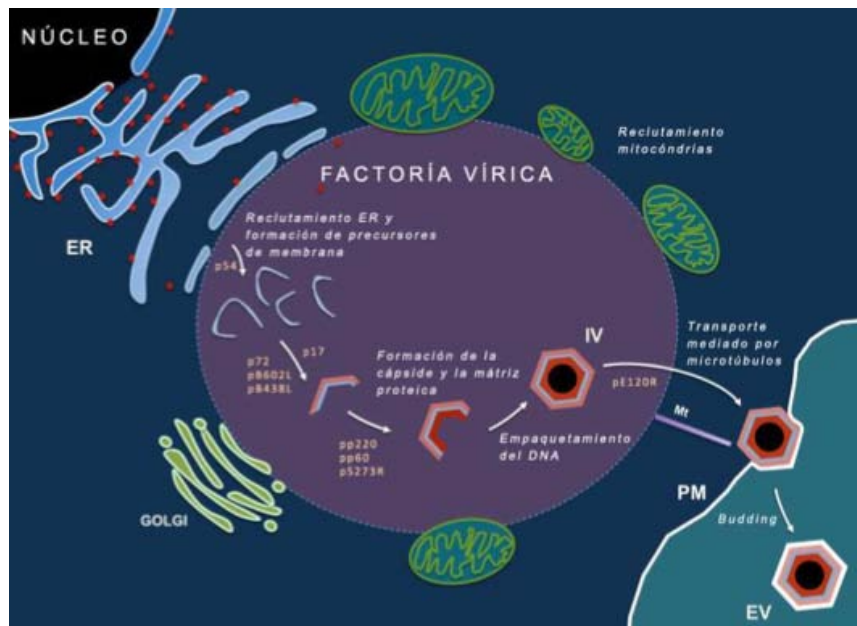


Figura 5: Ciclo infeccioso del VPPA (Salas y Andrés, 2013).

1.2.3.4 La tecnología inducible, una herramienta para el conocimiento de las funciones de las proteínas del VPPA

Estudios de inmunomicroscopía electrónica y microscopía confocal además de métodos bioquímicos y genéticos han permitido definir la localización de un número considerable de proteínas estructurales en la partícula viral. La función de estas proteínas se está investigando mediante el uso de virus recombinantes como se describe a continuación.

Los primeros estudios con virus modificados genéticamente se basaron en deletar un determinado gen y averiguar la esencialidad de la proteína codificada durante la morfogénesis viral. De este modo, si tras el proceso de recombinación homóloga necesario para trunca la expresión de cierto gen (bien por una delección completa o bien parcial del mismo) no se conseguía purificar virus, indicaba que se trataba de una proteína sin la cual el virus no es capaz de progresar, mientras que si la ausencia de dicha proteína generaba virus indicaba que se trataba de un gen del cual el virus podía prescindir (Rodríguez et al. 1992).

A continuación, y queriendo comprender las funciones de dichas proteínas imprescindibles para el virus, se ideó una estrategia que permitía su estudio. Se generaron estirpes del VPPA que denominamos inducibles, los cuales expresaban condicionalmente ciertos genes requeridos para la morfogénesis y encapsidación del genoma. El proceso de generación de virus que expresan condicionalmente ciertos genes se explicará más adelante (en la sección de

Materiales y Métodos).

Los estudios básicos sobre la morfogénesis viral y otros eventos esenciales de la biología del virus se han beneficiado extraordinariamente del desarrollo de esta tecnología inducible (García-Escudero *et al.*, 1998) Este primer estudio llevado a cabo con virus inducibles por García-Escudero *et al.*, se centró en la proteína mayoritaria de la cápsida, la p72 (B646L), la cual está ensamblada en la membrana interna del virus pero no es una proteína integral de membrana (Cobbold & Wileman, 1998). Tras obtener de forma satisfactoria el virus inducible para la p72 (denominado vA72), el análisis ultraestructural del mismo, reveló que la represión de la p72 durante una infección *in vitro* daba lugar a la acumulación de unas estructuras aberrantes características (Figura 6) que pasaron a ser denominadas *cremalleras* y que podían ser simples o dobles.

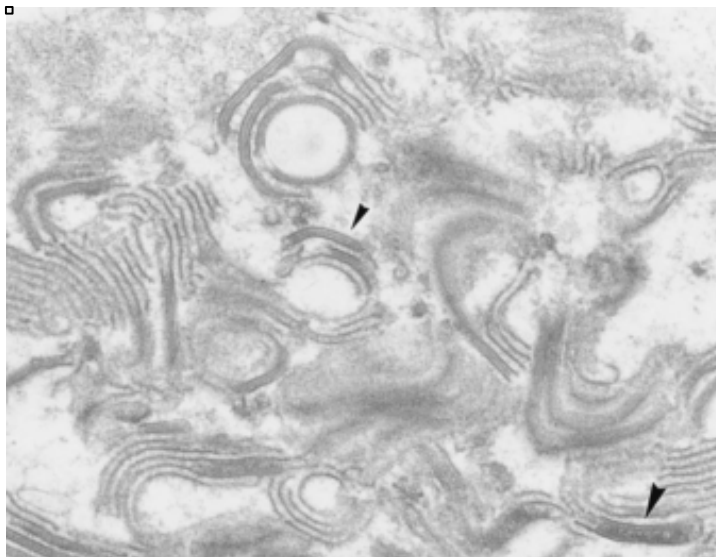


Figura 6: Células Vero infectadas con vA72, tras 16h en ausencia de IPTG. Las flechas señalan las estructuras tipo *cremalleras*, simples (flecha pequeña) y dobles (flecha mayor) (García-Escudero *et al.* 1998).

Siguiendo con esta metodología, se han construido virus con represión para muchas proteínas entre las que se encuentran las poliproteínas pp220 (CP2475L) (Andrés *et al.* 2002b) y pp62 (CP530R) (Suárez *et al.* 2010) y la proteína pB438L (B438L) (Epifano *et al.* 2006b) entre otras. También se han generado inducibles de enzimas virales como la proteasa viral pS273R (S273R) (Alejo *et al.* 2003) y, como se describe más adelante, de la proteína quinasa (R298L).

Dentro de la colección de virus generados a lo largo del tiempo y que expresan induciblemente ciertas proteínas, nos hemos centrado en comentar los que pueden ser interesantes a nivel de

su posible utilización como vacunas vivas atenuadas frente a la PPA. Este es el caso del virus que expresa induciblemente la pp220, pues en estado de represión, conlleva también la ausencia de las proteínas derivadas de su procesamiento posterior que son la p150, p37, p34 y p14, y al microscopio electrónico se observa un fenotipo viral muy interesante. La represión de la pp220 genera estructuras virales icosaédricas carentes de los dominios internos propios del virus y carentes de ADN (Figura 7). Este estudio reveló el papel fundamental que la pp220 juega en la formación del *core* viral que incluye el *core shell* y el nucleoide que contiene el ADN (Andrés et al. 2002b)

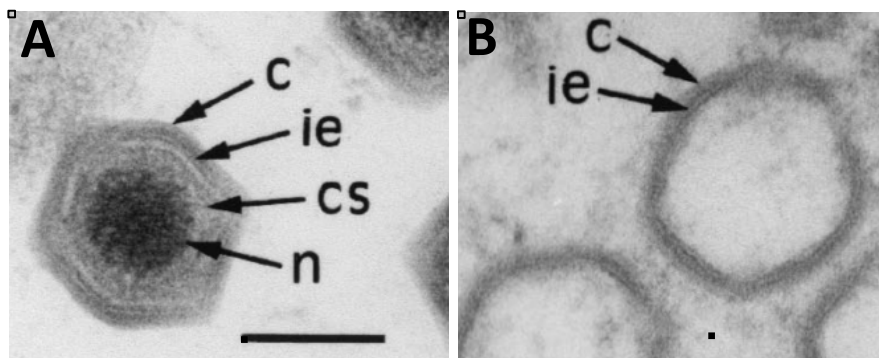


Figura 7: Partícula viral generada durante la infección con el virus inducible de la pp220 en presencia de IPTG (A). Partícula viral generada en ausencia de IPTG carente de los dominios internos y de ADN (B). (c) cápsida; (ie) envuelta interna; (cs) core shell; (n) nucleoide. Barras, 200nm. (Andrés et al. 2002b).

Otro caso de represión, que en una primera instancia nos pareció adecuado para su uso como vacuna, fue el basado en la represión de la proteína pB438L. En este caso, la ausencia de la proteína pB438L generaba unas estructuras aberrantes tubulares y alargadas junto con unas formas bilobuladas de origen viral (Figura 8), ambas carentes de ADN, por lo que no eran infecciosas. Este estudio desveló el papel que juega la proteína pB438L en la formación de los vértices de la cápsida viral (Epifano et al. 2006b). Las estructuras tubulares aberrantes generadas, parecían ser interesantes para su utilización como VLP (*Virus Like Particles*) en una vacunación, pero la imposibilidad de su correcta purificación nos hizo abandonar dicha idea.

Aparte de las proteínas implicadas en morfogénesis que se acaban de describir, el virus posee también proteínas capaces de modular la respuesta inmune celular y la muerte por apoptosis de la célula infectada. Dentro de estas proteínas se encuentra, por ejemplo, la proteína transmembrana de tipo II pEP153R que guarda cierta similitud con los receptores de las células asesinas naturales (NK) (como puede ser el CD69) y que es capaz de inhibir la sobreexpresión de moléculas del *Complejo Mayor de Histocompatibilidad* de clase I (MHC-I) en la superficie celular, siendo también capaz de inhibir la apoptosis (Hurtado *et al.*, 2004, 2011). Otras

proteínas virales interesantes son las homólogas a Bcl2 e IAP que inhiben la apoptosis de las células infectadas, prolongando de este modo la vida de las mismas y ayudando a la replicación viral (Brun *et al.*, 1996; Galindo *et al.*, 2008; Nogal *et al.*, 2001; Revilla *et al.*, 1997).

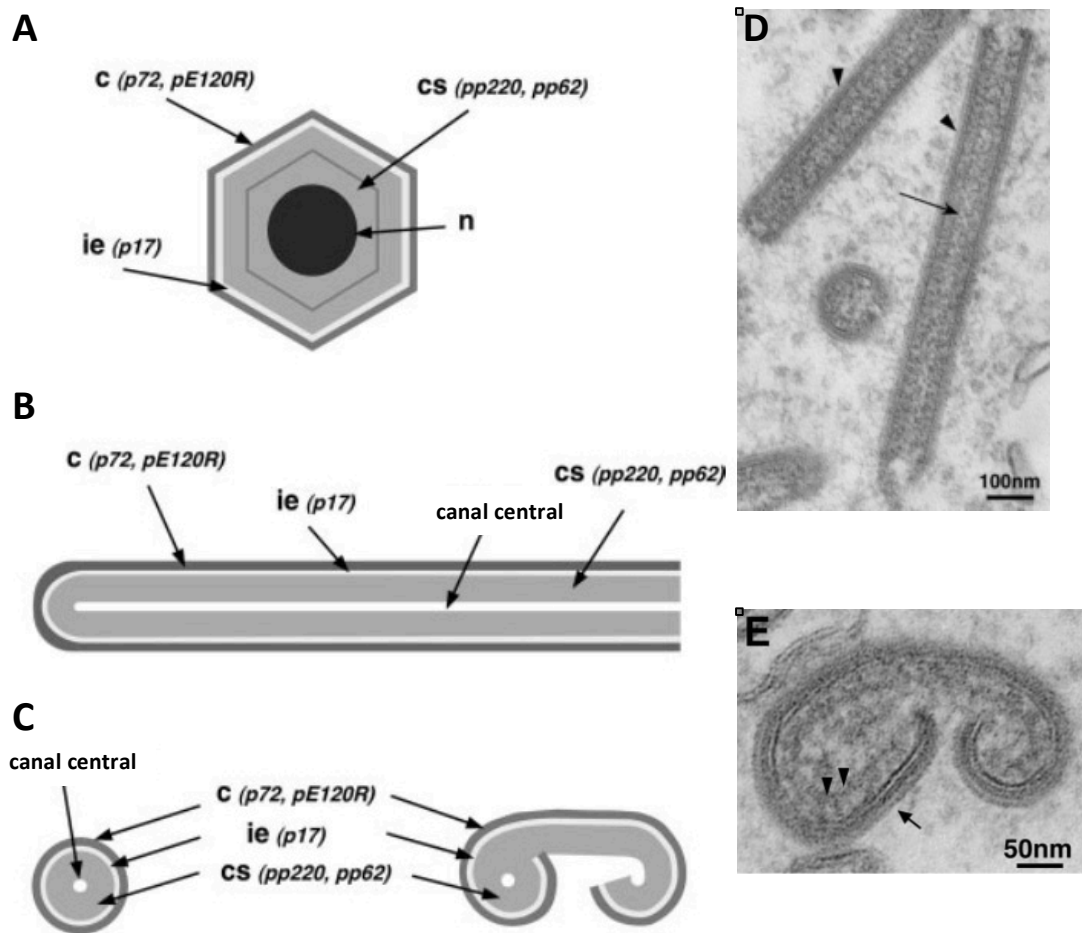


Figura 8: Representación esquemática de las estructuras generadas durante la infección *in vitro* con el virus inducible de la pB438L. (A) Partícula icosaédrica normal generada en presencia de IPTG (B) Sección longitudinal de una partícula tubular (C) Sección transversal de una estructura tubular (izquierda) y bilobulada (derecha). (c) cápsida; (ie) envuelta interna; (cs) core shell ; (n) nucleoide. Las proteínas de cada dominio aparecen indicadas en paréntesis. Imágenes al microscopio electrónico de las estructuras aberrantes tubulares y alargadas (D) y de las formas bilobuladas (E) formadas bajo condiciones de represión (Epifano *et al.* 2006b).

Nosotros nos hemos centrado en la proteína pEP402R (CD2v o HA), debido al interesante papel que tiene como inhibidor de la proliferación de linfocitos en respuesta a mitógenos (Borca *et al.* 1998). Además el hecho de que no es un gen esencial para la progresión viral (Borca *et al.* 1998; Rodríguez *et al.* 1993) lo convierte en un candidato ideal a deletar durante el proceso de generación de virus inducibles basados en la cepa virulenta BA71 para su utilización como vacunas.

1.3 Interacción del VPPA con el sistema inmunitario: Historia de un equilibrio inestable

1.3.1 VPPA: Un virus con tropismo por el sistema inmunitario del huésped

La patogenia del VPPA viene totalmente condicionada por el hecho de que las principales dianas de replicación del virus sean las células del sistema mononuclear fagocítico, células clave para el equilibrio del sistema inmunológico del huésped. El nivel de alteración del sistema inmunitario tras la infección depende, en gran medida, del grado de virulencia del aislado, observándose una correlación directa entre su patogenicidad y la afectación del mismo (Correia *et al.*, 2013; Dixon *et al.*, 2004).

El conocimiento que se tiene sobre la interacción del VPPA con el sistema inmunitario del huésped se debe a estudios de infección *in vitro*, con las limitaciones que esto implica y, sobre todo, a infecciones experimentales realizadas en cerdos domésticos. Desafortunadamente, los estudios realizados en los reservorios naturales del virus: cerdos salvajes africanos y garrapatas del género *Ornithodoros* son muy escasos.

Entender los detalles intrínsecos de la interacción del virus con el sistema inmunitario porcino resulta clave tanto para entender la patogénesis viral como los mecanismos de protección frente al mismo, e indirectamente para el diseño de futuras vacunas eficientes frente al virus. Sin embargo, y como intentaremos resumir a lo largo de este capítulo, la interacción del VPPA es mucho más compleja de lo que se podía prever, participando no sólo el virus y la célula que infecta, sino muchas otras células del sistema inmunológico que, a pesar de no ser infectadas directamente, se ven profundamente afectadas durante la infección *in vivo*, contribuyendo de manera fundamental a explicar la patogénesis viral. Uno de los mejores ejemplos que ilustran esta realidad es el que explica la dramática leucopenia observada tras la infección con cepas virulentas del VPPA, provocada por la liberación masiva de viriones y factores solubles por parte del macrófago infectado y que afecta principalmente a células B y T no infectadas (apoptosis *by-stander*) (Gómez-Villamandos *et al.*, 1995; Salguero *et al.*, 2005), explicando uno de los aspectos más característicos de la patogenia de la PPA aguda.

En claro contraste con lo descrito para aislados muy virulentos de VPPA, existen cepas atenuadas del VPPA, inicialmente descritas de forma natural en el campo, que pueden cursar con infecciones prácticamente inaparentes y sin provocar leucopenia ni lesiones macroscópicas distinguibles (Gómez-Puertas *et al.*, 1996, 1998; Onisk *et al.*, 1994; Oura *et al.*, 2005).

Varios son los trabajos que se han publicado sobre la diferente modulación del sistema inmunológico por parte de las cepas atenuadas y virulentas del VPPA aunque,

desafortunadamente, o se limitan a describir la interacción del virus con el macrófago *in vitro*, sistema biológico mucho menos complejo que el de *in vivo* y que únicamente se enfoca en la célula diana (Fishbourne *et al.*, 2013; Gil *et al.*, 2008; Portugal *et al.*, 2009), o se ha realizado con cepas virulentas y atenuadas demasiado distantes filogenéticamente como para extraer conclusiones definitivas. Un trabajo más reciente ha permitido avanzar un paso más en el proceso de atenuación del VPPA aunque sólo aborda aspectos estrictos de diferencias de secuencia, no abordando el estudio inmunológico (Krug *et al.*, 2015). En nuestro laboratorio hemos intentado aprovechar esta realidad para realizar infecciones experimentales paralelas con la misma dosis de un par de virus homólogos: E75 virulento y E75CV1 atenuado, resultante de la adaptación de E75 a la línea CV1 en sólo tres pases ciegos (Ruiz-Gonzalvo *et al.* 1983).

La utilización de una misma dosis viral (10^4 UHA₅₀) del E75 y E75CV1, permitió por un lado confirmar que, mientras que el E75 provocaba la muerte de todos los animales en una semana con la sintomatología típica de PPA aguda y una marcada leucopenia, la infección de los animales con la misma dosis de E75CV1 apenas provocaba fiebre y viremia transitoria y no se observaba ninguna lesión compatible con PPA ni leucopenia.

Los estudios de transcriptómica y proteómica realizados con órganos linfoides de estos animales a distintos días tras la infección deparó como hallazgo más llamativo, que, a diferencia de lo que cabría esperar, el número de genes del huésped que se ven modificados no dependía ni del grado de virulencia del virus utilizado ni de la carga de virus encontrada en el órgano diana.

El éxito que permite que el animal elimine el E75CV1 y sobreviva se correlacionó, sin embargo, con la capacidad de su sistema inmune innato para ser activado a tiempos muy tempranos tras la infección, condicionando así al animal para una posterior inducción de una respuesta inmune adaptativa (humoral y celular), lo que se correlacionaba con su capacidad para resistir la infección con E75 (Lacasta *et al.*, 2015, submitted). Por el contrario, E75 parece ser invisible al sistema inmunológico a tiempos tan tempranos de la infección facilitando esta evasión del sistema inmunológico y la replicación del virus. A tiempos tardíos tras la infección, la enorme expansión de virus correlaciona con la activación de multitud de mediadores inmunológicos, reflejo en este caso del daño tisular existente (Lacasta *et al.*, 2015, submitted). Actualmente nos encontramos en el proceso de comparar las secuencias de ambos virus para poder caracterizar factores implicados en virulencia.

1.3.2 VPPA: un maestro de la evasión del sistema inmunitario

El VPPA ha ido evolucionando hasta alcanzar la enorme complejidad y diversidad con la que hoy lo conocemos y es de esperar que continúe haciéndolo, en gran medida como mecanismo de supervivencia ante la presión inmunitaria de los huéspedes a los que infecta. Según algunas predicciones, de las aproximadamente 90 proteínas que son necesarias para la replicación viral, una número considerable de ellas juega algún papel durante la interacción del virus con el sistema inmunitario del huésped.

En una excelente revisión bibliográfica escrita por la Dra. Linda Dixon en el año 2004 (Dixon et al. 2004), se diferenciaron tres grandes grupos de proteínas del VPPA con capacidad para interferir en las respuestas por parte del huésped. El primer grupo lo formarían las proteínas capaces de modular las cascadas de señalización en los macrófagos infectados, inhibiendo/activando transcripcionalmente genes inmunomoduladores muy relevantes para el equilibrio inmunológico del huésped; en segundo lugar, encontraríamos las proteínas capaces de modular la apoptosis celular facilitando la replicación del virus; y un tercer grupo lo conformarían proteínas de membrana, capaces de alterar las propiedades de adhesión del virus y/o de las células infectadas.

Este grado de especialización de las proteínas del VPPA explica el enorme éxito del virus para haberse adaptado a huéspedes tan distintos como los que forman parte de su ciclo vital, y explican en gran medida tanto su patogénesis, como la enorme dificultad que entraña el poder diseñar vacunas frente al virus. A día de hoy se conoce la función real de muy pocos de estos genes y, con contadas excepciones, su clasificación como candidato a jugar un papel importante en virulencia se infiere de predicciones teóricas. La secuenciación completa de genomas del VPPA virulentos, atenuados y apatógenos está contribuyendo a caracterizar zonas del genoma muy posiblemente implicadas en atenuación (Chapman *et al.*, 2008; Krug *et al.*, 2015). Partiendo de estas premisas, y gracias al desarrollo de herramientas que permite eliminar genes concretos del VPPA mediante recombinación homóloga, se ha podido demostrar la participación de determinados genes en la virulencia del VPPA e incluso abrir la esperanza a la obtención de vacunas recombinantes atenuadas por recombinación. A día de hoy, se ha podido demostrar la atenuación del virus tras la eliminación de ciertos genes pertenecientes a las MGF 360 y MGF 530 (Neilan *et al.*, 2002; O'Donnell *et al.*, 2015a), o de genes individualizados como NL-S (Zsak *et al.*, 1996), UK (Zsak *et al.*, 1998) y 9GL (Lewis *et al.*, 2000) por citar algunos. Cierto es que la atenuación resultó en ocasiones dependiente de la cepa de virus utilizada de partida, como es por ejemplo el caso del gen NL-S, cuya ausencia atenúa la cepa E70, pero no la Malawi Lil-20/1 (Neilan et al. 2002), lo que añade un grado aún

mayor de complejidad al tema. Desafortunadamente, la mayoría de las inmunizaciones con cepas atenuadas únicamente resultaron efectivas frente al virus homólogo virulento (Neilan et al. 2002; Zsak et al. 1996; 1998).

1.3.3 Estudios de la interacción del VPPA con el sistema inmunitario: “No sólo de macrófagos vive el VPPA”

Diversos son los estudios *in vitro* que han revelado la capacidad del VPPA para interferir en múltiples cascadas de señalización claves para el correcto funcionamiento de los macrófagos, células esenciales tanto para la respuesta innata como para mantener una respuesta inmune de memoria en el organismo utilizando cepas de baja virulencia (Gil *et al.*, 2008), cepas virulentas y no patogénicas (Zhang *et al.*, 2006) o cepas virulentas (Powell et al. 1996). Como ya se ha comentado con anterioridad, el grado de afectación del macrófago así como las vías de señalización activadas y/o reprimidas dependerá en gran medida del grado de virulencia de la cepa de virus (Powell, et al. 1996; Gonzalez Juarrero et al. 1992; Ramiro-Ibáñez et al. 1997; Vallée et al. 2001). Desafortunadamente, la mayoría de los estudios comparativos se han hecho con cepas virulentas y atenuadas no homólogas, en ocasiones filogenéticamente muy alejadas entre sí (diferente dotación de genes), lo que dificulta aún más la interpretación de los datos obtenidos (Zhang *et al.*, 2006). Del mismo modo, la utilización de cultivos de macrófagos primarios de distinta procedencia y/o protocolos de infección muy distintos (incluyendo multiplicidades de infección y tiempos de infección muy distintos), ha dificultado obtener datos fiables, que son en ocasiones controvertidos (Fishbourne *et al.*, 2013; Sánchez-Torres *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2006).

Independientemente de su utilidad, todos estos estudios únicamente reflejan parcialmente la realidad de lo que ocurre *in vivo*, ya que *in vivo* otras muchas células, como pueden ser las células T y B, a pesar de no ser la diana principal del virus tienen un papel esencial en la patogenia viral. Así, la infección experimental con cepas altamente virulentas del VPPA permitió identificar dramáticos cambios a tiempos tardíos de la infección, incluyendo la secreción de multitud de mediadores solubles como la IL-1, la IL-6 o TNF- α , que, a su vez, colaboraban en la inducción de apoptosis de células circundantes no infectadas y en la expansión del virus a través del organismo (Gómez-Villamandos et al. 1997; Gómez-Villamandos et al. 1995; Gómez del Moral et al. 1999; Salguero et al. 2005; Sánchez-Cordón et al. 2008; Oura et al. 1998). En etapas tardías de la infección la apoptosis de las células endoteliales junto con la activación de un fenotipo pro-inflamatorio facilita la activación de la

hematopoyesis en la médula ósea (Gomez-Villamandos et al. 1997), así como la secreción de proteínas de fase aguda por parte del hígado.

A modo de ejemplo de la enorme dicotomía entre lo observado *in vitro* e *in vivo* cabe destacar el hecho de que, *in vitro*, algunas cepas virulentas parecían inhibir muy eficientemente la secreción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 y TNF- α en macrófagos alveolares y estimular la liberación de factores inmunosupresores codificados por el virus como es el TGF- β (Powell et al. 1996; Whittall and Parkhouse 1997). Una de las grandes deficiencias de los estudios *in vitro* e *in vivo* proviene no sólo de no tener en cuenta esta dicotomía, sino además de no tener en cuenta el tiempo exacto tras la infección en el que ocurren cada uno de los fenómenos descritos. Así, como veremos más adelante, la patogenia *in vivo* de una cepa virulenta o de una cepa atenuada del VPPA viene explicada no sólo por la activación y/o represión de multitud de cascadas de señalización, sino también por la cinética que afecta a cada una de estas cascadas a lo largo del tiempo, en ocasiones pasando de la activación a la represión, muy probablemente reflejando la complejidad del sistema inmunológico y de las células implicadas en el mismo.

Entrando en profundidad en el perfil de genes analizado, se vio que tan pronto como tras un día de infección con la cepa virulenta los marcadores de activación de la respuesta inmune CD163, IFN- γ e IL-4 mostraban tendencia a estar *down-regulados*, mientras que IL-12p40, TGF β R1, TNF- α e IL-21 estaban claramente sobreexpresados. Tras 7 días de infección, y coincidiendo con la tormenta de citoquinas descrita para las fases agudas de la infección, en las que el animal no es capaz de soportar la infección, se observó una activación masiva de IL-5, β -Defensina 2, TLR3, IL-6, IL-8, IL-1 β , IL-21, IL-23 e IL-10.

Por el contrario, en los animales infectados con la cepa atenuada el patrón de expresión cambiaba, pues se detectaron niveles elevados de CD163, IL-1 β , IFN- γ , IL-5, IL-6, IL12-p40, TNF- α , IL-10 y TGF- β R1, que se relacionan con una activación eficiente de la inmunidad innata, lo que posiblemente ayude a controlar las primeras rondas de replicación del virus, hecho que encaja con que se produzca una respuesta inmunológica más balanceada por parte del animal a lo largo de la infección (Lacasta et al. 2015, submitted).

La significativa represión de IL-4 junto con la consistente sobreexpresión de IFN- γ a lo largo de la infección con E75CV1, encaja con una respuesta mediada por células Th1, respuesta la cual ya ha sido previamente asociada a la protección conferida mediante virus atenuados y vacunas de subunidades (King et al. 2011; Lacasta et al. 2014).

Estos datos se ven apoyados por diferentes ensayos *in vitro* en los que se comparó el perfil de

expresión de citoquinas tras la infección de macrófagos porcinos derivados de sangre con aislados del VPPA de distinta virulencia. Mediante PCR a tiempo real se pudo confirmar que los virus atenuados inducían niveles más altos de expresión de las citoquinas IL-6, TNF- α e IL-12 que los aislados altamente virulentos (Gil *et al.*, 2003, 2008) del mismo modo que sucedió en el ensayo *in vivo*.

1.3.4 Mecanismos implicados en la protección contra el VPPA

La reciente expansión del VPPA en Europa se ha reflejado también en el mundo de la investigación básica, como queda de manifiesto con la reciente publicación de un monográfico sobre el virus en *Virus Research* (Volume 173, Issue 1, Pages 1-246, April 2013), con dos capítulos dedicados a rescatar lo poco que se sabe sobre los mecanismos implicados en protección contra el VPPA (Takamatsu *et al.* 2013; Escribano *et al.* 2013). La mayor aportación de estos capítulos quizás sea la de abogar, de una manera definitiva, por dar el protagonismo que se merece tanto a la respuesta celular como humoral o de anticuerpos en la protección frente al VPPA, sin olvidar por supuesto hacer mención a lo poco que se conoce sobre el papel de la respuesta inmune innata en la misma.

1.3.4.1 Las células NK

Las evidencias existentes en cuanto a la participación de las células NK en protección frente al VPPA son indirectas, observándose un paralelismo entre la actividad NK y la protección frente a la infección *in vivo* con el aislado atenuado ASFV:NH:P68 (Leitão *et al.*, 2001), correlacionando además la aparición de viremia, signos y lesiones crónicas de PPA con la ausencia de actividad NK y la presencia simultánea de altos títulos de anticuerpos específicos. El hecho de que sólo el aislado atenuado ASFV:NH:P68 fuera capaz de estimular la actividad NK (la cepa virulenta parecía inhibirla), parecería ratificar el papel de esta actividad en la recuperación de la infección (Martins & Leitão, 1994; Norley & Wardley, 1983).

Como sucede para el caso de la respuesta innata, la mayor parte de los conocimientos existentes sobre el papel de la respuesta específica o adaptativa proviene de estudios realizados *in vivo* con virus atenuados aislados de casos naturales (Onisk *et al.* 1994; Oura *et al.* 2005; King *et al.* 2011) o por adaptación en cultivo celular (Ruiz-Gonzalvo *et al.*, 1983; Lacasta *et al.* 2015, submitted). Más recientemente, con la aparición de la tecnología recombinante se han podido obtener virus atenuados con potencial protector eliminando factores de virulencia (Neilan *et al.*, 2004a; O'Donnell *et al.*, 2015b; Wardley *et al.*, 1985; Zsak *et al.*, 1993).

Desafortunadamente, prácticamente la totalidad de los trabajos experimentales realizados limitaban la capacidad protectora de los virus atenuados a cepas homólogas o filogenéticamente muy próximas (King *et al.*, 2011; Mulumba-Mfummu *et al.*, 2015; Neilan *et al.*, 2004a; Ruiz Gonzalvo *et al.*, 1983). A continuación resumimos evidencias irrefutables sobre el papel que tanto los anticuerpos como las células T específicas juegan en la protección conferida contra el VPPA.

1.3.4.2 Papel de los anticuerpos específicos en protección

La presencia de anticuerpos en animales supervivientes a la infección con el VPPA ha jugado un papel esencial en la erradicación de la enfermedad a lo largo de la historia, permitiendo diagnosticar la enfermedad muy eficientemente y facilitando las campañas de erradicación en todo el mundo, incluido nuestro país (Pastor *et al.*, 1992). Desde que en 1980 Tabarés y colaboradores identificaron anticuerpos frente a la proteína mayoritaria de la cápsida viral, la p72, tras una infección natural en animales y hasta la actualidad, el papel que los anticuerpos juegan en protección continúa generando una amplia polémica.

Por un lado, nadie puede obviar la presencia de anticuerpos en circulación en presencia de viremias elevadas (Leitão *et al.*, 2001), sobre todo en casos crónicos de la enfermedad, demostrando su incapacidad para controlar el virus, encontrándose el virus formando inmunocomplejos (Fernandez *et al.* 1992). En este sentido, parece clara la correlación entre la presencia de anticuerpos y las lesiones crónicas encontradas (Martins & Leitão, 1994; Reis *et al.*, 2007), coincidiendo quizás con la exacerbación mediada por anticuerpos descrita tras la vacunación con ADN codificando proteínas estructurales del virus (Argilaguet *et al.*, 2011).

Independientemente de estas evidencias, estudios de transferencia pasiva de anticuerpos recuperados por la infección con un virus atenuado, demostraban un claro poder protector. La transferencia pasiva de anticuerpos específicos mediante calostro, suero de cerdos inmunes o inmunoglobulinas purificadas, reflejaron un aumento en la tasa de supervivientes, un retraso en la aparición de signos clínicos y una reducción de los niveles de viremia tras infecciones letales con el VPPA homólogo (Onisk *et al.* 1994; Schlafer *et al.* 1984a; Schlafer *et al.* 1984b).

Así pues, resulta indiscutible que los anticuerpos puedan jugar un papel protector, quedando la discusión circunscrita a si el mecanismo de protección depende de la existencia o no de anticuerpos neutralizantes, asegurada por unos y negada por otros (Escribano *et al.* 2013) o de cualquier otro mecanismo alternativo. En este sentido, se ha correlacionado la presencia de anticuerpos inhibidores de la infección (Ruiz Gonzalvo *et al.*, 1986), en ocasiones, con la presencia de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación (Ruiz-Gonzalvo *et al.* 1983; Ruiz-

Gonzalvo et al. 1996). Estudios más recientes parecen correlacionar la presencia de este tipo de anticuerpos con la protección conferida, proponiéndose clasificar los aislados de VPPA en serogrupos dependiendo del reconocimiento de los mismos (Malogolovkin *et al.*, 2015).

Al hacer un repaso en la literatura sorprende comprobar el escaso conocimiento que existe no sólo de los mecanismos implicados en protección sino, sobre todo, de los antígenos implicados en la misma. De hecho, la práctica totalidad de las proteínas del virus que han sido descritas como inmunodominantes, lo han sido por el hecho de ser reconocidas por anticuerpos de cerdos supervivientes a la infección y no por la protección que éstas confieren. A día de hoy, muchas de estas proteínas forman parte de reactivos de diagnóstico de gran utilidad (Escribano et al. 1990; Pastor et al. 1990; Sanchez-Vizcaino 1987). A mediados de los noventa se describió un grupo de proteínas estructurales del virión: p30 (pCD204L), p54 (pE183L) y p72 (pB646L), implicadas en la unión al receptor y entrada del virus en la célula y cuyos anticuerpos específicos parecían jugar un papel en la protección parcial frente a la infección letal con VPPA (Gómez-Puertas *et al.*, 1996, 1998). Desafortunadamente, estos resultados no fueron reproducibles cuando se utilizaba una cepa de virus distinta (Neilan *et al.*, 2004a). Por otra parte, la inmunización de cerdos con células Sf9 de insecto infectadas con un baculovirus recombinante expresando la HA viral o CD2v, confería protección frente al virus letal de una manera dosis dependiente y correlacionada con la presencia de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación (Ruiz-Gonzalvo et al. 1996).

A pesar de los esfuerzos realizados, el resto de antígenos reconocidos por anticuerpos que han sido utilizados individual o colectivamente en experimentos de inmunización han resultado inocuos en lo que a protección conferida se refiere. Dentro de estos antígenos encontramos proteínas no estructurales como la ribonucleótido reductasa (pF334L), timidina quinasa (TK) (pK196R) y ADN ligasa (pNP419L), otras proteínas estructurales como la pA104R y la pK78R junto con otras proteínas de las que no se conoce actualmente su función (pC84L, pCP312R, pE184L, pK145R, pK205R) (Gómez-Puertas *et al.*, 1996; Kollnberger *et al.*, 2002; Neilan *et al.*, 2004b; Reis *et al.*, 2007; Zsak *et al.*, 1993).

En resumen, una vacuna ideal frente al VPPA debería sin duda, inducir anticuerpos capaces de inhibir la infección, evitando al máximo la inducción de anticuerpos exacerbantes de la misma. Así pues, cualquier estudio encaminado a entender, bien los mecanismos implicados en ambos fenómenos y/o bien los antígenos reconocidos por los mismos será de gran utilidad para el futuro desarrollo de una vacuna eficaz y segura frente a la enfermedad.

1.3.4.3 Papel de la respuesta T-específica en protección

La respuesta mediada por linfocitos y el papel que esta juega en la supervivencia de los animales frente a la infección con el VPPA no está del todo esclarecida a día de hoy.

De modo introductorio, cabe recordar que, a pesar de que el VPPA infecta preferentemente al macrófago, en etapas tardías, de manera infrecuente se pueden encontrar linfocitos infectados directamente por el virus (Ballester *et al.*, 2010). La infección *in vivo* con cepas virulentas afecta de modo indirecto a multitud de células circulantes, incluyendo las células T, inhibiendo su proliferación primero, y provocando seguidamente su apoptosis *by-stander* (Borca *et al.*, 1998; Leitão *et al.*, 2001). Como cabía esperar, no sucede lo mismo durante la infección con cepas atenuadas, en las que incluso se ha descrito el efecto inverso, la proliferación de células T (Leitão *et al.* 2001; Ramiro-Ibanez *et al.* 1997), correlacionando su inducción con protección (Argilagué *et al.*, 2012; King *et al.*, 2011; Lacasta *et al.*, 2014). La inducción de una respuesta T-específica por parte de los virus atenuados está bien documentada, tanto de células T-CD4⁺ con capacidad linfoproliferativa como de células T-CD8⁺ con capacidad citotóxica y con especificidad por determinados antígenos del VPPA (Alonso *et al.*, 1997; Canals *et al.*, 1992; Leitão *et al.*, 1998, 2000; Martins *et al.*, 1993). Como no podía ser de otro modo, la inmunización experimental con virus atenuados ha sido clave en la definitiva demostración de que las células T juegan un papel en protección frente al VPPA, si bien en este caso ésta vino de la mano de la depleción *in vivo* de células las células T-CD8⁺ (Oura *et al.*, 2005). La relevancia de las células T-CD8⁺ ha sido más reciente confirmada utilizando tanto virus atenuados (King *et al.* 2011), como vacunas ADN (Argilagué *et al.* 2012), habiéndose podido identificar en este caso una correlación perfecta entre protección y la inducción de respuestas específicamente dirigidas contra la HA. En nuestro laboratorio, hemos seguido explorando el potencial de las vacunas ADN como herramienta tanto para esclarecer los mecanismos implicados en protección, como los antígenos implicados en la misma, y, por el momento, hemos podido demostrar, sin lugar a dudas, que el VPPA codifica un enorme arsenal de antígenos con potencial protector (Lacasta *et al.*, 2014), que en un futuro no muy lejano esperamos identificar para su utilización en una formulación vacunal optimizada.

Lejos de apostar por la inducción de un tipo de respuesta, nuestra apuesta definitiva propone intentar el desarrollo de una vacuna capaz de inducir anticuerpos inhibidores de la infección que permitan eliminar el virus extracelular presente en los fluidos corporales, concomitantemente a la inducción de una respuesta T-específica capaz de eliminar el virus intracelularmente, allí donde los anticuerpos no tienen fácil acceso (Takamatsu *et al.*, 2013).

1.4 Desarrollo de vacunas experimentales frente al VPPA

1.4.1 Antecedentes

A día de hoy, 100 años después de que fuera descrito por primera vez en África y casi 60 desde que la enfermedad aterrizara por primera vez en Europa, continúa sin existir una vacuna eficaz frente al VPPA, esto a pesar del conocimiento que actualmente se tiene sobre la biología del virus. El diagnóstico temprano de la enfermedad y el sacrificio masivo de los animales son, como hemos comentado, las principales medidas adoptadas cuando se detecta un brote infeccioso. Teniendo en cuenta la situación actual de la enfermedad, es evidente que la generación de una vacuna eficaz es uno de los principales retos en el campo de la investigación de la PPA. Las primeras vacunas que se intentaron desarrollar se basaban en la utilización de preparados inactivados del VPPA o en el uso de virus atenuados.

Por un lado, el VPPA inactivado, bien física (por calor) o químicamente, aunque capaz de inducir una respuesta humoral, desgraciadamente fracasó a la hora de inducir una respuesta protectora en los animales inmunizados (Forman et al. 1982; Mebus 1988; Montgomery 1921; Stone and Hess 1967). Esta frustrante realidad ha sido confirmada muy recientemente utilizando los más modernos adyuvantes (Blome et al. 2014).

Por otro lado, el uso de virus atenuados, bien naturalmente o bien tras su adaptación en cultivo celular, confería, por regla general, altos niveles de protección frente al desafío con un virus virulento homólogo (Gómez-Puertas *et al.*, 1996; King *et al.*, 2011; Malmquist & Hay, 1960; Neilan *et al.*, 2004a; Onisk *et al.*, 1994; Oura *et al.*, 2005; Zsak *et al.*, 1993) y sólo ocasionalmente muestran un cierto grado de protección frente a virus heterólogos (Mulumba-Mfumumu *et al.*, 2015).

Desafortunadamente, su utilización en el campo se ha visto limitada por problemas de bioseguridad (Sanchez-Botija 1963), principalmente derivados de la presencia de virulencia residual en estas cepas, en ocasiones no del todo bien caracterizadas ni aisladas, llegando en algunos casos a provocar la persistencia del virus, la existencia de animales portadores inaparentes o incluso la reversión de la virulencia.

Comentaremos un ejemplo muy ilustrativo del peligro derivado de trasladar la experiencia experimental (siempre limitada en cuanto al número de cerdos utilizados), a un programa de vacunación como el llevado a cabo en Portugal tras el primer brote infeccioso de los años sesenta. Durante este programa, más de 500.000 cerdos fueron vacunados con una cepa atenuada del VPPA y más del 20% de ellos murieron mostrando signos y lesiones compatibles con PPA, de los que se pudo aislar gran cantidad de virus (Manso Ribeiro, 1962). Como

veremos más adelante, las nuevas técnicas de biología molecular facilitan enormemente la tarea de generar virus recombinantes defectivos en uno o varios factores de virulencia, generando así virus atenuados de una forma más controlada.

Además de las ya descritas, el desarrollo de vacunas basadas en subunidades proteicas ha sido explorado con no demasiado éxito, muy probablemente debido a la enorme complejidad del virus, que cuenta con más de 150 proteínas distintas, lo que dificulta la selección de la combinación ideal de antígenos virales. No obstante, a mediados de los años noventa se obtuvieron resultados prometedores utilizando extractos crudos de las proteínas estructurales del VPPA p30 (pCP204L) y p54 (pE183L) expresadas en el sistema de baculovirus (Barderas *et al.*, 2001; Gómez-Puertas *et al.*, 1998) resultados que desafortunadamente no resultaron reproducibles (Neilan *et al.* 2004), utilizando como modelo experimental un aislado de VPPA totalmente distinto.

Otro antígeno del VPPA utilizado con relativo éxito en protocolos de protección frente a la PPA fue la proteína pEP402R (HA o CD2v) que es el antígeno responsable del fenómeno de la hemadsorción y que, como ya hemos comentado, comparte gran homología con el antígeno leucocitario CD2 y que fue capaz de proteger frente al desafío letal con el virus homólogo de forma dosis dependiente (Ruiz-Gonzalvo *et al.* 1996). En este mismo ensayo no se detectaron anticuerpos neutralizantes, a pesar de que todos los animales desarrollaron anticuerpos específicos frente a CD2v. De todos modos, cabe destacar que en el caso del único animal totalmente protegido (avirémico), dichos anticuerpos sí que fueron capaces de inhibir la infección *in vitro*. El hecho de que se inmunizara con extractos totales de células infectadas con baculovirus permite predecir que las inmunizaciones con CD2v debían provocar también una potente respuesta celular Th1, tal y como ha sido descrita para otros antígenos utilizando este tipo de protocolo de vacunación (Bachmann *et al.*, 1994). La ausencia de metodología en su momento impidió poder comprobar el grado de respuesta celular inducida y/o su implicación en la protección conferida. Desafortunadamente, los procesos de producción y purificación de estas proteínas a gran escala hizo inviable su utilización en condiciones de campo. Esta realidad, junto con la enorme disminución de fondos dedicados a investigar esta enfermedad a partir de mediados de los 90, hizo que este tipo de abordajes no tuvieran la continuidad esperada (Argilagué *et al.* 2013).

Ampliando el rango de antígenos a utilizar, un estudio más reciente centró sus esfuerzos en el uso de péptidos sintéticos en base a la secuencia de varias proteínas del VPPA para la inmunización de cerdos, aunque tan solo se consiguió un retraso en la muerte de los animales.

De manera similar, la inmunización con otras proteínas virales individualmente o en combinación, ha resultado bastante frustrante hasta el momento (Leitão *et al.*, 2000), quizás estando esto relacionado con el hecho de que ninguna de estas estrategias resultara ideal a la hora de inducir no sólo anticuerpos, sino además respuestas celulares específicas, también importantes en protección.

En nuestro laboratorio hemos apostado durante años por la vacunación con ADN como estrategia ideal tanto para desentrañar los mecanismos involucrados en protección, como para desenmascarar tantos antígenos del virus con potencial protector como sea posible.

Las vacunas que inicialmente desarrollamos se basaron en la utilización de las tres proteínas estructurales del VPPA expresadas en baculovirus con anterioridad: p30 (pCP204L), p54 (pE183L) y HA o CD2v (pE402R) y varias fueron las lecciones aprendidas de la utilización de estas estrategias durante la Tesis Doctoral de Jordi Marquès i Argilagué (Argilagué, 2009): i) que la respuesta inmune inducida por las vacunas ADN se veía exponencialmente aumentada dirigiendo los antígenos del VPPA a las células presentadoras de antígeno (CPA), al menos en lo que se refería a la respuesta específica de anticuerpos y de células T-CD4⁺; ii) que esta respuesta, aunque cuantitativamente mayor, no sólo no era suficiente para conferir protección frente a la infección letal con VPPA, sino que parecía exacerbarla, como demostraba el aumento en la viremia observada respecto a los controles, quizás debido a la inducción de anticuerpos no neutralizantes (Argilagué *et al.*, 2011); iii) que la fusión de estos mismos antígenos a ubiquitina dirigía los antígenos al proteasoma, mejorando su presentación junto con el MHC de clase I y la potenciación de la respuesta T-CD8⁺, evitando, a su vez, la inducción de anticuerpos *in vivo* (Argilagué *et al.* 2012); y iv) que la inducción de esta respuesta, específicamente dirigida contra la HA del virus, correlacionaba con su capacidad para proteger frente a la infección letal con el virus (Argilagué *et al.* 2012)

En un intento de avanzar en el campo de la vacunación con ADN y mejorar los resultados obtenidos con estos tres antígenos virales, se generó una librería de expresión génica (ELI) basada en el genoma del VPPA consistente en más de 4.000 plásmidos distintos (excluyendo los correspondientes a p54, p30 y HA) codificando cada uno de ellos un fragmento distinto del genoma viral incluido al azar, fusionados todos ellos a ubiquitina con el objetivo de optimizar su presentación a las células T-CD8⁺. El concepto de ELI fue descrito por primera vez por Barry y colaboradores en 1995 para conferir protección frente a *Mycoplasma pulmonis* en ratón; nosotros utilizamos esta librería completa del VPPA para inmunizar grupos de cerdos, siguiendo estrategias de inmunización previamente utilizadas con éxito frente a otros

patógenos (Ivey *et al.*, 2003; Tekiel *et al.*, 2009). Tras esta inmunización, los resultados de protección que se obtuvieron fueron muy alentadores, quedando un 60% de los animales protegidos frente al desafío letal con VPPA homólogo. Como esperábamos, dicha protección fue conferida en ausencia de anticuerpos específicos detectables antes del desafío y en presencia de células T-CD8⁺ específicas a día de sacrificio (Lacasta *et al.* 2014).

Actualmente nos encontramos en pleno proceso de caracterización de los antígenos específicos responsables de dicha protección, con el objetivo final de generar una vacuna de subunidades segura y lo más eficaz posible contra el VPPA, siendo este el objeto de otra tesis doctoral recién comenzada en nuestro laboratorio.

1.4.2. Nuevos horizontes, virus modificados genéticamente

Como ya hemos mencionado con anterioridad, la utilización de virus atenuados con objetivo vacunal ha resultado, sin duda, la más eficaz de las metodologías. Sin embargo, los virus atenuados, bien de forma natural o bien por adaptación en cultivo celular, han resultado totalmente inseguros en condiciones de campo, exigiendo nuevos desarrollos más controlados. Así, en las últimas décadas, se ha generado una colección de virus atenuados genéticamente mediante la delección de genes específicos relacionados con virulencia, abriendo la posibilidad de obtener una vacuna viva atenuada segura a la vez que eficaz (Borca *et al.* 1998; Lewis *et al.* 2000; Moore *et al.* 1998; Neilan *et al.* 2002; Zsak *et al.* 1996; Zsak *et al.* 1998; Mulumba-Mfumu *et al.* 2015; O'Donnell *et al.* 2015).

Desafortunadamente, la mayor limitación hasta ahora demostrada con estos prototipos vacunales y compartida también con los virus atenuados clásicos, es, por un lado, la existencia de cierto grado de virulencia residual que impide considerarlos totalmente seguros y, por otro, la ineficacia que en general demuestran frente a virus heterólogos.

En nuestro laboratorio, hemos intentado explorar el potencial de la tecnología de virus inducibles (ver apartado de morfogénesis) para intentar desarrollar virus aún más seguros pero con potencialidad para ser utilizados como vacunas. En este sentido, resulta fundamental aprovechar los conocimientos que sobre la morfogénesis este sistema ha aportado.

Si bien la metodología de virus inducibles se desarrolló con el propósito de conocer en profundidad la morfogénesis viral, nuestro objetivo, que es su utilización con fines vacunales, exige pedirle a los candidatos, las siguientes características como ideales: i) que se derive de un virus infectivo *in vivo*, ya sea virulento o atenuado; ii) que el gen que ha de eliminarse durante el proceso de generación del virus inducible sea prescindible *in vivo* y en el mejor de

los casos, atenúe al virus sin inactivarlo; iii) que el gen que modificaremos para hacer que su expresión inducible corresponda con una proteína esencial pero que participe en un punto tardío del ciclo viral. Teniendo en cuenta estas características, durante la presente Tesis intentaremos generar virus inducibles para la poliproteína pp220, esencial en una etapa tardía de la morfogénesis viral y cuya ausencia *in vitro* permite observar la producción de virus idénticos al VPPA pero vacíos de ADN que pueden además ser secretados al medio (Andrés et al. 2002b). Este tipo de virus podrían resultar ideales para la producción de vacunas frente al VPPA.

Alternativamente, se generarán inducibles en la Serina Proteína Quinasa viral (PK) codificada por el gen R298L, un enzima, que, aunque no está implicado directamente en la morfogénesis viral como veremos, interesaba al laboratorio porque podría jugar un papel clave en procesos tan importantes como la fase nuclear del virus (Ballester et al. 2011) o en la salida del virus de la célula.

2. OBJETIVOS

La PPA ha sido y sigue siendo un enorme problema para los países del África Subsahariana que la padecen. La reciente expansión del VPPA en Europa, y la amenaza que esto supone para los mercados de los países ricos, no hacen sino ratificar la necesidad de obtener una vacuna segura y eficaz que ayude a controlar globalmente la enfermedad. La presente Tesis Doctoral persigue este objetivo, centrando nuestro desarrollo en la obtención de una vacuna recombinante viva atenuada, basándonos para ello en resultados preliminares disponibles en los laboratorios de la Dra. Salas del CBMSO (Madrid) y del Dr. Rodríguez en el CRESA (Barcelona).

Así pues, los objetivos específicos de la presente Tesis fueron:

1. Caracterizar *in vivo* la virulencia de la cepa BA71-COS, obtenida tras crecer el virus virulento BA71 (aislado a partir de un cerdo infectado en Badajoz en 1971) en células de la línea células COS-1; virus en el que se basará el desarrollo de nuestros virus recombinantes.

Con este primer objetivo se pretende evitar trabajar con un virus que pudiera ser apatogénico, inservible para el diseño de vacunas por su incapacidad para replicar *in vivo*, como ha resultado ser el tanto el virus BA71V como toda la colección de mutantes obtenidos a partir de él.

2. Una vez demostrada su virulencia *in vivo*, obtener el virus recombinante BA71.ΔTK.pp220i, virus inducible para la proteína estructural pp220 y delecionado en el gen prescindible de la Timidina Quinasa del VPPA y caracterizar su potencial protector *in vivo*.

Con este segundo objetivo se pretende comprobar si la inmunización con un virus de ciclo único que genera cápsidas vacías de contenido genómico, como se ha demostrado *in vitro*, presenta suficiente potencial inmunogénico *in vivo* como para conferir protección frente a la infección letal con el virus homólogo BA71.

3. Generar nuevos mutantes de deleción a partir de BA71-COS con mayor potencial protector *in vivo* frente a la infección letal con el virus homólogo BA71.
4. Generar nuevos virus inducibles basándonos en los nuevos mutantes de deleción y comprobar su potencial protector frente a la infección letal con el virus homólogo BA71.

5. Caracterizar el potencial protector de los recombinantes obtenidos frente al virus virulento heterólogo E75 disponible en el laboratorio.

Con este objetivo se pretende comprobar si, como ocurre con los virus atenuados descritos hasta ahora, la protección sólo se ciñe al virus homólogo o si por el contrario existe algún tipo de protección cruzada.

6. Caracterizar el potencial protector de los recombinantes obtenidos frente al virus heterólogo Georgia07 circulante en Europa en la actualidad, tras la puesta a punto de este último modelo de infección.

7. Caracterizar la respuesta inmune inducida por nuestras vacunas experimentales antes y después de la infección con los distintos virus virulentos y en su caso, caracterizar los mecanismos implicados en la protección cruzada inducida.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Líneas celulares

3.1.1. Líneas celulares estables

Las dos líneas celulares estables utilizadas a lo largo del trabajo experimental de la presente Tesis fueron adquiridas directamente de la American Type Culture Collection (ATCC) y son: células epiteliales de riñón de mono verde africano (Vero) y células semejantes a fibroblastos de riñón de mono verde africano (COS-1, CRL-1650, Manassas, VA 20108, USA). Las células se mantuvieron a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂, utilizando el medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco). Para el cultivo tanto de la línea celular Vero como de la línea celular COS-1 el medio se suplementó con gentamicina a 100 U/ml (Sigma), L-glutamina a 2 mM (Invitrogen), aminoácidos no esenciales (Invitrogen) y 10% (v/v) de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor (Invitrogen) en el caso de las células Vero y 5% (v/v) en el caso de las células COS-1.

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

3.1.2. Líneas celulares primarias

3.1.2.1. Células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

Las PBMC porcinas se purificaron a partir de sangre recogida directamente en presencia del anticoagulante heparina de litio, mediante un gradiente de densidad sobre Histopaque 1077 (Sigma). Un volumen de 20 ml de sangre diluida a la mitad en PBS (10 ml de sangre y 10 ml de PBS) se depositó suavemente sobre un volumen de 7 ml de Histopaque 1077 y, tras su centrifugación durante 30 minutos a 400 x g sin aceleración ni freno, se pudo recoger la interfase formada entre el plasma y el Histopaque 1077, conteniendo las PBMC. Después de centrifugar las células durante 10 minutos a 400 x g, se lisaron los eritrocitos que pudieran haber sido recogidos junto con las PBMC añadiendo 3,5 ml de agua destilada estéril durante 30 segundos, transcurridos los cuales se recuperó el equilibrio osmótico añadiendo 9 ml de cloruro sódico (NaCl, Merk) al 3,5%.

A continuación, las PBMC se lavaron dos veces utilizando el medio de cultivo del Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI, Sigma) suplementado con penicilina a 100 UI/ml (Invitrogen),

estreptomicina a 100 µg/ml (Invitrogen), L-glutamina a 2 mM (Invitrogen) y 10% (v/v) de SFB inactivado por calor (Invitrogen), para convertirlo en medio completo.

Finalmente, las PBMC fueron contadas en una cámara de Neubauer tras la exclusión de viabilidad con azul tripano (Sigma) y resuspendidas en medio RPMI 1640 completo a una concentración de 10^6 células/ml.

3.1.2.2. Macrófagos alveolares porcinos (MAP)

Inmediatamente tras el sacrificio de los cerdos, se extrajeron los pulmones completos en condiciones de máxima esterilidad para seguidamente proceder a la obtención de los MAP.

Para ello se realizaron tres lavados pulmonares consecutivos con 250 ml de PBS suplementado con gentamicina a 1 µg/ml (Sigma) cada uno de ellos. En cada lavado el PBS se administró a través de la tráquea del animal con la ayuda de un embudo estéril y se masajearon los lóbulos del pulmón con suavidad durante 5 minutos, para a continuación volcar el PBS contenido del pulmón en un recipiente estéril. Una vez tuvimos todo el volumen de PBS junto con las células recuperadas de los lavados, se realizaron dos centrifugaciones de 10 minutos a 400 x g y se procedió al recuento de los MAP el cual se realizó en una cámara de Neubauer tras la determinación de viabilidad con azul tripano. Los MAP se conservaron a largo plazo a -150°C a una concentración de 50×10^6 células/ml en medio de congelación.

3.2 Aislados virales y métodos de titulación utilizados

3.2.1. Aislados del VPPA utilizados

Para las infecciones experimentales *in vivo* se utilizaron los aislados virulentos E75, BA71 y Georgia07. Las cepas virulentas BA71 y E75 fueron aisladas en los brotes ocurridos en España en 1971 y 1975, respectivamente, y amplificadas en leucocitos porcinos. La cepa virulenta Georgia07 fue amablemente cedida por la Dra. Linda Dixon de The Pirbright Research Institute (UK).

3.2.2 Titulación del VPPA mediante la técnica de la hemadsorción

La capacidad hemaglutinante de los aislados virales aquí utilizados permitió titular los virus utilizando la técnica de la hemadsorción. Primeramente, se cultivaron MAP un mínimo de 3 horas antes del ensayo, en placas de 96 pocillos (Biolite), a una concentración de 400.000 células/pocillo. Para la titulación, se dispensó cada muestra directamente sobre los MAP para, a continuación, realizar diluciones seriadas en base 10 (6 réplicas por muestra). Transcurridas 18 horas tras la infección se dispensaron 20 µl de sangre de cerdo diluida 1:100 en PBS como

fuelle de eritrocitos (Argilaguet *et al.*, 2011). Cada 24 horas se observó la evolución de la aparición de las típicas “rosetas” de eritrocitos en cada pocillo, imagen típica del fenómeno de hemadsorción (Figura 9) (Malmquist and Hay 1960). El título viral se calculó teniendo en cuenta la última dilución en la que se observaba el efecto hemadsorbente en el 50% de los pocillos, viniendo así definido en forma de unidades hemadsorbentes por mililitro de muestra (UHA₅₀/ml) (Reed & Muench, 1938).

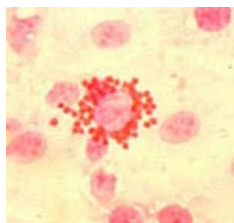


Figura 9: Imagen típica de la hemadsorción en la que se observa la adhesión de eritrocitos a la superficie de los MAP infectados por el VPPA.

3.2.3. Titulación del VPPA mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)

La utilización de métodos moleculares de detección facilitó la cuantificación de virus a partir de un gran número de muestras, como es el caso de los sueros e hisopos nasales obtenidos a lo largo de las infecciones con VPPA *in vivo*. La extracción de ADN, a partir tanto de 200 µl de suero, como de 200 µl de suspensión de PBS pre-incubado a temperatura ambiente con el hisopo nasal, se realizó mediante el kit NucleoSpin Blood (Macherey-Nagel) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los cebadores fueron diseñados utilizando el Primer Express software (Applied Biosystems) usando como molde el gen de la PK del VPPA (R298L) (Lacasta *et al.*, 2014). Tras la reacción de amplificación, se genera un fragmente de 85 pb.

Las reacciones de amplificación se realizaron por duplicado en un volumen final de 20 µl, conteniendo: 2 µl de muestra, 900 nM de cada cebador y 10 µl de Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), usando el ABI 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems) y siguiendo las siguientes condiciones: 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. El análisis incluye una curva de disociación que nos permite discriminar los dímeros de cebadores de las amplificaciones específicas (Ririe *et al.*, 1997). Las placas utilizadas fueron las MicroAmp™ Fast Optical 96-well Reaction Plate (Applied Biosystems).

La curva estándar y la cuantificación de la misma fue realizada mediante la amplificación de un fragmento de 891 pb del gen de la PK del VPPA usando la pareja de cebadores PK-F2 y PK-R2

(Lacasta *et al.*, 2014). El producto de la PCR fue purificado de un gel de agarosa mediante la utilización del kit NucleoSpin extract II (Macherey-Nagel), y cuantificado gracias al espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Products). Para la obtención de la curva estándar, se utilizaron diluciones seriadas desde 2 a 2×10^9 copias del gen. El límite de detección del ensayo se situó en 2 moléculas del producto de PCR utilizado como estándar ADN (Lacasta *et al.*, 2014). Los resultados se expresaron en Log10 de las copias genómicas equivalentes por mililitro (CGE/ml) de suero o bien en Log10 de las CGE/ml de contenido nasal en hisopo. En este caso, el límite de detección del ensayo fue de 10^3 CGE/ml (ó 1 CGE/ml).

Los resultados de la RT-qPCR mostraron una pendiente del 0,98 en correlación con los resultados obtenidos para suero por la técnica validada por la OIE que es la hemadsorción, indicando una relación 1:1 (1 CGE es equivalente a una UHA).

3.2.4 Titulación del VPPA mediante la técnica de formación de placas de lisis

Con el objetivo de cuantificar *stocks* virales crecidos en COS-1, se utilizó la técnica de formación de placas de lisis. Esta técnica clásica se basa en crecer el virus sobre monocapas de células en medio semisólido para observar la aparición de placas de lisis provocadas como consecuencia del efecto citopático del VPPA (Hurtado *et al.*, 2010) (Figura 10). Se comienza sembrando 100.000 células COS-1 por cada pocillo de una placa de 24 pocillos (Nunc), en un volumen final de 500 μ l de DMEM completo con 5% de SFB. Una vez mantenidas en cultivo durante 12-18 horas (O/N), las células se infectan con diluciones seriadas del virus (1:10) en un volumen de 150 μ l, permitiendo la adsorción del virus durante 2 horas a 37°C balanceando la placa cada 15 minutos para que la adsorción de virus se produzca de forma adecuada.

Transcurridas las 2 horas de incubación se retiró el inóculo y se lavó con PBS cada pocillo una vez, seguidamente se añadió 1 ml por pocillo de la mezcla 1:1 de agar noble al 1,4% en agua y medio DMEM 2x completo (5% SFB). Una vez solidificado, se añadió una gota de medio sobre la mezcla de agar solidificado para evitar que se seque. Se incubó a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ durante 3 a 6 días hasta que se observaron las placas de lisis formadas por el virus, momento en el cual se tiñeron las placas con cristal violeta al 2% en formaldehído al 5%, añadiendo 500 μ l de dicha solución sobre el agar e incubando durante toda la noche a temperatura ambiente, para finalmente retirar la tinción y los bloques de agar con agua corriente. Una vez secas, se realizó el recuento de las placas de lisis formadas, expresando los resultados de la titulación en unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/ml). De nuevo, la concordancia entre las técnicas permite asumir que 1 UFP equivale a 1 UHA o a 1 CGE.

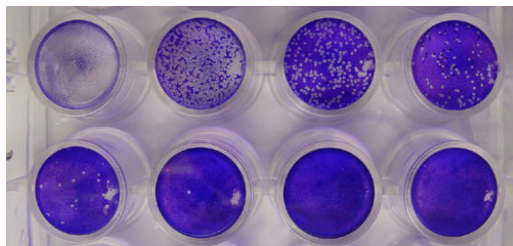


Figura 10: Placas de lisis formadas por el VPPA sobre células COS-1 tras 4 días de infección una vez fijadas y teñidas las células. El primer pozo corresponde al stock viral sin diluir, y el resto son diluciones seriadas en base 10. Se observa la progresiva disminución del número de placas a lo largo de las diluciones.

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

La producción de grandes cantidades de virus se realizó en botellas de vidrio 1 litro de volumen, previamente tratadas con hipoclorito al 5%, lavadas con jabón alcalino y posteriormente esterilizadas. Para el cultivo celular, las botellas se mantuvieron en un incubador a 37°C y en una atmósfera con CO₂ (las botellas se gasean individualmente antes de ser cerradas y selladas con parafilm) girando a razón de 1 vuelta por minuto en un *roller* (Hotpack incubator, Hotpack Corporation. California, USA) para favorecer su adhesión a las paredes de la botella. Cada botella se sembró con 40x10⁶ células COS-1, de modo que la botella tuviera una confluencia celular de 80% en un volumen de 50 ml de DMEM suplementado con 5% SFB. Finalmente, las células se infectaron con una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1 del virus correspondiente hasta observar un efecto citopático prácticamente completo (3-4 días).

Todos los experimentos de vacunación con VPPA recombinantes han sido realizados utilizando preparaciones de virus extracelular, obtenidas como a continuación se describe brevemente.

Las células infectadas se recogen junto al medio y se centrifugan a baja velocidad, 10 minutos a 1200 x g y 4°C, descartando el pellet y las células que en el se encuentran y recuperando únicamente el sobrenadante, con el que se continúa preparando un stock de virus extracelular. Para ello, el sobrenadante se centrifuga en una centrifuga Sorvall RC-5 utilizando un rotor SG3, durante 6 horas a 8500 rpm y a 4°C. Finalmente, el *pellet de alta* se hidrató con PBS en un volumen 10 veces menor que el original y tras 24 horas de incubación a 4°C se resuspendió de forma homogénea, alicuoteándose en pequeños volúmenes para posteriormente determinar el título viral mediante el ensayo de formación de placas de lisis.

En el caso de la preparación de stock virales de virus inducibles, el procedimiento es el mismo, la única diferencia es que es necesario añadir al medio de cultivo el inductor IPTG a una concentración final de 500 µM.

3.3 Manipulación genética del aislado virulento BA71 del VPPA

3.3.1 Generación de los virus inducibles BA71.ΔTK.pp220i, BA71.ΔCD2.pp220i y BA71. ΔCD2.PKi

La obtención de VPPA inducibles se basa en la utilización de estrategias originalmente desarrolladas para caracterizar la función de genes estrictamente esenciales para el crecimiento del virus, para los que resultaba imposible obtener virus defectivos.

Así pues, la técnica consiste en la generación de virus modificados por recombinación homóloga, capaces de expresar un gen de manera inducible dependiendo de la presencia de una molécula inductora en el medio o no, pudiendo de este modo controlar a nuestro antojo la expresión o silenciamiento del gen.

Los virus recombinantes inducibles disponibles en el laboratorio generados para los estudios de morfogénesis, se habían obtenido a partir de la cepa atenuada BA71V, cepa no patogénica adaptada al crecimiento en células Vero y que, según ciertos autores, es incapaz de infectar macrófagos porcinos (Zsak *et al.*, 2001). Por ello, decidimos basar nuestras vacunas en virus derivados de la cepa virulenta BA71 por presentar varias ventajas:

- Primero, el genoma viral está completamente secuenciado (Rodríguez *et al.* 2015, enviado) y reveló una gran similitud con BA71V (Yáñez *et al.*, 1995), pudiendo utilizar las mismas herramientas empleadas para la generación de virus recombinantes basados en BA71V.
- Segundo, y en contraste con otras cepas virulentas de VPPA, BA71 es capaz de crecer y formar placas de lisis en células COS-1, una línea celular que puede ser transfectada con gran eficiencia (Hurtado *et al.*, 2010) facilitando la construcción y purificación de virus inducibles recombinantes.

Así pues, partiendo del virus virulento BA71, el sistema de expresión inducible insertado en su genoma se basó en el sistema represor/operador del operón lac de *E.coli*, exigiendo dos pasos de recombinación consecutivos. En una primera fase, se sustituyó un gen prescindible (en nuestro caso el gen de la TK o el gen CD2v) por el *cassette* de represión y selección. Dicho *cassette* está formado por el gen lac I del represor Lac, bajo el control del promotor viral temprano/tardío pU104 y, como marcador de selección, el gen de la β-glucuronidasa (β-gus) bajo el control del promotor viral p72. Mediante la introducción del *cassette* se elimina la expresión de la TK o del CD2v y nos permite seleccionar los recombinantes por su coloración azul en presencia del sustrato X-gluc. Los virus resultantes: BA71.ΔTK y BA71.ΔCD2 no expresan la TK o el CD2v, respectivamente.

En una segunda fase, estos virus recombinantes se utilizaron como molde para obtener virus dobles recombinantes inducibles para los genes esenciales que codifican la poliproteína pp220 (CP2745L), o la PK, en este caso sustituyendo el promotor original de estos genes por el promotor inducible p72.I, formado por el promotor viral tardío p72.4 y la secuencia del operador O del operón Lac de *E. coli*.

Para permitir la identificación de los virus recombinantes inducibles, estos vectores poseen, además, el marcador *lac Z* que codifica para el enzima β -galactosidasa (β -gal), el cual se encuentra bajo el control del promotor tardío del gen de la proteína p72 del VPPA. Los pasos necesarios para la generación del inducibles están descritos originalmente en el trabajo de García-Escudero y colaboradores (García-Escudero *et al.*, 1998).

Es importante tener en cuenta que los virus recombinantes inducibles son dobles recombinantes con 2 marcadores: β -gus y β -gal, además de un represor el cual, en ausencia de IPTG, se unirá a la región operadora existente en un segundo *locus* del genoma, evitando su expresión. Por ello, el crecimiento de los virus inducibles siempre tiene que realizarse en presencia de una determinada concentración de IPTG.

Profundizando en el proceso de obtención de los virus inducibles, como ya hemos comentado, el primer paso fue la introducción del *cassette* de represión y selección en el genoma viral en sustitución de un gen prescindible para el virus, que en nuestro caso se trató del gen de la TK y del gen CD2v, obteniéndose de este modo los virus intermedios BA71. Δ TK y BA71. Δ CD2 los cuales contienen la secuencia del represor *lacZ* y de la β -gus bajo el control de promotores virales. El plásmido utilizado para la obtención del BA71. Δ TK está descrito en el trabajo de García-Escudero y colaboradores (García-Escudero *et al.*, 1998), mientras que el plásmido utilizado para la construcción del BA71. Δ CD2 (pLacI. Δ CD2) se detalla en la figura 11 y el proceso seguido para su obtención se describe a continuación.

Para obtener el plásmido pLacI. Δ CD2 primeramente se generaron por PCR dos fragmentos de ADN sintético utilizando como molde el ADN viral. El primer fragmento contenía la secuencia flanqueante izquierda al gen del CD2v que incluye los genes EP152R y EP153R y se obtuvo gracias al uso de la pareja de cebadores J059 y J060 (Figura 12) que amplificaron un fragmento de 1052 pb. Para la secuencia flanqueante derecha, que incluye parte del gen EP364R, se utilizaron los cebadores J061 y J062 (Figura 12) obteniéndose un producto de 1020 pb tras la amplificación. A continuación se digirieron con los enzimas adecuadas dichos fragmentos así como el plásmido LacI.10T. β GUS.10T (plásmido generado por García-Escudero y colaboradores en 1998 a partir del vector de clonación pJET1.2), y se utilizó el Gibson Assembly Clonig Kit

(NEB) para finalmente generar el plásmido pLacI.ΔCD2. La secuencia de este plásmido fue comprobada previamente a su utilización mediante secuenciación.

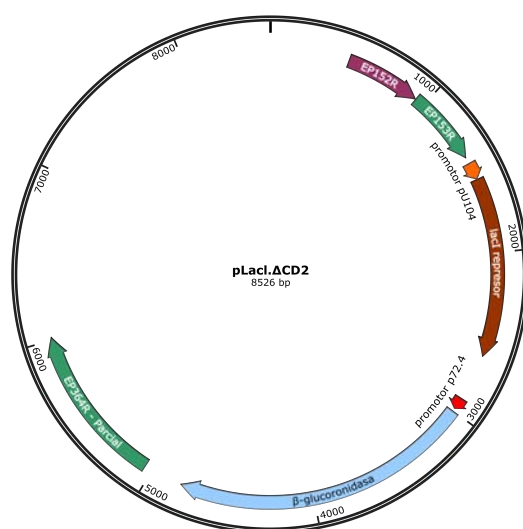


Figura 11: Representación esquemática del plásmido pLacI.ΔCD2 empleado para la obtención del mutante de delección BA71.ΔCD2.

	Secuencia (5'→3')
J059	GATGGCTCGAGTTTTTCAGCAAGATCTCGACGTAATAACATTTTACACG
J060	CCGTCGAGGGTACCGAGCTCGAATTACATATTGTTTAATTTATCATTATTTACCA
J061	TAGAGTCGAGTTTTTTTTTTCAGCTAATATTTTCGCTTATTCATGTAGATAG
J062	ATTGTAGGAGATCTTCTAGAAAGATCTTCATTCCCACTTAATCGT

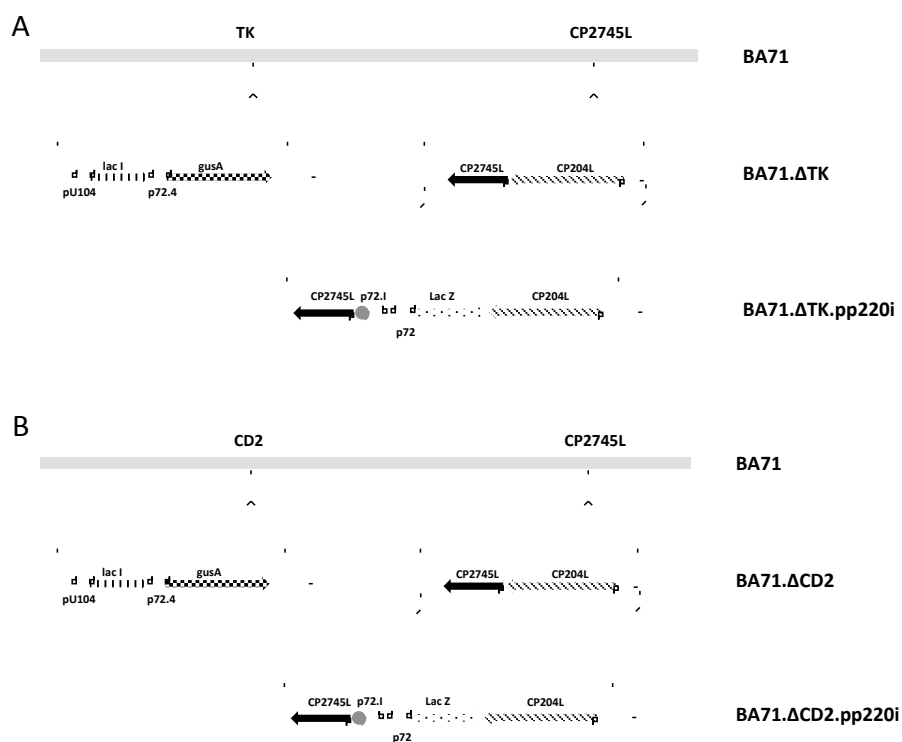
Figura 12: Tabla resumen de los cebadores utilizados para la construcción del pLacI.ΔCD2.

En cada caso, y una vez obtenidos los plásmidos de transferencia, 500 ng de cada plásmido se utilizaron para transfectar independientemente 100.000 células COS-1 (sembradas el día anterior), utilizando lipofectamina (Invitrogen) y siguiendo las indicaciones del fabricante. Tras las 3 horas de transfección, las células transfectadas se infectaron con el virus BA71 a una MOI de 3, facilitando así la recombinación homóloga entre el plásmido de interés y el genoma viral. Una vez el efecto citopático fue total, la mezcla resultante se utilizó para realizar una nueva infección en monocapa y el virus recombinante resultante se aisló y purificó mediante sucesivos plaques en presencia de X-gluc, el sustrato específico de la enzima β-gluc, utilizado a una concentración final de 300 μg/ml durante 24 horas. Las placas de lisis provocadas por los

virus recombinantes se tiñeron específicamente de azul facilitando su visualización en contraste con las placas de lisis del virus parental (*wild type*) que lógicamente fueron incoloras. La selección de placas de lisis azules se realizó utilizando bien una pipeta pasteur o bien con una punta amarilla con la pipeta p100-p200, aspirando tanto las células infectadas como la columna de agar correspondiente, depositándola sobre en un eppendorff con 0,5 ml de medio DMEM completo. Finalmente, la incubación durante la noche a 4°C facilitará la difusión del virus en el medio y su posterior plaqueo en una segunda ronda de purificación siguiendo exactamente el mismo procedimiento. Tras cuatro o cinco rondas de plaqueo y una vez asegurada la pureza del virus recombinante, confirmada por PCR (demostrando la ausencia del gen a deleccionar) se da por finalizado el proceso.

El siguiente paso fue generar los plásmidos de transferencia necesarios para la introducción del *cassette* de inducción; en ambos casos, el *cassette* permite sustituir los *locus* originales de la pp220 y PK (en cada caso) por secuencias idénticas pero bajo el control del promotor inducible. El plásmido de transferencia utilizado para la obtención del virus inducible de la pp220 se basó en el plásmido pIND2, mientras que el virus inducible para la PK se obtuvo utilizando el plásmido pIND3 (García-Escudero *et al.*, 1998), ambos diseñados inicialmente para obtener BA71V inducibles.

La figura 13 muestra un esquema del genoma viral de los mutantes resultantes, fácilmente identificables por plaqueo tras crecer los virus en presencia del sustrato de la β -gal, X-gal, a una concentración de 300 μ l/ml en todos los casos.



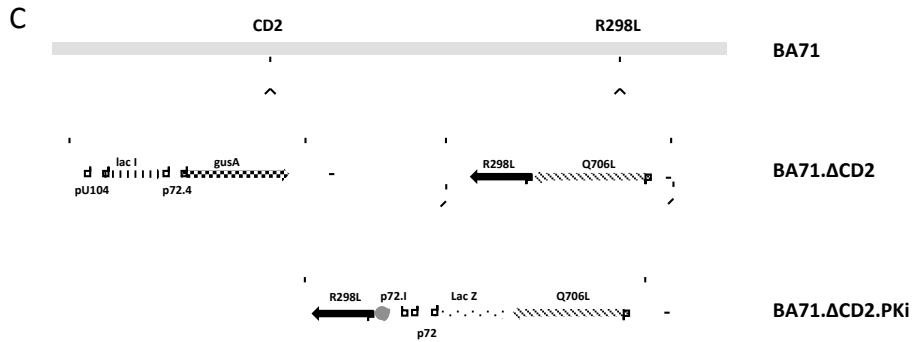


Figura 13: Representación esquemática del genoma de los virus inducibles (A) BA71.ΔTK.pp220i, (B) BA71.ΔCD2.pp220i y (C) BA71.ΔCD2.PKi.

3.3.2 Caracterización *in vitro* de los virus inducibles

3.3.2.1 Cuantificación de la inducción y represión de la PK por Western Blotting

Para realizar los estudios de caracterización de la expresión inducible de la PK se partió de monocapas de células COS-1 infectadas a una MOI de 1 del virus inducible BA71.ΔCD2.PKi en presencia o en ausencia de 500 μM de IPTG, utilizando células infectadas con el virus parental BA71 y células sin infectar como controles. Transcurridas 18 hpi, las células se lavaron con PBS para eliminar el exceso de medio y se lisaron en TNT (Tris-HCL 20mM pH 7,5, NaCl 200mM, Tritón X-100 al 1%) al que se le añadió una mezcla de inhibidores de proteasas al 10% (cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche), las muestras se mantuvieron a 4°C durante 15 minutos y se congelaron a -20°C.

Finalmente, las muestras se resuspendieron en tampón de muestra SDS 2X (Tris-HCl 0,5M al 0.4% SDS pH 6,8, Glicerina al 20%, SDS al 4%, 2-Mercaptoetanol al 0,2% y azul de bromofenol al 0.02%) se hirvieron 3 minutos y se cargaron a razón de 30 μg por pocillo en un gel de poliacrilamida al 12%, previamente los extractos fueron cuantificados mediante Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Las muestras se corrieron en el gel de poliacrilamida a 30 mA y al finalizar la electroforesis se transfirieron del gel a membranas de nitrocelulosa (100 V durante 70 minutos), utilizando un sistema Mini Protean II (BioRad).

Para la inmunodetección, se incubó la nitrocelulosa con el anticuerpo primario correspondiente en PBS-T (PBS con Tween-20 al 0.2 %) al 1% de leche durante toda la noche a 4°C y en agitación. Los anticuerpos primarios utilizados fueron un policlonal de conejo anti-p72 utilizado a una dilución 1/1.000 (Andrés *et al.*, 2001a) y un anticuerpo específicamente generado contra la PK tras la inmunización con el péptido KRENYIPENISETGK de la PK (aa 236-250), seleccionado por la empresa (Eurogentec) y utilizado a una dilución 1/200. A continuación, las membranas se lavaron y se incubaron con el anticuerpo secundario Anti-

Rabbit IgG acoplado a peroxidasa (dilución 1/10.000, NIF 824; GE Healthcare) durante 1 hora en PBS-T al 1% de leche. La detección de las proteínas con luminol se realizó utilizando el sistema ECL (Thermo scientific), de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

3.3.2.1 Caracterización fenotípica del BA71.ΔCD2.PKi por microscopia electrónica

Las células COS-1 infectadas con el virus parental BA71 y con el virus recombinante inducible BA71.ΔCD2.PKi en presencia o en ausencia de IPTG, se fijaron a las 20 horas tras la infección con glutaraldehído al 8% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación las muestras se lavaron con tampón cacodilato sódico, pH 7,2 y se post-fijaron con tetróxido de osmio (BioRad) al 1% en PBS durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente, las muestras se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol (del 30% al 100%) y se incluyeron en resina Epon 812 (Fluka), según el protocolo convencional (Glauert, 1975). Seguidamente se obtuvieron cortes de 80-100 nm y las preparaciones fueron contrastadas con acetato de uranilo al 2% antes de su examen al microscopio electrónico.

3.4. Ensayos *in vivo*

3.4.1. Animales y diseño experimental de los ensayos de inmunización e infección

En todos los experimentos con cerdos se emplearon machos de 6-8 semanas de edad del cruce Landrace x Large White (cerdos convencionales en nuestras granjas). Todos los experimentos se realizaron en nuestras instalaciones de alta seguridad biológica de nivel 3 plus (BSL3+) en el CReSA siguiendo las normas de ética y bioseguridad aprobadas por los Comités correspondientes de la UAB.

Todas las inoculaciones se hicieron por vía intramuscular en los músculos tabloides del cuello utilizando 1 ml de volumen conteniendo la dosis adecuada de virus recombinante diluido en PBS. La práctica totalidad de los experimentos consistió en una dosis única de inmunización con la única excepción del experimento de vacunación con BA71.ΔTK.pp220i en el que se administraron dos dosis, intercambiando el lado del cuello donde se realizaba la inmunización. Las infecciones con dosis letales de cepas virulentas de VPPA: BA71, E75 y Georgia07 se realizaron utilizando 20 dosis letales cincuenta (20LD₅₀) calculadas con mayor o menor precisión en experimentos piloto usando distintas dosis.

La dosis final utilizada para cada virus fue de 10³ para BA71 y Georgia07 y de 10⁴ de E75 en 1 ml de PBS y se inocularon de nuevo en el músculo del cuello pero en el lado opuesto al de la última inmunización realizada. La dosis seleccionada permite asegurar la homogeneidad de la infección dentro de cada grupo, incluyendo el momento de aparición de viremia, las cinéticas

observadas en cuanto a viremia, síntomas de enfermedad y muerte, facilitando la comparativa entre los grupos vacunados y no vacunados.

En cada sección correspondiente de los resultados se incluye un diagrama con el diseño experimental, los grupos de inmunización, los intervalos entre inmunización e infección, así como las tomas de muestra realizadas: sangre y suero obtenidos de vena cava para seguir la viremia, la inducción de anticuerpos o la respuesta celular específicamente inducida, hisopos nasales para seguir la excreción viral, así como diversas muestras de tejido tras la necropsia.

3.4.2 Seguimiento clínico de la PPA

Tanto tras la inoculación con los VPPA recombinantes como tras la infección con dosis letales de las cepas virulentas de VPPA, los animales fueron observados diariamente para determinar de forma cuantitativa (escala de 0 a 4) la aparición de los siguientes signos clínicos característicos de PPA aguda: temperatura rectal, cianosis, diarrea, hemorragias, postración y pérdida de apetito. Siguiendo los protocolos éticos establecidos, los animales fueron sacrificados en el mismo momento en el que la progresión de la enfermedad imposibilitaba la vida sin sufrimiento, para inmediatamente realizar la necropsia completa, incluyendo la valoración de las lesiones macroscópicas y microscópicas de los distintos órganos, siguiendo protocolos descritos por Galindo-Cardiel y colaboradores (Galindo-Cardiel *et al.*, 2013).

3.4.3 Cinética cuantitativa de la carga viral en sangre y en hisopos nasales

La cuantificación de la viremia se realizó a través de RT-qPCR según se ha detallado previamente. Remarcar que la extracción de ADN se realizó a partir de 200 µl tanto en el caso de las muestras de suero como de las de suspensión de PBS pre-incubado a temperatura ambiente con hisopos nasales, y que se utilizaron unos cebadores específicos frente a la PK del VPPA (Lacasta *et al.*, 2014).

Las reacciones de amplificación se realizaron por duplicado en un volumen final de 20 µl, conteniendo: 2 µl de muestra, 900 nM de cada cebador y 10 µl de Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), usando el ABI 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems) y siguiendo las siguientes condiciones: 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. Las placas utilizadas fueron las MicroAmp™ Fast Optical 96-well Reaction Plate (Applied Biosystems). Los resultados se expresaron como Log₁₀ de las CGE/ml de suero o bien de contenido nasal en hisopo.

3.4.4. Valoración de la respuesta inmunológica

3.5.4.1 Detección de anticuerpos frente al VPPA mediante un ELISA específico

Para determinar la presencia de anticuerpos específicos frente al VPPA en el suero de cerdos vacunados y/o infectados, utilizamos un ELISA de tipo indirecto empleando un antígeno soluble obtenido a partir de células infectadas con VPPA (OIE, 2012), generosamente facilitado por la Dra. Gallardo del CISA-INIA. Cada pocillo de una placa de 96 pocillos de alta capacidad de captura (Multiwell96 HighBinding-Nunc) se tapizó durante 12 horas a 4°C con 100 µl del antígeno a una concentración de 5 µg/ml diluido en tampón carbonato-bicarbonato 0.05 M pH 9,6 (Merk). Tras lavar 3 veces la placa con PBS suplementado con Tween 20 al 0,05% (v/v, Sigma), la reacción se bloqueó durante 1 hora a 37°C con 200 µl de PBS suplementado con 2% (p/v) de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma). Los sueros porcinos diluidos 1/200 se incubaron durante 1 hora a 37°C y, tras los lavados correspondientes, se añadió el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa (α -IgG de cerdo diluido 1:20.000, 0,05 µg/ml, Serotec), incubando la reacción durante 1 hora a 37°C. Tras los últimos lavados, las reacciones se revelaron utilizando 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina soluble (TMB, Sigma) como sustrato y se pararon añadiendo ácido sulfúrico 1 N (Merk). Los resultados obtenidos para cada punto fueron representados como la absorbancia obtenida para cada pocillo a una longitud de onda de 450 nm (λ_{450}).

3.4.4.2. Detección de respuesta celular específica frente al VPPA

Del mismo modo que los anticuerpos específicos se detectan directamente en suero, la respuesta T-específica se midió utilizando PBMC obtenidas a distintos tiempos tras la inoculación con cepas atenuadas o virulentas del VPPA. El método estándar utilizado para medir la respuesta celular específica fue el ensayo de puntos por inmuoabsorción ligado a enzima o ELISPOT, complementando en ocasiones los experimentos con un ensayo de proliferación celular.

3.4.4.2.1. ELISPOT para la detección de células T específicas secretoras de IFN- γ

Una vez obtenidas las PBMC porcinas, se determinó la frecuencia de células específicas secretoras de IFN- γ presentes en sangre, mediante un ELISPOT (Díaz and Mateu, 2005) tras la vacunación y/o la infección. Para ello, se tapizaron placas de 96 pocillos Costar 3590 (Corning) con 50 µl/pocillo del anticuerpo α -IFN- γ porcino (clon P2G10, BD Pharmingen) a una concentración de 5 µg/ml en tampón carbonato-bicarbonato (pH 9,6) durante 18 horas a 4°C. Tras lavar 3 veces con PBS suplementado con Tween 20 al 0,05% (v/v) y bloquear las placas con medio RPMI 1640 completo durante 1 hora a 37°C, se sembraron 500.000 PBMC en cada

pocillo en un volumen final de 200 μ l/pocillo, bien en ausencia o bien en presencia de los estímulos específicos. Como estímulos específicos se usaron 10^5 UHA₅₀ de las cepas vivas virulentas E75, BA71 y Georgia07 y también la cepa viva atenuada BA71. Δ CD2.

En ocasiones las PBMC fueron adicionalmente estimuladas con péptidos de 9 aminoácidos previamente descritos en el laboratorio como epítomos CTL con capacidad protectora, o bien con una mezcla de péptidos diseñados *in silico* como potenciales epítomos y correspondientes a tres de las proteínas más inmunogénicas del VPPA; cada uno de ellos a una concentración de 4 μ g/ml.

Como control positivo del ensayo siempre se utilizó fitohemaglutinina (PHA, Sigma) a 10 μ g/ml y como control negativo se utilizó medio RPMI 1640. Los ensayos se realizaron por duplicado. Tras 20 horas de estimulación a 37°C en atmósfera húmeda con el 5% de CO₂, las células se retiraron, las placas se lavaron con Tween 20 al 0,05% (v/v) en PBS, para finalmente proceder a realizar una inmunotinción. Para ello se dispensaron 50 μ l por pocillo de un anticuerpo α -IFN γ porcino biotilado (clon P2C11, BD Pharmingen), con especificidad distinta al utilizado anteriormente para tapizar las placas, a una concentración final de 0,5 μ g/ml diluido en Tween 20 al 0,05% (v/v) en PBS con BSA al 0,5%. Tras 1 hora de incubación a 37°C, se añadió estreptavidina-peroxidasa (Biosource) diluida a 0,5 μ g/ml, siendo incubada 45 minutos a 37°C. Para revelar la reacción se utilizó TMB insoluble (Calbiochem) y para pararla las placas se lavaron con agua.

Los resultados, una vez sustraídos los valores obtenidos de los pocillos del control negativo (solamente medio de cultivo celular) se representan como el número de células específicas secretoras de IFN- γ por cada millón de PBMC (CS-IFN- γ /millón PBMC). Los fondos (spots en los pocillos controles negativos) no alcanzaron en ningún caso la decena.

3.4.4.2.2. Linfoproliferación y caracterización fenotípica de los linfocitos T específicos mediante citometría de flujo

El ensayo de linfoproliferación utilizado se basa en la capacidad de las PBMC de teñirse homogéneamente con Carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE, Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit, Invitrogen), marcador fluorescente que permite seguir el número de divisiones de las células por citometría de flujo a lo largo del tiempo, ya que con cada replicación, la fluorescencia de cada célula se reduce a la mitad. El procedimiento a seguir de manera resumida es el siguiente, las PBMC se pasan a través de un filtro de Nylon de 70 μ m (BD Falcon) para evitar posibles agregados celulares y a continuación 10^7 células resuspendidas en

1 ml de PBS al 5% SFB previamente atemperado, se marcaron con 1 μ l de CFSE 5mM y, tras mezclar bien, se incubaron estrictamente 5 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Seguidamente, se añadió por la pared del tubo 10 ml de PBS al 5% SFB frío (en hielo). Se centrifugó 6 minutos a 290 x g, se descartó el sobrenadante y tras realizar dos lavados más el sedimento finalmente se resuspendió en medio RPMI 1640 sin SFB para posteriormente volver a contar las células viables mediante una tinción con azul tripano. Las células así preparadas están listas para realizar la estimulación específica como a continuación se describe: 2×10^6 células en 500 μ l de RPMI 1640 completo (10% SFB), fueron incubadas en tubos falcon de 15 ml con los estímulos adecuados: Medio, PHA o VPPA (10^5 UHA₅₀ de E75 o BA71), durante 30 minutos a 37°C, 5% CO₂ y en atmósfera húmeda, para posteriormente centrifugar a 290 x g durante 5 minutos y volver a incubar, en este caso 90 minutos, en atmósfera húmeda a 37°C y 5% CO₂ sin haber resuspendido el pellet. Posteriormente, el pellet se resuspendió en el sobrenadante con una pipeta para ser transferido a un pocillo de una placa de 48 pocillos; finalmente se añadió medio RPMI 1640 completo hasta un volumen final de 1 ml y se incubó durante 5 días a 37°C y 5% CO₂ en atmósfera húmeda.

Una vez finalizada la estimulación, la viabilidad celular se comprobó con LIVE/DEAD Fixable Violet Dead Cell Strain Kit (Invitrogen) y las PMBCs se marcaron con el marcador de superficie anti-CD8-AlexaFluor647 (clon 76-2-11) y/o anti-CD4a-PerCP-Cy5.5 (clon 74-12-4) (BD Pharmingen). El fenotipo de las células que específicamente proliferan en respuesta a cada cepa de VPPA se pudo seguir por citometría de flujo en un FACS Aria I (BD) utilizando los filtros adecuados.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterización del potencial vacunal de VPPA inducibles

4.1.1 Generación de virus mutantes: no es lo mismo *in vitro* que *in vivo*

Como ya hemos contado en la Introducción, la generación de virus recombinantes, bien deficientes en genes o fragmentos de genes concretos o bien inducibles en genes esenciales, ha facilitado comprender numerosos eventos clave en la biología del VPPA. Los primeros VPPA recombinantes descritos en la literatura se generaron a partir de la cepa BA71V (García-Escudero *et al.*, 1998; Rodríguez *et al.*, 1996), siendo ésta también la primera cepa de VPPA secuenciada completamente (Yáñez *et al.*, 1995). Los datos de secuencia de BA71V facilitaron a su vez la obtención de un gran número de virus de delección por recombinación homóloga, así como la práctica totalidad de los virus inducibles descritos en la Introducción, incluyendo el virus BA71V.ΔTK.pp220i. Como ya se adelantó, BA71V.ΔTK.pp220i es un virus inducible para la poliproteína pp220, esencial en las etapas tardías de la morfogénesis, y que, tras infectar células Vero en condiciones de represión (sin IPTG), produce cápsidas virales vacías (Andrés *et al.*, 2002) que, según nuestra hipótesis de partida, podrían resultar un inmunógeno ideal.

Desafortunadamente, este y todos los recombinantes disponibles en el laboratorio habían sido obtenidos a partir de la cepa BA71V, que, debido a su adaptación y progresivo pase en células Vero (Enjuanes *et al.*, 1976; García-Barreno *et al.*, 1986), había perdido totalmente su capacidad para infectar el cerdo (Esparza *et al.*, 1988) coincidiendo con la considerable pérdida de información genética observada (Yáñez *et al.*, 1995) e inutilizándolos completamente para su utilización *in vivo* como potenciales vacunas (simplemente recordar que las vacunas inactivadas no funcionan, exigiendo un cierto grado de replicación a las mismas para ser eficientes).

Más recientemente se ha podido demostrar que virus virulentos, entre los que se encontraba el aislado virulento BA71 original, eran capaces de replicar y formar placas de lisis en células COS-1 sin necesidad de adaptación (Hurtado *et al.* 2010), reduciéndose así la posibilidad de atenuación, como intentaremos demostrar con el primer experimento realizado durante esta Tesis Doctoral.

4.1.2 BA71 no pierde virulencia en células COS-1

Para intentar mimetizar el número de pases que se necesita para obtener un virus recombinante inducible, el aislado BA71 se utilizó para infectar células COS-1 realizándose así 10 pases seriados antes de obtener el stock viral con el que se realizó el experimento *in vivo*.

Con el objetivo de poder realizar la comparativa, el mismo aislado de BA71 se utilizó para preparar un stock viral generado en macrófagos porcinos, diana natural del VPPA.

Para este primer experimento *in vivo* se dispuso de 12 cerdos machos Landrace X Large White de 3 meses de edad distribuidos en 4 grupos como se describe en la Figura 14, según el virus (BA71 vs BA71-COS) y la dosis (10^2 ó 10^4 UHA₅₀) utilizada.

	10^2 UHA ₅₀	10^4 UHA ₅₀
BA71	Cerdos 1-3	Cerdos 4-6
BA71COS	Cerdos 7-9	Cerdos 10-12

Figura 14: Tabla resumen sobre la composición de los diferentes grupos de infección.

La ausencia de referencias recientes sobre la virulencia del aislado original de campo BA71, recomendó realizar un experimento piloto utilizando dos dosis distintas, escogidas a partir de nuestra experiencia utilizando cepas de VPPA contemporáneas a BA71 y aisladas en zonas geográficamente próximas tales como E75 o E70. La inoculación *in vivo* de BA71 tanto utilizando una dosis de 10^4 UHA₅₀ como 100 veces menor (10^2 UHA₅₀) resultó letal, observándose un ligero retraso de un día en las muertes de los animales: registradas entre el día 6 y el 7 post-infección (pi) con dosis altas y entre los días 7 y 8 con dosis bajas (Figura 15). De igual modo, el virus crecido en COS-1 resultó letal a ambas dosis con la salvedad de que mientras a dosis altas (10^4 UHA₅₀) los animales murieron siguiendo una cinética indistinguible a la de los animales infectados con BA71, los animales inoculados con de 10^2 UHA₅₀, comenzaron a morir un día más tarde (a día 8 pi) que los inoculados con la misma dosis de BA71, registrándose la última muerte a día 10 pi.

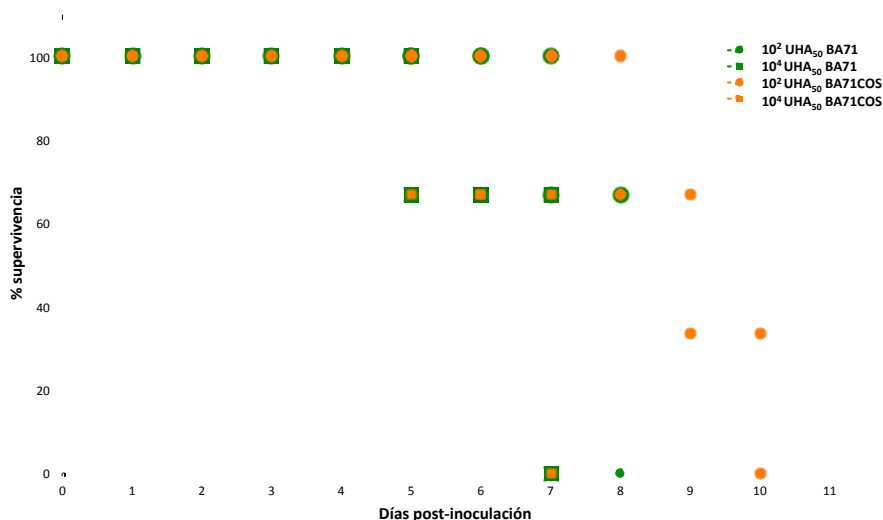


Figura 15: Porcentaje de supervivencia de los cerdos tras la infección con 10^2 UHA₅₀ ó 10^4 UHA₅₀ de BA71 (líneas en verde) o de BA71-COS (líneas en naranja).

Confirmando estas observaciones, la mayoría de los animales infectados con ambos virus, e independientemente de la dosis utilizada, evidenciaron síntomas clínicos de PPA aguda tan temprano como a día 4 pi, incluyendo fiebre (Figura 16) y sucumbiendo entre los día 6 y 8 pi. Las pocas excepciones reseñables, tales como la aparición temprana de síntomas y fiebre en tres de los animales infectados o el retraso en la aparición de los mismos (incluyendo la muerte), afectaron de manera indistinguible a animales infectados por uno u otro virus, imposibilitando definir algún grado de atenuación del virus.

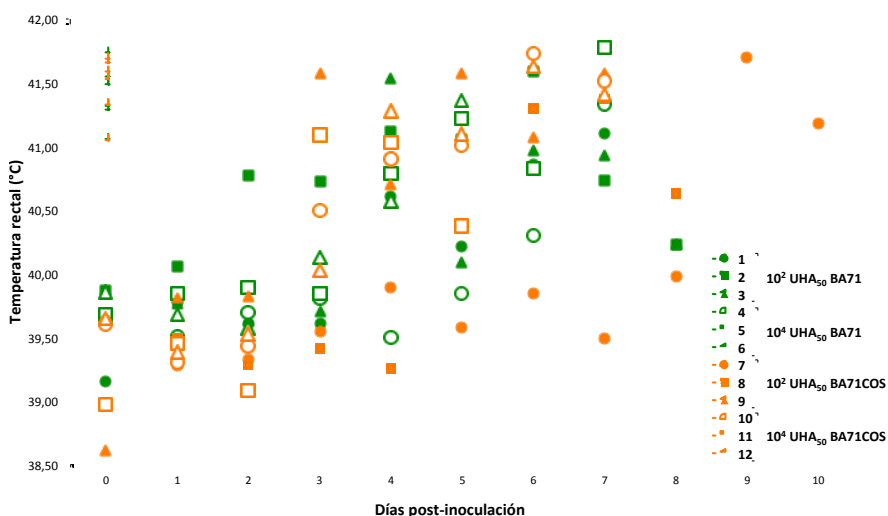


Figura 16: Evolución de la temperatura rectal de los animales infectados con 10^2 UHA₅₀ ó 10^4 UHA₅₀ de BA71 (líneas en verde) o de BA71-COS (líneas en naranja).

El experimento demostró que el virus original disponible en nuestros congeladores mantenía su virulencia y que su adaptación a células COS-1 no le hacía perder la capacidad de infectar letalmente incluso a bajas dosis de infección.

4.1.3 Generación de BA71.ΔTK.pp220i, virus inducible para la poliproteína esencial pp220 utilizando el aislado virulento del VPPA BA71 como virus parental

Una vez comprobado que el pase sucesivo de BA71 en células COS-1 no comprometía la virulencia de BA71, nos decidimos a generar un virus inducible utilizando las células COS-1 como línea celular en la que crecer el virus. Basándonos en los resultados obtenidos en el laboratorio y como ya describimos en la introducción, decidimos enfocar nuestros esfuerzos iniciales a generar el virus BA71.ΔTK.pp220i; virus inducible para la poliproteína pp220, esencial en etapas tardías de la morfogénesis viral. Aprovechando las herramientas disponibles en el laboratorio, para obtener el inducible fue necesario disponer inicialmente de un segundo

locus en el genoma viral dispensable para el virus, en este caso el gen de la Timidina Quinasa (TK), en el que introducir tanto el gen represor lac I de *E. coli* bajo el control del promotor temprano/tardío del VPPA pU104, así como un gen marcador que facilite el seguimiento del recombinante para su aislamiento y purificación, en nuestro caso el gen de la β -gus (*gusA*) bajo el control del promotor viral p72. Así pues, inicialmente se obtuvo en COS-1, el virus deletado BA71. Δ TK, para a continuación obtener el inducible BA71. Δ TK.pp220i, en el que la expresión del gen de la pp220 está regulada por el promotor inducible, compuesto por el promotor viral p72 y la secuencia operadora O1. El segundo gen marcador introducido para el seguimiento del virus inducible es el de la β -gal (*lac Z*). Una vez obtenido el inducible, se infectaron células COS-1 con BA71. Δ TK.pp220i a una MOI de 3 en presencia o en ausencia del inductor IPTG. Como cabía esperar, la expresión de pp220 sólo se produjo a niveles detectables por Western blotting en presencia de IPTG (Figura 17).

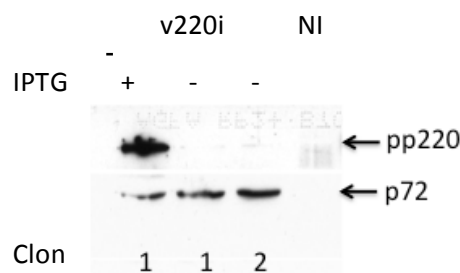


Figura 17: Expresión de la poliproteína inducible pp220 en el virus BA71. Δ TK.pp220i así como de la proteína mayoritaria de la cápsida viral, p72 detectada mediante Western blotting utilizando los anticuerpos anti-p72 y anti-pp220i para detectar específicamente dichas proteínas en extractos de células COS-1 infectadas durante 18 horas con el virus recombinante BA71. Δ CD2.PKi (v220i) en presencia de IPTG 250 μ M (+) o en ausencia del mismo (-) y también en una muestra de extractos de células COS-1 no infectadas (NI). Se analiza la represión de dos clones (1 y 2).

Los resultados del Western blotting, junto con otros experimentos complementarios (resultado no mostrados) nos hicieron pensar que el fenotipo de BA71. Δ TK.pp220i tendría que ser similar al observado por Andrés y colaboradoras para la cepa apatógena BA71V (Andrés *et al.*, 2002) donde la ausencia de IPTG en el medio generaba la acumulación de cápsidas virales vacías en células COS-1 infectadas con BA71V. Δ TK.pp220i, mientras que la presencia de IPTG permitía completar la morfogénesis normal del virus observándose la formación de viriones completos con su material genético encapsidado correctamente, como ya hemos comentado en la Introducción. En este punto quisimos probar el potencial protector de BA71. Δ TK.pp220i, con la idea en mente de que la producción de “cápsidas vacías” *in vivo* (donde no existen trazas del inductor IPTG), debería rendir óptimas una adecuada respuesta inmunológica.

4.1.4 BA71.ΔTK.pp220i no confiere protección frente a la infección letal con el virus homólogo BA71

Con el objetivo de maximizar las posibilidades de éxito, comenzamos por inocular dos grupos de 6 cerdos cada uno, con dosis de 10^5 y 10^7 UFP respectivamente, de BA71.ΔTK.pp220i; adicionalmente 3 cerdos fueron utilizados como controles de la infección, siguiendo el esquema representado a continuación (Figura 18).

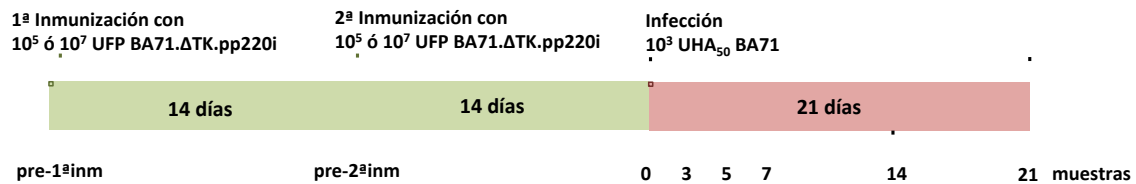


Figura 18: Esquema de la planificación del experimento *in vivo*. Tres grupos de animales, un primer grupo compuesto por 6 cerdos inoculados dos veces con 10^5 UFP de BA71.ΔTK.pp220i, un segundo grupo de 6 cerdos inoculados dos veces con 10^7 UFP y un grupo control de 3 cerdos sin inmunizar. 28 días tras la primera inoculación, los animales se infectaron con una dosis letal de BA71.

El primer resultado destacable es que a pesar de las elevadas dosis utilizadas de BA71.ΔTK.pp220i, en ningún momento tras la inoculación se observó síntoma alguno compatible con PPA avalando la seguridad del método; sobre todo teniendo en cuenta que 10^2 UHA₅₀ del virus parental BA71 resultaban letales para los animales. Desafortunadamente, la ausencia de respuesta inmune inducida en prácticamente todos los animales inmunizados, no permitía ser optimista en cuanto a su utilización vacunal. Así, de los 12 animales inoculados con BA71.ΔTK.pp220i, sólo en uno, en el cerdo número 2, se pudo demostrar la presencia de niveles significativos de anticuerpos específicos frente al VPPA por ELISA (Figura 19); datos confirmados mediante el hecho de que este animal fuera el único en el que también se detectara una respuesta T-específica en respuesta al virus (Figura 20).

Correlacionando con los desalentadores datos de inmunogenicidad, la vacunación no resultó protectora, muriendo todos los animales inmunizados con BA71.ΔTK.pp220i antes del día 9 pi, siguiendo una cinética indistinguible a la de los cerdos control (Figura 21); evidencias refutadas tanto con los datos del seguimiento clínico de la enfermedad, (con la excepción del cerdo número 2 inmunizado con la dosis baja de BA71.ΔTK.pp220i), como con la cinética de la viremia en cada grupo (Figura 22). Únicamente dos de los animales vacunados con la máxima dosis de BA71.ΔTK.pp220i (animales 7 y 9), mostraron un cierto retraso en la viremia, siendo detectable por primera vez a día 5 pi en lugar de a día 3 pi, hallazgo difícil de interpretar puesto que inmediatamente se igualaron los títulos virales con los del resto de los animales.

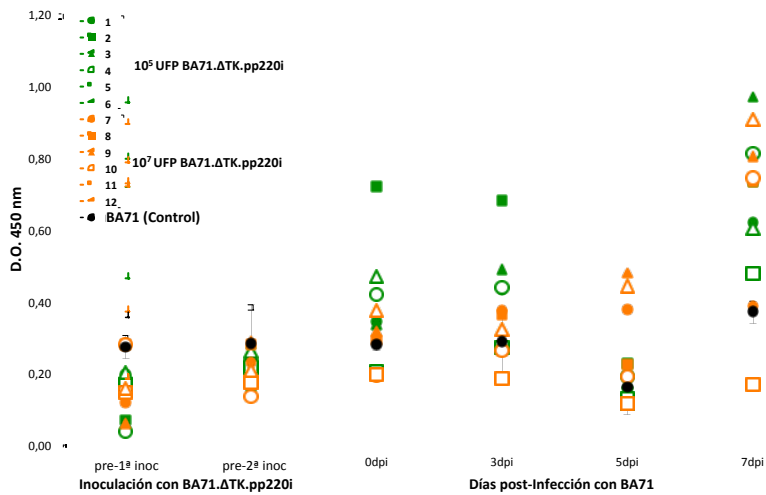


Figura 19: Cinética de generación de anticuerpos específicos frente al VPPA detectados mediante ELISA a partir de suero de cerdos inmunizados con 10^5 UFP (líneas en verde) y 10^7 UFP (líneas en naranja) de BA71.ΔTK.pp220i junto con la media de los cerdos control sin inmunizar y su correspondiente desviación estándar (línea en negro), antes y después de la infección con una dosis letal de BA71.

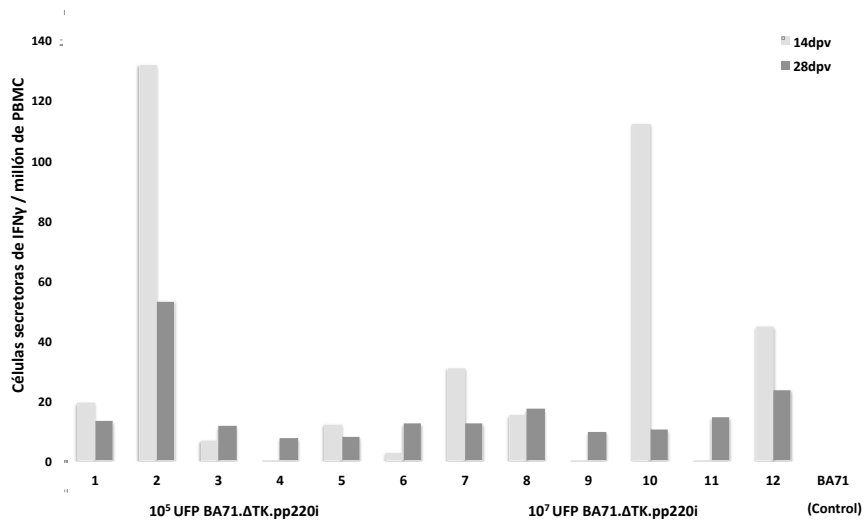


Figura 20: Detección de células T-secretoras de IFN- γ específicamente frente a BA71.ΔTK.pp220i en PBMC de cerdos inmunizados con 10^5 y 10^7 UFP de BA71.ΔTK.pp220i tras 14 y 28 días frente a animales sin inmunizar (BA71 Control), el valor medio de células secretoras detectados en los controles sin inmunizar fue sustraído de todos los animales.

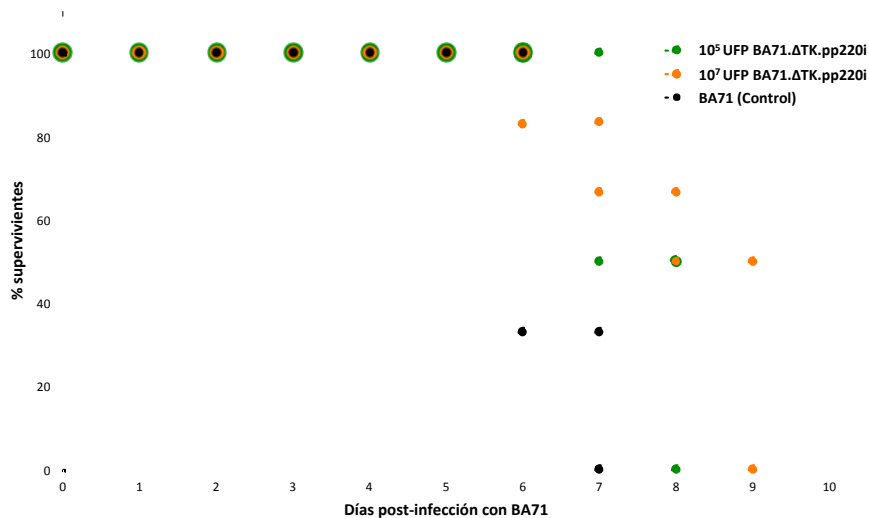


Figura 21: Porcentaje de animales supervivientes frente al desafío con una dosis letal de BA71 en cerdos inmunizados con 10^5 UFP (línea en verde) y con 10^7 UFP (línea en naranja) de BA71.ΔTK.pp220i frente a los cerdos control sin inmunizar (línea en negro).

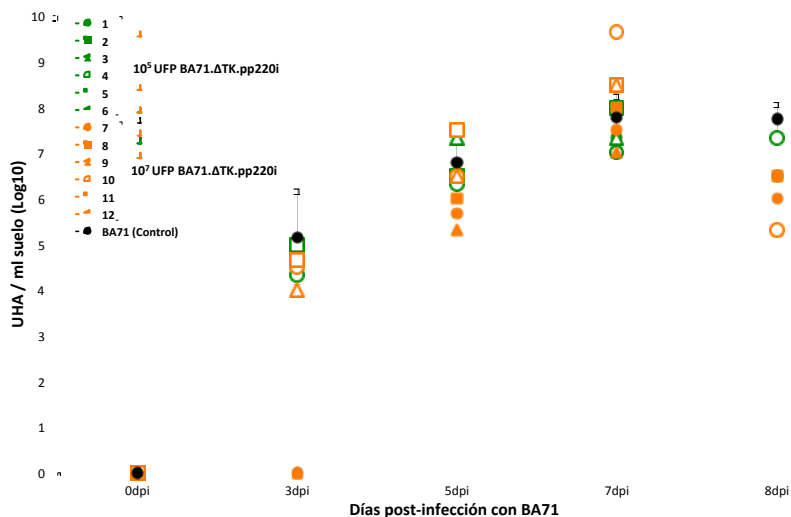


Figura 22: Cinética de detección de virus en suero tras la infección con una dosis letal de BA71 en cerdos vacunados con 10^5 UFP de BA71.ΔTK.pp220i (líneas en verde), vacunados con 10^7 UFP de BA71.ΔTK.pp220i (líneas en naranja) y la media de los resultados obtenidos para los cerdos control junto con la desviación estándar correspondiente (línea en negro).

Como se acaba de adelantar, el único animal que mostró un comportamiento atípico tras la infección con el virus virulento BA71 fue el cerdo número 2 del grupo inmunizado con 10^5 UFP de BA71.ΔTK.pp220i, correspondiendo justo con la detección de una respuesta T y B significativa. Cabe destacar que durante la necropsia del animal número 2, se observó edema hiperagudo, destrucción notable de las estructuras pulmonares, hemotórax y una congestión pulmonar que alcanzó la máxima puntuación de todos los animales del experimento

analizados en la escala patológica de valoración de la enfermedad (Figura 23), coincidiendo además con la presencia de lesiones cardiovasculares muy aparatosas, mostrando el animal elevados niveles de fibrina extravascular y múltiples adherencias en la cavidad costal y en el diafragma así como una acumulación de fibrina en el pericardio.

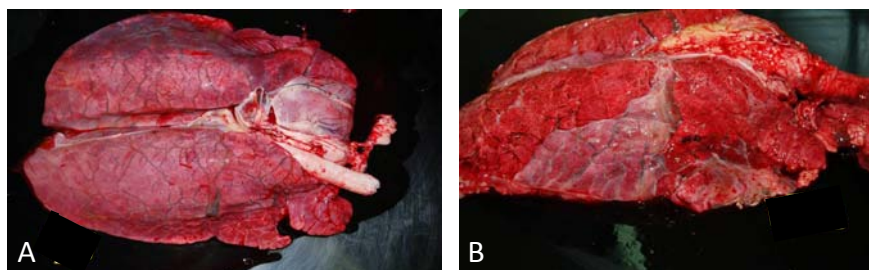


Figura 23: Fotografías de las lesiones macroscópicas encontradas en pulmón de un animal control (A), en comparación con las lesiones encontradas en el cerdo número 2 (B), donde se observaron lesiones pulmonares que denotaban una dramática destrucción de las estructuras pulmonares además de acúmulos anormales de fibrina.

Los desalentadores resultados obtenidos *in vivo* con BA71.ΔTK.pp220i, muy probablemente se expliquen por el hecho de que el gen de la TK, delecionado para obtener el inducible, resultara ser un gen esencial para la infección *in vivo*, como ya se ha demostrado para otras cepas virulentas de VPPA (Moore *et al.*, 1998). Esta y otras hipótesis serán discutidas en la sección correspondiente.

4.2 BA71.ΔCD2: de la Timidina Quinasa a la Hemaglutinina

Como acabamos de describir, la incapacidad de BA71.ΔTK.pp220i de producir los resultados esperados *in vivo*, provocó la inmediata necesidad de buscar un gen alternativo del VPPA que fuera prescindible *in vivo* para generar nuestros inducibles, resultando finalmente seleccionado el gen EP402R que codifica para la hemaglutinina viral y que posee una marcada homología en su dominio extracelular con el marcador de superficie linfocitario CD2 (Rodríguez *et al.* 1993; Borca *et al.* 1994). El CD2 viral fue uno de los primeros genes definidos como prescindibles para la infección en cerdo, como se pudo demostrar tras su eliminación del aislado virulento africano Malawi Lil-20/1. El virus recombinante resultante, Malawii.ΔCD2, seguía siendo letal para el cerdo aunque la infección sufría un ligero retraso provocando viremias un poco menos elevadas que el virus parental el cual produce una patogenia muy agresiva (Borca *et al.*, 1998).

Ante la imposibilidad de utilizar los plásmidos disponibles en el laboratorio, todos ellos diseñados para incluir los *cassetes* de inducción y el marcador en el *locus* de la TK, tuvimos que comenzar por rediseñar nuevos plásmidos, adaptándolos al nuevo *locus* del CD2v.

La obtención de virus inducibles recombinantes basados en CD2v, como ya se ha explicado con profundidad en la sección de Materiales y Métodos y que recordamos a continuación, consistió en dos pasos consecutivos: i) La obtención del virus deleciónado en CD2v mediante recombinación homóloga con el plásmido pLacI.ΔCD2 que contiene el *cassette* con el marcador *gusA* y el gen represor *lac I* (Figura 11) y ii) La generación del inducible *per se* para el gen elegido: pp220 o PK en nuestro caso, como se verá más adelante (Figura 12).

La experiencia obtenida con BA71.ΔTK.pp220i, recomendó, antes de utilizar los inducibles basados en CD2v, caracterizar la capacidad infectiva del virus intermediario BA71.ΔCD2, deleciónado en el gen CD2v, tanto *in vitro* en células COS-1 y en macrófagos, célula diana del VPPA, como *in vivo*.

Los ensayos diseñados para caracterizar la cinética del crecimiento del virus BA71.ΔCD2 tanto en células COS-1 como en macrófagos, rindieron curvas de crecimiento indistinguibles con respecto al virus parental BA71, obteniéndose títulos máximos de virus en células COS-1 de $3,7 \times 10^8$ UFP/ml y $2,2 \times 10^8$ UFP/ml para BA71 y BA71.ΔCD2 respectivamente y títulos de 2×10^5 UFP/ml y $1,2 \times 10^5$ UFP/ml en macrófagos para los mismos virus a las 72 h tras la infección, animando a continuar con el ensayo preliminar *in vivo*.

4.2.1 El virus virulento BA71 se atenúa al perder el gen CD2: BA71.ΔCD2

Una vez seleccionado el CD2v como *locus* en el que insertar el *cassette* de represión/inducción y con el objetivo de confirmar que la eliminación de dicho gen en la cepa BA71 no afectaba a su capacidad de replicación *in vivo*, al menos de manera dramática, como se había observado para el aislado Malawi Lil-20/1 (Borca *et al.*, 1998), 24 animales fueron distribuidos en dos boxes (alojando 12 animales en cada box). 12 animales (6 de cada box) fueron inoculados con 10^3 UFP de BA71.ΔCD2 y los 12 animales restantes (6 en cada box) se utilizaron como controles recibiendo una dosis de PBS. En una tercera habitación se alojaron 6 animales que fueron desafiados con 10^3 UFP de virus virulento parental BA71.

Como cabía esperar, todos los animales del grupo control infectado con BA71, comenzaron a desarrollar síntomas de la enfermedad, incluido fiebre, a día 3 pi, sucumbiendo todos antes del día 7 (Figura 24) y mostrando viremias muy elevadas. Sorprendentemente, ninguno de los

cerdos inoculados con 10^3 UFP de BA71.ΔCD2 mostraron síntoma alguno de la enfermedad, ni viremia, ni secreción viral detectable (Figuras 25 y 26).

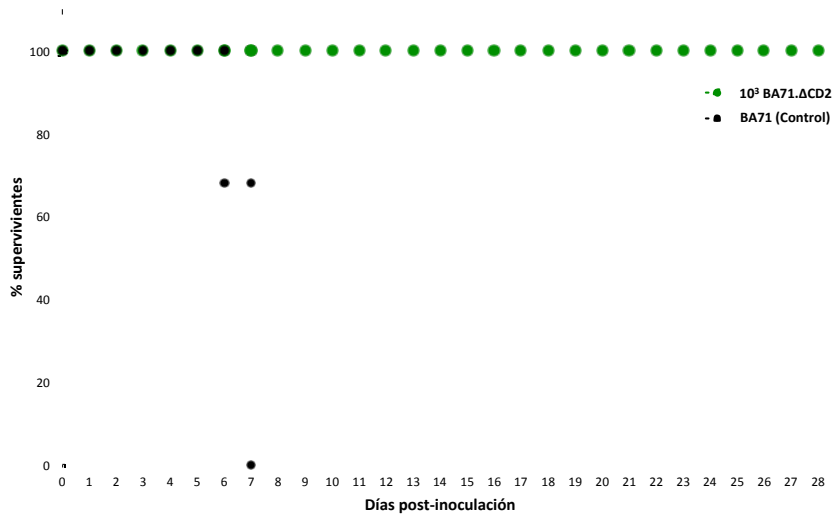


Figura 24: Porcentaje de animales supervivientes frente a la inoculación con 10^3 UFP de BA71.ΔCD2 (línea en verde) y a la infección con la misma dosis del virus parental virulento, BA71 (línea en negro).

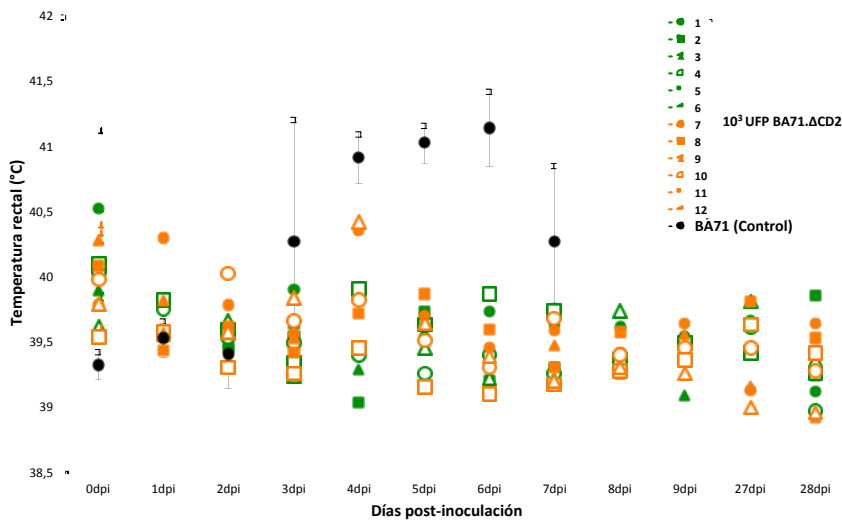


Figura 25: Evolución de la temperatura rectal en °C de cerdos inoculados con 10^3 UFP de BA71.ΔCD2 (líneas en verde y naranja) y la media de los resultados obtenidos para los cerdos control inoculados con la misma dosis del virus parental virulento (BA71) junto con la desviación estándar correspondiente (línea negra).

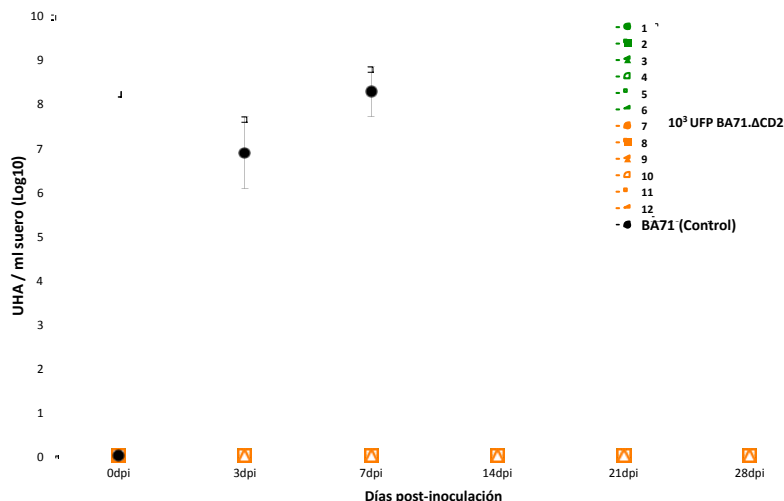


Figura 26: Cinética de detección de virus en suero de cerdos tras la inoculación con 10^3 UFP de BA71.ΔCD2 (líneas en verde y naranja). La media de los resultados obtenidos para los cerdos control junto con la desviación estándar correspondiente se muestra como una línea negra.

El hecho de que la práctica totalidad de los animales inoculados con 10^3 UFP de BA71.ΔCD2 desarrollaran anticuerpos específicos frente al VPPA (Figura 27), demostró fehacientemente el éxito de la infección descartando un fallo en la misma y demostrando que, en contra de lo que se había descrito para el aislado Malawi Lil-20/1, el CD2v se comporta como un factor de virulencia clave en el caso del aislado BA71. Los animales control inoculados con PBS se mantuvieron libres de síntomas compatibles con PPA.

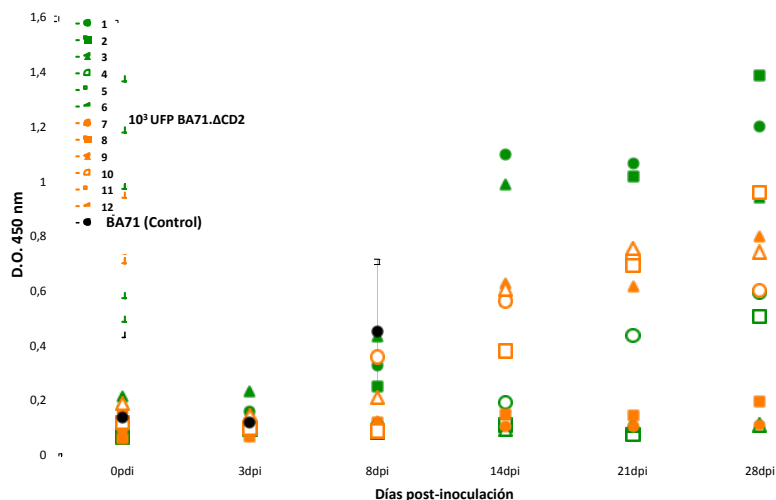


Figura 27: Cinética de generación de anticuerpos específicos frente al VPPA detectados mediante ELISA a partir de suero de cerdos inoculados con 10^3 UFP de BA71.ΔCD2 (líneas en verde y naranja). La media de los resultados obtenidos para los animales control, junto con la desviación estándar correspondiente se muestra en este caso como una línea negra.

4.2.2 La inoculación con BA71.ΔCD2 puede proteger frente al desafío letal con virus homólogos y heterólogos

Una vez demostrada su inmunogenicidad y seguridad *in vivo*, los cerdos vacunados con 10^3 UFP de BA71.ΔCD2 fueron infectados con una dosis letal del virus homólogo BA71 o del virus heterólogo E75, utilizando como controles los animales *naïve* inoculados con PBS (Figura 28).

Como cabía esperar tras el desafío con 10^3 UFP de BA71, todos los animales control murieron antes del día 7 pi. En claro contraste, a día 7 pi, todos los animales del grupo vacunado con 10^3 UFP de BA71.ΔCD2 estaban vivos y lo que resultó más significativo todavía, dos de ellos sobrevivieron a la infección (Figura 29), sin mostrar uno de ellos (cerdo número 2), síntoma alguno compatible con la PPA a lo largo de la infección, incluyendo fiebre (Figura 30).

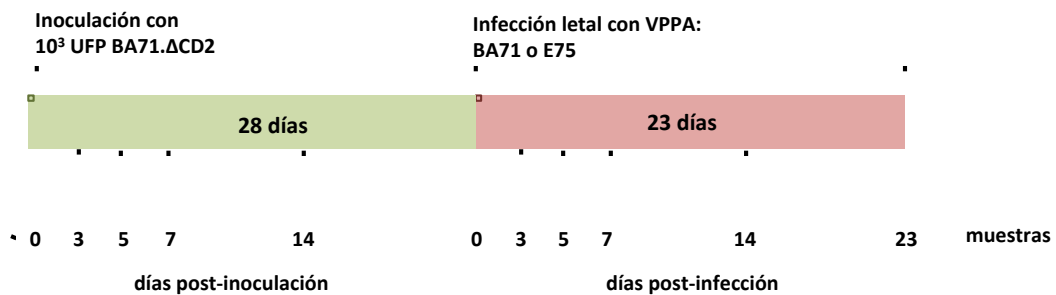


Figura 28: Esquema sobre la planificación del experimento *in vivo*. Transcurridos 28 días tras la inoculación con 10^3 UFP de BA71.ΔCD2, la mitad de los cerdos se desafiaron con 10^3 UFP BA71 (dosis letal), y la otra mitad con 10^4 UHA₅₀ de E75 (dosis letal). Se tomaron muestras en los días señalados.

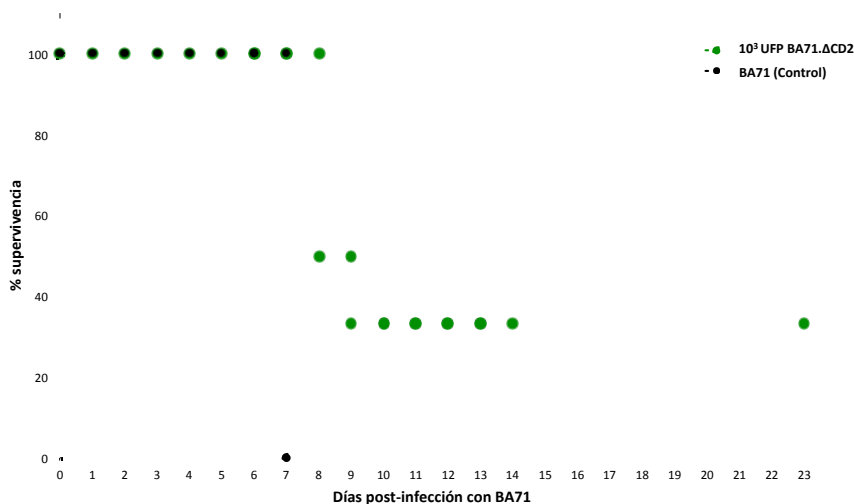


Figura 29: Porcentaje de supervivencia de los cerdos inmunizados con 10^3 UFP de BA71.ΔCD2 (línea en verde) y de los controles sin vacunar (línea en negro) tras la infección con una dosis letal de BA71.

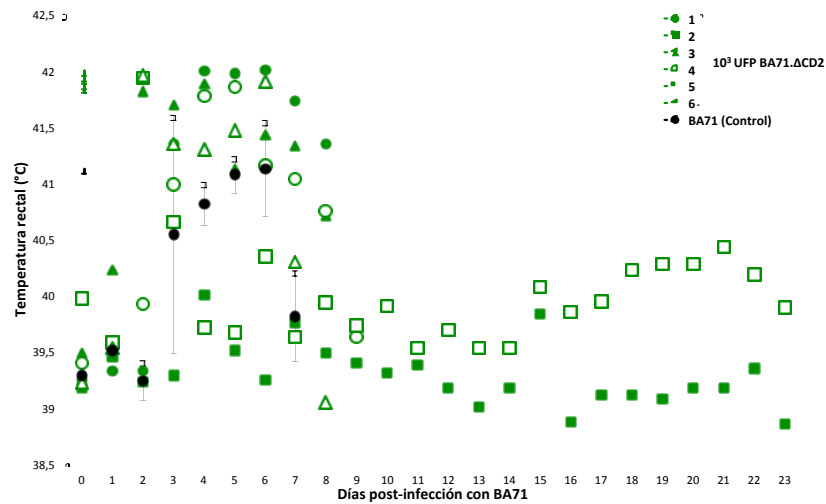


Figura 30: Evolución de la temperatura rectal en °C tanto de cerdos inmunizados con 10^3 UFP de BA71.ΔCD2 (líneas en verde) como de los controles sin vacunar (la línea en negro muestra la media y la desviación estándar del grupo) tras la infección con una dosis letal de BA71.

Tras el desafío letal con la cepa homóloga BA71, los animales control mostraron niveles de viremia en sangre elevados a día 4 pi y máximos a día de muerte mientras que los animales vacunados con BA71.ΔCD2 mostraron niveles menores que los controles en todo momento, siendo dramática esta disminución en el caso del animal número 5, uno de los animales supervivientes (Figura 31). Coincidiendo con la ausencia de sintomatología, el segundo animal superviviente (cerdo número 2), no mostró viremia en ningún momento tras la infección (Figura 31).

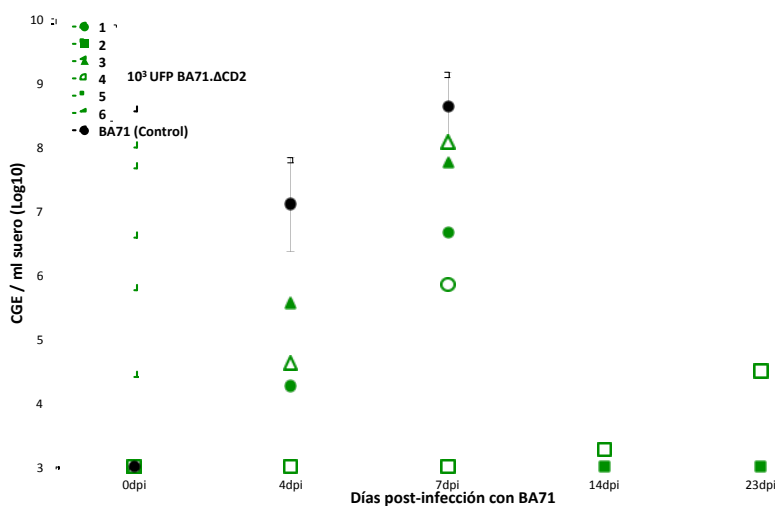


Figura 31: Cinética de detección viral en suero de cerdos inmunizados con 10^3 UFP de BA71.ΔCD2 (líneas en verde) y de los controles sin vacunar (línea en negro, muestra la media y la desviación estándar del grupo) tras la infección con una dosis letal de BA71.

De forma semejante a lo observado en el desafío con BA71, los animales control infectados con 10^4 UHA₅₀ de E75, desarrollaron signos clínicos propios de PPA desde el día 3 pi y tras 8 días desde la infección, todos los animales habían muerto. En cuanto a los animales vacunados con 10^3 UFP de BA71.ΔCD2, solamente uno de los seis, el animal número 10, consiguió sobrevivir al desafío heterólogo (Figura 32); de nuevo observándose una sorprendente ausencia de sintomatología, incluyendo fiebre y viremia, en el animal superviviente (Figuras 33 y 34).

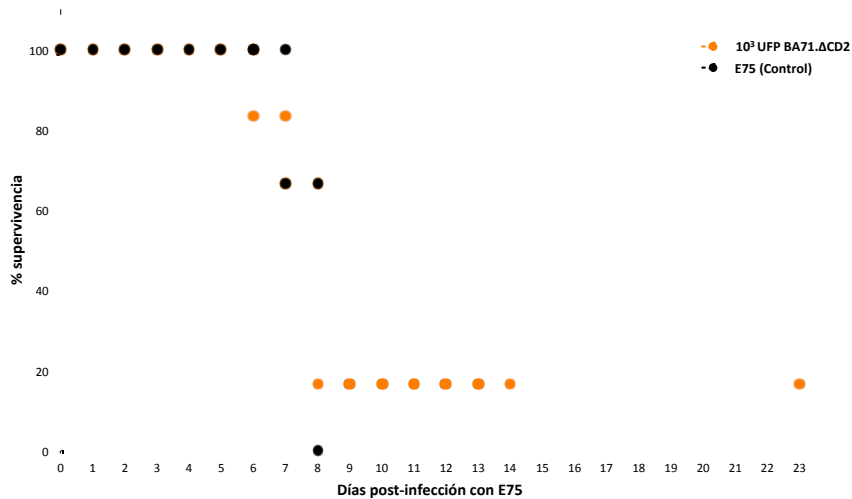


Figura 32: Porcentaje de supervivencia de cerdos inmunizados con 10^3 UFP de BA71.ΔCD2 (línea naranja) y de los controles sin vacunar (línea negro, se muestra la media) tras la infección con una dosis letal de E75.

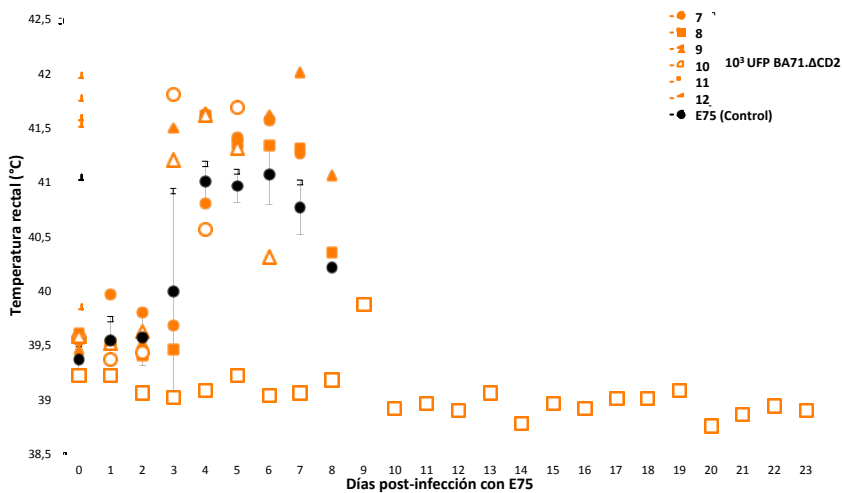


Figura 33: Evolución de la temperatura rectal en °C tanto de cerdos inmunizados con 10^3 UFP de BA71.ΔCD2 (líneas en naranja) como de la media de los controles sin vacunar y su desviación estándar (línea en negro) tras la infección con una dosis letal de E75.

Esta ausencia de sintomatología observada coincidió de nuevo con la no presencia detectable de virus en sangre, demostrando la posibilidad de conseguir por primera vez para el VPPA una inmunización completa frente al desafío heterólogo. Las cinéticas virales del resto de los animales no revelaron diferencias significativas a favor de los animales vacunados, en comparación con los animales control alcanzando elevados títulos de virus en sangre a día 7 pi (Figura 34).

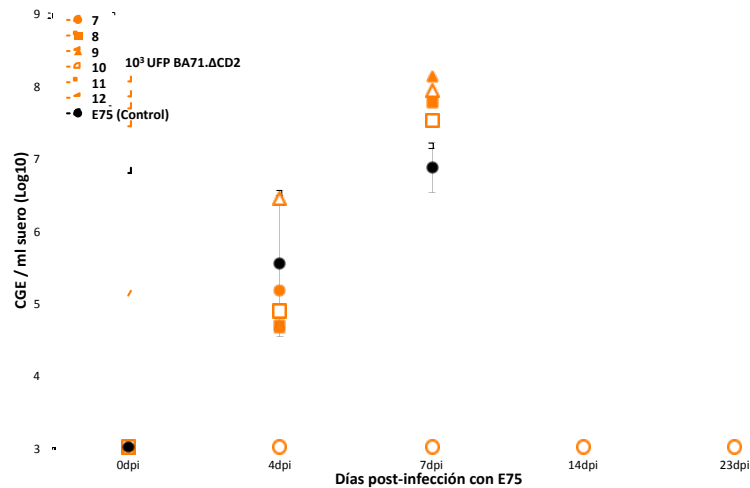


Figura 34: Cinética viral en suero de cerdos inmunizados con 10^3 UFP de BA71.ΔCD2 (líneas en naranja) y la media y la desviación estándar observada en el grupo control (línea en negro) tras la infección con una dosis letal de E75.

Aunque BA71.ΔCD2 fue capaz de conferir protección total frente a un desafío tanto homólogo como heterólogo, no todos los animales desarrollaron una respuesta inmune similar. En el caso de la respuesta humoral, y como era de esperar, los animales control tanto infectados con BA71 como con E75, no tuvieron tiempo de desarrollar títulos significativos de anticuerpos específicos antes de su muerte. En claro contraste, los animales vacunados desarrollaron una respuesta específica de anticuerpos de manera que el día del desafío, 28 días tras la vacunación 9 de los 12 animales vacunados (el 75% de los mismos) tenían niveles elevados de anticuerpos específicos anti-VPPA, aunque en ningún caso éstos se pudieron correlacionar con protección (Figura 35).

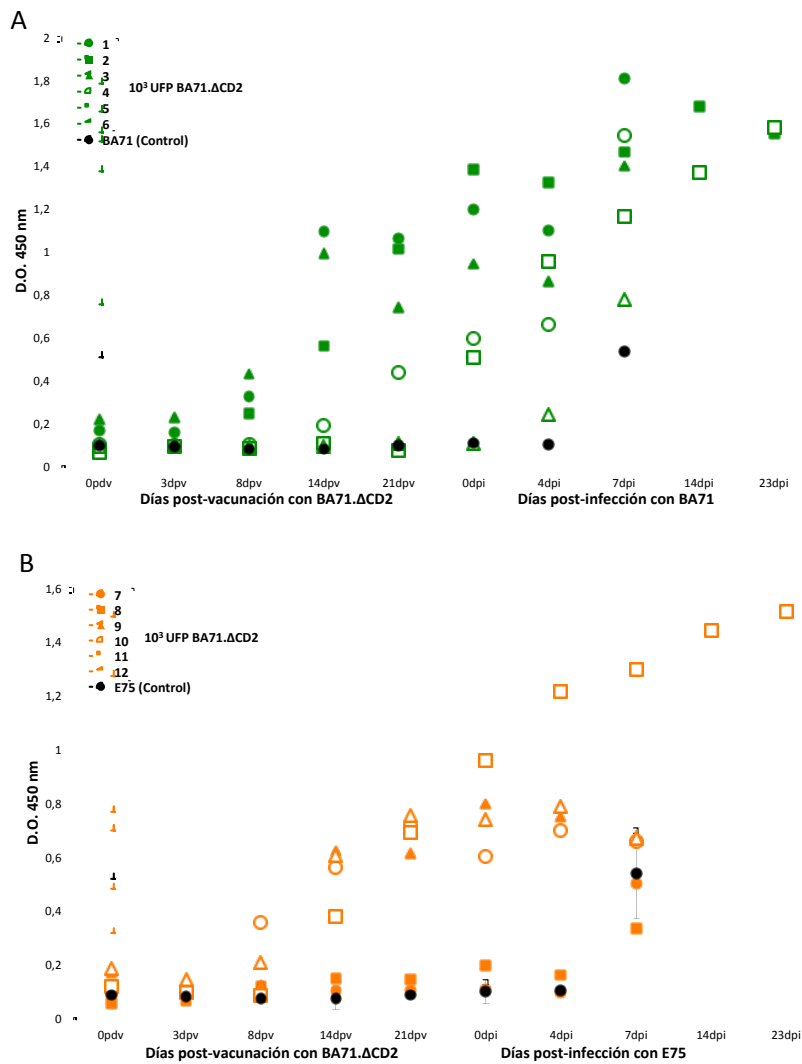


Figura 35. Cinética de detección de anticuerpos específicos anti-VPPA mediante ELISA tras la vacunación con 10³ UFP de BA71.ΔCD2 y tras la infección con una dosis letal de BA71 (A) o E75 (B), tanto de cerdos inmunizados de BA71.ΔCD2 (líneas en verde o naranja) como de los controles sin vacunar (las líneas en negro muestran la media y la desviación estándar correspondientes a los grupos control).

Algo parecido sucede con las células T-específicas, cuya cuantificación previa al desafío no explica los niveles de protección obtenida, observándose animales que sucumbían a la infección letal a pesar de disponer de un gran número de células en circulación. Como era de esperar, los animales control murieron antes de ser capaces de desarrollar una respuesta mediada por células T detectable, mientras que varios de los animales inmunizados con BA71.ΔCD2 fueron capaces de desarrollar una respuesta específica mediada por células T frente al virus desde el día 14 post-vacunación (Figura 36).

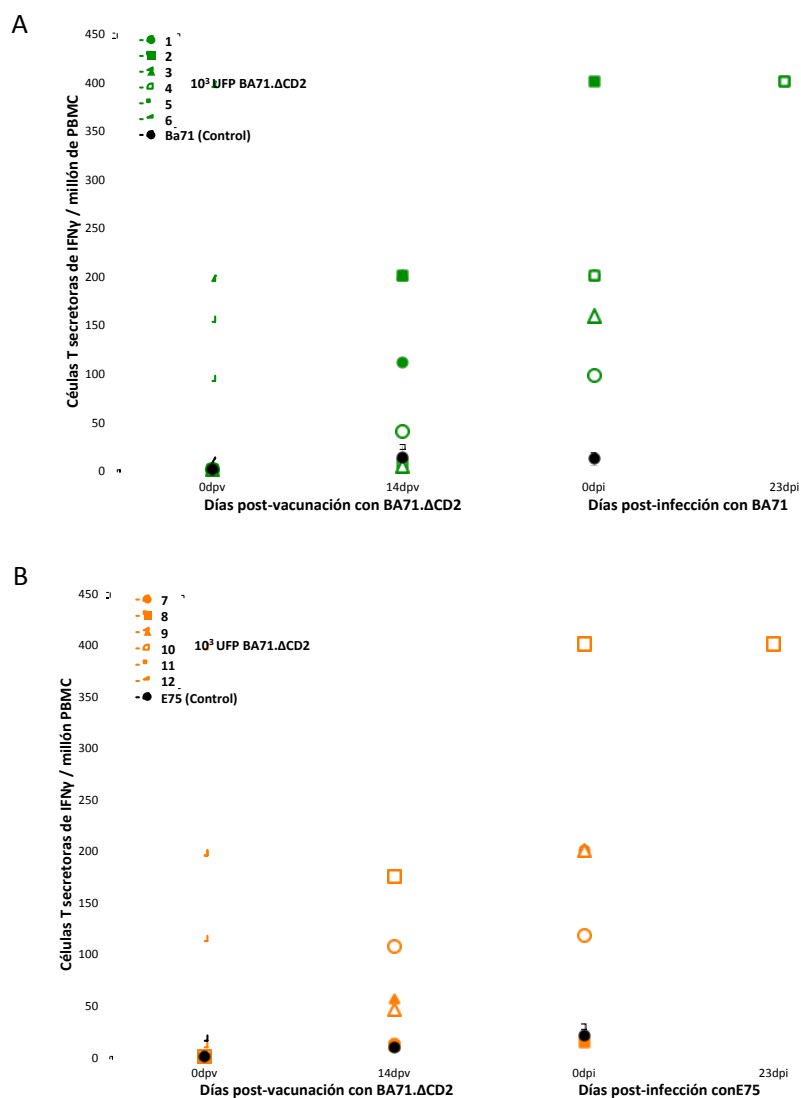


Figura 36: Cinética de detección de células T específicas frente al VPPA mediante ELISPOT en PBMCs tras la vacunación con BA71.ΔCD2 y tras la infección con una dosis letal de BA71 (A) o E75 (B), tanto de cerdos inmunizados con BA71.ΔCD2 (líneas en verde o naranja) como de los controles sin vacunar (las líneas en negro, muestran los valores medios y la desviación estándar correspondiente a los datos del grupo control).

Curiosamente, si bien todos los animales supervivientes mostraron altos niveles de células T específicas en sangre, no todos los animales capaces de responder de forma adecuada a nivel celular acabaron por sobrevivir. Estos resultados no permiten relacionar de forma directa los niveles de estimulación específica con protección, si bien hay que ser cautos en las conclusiones al tratarse de una foto fija (tiempo concreto), tomada en sangre periférica y no en los órganos linfoides, diana principal del VPPA.

4.2.3 BA71.ΔCD2 produce una respuesta policlonal

Con el objetivo de profundizar en los mecanismos implicados en la protección observada tras la inoculación con BA71.ΔCD2, intentamos determinar la identidad de las células T específicamente inducidas mediante un ensayo de proliferación *in vitro*. Este ensayo permitió demostrar que tanto las células T-CD4⁺ como las células T-CD8⁺ específicamente inducidas, eran capaces de reconocer indistintamente al BA71 y al E75 (Figura 37), correlacionando con la protección cruzada observada. En contraste claro, las células T-CD8⁺ inducidas por E75CV1, virus atenuado capaz de proteger únicamente frente al virus homólogo virulento, únicamente proliferaban en respuesta a la estimulación *in vitro* con E75, apenas reconociendo al virus heterólogo BA71 (Lacasta *et al.*, 2015, submitted).

El hecho de que las células T-CD4⁺ inducidas por ambos virus: BA71.ΔCD2 y E75CV1, también reconocieran ambos virus *in vitro*, confirma los datos obtenidos por ELISPOT. Con estos datos en mente podríamos concluir que la capacidad de BA71.ΔCD2 de proteger *in vivo* frente a virus heterólogos correlaciona con su capacidad de inducir células T-CD8⁺ capaces de reconocer tanto virus homólogos como heterólogos *in vitro*.

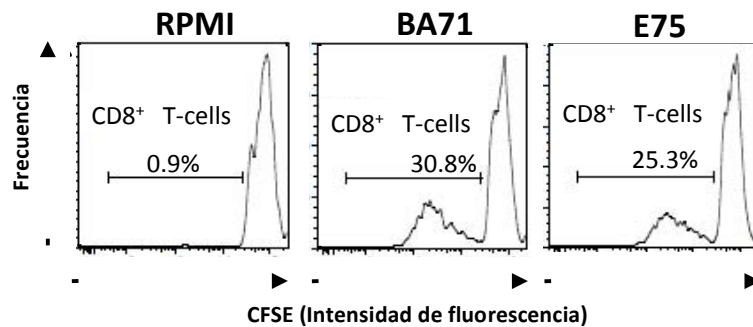


Figura 37: Histogramas representativos de la linfoproliferación específica de la población de linfocitos T-CD8⁺ medida a través de la tinción intracelular con CFSE y la tinción superficial con anti-CD8. Se muestra el porcentaje de la población de células T-CD8⁺ de animales vacunados con BA71.ΔCD2 que linfoproliferaron de forma específica tras la estimulación con BA71 (30,8%) y E75 (25,3%) en comparación con la no proliferación de dicha población en contacto con medio, RPMI (0,9%).

El elevado repertorio de células T-CD8⁺ inducidas por BA71.ΔCD2 *in vivo*, vendría confirmado por los resultados obtenidos *in vitro* mediante ELISPOT utilizando las PBMC extraídas a partir de animales inmunizados con BA71.ΔCD2. Estas PBMCs fueron capaces de reconocer específicamente no sólo BA71 y E75 sino además, una mezcla de péptidos predichos *in silico* como potenciales epítopos CTL disponibles en el laboratorio (datos no publicados). En claro contraste, no se observó estimulación específica alguna frente a estos mismos péptidos a partir de las PBMCs aisladas de cerdos inmunizadas con E75CV1 (Figura 38), muy probablemente reflejando una respuesta inmunodominante frente a muy pocos

determinantes antigénicos tras la inmunización con E75CV1 (Takamatsu *et al.*, 2013) correlacionando perfectamente con su capacidad para proteger únicamente frente al virus homólogo, mientras que el potencial protector del BA71.ΔCD2 podría correlacionarse con la capacidad que tiene para inducir una respuesta policlonal de células T.

	Secreción de IFN-γ por células T			Proliferación de células T-CD8 ⁺	
	BA71	E75	Mezcla péptidos	BA71	E75
10³ UFP BA71.ΔCD2	+++	++	++	+++	++
10⁴ UHA₅₀ E75CV1	++	+++	---	---	+++

Figura 38: Tabla resumen de la capacidad que tienen las PBMCs aisladas de animales inmunizados con dos cepas atenuadas diferentes del VPPA de secretar IFNγ específicamente y de linfoproliferar frente a virus homólogos y heterólogos así como frente a una mezcla de péptidos virales.

4.2.4 La protección conferida por BA71.ΔCD2 es dosis dependiente

Después de los alentadores resultados obtenidos tras la inoculación de cerdos con una dosis de tan sólo 10³ UFP de BA71.ΔCD2, decidimos escalar la dosis de inoculación *in vivo*, inmunizando dos grupos de 12 animales cada uno, bien con 3,3x10⁴ o bien con 10⁶ UFP de BA71.ΔCD2. Siguiendo el esquema descrito para el experimento anterior: cada grupo de inmunización se dividió en dos mitades (6 cerdos para cada dosis), alojándose en dos boxes distintos (A y B) cada uno incluyendo tres cerdos extras utilizados como control (total de 15 cerdos en cada box). 28 días tras la inmunización intramuscular todos los animales del Box A fueron inoculados con una dosis letal de BA71 (10³ UFP) y todos los animales del Box B con una dosis letal de E75 (10⁴ UHA₅₀), tal y como se resume a continuación en la Figura 39.

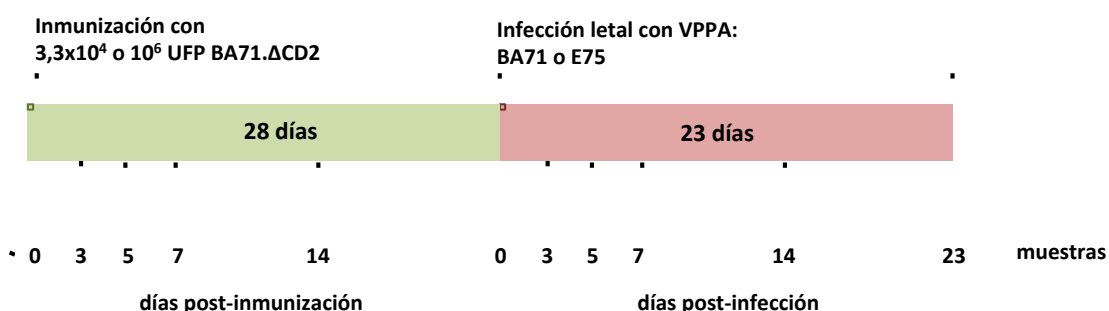


Figura 39: Esquema sobre la planificación del experimento *in vivo*. De cada Box 12 animales fueron inoculados con BA71.ΔCD2 (3,3x10⁴ o 10⁶ UFP) y transcurridos 28 días, todos los animales del Box A fueron desafiados con una dosis letal de BA71 y todos los animales del Box B con una dosis letal de E75.

Como era de esperar, todos los animales control, tanto los inoculados con BA71 como con E75, murieron antes del día 9 pi (Figura 40, líneas en negro). En claro contraste, todos los animales vacunados con BA71.ΔCD2 sobrevivieron a la infección letal con el virus homólogo BA71, independientemente de la dosis utilizada (Figura 40A). Más sorprendente aún resultó el hecho de que BA71.ΔCD2 fuera capaz de proteger de la misma manera frente al virus heterólogo E75, sobreviviendo el 100% de los cerdos vacunados, de nuevo con independencia de la dosis utilizada (Figura 40B).

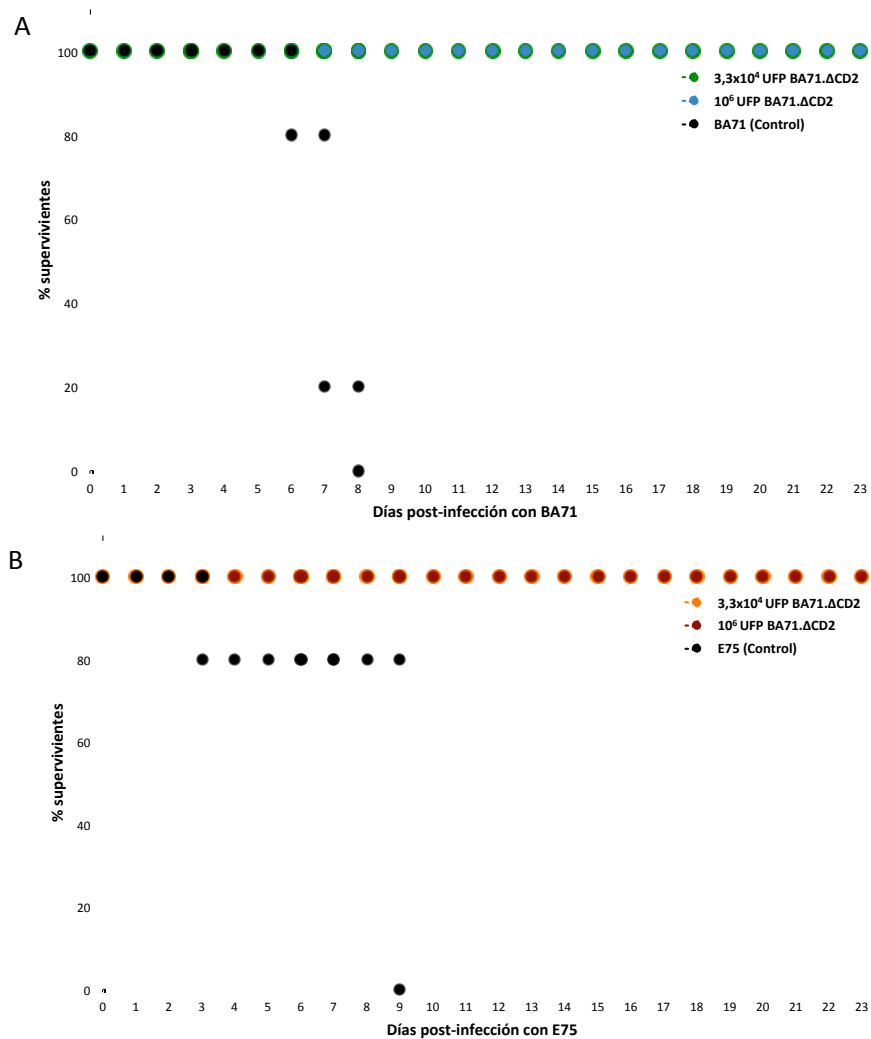


Figura 40: Porcentaje de animales supervivientes previamente inmunizados con $3,3 \times 10^4$ UFP de BA71. ΔCD2 (líneas verde y naranja), 10^6 UFP de BA71. ΔCD2 (líneas azul y marrón) y de los controles sin vacunar (líneas en negro) tras la infección con (A) una dosis letal de BA71 y (B) una dosis letal de E75.

Como ya se ha mencionado repetidamente, no existe en la literatura referencia alguna, al menos que hayamos sido capaces de encontrar, de una protección tan sólida frente a virus heterólogos. El hecho refutado de que a la inversa no ocurra así: el E75CV1 (virus atenuado

obtenido por adaptación a cultivo celular del E75 virulento) no es capaz de proteger frente a la infección letal con BA71 (Lacasta et al. 2015, submitted) da fe de las características únicas de BA71.ΔCD2 y abre enormes expectativas en cuanto a su potencial vacunal de futuro.

Estos resultados confirman que la ausencia de protección observada en algunos animales tras la inmunización con 10^3 UFP de BA71.ΔCD2 fue debida a la utilización de una dosis demasiado baja o subóptima. Tanto la dosis de inmunización alta (10^6 UFP) como la intermedia ($3,3 \times 10^4$ UFP) de BA71.ΔCD2 resultaron seguras para la inmensa mayoría de los animales, como demuestra la ausencia de síntomas compatibles con PPA, incluyendo aparición de fiebre (Figura 41) ni viremia (Figura 42) en prácticamente ningún momento tras su inoculación.

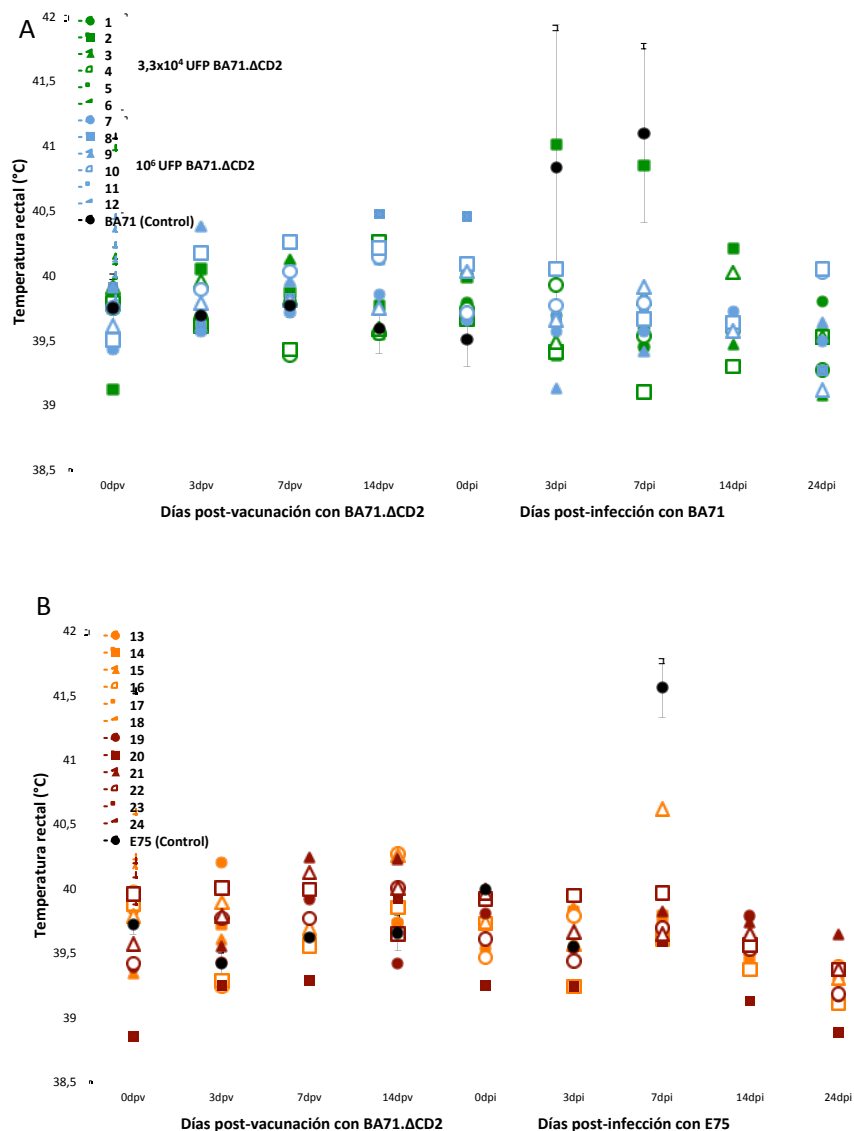


Figura 41: Evolución de la temperatura rectal en °C de cerdos inmunizados con dos dosis diferentes de BA71.ΔCD2 ($3,3 \times 10^4$ UFP o 10^6 UFP) como de animales control sin vacunar antes y después de la infección con una dosis letal de (A) BA71 y (B) E75. Las líneas en negro muestran los valores medios y la desviación estándar de los datos obtenidos en el grupo control.

Esto fue así para la mayoría de los animales inoculados a excepción del cerdo número 8, el cual fue inoculado con la dosis más alta de BA71.ΔCD2 y en el que se detectó un pico de viremia a día 7 post-vacunación que coincidió con un pico transitorio de temperatura entre los días 14 y 21 post-vacunación. Ningún otro animal mostró fiebre ni viremia detectable tras la vacunación por la metodología al alcance siendo indistinguibles de los animales control.

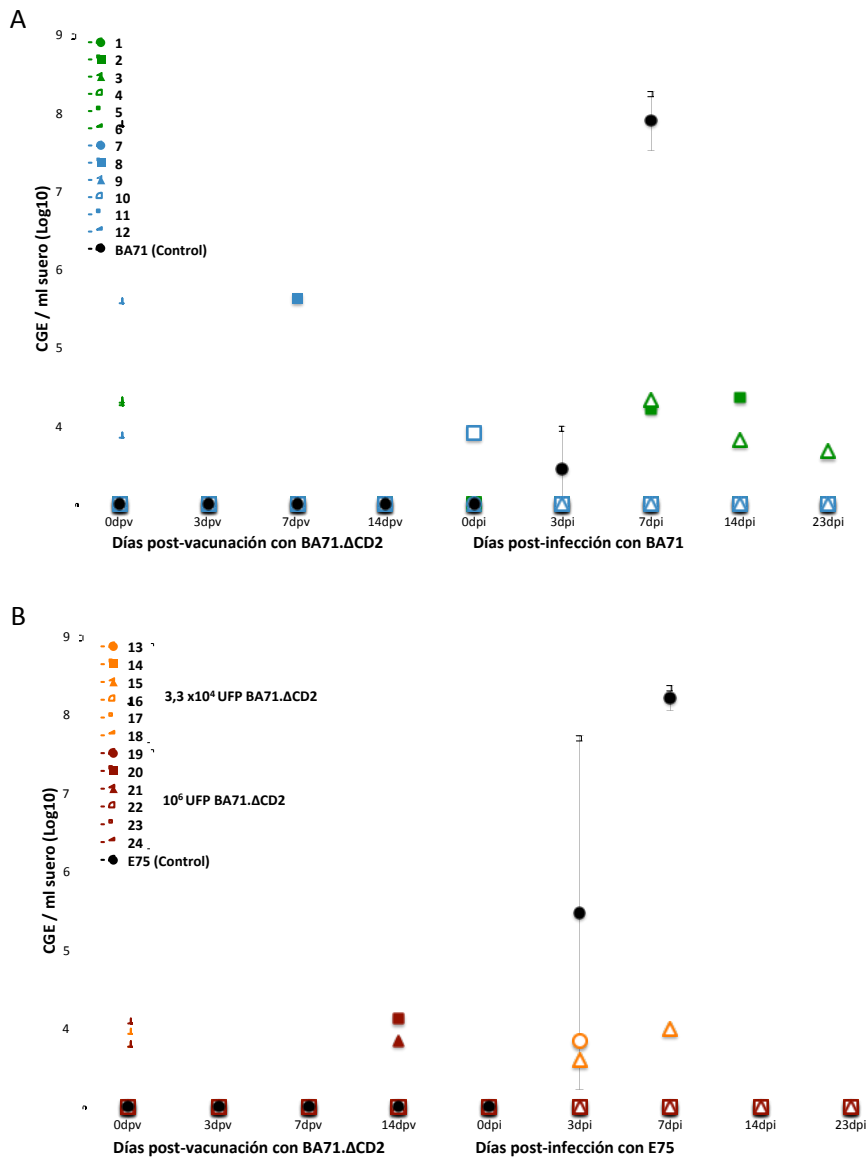


Figura 42: Cinética viral en suero de cerdos inmunizados con $3,3 \times 10^4$ UFP o 10^6 UFP de BA71.ΔCD2 junto con la media de los controles sin vacunar (línea en negro, se muestra la media) antes y después de la infección con una dosis letal de (A) BA71 y (B) E75.

Finalmente cabe destacar que independientemente de la cepa viral utilizada para el desafío (BA71 o E75), todos los animales vacunados con la dosis alta de BA71.ΔCD2 (10^6 UFP) quedaron totalmente protegidos, como se demuestra por la ausencia total de sintomatología y

fiebre (Figuras 41) o viremia detectable a lo largo de la infección (Figuras 42). El grado de protección conferido por la dosis intermedia de BA71.ΔCD2 ($3,3 \times 10^4$ UFP) no resultó por el contrario tan sólida. A pesar de que ningún cerdo vacunado con esta dosis mostró síntomas clínicos compatibles con PPA aguda, algunos ejemplares mostraron picos de viremia y fiebre variables, tanto tras infección con BA71 como E75 (Figuras 43).

A modo de ejemplo, los cerdos número 2 y 6 y los cerdos 16 y 18 mostraron un pico de fiebre y viremia detectable tras el desafío con BA71 y E75, respectivamente; aunque 4 logaritmos menor que el observado para los cerdos control, demostrando el elevado grado de protección generado. Así pues, estos resultados demuestran claramente que la protección conferida por BA71.ΔCD2 es dosis dependiente.

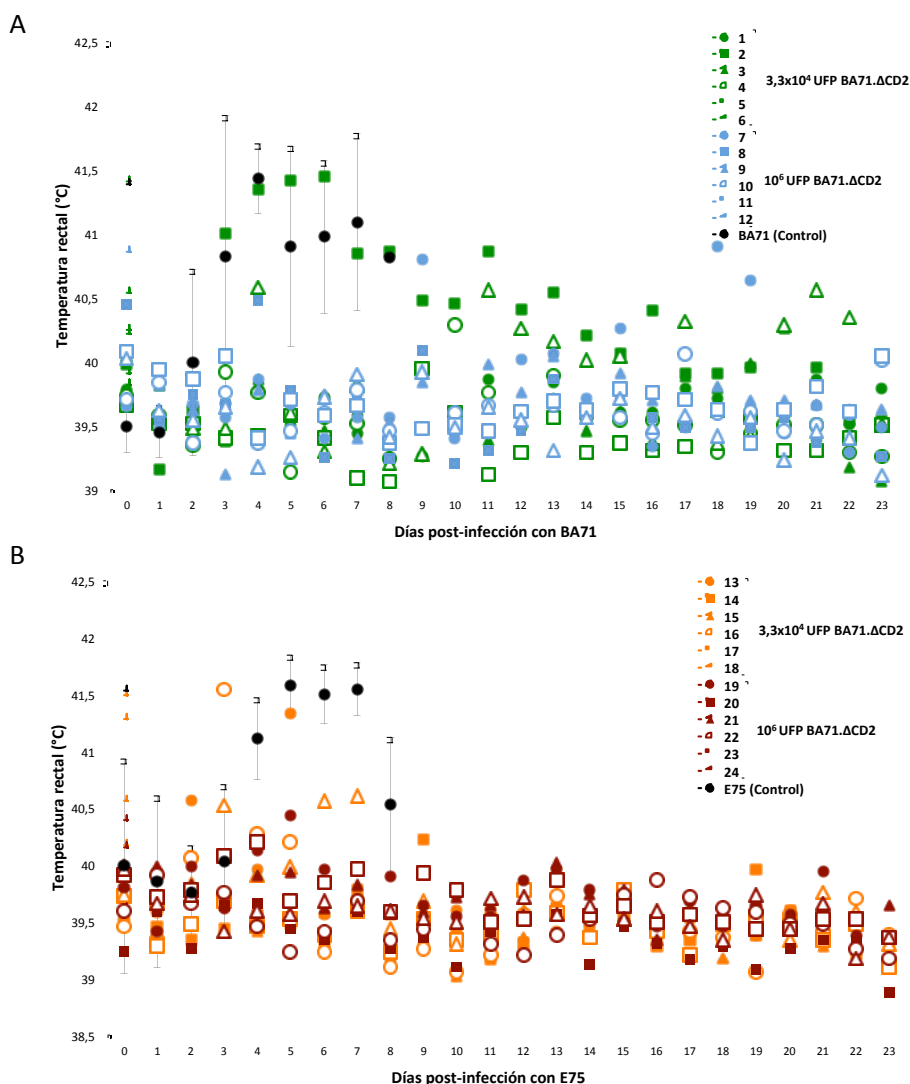


Figura 43: Evolución de la temperatura rectal en °C de cerdos inmunizados con dos dosis diferentes de BA71.ΔCD2 ($3,3 \times 10^4$ UFP o 10^6 UFP) como de animales control sin vacunar (líneas en negro, se muestran las medias) tras el desafío con una dosis letal de (A) BA71 o de (B) E75.

4.2.5 BA71.ΔCD2 estimula una potente respuesta humoral y celular

Analizando la respuesta humoral inducida tras la inoculación con BA71.ΔCD2, todos los animales inmunizados generaron anticuerpos específicos en mayor o menor medida, detectables a partir del día 14 post-inoculación y que alcanzaron su máximo tras la reinfección con el virus virulento, independientemente de que se tratara del virus homólogo BA71 o el heterólogo E75 virulentos (Figura 44). Como era de esperar, los animales control murieron antes de mostrar una clara respuesta específica de anticuerpos, de nuevo independientemente del virus utilizado en el desafío. Coincidiendo con lo recién descrito para dosis bajas de inmunización, no se observó una correlación evidente entre la dosis vacunal utilizada, el nivel de anticuerpos específicos detectado por ELISA y la protección conferida.

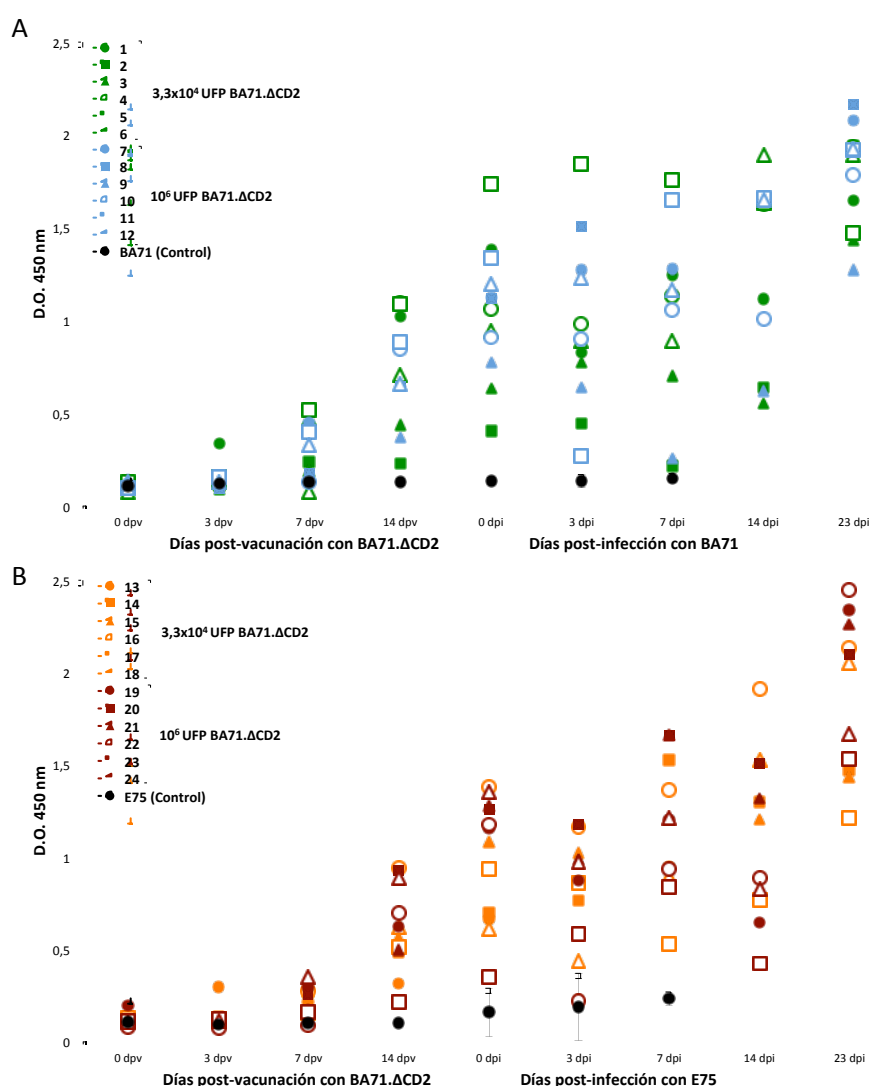


Figura 44: Cinética de detección de anticuerpos específicos frente al VPPA mediante ELISA antes y después de la vacunación con $3,3 \times 10^4$ UFP o 10^6 UFP BA71.ΔCD2 y tras la infección con una dosis letal de BA71 (A) o E75 (B). En negro se muestra la media de los valores obtenidos a partir de los cerdos control sin vacunar, así como la desviación estándar correspondiente a los mismos.

En lo que atañe a la respuesta celular, la vacunación con BA71.ΔCD2 indujo de nuevo una clara respuesta T-específica en todos los casos, detectable tanto antes de desafío como en el momento del sacrificio. Como ya había sido descrito para dosis bajas, se detectó una frecuencia de más de 150 células T-específicas por millón de PBMCs en el momento del desafío y de más de 300 en el momento de la necropsia (Figura 45), muy probablemente reflejando su proliferación en respuesta al desafío *in vivo*.

	Células T secretoras de IFN-γ / millón de PBMCs					
	Antes del desafío		Post-infección con BA71		Post-infección con E75	
	BA71	E75	BA71	E75	BA71	E75
3,3x10⁴ UFP BA71.ΔCD2	>150	>150	>300	>300	>300	>300
10⁶ UFP BA71.ΔCD2	>150	>150	>300	>300	>300	>300

Figura 45: Tabla resumen de las células T secretoras de IFN-γ específicamente frente al VPPA detectadas por ELISPOT antes y después de la infección con BA71 y E75 para los dos grupos vacunales.

4.3 BA71.ΔCD2 protege frente a la infección con Georgia07

Tras los buenos resultados obtenidos en los experimentos anteriores, quisimos comprobar el potencial de nuestra vacuna frente a la cepa de VPPA que está actualmente circulando en Europa, Georgia07.

4.3.1 Eligiendo una dosis letal óptima de Georgia07 para los ensayos de protección

Previo a la ejecución de este ensayo de protección, realizamos un estudio piloto para determinar la dosis óptima de infección con Georgia07, el cual queda resumido en el siguiente esquema (Figura 46).

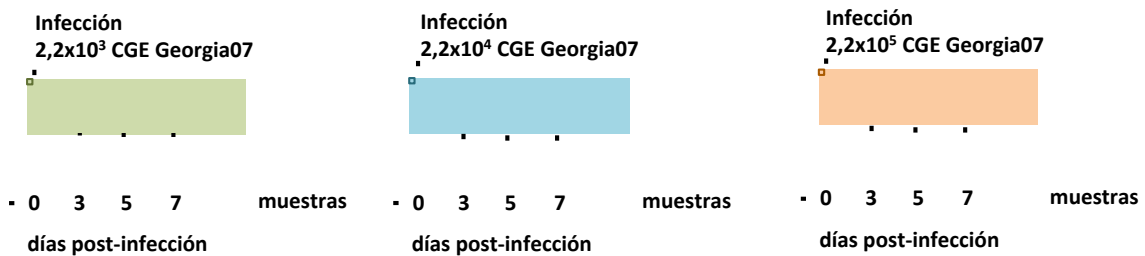


Figura 46: Esquema sobre la planificación del experimento *in vivo*. Distribución de los 12 animales en 3 grupos, cada grupo fue inoculado con una dosis diferente de Georgia07. Dosis baja 2,2x10³ CGE (verde), dosis intermedia 2,2x10⁴ CGE (azul) y dosis alta 2,2x10⁵ CGE (naranja).

Como cabía esperar de lo descrito en la literatura, la alta patogenicidad de Georgia07 quedó patente, siendo capaz de matar al 100% de los animales infectados en menos de 10 días (Figura 47), incluso a la dosis más baja ensayada: $2,2 \times 10^3$ CGE. Como hecho diferencial más significativo, cabe destacar la acelerada aparición de bajas tras la infección con la dosis más elevadas, registradas entre los días 6 y 8 tras la infección con $2,2 \times 10^5$ CGE de Georgia07 (Figura 47).

Coincidiendo con las curvas de mortalidad, la aparición de síntomas clínicos de PPA, así como la intensidad de los mismos, incluyendo fiebre (Figura 48), así como la cinética de aparición de virus en sangre como los títulos virales alcanzados en la misma (Figura 49) correlacionan de cierta manera con la dosis de virus inoculada, aunque la alta patogenicidad del aislado impidió observar diferencias estadísticamente significativas, resultando letal incluso para las dosis más bajas escogidas.

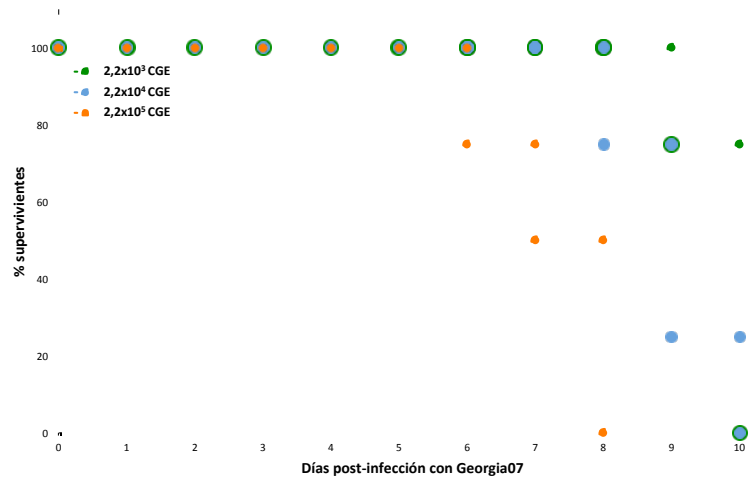


Figura 47: Porcentaje de supervivencia de cerdos infectados con el aislado Georgia07 a distintas dosis: $2,2 \times 10^3$ CGE (línea en verde), $2,2 \times 10^4$ CGE (línea en azul) y $2,2 \times 10^5$ CGE (línea en naranja).

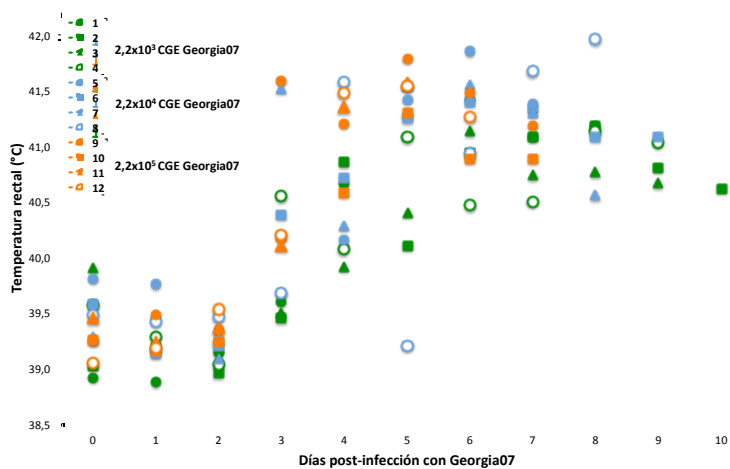


Figura 48: Evolución de la temperatura rectal en °C de cerdos infectados con tres dosis diferentes del aislado Georgia07, $2,2 \times 10^3$ CGE (líneas en verde), $2,2 \times 10^4$ CGE (líneas en azul) y $2,2 \times 10^5$ CGE (líneas en naranja).

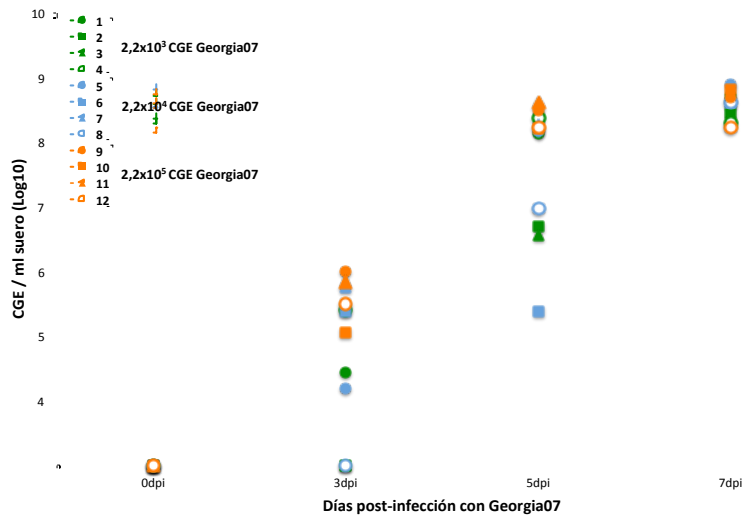


Figura 49: Cinética viral en suero de cerdos infectados con tres dosis diferentes del aislado Georgia07, $2,2 \times 10^3$ CGE (líneas en verde), $2,2 \times 10^4$ CGE (líneas en azul) y $2,2 \times 10^5$ CGE (líneas en naranja).

Estos datos junto con los hallazgos anatomopatológicos descritos durante la necropsia de los animales, posibilitó realizar un estudio comparativo con la patogenicidad de los dos aislados de VPPA virulentos utilizados a lo largo de esta tesis: BA71 y E75, permitiéndonos seleccionar 10^3 CGE de Georgia07 como la dosis a emplear en subsiguientes experimentos, la misma dosis utilizada para BA71.

4.3.2 Evaluación del potencial protector de Ba71.ΔCD2 frente a Georgia07

Una vez fijada la dosis de infección para Georgia07, pasamos a evaluar el potencial de nuestra vacuna frente a esta cepa de VPPA, actualmente circulando por Europa. Los detalles experimentales seguidos se resumen a continuación con la Figura 50. En esta ocasión, y con el objetivo de aumentar la casuística, se inocularon 10 cerdos intramuscularmente con 10^6 UFP de BA71.ΔCD2, para, 28 días después, infectarlos con una dosis letal de 10^3 CGE de Georgia07.

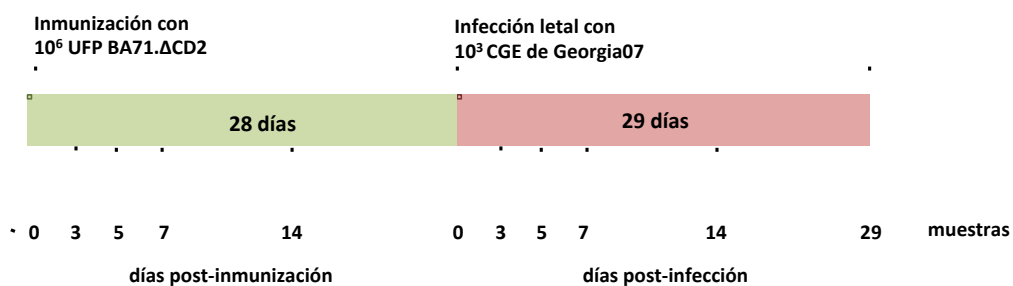


Figura 50: Esquema sobre la planificación del experimento *in vivo*, donde 10 animales fueron inmunizados con 10^6 UFP de BA71.ΔCD2 y que tras 28 días fueron infectados con una dosis letal de Georgia07.

Confirmando la idoneidad de la dosis de Georgia07 elegida, 10^3 CGE resultó suficiente para matar a todos los animales control entre los días 9 y 11 pi (Figura 51) mostrando severos signos clínicos típicos de PPA aguda, incluyendo la aparición de cuadros febriles a partir del día 5 pi (Figura 52). En claro contraste, los animales inmunizados con 10^6 UFP de BA71.ΔCD2 sobrevivieron al desafío letal con la cepa Georgia07 (Figura 51), confirmando la capacidad de protección cruzada que tiene nuestra vacuna experimental, incluso frente a cepas de virus tan distantes filogenéticamente como lo son BA71 (virus parental del que procede nuestra vacuna) y Georgia07 englobados en Genotipos del VPPA diferentes.

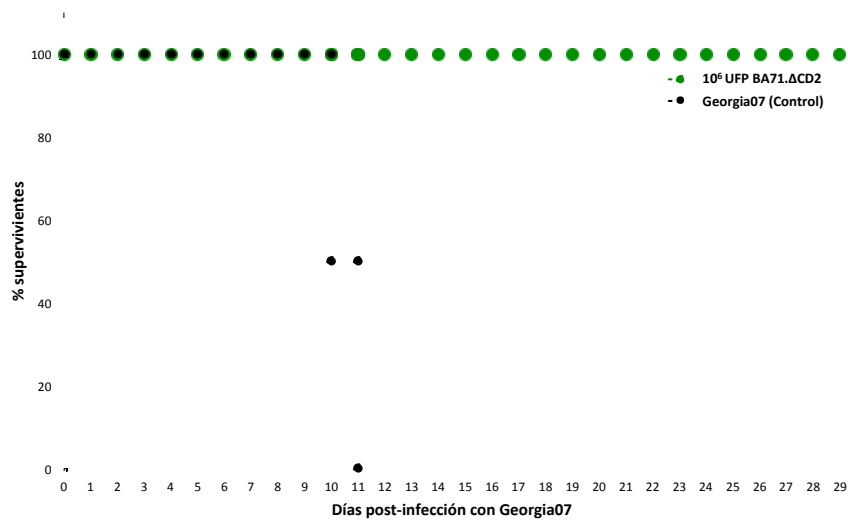


Figura 51: Porcentaje de supervivencia de cerdos inmunizados con 10^6 UFP de BA71.ΔCD2 (línea en verde) y de los animales control sin inmunizar (línea en negro) tras el desafío con una dosis letal de Georgia07.

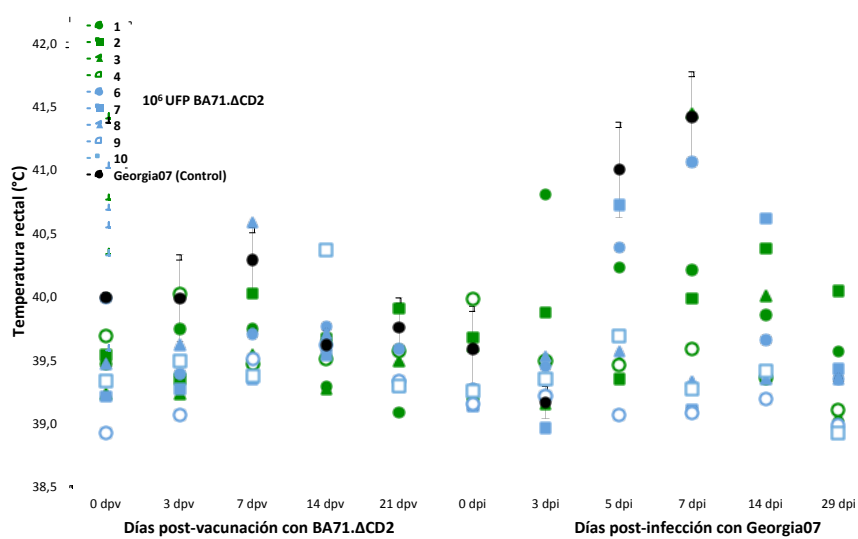


Figura 52: Evolución de la temperatura rectal en °C de cerdos inmunizados con 10^6 UFP de BA71.ΔCD2 junto con la temperatura media alcanzada por los animales control sin vacunar y su desviación estándar (línea en negro) desde el día de inmunización y tras el desafío con una dosis letal de Georgia07.

Confirmado el grado de protección conferido, 5 de los animales vacunados con BA71.ΔCD2 (números 1, 4, 6, 8 y 9) se mostraron libres de virus en sangre en todos los momentos evaluados tras la infección, mientras que en los 4 restantes (números 2, 3, 7 y 10) se detectó un leve pico de viremia en sangre, pero el título máximo de virus alcanzado fue mucho menor que en el caso de los controles, oscilando entre 10^4 y 10^5 CGE/ml de suero, estando todos ellos libres de virus detectable al final del experimento (Figura 53). En claro contraste, tras la infección con 10^3 CGE de Georgia07 todos los animales control mostraron altos títulos de virus en sangre, alcanzando 10^9 CGE a día 7 pi (Figura 53).

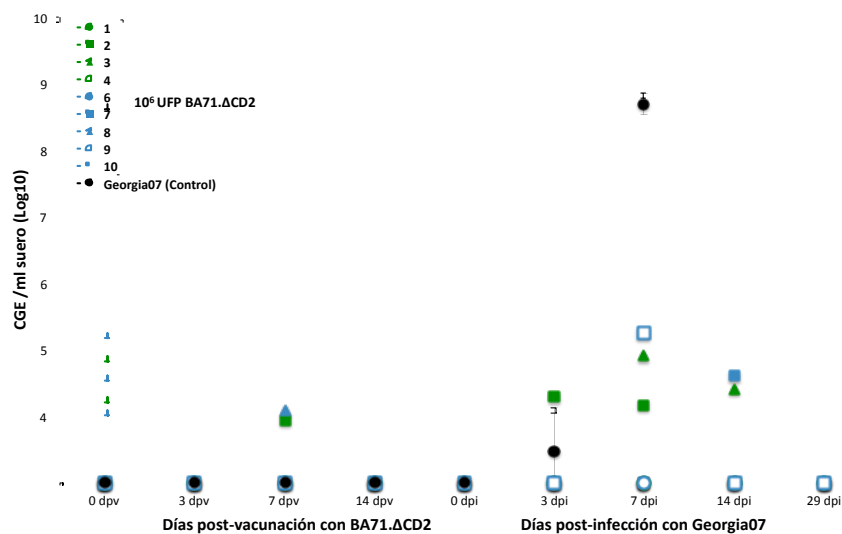


Figura 53: Cinética viral en suero de cerdos inmunizados con 10^6 UFP de BA71.ΔCD2 (líneas en verde y azul) tras la inmunización y tras el desafío con una dosis letal del Georgia07. En negro se muestra la media de los valores obtenidos a partir de los cerdos sin vacunar hasta así como la desviación estándar correspondiente.

Como en otras ocasiones, los datos clínicos del desarrollo de la enfermedad tras el desafío con Georgia07, reflejados con la cinética de aparición de fiebre (Figura 52), encajaron perfectamente con los datos de viremia. Los datos de viremia, coinciden a la perfección con los datos de secreción viral, siendo 4 Log mayores en los animales control que en algunos de los animales inmunizados en los que se detecta secreción (datos no mostrados).

4.3.3 BA71.ΔCD2; un prototipo vacunal experimental que necesita mejorar su bioseguridad

Independientemente del aparente grado de bioseguridad que en los experimentos preliminares había demostrado BA71.ΔCD2, tanto usando 10^3 como $3,3 \times 10^4$ o 10^6 UFP, en esta ocasión, la inoculación de 10^6 UFP provocó la inesperada muerte de uno de los 10 animales intramuscularmente inoculados (cerdo número 5) tras sufrir claros signos de PPA, incluyendo fiebre alta detectable entre los días 7 y 10 pi (figura 54) y viremias elevadas que alcanzaron $2,44 \times 10^8$ CGE/ml (Figura 55), obligando a su sacrificio.

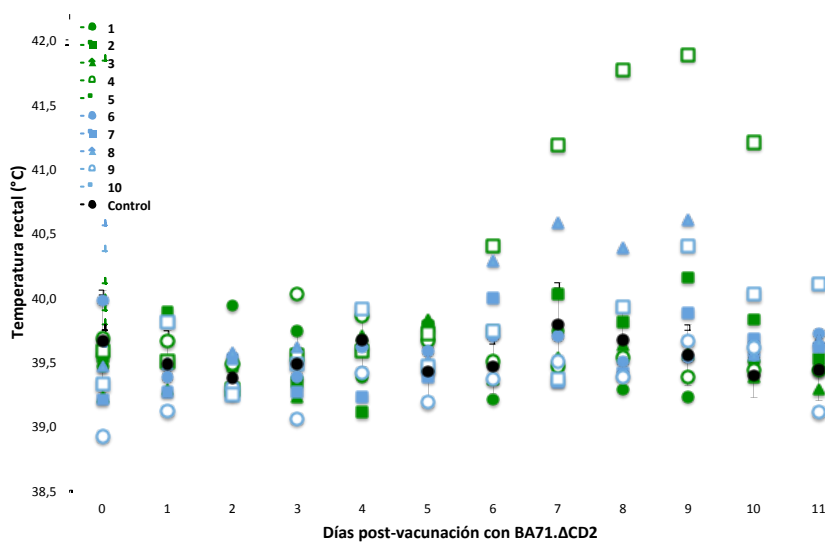


Figura 54: Evolución de la temperatura rectal en °C de los cerdos tras la inoculación de 10^6 UFP de BA71.ΔCD2. La elevada fiebre sufrida por el animal número 5 que obligó a su sacrificio a día 10 pi.

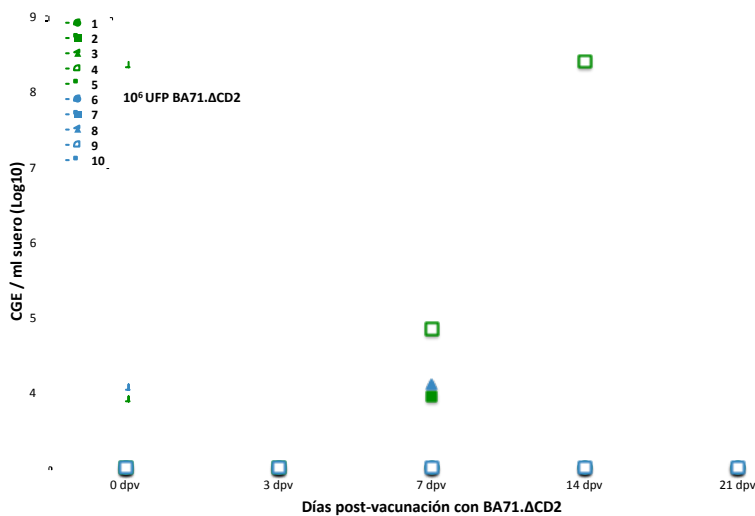


Figura 55: Cinética viral en suero de cerdos inmunizados con 10^6 UFP de BA71.ΔCD2.

Independientemente de las causas que expliquen este inesperado hallazgo, la realidad confirma la necesidad de mejorar la bioseguridad de BA71.ΔCD2, sobre todo pensando en su utilización en campo. En su correspondiente sección se discute más detalladamente tanto las posibles razones que expliquen estos inesperados hallazgos como posibles alternativas para mejorar la seguridad de nuestra vacuna.

4.3.4 Análisis de la respuesta humoral y celular

La protección frente a Georgia07 correlaciona en la mayoría de los casos con la detección de anticuerpos y células T-específicas frente al virus. Todos los cerdos inmunizados con BA71.ΔCD2, a excepción del animal número 5 (sacrificado) y los animales número 1 y 4, desarrollaron anticuerpos específicos detectables antes del desafío letal. Tras la inoculación de Georgia07, los niveles de anticuerpos de todos los animales, incluyendo también a los animales número 1 y 4, se vieron incrementados rápidamente desde tan pronto como 3 dpi y alcanzando niveles máximos a día 29 pi (Figura 56).

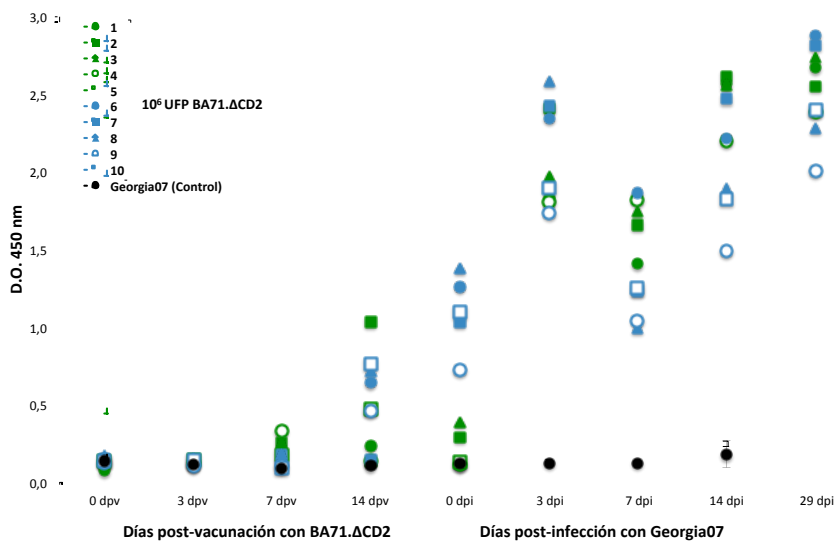


Figura 56: Cinética de detección de anticuerpos específicos frente al VPPA mediante ELISA antes y después de la vacunación con BA71.ΔCD2 y tras la infección con una dosis letal de Georgia07, tanto de cerdos inmunizados con BA71.ΔCD2 como de los controles sin vacunar (línea en negro, se muestra la media y la desviación estándar).

Adicionalmente, los 9 animales desafiados y que sobrevivieron, desarrollaron una respuesta específica de células T secretoras de IFN-γ frente a la estimulación *in vitro* con Georgia07,

detectable tanto antes como después del desafío, de nuevo observándose un *boost* en la misma tras el desafío virulento (Figura 57). Como cabía esperar ninguno de los animales control tuvo tiempo de desarrollar ningún tipo de respuesta inmune específica frente al virus, al menos detectables con las técnicas disponibles.

	Células T secretoras de IFN- γ / millón de PBMCs	
	0dpi	29dpi
10 ⁶ UFP de BA71. Δ CD2	>150	>300

Figura 57: Tabla resumen de las células T-secretoras de IFN- γ específicamente frente a Georgia07 detectadas por ELISPOT de los animales inmunizados con BA71. Δ CD2 antes y después de la infección con una dosis letal de Georgia07.

4.4 Virus inducibles como potenciales vacunas frente a la PPA: Datos preliminares

4.4.1 BA71. Δ CD2.pp220i

Como ya se describió en la introducción y al inicio de esta sección, BA71. Δ CD2 fue diseñado como un virus intermediario para producir virus inducibles, siendo el primer candidato a producir BA71. Δ CD2.pp220i, virus inducible que en el caso de reproducir el fenotipo descrito en células Vero utilizando la cepa apatógena del VPPA BA71V, debería ser capaz de provocar un ciclo único de infección *in vivo* (en ausencia de IPTG) y la generación de viriones vacíos de contenido genético: vacuna ideal en teoría desde el punto de vista de inmunogenicidad y seguridad. Desafortunadamente, todos los intentos de obtener el BA71. Δ CD2.pp220i fracasaron y muy a nuestro pesar la generación de este virus inducible no fue posible. Tras múltiples intentos de recombinación homóloga del virus BA71. Δ CD2 con el plásmido pIND2.pp220 no se consiguieron aislar virus que incorporasen el promotor inducible que controla a la expresión gen de la pp220. Esto, junto con los buenos resultados obtenidos con el virus intermedio BA71. Δ CD2 hizo que la generación del virus inducible para la pp220 pasase a un segundo plano en cuanto a nuestras prioridades.

4.4.2 BA71. Δ CD2.PKi; un nuevo virus virulento inducible y el primero carente de CD2v

Teniendo en mente que la generación de un virus inducible obtenido a partir del BA71. Δ CD2, podría representar una alternativa válida para mejorar la seguridad de la vacuna atenuada,

decidimos explorar otros candidatos alternativos a la pp220: seleccionado en esta ocasión para hacer el inducible, el gen de la Serina Proteína Quinasa (PK) del VPPA (R298L), gen esencial del VPPA (datos no mostrados) y de gran interés por su posible implicación en muy diversos aspectos de la morfogénesis viral y del ciclo celular, incluyendo en la fase nuclear del virus, confirmada en nuestro laboratorio (Ballester *et al.*, 2011). Así, pues, y siguiendo los protocolos descritos en la sección de Materiales y Métodos, se generó con éxito el virus inducible BA71.ΔCD2.PKi. Tras su obtención, se comprobó la eficiencia del sistema de inducción y represión mediante Western blotting con extractos de células infectadas en presencia y ausencia del inductor (IPTG) y utilizando anticuerpos específicos generados en conejo (Eurogentec) frente a la PK (Figura 58), y efectivamente, pudimos comprobar la correcta represión e inducción del gen PK.

El Western blotting, así como los ensayos de inmunofluorescencia realizados con posterioridad, dejaron en evidencia el hecho de que el anticuerpo anti-PK estaba probablemente reconociendo, además de la PK viral, muchas otras quinasas celulares, hecho que, pese a permitirnos por Western blotting comprobar la inducción y represión del gen de la PK, no nos permitió llevar a cabo los ensayos que teníamos en mente (sobre todo inmunofluorescencias) para poder caracterizar más profundamente el virus inducible.

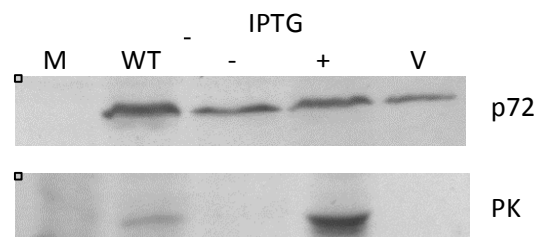


Figura 58: Muestra la expresión de la proteína mayoritaria de la cápsida viral, p72, y de la proteína inducible PK en el virus BA71.ΔCD2.PKi detectado mediante Western blotting. Extractos de células COS-1 no infectadas (M) e infectadas durante 18 horas con el virus parental BA71 (WT) o con el virus recombinante BA71.ΔCD2.PKi en ausencia (-) o presencia (+) de IPTG 500 μM utilizando el anticuerpo anti-p72 (1/1.000) y anti-PK (1/200). Se analizó también una muestra de virus purificado (4 μg) (V).

Por otro lado, el virus se utilizó para realizar una cinética del crecimiento de BA71.ΔCD2.PKi en células COS-1 en presencia y en ausencia de IPTG. Como se esperaba en presencia de IPTG el virus seguía una cinética normal de crecimiento, la cual era comparable a la del virus parental (Figura 59A y B).

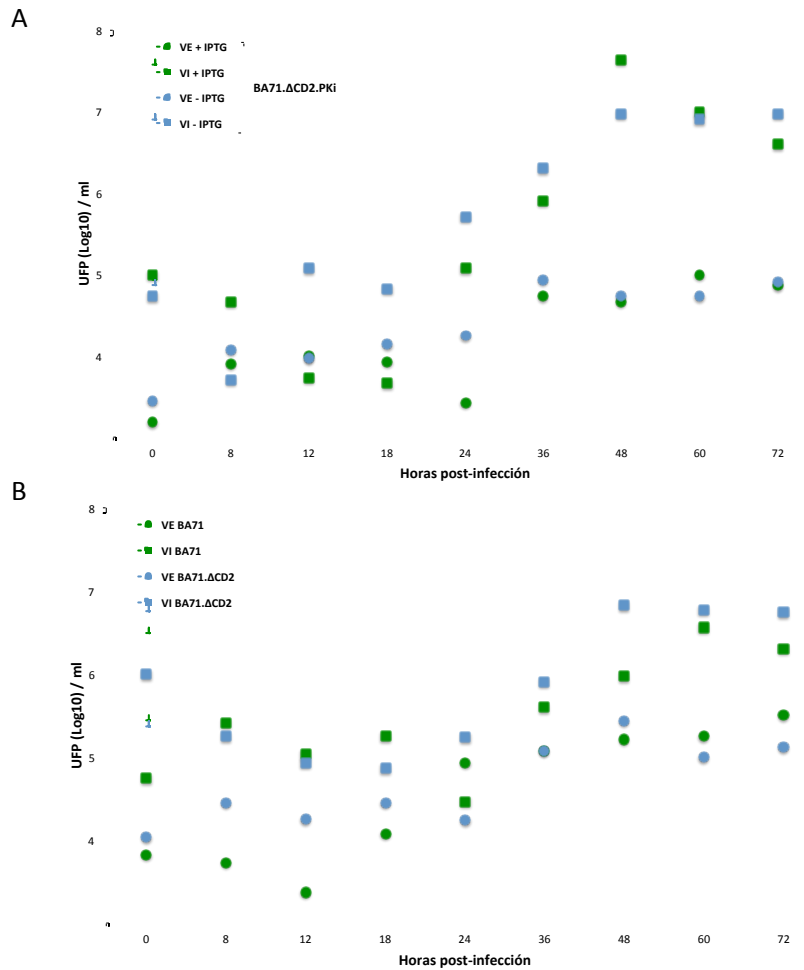


Figura 59: Cinética de crecimiento viral en células COS-1 determinado mediante titulación por placas de lisis de (A) el virus inducible BA71.DCD2.PK1 en presencia de IPTG (líneas en verde) y ausencia del mismo (líneas en azul) y (B) de los virus parentales BA71 y BA71.DCD2. Se diferencia entre VI (virus intracelular) y VE (virus extracelular).

Sin embargo, se pudo comprobar que en ausencia de IPTG el virus crecía también aparentemente sin problemas, hecho totalmente inesperado puesto que previamente en el laboratorio se había intentado generar sin éxito un mutante de delección para la PK, lo que nos dejaba entrever que la PK resultaba indispensable para el virus. Quizás que la incapacidad del virus delecionado de PK de ser obtenido no se debía a su esencialidad sino a la imposibilidad de rescatar placas recombinantes; y en segundo lugar, que la PK puede estar involucrada en una fase final de la morfogénesis viral que permite la liberación del virus al medio.

Además de esto, el fenotipo observado gracias a la microscopía electrónica tampoco reveló diferencias entre el virus *wild type* y el virus inducible en presencia y ausencia del inductor, por lo que en cualquier caso, es necesario más trabajo para la comprensión del papel que la PK juega en el ciclo viral.

La obtención de este virus inducible, además de para múltiples estudios básicos, se pensó que podría servir para inmunizar animales eficientemente aumentando un poco más la seguridad del virus. Pero desafortunadamente, las últimas evidencias obtenidas en el laboratorio restan un poco de atractivo a su utilización *in vivo*, experimento que sin embargo va a llevarse a cabo en un futuro inmediato. En la discusión se barajarán las posibilidades vacunales que este inducible puede presentar *in vivo* así como otros posibles genes candidatos para generar inducibles con propósito vacunal.

5. DISCUSIÓN

En un intento de no convertir este apartado en una sección redundante con la de la Introducción y Resultados, hemos intentado dividir la Discusión en 6 apartados, correspondiendo con los puntos en los que los resultados han generado más preguntas que respuestas. Se trata de un ejercicio de auto-reflexión que esperamos sirva tanto para discutir los resultados obtenidos a lo largo de esta Tesis como para intentar ordenar nuestras ideas para el futuro inmediato.

De una manera resumida, el logro principal de este trabajo se puede resumir en el desarrollo de una vacuna viva atenuada: BA71.ΔCD2, capaz de proteger frente a la infección experimental con dosis letales no sólo del virus homólogo BA71, sino también, sólidamente y por primera vez para el caso de la PPA (Mulumba-Mfumum *et al.*, 2015), frente a virus heterólogos tan distantes filogenéticamente del BA71 (Genotipo I) como el Georgia2007 (Genotipo II) que actualmente circula por el continente Europeo. A pesar de lo impresionante de los resultados, nuestro prototipo vacunal se encuentra con serias dificultades para su inmediata utilización en el campo por motivos de bioseguridad, sobre todo si se utiliza a dosis muy elevadas, como discutiremos más adelante. A priori uno pensaría que el campo de pruebas ideal para probar la vacuna a gran escala sería, sin duda alguna, regiones endémicas ya azotadas por el virus como podrían ser los países del Cáucaso, afectados desde hace años, o, aún con más razones, los países del África subsahariana donde el virus causa verdaderos estragos desde hace décadas. Si bien es cierto que la circulación concomitante de múltiples genotipos virales aumentaría la probabilidad de recombinación con nuestro virus vacunal, ¿qué peligro supondría la más que improbable aparición de BA71 virulento, al fin y al cabo un virus de procedencia Africana y probablemente presente entre la múltiples cepas presentes en la zona? A nuestro juicio, los beneficios que la vacunación masiva con BA71.ΔCD2 podrían acarrear a la zona, serían mucho más elevados que el riesgo en sí inherente a la vacunación. En el hipotético caso de que se autorizara su utilización y volviendo a la realidad: ¿Quién se haría cargo de los gastos de producción, conservación y administración que una campaña de vacunación de estas características acarrearían? Esta es sin duda una pregunta que merecería ser discutida en profundidad pero que desafortunadamente escapa a nuestro dominio.

La situación está mucho más clara en el caso de zonas libres de la enfermedad como la UE, muy probablemente escarmentada por dramáticas experiencias anteriores con otras vacunas atenuadas de VPPA que demostraron ser responsables de la aparición de animales portadores inaparentes del virus lo que facilitó la propagación de la enfermedad, haciendo aún más difícil su erradicación (Manso Ribeiro, 1962; Sanchez Botija, 1963). Así pues, antes de contemplar su utilización en el campo, se exigiría solucionar al menos dos problemas cruciales: 1) la virulencia

residual de BA71.ΔCD2 y 2) la dificultad de diferenciar a los animales vacunados de los infectados; problemas ambos que impiden su introducción en mercados como el de la UE que aboga por una política de no-vacunación y sacrificio masivo de casos confirmados y sospechosos, considerando la vacunación, si acaso, en casos de extrema emergencia.

- **Vacunas Vivas: pasado, presente y futuro**

La vacunación está considerada, sin ningún género de duda, como uno de los mayores inventos del género humano. Desde su descubrimiento en 1796 por Edward Jenner, se calcula que las vacunas han salvado más vidas que muertes han supuesto todas las guerras de la humanidad juntas. A pesar de ello, en pleno siglo XXI sólo han conseguido ser erradicadas dos enfermedades del planeta y en ambos casos, las campañas de erradicación habrían sido imposibles sin el apoyo de una vacuna eficaz. Este fue el caso tanto de la erradicación de la viruela en humanos como la más reciente erradicación de la Peste Bovina en animales, para las que se disponían de vacunas vivas atenuadas muy eficaces (Greenwood, 2014; Normile, 2010). A pesar de los avances de la biología molecular, la gran mayoría de las vacunas humanas y veterinarias consisten en vacuna vivas atenuadas; a día de hoy imbatibles en el balance respuesta inmune/protección que provocan a pesar de sus limitaciones en bioseguridad, principalmente derivadas de su naturaleza biológica. Este concepto, la seguridad, impediría muy probablemente la aceptación en el mercado de nuevas vacunas similares a las que a día de hoy se prescriben a nuestros bebés y diseñadas hace décadas, permitiendo salvar millones de vidas en un momento en el que la presión epidemiológica de alguno de estos patógenos era mucho mayor que la que a día de hoy disfrutamos.

Observando hoy las medidas exigidas por las Autoridades Sanitarias Nacionales e Internacionales de Seguridad Médica, una nueva vacuna ha de cumplir unos requisitos de seguridad que multiplican por mucho las de eficacia; primando así cualquier peligro que ésta pudiera provocar a la salud pública. Esta realidad se hace muy patente a día de hoy en el mercado veterinario, con multitud de vacunas de dudosa eficacia, pero con probada seguridad, presentes en el mercado.

- **PPA, una enfermedad considerada exótica y erradicada en nuestras fronteras**

Independientemente de nuestra opinión personal, la realidad a día de hoy hace que cualquier vacuna diseñada contra la PPA, independientemente de su eficacia, ha de demostrarse totalmente segura si quiere ser comercializada en zonas declaradas como libres de la enfermedad como es el caso de la UE y la práctica totalidad de los países con los que ésta

mantiene relaciones comerciales estables, con los EEUU a la cabeza. A día de hoy, una vacuna frente a la PPA ha de demostrar ser inocua para el animal que lo recibe y no transmisible para aquellos que lo rodean, siendo además esencial que cumpla el concepto DIVA: es decir, que provoque una respuesta inmune diferenciable de la infección natural.

Ejemplos de la existencia de vacunas sumamente efectivas pero que no se utilizan en territorio de la UE por no cumplir este último requisito tenemos varios, siendo quizás los más dramáticos los que afectan a la Peste Porcina Clásica (PPC), a la Fiebre Aftosa (FA) y más recientemente a la Lengua Azul, tres de las enfermedades veterinarias más importantes para las que, a pesar de existir vacunas muy eficaces en el mercado, sólo se vacuna en zonas endémicas. El hecho de que en la UE sólo se utilice la vacunación en casos de emergencia, prefiriendo basar el control en la vigilancia diagnóstica y sacrificio masivo de los animales infectados y en contacto, no es una medida exenta de polémica y se encuentra en continua revisión (Caporale & Giovannini, 2010; Greiser-Wilke & Moennig, 2004). Al igual que hoy estamos asistiendo a un intenso debate entre los partidarios y los detractores de la vacunación en humanos, este mismo debate se encuentra en plena efervescencia también para las vacunas veterinarias y, desafortunadamente, en ambos casos es difícil discernir entre los argumentos puramente científicos de aquellos puramente éticos o interesados. Que la vacunación ha salvado y mejorado nuestras vidas es indiscutible, y que cualquier vacuna que se quiera implementar ha de ser sometida a los más estrictos controles son realidades indiscutibles. La utilización o no de las herramientas disponibles ha de ser objeto de un debate que debería mantenerse al margen de cualquier análisis subjetivo y buscando un bien común no individual.

Con esta premisa en mente, la realidad es que una evaluación detallada de las posibilidades de éxito de comercialización de una vacuna de las características de BA71.ΔCD2 a día de hoy, dejan un margen muy pequeño de utilización, restringiéndola a casos de extrema emergencia en nuestro territorio. La posibilidad de ser aplicada en zonas endémicas azotadas por la enfermedad aumentaría siempre que hubiera alguna organización benefactora que se hiciera cargo de los costes de fabricación y correcta aplicación de la misma, tarea nada fácil de prever si se tiene en cuenta que para su producción se exigen instalaciones de alta seguridad Biológica nada económicas de mantener.

Así pues, con estas premisas en mente y a pesar de los fantásticos resultados de protección obtenidos, éstos son dos de los grandes campos de trabajo en los que se debería intentar avanzar: seguridad y DIVA.

- **Mejorando la seguridad y trazabilidad de BA71.ΔCD2: Una tarea no tan sencilla de llevar a cabo**

Siendo conscientes de las dificultades que entraña el objetivo planteado, en nuestro laboratorio se plantea seguir varias estrategias en paralelo que pasamos a discutir.

- *Utilización de VPPA inducibles como vacunas*

Como ya se ha descrito a lo largo de la Tesis, éste fue el planteamiento inicial que intentamos seguir como estrategia vacunal, aunque los éxitos de nuestro prototipo BA71.ΔCD2, construcción diseñada inicialmente como intermediaria para la obtención de virus inducibles, hizo que dejáramos a un lado nuestros esfuerzos iniciales. El primer candidato en el que hemos puesto más esperanzas en un principio es BA71.ΔCD2.pp220i prototipo que debería rendir partículas virales con los dominios externos (envuelta interna, cápsida y envuelta externa) pero carentes del *core* incluido el material genético (Andrés *et al.*, 2002), teóricamente ideales inductoras de respuesta inmune y totalmente seguras por tratarse de virus de ciclo único *in vivo*. BA71.ΔCD2.pp220i debería además rendir una respuesta inmunológica distinguible de los animales infectados (concepto DIVA) de forma natural, teóricamente, ver limitada la producción de anticuerpos únicamente a proteínas estructurales, pero no hay antecedentes de esto, así que habría que esperar a su comprobación *in vivo*.

Dos son, sin embargo, los riesgos principales de la utilización de virus inducibles como vacunas, siendo el principal de ellos la incertidumbre de si una inmunización de este tipo (un único ciclo) sería suficiente para provocar una respuesta inmunitaria protectora frente al VPPA, aunque es cierto que el éxito comercial de vacunas basadas en vectores de ciclo único como los Canarypox (webveterinaria.com/merial/canarypox.pdf), nos permite ser optimistas. El segundo hándicap de los virus inducibles provendría de potenciales fallos en el sistema de inducible *in vivo*, bien por fugas del sistema o bien por mutaciones en el sistema de represión que provocaría la reversión del inducible hacia un virus virulento; pero en este caso, aunque se produjese un fallo en el sistema de inducción y la pp220 se sintetizase de forma normal, el virus que se produciría sería el BA71.ΔCD2, un virus atenuado y seguro para el animal. Otra alternativa que estamos barajando en la actualidad y que resulta mucho más atractiva para las autoridades reguladoras sería la de sustituir el sistema de inducibles por un sistema de complementación basado en la obtención de líneas celulares empaquetadoras que suministrarían la proteína esencial en trans. En este caso reevaluaríamos la selección de los candidatos, ya que bien podríamos trabajar con enzimas esenciales necesarias en mucha menor concentración que proteínas estructurales como pp220. Vacunas de este tipo se han probado con éxito experimentalmente en multitud de modelos e incluso actualmente se

utilizan para la producción de vacunas estacionales frente a la gripe humana (Lee, 2014).

- *Generación de virus delecionados en más de un locus*

Disponer de una vacuna delecionada en más de un factor de virulencia presenta ventajas indiscutibles sobre mutantes simples, siendo la primera de ellas el disminuir exponencialmente las probabilidades de que se obtengan virus revertientes virulentos. Sin embargo, uno de los motivos que ha complicado la tarea de producir una vacuna frente al VPPA es justamente la enorme complejidad del virus. Con más de 150 genes codificados, no resulta fácil decidir cómo seleccionar los factores de virulencia a eliminar. Dos son los avances que más han colaborado en este sentido: la secuenciación completa de genomas del VPPA virulentos y atenuados naturales, así como apatógenos por paso en cultivo celular, y la aplicación de las metodologías recombinantes al desarrollo de VPPA modificados genéticamente (García-Escudero *et al.*, 1998). La comparación de los genomas de cepas con distinta capacidad para infectar al cerdo ha permitido identificar secuencias potencialmente implicadas en virulencia y la generación de virus recombinantes demostrar tal implicación. De entre los candidatos eliminados con éxito a partir de virus virulentos que en mayor o menor medida han atenuado la patogenicidad del virus y han permitido conferir protección frente a virus homólogos, cabe destacar al gen 9GL y a un grupo de genes de las MGF 360 y 505, cuya deleción provocaba una atenuación muy significativa cuando se eliminaban del virus Malawi Lil-20/1 (Lewis *et al.*, 2000; Neilan *et al.*, 2002). Sorprendentemente, la deleción de estos mismos fragmentos en el virus Georgia2007 provocaba un fenotipo mucho menos atenuado, manteniendo su capacidad de matar a dosis medias y altas (O'Donnell *et al.* 2015a; O'Donnell *et al.* 2015b). Disparidades similares en los resultados obtenidos resultan un continuo para el caso de VPPA y de hecho han dado lugar a esta Tesis y el caso del CD2 viral: cuya deleción atenuaba totalmente a BA71V y apenas levemente a Malawi Lil-20/1 (Borca *et al.*, 1998). Estos resultados demuestran la gran variabilidad de un virus, que a pesar de poseer un genoma dsADN, puede jugar con la redundancia, en gran medida fruto de su gran tamaño. La complejidad del virus se ha reflejado incluso en la obtención de efectos contrarios a lo esperado tras su manipulación genética. Así, la deleción de factores de virulencia a partir de un aislado natural atenuado abolía totalmente la capacidad protectora del mismo (Abrams *et al.*, 2013), evidenciando el fino equilibrio existente entre virulencia, atenuación y apatogenicidad para el caso del VPPA. Esta realidad ha sido refutada más recientemente tras secuenciar de manera seriada tanto al virus parental Georgia07 antes como después de su adaptación y pase seriado en células Vero (Krug *et al.*, 2015), aunque, desafortunadamente, explicar el fenómeno de atenuación está resultando ser más esquivo de lo esperado. La infección *in vivo* con cada uno de estos pases de virus

efectivamente pasó desde una infección aguda y mortal a la total apatogenicidad del aislado coincidiendo con la pérdida de importante material genético, aunque desafortunadamente, ninguno de los virus intermediarios utilizados pudo ser utilizado como vacuna eficaz, impidiendo identificar los factores de virulencia clave en este caso concreto. En la discusión, los autores justifican esta realidad con la existencia en cada pase en cultivo de una mezcla de aislados virales que dificultaba el análisis, dando una vez más muestra de la enorme complejidad del virus.

Con todos estos datos en mente, no resulta sencillo seleccionar un segundo gen a deletar sobre nuestro virus vacunal: BA71.ΔCD2. Idealmente, habríamos de intentar seleccionar un gen que permitiera:

1. Aumentar la seguridad de la vacuna, evitando su excreción y potencial diseminación.

Este no resulta un asunto trivial ya que a la dificultad de acertar con un segundo factor de virulencia y que éste actúe de forma sinérgica con la ausencia de CD2v, hemos de evitar a toda costa la inactivación del virus, pues, como ya hemos visto, se necesita un cierto grado de replicación para conseguir conferir protección.

2. Diferenciar animales vacunados de infectados. Sería ideal que el segundo factor a eliminar no sólo mejorase la seguridad de la vacuna sino que además incorporara el valor añadido de afectar a un gen que codifique por una proteína suficientemente inmunogénica como para facilitar el desarrollo de un método diagnóstico DIVA basado en el gen deletado. Desafortunadamente, el gen CD2v quedó descartado con este propósito por su baja inmunogenicidad. La existencia de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación o hemadsorción, aunque producidos *in vivo*, son demasiado bajos como para ser utilizados en diagnóstico (Malogolovkin *et al.*, 2015). En el peor de los casos, deberíamos generar una triple deleción en el que la tercera secuencia a eliminar permitiera el diagnóstico DIVA. De nuevo complicando la tarea, hemos de descartar a muchas de las proteínas más inmunodominantes del virus descritas hasta ahora: p30, p54, p72, pp62 y propuestas para el diagnóstico alternativo de la PPA (Alcaraz *et al.*, 1990; Gallardo *et al.*, 2006; Oviedo *et al.*, 1997), por tratarse de proteínas estructurales del virus que han demostrado ser esenciales para el virus y por tanto imposibles de eliminar.

Así pues, hemos de decantarnos por otros candidatos descritos como buenos inductores de respuesta inmune (Kollnberger *et al.*, 2002), esperando que no sean esenciales para el virus, o en caracterizar más en profundidad nuevos antígenos inmunorelevantes del VPPA utilizando aproximaciones proteómicas más complejas (Davies *et al.*, 2007).

- **BA71ΔCD2. Un modelo ideal para identificar antígenos crosprotectores**

Incluso contando con las mejores perspectivas, una vacuna basada en VPPA prácticamente completo va a contar siempre con las reticencias de las Autoridades Sanitarias de zonas libres de la enfermedad, recomendando mantener la guardia alta y seguir investigando en la obtención de vacunas de tercera generación, incluyendo en este concepto a vacunas de subunidades basadas en la expresión de proteínas o fragmentos de proteínas del virus con capacidad protectora a la vez que ofreciendo la máxima seguridad biológica exigida. En los próximos años esperamos asistir a una explosión de nuevos vectores de expresión comercialmente utilizables en nuestras granjas con propósitos vacunales: sorprenda o no, a día de hoy sólo un vector de estas características, basado en alfavirus ha sido aprobado para su uso en cerdos por las agencias competentes de EEUU (Harris Vaccines) y ninguno en la UE. Para cuando ese momento llegue nuestro deber será disponer de una batería de antígenos lo más completa posible con potencial protector frente a la PPA.

Este es el campo en el que nuestro laboratorio más ha estado trabajando desde hace más de una década gracias sobre todo a la financiación del Ministerio de Educación Español y que ha permitido demostrar hasta el momento (Argilagué et al. 2012; Argilagué et al. 2013; Lacasta et al. 2014) 1) Que la vacunación con ADN codificando unos pocos determinantes virales puede conferir protección frente a una infección letal con VPPA en ausencia de anticuerpos detectables antes del desafío; 2) Que la protección conferida tras la vacunación con mezclas más o menos complejas de ADN plasmídico correlacionaba con la inducción de respuestas T-CD8⁺ específicas dirigidas contra zonas muy distintas del genoma viral; 3) Que era posible identificar antígenos específicos con potencial protector, así como los epítomos T-CD8⁺ responsables de dicha protección; 4) Que el genoma viral disponía de un arsenal de potenciales antígenos protectores mucho más elevado de lo inicialmente previsto esperando a ser descubierto, abriendo la posibilidad a generar una vacuna de subunidades ampliamente protectora.

La disponibilidad en el laboratorio, por primera vez en la historia de una vacuna: BA71.ΔCD2, capaz de inducir un repertorio de células T-CD8 tan amplio como para permitir proteger frente a cualquier cepa de virus, abre una posibilidad ideal para intentar avanzar en el descubrimiento de antígenos protectores como sea posible. De una manera resumida, la idea es utilizar las PBMC de animales vacunados con BA71.ΔCD2 antes y después de la infección con cepas letales del virus y utilizarlos como células efectoras en ensayos de estimulación *in vitro* con una colección de péptidos disponibles en el laboratorio y sintetizados a partir del estudio

in silico del proteoma viral, utilizando para ello plataformas informáticas especializadas en la caracterización de péptidos CTL según su afinidad por las moléculas del SLAI (Correa Fiz, 2014) o por las moléculas transportadoras TAP (Argilaguet *et al.*, 2012; Diez-Rivero *et al.*, 2010). Estas estrategias ya han sido utilizadas con éxito en el laboratorio para caracterizar epítomos CTL con capacidad protectora (Argilaguet *et al.*, 2012; Correa Fiz, 2014 datos confidenciales). Alternativamente, las estimulaciones se realizarán con fibroblastos autólogos (aislados del mismo cerdo) transfectados con las colecciones de plásmidos disponibles en el laboratorio y utilizando de nuevo, protocolos optimizados disponibles en el laboratorio. La caracterización de tantos epítomos CTL como sea posible facilitaría ensayar una vacuna con capacidad protectora lo más amplia posible, primero utilizando la inmunización con ADN como herramienta y posteriormente, un vector de expresión más potente y con posibilidades comerciales, disponible por parte de nuestro socio empresarial, Boehringer Ingelheim, ya comprometido con el esquema aquí descrito.

- **La vacuna ideal**

Siendo conscientes de que una vacuna ideal debería ser capaz de provocar una respuesta lo más completa posible y no sólo limitarse a una respuesta CTL, deberían redoblarse los esfuerzos por intentar esclarecer la doble dicotomía existente entre anticuerpos que exacerban la viremia y anticuerpos que ayudan durante la infección para el caso de la PPA. El escaso tamaño de nuestro grupo sin embargo ha impedido hasta el momento plantearse objetivos tan específicos aunque no se descartan para el futuro. Si bien resulta indudable que la transferencia de inmunoglobulinas específicas pueden conferir protección parcial frente a una infección letal con el VPPA (Onisk *et al.*, 1994) y que anticuerpos inhibidores de la infección se han correlacionado con protección (Ruiz-Gonzalvo *et al.* 1996), mucho más controvertida resulta la correlación existente entre la presencia de anticuerpos capaces de neutralizar al virus *in vitro* y la protección *in vivo* (Escribano *et al.*, 2013), así como el papel de las proteínas descritas hasta el momento como capaces de inducirlos (Gómez-Puertas *et al.*, 1996; Neilan *et al.*, 2004). En este sentido, cabe destacar que igualmente indiscutible es la presencia concomitante de anticuerpos y virus en sangre de animales persistentemente infectados con VPPA (Carrillo *et al.*, 1994), así como la asociación de lesiones muy severas asociadas a la presencia de anticuerpos en animales crónicamente infectados con el virus. Sin poder decantarnos por una u otra realidad, probablemente ciertas ambas, el hecho es que cada vez que en nuestro laboratorio hemos inducido una respuesta de anticuerpos tras la

vacunación con ADN, estos han resultado, en el mejor de los casos inocuos, llegando a provocar en algún caso una exacerbación de la viremia (Argilaguet *et al.*, 2011), obligándonos en su día a buscar estrategias que evitaran su estimulación. Incluso en esta tesis, la inducción de anticuerpos por parte de BA71.ΔTK.pp220i, no sólo falló en proteger frente a la infección letal sino que en el único caso en el que estimuló la inducción de anticuerpos detectables, éstos correlacionaron con lesiones dramáticas en los animales (Figura 23).

En resumen, sin negar que la inducción de anticuerpos pueda resultar muy útil en futuras vacunas de subunidades, habremos de ser ingeniosos y buscar nuevas metodologías o antígenos capaces de inducir anticuerpos capaces de inhibir la infección sin causar ningún efecto adverso. En nuestro caso, y aunque apenas se ha comentado, todos los intentos por comprobar la capacidad de nuestros anticuerpos por inhibir la infección *in vitro* han resultado negativos, aunque bien podría deberse a limitaciones de nuestra técnica (Ruiz Gonzalvo *et al.*, 1986).

• Otros hallazgos y misterios sin resolver

De entre los hallazgos más interesantes desde el punto de vista científico sin responder cabe destacar uno bueno y uno malo. Comenzaremos por el malo.

- *La muerte inesperada de un animal tras la vacunación con BA71.ΔCD2*

No podemos esconder la evidencia de que uno de los animales utilizados durante esta Tesis tuvo que ser sacrificado 14 días tras la inmunización con BA71.ΔCD2, y tras sufrir síntomas evidentes de PPA aguda a partir del día 7 pi, concordante con títulos elevadísimos de virus en sangre. La secuenciación parcial del genoma de virus aislado de este animal, descarta cualquier reversión o contaminación con el virus parental BA71, demostrando que se trata de una población pura del virus vacunal. Dos son las explicaciones más plausibles a este inesperado y preocupante hallazgo: La primera de ellas, vendría dada por una posible inmunosupresión del cerdo afectado que hubiera pasado por alto a los cuidadores. Aunque altamente improbable, el hecho de que cerdos SPF hayan demostrado una extrema susceptibilidad a cepas atenuadas del VPPA (Lacasta *et al.*, 2015, submitted) avalaría esta hipótesis. Una segunda explicación, aunque más banal, podría venir dada por un error humano a la hora de preparar las dosis vacunales a partir de un stock altamente concentrado y que resultó especialmente difícil de homogeneizar. Titulaciones *in vitro* con alícuotas mantenidas en congelación ratificaba la presencia en algunas de ellas de conglomerados de virus que bien podrían haber provocado la

inmunización con hasta 2 logaritmos más de BA71.ΔCD2. El hecho de que una vacuna con miras comerciales no pueda plantearse partir de virus altamente purificado ni concentrado, permitirá descartar este tipo de problema mecánico. Por último y aunque improbable, no debería descartarse la generación de un nuevo virus mutante en una segunda posición del genoma que permitiera restaurar la virulencia. Si esto fuera así, la infección de cerdos con el virus resultante debería resultar letal, experimento que se ha planteado realizar próximamente.

- Las causas que explican la crosprotección

La principal ventaja de BA71.ΔCD2 respecto a cualquier otra vacuna experimental descrita hasta el momento es, sin lugar a dudas, su capacidad de conferir crosprotección, no exigiendo obtener una vacuna para cada virus existente. Esta es por el contrario la mayor limitación de los mejores candidatos descritos hasta el momento.

A pesar de que no conocemos los mecanismos exactos por los que la eliminación de CD2v provoca este efecto, nuestros datos de linfoproliferación y ELISPOT apuntan sin duda a una mejor presentación antigénica tras la infección y/o a una mejor inducción de una respuesta T-poligonal. Del mismo modo, el hecho conocido de que el CD2v sea el responsable de más del 90% de la inhibición de la proliferación frente a mitógenos *in vitro* (Borca *et al.*, 1998), permite hipotetizar con una desinhibición *in vivo* de la respuesta T tras la infección con BA71.ΔCD2. Yendo más al detalle sobre el mecanismo de acción de CD2v parece innegable que su efecto inhibitorio residiría en el extremo carboxilo terminal, capaz de interactuar en el citoplasma del macrófago infectado con proteínas clave en múltiples procesos celulares, como es SH3P7: desde la endocitosis y el transporte de proteínas a través del aparato de Golgi (Dixon *et al.*, 2004; Kay-Jackson *et al.*, 2004) así como también implicada hasta en la modulación de ciertas cascadas de señalización (Ensenat *et al.*, 1999).

Estudios futuros de proteómica y genómica comparada tanto *in vitro* como *in vivo* entre BA71 y BA71.ΔCD2 permitirá entender más en detalle tanto las causas de atenuación como las de inducción de crosprotección. Pero eso es o será objeto de otra tesis.

6. CONCLUSIONES

1. La cepa BA71-COS, obtenida tras pases sucesivos del virus virulento BA71 en la línea células COS-1, no se atenúa y mantiene su virulencia *in vivo*.
2. El virus recombinante inducible BA71.ΔTK.pp220i no confiere protección *in vivo* frente a la infección letal con el virus homólogo BA71. Este dato, junto con la descripción del gen de la Timidina Quinasa (TK) como esencial para la replicación *in vivo* del virus, obligó a buscar un nuevo *locus* en el genoma viral no esencial y que facilitara la obtención de VPPA inducibles.
3. La delección del gen homólogo a CD2 (CD2v o EP402R) del aislado virulento de VPPA BA71, provoca su atenuación *in vivo*. La inoculación *in vivo* con 10^3 UFP del virus delecionado BA71.ΔCD2 resulta inocua para los animales, induciendo sin embargo una respuesta inmune específica detectable. En claro contraste, esta misma dosis del virus parental BA71 provoca la muerte de los cerdos en apenas una semana.
4. El virus delecionado BA71.ΔCD2 es capaz de conferir protección frente al aislado homólogo virulento BA71 de manera dosis dependiente. Mientras que la inoculación de 10^3 UFP proporciona un 33% de supervivencia, tanto la inoculación de $3,3 \times 10^4$ como de 10^6 UFP de BA71.ΔCD2 protegen al 100% de los animales. La inoculación de 10^6 UFP de BA71.ΔCD2 provoca una protección total, no detectándose el virus en los cerdos vacunados en ninguno de los días testados tras la inoculación de BA71.
5. BA71.ΔCD2 también es capaz de conferir protección frente al aislado heterólogo virulento E75 de una manera dosis dependiente. En este caso, un 16% de los animales inmunizados con 10^3 UFP fueron capaces de sobrevivir al desafío heterólogo, mientras que todos los animales inmunizados con $3,3 \times 10^4$ y con 10^6 UFP de BA71.ΔCD2 sobrevivieron a la infección letal con E75. De nuevo, todos los animales vacunados con la máxima dosis probada quedaron totalmente protegidos.
6. La protección cruzada conferida por el virus BA71.ΔCD2 co-relaciona con la capacidad de las células T-CD8⁺ por él inducidas de reconocer *in vitro* tanto a BA71 como a E75. En claro contraste, las células T-CD8⁺ inducidas por el virus atenuado E75CV1, capaz de proteger únicamente frente al virus homólogo virulento E75, sólo reconocen *in vitro* a este mismo virus, apenas reconociendo al virus heterólogo BA71.

7. La inoculación de 10^6 UFP de BA71. Δ CD2 protegió al 100% de los animales frente a la infección con la cepa heteróloga virulenta de VPPA Georgia07. En este caso, 5 de los 9 animales vacunados quedaron protegidos totalmente (sin viremia detectable), mientras que los otros 4 sufrieron leves picos de viremia en sangre, 4 logaritmos por debajo de los títulos encontrados en los animales control.

8. A pesar de los excelentes resultados de protección obtenidos tras la inoculación de BA71. Δ CD2, los efectos adversos observados en uno de los 22 animales inmunizados con la dosis máxima probada (10^6 UFP), exigen seguir mejorando su grado de seguridad biológica.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abrams, C. C., Goatley, L., Fishbourne, E., Chapman, D., Cooke, L., Oura, C. A., Netherton, C. L., Takamatsu, H.-H. & Dixon, L. K. (2013).** Deletion of virulence associated genes from attenuated African swine fever virus isolate OUR T88/3 decreases its ability to protect against challenge with virulent virus. *Virology* **443**, 99–105.
- Afonso, C. L., Piccone, M. E., Zaffuto, K. M., Neilan, J., Kutish, G. F., Lu, Z., Balinsky, C. A., Gibb, T. R., Bean, T. J. & other authors. (2004).** African swine fever virus multigene family 360 and 530 genes affect host interferon response. *J Virol* **78**, 1858–64.
- Agüero, M., Fernández, J., Romero, L., Sánchez Mascaraque, C., Arias, M. & Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2003).** Highly sensitive PCR assay for routine diagnosis of African swine fever virus in clinical samples. *J Clin Microbiol* **41**, 4431–4.
- Agüero, M., Fernández, J., Romero, L. J., Zamora, M. J., Sánchez, C., Belák, S., Arias, M. & Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2004).** A highly sensitive and specific gel-based multiplex RT-PCR assay for the simultaneous and differential diagnosis of African swine fever and Classical swine fever in clinical samples. *Vet Res* **35**, 551–63.
- Alcamí, A., Carrascosa, A. L. & Viñuela, E. (1989).** Saturable binding sites mediate the entry of African swine fever virus into Vero cells. *Virology* **168**, 393–8.
- Alcaraz, C., De Diego, M., Pastor, M. J. & Escribano, J. M. (1990).** Comparison of a Radioimmunoprecipitation Assay to Immunoblotting and ELISA for Detection of Antibody to African Swine Fever Virus. *J Vet Diagnostic Investig* **2**, 191–196.
- Alejo, A., Andres, G. & Salas, M. L. (2003).** African Swine Fever Virus Proteinase Is Essential for Core Maturation and Infectivity. *J Virol* **77**, 5571–5577. American Society for Microbiology (ASM).
- Almazán, F., Rodríguez, J. M., Andrés, G., Pérez, R., Viñuela, E. & Rodríguez, J. F. (1992).** Transcriptional analysis of multigene family 110 of African swine fever virus. *J Virol* **66**, 6655–67.
- Almazán, F., Rodríguez, J. M., Angulo, A., Viñuela, E. & Rodríguez, J. F. (1993).** Transcriptional mapping of a late gene coding for the p12 attachment protein of African swine fever virus. *J Virol* **67**, 553–6.
- Almeida, J. D., Waterson, A. P. & Plowright, W. (1967).** The morphological characteristics of African swine fever virus and its resemblance to tipula iridescent virus. *Arch Gesamte Virusforsch* **20**, 392–6.
- Almendral, J. M., Almazán, F., Blasco, R. & Viñuela, E. (1990).** Multigene families in African swine fever virus: family 110. *J Virol* **64**, 2064–72.
- Alonso, C., Miskin, J., Hernáez, B., Fernandez-Zapatero, P., Soto, L., Cantó, C., Rodríguez-Crespo, I., Dixon, L. & Escribano, J. M. (2001).** African swine fever virus protein p54 interacts with the microtubular motor complex through direct binding to light-chain dynein. *J Virol* **75**, 9819–27.

- Alonso, F., Domínguez, J., Viñuela, E. & Revilla, Y. (1997).** African swine fever virus-specific cytotoxic T lymphocytes recognize the 32 kDa immediate early protein (vp32). *Virus Res* **49**, 123–30.
- Anderson, E. C., Hutchings, G. H., Mukarati, N. & Wilkinson, P. J. (1998).** African swine fever virus infection of the bushpig (*Potamochoerus porcus*) and its significance in the epidemiology of the disease. *Vet Microbiol* **62**, 1–15.
- Andrés, G., Simón-Mateo, C. & Viñuela, E. (1997).** Assembly of African swine fever virus: role of polyprotein pp220. *J Virol* **71**, 2331–41.
- Andrés, G., García-Escudero, R., Simón-Mateo, C. & Viñuela, E. (1998a).** African swine fever virus is enveloped by a two-membraned collapsed cisterna derived from the endoplasmic reticulum. *J Virol* **72**, 8988–9001.
- Andrés, G., García-Escudero, R., Simón-Mateo, C. & Viñuela, E. (1998b).** African swine fever virus is enveloped by a two-membraned collapsed cisterna derived from the endoplasmic reticulum. *J Virol* **72**, 8988–9001. American Society for Microbiology (ASM).
- Andrés, G., García-Escudero, R., Viñuela, E., Salas, M. L. & Rodríguez, J. M. (2001a).** African swine fever virus structural protein pE120R is essential for virus transport from assembly sites to plasma membrane but not for infectivity. *J Virol* **75**, 6758–68.
- Andrés, G., Alejo, A., Simón-Mateo, C. & Salas, M. L. (2001b).** African swine fever virus protease, a new viral member of the SUMO-1-specific protease family. *J Biol Chem* **276**, 780–7.
- Andrés, G., Alejo, A., Salas, J. & Salas, M. L. (2002a).** African swine fever virus polyproteins pp220 and pp62 assemble into the core shell. *J Virol* **76**, 12473–82.
- Andrés, G., García-Escudero, R., Salas, M. L. & Rodríguez, J. M. (2002b).** Repression of African swine fever virus polyprotein pp220-encoding gene leads to the assembly of icosahedral core-less particles. *J Virol* **76**, 2654–66.
- Angulo, A., Viñuela, E. & Alcamí, A. (1993).** Inhibition of African swine fever virus binding and infectivity by purified recombinant virus attachment protein p12. *J Virol* **67**, 5463–71.
- Argilaguet, J. M., Pérez-Martín, E., Gallardo, C., Salguero, F. J., Borrego, B., Lacasta, A., Accensi, F., Díaz, I., Nofrarías, M. & other authors. (2011).** Enhancing DNA immunization by targeting ASFV antigens to SLA-II bearing cells. *Vaccine* **29**, 5379–85.
- Argilaguet, J. M., Pérez-Martín, E., Nofrarías, M., Gallardo, C., Accensi, F., Lacasta, A., Mora, M., Ballester, M., Galindo-Cardiel, I. & other authors. (2012).** DNA vaccination partially protects against African swine fever virus lethal challenge in the absence of antibodies. *PLoS One* **7**, e40942.
- Argilaguet, J. M., Pérez-Martín, E., López, S., Goethe, M., Escribano, J. M., Giesow, K., Keil, G. M. & Rodríguez, F. (2013).** BacMam immunization partially protects pigs against sublethal challenge with African swine fever virus. *Antiviral Res* **98**, 61–5.

- Arias, M. & Sanchez-Vizcaino, J. (2002).** African swine fever Eradication: The Spanish model. In *Trends Emerg Viral Infect Swine*, 1st edn., pp. 133–139. Iowa State University Press.
- Arias, M. & Sánchez-Vizcaíno JM. (1992).** Manual de diagnóstico serológico de la Peste porcina africana. *Monogr INIA* 5– 44.
- Bachmann, M. F., Kündig, T. M., Freer, G., Li, Y., Kang, C. Y., Bishop, D. H., Hengartner, H. & Zinkernagel, R. M. (1994).** Induction of protective cytotoxic T cells with viral proteins. *Eur J Immunol* **24**, 2228–36.
- Ballester, M., Galindo-Cardiel, I., Gallardo, C., Argilagué, J. M., Segalés, J., Rodríguez, J. M. & Rodríguez, F. (2010).** Intracellular detection of African swine fever virus DNA in several cell types from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues using a new in situ hybridisation protocol. *J Virol Methods* **168**, 38–43.
- Ballester, M., Rodríguez-Cariño, C., Pérez, M., Gallardo, C., Rodríguez, J. M., Salas, M. L. & Rodríguez, F. (2011).** Disruption of nuclear organization during the initial phase of African swine fever virus infection. *J Virol* **85**, 8263–9.
- Bardeas, M. G., Rodríguez, F., Gómez-Puertas, P., Avilés, M., Beitia, F., Alonso, C. & Escribano, J. M. (2001).** Antigenic and immunogenic properties of a chimera of two immunodominant African swine fever virus proteins. *Arch Virol* **146**, 1681–91.
- Basta, S., Gerber, H., Schaub, A., Summerfield, A. & McCullough, K. C. (2010).** Cellular processes essential for African swine fever virus to infect and replicate in primary macrophages. *Vet Microbiol* **140**, 9–17.
- Basto, A. P., Nix, R. J., Boinas, F., Mendes, S., Silva, M. J., Cartaxeiro, C., Portugal, R. S., Leitão, A., Dixon, L. K. & Martins, C. (2006).** Kinetics of African swine fever virus infection in *Ornithodoros erraticus* ticks. *J Gen Virol* **87**, 1863–71.
- Bastos, A. D. S., Penrith, M.-L., Crucière, C., Edrich, J. L., Hutchings, G., Roger, F., Couacy-Hymann, E. & Thomson, G. (2003).** Genotyping field strains of African swine fever virus by partial p72 gene characterisation. *Arch Virol* **148**, 693–706.
- Bastos, A. D. S., Penrith, M.-L., Macome, F., Pinto, F. & Thomson, G. R. (2004).** Co-circulation of two genetically distinct viruses in an outbreak of African swine fever in Mozambique: no evidence for individual co-infection. *Vet Microbiol* **103**, 169–82.
- Baylis, S. A., Banham, A. H., Vydellingum, S., Dixon, L. K. & Smith, G. L. (1993).** African swine fever virus encodes a serine protein kinase which is packaged into virions. *J Virol* **67**, 4549–56.
- Bech-Nielsen, S., Fernandez, J., Martinez-Pereda, F., Espinosa, J., Perez Bonilla, Q. & Sanchez-Vizcaino, J. M. (1995).** A case study of an outbreak of African swine fever in Spain. *Br Vet J* **151**, 203–14.
- Bishop, R. P., Fleischauer, C., de Villiers, E. P., Okoth, E. A., Arias, M., Gallardo, C. & Upton, C. (2015).** Comparative analysis of the complete genome sequences of Kenyan African swine fever virus isolates within p72 genotypes IX and X. *Virus Genes*.

- Blasco, R., Agüero, M., Almendral, J. M. & Viñuela, E. (1989).** Variable and constant regions in African swine fever virus DNA. *Virology* **168**, 330–8.
- Blome, S., Gabriel, C. & Beer, M. (2013).** Pathogenesis of African swine fever in domestic pigs and European wild boar. *Virus Res* **173**, 122–30.
- Blome, S., Gabriel, C. & Beer, M. (2014).** Modern adjuvants do not enhance the efficacy of an inactivated African swine fever virus vaccine preparation. *Vaccine* **32**, 3879–82.
- De Boer, C. J., Pan, I. C. & Hess, W. R. (1972).** Immunology of African swine fever. *J Am Vet Med Assoc* **160**, 528–32.
- Bool, P. H., Ordas, A. & Sanchez Botija, C. (1969).** El diagnostico de la peste porcina africana por inmunofluorescencia. (The diagnosis of African swine fever by immunofluorescence). *Bull OIE* 819– 839.
- Borca, M. V, Kutish, G. F., Afonso, C. L., Irusta, P., Carrillo, C., Brun, A., Sussman, M. & Rock, D. L. (1994).** An African swine fever virus gene with similarity to the T-lymphocyte surface antigen CD2 mediates hemadsorption. *Virology* **199**, 463–8.
- Borca, M. V, Carrillo, C., Zsak, L., Laegreid, W. W., Kutish, G. F., Neilan, J. G., Burrage, T. G. & Rock, D. L. (1998).** Deletion of a CD2-like gene, 8-DR, from African swine fever virus affects viral infection in domestic swine. *J Virol* **72**, 2881–9.
- Breese, S. S. & DeBoer, C. J. (1966).** Electron microscope observations of African swine fever virus in tissue culture cells. *Virology* **28**, 420–8.
- Brookes, S. M., Dixon, L. K. & Parkhouse, R. M. (1996).** Assembly of African Swine fever virus: quantitative ultrastructural analysis in vitro and in vivo. *Virology* **224**, 84–92.
- Brookes, S. M., Hyatt, A. D., Wise, T. & Parkhouse, R. M. (1998).** Intracellular virus DNA distribution and the acquisition of the nucleoprotein core during African swine fever virus particle assembly: ultrastructural in situ hybridisation and DNase-gold labelling. *Virology* **249**, 175–88.
- Brun, A., Rivas, C., Esteban, M., Escribano, J. M. & Alonso, C. (1996).** African swine fever virus gene A179L, a viral homologue of bcl-2, protects cells from programmed cell death. *Virology* **225**, 227–30.
- Canals, A., Alonso, F., Tomillo, J. & Domínguez, J. (1992).** Analysis of T lymphocyte subsets proliferating in response to infective and UV-inactivated African swine fever viruses. *Vet Microbiol* **33**, 117–27.
- Caporale, V. & Giovannini, A. (2010).** Bluetongue control strategy, including recourse to vaccine: a critical review. *Rev Sci Tech* **29**, 573–91.
- Carrasco, L., de Lara, F. C., Martín de las Mulas, J., Gómez-Villamandos, J. C., Pérez, J., Wilkinson, P. J. & Sierra, M. A. (1996a).** Apoptosis in lymph nodes in acute African swine fever. *J Comp Pathol* **115**, 415–28.

- Carrasco, L., Gómez-Villamandos, J. C., Bautista, M. J., Martín de las Mulas, J., Villeda, C. J., Wilkinson, P. J. & Sierra, M. A. (1996b).** In vivo replication of African swine fever virus (Malawi '83) in neutrophils. *Vet Res* **27**, 55–62.
- Carrasco, L., Bautista, M. J., Gómez-Villamandos, J. C., Martín de las Mulas, J., Chacón-M de Lara, F., Wilkinson, P. J. & Sierra, M. A. (1997).** Development of microscopic lesions in splenic cords of pigs infected with African swine fever virus. *Vet Res* **28**, 93–9.
- Carrascosa, A. L., Sastre, I. & Viñuela, E. (1995).** Production and purification of recombinant African swine fever virus attachment protein p12. *J Biotechnol* **40**, 73–86.
- Carrascosa, J. L., Carazo, J. M., Carrascosa, A. L., García, N., Santisteban, A. & Viñuela, E. (1984).** General morphology and capsid fine structure of African swine fever virus particles. *Virology* **132**, 160–72.
- Carrillo, C., Borca, M. V, Afonso, C. L., Onisk, D. V & Rock, D. L. (1994).** Long-term persistent infection of swine monocytes/macrophages with African swine fever virus. *J Virol* **68**, 580–3.
- De Carvalho Ferreira, H. C., Weesendorp, E., Elbers, A. R. W., Bouma, A., Quak, S., Stegeman, J. A. & Loeffen, W. L. A. (2012).** African swine fever virus excretion patterns in persistently infected animals: A quantitative approach. *Vet Microbiol* **160**, 327–340.
- Carvalho, Z. G. & Rodrigues-Pousada, C. (1986).** African swine fever virus gene expression in infected Vero cells. *J Gen Virol* **67 (Pt 7)**, 1343–50.
- Chapman, D. A. G., Tcherepanov, V., Upton, C. & Dixon, L. K. (2008).** Comparison of the genome sequences of non-pathogenic and pathogenic African swine fever virus isolates. *J Gen Virol* **89**, 397–408.
- Chapman, D. A. G., Darby, A. C., Da Silva, M., Upton, C., Radford, A. D. & Dixon, L. K. (2011).** Genomic analysis of highly virulent Georgia 2007/1 isolate of African swine fever virus. *Emerg Infect Dis* **17**, 599–605.
- Cobbold, C. & Wileman, T. (1998).** The major structural protein of African swine fever virus, p73, is packaged into large structures, indicative of viral capsid or matrix precursors, on the endoplasmic reticulum. *J Virol* **72**, 5215–23.
- Cobbold, C., Whittle, J. T. & Wileman, T. (1996).** Involvement of the endoplasmic reticulum in the assembly and envelopment of African swine fever virus. *J Virol* **70**, 8382–90.
- Cobbold, C., Windsor, M. & Wileman, T. (2001).** A virally encoded chaperone specialized for folding of the major capsid protein of African swine fever virus. *J Virol* **75**, 7221–9.
- Colgrove, G. S., Haelterman, E. O. & Coggins, L. (1969).** Pathogenesis of African swine fever in young pigs. *Am J Vet Res* **30**, 1343–59.
- Colson, P., De Lamballerie, X., Yutin, N., Asgari, S., Bigot, Y., Bideshi, D. K., Cheng, X.-W., Federici, B. A., Van Etten, J. L. & other authors. (2013).** 'Megavirales', a proposed new order for eukaryotic nucleocytoplasmic large DNA viruses. *Arch Virol* **158**, 2517–21.

- Correia, S., Ventura, S. & Parkhouse, R. M. (2013).** Identification and utility of innate immune system evasion mechanisms of ASFV. *Virus Res* **173**, 87–100.
- Costard, S., Wieland, B., de Glanville, W., Jori, F., Rowlands, R., Vosloo, W., Roger, F., Pfeiffer, D. U. & Dixon, L. K. (2009).** African swine fever: how can global spread be prevented? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **364**, 2683–96. The Royal Society.
- Cuesta-Geijo, M. A., Galindo, I., Hernáez, B., Quetglas, J. I., Dalmau-Mena, I. & Alonso, C. (2012).** Endosomal maturation, Rab7 GTPase and phosphoinositides in African swine fever virus entry. *PLoS One* **7**, e48853.
- Davies, D. H., Molina, D. M., Wrammert, J., Miller, J., Hirst, S., Mu, Y., Pablo, J., Unal, B., Nakajima-Sasaki, R. & other authors. (2007).** Proteome-wide analysis of the serological response to vaccinia and smallpox. *Proteomics* **7**, 1678–86.
- Detray, D. E. (1957).** African swine fever in wart hogs (*Phacochoerus aethiopicus*). *J Am Vet Med Assoc* 537–40.
- Díaz, I. & Mateu, E. (2005).** Use of ELISPOT and ELISA to evaluate IFN-gamma, IL-10 and IL-4 responses in conventional pigs. *Vet Immunol Immunopathol* **106**, 107–12.
- Diez-Rivero, C. M., Chenlo, B., Zuluaga, P. & Reche, P. A. (2010).** Quantitative modeling of peptide binding to TAP using support vector machine. *Proteins* **78**, 63–72.
- Dixon, L., Costa, J. V., Escribano, J. M., Rock, D. L., Viñuela, E. & Wilkinson, P. J. (2000).** Asfarviridae. *Regenmortel, MHV, Van, FCMBDHLO (Eds), Acad Press London* 159–165.
- Dixon, L. K., Abrams, C. C., Bowick, G., Goatley, L. C., Kay-Jackson, P. C., Chapman, D., Liverani, E., Nix, R., Silk, R. & Zhang, F. (2004).** African swine fever virus proteins involved in evading host defence systems. *Vet Immunol Immunopathol* **100**, 117–34.
- Dixon, L. K., Chapman, D. A. G., Netherton, C. L. & Upton, C. (2013a).** African swine fever virus replication and genomics. *Virus Res* **173**, 3–14.
- Dixon, L. K., Chapman, D. A. G., Netherton, C. L. & Upton, C. (2013b).** African swine fever virus replication and genomics. *Virus Res* **173**, 3–14.
- Edelsten, R. M. & Chinombo, D. O. (1995).** An outbreak of African swine fever in the southern region of Malawi. *Rev Sci Tech* **14**, 655–66.
- Edwards, J. F., Dodds, W. J. & Slauson, D. O. (1984).** Coagulation changes in African swine fever virus infection. *Am J Vet Res* **45**, 2414–20.
- Enjuanes, L., Carrascosa, A. L., Moreno, M. A. & Viñuela, E. (1976).** Titration of African swine fever (ASF) virus. *J Gen Virol* **32**, 471–7.
- Ensenat, D., Yao, Z., Wang, X. S., Kori, R., Zhou, G., Lee, S. C. & Tan, T. H. (1999).** A novel src homology 3 domain-containing adaptor protein, HIP-55, that interacts with hematopoietic progenitor kinase 1. *J Biol Chem* **274**, 33945–50.

- Epifano, C., Krijnse-Locker, J., Salas, M. L., Rodríguez, J. M. & Salas, J. (2006a).** The African swine fever virus nonstructural protein pB602L is required for formation of the icosahedral capsid of the virus particle. *J Virol* **80**, 12260–70.
- Epifano, C., Krijnse-Locker, J., Salas, M. L., Salas, J. & Rodríguez, J. M. (2006b).** Generation of filamentous instead of icosahedral particles by repression of African swine fever virus structural protein pB438L. *J Virol* **80**, 11456–66.
- Escribano, J. M., Pastor, M. J. & Sánchez-Vizcaíno, J. M. (1989).** Antibodies to bovine serum albumin in swine sera: implications for false-positive reactions in the serodiagnosis of African swine fever. *Am J Vet Res* **50**, 1118–22.
- Escribano, J. M., Pastor, M. J., Arias, M. & Sanchez-Vizcaino, J. M. (1990).** Confirmación de sueros positivos a ELISA-peste porcina africana, mediante la técnica de 'Immunoblotting'. Utilización de las proteínas inducidas por el virus con pesos moleculares comprendidos entre 23 y 35 kilodaltons, en el desarrollo de un 'kit' de 135–141.
- Escribano, J. M., Galindo, I. & Alonso, C. (2013).** Antibody-mediated neutralization of African swine fever virus: myths and facts. *Virus Res* **173**, 101–9.
- Esparza, I., González, J. C. & Viñuela, E. (1988).** Effect of interferon-alpha, interferon-gamma and tumour necrosis factor on African swine fever virus replication in porcine monocytes and macrophages. *J Gen Virol* **69** (Pt 12), 2973–80.
- Esteves, A., Marques, M. I. & Costa, J. V. (1986).** Two-dimensional analysis of African swine fever virus proteins and proteins induced in infected cells. *Virology* **152**, 192–206.
- Fernandez, A., Perez, J., Carrasco, L., Bautista, M. J., Sanchez-Vizcaino, J. M. & Sierra, M. A. (1992a).** Distribution of ASFV antigens in pig tissues experimentally infected with two different Spanish virus isolates. *Zentralbl Veterinarmed B* **39**, 393–402.
- Fernandez, A., Perez, J., Martin de las Mulas, J., Carrasco, L., Dominguez, J. & Sierra, M. A. (1992b).** Localization of African swine fever viral antigen, swine IgM, IgG and C1q in lung and liver tissues of experimentally infected pigs. *J Comp Pathol* **107**, 81–90.
- Fishbourne, E., Abrams, C. C., Takamatsu, H.-H. & Dixon, L. K. (2013).** Modulation of chemokine and chemokine receptor expression following infection of porcine macrophages with African swine fever virus. *Vet Microbiol* **162**, 937–943.
- Forman, A. J., Wardley, R. C. & Wilkinson, P. J. (1982).** The immunological response of pigs and guinea pigs to antigens of African swine fever virus. *Arch Virol* **74**, 91–100.
- Galindo, I., Hernaez, B., Díaz-Gil, G., Escribano, J. M. & Alonso, C. (2008).** A179L, a viral Bcl-2 homologue, targets the core Bcl-2 apoptotic machinery and its upstream BH3 activators with selective binding restrictions for Bid and Noxa. *Virology* **375**, 561–72.
- Galindo, I., Cuesta-Geijo, M. A., Hlavova, K., Muñoz-Moreno, R., Barrado-Gil, L., Dominguez, J. & Alonso, C. (2015).** African swine fever virus infects macrophages, the natural host cells, via clathrin- and cholesterol-dependent endocytosis. *Virus Res* **200C**, 45–55.

- Galindo-Cardiel, I., Ballester, M., Solanes, D., Nofrarías, M., López-Soria, S., Argilagué, J. M., Lacasta, A., Accensi, F., Rodríguez, F. & Segalés, J. (2013).** Standardization of pathological investigations in the framework of experimental ASFV infections. *Virus Res* **173**, 180–90.
- Gallardo, C., Soler, A., Nieto, R., Carrascosa, A. L., De Mia, G. M., Bishop, R. P., Martins, C., Fasina, F. O., Couacy-Hymman, E. & other authors. (2013).** Comparative evaluation of novel African swine fever virus (ASF) antibody detection techniques derived from specific ASF viral genotypes with the OIE internationally prescribed serological tests. *Vet Microbiol* **162**, 32–43.
- Gallardo, C., Mwaengo, D. M., Macharia, J. M., Arias, M., Taracha, E. A., Soler, A., Okoth, E., Martin, E., Kasiti, J. & Bishop, R. P. (2009).** Enhanced discrimination of African swine fever virus isolates through nucleotide sequencing of the p54, p72, and pB602L (CVR) genes. *Virus Genes* **38**, 85–95.
- Gallardo, C., Blanco, E., Rodríguez, J. M., Carrascosa, A. L. & Sanchez-Vizcaino, J. M. (2006).** Antigenic properties and diagnostic potential of African swine fever virus protein pp62 expressed in insect cells. *J Clin Microbiol* **44**, 950–6.
- García-Barreno, B., Sanz, A., Nogal, M. L., Viñuela, E. & Enjuanes, L. (1986).** Monoclonal antibodies of African swine fever virus: antigenic differences among field virus isolates and viruses passaged in cell culture. *J Virol* **58**, 385–92.
- García-Beato, R., Salas, M. L., Viñuela, E. & Salas, J. (1992).** Role of the host cell nucleus in the replication of African swine fever virus DNA. *Virology* **188**, 637–49.
- García-Escudero, R., Andrés, G., Almazán, F. & Viñuela, E. (1998).** Inducible gene expression from African swine fever virus recombinants: analysis of the major capsid protein p72. *J Virol* **72**, 3185–95.
- Gil, S., Spagnuolo-Weaver, M., Canals, A., Sepúlveda, N., Oliveira, J., Aleixo, A., Allan, G., Leitão, A. & Martins, C. L. V. (2003).** Expression at mRNA level of cytokines and A238L gene in porcine blood-derived macrophages infected in vitro with African swine fever virus (ASFV) isolates of different virulence. *Arch Virol* **148**, 2077–97.
- Gil, S., Sepúlveda, N., Albina, E., Leitão, A. & Martins, C. (2008).** The low-virulent African swine fever virus (ASFV/NH/P68) induces enhanced expression and production of relevant regulatory cytokines (IFN α , TNF α and IL12p40) on porcine macrophages in comparison to the highly virulent ASFV/L60. *Arch Virol* **153**, 1845–1854.
- Glauert, A. (1975).** Fixation, dehydration and embedding of biological specimens. *Elsevier North-holl Biomed Press Amsterdam*.
- Gogin, A., Gerasimov, V., Malogolovkin, A. & Kolbasov, D. (2013).** African swine fever in the North Caucasus region and the Russian Federation in years 2007-2012. *Virus Res* **173**, 198–203.
- Gómez del Moral, M., Ortuño, E., Fernández-Zapatero, P., Alonso, F., Alonso, C., Ezquerro, A. & Domínguez, J. (1999).** African swine fever virus infection induces tumor necrosis factor alpha production: implications in pathogenesis. *J Virol* **73**, 2173–80.

- Gómez-Puertas, P., Rodríguez, F., Oviedo, J. M., Ramiro-Ibáñez, F., Ruiz-Gonzalvo, F., Alonso, C. & Escribano, J. M. (1996).** Neutralizing antibodies to different proteins of African swine fever virus inhibit both virus attachment and internalization. *J Virol* **70**, 5689–94.
- Gómez-Puertas, P., Rodríguez, F., Oviedo, J. M., Brun, A., Alonso, C. & Escribano, J. M. (1998).** The African swine fever virus proteins p54 and p30 are involved in two distinct steps of virus attachment and both contribute to the antibody-mediated protective immune response. *Virology* **243**, 461–71.
- Gómez-Villamandos, J. C., Hervás, J., Méndez, A., Carrasco, L., Martín de las Mulas, J., Villeda, C. J., Wilkinson, P. J. & Sierra, M. A. (1995).** Experimental African swine fever: apoptosis of lymphocytes and virus replication in other cells. *J Gen Virol* **76 (Pt 9)**, 2399–405.
- Gómez-Villamandos, J. C., Bautista, M. J., Hervás, J., Carrasco, L., de Lara, F. C., Pérez, J., Wilkinson, P. J. & Sierra, M. A. (1996).** Subcellular changes in platelets in acute and subacute African swine fever. *J Comp Pathol* **115**, 327–41.
- Gómez-Villamandos, J. C., Bautista, M. J., Carrasco, L., Caballero, M. J., Hervás, J., Villeda, C. J., Wilkinson, P. J. & Sierra, M. A. (1997).** African swine fever virus infection of bone marrow: lesions and pathogenesis. *Vet Pathol* **34**, 97–107.
- Gómez-Villamandos, J. C., Bautista, M. J., Carrasco, L., Chacón-Manrique de Lara, F., Hervás, J., Wilkinson, P. J. & Sierra, M. A. (1998).** Thrombocytopenia associated with apoptotic megakaryocytes in a viral haemorrhagic syndrome induced by a moderately virulent strain of African swine fever virus. *J Comp Pathol* **118**, 1–13.
- Gonzague, M., Roger, F., Bastos, A., Burger, C., Randriamparany, T., Smondack, S. & Cruciere, C. (2001).** Isolation of a non-haemadsorbing, non-cytopathic strain of African swine fever virus in Madagascar. *Epidemiol Infect* **126**, 453–9.
- González, A., Talavera, A., Almendral, J. M. & Viñuela, E. (1986).** Hairpin loop structure of African swine fever virus DNA. *Nucleic Acids Res* **14**, 6835–44.
- Gonzalez Juarrero, M., Mebus, C. A., Pan, R., Revilla, Y., Alonso, J. M. & Lunney, J. K. (1992).** Swine leukocyte antigen and macrophage marker expression on both African swine fever virus-infected and non-infected primary porcine macrophage cultures. *Vet Immunol Immunopathol* **32**, 243–59.
- Greenwood, B. (2014).** The contribution of vaccination to global health: past, present and future. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **369**, 20130433.
- Gregg, D. A., Mebus, C. A. & Schlafer, D. H. (1995).** Early infection of interdigitating dendritic cells in the pig lymph node with African swine fever viruses of high and low virulence: immunohistochemical and ultrastructural studies. *J Vet Diagn Invest* **7**, 23–30.
- Greiser-Wilke, I. & Moennig, V. (2004).** Vaccination against classical swine fever virus: limitations and new strategies. *Anim Health Res Rev* **5**, 223–6.

- Griebel, P. J., Ohmann, H. B., Lawman, M. J. & Babiuk, L. A. (1990).** The interaction between bovine herpesvirus type 1 and activated bovine T lymphocytes. *J Gen Virol* **71** (Pt 2), 369–77.
- Hawes, P. C., Netherton, C. L., Wileman, T. E. & Monaghan, P. (2008).** The envelope of intracellular African swine fever virus is composed of a single lipid bilayer. *J Virol* **82**, 7905–12.
- Heath, C. M., Windsor, M. & Wileman, T. (2001).** Aggresomes resemble sites specialized for virus assembly. *J Cell Biol* **153**, 449–55.
- Hernaiz, B. & Alonso, C. (2010).** Dynamin- and clathrin-dependent endocytosis in African swine fever virus entry. *J Virol* **84**, 2100–9.
- Hernaiz, B., Escribano, J. M. & Alonso, C. (2006).** Visualization of the African swine fever virus infection in living cells by incorporation into the virus particle of green fluorescent protein-p54 membrane protein chimera. *Virology* **350**, 1–14.
- Hess, W. R., Endris, R. G., Lousa, A. & Caiado, J. M. (1989).** Clearance of African swine fever virus from infected tick (*Acari*) colonies. *J Med Entomol* **26**, 314–7.
- Heuschele, W. P. & Coggins, L. (1969).** Epizootiology of African swine fever virus in warthogs. *Bull Epizoot Dis Afr* **17**, 179–83.
- Heuschele, W. P. & L. Coggins. (1965).** Studies on the transmission of African swine fever virus Bech-Nielsen y arthropods. *Proc US Livest Sanit Ass* 69:94–100.
- Hurtado, C., Granja, A. G., Bustos, M. J., Nogal, M. L., González de Buitrago, G., de Yébenes, V. G., Salas, M. L., Revilla, Y. & Carrascosa, A. L. (2004).** The C-type lectin homologue gene (EP153R) of African swine fever virus inhibits apoptosis both in virus infection and in heterologous expression. *Virology* **326**, 160–70.
- Hurtado, C., Bustos, M. J. & Carrascosa, A. L. (2010).** The use of COS-1 cells for studies of field and laboratory African swine fever virus samples. *J Virol Methods* **164**, 131–4.
- Hurtado, C., Bustos, M. J., Granja, A. G., de León, P., Sabina, P., López-Viñas, E., Gómez-Puertas, P., Revilla, Y. & Carrascosa, A. L. (2011).** The African swine fever virus lectin EP153R modulates the surface membrane expression of MHC class I antigens. *Arch Virol* **156**, 219–34.
- Ito, M., Koide, W., Watanabe, M., Kamiya, H. & Sakurai, M. (1997).** Apoptosis of cord blood T lymphocytes by herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol* **78** (Pt 8), 1971–5.
- Ivey, F. D., Magee, D. M., Woitaske, M. D., Johnston, S. A. & Cox, R. A. (2003).** Identification of a protective antigen of *Coccidioides immitis* by expression library immunization. *Vaccine* **21**, 4359–67.
- Iyer, L. M., Balaji, S., Koonin, E. V & Aravind, L. (2006).** Evolutionary genomics of nucleocytoplasmic large DNA viruses. *Virus Res* **117**, 156–84.

- Jeurissen, S. H., Wagenaar, F., Pol, J. M., van der Eb, A. J. & Noteborn, M. H. (1992).** Chicken anemia virus causes apoptosis of thymocytes after in vivo infection and of cell lines after in vitro infection. *J Virol* **66**, 7383–8.
- Jori, F., Vial, L., Penrith, M. L., Pérez-Sánchez, R., Etter, E., Albina, E., Michaud, V. & Roger, F. (2013).** Review of the sylvatic cycle of African swine fever in sub-Saharan Africa and the Indian ocean. *Virus Res* **173**, 212–27.
- Jouvenet, N., Monaghan, P., Way, M. & Wileman, T. (2004).** Transport of African swine fever virus from assembly sites to the plasma membrane is dependent on microtubules and conventional kinesin. *J Virol* **78**, 7990–8001.
- Karalyan, Z., Zakaryan, H., Arzumanyan, H., Sargsyan, K., Voskanyan, H., Hakobyan, L., Abroyan, L., Avetisyan, A. & Karalova, E. (2012).** Pathology of porcine peripheral white blood cells during infection with African swine fever virus. *BMC Vet Res* **8**, 18.
- Kay-Jackson, P. C., Goatley, L. C., Cox, L., Miskin, J. E., Parkhouse, R. M. E., Wienands, J. & Dixon, L. K. (2004).** The CD2v protein of African swine fever virus interacts with the actin-binding adaptor protein SH3P7. *J Gen Virol* **85**, 119–30.
- Keil, G. M., Giesow, K. & Portugal, R. (2014).** A novel bromodeoxyuridine-resistant wild boar lung cell line facilitates generation of African swine fever virus recombinants. *Arch Virol* **159**, 2421–8.
- King, D. P., Reid, S. M., Hutchings, G. H., Grierson, S. S., Wilkinson, P. J., Dixon, L. K., Bastos, A. D. S. & Drew, T. W. (2003).** Development of a TaqMan PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus. *J Virol Methods* **107**, 53–61.
- King, K., Chapman, D., Argilaguet, J. M., Fishbourne, E., Hutet, E., Cariolet, R., Hutchings, G., Oura, C. A. L., Netherton, C. L. & other authors. (2011).** Protection of European domestic pigs from virulent African isolates of African swine fever virus by experimental immunisation. *Vaccine* **29**, 4593–600.
- Kleiboeker, S. B., Burrage, T. G., Scoles, G. A., Fish, D. & Rock, D. L. (1998).** African swine fever virus infection in the argasid host, *Ornithodoros porcinus porcinus*. *J Virol* **72**, 1711–24.
- Kleiboeker, S. B. (2002).** Swine fever: classical swine fever and African swine fever. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* **18**, 431–51.
- Kollnberger, S. D., Gutierrez-Castañeda, B., Foster-Cuevas, M., Corteyn, A. & Parkhouse, R. M. E. (2002).** Identification of the principal serological immunodeterminants of African swine fever virus by screening a virus cDNA library with antibody. *J Gen Virol* **83**, 1331–42.
- Konno, S., Taylor, W. D., Hess, W. R. & Heuschele, W. P. (1972).** Spleen pathology in African swine fever. *Cornell Vet* **62**, 486–506.
- Krug, P. W., Holinka, L. G., O'Donnell, V., Reese, B., Sanford, B., Fernandez-Sainz, I., Gladue, D. P., Arzt, J., Rodriguez, L. & other authors. (2015).** The Progressive Adaptation of a Georgian Isolate of African Swine Fever Virus to Vero Cells Leads to a Gradual

Attenuation of Virulence in Swine Corresponding to Major Modifications of the Viral Genome. *J Virol* **89**, 2324–2332 (S. Perlman, Ed.).

Lacasta, A., Ballester, M., Monteagudo, P. L., Rodríguez, J. M., Salas, M. L., Accensi, F., Pina-Pedrero, S., Bensaid, A., Argilagué, J. & other authors. (2014). Expression Library Immunization Can Confer Protection against Lethal Challenge with African Swine Fever Virus. *J Virol* **88**, 13322–32.

Lacasta, A., L. Monteagudo, P., Accensi, F., Ballester, M., Blanco, E., Galindo, I., Segalés, J., Salas, M. L., Dominguez, J. & other authors. (2015). Live attenuated African swine fever viruses as ideal tools to dissect the mechanisms involved in viral pathogenesis and immune protection. *Submitted*.

Law, M. & Smith, G. L. (2004). Studying the binding and entry of the intracellular and extracellular enveloped forms of vaccinia virus. *Methods Mol Biol* **269**, 187–204.

Lee, C.-W. (2014). Reverse genetics of influenza virus. *Methods Mol Biol* **1161**, 37–50.

Leitão, A., Malur, A., Cornelis, P. & Martins, C. L. (1998). Identification of a 25-aminoacid sequence from the major African swine fever virus structural protein VP72 recognised by porcine cytotoxic T lymphocytes using a lipoprotein based expression system. *J Virol Methods* **75**, 113–9.

Leitão, A., Malur, A., Cartaxeiro, C., Vasco, G., Cruz, B., Cornelis, P. & Martins, C. L. (2000). Bacterial lipoprotein based expression vectors as tools for the characterisation of African swine fever virus (ASFV) antigens. *Arch Virol* **145**, 1639–57.

Leitão, A., Cartaxeiro, C., Coelho, R., Cruz, B., Parkhouse, R. M., Portugal, F., Vigário, J. D. & Martins, C. L. (2001). The non-haemadsorbing African swine fever virus isolate ASFV/NH/P68 provides a model for defining the protective anti-virus immune response. *J Gen Virol* **82**, 513–23.

Lewis, T., Zsak, L., Burrage, T. G., Lu, Z., Kutish, G. F., Neilan, J. G. & Rock, D. L. (2000). An African swine fever virus ERV1-ALR homologue, 9GL, affects virion maturation and viral growth in macrophages and viral virulence in swine. *J Virol* **74**, 1275–1285.

Lu, Y. Y., Koga, Y., Tanaka, K., Sasaki, M., Kimura, G. & Nomoto, K. (1994). Apoptosis induced in CD4+ cells expressing gp160 of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **68**, 390–9.

Malmquist, W. A. & Hay, D. (1960). Hemadsorption and cytopathic effect produced by African Swine Fever virus in swine bone marrow and buffy coat cultures. *Am J Vet Res* **104–108**.

Malogolovkin, A., Yelsukova, A., Gallardo, C., Tsybanov, S. & Kolbasov, D. (2012). Molecular characterization of African swine fever virus isolates originating from outbreaks in the Russian Federation between 2007 and 2011. *Vet Microbiol* **158**, 415–9.

Malogolovkin, A., Burmakina, G., Titov, I., Sereda, A., Gogin, A., Baryshnikova, E. & Kolbasov, D. (2015). Comparative Analysis of African Swine Fever Virus Genotypes and Serogroups. *Emerg Infect Dis* **21**, 312–315.

- Manso Ribeiro, J. (1962).** Déclaration sur la Vaccination Contre la Peste Porcine Africaine à la Session Générale de l'Office International des Epizootics. *Bull off Internat Epizoot*, **58** **27**, 1031–1040.
- Manso Ribeiro, J., Azevedo, J. A. R., Teixeira, M. J. O., Forte, M. C. B., Ribeiro, A. M. R., Oliveira, F., Noronha, E., Pereira, C. G. & Vigario, J. D. (1958).** Peste porcine provoquée par une souche différente (Souche L) de la souche classique. *Bull Off int Epiz* 516–534.
- Martins, C. L. & Leitão, A. C. (1994).** Porcine immune responses to African swine fever virus (ASFV) infection. *Vet Immunol Immunopathol* **43**, 99–106.
- Martins, C. L., Lawman, M. J., Scholl, T., Mebus, C. A. & Lunney, J. K. (1993).** African swine fever virus specific porcine cytotoxic T cell activity. *Arch Virol* **129**, 211–25.
- McCullough, K. C., Basta, S., Knötig, S., Gerber, H., Schaffner, R., Kim, Y. B., Saalmüller, A. & Summerfield, A. (1999).** Intermediate stages in monocyte-macrophage differentiation modulate phenotype and susceptibility to virus infection. *Immunology* **98**, 203–12.
- Mebus, C. A. (1988).** African swine fever. *Adv Virus Res* **35**, 251–69.
- Mebus, C. A. & Dardiri, A. H. (1979).** Additional characteristics of disease caused by the African swine fever viruses isolated from Brazil and the Dominican Republic. *Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc* 227–39.
- Misinzio, G., Magambo, J., Masambu, J., Yongolo, M. G., Van Doorselaere, J. & Nauwynck, H. J. (2011).** Genetic characterization of African swine fever viruses from a 2008 outbreak in Tanzania. *Transbound Emerg Dis* **58**, 86–92.
- Montgomery, R. E. (1921).** On a form of swine fever occurring in British East Africa (Kenya colony). *J Comp Pathol*, **34**, 59–191, 243–262.
- Moore, D. M., Zsak, L., Neilan, J. G., Lu, Z. & Rock, D. L. (1998).** The African swine fever virus thymidine kinase gene is required for efficient replication in swine macrophages and for virulence in swine. *J Virol* **72**, 10310–5.
- Moulton, J. & Coggins, L. (1968).** Comparison of lesions in acute and chronic African swine fever. *Cornell Vet* **58**, 364–88.
- Moulton, J. E., Pan, I. C., Hess, W. R., DeBoer, C. J. & Tessler, J. (1975).** Pathologic features of chronic pneumonia in pigs with experimentally induced African swine fever. *Am J Vet Res* **36**, 27–32.
- Mulumba-Mfumu, L. K., Goatley, L. C., Saegerman, C., Takamatsu, H.-H. & Dixon, L. K. (2015).** Immunization of African Indigenous Pigs with Attenuated Genotype I African Swine Fever Virus OURT88/3 Induces Protection Against Challenge with Virulent Strains of Genotype I. *Transbound Emerg Dis*.
- Mur, L., Atzeni, M., Martínez-López, B., Feliziani, F., Rolesu, S. & Sanchez-Vizcaino, J. M. (2014).** Thirty-Five-Year Presence of African Swine Fever in Sardinia: History, Evolution and Risk Factors for Disease Maintenance. *Transbound Emerg Dis*.

- Neilan, J. G., Zsak, L., Lu, Z., Kutish, G. F., Afonso, C. L. & Rock, D. L. (2002).** Novel swine virulence determinant in the left variable region of the African swine fever virus genome. *J Virol* **76**, 3095–104.
- Neilan, J. G., Zsak, L., Lu, Z., Burrage, T. G., Kutish, G. F. & Rock, D. L. (2004).** Neutralizing antibodies to African swine fever virus proteins p30, p54, and p72 are not sufficient for antibody-mediated protection. *Virology* **319**, 337–42.
- Netherton, C., Rouiller, I. & Wileman, T. (2004).** The subcellular distribution of multigene family 110 proteins of African swine fever virus is determined by differences in C-terminal KDEL endoplasmic reticulum retention motifs. *J Virol* **78**, 3710–21.
- Nix, R. J., Gallardo, C., Hutchings, G., Blanco, E. & Dixon, L. K. (2006).** Molecular epidemiology of African swine fever virus studied by analysis of four variable genome regions. *Arch Virol* **151**, 2475–94.
- Nogal, M. L., González de Buitrago, G., Rodríguez, C., Cubelos, B., Carrascosa, A. L., Salas, M. L. & Revilla, Y. (2001).** African swine fever virus IAP homologue inhibits caspase activation and promotes cell survival in mammalian cells. *J Virol* **75**, 2535–43.
- Norley, S. G. & Wardley, R. C. (1983).** Investigation of porcine natural-killer cell activity with reference to African swine-fever virus infection. *Immunology* **49**, 593–7.
- Normile, D. (2010).** Rinderpest, deadly for cattle, joins smallpox as a vanquished disease. *Science* (80-) http://www.cuso.ch/fileadmin/biologie_microbiologi.
- Nunes-Correia, I., Rodríguez, J. M., Eulálio, A., Carvalho, A. L., Citovsky, V., Simões, S., Faro, C., Salas, M. L. & Pedroso de Lima, M. C. (2008).** African swine fever virus p10 protein exhibits nuclear import capacity and accumulates in the nucleus during viral infection. *Vet Microbiol* **130**, 47–59.
- O'Donnell, V., Holinka, L. G., Gladue, D. P., Sanford, B., Krug, P. W., Lu, X., Arzt, J., Reese, B., Carrillo, C. & other authors. (2015a).** African swine fever virus Georgia isolate harboring deletions of MGF360 and MGF505 genes is attenuated in swine and confers protection against challenge with the virulent parental virus. *J Virol*.
- O'Donnell, V., Holinka, L. G., Krug, P. W., Gladue, D. P., Carlson, J., Sanford, B., Alfano, M., Kramer, E., Lu, Z. & other authors. (2015b).** Deletion of African Swine Fever Virus Georgia 2007 virulence-associated gene 9GL (B119L) leads to virus attenuation in swine at low doses while inducing an effective protection against homologous challenge. *J Virol*.
- Oganesyan, A. S., Petrova, O. N., Korennoy, F. I., Bardina, N. S., Gogin, A. E. & Dudnikov, S. A. (2013).** African swine fever in the Russian Federation: spatio-temporal analysis and epidemiological overview. *Virus Res* **173**, 204–11.
- Onisk, D. V., Borca, M. V., Kutish, G., Kramer, E., Irusta, P. & Rock, D. L. (1994).** Passively transferred African swine fever virus antibodies protect swine against lethal infection. *Virology* **198**, 350–4.
- Oura, C. A., Powell, P. P., Anderson, E. & Parkhouse, R. M. (1998a).** The pathogenesis of African swine fever in the resistant bushpig. *J Gen Virol* **79** (Pt 6), 1439–43.

- Oura, C. A., Powell, P. P. & Parkhouse, R. M. (1998b).** African swine fever: a disease characterized by apoptosis. *J Gen Virol* **79** (Pt 6), 1427–38.
- Oura, C. A. L., Denyer, M. S., Takamatsu, H. & Parkhouse, R. M. E. (2005).** In vivo depletion of CD8+ T lymphocytes abrogates protective immunity to African swine fever virus. *J Gen Virol* **86**, 2445–50.
- Oviedo, J. M., Rodriguez, F., Gómez-Puertas, P., Brun, A., Gómez, N., Alonso, C. & Escribano, J. M. (1997).** High level expression of the major antigenic African swine fever virus proteins p54 and p30 in baculovirus and their potential use as diagnostic reagents. *J Virol Methods* **64**, 27–35.
- Pan, I. C. & Hess, W. R. (1984).** Virulence in African swine fever: its measurement and implications. *Am J Vet Res* **45**, 361–6.
- Pan, I. C., De Boer, C. J. & Heuschele, W. P. (1970).** Hypergammaglobulinemia in swine infected with African swine fever virus. *Proc Soc Exp Biol Med* **134**, 367–71.
- Pan, I. C., Trautman, R., Hess, W. R., DeBoer, C. J., Tessler, J., Ordas, A., Botija, C. S., Ovejero, J. & Sanchez, M. C. (1974).** African swine fever: comparison of four serotests on porcine serums in Spain. *Am J Vet Res* **35**, 787–90.
- Pastor, M. J., Laviada, M. D., Sanchez-Vizcaino, J. M. & Escribano, J. M. (1989).** Detection of African swine fever virus antibodies by immunoblotting assay. *Can J Vet Res* **53**, 105–7.
- Pastor, M. J., Arias, M. & Escribano, J. M. (1990).** Comparison of two antigens for use in an enzyme-linked immunosorbent assay to detect African swine fever antibody. *Am J Vet Res* **51**, 1540–3.
- Pastor, M. J., Arias, M., Alcaraz, C., De Diego, M. & Escribano, J. M. (1992).** A sensitive dot immunobinding assay for serodiagnosis of African swine fever virus with application in field conditions. *J Vet Diagn Invest* **4**, 254–7.
- Penrith, M. L., Vosloo, W., Jori, F. & Bastos, A. D. S. (2013).** African swine fever virus eradication in Africa. *Virus Res* **173**, 228–46.
- Plowright, W., Perry, C. T. & Greig, A. (1974).** Sexual transmission of African swine fever virus in the tick, *Ornithodoros moubata* porcinus, Walton. *Res Vet Sci* **17**, 106–13.
- Plowright, W., Parker, J. & Staple, R. F. (1969).** African swine fever virus in ticks (*Ornithodoros moubatu*, Murray) collected from animal burrows in Tanzania. *Nature* **221**:1071–1073.
- Portugal, R., Leitão, A. & Martins, C. (2009).** Characterization of African swine fever virus IAP homologue expression in porcine macrophages infected with different virulence isolates. *Vet Microbiol* **139**, 140–146.
- Powell, P. P., Dixon, L. K. & Parkhouse, R. M. (1996).** An IkappaB homolog encoded by African swine fever virus provides a novel mechanism for downregulation of proinflammatory cytokine responses in host macrophages. *J Virol* **70**, 8527–33.

- Quetglas, J. I., Hernández, B., Galindo, I., Muñoz-Moreno, R., Cuesta-Geijo, M. A. & Alonso, C. (2012). Small rho GTPases and cholesterol biosynthetic pathway intermediates in African swine fever virus infection. *J Virol* **86**, 1758–67.
- Ramiro-Ibáñez, F., Ortega, A., Brun, A., Escribano, J. M. & Alonso, C. (1996). Apoptosis: a mechanism of cell killing and lymphoid organ impairment during acute African swine fever virus infection. *J Gen Virol* **77** (Pt 9), 2209–19.
- Ramiro-Ibáñez, F., Ortega, A., Ruiz-Gonzalvo, F., Escribano, J. M. & Alonso, C. (1997). Modulation of immune cell populations and activation markers in the pathogenesis of African swine fever virus infection. *Virus Res* **47**, 31–40.
- Raoult, D., Audic, S., Robert, C., Abergel, C., Renesto, P., Ogata, H., La Scola, B., Suzan, M. & Claverie, J.-M. (2004). The 1.2-megabase genome sequence of Mimivirus. *Science* **306**, 1344–50.
- Reed, L. J. & Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoint. *Am J Hyg* **27**, 493–497.
- Reis, A. L., Parkhouse, R. M. E., Penedos, A. R., Martins, C. & Leitão, A. (2007). Systematic analysis of longitudinal serological responses of pigs infected experimentally with African swine fever virus. *J Gen Virol* **88**, 2426–34.
- Rennie, L., Wilkinson, P. J. & Mellor, P. S. (2001). Transovarial transmission of African swine fever virus in the argasid tick *Ornithodoros moubata*. *Med Vet Entomol* **15**, 140–6.
- Revilla, Y., Cebrián, A., Baixeras, E., Martínez, C., Viñuela, E. & Salas, M. L. (1997). Inhibition of apoptosis by the African swine fever virus Bcl-2 homologue: role of the BH1 domain. *Virology* **228**, 400–4.
- Ririe, K. M., Rasmussen, R. P. & Wittwer, C. T. (1997). Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* **245**, 154–60.
- Rodríguez, F., Ley, V., Gómez-Puertas, P., García, R., Rodríguez, J. F. & Escribano, J. M. (1996). The structural protein p54 is essential for African swine fever virus viability. *Virus Res* **40**, 161–7.
- Rodríguez, I., Nogal, M. L., Redrejo-Rodríguez, M., Bustos, M. J. & Salas, M. L. (2009). The African swine fever virus virion membrane protein pE248R is required for virus infectivity and an early postentry event. *J Virol* **83**, 12290–300.
- Rodríguez, J. M., Yanez, R. J., Almazan, F., Vinuela, E. & Rodríguez, J. F. (1993). African swine fever virus encodes a CD2 homolog responsible for the adhesion of erythrocytes to infected cells. *J Virol* **67**, 5312–5320.
- Rodríguez, J. M., Almazán, F., Viñuela, E. & Rodríguez, J. F. (1992). Genetic manipulation of African swine fever virus: construction of recombinant viruses expressing the beta-galactosidase gene. *Virology* **188**, 67–76.
- Rodríguez, J. M. & Salas, M. L. (2013). African swine fever virus transcription. *Virus Res* **173**, 15–28.

- Rodríguez, J. M., García-Escudero, R., Salas, M. L. & Andrés, G. (2004).** African swine fever virus structural protein p54 is essential for the recruitment of envelope precursors to assembly sites. *J Virol* **78**, 4299–1313.
- Rodríguez, J. M., Moreno, T., Alejo, A., Lacasta, A., Rodríguez, F. & Salas, M. L. (2015).** Genome sequence of African swine fever virus BA71, the virulent parental strain of the nonpathogenic and tissue-culture adapted BA71V isolate.
- Rojo, G., García-Beato, R., Viñuela, E., Salas, M. L. & Salas, J. (1999).** Replication of African swine fever virus DNA in infected cells. *Virology* **257**, 524–36.
- Ronish, B., Hakhverdyan, M., Ståhl, K., Gallardo, C., Fernandez-Pinero, J., Belák, S., Leblanc, N. & Wangh, L. (2011).** Design and verification of a highly reliable Linear-After-The-Exponential PCR (LATE-PCR) assay for the detection of African swine fever virus. *J Virol Methods* **172**, 8–15.
- Rouiller, I., Brookes, S. M., Hyatt, A. D., Windsor, M. & Wileman, T. (1998).** African swine fever virus is wrapped by the endoplasmic reticulum. *J Virol* **72**, 2373–87.
- Rowlands, R. J., Michaud, V., Heath, L., Hutchings, G., Oura, C., Vosloo, W., Dwarka, R., Onashvili, T., Albina, E. & Dixon, L. K. (2008).** African swine fever virus isolate, Georgia, 2007. *Emerg Infect Dis* **14**, 1870–4.
- Ruiz Gonzalvo, F., Carnero, M. E., Caballero, C. & Martínez, J. (1986a).** Inhibition of African swine fever infection in the presence of immune sera in vivo and in vitro. *Am J Vet Res* **47**, 1249–52.
- Ruiz Gonzalvo, F., Caballero, C., Martinez, J. & Carnero, M. E. (1986b).** Neutralization of African swine fever virus by sera from African swine fever-resistant pigs. *Am J Vet Res* **47**, 1858–62.
- Ruiz Gonzalvo, F., Carnero, M. E. & Bruyel, V. (1983).** Immunological responses of pigs to partially attenuated African swine fever virus and their resistance to virulent homologous and heterologous viruses. *Wilkinson, PJ (Ed), African Swine Fever, Proc EUR 8466 EN, CEC/FAO Res Semin Sardinia, Sept 1981* 206–216.
- Ruiz-Gonzalvo, F., Rodríguez, F. & Escribano, J. M. (1996).** Functional and immunological properties of the baculovirus-expressed hemagglutinin of African swine fever virus. *Virology* **218**, 285–9.
- Salas, M. L., Kuznar, J. & Viñuela, E. (1981).** Polyadenylation, methylation, and capping of the RNA synthesized in vitro by African swine fever virus. *Virology* **113**, 484–91.
- Salas, M. L. (1999).** African Swine Fever Virus (Asfarviridae). *Allan Granof, RGW Encycl Virol Acad Press London* 30–38.
- Salas, M. L. & Andrés, G. (2013).** African swine fever virus morphogenesis. *Virus Res* **173**, 29–41.
- Salguero, F. J., Ruiz-Villamor, E., Bautista, M. J., Sánchez-Cordón, P. J., Carrasco, L. & Gómez-Villamandos, J. C. (2002).** Changes in macrophages in spleen and lymph nodes during

- acute African swine fever: expression of cytokines. *Vet Immunol Immunopathol* **90**, 11–22.
- Salguero, F. J., Sánchez-Cordón, P. J., Núñez, A., Fernández de Marco, M. & Gómez-Villamandos, J. C. (2005).** Proinflammatory cytokines induce lymphocyte apoptosis in acute African swine fever infection. *J Comp Pathol* **132**, 289–302.
- Sanchez Botija, C. (1963).** Reservorios del virus de la peste porcina africana. Investigación del virus de la P.P.A. en los artrópodos mediante la prueba de hemadsorción. *Bull Off int Epiz*, **68**, 895–899.
- Sánchez, E. G., Quintas, A., Pérez-Núñez, D., Nogal, M., Barroso, S., Carrascosa, Á. L. & Revilla, Y. (2012).** African swine fever virus uses macropinocytosis to enter host cells. *PLoS Pathog* **8**, e1002754.
- Sánchez-Cordón, P. J., Romero-Trejejo, J. L., Pedrera, M., Sánchez-Vizcaíno, J. M., Bautista, M. J. & Gómez-Villamandos, J. C. (2008).** Role of hepatic macrophages during the viral haemorrhagic fever induced by African Swine Fever Virus. *Histol Histopathol* **23**, 683–91.
- Sánchez-Torres, C., Gómez-Puertas, P., Gómez-del-Moral, M., Alonso, F., Escribano, J. M., Ezquerro, A. & Domínguez, J. (2003).** Expression of porcine CD163 on monocytes/macrophages correlates with permissiveness to African swine fever infection. *Arch Virol* **148**, 2307–23.
- Sanchez-Vizcaino, J. M. (1987).** African swine fever diagnosis. *Ina Swine Fever*, Becker Y, ed *Martinus Nijhoff, Boston, USA*, 63 – 71.
- Sanchez-Vizcaino, J. M. (2006).** African swine fever. In *Diseases of swine*. 291–298.
- Sanchez-Vizcaino, J. (1986).** African swine fever diagnosis. *Martinus Nijhoff Publ Boston, MA* 63–71.
- Sanchez-Vizcaino, J., Tabares, E. & Salvador, E. (1982).** Semipurified structural viral protein for the detection of African swine fever antibodies by indirect ELISA technique. *Curr Top Vet Med Anim Sci* 214–222.
- Sánchez-Vizcaíno, J. M., Mur, L. & Martínez-López, B. (2013).** African swine fever (ASF): five years around Europe. *Vet Microbiol* **165**, 45–50.
- Santurde, G., Ruiz Gonzalvo, F., Carnero, M. E. & Tabarés, E. (1988).** Genetic stability of African swine fever virus grown in monkey kidney cells. Brief report. *Arch Virol* **98**, 117–22.
- Sanz, A., García-Barreno, B., Nogal, M. L., Viñuela, E. & Enjuanes, L. (1985).** Monoclonal antibodies specific for African swine fever virus proteins. *J Virol* **54**, 199–206.
- Schlafer, D. H., McVicar, J. W. & Mebus, C. A. (1984a).** African swine fever convalescent sows: subsequent pregnancy and the effect of colostral antibody on challenge inoculation of their pigs. *Am J Vet Res* **45**, 1361–6.

- Schlafer, D. H., Mebus, C. A. & McVicar, J. W. (1984b).** African swine fever in neonatal pigs: passively acquired protection from colostrum or serum of recovered pigs. *Am J Vet Res* **45**, 1367–72.
- Schloer, G. M. (1985).** Polypeptides and structure of African swine fever virus. *Virus Res* **3**, 295–310.
- Sierra, M. A., Bernabe, A., Mozos, E., Mendez, A. & Jover, A. (1987).** Ultrastructure of the liver in pigs with experimental African swine fever. *Vet Pathol* **24**, 460–2.
- Sierra, M. A., Quezada, M., Fernandez, A., Carrasco, L., Gomez-Villamandos, J. C., Martin de las Mulas, J. & Sanchez-Vizcaino, J. M. (1989).** Experimental African swine fever: evidence of the virus in interstitial tissues of the kidney. *Vet Pathol* **26**, 173–6.
- Simón-Mateo, C., Andrés, G. & Viñuela, E. (1993).** Polyprotein processing in African swine fever virus: a novel gene expression strategy for a DNA virus. *EMBO J* **12**, 2977–87.
- Simón-Mateo, C., Andrés, G., Almazán, F. & Viñuela, E. (1997).** Proteolytic processing in African swine fever virus: evidence for a new structural polyprotein, pp62. *J Virol* **71**, 5799–804.
- Steyn, D. G. (1932).** East african virus disease in pigs. *18th Rep Dir vet Serv Anim Ind Sth Africa*, 99–109.
- Stone, S. S. & Hess, W. R. (1967).** Antibody response to inactivated preparations of African swine fever virus in pigs. *Am J Vet Res* **28**, 475–81.
- Suárez, C., Gutiérrez-Berzal, J., Andrés, G., Salas, M. L. & Rodríguez, J. M. (2010).** African swine fever virus protein p17 is essential for the progression of viral membrane precursors toward icosahedral intermediates. *J Virol* **84**, 7484–99.
- Tabares, E. & Sánchez Botija, C. (1979).** Synthesis of DNA in cells infected with African swine fever virus. *Arch Virol* **61**, 49–59.
- Takamatsu, H.-H., Denyer, M. S., Lacasta, A., Stirling, C. M. A., Argilaguet, J. M., Netherton, C. L., Oura, C. A. L., Martins, C. & Rodríguez, F. (2013).** Cellular immunity in ASFV responses. *Virus Res* **173**, 110–21.
- Tekiel, V., Alba-Soto, C. D., González Cappa, S. M., Postan, M. & Sánchez, D. O. (2009).** Identification of novel vaccine candidates for Chagas' disease by immunization with sequential fractions of a trypomastigote cDNA expression library. *Vaccine* **27**, 1323–32.
- Uttenthal, Å., Braae, U. C., Ngowi, H. A., Rasmussen, T. B., Nielsen, J. & Johansen, M. V. (2013).** ASFV in Tanzania: asymptomatic pigs harbor virus of molecular similarity to Georgia 2007. *Vet Microbiol* **165**, 173–6.
- Vallée, I., Tait, S. W. & Powell, P. P. (2001).** African swine fever virus infection of porcine aortic endothelial cells leads to inhibition of inflammatory responses, activation of the thrombotic state, and apoptosis. *J Virol* **75**, 10372–82.

- Vergne, T., Guinat, C., Petkova, P., Gogin, A., Kolbasov, D., Blome, S., Molia, S., Pinto Ferreira, J., Wieland, B. & other authors. (2014).** Attitudes and Beliefs of Pig Farmers and Wild Boar Hunters Towards Reporting of African Swine Fever in Bulgaria, Germany and the Western Part of the Russian Federation. *Transbound Emerg Dis*.
- Vial, L., Wieland, B., Jori, F., Etter, E., Dixon, L. & Roger, F. (2007).** African swine fever virus DNA in soft ticks, Senegal. *Emerg Infect Dis* **13**, 1928–31.
- Villeda, C. J., Williams, S. M., Wilkinson, P. J. & Viñuela, E. (1993a).** Haemostatic abnormalities in African swine fever a comparison of two virus strains of different virulence (Dominican Republic '78 and Malta '78). *Arch Virol* **130**, 71–83.
- Villeda, C. J., Williams, S. M., Wilkinson, P. J. & Viñuela, E. (1993b).** Consumption coagulopathy associated with shock in acute African swine fever. *Arch Virol* **133**, 467–75.
- De Villiers, E. P., Gallardo, C., Arias, M., da Silva, M., Upton, C., Martin, R. & Bishop, R. P. (2010).** Phylogenomic analysis of 11 complete African swine fever virus genome sequences. *Virology* **400**, 128–36.
- Vydelingum, S., Baylis, S. A., Bristow, C., Smith, G. L. & Dixon, L. K. (1993).** Duplicated genes within the variable right end of the genome of a pathogenic isolate of African swine fever virus. *J Gen Virol* **74** (Pt 10), 2125–30.
- Wardley, R. C., Norley, S. G., Wilkinson, P. J. & Williams, S. (1985).** The role of antibody in protection against African swine fever virus. *Vet Immunol Immunopathol* **9**, 201–12.
- Whittall, J. T. & Parkhouse, R. M. (1997).** Changes in swine macrophage phenotype after infection with African swine fever virus: cytokine production and responsiveness to interferon-gamma and lipopolysaccharide. *Immunology* **91**, 444–9.
- Wilkinson, P. J., Wardley, R. C. & Williams, S. M. (1981).** African swine fever virus (Malta/78) in pigs. *J Comp Pathol* **91**, 277–84.
- Yáñez, R. J., Rodríguez, J. M., Nogal, M. L., Yuste, L., Enríquez, C., Rodríguez, J. F. & Viñuela, E. (1995).** Analysis of the complete nucleotide sequence of African swine fever virus. *Virology* **208**, 249–78.
- Yozawa, T., Kutish, G. F., Afonso, C. L., Lu, Z. & Rock, D. L. (1994).** Two novel multigene families, 530 and 300, in the terminal variable regions of African swine fever virus genome. *Virology* **202**, 997–1002.
- Zhang, F., Hopwood, P., Abrams, C. C., Downing, A., Murray, F., Talbot, R., Archibald, A., Lowden, S. & Dixon, L. K. (2006).** Macrophage Transcriptional Responses following In Vitro Infection with a Highly Virulent African Swine Fever Virus Isolate. *J Virol* **80**, 10514–10521.
- Zsak, L., Onisk, D. V., Afonso, C. L. & Rock, D. L. (1993).** Virulent African swine fever virus isolates are neutralized by swine immune serum and by monoclonal antibodies recognizing a 72-kDa viral protein. *Virology* **196**, 596–602.

- Zsak, L., Lu, Z., Kutish, G. F., Neilan, J. G. & Rock, D. L. (1996).** An African swine fever virus virulence-associated gene NL-S with similarity to the herpes simplex virus ICP34.5 gene. *J Virol* **70**, 8865–71.
- Zsak, L., Caler, E., Lu, Z., Kutish, G. F., Neilan, J. G. & Rock, D. L. (1998).** A nonessential African swine fever virus gene UK is a significant virulence determinant in domestic swine. *J Virol* **72**, 1028–35.
- Zsak, L., Lu, Z., Burrage, T. G., Neilan, J. G., Kutish, G. F., Moore, D. M. & Rock, D. L. (2001).** African swine fever virus multigene family 360 and 530 genes are novel macrophage host range determinants. *J Virol* **75**, 3066–76.
- Zsak, L., Borca, M. V, Risatti, G. R., Zsak, A., French, R. A., Lu, Z., Kutish, G. F., Neilan, J. G., Callahan, J. D. & other authors. (2005).** Preclinical diagnosis of African swine fever in contact-exposed swine by a real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* **43**, 112–9.