Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Estudio de aislamientos nacionales y desarrollo de una vacuna a subunidad, direccionada a células presentadoras de antígenos, para el Virus de la Lengua Azul

Legisa, Danilo Mario

2014-04-03

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Legisa, Danilo Mario. (2014-04-03). Estudio de aislamientos nacionales y desarrollo de una vacuna a subunidad, direccionada a células presentadoras de antígenos, para el Virus de la Lengua Azul. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Legisa, Danilo Mario. "Estudio de aislamientos nacionales y desarrollo de una vacuna a subunidad, direccionada a células presentadoras de antígenos, para el Virus de la Lengua Azul". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014-04-03.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS y NATURALES
Departamento de Química Biológica

Estudio de aislamientos nacionales y desarrollo de una vacuna a subunidad, direccionada a células presentadoras de antígenos, para el Virus de la Lengua Azul

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica

Danilo Mario Legisa

Director de tesis: Dra. María José Dus Santos

Consejero de estudios: Dra. Elsa Damonte

Lugar de trabajo: Laboratorio de Vacunas de Nueva Generación. Instituto de Virología, CICVyA, INTA Castelar. Las Cabañas y Los Reseros s/n. Hurlingham. Buenos Aires, Argentina.

Buenos Aires, 2014

Estudio de aislamientos nacionales y desarrollo de una vacuna a subunidad, direccionada a células presentadoras de antígenos, para el Virus de la Lengua Azul

Resumen

La Lengua Azul es una enfermedad que afecta principalmente rumiantes salvajes y doméstico, y representa una importante barrera para el comercio internacional de animales y sus subproductos. El Virus de la Lengua Azul es el causante etiológico de la enfermedad y es transmitido por insectos hematófagos del género Culicoides. El Virus de la Lengua Azul , es el miembro prototipo del género Orbivirus dentro de la familia Reoviridae. El virión está compuesto por una doble capa proteica desnuda que envuelve un genoma de 10 segmentos lineales de ARNdc, los cuales codifican para al menos diez proteínas, 7 proteínas estructurales y al menos 4 no estructurales.

La distribución del Virus de la Lengua Azul es global aunque en ciertas zonas la información es escasa. En Sudamérica, evidencia serológica de la presencia del virus fue encontrada todos los países menos Uruguay y Bolivia. Argentina y Brasil son los únicos países donde ha sido aislado el virus. En Argentina han sido obtenidos 5 aislamientos de Virus de la Lengua Azul serotipo4 en ganado bovino. Tres de estos aislamientos fueron logrados entre los años 1999-2001, mientras los dos restantes fueron obtenidos en los años 2009 y 2010 como parte del presente trabajo de tesis.

La medida de control más práctica y eficaz es la inmunización profiláctica de los animales susceptibles. Desde principios del siglo XX se han desarrollado vacunas atenuadas e inactivadas eficientes para la Lengua Azul. Sin embargo, las desventajas en cuanto a bioseguridad y efectos adversos impulsan el desarrollo de vacunas a subunidad, no infecciosas como alternativa a las vacunas convencionales. En este trabajo de tesis se abordó un análisis epidemiológico molecular de los aislamientos argentinos del VLA y el desarrollo de una vacuna a subunidad direccionada a células presentadoras de antígeno.

El análisis epidemiológico molecular se basó en la obtención y análisis de las secuencias de 5 de los 10 segmentos virales (Segmentos 2, 3, 6, 7 y 10). El análisis de los segmentos 2 y 6 resultó en un cluster de secuencias argentinas dentro del clado del serotipo 4 y también dentro del grupo del nucleotipo A (definido para cada segmento). El análisis de los segmentos 3, 7 y 10 mostró que los aislamientos argentinos agrupan dentro del cluster de aislamientos de topotipo occidental o *western*, indicando que su origen se remontaría a África/Europa. El análisis filogenético reveló que, además de este origen, las secuencias argentinas representaron un fuerte linaje Sudamericano de evolución independiente.

El desarrollo de la vacuna a subunidad se basó en la expresión de la proteína VP2, mayoritaria de la cápside externa e inmunodominante, sola o fusionada a la molécula APCH (Antigen Presenting Cell Homing) capaz de dirigir moléculas a células presentadoras de antígeno, utilizando el sistema de expresión de baculovirus. Los ensayos de inmunogenicidad en cobayos y bovinos utilizando estos dos antígenos, resultaron en altos títulos de anticuerpos neutralizantes similares a los evocados por la vacuna formulada con virus inactivado. Más aún, se obtuvieron títulos comparables para VP2 y dosis 4 veces menores de APCH-VP2 demostrando la capacidad APCH de potenciar la generación de anticuerpos. Como caracterización de la respuesta inmune asociada se analizó el perfil de inmunoglobulinas G y la presencia de células T de memoria. El perfil de IgG en los bovinos inmunizados con APCH-VP2 mostró una mayor proporción de IgG1 en comparación con los grupos vacunados con VP2 sola o con el virus inactivado. Por otro lado, la inmunización con las vacunas experimentales, mostró generación de células T de memoria para VP2 sola. Además, se comprobó la capacidad de las vacunas recombinantes de diferencias animales vacunados de infectados. Esta sección constituye un aporte en el desarrollo de vacunas a subunidad, capaces de generar una respuesta inmune comparable a vacunas inactivadas pero con características emergentes.

Palabras clave: virus de la lengua azul, epidemiologia, Argentina, vacunas recombinantes.

Study of national isolates and development of a subunit vaccine delivered to antigen presenting cells for Bluetongue Virus.

Abstract

Bluetongue disease affects principally wild and domestic ruminants and represents a major barrier to animal trade and their sub products. The etiological agent is the Bluetongue Virus, it is transmitted by hematophagous arthropods from the genus Culicoides. Bluetongue Virus is the prototype member of genus Orbivirus and it belongs to *Reoviridae* family. The non enveloped virión is composed by two concentric protein layer which contents the viral genome, composed by ten dsRNA segments. This genome codifies for 7 structural proteins and at least, 4 non structural proteins.

Bluetongue Virus is worldwide distributed, although there is a lack of information in certain regions. In Southamerica, serologic evidences of Bluetongue Virus were recorded in all countries except Uruguay and Bolivia. Argentina and Brazil are the only two countries where the virus was isolated. In Argentina, five Bluetongue Virus serotype 4 isolates have been obtained from asymptomatic cattle. Three isolates were obtained in years 1999-2001, and two in years 2009 and 2010 as result of this thesis work.

Prophylactic immunization of susceptible animals is the most practical and effective measure to prevent Bluetongue disease. From beginning of XX century, attenuated and inactivated vaccines against Bluetongue Virus have been developed, however, biosafety issues and the well known adverse effects lead to the development of subunit vaccines as an alternative to classic ones. In this work, we performed a molecular epidemiology study of Argentinean Bluetongue Virus isolates and we also developed a subunit vaccine delivered to antigen presenting cells.

The molecular epidemiology approach was based on the sequence analysis from 5 out of 10 genome segments (Segments 2, 3, 6, 7, and 10). Segments 2 and 6 analysis showed that Argentinean sequences grouped into the serotype 4 cluster and nucleotype A group, and even more, they grouped in a unique Argentinean cluster whit high bootstrap value. Segments 3, 7 and 10 analysis, showed that Argentinean isolates grouped into a western topotype cluster, along with sequences already classified as originated in Africa and/or Europe. Phylogenetic analysis revealed

that all Argentinean sequences formed a well supported Southamerican lineage with independent evolutionary history.

The subunit vaccine development was based on the baculoviral expression of VP2 protein, the major and immunodominant component of the outer capsid, alone or fussed to a molecule named APCH (antigen presenting cell homing), capable to deliver peptides or molecules to antigen presenting cells. Immunogenicity assays conducted in guinea pigs and cattle showed that both antigens were able to induce high neutralizing antibodies titers similar to those evoked by the inactivated vaccine. Moreover, VP2 antibody titers were comparable to APCH-VP2 titers which were generated using a 4 times lower dose of antigen, demonstrating the ability of APCH molecule to enhance the generation of antibodies. As part of the immune response characterization, immunoglobulin G profile and the presence of memory T cells were analyzed. IgG profile in animals vaccinated whit APCH-VP2 showed a higher proportion of IgG1 in comparison with VP2 and inactivated BTV groups. On the other hand, immunization with both candidate vaccines showed the generation of memory T cells specific to VP2. In addition, the capacity of the recombinant vaccine to differentiate vaccinated animal from infected ones was confirmed. This section represents a contribution in the development of Bluetongue Virus subunit vaccines capable of generating an immune response comparable to inactivated vaccines but with new and advance features.

Keywords: Bluetongue Virus, Epidemiology, recombinant vaccines

Agradecimientos:

A la **Universidad de Buenos Aires**, a la **Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**.

A la **familia** y los **amigos**.

Al Dr. Roberto Julio **Staneloni**.

A la Dra. Maria José **Dus Santos**, por el espacio y la libertad.

Al **Instituto de Virología**, contenido en INTA Castelar. A toda su gente. Y a los **buenos amigos** que me llevo de acá…

A la **ANPCyT** y **CONICET** por financiar las becas.

Al laboratorio **C** y sus miembros.

Al Dr. Javier **Ortego** (INIA, España) por la ayuda totalmente desinteresada.

A las personas con quienes colaboramos en este trabajo de tesis y otros trabajos más.

Al Comité de Seguimiento de Tesis en el I.V.: Dra. Calamante, Dr. Odeón, Dr. Pereda.

A la consejera de estudios, la Dra. Elsa **Damonte**, en el Depto. de Qca. Biológica (FCEyN, UBA), por la ayuda constante.

Cada cual sabrá en que grupo está, y más aún, si no está en ninguno.

Parte de los resultados presentados en este trabajo de Tesis fueron publicados en las siguientes revistas internacionales con referato:

- **FIRST PHYLOGENETIC ANALYSIS OF BLUETONGUE VIRUS SEROTYPE 4 FIELD ISOLATES FROM ARGENTINA.**
  Legisa Danilo, González Fernanda, De Stefano Gabriel, Pereda A, Dus Santos María José.
  Journal of General Virology. 2013 Mar; 94(Pt 3):652-62. doi: 10.1099/vir.0.046896-0. Epub 2012 Nov 14.

- **BLUETONGUE VIRUS IN SOUTH AMERICA, CENTRAL AMERICA AND THE CARIBBEAN**.
  Danilo M Legisa; Fernanda N González; María José Dus Santos.
  Virus Research, BTV Special Issue, Available online: 12-NOV-2013, DOI information: 10.1016/j.virusres.2013.10.030.

Abreviaturas: 15
1. Introducción 17
1.1 Historia 17
1.2 Impacto económico 18
1.3 Distribución 21
1.4 Propiedades de la partícula viral 26
1.5 Patología 29
1.6 Transmisión 31
1.7 Diagnóstico 34
1.8 Epidemiología molecular 35
1.9 Prevención y control 38
1.10 Vacunas 39
2. HIPOTESIS 45
3. OBJETIVOS 46
Objetivo general 46
Objetivos específicos 46
4. MATERIALES Y MÉTODOS 47
4.1 Obtención de muestras 47
4.2. Pruebas diagnósticas 48
4.2.1 Pruebas serológicas 48
4.2.2 RT-nPCR 48
4.3. Aislamiento viral. 51
4.3.1. Cultivo celular en células C6/36 (Aedes albopictus, ATCC CRL1660) 51
4.3.2. Cultivo celular en células BHK21 52
4.4. Mantención de stock viral y titulación viral 52
4.5. Amplificación de secuencias 53
4.5.1. Extracción de ARN. 53
4.5.2. Reacciones de RT-PCR y PCR para amplificación del genoma del VLA. 53
4.5.3 Electroforesis en gel de agarosa 57
4.6. Secuenciación 57

4.7. Análisis filogenético de distancias 58
4.7.1. Alineamiento de secuencias nucleotídicas 58
4.7.2. Reconstrucción de árboles filogenéticos. 58
4.8. Análisis filogenético de máxima verosimilitud 58
4.8.1. Alineamiento de secuencias nucleotídicas 58
4.8.2. Reconstrucción de árboles filogenéticos. 59
4.8.3. Análisis de similitud 60
4.9. Sub clonado de Segmento 2 61
4.10. Sistema de Baculovirus 65
4.10.2. Generación de Bácmido 65
4.10.3. Células Sf9 66
4.10.4. Transfección de células de insecto 66
4.10.5. Selección células transfectantes 67
4.10.6. Obtención de baculovirus recombinante 67
4.11 Expresión de la proteína recombinante 68
4.11.1. Análisis de expresión 68
4.11.2. Cuantificación estimada por comparación 69
4.11.3. Cuantificación de proteínas totales 69
4.12. Caracterización antigénica: wb con sueros anti VLA 69
4.13. Evaluación inmunogénica 70
4.13.1. Formulación de las vacunas 70
4.13.2. Inactivación con BEI 70
4.14. Evaluación en cobayos 71
4.14.1. Animales 71
4.14.2. Diseño experimental 71
4.15. Evaluación en bovinos 72
4.15.1. Animales 72
4.15.2. Diseño experimental 73
4.16. Seroneutralización viral 74
4.17 Inmunofluorescencia 75

4.18 ELISAc (kit comercial) para evaluar capacidad DIVA 75
4.19 Elisa isotipos 75
4.20 Obtención de linfocitos 76
4.21 Linfoproliferación dependiente de antígeno. 76
4.22 Protocolo CFSE 77
4.23 Citometría 78
4.24 Análisis estadístico 78
4.25. Bienestar animal 79
5. RESULTADOS 80
5.1 Aislamiento viral 80
5.2 Amplificación de segmentos génicos. 81
5.3 Análisis filogenético 82
5.3.1 Segmento 2 85
5.3.2 Segmento 3 87
5.3.3 Segmento 6 89
5.3.4 Segmento 7 91
5.3.5 Segmento 10 93
5.4 Análisis de similitud de secuencias del Seg2. 95
5.5 Amplificación y clonado del gen de la proteína VP2. 97
5.6 Obtención del baculovirus recombinante 97
5.7 Producción de las proteínas recombinantes. 98
5.7.1 Efecto citopático en células adherentes 98
5.7.2 Evaluación de la expresión en células SF9. 99
5.7.3 Optimización de condiciones de infección y cosecha. 99
5.7.3.1 Curva de MOI 100
5.7.3.2 Curva de días de cosecha post infección 101
5.7.3.3 Volumen de producción antigénica 101
5.8 Detección y caracterización antigénica de la proteína VP2 recombinante 102
5.9 Cuantificación de la proteína recombinante 103
5.10 Ensayos de inmunogenicidad en cobayo 104

5.11 Ensayos de inmunogenicidad en bovinos 105
5.12 kit ELISA comercial 107
5.13 ELISA isotipos 108
5.14 Linfoproliferación 109
6 . DISCUSIÓN 111
6.1 ESTUDIO FILOGENÉTICO DE AISLAMIENOS DE CAMPO ARGENTINOS PARA EL VIRUS DE LA LENGUA AZUL. 111
6.2 DESARROLLO DE UNA VACUNA A SUBUNIDAD, DIRECCIONADA A CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENOS, PARA EL VIRUS DE LA LENGUA AZUL 120
7. CONCLUSIONES FINALES 129
8. ANEXO 131
9. BIBLIOGRAFÍA 138

Abreviaturas:

°C	grados celsius
Ac	anticuerpo
AcMo	anticuerpo monoclonal
ADN	acido desoxirribonucleico
ADNc	ADN *copia*
Ag	antígeno
Ags	antígenos
ARN	ácido ribonucleico
ARNdc	ARN doble cadena
ARNm	ARN mensajero
ANs	Anticuerpos Neutralizantes
BEI	betapropiolactona
c.s.p.	Cantidad suficiente para
DMSO	dimetilsulfóxido
dpi	días post inoculación
EC	efecto citopático
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
G	Aceleración de la gravedad
h	hora
IDGA	Inmunodifusión en gel de agar
IFN	interferón
IgG	Inmunoglobulina G
IMC	inmunidad mediada por células
kb	Kilopares de bases
kDa	kiloDalton
LA	Lengua Azul
LB	Luria-Bertoni
LTC	Linfocitos T citotóxicos
Mg	Miligramo/s
min	Minuto/s
Ml	Mililitro/s
mm	Milímetro/s
mM	Milimolar
MOI	multiplicidades de infección
ND	No determinado
ng	Nanogramo/s
nm	Nanómetro/s
nPCR	PCR anidada (nested PCR)
NV	neutralización viral
OIE	Organización mundial de sanidad animal
P1	pasaje 1
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	pares de bases

PBS	Solución amortiguadora de fosfato (Phosphate buffered salt)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa(Polymerase chain reaction)
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVDF	polivynilidene difluoride
RT-PCR	retrotranscripción + PCR
s	Segundo/s
SDS	Dodecil sulfafo de sodio (sodium docecil sulfate)
SDS-PAGE	PAGE en presencia de SDS
SFB	suero fetal bovino
SN	seroneutralización viral
T° amb	Temperatura ambiente
TBS	Solución amortiguadora de Tris (Tris buffer salt)
VLA	Virus de la Lengua Azul
VLP	*virus like particles*
VP	proteínas virales
wb	*western blot*

1. Introducción

La Lengua azul (LA) es una enfermedad viral, transmitida por vectores hematófagos del género *Culicoides spp* que afecta a rumiantes domésticos y salvajes. El agente etiológico es el Virus de la Lengua Azul (VLA), prototipo perteneciente al género Orbivirus de la familia *Reoviridae*. [1]

1.1 Historia

La LA fue primeramente descripta en África a fines del siglo XIX, aunque se estima que su aparición ocurrió hace mas de 100 años [2]. El primer reporte oficial se conoce luego de una importación de ganado ovino susceptible de raza Merino desde Europa a la provincia de El Cabo, en Sudáfrica[2]. Hutcherson en 1881 la llamó "Catarro Epizoótico de las Ovejas" creyendo que se trataba de una enfermedad causada por algún parásito intracorpuscular[2]. En 1902 Spreull propuso el nombre de "Lengua Azul" haciendo referencia a la traducción literaria de la denominación utilizada por los nativos, y posteriormente, en 1906, Sir Arnold Theiler demostró que era producida por un agente filtrable y por consiguiente, demostró que se trataba de un virus. A mediados de ese mismo siglo Du Toit reveló que era transmitida por insectos Culicoides[3] basándose en evidencia de incidencia estacional y espacial. Du toit también demostró que la enfermedad podía ser causada mediante la inoculación de suspensión de Culicoides salvajes capturados a animales susceptibles y también que Culicoides que picaban animales enfermos, podían infectar luego animales sanos[2].

Durante mucho tiempo y hasta mediados del siglo XX, se creía que el VLA estaba confinado al sur del continente africano, idea que fue luego contradicha. Durante la segunda guerra mundial se diseminó fuera de África, y se conocieron brotes en Chipre, Israel, Portugal y España, entre otros países[2]. En 1952 el VLA fue aislado en EEUU; en Asia subcaucasiana en 1960 y más adelante en América y Australia. Muy recientemente, a fines del siglo XX, se identificó el virus en Argentina.[4,5]

1.2 Impacto económico

Lengua Azul es una enfermedad considerada por la OIE como de máxima importancia para el comercio internacional de animales y productos de origen animal y de declaración obligatoria [6,7]. Esta clasificación fue impuesta a partir de las grandes pérdidas ocasionadas por los brotes reportados en la península Ibérica a mediados del siglo XX y la posterior diseminación del virus por todo el mundo. De esta manera, el VLA se convirtió en una amenaza aún para los países considerados libres de VLA. Esto fue posteriormente ratificado con los brotes que ocurrieron en el norte de Europa y por la introducción de nuevos serotipos en zonas remotas como Australia o Norteamérica.

Las pérdidas económicas asociadas con la presencia del VLA están relacionadas con restricciones en el comercio internacional de animales y productos de origen animal, pérdidas directas debidas a la enfermedad y costos por pruebas diagnósticas, cuarentena y programas de vigilancia epidemiológica.

En relación a las pérdidas directas ocasionadas por la LA, las incursiones ocurridas en Europa en los últimos años constituyen un ejemplo notorio de la importancia de esta enfermedad. Entre 1998 y 2005, seis serotipos del VLA habían invadido el sur y centro de Europa. El virus apareció por primera vez en el norte de Europa en agosto del año 2006, siendo identificado por RT-PCR y secuenciación del segmento 2 como serotipo 8. Era la primera vez que este serotipo incursionaba en Europa. El brote se extendió a Holanda, Bélgica, Alemania, Luxemburgo y NE de Francia[8-10] (Fig.1.2). En diciembre de 2006 las bajas temperaturas cortaron el ciclo de transmisión del virus. Sin embargo, en julio de 2007 nuevos casos de VLA-8 aparecieron en las mismas zonas de Europa del norte. Más aún, el brote se extendió hasta el Reino Unido[11]. Análisis de secuencias del segmento 2 permitieron confirmar que el virus presente en el Reino Unido derivaba directamente del que había causado los brotes en los otros países de Europa. Estudios meteorológicos indicaron que los vectores infectados habrían sido transportados por el aire desde el norte de Europa hasta el reino Unido. Además, otras teorías indicaron que el origen de las cepas detectadas pudo deberse a la importación de ganado en estado virémico, semen infectado o embriones infectados. También se apunta a la posible introducción de vector infectivo en cargamentos de plantas o animales[10].

Para el caso del brote de VLA2 en Europa durante los años 2006 y 2007, se cuenta con reportes de unas 2000 propiedades donde la LA fue detectada y propiamente reportada a lo largo del territorio comprendido por Holanda, Bélgica y Alemania. Durante el año 2007, el brote fue más fuerte que en el año anterior, se estima que en Bélgica murieron 25000 ovinos y caprinos más que en 2006, de un tamaño estimado total de 150000 animales en todo el país. Hacia finales de 2007 se estima que el costo directo de la infección por VLA ascendió a unos 150 millones de Euros en Bélgica, mientras que para el caso de Holanda se estima un costo directo de casi 55 millones de Euros[12].

La aparición de un foco en un país libre genera una perturbación seria y por largo tiempo, como condicionante de las exportaciones de animales susceptibles dada la persistencia de la viremia. Por lo tanto, monitoreos constantes en los puestos sanitarios de frontera debería constituir una preocupación importante para cualquier organismo sanitario[7,13]. De hecho, se estima que desde su aparición en el año 1998, en Europa, el VLA ha causado la muerte de más de un millón de ovinos. Por otro lado, como consecuencias de la mortalidad, morbilidad y más aún de las restricciones asociadas a la aparición o detección del virus, en EEUU se estiman pérdidas anuales que rondan los 125 millones de dólares[14].

Si bien nuestro país puede ser considerado “zona de incursión aleatoria” y en la mayor parte del territorio no están dadas las condiciones ecológicas para el establecimiento permanente de los vectores y su introducción depende de condiciones climáticas especiales (aumentos de temperaturas, vientos, lluvias)[5,15-17], la presencia confirmada del virus así como la detección de animales seropositivos debe constituir una “alarma sanitaria”, porque tal como lo demuestra la epidemia que ha sufrido Europa, la enfermedad puede ser responsable de importantes pérdidas económicas y significar una interferencia muy importante para el comercio exterior. Si bien las barreras climáticas y geográficas serian una limitante para la actividad viral porque depende esencialmente de la actividad de los vectores, la epidemiología de la enfermedad demuestra que existen condiciones dinámicas cambiantes que pueden permitir el ingreso del virus en nuestro país, y las pruebas obtenidas últimamente son un ejemplo de ello. De hecho, la detección y aislamiento de VLA en nuestro país a lo largo de una década comprendida entre los años 1999 y

2010, lo cual se presenta como parte de este trabajo de tesis, son la muestra fundamental que el virus es una amenaza real.

Las autoridades responsables de la Sanidad Animal de los países tienen, entre otras funciones, evitar la introducción de agentes infecciosos que ocasionen pérdidas en las poblaciones animales y en las industrias relacionadas. Por lo tanto, un país importador tratará de disminuir al mínimo el riesgo de que estos sucesos ocurran. Teniendo en cuenta que la política de no importación absoluta (riesgo cero) ya no es sostenible, las decisiones sobre que animales, que productos, en qué condiciones y de qué origen ingresarán a sus respectivos países se basarán en el análisis de riesgo. Para esto, y de acuerdo a las recomendaciones dadas, los países importadores evaluarán, con relación al VLA:

a) la distribución, nivel y estacionalidad de la incidencia de la infección en el país exportador.;
b) los serotipos presentes;
c) la presencia de vectores o potenciales vectores en su propio país y la estacionalidad de la incidencia de esos vectores y
d) la presencia de huéspedes susceptibles en su propio país y su relación con los vectores potenciales.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, los países podrían ser categorizados de acuerdo con su situación con respecto a orbivirus en:

- Países en los cuales tanto los virus como la enfermedad han sido identificados.
- Países en los cuales los virus han sido identificados, pero la enfermedad clínica no ha sido detectada.
- Países con distribución de vectores y orbivirus regional o estacional.
- Países libres de orbivirus pero con existencia de vectores potenciales.
- Países libres de orbivirus y vectores conocidos.

Para determinar el estatus de un área, región o país es necesario la implementación de estudios epidemiológicos que permitan la determinación de la distribución geográfica de los orbivirus, los serotipos específicos y de los patrones de transmisión del virus (incluyendo los hospedadores vertebrados y los vectores) y un sistema de vigilancia epidemiológica para la

detección oportuna de nuevos serotipos virales, en determinadas áreas geográficas y/o poblaciones animales o de vectores.

El Código Zoosanitario 2009 de la OIE considera que: "Los estudios históricos demuestran que el área de distribución geográfica del VLA está comprendida, aproximadamente entre las latitudes 40° N y 35°S" y que "En caso de ausencia de signos clínicos, el estatus de un país o de una zona situados en esta parte del mundo respecto del VLA debe determinarse por medio de un programa de vigilancia serológica y seguimiento continuo (monitoreo). Por esto, es importante definir el área de distribución de la infección por VLA y cumplimentar los requisitos para la aceptación internacional del resto del país libre de la infección de acuerdo a las recomendaciones de la OIE[18].

Es así que dada la distribución de VLA, las restricciones asociadas y las pérdidas económicas registradas, la LA ha sido declarada como una de las enfermedades posiblemente más importantes del siglo XXI.

1.3 Distribución

Se sabe que la distribución de VLA es global, ha sido detectado en todos los continentes excepto el territorio antártico[2](Fig. 1.1). La infección por el VLA es endémica en áreas tropicales y templadas de la mayor parte del mundo, su detección coincide con la distribución de vector competente infectivo. La persistencia del virus en la naturaleza requiere de su transmisión entre los vectores (*Culicoides spp*.) y rumiantes susceptibles[1]. El VLA existe en una amplia franja que incluye regiones entre las latitudes 40°N y 35°S (quedando la Argentina incluida desde la frontera norte hasta la mitad de la provincia de Buenos Aires, norte de La Pampa y sur de Mendoza). Sin embargo, estos límites han sido superados en regiones de Asia, Norteamérica y Europa donde la infección por el VLA ha sido detectada hasta los 50°N.

La distribución de vectores y serotipos del VLA difiere a través del mundo, de modo que vectores específicos coexisten con determinadas constelaciones de VLA en ecosistemas relativamente estables. La distribución global de los 26 serotipos descriptos del virus no es

uniforme y en los últimos años ha sufrido cambios drásticos probablemente como consecuencia del cambio climático global y el movimiento de animales, muchas veces poco regulado[7,13].

Desde un punto de vista histórico, hasta mediados del siglo XX se creía que el VLA estaba confinado a la región sur del continente africano. El primer brote registrado fuera de África, ocurrió en Chipre, en el año 1943. Posteriormente en la década siguiente brotes de LA fueron reportados en California (EEUU) y la península Ibérica. Luego de 1960, el VLA fue detectado en vertebrados e invertebrados en todo el globo, salvo el territorio antártico.[2]

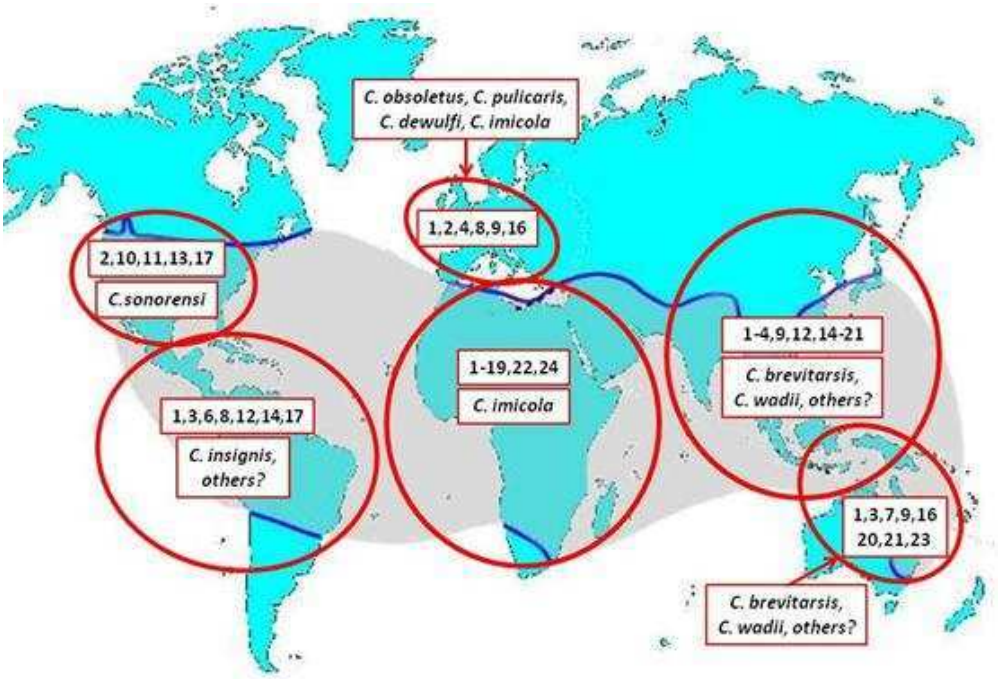

Figura 1.1: Distribución del VLA a nivel global. En los círculos se detalla en serotipo detectado y la especie de vector *Culicoide* predominante (tomado de Matamoros 2008)

Como se dijo, el primer reporte oficial de LA en África fue a finales del siglo XVIII, desde entonces, África es la región donde se encuentra la mayor diversidad serotípica. Muestreos a gran escala, demostraron que solo en la República de Sudáfrica, están presentes 22 de los 26 serotipos virales. Siendo considerados exóticos los serotipos 20, 21, 25 y 26[2].

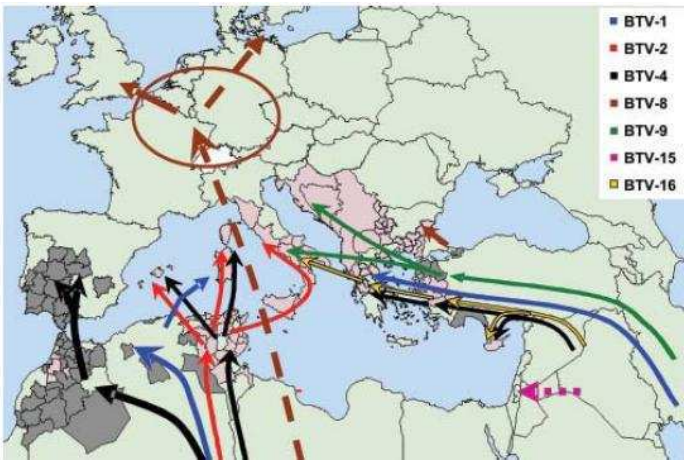

Figura 1.2: Distribución del VLA en el este de Europa, Norte de África y Oeste de Asia desde 1998. Las flechas referencian cada ruta de acceso supuesta para cada serotipo (tomado de Mertens, Baylis, Mellor, 2009).

Fue de particular relevancia la aparición de brotes de LA en el continente Europeo entre los años 1998-2005 (Fig.1.2), en este periodo 6 nuevos serotipos diferentes estuvieron presentes en la cuenca del mediterráneo y algunas partes de Europa (VLA1, 2, 4, 9 y 16). Hasta el momento esto no había ocurrido, siendo este el primer lapso temporal de preocupación por el VLA. Luego en los años 2006 y 2007, nuevos casos de VLA fueron reportados pero esta vez en el norte de Europa, región que no presenta los factores climáticos favorables para el desarrollo del vector. En este evento, se vio involucrado el serotipo 8 de VLA, uno de los descriptos como más virulentos. Desde entonces, esta zona se incluye dentro del área de riesgo siendo esto, un precedente para la extensión de los limites teóricos conocidos para la predicción de la ocurrencia de la enfermedad a nivel global[19]. Para estos casos se hipotetizó que la introducción del VLA pudo haber sido por movimiento de animales, movimiento activo o pasivo de vector infectivo o más aún, por objetos inanimados. De todos modos, la expansión de los límites de distribución de VLA se cree que es efecto de factores relacionados con el vector y no con características propias del virus. Siguiendo en esta línea, los factores asociados al vector pueden ser, no solo aparición de nuevas especies de Cullicoides como vectores sino también, el cambio global climático que propicia situaciones favorables para el vector y su ciclo de vida [14]. Cabe destacar, que en este periodo de tiempo, los

límites conocidos hasta el momento se vieron modificados dado que se reportaron casos de VLA 800 km al norte del límite norte previamente pensado.

En Australia 10 de los 26 serotipos fueron detectados. Estos serotipos son 1, 2, 3, 7, 9, 15, 16, 20, 21, y 23. Los serotipos 1 y 21 han sido regularmente documentados en la región norte aunque nuevos serotipos como VLA 2 ha sido recientemente identificado en el noreste, posiblemente por introducciones desde el sudeste asiático[20].

En Norteamérica, los serotipos 10, 11, 13 y 17 has sido ampliamente descriptos: el serotipo 2 fue identificado hace unos treinta años en Florida. Desde 1998 diez serotipos mas fueron identificados en el sudeste norteamericano (1, 3, 5, 6, 9, 12, 14, 19, 22 y 24). Se postula que estos virus han invadido Norteamérica desde el Caribe[10].

En Centroamérica, el Caribe y en Sudamérica ha sido detectado por pruebas serológicas en casi todos los países que componen la región[21-31](Fig. 1.3). En Centroamérica y Caribe el VLA fue detectado por aislamiento y/o serología determinando la presencia de 16 de los 26 serotipos (serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 18, 22 y 24) [32-35]. El virus ha sido reportado en Guatemala, Honduras, El salvador, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, Trinidad Y Tobago y en las Antillas mayores y menores (Cuba, Jamaica, Republica Dominicana, Puerto Rico, Islas Vírgenes, Guadalupe, Martinica, Santa Lucia y Barbados).

En Sudamérica, el VLA ha sido detectado por técnicas serológicas en todos los países, salvo Bolivia y Uruguay (Fig. 1.3), y ha sido aislado solo en dos países: Argentina y Brasil, aunque recientemente han aparecido en bases de datos, secuencias correspondientes a aislamientos de Guyana. Serología positiva ha sido reportada en Colombia[22,33], Ecuador[29], Venezuela[36-38], Guyana, Surinam[22,24,31], Perú[21,39,40], Brasil[22] y Argentina[5,21,22].

Particularmente Brasil, constituye el país más grande de la región y representa cerca del 50% de la superficie total de Sudamérica. El VLA fue primeramente descripto en territorio brasilero en 1978 por Silva y col.[41] en São Paulo. Luego, la presencia del virus ha sido reportada por medio de técnicas serológicas (IDGA y ELISA) en todas sus sub regiones demostrando que el mismo estaría presente en todo el territorio[42-58]. En Brasil, el VLA ha sido aislados solo en una oportunidad por Clavijo y col [4] de ovinos con signos clínicos siendo clasificado como VLA serotipo 12. Cabe

Figura 1.3: Distribución de VLA en Centroamérica y Caribe (panel superior) y Sudamérica (panel inferior). Los datos se presentan como: datos serológicos (cuadros amarillos), datos serológicos negativos (cuadros violetas) y puntos de aislamiento viral (puntos rojos). (Tomado de Legisa et al, 2013).

destacar que en otra oportunidad en el año 1980, Groocock y col[59] aislaron VLA serotipo 4 en ganado proveniente de Brasil que se encontraba en cuarentena en Florida, (EEUU).

Muy recientemente, en junio de 2013 se produjo un brote de VLA4 en Vassouras, estado de Rio de Janeiro en un rebaño de 99 ovinos de raza Lacaune[42,43].

En Argentina la situación es un tanto distinta, el país es considerado dentro de la categoría de país de incursión aleatoria. Los límites descriptos hasta hace unos años para la distribución mundial de VLA estaban restringidos a los 53° latitud Norte y los 35° de latitud Sur, esto incluye a nuestro país hasta el centro de su territorio aunque los datos serológicos nacionales disponibles hasta el momento reportan un límite sur en la provincia de Corrientes (30° latitud sur)[22]. En nuestro país se ha detectado serología positiva desde 1996 [3,5] aunque no hay un plan de vigilancia regional o nacional. Lager y col [5] detectaron seroconversión y aislaron VLA4 de ganado centinela en la región litoral argentina en muestreos realizados entre los años 1999 y 2001. En muestreos realizados durante los años 2004 y 2008 los autores reportaron prevalencias de hasta 40.7% en ganado bovino y 95% en ganado ovino en la provincia de Misiones. Para la provincia de Corrientes detectaron valores de 0.7-2.7% en bovinos y 3.13% en ovinos[22].

1.4 Propiedades de la partícula viral

El virus de la Lengua Azul (LA) (Bluetongue virus BTV, en inglés), es el prototipo del género Orbivirus incluido en la familia *Reoviridae*, que reúne un conjunto de virus caracterizados morfológicamente por un virión sin envoltura, de simetría icosaédrica de 60-80 nm de diámetro, con una cápside doble-triple, externa y otra interna o “core”, con un material genético compuesto de ARN doble cadena (ARNdc) organizado en 10-12 segmentos según el género[60], completando entre 18.200-30.500 nucleótidos (Fig.1.4). A esta familia pertenecen varios géneros (orthoreovirus, orbivirus, rotavirus, coltivirus, aquareovirus, cypovirus, seadornavirus, fijivirus, phytoreovirus, oryzavirus, idnoreovirus, mycoreovirus) entre los que merecen destacarse los géneros reovirus, rotavirus, coltivirus y orbivirus [1,61]. Dentro de la familia se encuentran patógenos de un gran número de insectos, reptiles, peces, crustáceos, mamíferos, plantas y hongos algunos de los cuales son de gran importancia económica.

El VLA es un virus no envuelto con un genoma de aproximadamente 19.200 pares de bases, compuesto de 10 segmentos lineales de ARN doble cadena (ARNdc) de extremos 5´y

3´conservados (Seg1-Seg10). Los 10 segmentos están empaquetados dentro de una triple capa proteica de simetría icosaédrica característica del virión de aproximadamente 90 nm de diámetro.[62] La capa externa del virión está formada por dos proteínas estructurales, las cuales conforman 60 trímeros de VP2 (111 kDa) y 120 trímeros de VP5 (59 kDa)[63]. La capa intermedia está compuesta por la proteína estructural VP7 (38 kDa), organizada en 260 trímeros. La capa interna consiste de 12 decámetros de VP3 (100 kDa). Las 120 moléculas de VP3 envuelven el core interno compuesto por las proteínas involucradas en la transcripción y replicación del virus, siendo estas: ARN polimerasa dependiente de ARN (VP1, 149 kDa), enzima de caping de ARN (VP4, 76 kDa) y la helicasa de ANRdc (VP6, 36 kDa). Las proteínas no estructurales (NS1, NS2, NS3, NS3A, Ns4 y NS4A) participan en el control de replicación, maduración y salida de la célula infectada. [1,64,65].

La proteína VP2, codificada en el segmento 2 (Seg2) es la proteína mayoritaria de la cápside externa del virión y la más variable del genoma de VLA[66]. VP2 forma motivos *triskelion* en la cápside externa. Esta proteína es responsable de la unión al receptor, hemaglutinación y promueven la generación anticuerpos serotipo específicos. VP2 recombinante tiene una fuerte afinidad por glicoporina A, una sialoglicoproteina componente de eritrocitos, esta interacción puede explicar la unión del virión a los mismos[1].

VP2 es el determinante principal de serotipo. Comparaciones filogenéticas de VP2 de los 26 serotipos descriptos muestran una perfecta correlación entre variación de secuencia y serotipo de VLA (Fig. 1.7)[61]. Como se verá luego, las estrategias vacunales son serotipo dependientes dada la alta variabilidad de VP2 entre serotipos. Respecto a los epítopes antigénicos mapeados sobre VP2, DeMaula y col.[67] describieron dos segmentos hidrofílicos entre los aminoácidos 199-213 y 321-346 donde hallaron múltiples epítopes conformacionales neutralizantes. Por otro lado, Caporale y col. [68] reportaron mutaciones no sinónimas posiblemente responsables en perdida de virulencia para Seg2 de VLA2, 4 y 9 en el rango de posiciones [317-395].

A diferencia de VP2, VP5 (codificada por el segmento 6) muestra mayores niveles de conservación pero tiene cierto grado de variación que se puede reflejar en un análisis filogenético comparativo, diferencias que denotan su posible origen geográfico[21,62,69]. VP5 juntos con VP2, forman los motivos globulares de la cápside externa del virión. VP5 se ha descripto como una

proteína de penetración de membrana, que media la liberación de las partículas virales del endosoma en el citoplasma. Más aún, la conformación de la VP5 es pH dependiente lo cual permite la fusión a membrana y formación de sincicios[70].

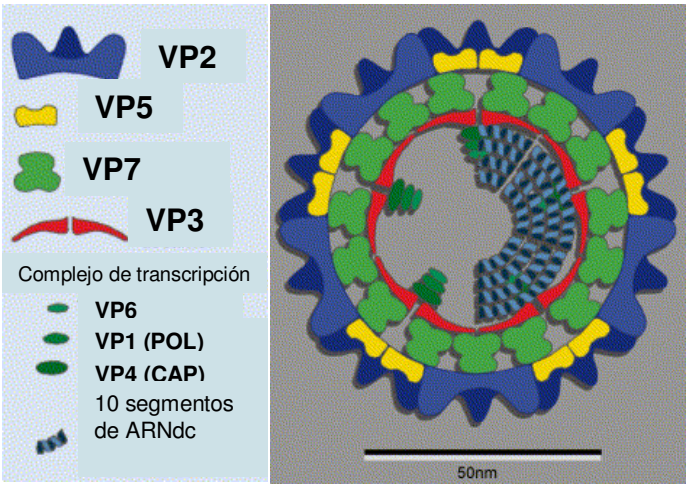

Figura 1.4: Estructura del virión de VLA y sus segmentos codificantes. Aclaración: para la fecha de la figura, no estaba aún descripta NS4 (tomado de Mertens, Baylis, Mellor, 2009).

VP3 y VP7 (codificadas en los segmentos 3 y 7 respectivamente) son proteínas mas conservadas que las descriptas previamente. Estas poseen una naturaleza mayormente hidrofóbica. Como se dijo, son parte estructural del core del virión y expresan en su estructura primaria determinantes antigénicos grupo específicos. VP7 está relacionada con la entrada del virión a la célula del hospedador artrópodo en ausencia de VP2 o VP5. El complejo VP3/VP7 protege el complejo genoma viral ARNdc de la vigilancia intracelular previniendo la activación de producción de IFN tipo I por sensores citoplasmáticos.[63,71-73]

VP1 (Seg1), VP4 (Seg2) y VP6 (Seg9) forman el complejo de transcripción. VP1 puede sintetizar ARN desde primers Oligo(A) y actúa como la replicasa que sintetiza ARNdc desde cadena positiva de ARN. El ARNm viral de transcripción temprana posee estructura de cap (metilguanosina conectada al primer nucleósido) que lo estabiliza. Para el caso de VLA, VP4 cataliza todas las reacciones necesarias para generar esa estructura. VP6 tiene actividad de unión a ATP y se ha descripto actividad helicasa y actividad ATPasa RNA dependiente.[64]

Las proteínas no estructurales muestran niveles mayores de conservación, entre ellas encontramos a NS1 (Seg5), NS2 (Seg8), NS3 y NS3A (Seg10), NS4 (Seg9). NS1 y NS2 son las proteínas más expresadas en las células infectadas mientras que NS3 y NS3A son apenas detectables[74]. NS1 se ha descripto como formador de túbulos intracelulares posiblemente causales del efecto citopático de VLA. Del mismo modo, NS1 resulta ser un buen inmunógeno y ha sido utilizada como vacuna experimental a subunidad[75,76]. NS2 formar cuerpos de inclusión viral. NS2 se une a ARNsc viral y estaría involucrada en el ensamblado viral[77]. NS3 y su forma corta NS3A estarían asociadas con la liberación del virus por su actividad de viroporina[65]. NS4 estaría asociada a la replicación viral pero en un estadio celular antiviral aunque su rol no está propiamente descripto aún[64].

1.5 Patología

La LA, es una enfermedad primariamente de los ovinos que son los más afectados y los que más frecuentemente la manifiestan clínicamente. Los bovinos así como otros rumiantes también son susceptibles aunque en la mayoría de los casos la enfermedad no se manifiesta clínicamente[78]. De la misma manera, se ha detectado animales seropositivos en ejemplares salvajes de especies tan distantes como elefante africano (*Loxodonta africana*), ñu azul (*Connochaetes taurinus*), ñu negro (*Connochaetes gnou*), búfalo (*Syncerus caffer*), alcelafo caama (*Alcelaphus buselaphus*), impala (*Aepyceros malampus*), antílope eland (*Taurotragus oryx*), blesbok, gacela (*Antidorcas marsupialis*) y girafa (*Giraffa camelopardalis*).También Chita (*Acinonyx jubatus*), leones (*Panthera leo*), perros salvajes africanos (*Lycaon pictus*), hiena manchada (*Crocuta crocuta*), chacal (*Canis spp*.), jineta tigrina (*Genetta tigrina*), perro domestico (*Canis familiaris*) y gato (*Felis catus*) y camelidos sudamericanos[79,80]. Cabe destacar que para el caso de los carnívoros seropositivos, el haber ingerido carne infectada con VLA y puede ser la causa de mostrar reacción serológica antes las pruebas diagnósticas[2]. De todos modos, todo animal que pueda ser infectado por VLA y no mostrar signos clínicos es un potencial reservorio de virus, con las implicancias económicas que esto conlleva.

En ovinos, tras la picadura de un *Culicoide sp*. Infectado, el VLA réplica primero en los nódulos linfáticos locales y posteriormente induce una viremia primaria que se disemina en otros

nódulos linfáticos, bazo, pulmón, endotelio vascular y fagocitos mononucleares [68,78]. El período de incubación es normalmente de 6-10 días y la viremia aparece 3-4 días después. El virus circula por linfa o sangre y se asocia con células sanguíneas, sobre todo con eritrocitos y plaquetas, y el virus asociado con células mononucleares es el que disemina por todo el animal infectado. Más tarde, durante la viremia, el virus se asocia exclusivamente con eritrocitos[81]. Las partículas del virus quedan secuestradas mediante invaginaciones de la membrana del eritrocito, permitiendo una viremia prolongada no persistente, a pesar de la presencia de altos títulos de anticuerpos (Ac) que lo pueden neutralizar[82] , de hecho se postula que de esta forma, la proteína viral VP2 se asociaría a esas invaginaciones de la membrana del eritrocito, "escapando" de la presión del sistema inmune[81]. La viremia en bovinos y ovinos puede ser de hasta 100 días. El VLA infeccioso puede ser detectado en sangre durante 35 a 60 días, mientras que partículas virales, hasta 160 días. De esta misma manera, ARN viral puede ser detectado 145 días post infección.[81]

El cuadro clínico comienza por una súbita fiebre (42,5°C), que puede durar 4-12 días, y se completa con depresión, inapetencia, somnolencia, hiperemia e inflamación de las mucosas. Hay congestión y edema facial, congestión en boca y nasofaringe, ulceración y hemorragias del tracto gastrointestinal superior (en labios, boca, rodete dentario y ocasionalmente en lengua, esófago y rumen) con destrucción del endotelio vascular por el virus[83]. La salivación excesiva se asocia a la hiperemia de la mucosa bucal y nasal. En casos severos, se observan ulceraciones extensas cubiertas de tejido necrótico gris en el cojín dental y la superficie dorsal de la lengua. Puede haber inflamación del rodete coronario y laminitis con la consiguiente cojera. También trastornos en el desarrollo del vellón y perdida-rotura de lana hasta 3 semanas posteriores al proceso febril[81].

Durante el curso de la enfermedad se presenta hipertermia, hiperemia y una inflamación cianótica de la mucosa bucal (la lengua puede estar inflamada y de color azul) caracteriza el cuadro clínico de los ovinos y da nombre a la enfermedad[2].

El bovino se infecta fácilmente, pero sólo un 2-10% de los casos manifiestan signos clínicos de la enfermedad. El bovino es considerado reservorio del VLA a partir de los cuales la infección puede transmitirse a otros bovinos y rumiantes susceptibles, a través de vectores[84]. Además, los bovinos son especialmente importantes en la epidemiología de la enfermedad por el gran tamaño

de la población, su amplia distribución geográfica y la frecuencia de movimientos a que son sometidos[78].

La respuesta inmune contra el VLA se caracteriza por tener componentes tanto humoral como celular. La respuesta humoral es a través de neutralización viral mediada por anticuerpos, aunque se desconoce el mecanismo exacto en que esto ocurre. Las únicas proteínas virales de VLA que generan anticuerpos neutralizantes son VP2 y VP5, ambas, como se dijo anteriormente, componen la cápside externa del virión y son determinantes del serotipo viral. La proteína dominante en cuanto a generación de anticuerpos neutralizantes es VP2, aunque algunos reportes indican que este efecto se vería aumentado en presencia de VP5, tal vez por la acción que esta última tiene sobre la estructura terciaria de VP2[1]. Por otro lado, VP5 es capaz de generar anticuerpos neutralizantes pero aunque estos no han sido profundamente estudiados[81].

1.6 Transmisión

El VLA es transmitido biológicamente por ciertas especies del género *Culicoides* (Fig. 1.5). Aunque existen más de 1400 especies de *Culicoides* en el mundo, solo en 6 de ellas (*C. sonorensis, C. imicola, C. fulvus, C. actoni, C. wadai* y *C. nubeculosus*) se ha demostrado la transmisión del virus[14,85-87]. No se ha encontrado aún evidencia de transmisión vertical del virus en el hospedador invertebrado. La transmisión vertical en vertebrados, aunque posible, no sería importante en la epidemiología de la infección[22]. Hay poca evidencia de transmisión por contacto directo o

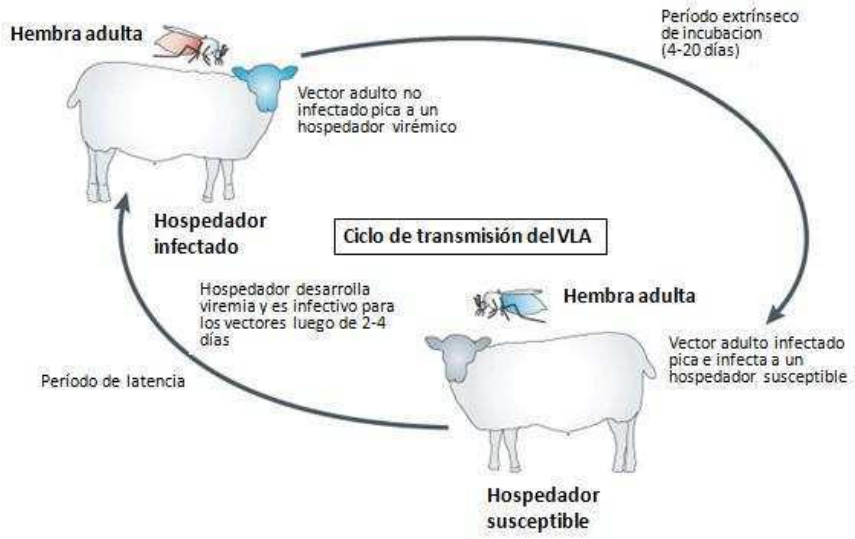

Figura 1.5: Ciclo de transmisión del VLA en hospedador bovino (tomado de Purse et al. 2005).

indirecto[23]. El virus no es transmitido por carne, leche y derivados pero se debe remarcar que los machos infectados con el VLA pueden eliminar el virus por semen durante el período de viremia. [24]

Se han identificado, hasta el presente 26 serotipos del virus[61]. Los serotipos presentes del VLA en distintas regiones del mundo tienen características virológicas diferentes y parecerían mantenerse en ecosistemas estables[23]. A su vez, diferentes serotipos del VLA se encuentran en distintas zonas geográficas aunque no hay una correlación perfecta entre estas variables, además, el creciente movimiento de animales y vectores está homogeneizando la distribución global de serotipos[88]. Por otro lado, también se cree que la presencia de diferentes serotipos virales y especies de *Culicoides* en diferentes áreas sugeriría que la relación virus-vector es importante para

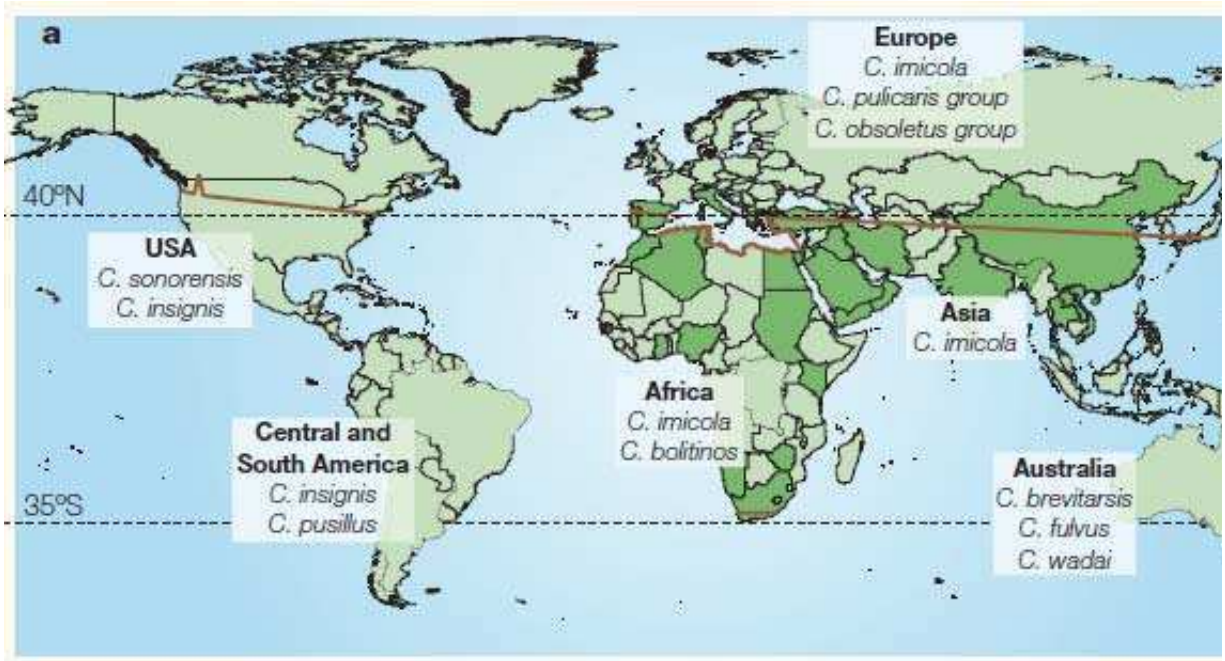

Figura 1.6: Arriba: vector invertebrado, Género *Cullicoides spp*., Abajo: distribución global de especies del vector (tomado de Verwoerd, 2013).

determinar la incidencia de la enfermedad[89].

La dispersión de los *Cullicoides* (Fig. 1.6) está asociada con su transporte mediante el viento, el cual lleva insectos infectados y no infectados de un lugar a otro dado que se sabe que los *Culicoides* no vuelan grandes distancias. La ocurrencia de infección depende en parte del genotipo del vector, la cepa de virus, el grado de viremia y factores ambientales [90]. El período de incubación extrínseco (período entre la ingestión de sangre y la aparición de virus en la saliva del insecto) es de 1-2 semanas. La duración de la viremia en el vertebrado infectado es un factor importante en la transmisión del virus.

Los factores ambientales afectan la dinámica de la infección a través de sus efectos sobre la distribución y la densidad de la población de vectores. Diferentes estudios han descripto una asociación de las temperaturas máxima-mínima y la precipitación pluvial con la prevalencia de infección por el VLA[5,15,22] y la incidencia en bovinos así como también la relación entre la altura sobre el nivel del mar y la distribución del vector hematófago.

En zonas de clima templado la transmisión estacional ocurre hacia fines de verano y en otoño. Las bajas temperaturas invernales suspenden el ciclo de transmisión pero no lo cortan definitivamente, ya que se ha observado que los mismos serotipos del virus del año previo pueden volver a aparecer. Esta persistencia del virus en la naturaleza se denomina invernada u *overwintering*. Hay muchas teorías sobre la forma que el overwintering ocurre. El mismo se podría dar de tres maneras: persistencia en la población de vector; persistencia en la población de vertebrado; persistencia en un par vector-vertebrado no conocido. Para el primer caso, la persistencia en el vector *Cullicoide*, la transmisión vertical es poco probable por lo cual se cree que tal vez una pequeña porción de la población puede sobrevivir al invierno en condiciones de refugio. En cuanto al hospedador vertebrado, se sabe que en bovinos, la viremia puede durar hasta 100 días, en ovinos por ejemplo es mucho menor, de modo que el ganado bovino podría actuar como un particular reservorio de virus capaz de re infectar vector *naïve* luego de la invernada. Respecto a este punto, Takamatsu y col [91] demostraron que en ovinos, un animal puede ser seropositivo y avirémico pero infectado persistentemente por la presencia de viriones infectivos en linfocitos T $\gamma\delta$, así, durante el invierno que corta el ciclo de vida del vector competente, el vertebrado es reservorio de VLA. Luego de la estación fría, una picadura del vector

causa inflamación cutánea por la cual se reclutan células T $\gamma\delta$. Entonces, por la interacción de estas células y fibroblastos cutáneos, y un mecanismo desconocido, el VLA contenido dentro de las células T $\gamma\delta$ se vuelve lítico liberando viriones que pueden pasar al vector en un nuevo ciclo de infección[14,92]. Otro factor importante es la existencia de transmisión vertical transplacental, en vertebrados infectados. En tercer lugar, se proponen sistemas de persistencia en invertebrados y vertebrados no conocidos aún, en los cuales la virema debería ser larga de modo de actuar como reservorios. En Europa se postula que ciertos venados, o rumiantes salvajes podrían actuar como el vertebrado involucrado en este sistema[84,93], en África ha sido detectada serología positiva para VLA en distintas especies de no-rumiantes[2]. Respecto al vector, se postula que posibles especies no-culicoides podrían actuar como transmisores, tal es el caso de las garrapatas[94].

En el noreste de Argentina, las especies predominantes de Cullicoides son *C insignis, C paranaensis* y *C venezuelensis* [15]. En el noroeste, Veggiani Aybar y col [95], describieron la presencia de *C paraensis* Goeldi y *C lahillei* iches como las especies más frecuentemente encontradas en el NOA. Otros reportes apuntan a *C insignis* y *C pusillus* como los ejemplares más representativos del género Culicoide en toda la región sudamericana [21,26,31,96-98]. VLA ha sido aislado de *C insignis* y *C pusillus* en Centroamérica y el Caribe pero no en Sudamérica. Esto nos lleva a pensar acerca de la importancia de estas abundancias relativas regionales y su relación posible en la transmisión de VLA entre sus hospedadores vertebrados.

1.7 Diagnóstico

Un diagnóstico concluyente de la LA requiere de estudios serológicos, detección viral y el aislamiento e identificación del agente o de sus antígenos[82,99]. El diagnóstico clínico puede ser difícil, sobre todo en bovinos aunque es factible con casos típicos de ovinos. Para la confirmación de un brote es preciso identificar el agente y el serotipo responsable, un factor fundamental desde el punto de vista de la epidemiología y comprensión de la incursión.

La identificación del agente se realiza clásicamente mediante el aislamiento viral en huevo de pollo embrionado y líneas celulares de mamífero o insecto, así como la detección de antígenos específicos del virus. Estas últimas son la fijación del complemento, la inmunofluorescencia

directa, el ELISA de captura de antígeno, la seroneutralización y técnicas basadas en PCR, ya sea mediante la clásica RT-PCR o empleando RT PCR en tiempo real [75,100-103]. Las técnicas basadas en PCR cuentan con una alta sensibilidad y especificidad, son las utilizadas en la actualidad para la confirmación de brotes, y permite diferenciar las cepas de campo de las cepas vacunales[99].

Para estudios serológicos se utilizan pruebas tales como Inmunodifusión en Geles de Agar (IDGA), considerada desde 1982 por la OIE como la prueba estándar. Es de fácil realización y de bajo costo, pero falta de sensibilidad y especificidad, pudiéndose reemplazar por un ELISA competitivo, más aplicable por su mayor exactitud y adaptación a rápidas pruebas convencionales de laboratorio y tecnología de lectura.

En presencia de casos clínicos de ciervos o bovinos, donde es difícil el diagnóstico dado que la serología muestra reacciones inespecíficas o cruzadas, es importante contar con técnicas basadas en RT-PCR, las cuales permite además, realizar estudios retrospectivos en muestras congeladas[99]. Para el caso de respuesta ante un brote, las técnicas basadas en ácidos nucleícos también son esenciales dada su sensibilidad y precisión, aúnen la determinación de serotipos y topotipos, en post de seleccionar un plan de vacunación pertinente[104]. En los últimos años, la PCR en tiempo real ha sido la técnica mas adoptada en laboratorios de todo el mundo. Aunque su costo sea mayor, tiene niveles de confiabilidad que la destaca sobre las otras[75,102,105-109].

1.8 Epidemiología molecular

El VLA sin duda ha evolucionado y continúa haciéndolo en respuesta a presiones selectivas ejercidas por su hospedador vertebrado y por el invertebrado. La clave para entender la genética, evolución y características del VLA yace en la adquisición y secuenciación completa de algunos segmentos geonómicos o de genomas completos [110].

El Segmento 2 codifica para la proteína de la cápside VP2 y posee el mayor grado de variabilidad genética. VP2 es responsable de la neutralización viral y de la especificidad por serotipo. VP2 probablemente se ve afectada por la presión del sistema inmune en el hospedador vertebrado. Cuando se realizan análisis filogenéticos, la variación entre serotipos resulta en una segregación del virus por serotipos diferenciándose en los 26 *clusters* correspondientes (Fig. 1.7)

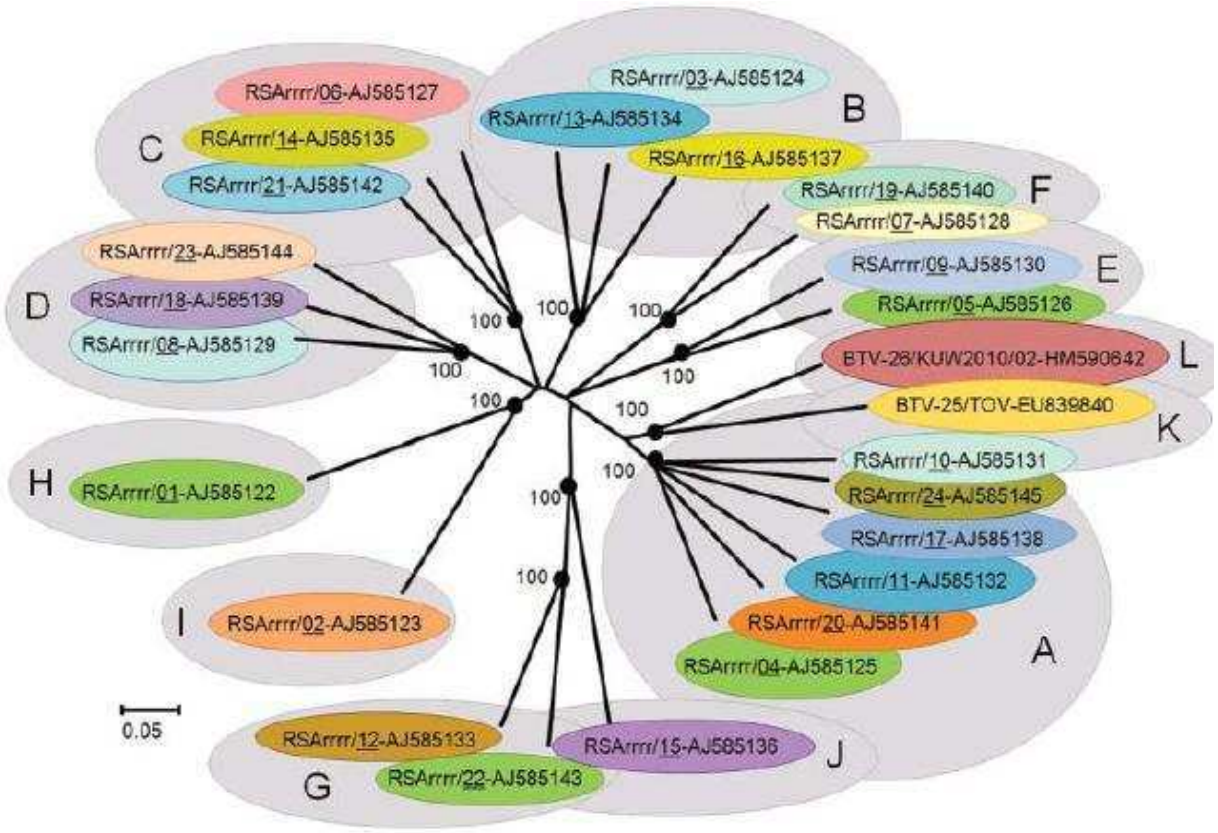

Figura 1.7: Árbol filogenético reconstruido a partir de secuencias nucleotídicas del Seg2, mostrando las relaciones entre los 26 serotipos de VLA. Los óvalos grises agrupan serotipos según los nucleotipos definidc para este segmento (Tomado de Maan, S. 2011)

[61,111,112]. Además, las secuencias de los 26 serotipos agrupan en 12 linajes evolutivamente distintos, identificados como nucleotipos (de A a L), estos nucleotipos agrupan las secuencias de uno o varios serotipos entre las cuales se ve reactividad cruzada en pruebas diagnósticas basadas en serología (Fig 1.8). La variación inter serotipo oscila de 29% (VLA8 y VLA18) a 59% (serotipo 16 y 22). Secuenciación y análisis filogenético de VP2 también revela variación significativa entre cepas del mismo serotipo, ubicadas en diferentes áreas geográficas. Estas variaciones geográficas definen principalmente dos linajes internos, *Eastern* y *Western*, definidos también como topotipos[112], este patrón de separación por topotipo se ve reflejado en el análisis de los otros segmentos génicos.

La segunda proteína que causa alteraciones conformacionales en la cápside externa y cambios en las características neutralizantes es la VP5. La misma contribuye con el reconocimiento

de la célula hospedadora y el gen que la codifica (Seg6) es el segundo más variable[63]. El análisis de secuencias correspondiente para la proteína viral 5 (VP5) muestra un patrón de separación en nucleotipos y una leve correlación con el serotipo viral, como se dijo anteriormente, el serotipo está dado por la secuencia y estructura de la proteína VP2, aunque se cree que la acción de VP5 sobre la estructura de VP2 cumple un rol importante[70].

El core del virus está compuesto por las proteínas VP3 y VP7. El análisis de secuencias del segmento que codifica para VP3 sugiere una genotipificación viral basada en el origen geográfico del aislado[73], VP3 no presenta variaciones comparables con las proteínas de la cápside externa por lo cual su grado de conservación puede guardar señal filogenética más profunda. VP7 está involucrada en la unión a las proteínas de membrana de la célula de insecto [86], por lo que existe alguna leve relación entre especie de *Culicoide* y secuencia de Seg7. Recientemente en bibliografía se ha abandonado esa idea y se utiliza la variación de Seg7 para rastrear el origen geográfico de los aislamientos del mismo modo que se realiza para VP3[89].

Entre los genes que codifican para proteínas no estructurales, el Seg5 (codifica para NS1) es el más conservado dentro de un serogrupo, pero difiere entre serogrupos. Por ello es ideal para el diagnóstico del VLA[75,76] . El gen S10 codifica para dos proteínas denominadas NS3 y NS3a. Este gen también ha sido ampliamente analizado y utilizado para asociar su secuencia con características de agrupamiento geográfico complementando la información dada por VP7 y VP3 [65,74,111,113,114]. En resumen, la determinación de topotipo así como también, de origen de una cepa aislada se realiza por análisis de todos los segmentos posibles. Existe un sesgo en la información disponible en bases de datos, por lo cual es necesario un análisis de varios segmentos por separado, esto nos brinda información útil para caracterizar un aislamiento[21]. Del mismo modo, eventos de reasociación génica llevan a la necesidad del análisis de cada segmento por separado para poder inferir eventos históricos de reasociación por coinfección de dos cepas salvajes y/o cepas vacunales.

Entonces, dado que la secuencia nucleotídica de los genes del VLA puede diferir con el área geográfica del aislamiento[115,116]. Es posible con ella complementar los estudios epidemiológicos clásicos; este proceso se denomina genotipificación ó topotipificación. El desarrollo de la topotificación como herramienta epidemiológica depende de la adquisición de

distintas secuencias de aislamientos del VLA de diferentes regiones del mundo[65]. Por último, cabe mencionar que se ha comprobado que los segmentos de VLA evolucionan de manera independiente mediante efecto fundador y deriva génica, sobre todo aquellos genes que no están bajo presión de selección del sistema inmune[111].

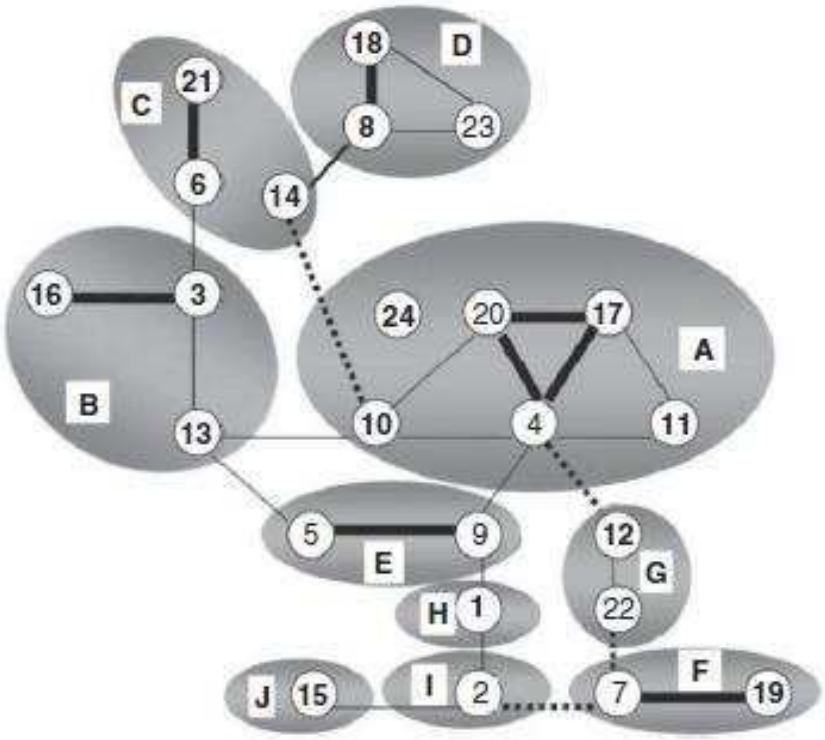

Figura. 1.8: Esquema de las relaciones entre serotipos de VLA. El grosor de cada línea que conecta dos serotipos representa el diferente grado de relación serológica. Los óvalos grises representan los diferentes nucleotipos definidos por análisis filogenéticos. En esta figura no se definen los serotipos 25 y 26, así como sus nucleotipos asociados dado que al momento de publicarse, éstos no estaban descriptos (tomado de Mertens, Baylis, Mellor, 2009).

1.9 Prevención y control

La prevención y control para LA están dirigidos a atenuar el impacto económico que la enfermedad tiene sobre regiones y/o países en los que está declarada la presencia del virus. No hay terapias específicas para animales infectados. Terapias sintomáticas se basan en buen trato al animal afectado, su estabulado y posible administración de ciertas drogas no esteroideas. El

bloqueo inmediato de comercio de animales de países con LA declarada es el primer y prioritario paso, seguido por el monitoreo de establecimientos que puedan contener al VLA. La Inmunización profiláctica es un factor a ser tenido en cuenta dado que puede prevenir o mitigar los efectos del virus en un ecosistema [63,117-119].

Según el Consejo de la Unión Europea, en caso de detectase LA, tres zonas de restricción se definen, una zona de 20 km de radio alrededor del foco infeccioso y luego una zona de protección y una zona de vigilancia juntas o a 150 km de radio alrededor del foco.

Para la prevención y control no hay que desestimar las medidas a tomar respecto a la exposición de los animales susceptibles al vector transmisor *Culicoide*. Así, prácticas como evitar la estancia de animales en pastizales húmedos de tierras bajas, encierro de los mismos durante la noche, esquila de ovinos en verano y el uso de repelentes contra insectos constituyen un factor importante aunque no suficiente para la prevención de la transmisión de la enfermedad.

1.10 Vacunas

La inmunización profiláctica de los animales susceptibles es la medida de control más práctica y eficaz en cuanto a costo y efectividad real. Los principales propósitos de la vacunación contra VLA son:

1. prevenir la enfermedad
2. limitar la dispersión del virus
3. permitir la erradicación de la enfermedad en un área o región determinada mediante la reducción de la circulación viral y
4. permitir el movimiento de animales susceptibles entre zonas afectadas y zonas libres.

Actualmente, las únicas vacunas comercialmente disponibles son atenuadas o inactivadas[81]. Como se dijo antes respecto a las características del virión y la respuesta inmune asociada a la infección de VLA, la respuesta es dependiente del serotipo aunque hay una mínima protección cruzada. Por esto, el diseño y/o uso de vacunas debe ser en función del conocimiento

de la existencia de múltiples serotipos, tal vez poco relacionados presentes en una putativa zona de conflicto. Del mismo modo, las vacunas deben presentar un nivel de seguridad asociado a cada tipo de estrategia de obtención (atenuación o inactivación) y por último, idealmente se pretende luego e la vacunación, poder diferenciar animales vacunados de animales infectados naturalmente (vacunas DIVA, de sus siglas en inglés: ‘‘differentiation of infected from vaccinated animals”).

Las vacunas atenuadas han sido y continúan siendo usadas para la inmunización preventiva de ovinos y bovinos[120]. La primera vacuna para el VLA reportada fue producida por Theiler y col. a principios del siglo XX, ésta fue lograda a través de sucesivos pasajes en ovinos de una cepa serotipo 4. Esta vacuna basada en virus atenuado fue protectiva contra el mismo serotipo 4 y contra aquellos serotipos que presentan reactividad cruzada con el VLA-4. Desde el punto de vista pragmático, fue adoptada y utilizada por productores sudafricanos por casi 40 años[2] entre 1907 y 1943 y se cree que unas 50 millones de dosis fueron aplicadas en ese periodo temporal[78]. La experimentación basada en este tipo de vacunas llevó a Theiler a conocer la existencia de distintos serotipos para el VLA. Hacia mediados del siglo XX, Theiler condujo pruebas de desarrollo de vacunas multivalentes producidas por adaptación de virus en embrión de pollo y luego cultivo celular constituyendo las bases de las vacunas multivalentes usadas en la actualidad.[2] Algunas de las vacunas de este tipo han sido aprobadas para su uso dentro de la Unión Europea (UE) y de hecho, su uso ha sido declarado en países como España, Italia y Francia[6].

En la actualidad, las vacunas atenuadas son producidas por adaptación de los aislados de campo al crecimiento *in vitro*, mediante el pasaje del virus en cultivos celulares o huevos de pollo embrionados. Las vacunas atenuadas son económicas de producir e inducen inmunidad protectiva luego de una única inmunización/vacunación y han probado ser efectivas en prevenir la enfermedad en las distintas áreas donde se han usado. Por otro lado, las vacunas atenuadas son difíciles de controlar en cuanto a su grado de atenuación, en especial para ciertas razas de rumiantes, por esto, su uso aumenta la probabilidad de que ocurran reasociaciones entre las cepas vacunales o entre la vacuna y el virus *wild type*, pudiendo generar nuevas cepas en la progenie con características biológicas/ecológicas emergentes, diferentes de las cepas que le dieron origen.

Se ha demostrado que vacas inmunizadas con dichas vacunas desarrollaron una viremia suficientemente alta como para infectar *Culicoides* competentes y la transmisión natural de cepas

vacunales fue confirmada[117,121]. Las vacunas atenuadas pueden también presentar efectos teratogénicos en ovejas y vacas. Adicionalmente, no existe la posibilidad de diferenciar animales vacunados de infectados con el uso de vacunas atenuadas [117], característica antes enunciada como DIVA. También, el uso de vacunas atenuadas en ovinos lactantes ha demostrado que provocan baja de producción lechera así como malformaciones para ovejas preñadas[6]

Según los reportes oficiales, el mayor fabricante de vacunas de este tipo es Onderstepoort Biological Products (República de Sudáfrica). Las vacunas allí producidas han sido ampliamente utilizadas en la región sudafricana y en brotes en la zona del Mediterráneo.

Las primeras vacunas inactivadas para VLA utilizadas en Europa fueron contra el serotipo 2, luego contra el serotipo 4 y también, una formulación bivalente contra ambos serotipos[6]. Entre las ventajas de este tipo de vacunas, se puede destacar que no hay replicación viral, no inducen viremia, no hay peligro de reversión de la virulencia, se podrían diferenciar animales vacunados de los infectados naturalmente y su utilización en bovinos ha demostrado ser eficaz y se elimina el peligro de la infección fetal. Savini y col[121] han mostrado la eficiencia de una vacuna inactivada contra VLA serotipo 16 capaz de inducir inmunidad protectiva en ovejas. La eficiencia de una vacuna bivalente (VLA2-VLA4) también ha sido reportada en bovinos[122]. Ensayos en ovejas y bovinos con vacunas inactivadas para el serotipo 2, 4 o ambos juntos han inducido una respuesta inmune protectiva. La inmunogenicidad de este tipo de vacunas depende de la dosis de virus, la cual debe ser significativamente superior a la necesaria en las vacunas atenuadas[123]. En consecuencia, son necesarias múltiples dosis en presencia de adyuvante para lograr la inmunidad deseada. Esto lleva necesariamente a un aumento del costo de producción y el manejo de enormes cantidades de virus.

Desde el año 2005, las vacunas inactivadas más efectivas estuvieron disponibles para su mayor uso y fueron incluidas en campañas europeas de vacunación, dirigiéndose a ganado ovino y bovino. Se calcula que desde los brotes de VLA serotipo 8 en el norte de Europa, 100 millones de animales fueron vacunados resultando en una baja de incidencia considerable[6]. Estas observaciones impulsan el desarrollo de vacunas recombinantes, no infecciosas como alternativa a las vacunas convencionales.

En las últimas décadas, se han desarrollado ciertas vacunas a subunidad para el VLA incluyendo VLPs producidas en baculovirus [124-130]. Algunos reportes han sido publicados acerca de vacunas basadas en subunidades víricas, la mayoría de ellos hacen hincapié en el uso de VP2 como principal antígeno dado que como se mencionó anteriormente, la proteína VP2 contiene los principales epítopes neutralizantes. Inmunizaciones con VP2 producida tanto en sistema bacoluviral como en levaduras (*Pichia pastoris*) han mostrado protección ante un desafío viral homologo para el caso del sistema de baculovirus o inmunogenicidad para el caso de *Pichia pastoris*[125,131]. Ovejas inmunizadas con VP2 sola o formando VLPs, producidas en baculovirus, fueron capaces de generar anticuerpos neutralizantes y protección al desafío viral[125].

La co-expresión de VP2 y VP5 para formar VLPs o en combinación con proteínas del *core*, ha mostrado potenciar la respuesta de anticuerpos neutralizantes en ovejas[132]. En el mismo campo de VLPs (VP2, 5, 3 y 7) y CLPs, (VP3 y 7) se han reportado ensayos de inmunización en ovinos mostrando gran efectividad, aún siendo comparadas con las vacunas a subunidad antes mencionadas[129,133,134]. Si bien las VLPs son seguras desde el punto de vista biológico, han mostrado eficiencia inconsistente al utilizarlas en ensayos a campo. A su vez, las dificultades con la producción comercial, el costo y estabilidad a largo plazo hacen que no sean candidatas para usar de modo extensivo.

Los vectores virales han sido explorados como inmunógenos experimentales con resultados variables. Wade-Evans[135] ha reportado que la expresión de VP7 por capripox recombinante puede generar una respuesta humoral, aunque parece no prevenir la replicación viral en ovinos. Boone y col[136] desarrollaron una vacuna basada en canaripox recombinante que co-expresa las proteínas VP2 y VP5. Ovejas inmunizadas con esta vacuna desarrollaron altos títulos de anticuerpos neutralizantes y resultaron resistentes frente al desafío viral. También, expresión de diferentes combinaciones de VP2, 5, 7 y 3 en sistema capripox recombinante ha mostrado buenos niveles de protección ante el desafío viral en ovinos y/o caprinos [132,137,138].

Se ha observado que el nivel de anticuerpos neutralizantes no era siempre correlativo al nivel de protección frente a VLA y más aún, algunas vacunas podían presentar protección en ausencia de anticuerpos detectables contra VLA. Se ha descripto que Linfocitos T citotóxicos (LTC) podrían participar en la protección contra VLA, que el reconocimiento por estas células no está

limitado solo a los antígenos predominantes de la respuesta humoral antes descriptos (VP2 y VP5), sino que para la respuesta por LTC estaría gatillada además por las proteínas del core interno y las proteínas no estructurales[81]. De hecho, Andrew y col [139] demostraron que VP2 y NS1 son las proteínas mayormente inmunogénicas para LTC en ovinos.

Está demostrado que tanto la producción de anticuerpos neutralizantes como la activación de linfocitos T citotóxicos (CTLs) son responsables de generar una respuesta inmune protectiva y que los CTLs son capaces de eliminar el virus de células infectadas[63,117,140]. Jeggo y col. mostraron que no existe correlación entre el grado de protección y el nivel de anticuerpos neutralizantes inducidos por la vacunación con virus vivo, aún cuando el virus vacunal y el de desafío son del mismo serotipo [81]. Esto implica que, aunque los AN juegan un rol en la protección existen otros factores o mecanismos involucrados. Los genes VP2 y NS1 están descriptos como los principales inmunógenos para CTLs, mientras que los genes VP7, VP5 y VP3 son menos relevantes[63,138].

La obtención de vacunas a partir de subunidades recombinantes del patógeno, en cualquier sistema, tiene como principal limitación la baja inmunogenicidad de los productos recombinantes obtenidos y, por tanto, suelen ser necesarias dosis vacunales muy elevadas y repetidas para igualar la respuesta inmune obtenida con las vacunas convencionales (inactivadas y atenuadas)[128-130,141]. En consecuencia, los costos de producción de las vacunas de subunidades recombinantes son muy elevados en comparación con los de las vacunas convencionales y por tanto muchas de ellas no llegan al mercado en la actualidad.

Con el fin de mejorar la inmunogenicidad de las vacunas a subunidades se han evaluado distintas alternativas. Una de ellas se basa en el empleo de moléculas capaces de dirigir antígenos vacunales a células presentadoras de antígeno en ratones.

El direccionamiento de antígenos a células presentadoras de antígeno (CPA) es una estrategia prometedora que permite aumentar la eficacia de una vacuna[142]. Las moléculas presentes en la superficie de las células dendríticas (CDs) son esenciales en el reconocimiento, activación de dichas células y en el comienzo y regulación de la respuesta inmune. Se han obtenido resultados prometedores mediante el direccionamiento de antígenos a una gran

variedad de moléculas presentes en la superficie de CDs, entre ellas: DEC-205[143], DCIR2[144], Dectina-1[145], Clec9A[146], CD11, MHCII[147] y DC-SIGN[148]. Las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase II, son glicoproteínas de membrana polimórficas y están involucradas en la presentación de antígenos foráneos al sistema inmune. Está reportada la caracterización de un epítope presente en la cadena β de la molécula DR del CMH II porcino, el cual, se encuentra conservado en otras especies, entre ellas, humanos, ratones y bovinos[149]. El diseño de un anticuerpo recombinante de simple cadena (scFv) dirigido contra este epítope, fusionado a un péptido derivado de la proteína VP2 del parvovirus canino o a la proteína del virus de la fiebre hemorrágica del conejo, fue capaz de inducir una respuesta de Acs superior a la obtenida con los antígenos solos[147].

El desarrollo de vacunas recombinantes expresando antígenos inmunorelevantes y optimizando su presentación al sistema inmune constituye una estrategia factible para generar una vacuna con la eficacia deseada.

2. HIPOTESIS

- La obtención de secuencias originales de aislados argentinos del Virus de la Lengua Azul permite analizar las características genéticas de los mismos.
- Es posible inferir el origen geográfico de los aislados argentinos de VLA a partir de la secuenciación de varios segmentos de su genoma.
- La proteína VP2 del Virus de la Lengua Azul constituye un inmunógeno eficaz para el desarrollo de una vacuna recombinante a subunidad.
- La vacuna a subunidad expresada en células de insecto es capaz de generar respuesta de anticuerpos en un modelo experimental y en el hospedador natural.
- El direccionamiento de la proteína VP2 a células presentadoras de antígeno es capaz de potenciar la respuesta de anticuerpos en comparación con la vacuna que contiene dicha proteína sin direccionamiento.

3. OBJETIVOS

Objetivo general

- Realizar un estudio epidemiológico-molecular de los aislados de VLA argentinos.
- Desarrollar una vacuna recombinante a subunidad para el VLA y evaluar la respuesta inmune inducida.

Objetivos específicos

- Obtener la secuencia codificante de los segmentos 2, 3, 6, 7 y 10 del VLA de los aislados nacionales.
- Secuenciar los genes obtenidos a fin de confirmar el serotipo de los aislados y realizar análisis filogenéticos y genealógicos utilizando también secuencias disponibles en bases de datos.
- Expresar la proteína VP2 sola y fusionada a la molécula APCH en células de insecto utilizando el sistema baculovirus recombinante.
- Detectar y caracterizar las proteínas quiméricas.
- Evaluar la respuesta inmune inducida por las proteínas recombinantes en cobayos y bovinos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Obtención de muestras

Al momento de empezar el trabajo propuesto en la tesis, se contaba con 3 aislamientos argentinos del VLA, obtenidos por Lager y col[5] disponibles en la colección del Instituto de Virología del Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Castelar. Dichas muestreas se obtuvieron en un muestreo realizado en la provincia de Misiones entre junio de 1999 y agosto de 2000. Durante ese ensayo, bovinos centinela fueron muestreados mensualmente y los sueros fueron analizados mediante un ELISA competitivo, hasta el momento de su seroconversión. Glóbulos rojos de los animales seropositivos fueron utilizados para el aislamiento viral mediante el pasaje por Huevo de Pollo Embrionado y cultivo de células BHK21[5]. El aislamiento fue confirmado por efecto citopático sobre monocapa de células BHK21 y por Inmunofluorescencia indirecta. Posteriormente, se enviaron los virus al Animal Health Institute (Pirbright, Inglaterra) donde se caracterizaron como serotipo 4 mediante RT-PCR y microseroneutralización. Estos tres aislamientos se denominaron 4/ARG/99/2001, 4/ARG/102/2001 y 4/ARG/829/2001, aplicando esta nomenclatura para el resto de los análisis, siguiendo un orden: serotipo/país de origen/código interno/año de muestreo.

Además de estas tres muestras disponibles en el Instituto, se logró aislar VLA en dos oportunidades más, en el año 2007 y en 2009. Dichas muestras provinieron de animales seropositivos detectados por el servicio de diagnóstico del Instituto de Virología, CICVyA, INTA. Ambas muestras fueron provenientes de la provincia de Corrientes, Argentina.

Para ambos casos, el animal se detectó como seropositivo mediante las técnicas IDGA y ELISA (ver 4.2) en el servicio de diagnóstico del Instituto de Virología, CICVyA, INTA, Castelar. Inmediatamente luego de confirmar los resultados de IDGA y ELISA, se pidió al productor/dueño del animal diagnosticado, sangre entera con anticoagulante para efectuar una RT-nPCR diagnóstico para confirmar la presencia de ARNdc viral (ver 4.2.2).

Posteriormente, la misma sangre fue utilizada para el intento de aislamientos utilizando células C6/36 y BHK21. Este procedimiento está descripto en 4.3. Al momento de apreciar un EC

considerable en células BHK21, para confirmar la presencia de VLA se efectuó la RT-PCR anidada descripta en 4.2.2. Del mismo modo, se comprobó la presencia de VLA por Inmunofluorescencia.

4.2. Pruebas diagnósticas

4.2.1 Pruebas serológicas

En primera instancia, las muestras de suero se testearon por Inmunodifusión en Gel de Agarosa (IDGA), se procedió según las recomendaciones del fabricante para detectar anticuerpos anti VP7, proteína del core interno viral. El ensayo se realizó utilizando el kit Bluetongue Virus Antibody Test Kit (VMRD, Pullman, WA, EEUU).

Los animales positivos para IDGA se testearon por ELISA de competición (Bluetongue Virus Antibody Test Kit, cELISA, VMRD, Pullman, WA, EEUU) bajo protocolo propuesto por fabricante, en este caso también se ensayó la presencia de anticuerpos contra VP7 de VLA.

4.2.2 RT-nPCR

A partir de sangre entera con anticoagulante se efectuó una RT-nPCR diagnóstico recomendada por OIE[99]. Previo a la RT-nPCR se debió obtener el ARNdc viral. Para esto se utilizó el kit RNA Extraction kit (Qiagen, EEUU) siguiendo las especificaciones del fabricante. La RT-nPCR detecta presencia de ARNdc viral, amplificando de manera anidada el Segmento 5 codificante para la proteína NS1. Para este test se utilizaron los primers BTNS1-9R (GTTCTCTAGTTGGCAACCACC), BT10NS1-402 (TTCACGGCTTCATCCATCATCC), BTNS1-8R: (CACCACAATGGACTTGCAGTCA), BT10NS1-325: (GACATCCTCCTCGTATGGTTGG).

Se colocó en los tubos 10 µl del ARN extraído, 3 µl H2O, 1 µl DMSO, 1 µl de cada uno de los Oligonucleótidos de la primera ronda de amplificación (BTNS1-9R y BT10NS1-402L). Se incubó a 95ºC por 5 minutos (en el termociclador, ver Tabla 4.1) y se colocó inmediatamente en hielo (0°C) por 5 minutos. Luego se agregó 9 µl de la mezcla de RT a cada tubo.

Retrotranscripción	
Reactivos	**Volumen (µl)**
H2O libre de RNAsas	1.25
Buffer MMLV 5X (Promega)	4
DTT 0.1M	2
dNTPs 5mM	1
RNAsin (Promega) 10UE/µl	0,25
MMLV-RT (promega) 200 UE/µl	0,5
Volumen Total	9

Tabla 4.1: Mezcla de reacción para retrotranscripción

La reacción de retrotranscripción se realizó según el siguiente esquema: 42°C por 60 min, 95°C por 5 min, 4° hasta guardar a -20°C.

PCR	
Reactivos	**Volumen (µl)**
H20 libre de RNAsa	11,75
Buffer Taq 5X (promega)	5
Mg++ 25 mM	1,5
dNTPs 5 mM	0,5
Primer 1 - 100ng/µl	0,5
Primer 2 - 100ng/(l	0,5
cDNA	5
Taq Pol (Promega) 2,5 UE/µl	0,25
Volumen final	25

Tabla 4.2: Mezcla de reacción para reacción de PCR

Ciclado de PCR			
	Proceso	**Tiempo (minutos)**	**Temperatura**
35 ciclos	Desnaturalización inicial	3	94 °C
	Desnaturalización	0.5	94 °C
	Hibridación	0.5	58 °C
	Extensión	1	72 °C
	Extensión final	7	72 °C

Tabla 4.3: Condiciones generales de reacción de PCR

La segunda ronda de reacción se realizó de la misma manera pero utilizando el segundo set de primers. A continuación, la tabla 4.4 muestra ambos pares utilizados. Los productos de amplificación obtenidos de la primera y segunda ronda se conservaron a -20°C hasta su utilización

Ronda de amplificación de nPCR	Par de primers utilizados
Primera ronda de amplificación	Primer 1 BTNS1-9R (100 ng/ul)
	Primer 2 BT10NS1-402L (100 ng/ul)
Segunda ronda de amplificación	Primer 1 BTNS1-8R (100 ng/ul)
	Primer 2 BT10NS1-325L (100 ng/ul)

Tabla 4.4: Detalle de primers utilizados en cada ronda de RT-nPCR

Los productos de amplificación obtenidos al cabo de la segunda ronda, fueron sometidos a una corrida electroforética en gel de agarosa 2% a 100V durante 40 minutos en buffer TAE 1X (Trizma® base 89 mM, EDTA 2 mM pH8, y ácido acético (89 mM)). La visualización del producto de PCR se realizó con el agregado de Bromuro de Etidio (5 mg/ml) al momento de preparar el gel de agarosa. El ensayo fue considerado válido cuando el control positivo y el control de amplificación mostraron una banda del tamaño apropiado (393 pb para el primer round y 217 pb para el segundo round). En los controles sin templado de la RT y de la PCR no debían observarse bandas

4.3. Aislamiento viral.

Las muestras de sangre entera con anticoagulante fueron centrifugadas a 1000 g, se separó la fase de plasma y se lavaron los glóbulos rojos con buffer PBS 1X, se repitió el lavado dos veces, se fraccionaron los glóbulos rojos y se guardaron en ultra freezer a -80°C.

4.3.1. Cultivo celular en células C6/36 (Aedes albopictus, ATCC CRL1660)

Se inocularon de 300 a 500 μl de glóbulos rojos sobre un cultivo de células CRL1660 (C6/36 ATCC[150]) de *Aedes albopictus* con una confluencia del 80%, en frascos de poliestireno T25 (25 cm^2). La sangre se incubó 60 min a 28°C para la adsorción del virus y se lavó dos veces con 3 ml de una mezcla 1:1 de medio MEM E (Invitrogen) y medio MEM D (Invitrogen) para eliminar el sobrante de sangre. Una vez hechos los lavados, se agregó medio MEM E+D, con Piruvato de Sodio 1X (Invitrogen) y Suero Fetal Bovino (SFB) (Internegocios) al 10%. Se incubó por 5 días en estufa a 28°C. Al 5to día, se congeló y descongeló el frasco de cultivo, se cosechó el sobrenadante y se clarificó centrifugando el mismo a 1000 g por 5 min. El clarificado obtenido en el paso anterior sirvió de inóculo para un nuevo pasaje ciego sobre células C6/36 (CRL1660 ATCC). El segundo pasaje se realizó inoculando de 300 a 500 μl del clarificado sobre células C6/36, y se procedió de igual manera que para el primer pasaje.

4.3.2. Cultivo celular en células BHK21

Se utilizó como inóculo el sobrenadante clarificado del segundo pasaje ciego en células C6/36. Se inocularon 300 a 500 μl de este sobrenadante clarificado sobre un cultivo de células BHK21 a una confluencia de un 80%. Se adsorbió el cultivo por 60 minutos a 37°C con una atmosfera de 5% de CO_2 junto con 500 μl de MEM D (invitrogen) + 3% SFB. Luego del tiempo de adsorción, se llevó a volumen según el frasco utilizado. Este cultivo se incubó en las mismas condiciones que la adsorción por 5 días (en caso de no observar EC antes). Este procedimiento se repitió 3 veces hasta tener un EC característico de VLA en BHK21. En cada paso el sobrenadante se cosechó de igual manera que para las células C6/36, por congelamiento/descongelamiento y clarificado por centrifugación.

4.4. Mantención de stock viral y titulación viral

Los stocks virales se mantuvieron por amplificación/pasaje de virus sobre cultivos de células BHK21.

La titulación de VLA se realizó por observación de efecto citopático sobre cultivo celular, brevemente: los sobrenadantes de cultivo fueron clarificados y preparados en diluciones seriadas en base 10 en MEM-D (GIBCO BRL) suplementado con 2% de SFB e inoculadas sobre monocapas de células BHK21 a una confluencia de 50% en placa de 96 pocillos. Se incubó durante 5 días a 37 ºC, en atmósfera de 5% CO2. El título viral final se determinó por observación de pocillos con efecto citopático y la metodología de Reed y Muench[151].

4.5. Amplificación de secuencias

4.5.1. Extracción de ARN.

A partir de los sobrenadantes de cultivo viral en BHK21 que mostraron EC se extrajo ARNdc viral utilizando el reactivo TRIZOL (Invitrogen), según recomendaciones del fabricante. Brevemente: 200μl de sobrenadante de cultivo celular infectado con VLA se mezclaron con 1 ml de TRIZOL, y se incubaron a 5 minutos a temperatura ambiente (Tamb.). Se agregaron 200 μl de cloroformo. Se incubó 3 minutos a T° amb. Se centrifugó a 12.000 g 15 minutos a 4°C. Se tomó la fase acuosa y se agregó 500 μl l de isopropanol + glicógeno (1 μg). Se incubó 10 minutos a T° amb. Se centrifugó a 12000 g 10 minutos a 4°C. Se lavó el pellet con 1 ml de etanol 70%. Se centrifugó a 7.500 g 5 minutos a 4°C. Se eliminó el etanol, se secó el pellet y se resuspendió en H2O libre de ARNasas + Inhibidor de ARNasas (RNAsin, Promega). El ARN obtenido se conservó a -80°C. Dicho ARN se utilizó como templado para la retrotranscripción y posterior amplificación por PCR.

4.5.2. Reacciones de RT-PCR y PCR para amplificación del genoma del VLA.

A partir del ARNdc obtenido tanto por reactivo TRIZOL como por columnas de extracción (High Pure RNA isolation kit, Roche) se procedió a amplificar los segmentos de interés. En primera instancia, se preparó la mezcla de desnaturalización del ARNdc e hibridación de primers diseñados:

Mezcla de desnaturalización de ARN	
Reactivos	**Volumen (µl)**
H2O	8
DMSO	1
Primer 1 (1 µg/µl)	1
Primer 2 (1 (g/(l)	1
RNA	5
total	11

Tabla 4.5: Reacción para paso de desnaturalización de ARN

Ciclado: 95°C 5 minutos, 0°C 5 minutos.

Luego se procedió con la reacción de retro transcripción para obtener ADNc a partir del ARNdc mediante la utilización de la enzima MMLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase Promega™, WI, USA). En las tablas 4.5 , 4.6 y 4.7 se detalla el esquema general para este paso.

RT-PCR:	
Reactivos	Volumen (µl)
H2O	0,25
Buffer MMLV 5X (Promega)	5
DTT 0.1M	2
dNTPs 5mM	1
RNAsin (Promega) 10UE/µl	0,25
MMLV-RT (promega) 200 UE/µl	0,5
Volumen Total	9

Tabla 4.6: Mezcla de reacción para retrotranscripción

Esta mix de RT-PCR se agregó a cada tubo de ARN+Primers desnaturalizados. Para cada combinación de primers, se agregó un control negativo que en lugar de ARN tenia H_2O.

El ciclado constó de 60 minutos a 42°C y 5 minutos a 95°C.

En la tabla 4.5, 4.6 y 4.7 se muestra el esquema general para las reacciones de PCR llevadas a cabo, para cada mezcla conteniendo un par específico de primers se agregó un control negativo de la reacción el cual contenía 5 µl de H_2O en vez de ADNc.

Reactivos	**Volumen (µl)**
H20 libre de RNAsa	11,25
Buffer Taq 5X (promega)	5
Mg++ 25 mM	2
dNTPs 5 mM	0,5
Primer 1 (1 µg/µl)	0,5
Primer 2 (1 µg/µl)	0,5
cDNA	5
Taq Pol (Promega) 2,5 UE/µl	0,25
Volumen final	25

Tabla 4.7: Mezcla de reacción de PCR

El modelo de ciclado general se detalla a continuación y en la tabla 4.9 se especifican diferencias para cada segmento:

	Proceso	Tiempo (minutos)	Temperatura
35 ciclos	Desnaturalización inicial	5	95 °C
	Desnaturalización	1	95 °C
	Hibridación	1	55 °C
	Extensión	1	72 °C
	Extensión final	7	72 °C

Tabla 4.8: Condiciones de ciclado la PCR

Detalle de cambios en temperaturas de hibridación para cada segmento:

Segmento	Temperatura de hibridación	observaciones
2	55 °C	Idem tabla 4.8
3	55 °C	Idem tabla 4.8
6	55 °C	Idem tabla 4.8
7	55 °C	Idem tabla 4.8
8	61°C - 47 °C	Gradiente de temperaturas
9	61°C - 47 °C	Gradiente de temperaturas
10	52 °C	Idem tabla 4.8

Tabla 4.9: Detalle de variaciones para ciclados especiales respecto a tabla 4.8.

4.5.3 Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de amplificación obtenidos fueron sometidos a una corrida electroforética en gel de agarosa 1% a 100V durante 40 minutos en buffer TAE 1X (Trizma® base 89 mM, EDTA 2 mM pH8, y ácido bórico (89 mM)). La visualización del producto de PCR se realizó con el agregado de Bromuro de Etidio (5 mg/ml) al momento de preparar el gel de agarosa. Posteriormente se procedió a escindir la banda correspondiente bajo luz UV y se purificó el amplicón utilizando el kit GE-GFX Gel Band Purification kit (GE Healthcare lifescience, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

4.6. Secuenciación

El ADN purificado fue cuantificado por nanodrop (Nanodrop 2000, Thermo Scientific). Para cada reacción de secuenciación fueron enviados 80 ng al servicio de secuenciación del CICVyA-INTA-Castelar. Las reacciones fueron llevadas a cabo en un equipo de secuenciación automática de 16 capilares ABI PRISM 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Para obtener cada segmento se utilizaron primers específicamente diseñados (ver tabla A1), los mismos primers fueron empleados para la secuenciación, desde el extremo 5´ así como también desde el extremo 3´. En la tabla A1 se detallan los cebadores utilizados para la secuenciación de los segmentos genómicos. Para el caso de los segmentos para los cuales no se llegaba a barrer el total del largo de secuencia, se diseñaron primers de modo de efectuar un *caminado génico*. Brevemente: una vez obtenida la primera secuencia, se diseñó un cebador que hibridaba y amplificaba hacia el límite de ésta y permitía en una nueva ronda de secuenciación alcanzar nucleótidos que no se secuenciaron en la primera reacción.

Los cromatogramas obtenidos fueron revisados con el fin de controlar las indeterminaciones propias de la técnica. Una vez curadas las secuencias, se armaron los *continuos de secuencias* utilizando el software BioEdit 7.1.3.0 [152].

4.7. Análisis filogenético de distancias

4.7.1. Alineamiento de secuencias nucleotídicas

Para preparar las matrices a utilizar para el análisis filogenético, se procedió a efectuar los alineamientos múltiples de secuencias, para ello se utilizaron las secuencias obtenidas de aislamientos argentinos con el agregado de secuencias de referencia y secuencias de aislamientos de todo el mundo, estas dos últimas, disponibles en GeneBank (NCBI web). El alineamiento se realizó con el programa BioEdit, utilizando el subprograma de algoritmo CLUSTALW[152]. De este modo se construyeron matrices para cada segmento a analizar, Seg2, 3, 6, 7 y 10.

4.7.2. Reconstrucción de árboles filogenéticos.

Las matrices generadas en 4.7.1, fueron utilizadas para la reconstrucción de árboles filogenéticos por métodos de distancia (Neighbor-Joining) con el programa MEGA5 [153]. Las distancias evolutivas fueron calculadas usando el método "maximun composite likelihood" [153]. Los soportes de nodos de todos los árboles obtenidos se estimaron mediante la metodología Bootstrapping (1000 réplicas de re muestreo para cada análisis). La visualización de los árboles obtenidos fue realizada con el software Figtree. Posteriormente este programa sirvió para exportar el grafico y así, ser editado en Adobe Photoshop CS5.

4.8. Análisis filogenético de máxima verosimilitud

4.8.1. Alineamiento de secuencias nucleotídicas

En este segundo análisis filogenético, se procedió a usar un mayor número de taxas y métodos probabilísticos de reconstrucción génica más exhaustivos que los métodos de distancia anteriormente utilizados, en este preliminar de tesis no se adjuntan los detalles de taxas utilizados por su excesivo tamaño, aunque se incluyen los datos informativos de cada aislamiento en su nombre, según la nomenclatura antes referida: serotipo/ país de origen/código interno/año de aislamiento. El anterior ítem de búsqueda por distancias

correspondía a un primer análisis exploratorio que solo caracterizaba levemente a las cepas estudiadas.

Para el caso y como consecuencia de la gran diversidad que se encuentra en las matrices, se procedió a traducir las secuencias de nucleótidos a aminoácidos mediante el programa BioEdit, luego alinearlas y finalmente transformarlas a nucleótido nuevamente. De esta manera, se logró un alineamiento "más confiable" que el obtenido al alinear las secuencias directamente a partir de nucleótidos, confiando únicamente en el algoritmo de alineamiento global ClustalW, esta era una alternativa al alineamiento y posterior "arreglo" a "mano" que podría insertar errores humanos al algoritmo de alineamiento.

4.8.2. Reconstrucción de árboles filogenéticos.

Una vez obtenidos los alineamientos se reconstruyeron las filogenias más probables con métodos de máxima verosimilitud. El análisis filogenético por máxima verosimilitud se realizó mediante el programa PhyML[154].

El método de Máxima Verosimilitud requiere la utilización de modelos de sustitución para modelar las probabilidades de cambio entre nucleótidos. El modelo de sustitución que mejor se ajusta al conjunto de secuencias puede estimarse con programas bioinformáticos. Los modelos evolutivos se estimaron usando el programa jModelTest v0.1.1[155] de acuerdo con el Criterio de Información de Akaike. Los soportes en los nodos de los árboles filogenéticos obtenidos a partir de las diferentes matrices (Seg2, 3, 6, 7 y 10) se estimaron mediante la metodología Bootstrapping (1000 réplicas de re muestreo para cada análisis).

Los modelos evolutivos obtenidos por JModelTest para cada matriz de cada segmento analizado se enuncian en la tabla 5.1. Los arboles reconstruidos se visualizaron con el programa FigTree y se editaron posteriormente con Adobe Photoshop CS5.

4.8.3. Análisis de similitud

Como aproximación *a priori* e *in silico*, se analizaron las similitudes de identidad entre las secuencias correspondientes al Seg2 de los aislamientos secuenciados para VLA serotipo 4. Las secuencias utilizadas fueron las obtenidas para los aislamientos argentinos, la secuencia perteneciente a la cepa vacunal (accesión number GenBank: JN255943.1), y las secuencias de otros aislamientos de VLA4 disponibles en bases de datos (4/IND/S4/1997, 4/POR/45/2004, 4/TUR/00/1999, 4/GRE/00/1999, 4/COR/00/2003, 4/SA/REF/1958, 4/ITA/69/2003, 4/ISR/22/2001, 4/GRE/M/1999, 4/ITA/53/2003, 4/ISR/26/2001, 4/ITA/27/2002).

El software utilizado para este análisis fue SimPlot v3.5.1. Se dispusieron 3 grupos para efectuar los gráficos de similitud, un grupo compuesto por las secuencias argentinas (ARG), un grupo compuesto por la secuencia de la cepa vacunal y un grupo compuesto por el resto de las secuencias de VLA4 enunciado anteriormente. Los parámetros ajustados para el análisis fueron: tamaño de ventana (200 pb), pasos (10 pb), GapStrip (on), modelo de distancia (Kimura 2 p) y tasa transversión/transición (2.0).

DESARROLLO DE VACUNA A SUBUNDAD DIRIGIDA A CELULAS PRESENTADORAS DE ANTIGENO

4.9. Sub clonado de Segmento 2

Se utilizó como virus fuente de las secuencias, la cepa 4/ARG/829/2001 obtenida en 5.1. Para obtener las secuencias codificantes, se extrajo ARNdc desde sobrenadante de cultivo de VLA en células BHK21, utilizando el reactivo TRIZOL (Invitrogen) según se describe en 4.5.1. Se realizó la RT-PCR y PCR, analizando el producto amplificado en un gel de agarosa 1%.

Dado el tamaño de la secuencia del Segmento 2 de VLA, se diseñó una estrategia de clonado para subclonar secuencialmente la región codificante del Segmento 2 en dos pasos, haciendo uso de un sitio natural de restricción en la secuencia viral correspondiente a la enzima de restricción PmeI.

La RT-PCR se realizó igual que en 4.5.2 utilizando los primers: L2 FW-SalI-ATG (5´GTCGACATGGAGGAGTTTGTCA3´) y L2 PmeI Rev (5´AGTTTAAACCGCTCCTGATCCCA3´) para la primera mitad de Seg2. Para la otra mitad se utilizaron los primers L2 PmeI Fw (5´TGGGATCAGGAGCGGTTTAAACT3´) y L2 Rev-His-NotI (5´GCGGCCGCCTAGTGATGGTGATGGTGATGAACGTTGAGTAATTTCG3´), todos estos primers fueron diseñados específicamente para esta reacción.

El producto de PCR amplificado y purificado se ligó al vector pGemTeasy (Promega). La reacción de ligación se realizó como se detalla a continuación:

Reactivo	Volumen (µl)
Buffer de ligación	5
pGEM T Easy vector (50 ng)	2
Producto de PCR (150 ng)	*
T4 DNA ligasa (Promega)	1
H2O libre de nucleasas	csp
Volume total	10

Tabla 4.10: Mezcla para reacción de ligación en vector pGem T Easy.

(*) Volumen variable de acuerdo a la concentración de cada producto de amplificación

Para cada reacción se cuantificó el ADN purificado por Nanodrop (Nanodrop 2000, Thermo Scientific) y se ligó manteniendo una relación 3:1 (inserto vector) según especificaciones técnicas. Se evidenciaron los clones positivos por transformación por el método de shock térmico y plaqueo de células competentes *E coli* DH5α, se seleccionaron clones positivos para la transformación en pGemT Easy en placas con medio LB Ampicilina + IPTG + X-Gal. La selección se realizó por color de la colonia y luego por digestión con enzimas de restricción a partir de mini-preparaciones de ADN.

Cada mitad del segmento codificante para VP2 se clonó por separado en pGemT Easy. Una vez confirmada la identidad nucleotídica de los mismos se procedió a subclonar secuencialmente en el vector de expresión pFastBacDual, utilizando las enzimas Sal I + PmeI para la primer mitad de VP2 y PmeI + NotI para la segunda mitad. Dichas reacciones de digestión y ligación se realizaron como en 4.9.

La reacción de restricción se realizó según:

Reactivo	Volumen (µl)
Buffer de reacción 10X	2
BSA 10X	2
DNA	5
Enzima I	1
Enzima II	1
H2O libre de nucleasas	csp
Volume total	20

Tabla 4.11: Mezcla para una reacción general de restricción por endonucleasas.

La reacción se incubó 16 h a 37°C.

El producto de la reacción se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa y se recuéró luego por columnas de sílica GFX, GE, Amersham como se explicó en 4.5.3.

El mismo procedimiento se realizó para preparar el vector abierto con las mismas enzimas de restricción, de modo de concretar el clonado direccionado.

Tanto el inserto como el vector se recuperan en 25 ml de agua libre de nucleasas y se cuantifican por nanodrop (Nanodrop 2000, Thermo Scientific).

La reacción de ligación se lleva a cabo según:

Reactivo	Volumen (µl)
Buffer de ligación 10X	1
Vector digerido	2
Inserto digerido	*
T4 DNA ligasa (Promega)	1
H2O libre de nucleasas	csp
Volumen total	10

Tabla 4.12: Mezcla de reacción de ligación en vector pFast Bac Dual

Para cada ligación se realizó un control de reacción en el cual no se agregó inserto para comprobar el grado de auto ligado del vector.

Del volumen total de ligación (10 µl) se utilizan 5 ul para transformar 100 ul de células competentes *E coli* DH5a, (eficiencia de transformación $1x10^6$ UFC/ug ADN) dicha reacción se realizó por el método de shock térmico.

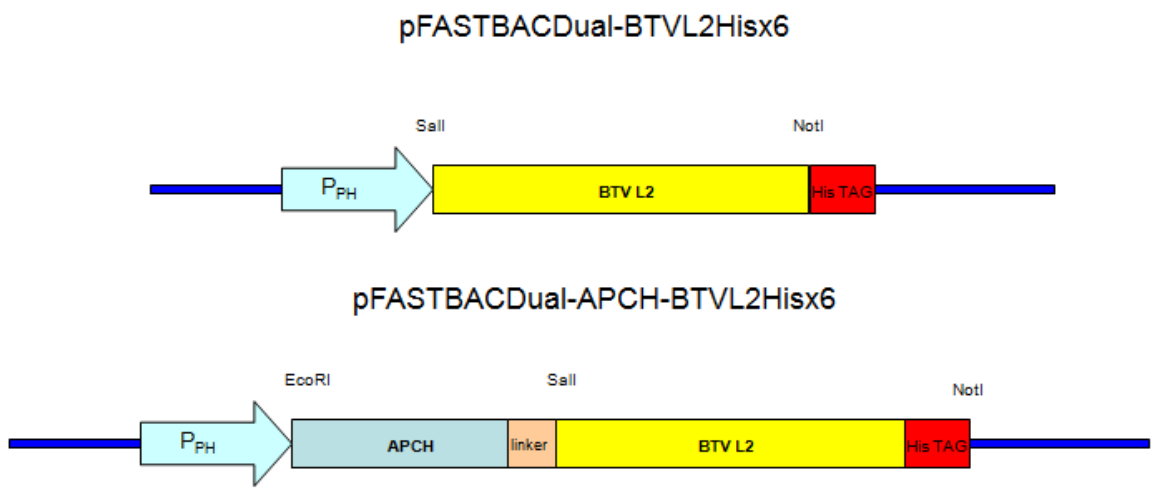

Figura 4.1: Esquema de construcciones realizadas en vector pFastBacDual

4.10. Sistema de Baculovirus

Se eligió para el caso, el sistema Bac To Bac (Invitrogen) para la expresión de proteínas recombinantes en sistema Baculovirus. El vector de expresión elegido fue el pFAST Bac Dual (Fig. 4.1).

4.10.1. Clonado en vector de trabajo pFastBacDual

Se realizaron dos construcciones: la secuencia codificante de la proteína VP2 sola o fusionada a la secuencia codificante de la molécula APCH.

Los clones en vector pGEMT-E fueron utilizados como fuente de inserto VP2; el mismo se liberó por reacciones de restricción con endonucleasas y se clonó en el vector pFAST Bac Dual. De esta manera se obtuvo el plásmido pFastBacDual+VP2. La secuencia codificante de APCH fue obtenida a partir de un vector pGEMTE+APCH disponible en el laboratorio y subclonada en el vector pFastBacDual+Seg2. Para ello se utilizaron los sitios de restricción EcoRI y SalI. Se obtuvo así el vector pFastBacDual+APCH1+Seg2 (Fig 4.1).

El vector fue elegido por las características de su sitio de clonado múltiple (SCM). Rio arriba de éste, se encuentra el promotor PH, natural del baculovirus, encargado de regular la expresión de polihedrina. Rio abajo del SCM, se encuentra el terminador de SV40 con la señal de poliadenilación[156].

Los vectores fueron secuenciados para el largo total del inserto y los sitios de inserción a fin de comprobar la integridad de los mismos. (Ver 4.6).

4.10.2. Generación de Bácmido

Siguiendo las recomendaciones del fabricante, se transformaron células *E coli* DH10BAC con 1ng de vector pFastBacDual+Seg2 ó pFastBacDual+APCH1+Seg2 y se seleccionaron los clones putativamente positivos por resistencia a antibióticos, color de colonia y selección por PCR[156]. Para cada colonia considerada “positiva” se hicieron de 2 a 5 repiques en el mismo medio sólido para comprobar que no era una mezcla de clones positivos y negativos.

Una vez que se obtuvo un clon positivo para cada construcción, se preparó el bácmido recombinante para transfectar células de insecto.

Esta preparación, recomendada por el fabricante, consta brevemente de un cultivo de 16 h a 37°C de las colonias en medio LB conteniendo 50 µg/ml kanamicina, 7 µg/ml gentamicina, y 10 µg/ml tetraciclina. A partir de este cultivo se cosecharon células y se las sometió a una lisis alcalina que aprovecha la diferencia de solubilidades, durante el protocolo de los bácmidos versus el resto de los componentes celulares. Luego se precipitó el bácmido con isopropanol y se lavó y resuspendió en H2O.

El bácmido obtenido se cuantificó por Nanodrop (Nanodrop 2000, Thermo Scientific) y se confirmó mediante PCR con primers diseñados para que hibriden en el bácmido y así evitar detectar contaminaciones[156].

4.10.3. Células Sf9

Las células Sf9 (*Spodoptera frugífera*) fueron cedidas por la sección de cultivo de tejidos del Instituto de Virología del CICVyA. Se realizaron cultivos en monocapa (frascos tipo T), los cuales fueron realizados con medio SF900 SFM (Invitrogen) suplementado con antibióticos (penicilina, estreptomicina, gentamicina, fungizona) y 1% de suero fetal bovino (SFB, Internegocios).

4.10.4. Transfección de células de insecto

Se realizó la transfección de células de insecto (Sf9) con el bácmido recombinante obtenido anteriormente en 4.10.2. Para esto, se prepararon placas de 6 pocillos con $9x10^5$ células por pocillo. Para la reacción de transfección se probaron distintas masas de bácmido (1 y 2 µg) y distintas cantidades del agente transfectante (3, 6 y 9 µl), en este caso Cellfectin II (Cellfectin II Reagent-Invitrogen).

Brevemente, para cada reacción se prepararon mezclas DNA:Cellfectin II® Reagent diluyendo 1 µg y 2 µg de bácmido purificado en 100 ul de Medio SF900 SFM (Invitrogen) no suplementado y, por otro lado, se diluyeron 3 µl y 8 µl del reactivo Cellfectin II® Reagent (Invitrogen) en 100 µl del mismo medio que para el caso del bácmido. Luego, se combinaron ambas mezclas y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Mientras se generaron estos complejos DNA:lípido, se procedió a lavar las células con medio SF900 SFM (Invitrogen) no suplementado. Posteriormente a la mezcla DNA:lípido se le agregaron 800 µl

de medio SF900 SFM(Invitrogen) no suplementado, se mezclaron y se agregaron a los pocillos que poseen las células. La placa se incubó a 27ºC por 5 horas. Transcurrido ese tiempo, se retiró la mezcla DNA:lípido y se agregaron a las células 2 ml de medio de crecimiento completo (conteniendo SF900 SFM, suero fetal bovino 3%, fungizona y penicilina/estreptomicina). Por último, se incubó a 27ºC durante 72 h ó hasta que se comiencen a ver signos de infección viral. Cosechando este sobrenadante, se obtuvo el llamado Pasaje 1 (P1).

4.10.5. Selección células transfectantes

Según las indicaciones del fabricante, las células transfectantes se evidencian hacia las 72 h por el aumento de su tamaño, seguido por el despegue de la superficie, granulación aparente y detención del crecimiento o multiplicación. Estos signos se utilizaron también, luego, para evidenciar las células infectadas al momento de expresar las proteínas recombinantes.

4.10.6. Obtención de baculovirus recombinante

A partir de lo cosechado en el paso de transfección (Pasaje 1, P1) se realizaron pasajes a multiplicidades de infección (MOI) bajas para de esta manera poder elevar el título del baculovirus. De este modo, frascos T-25 crecidos a un 80 % de confluencia ($3,2.10^6$ células) en medio de crecimiento completo (con penicilina/estreptomicina) más 3% SFB, fueron infectados a MOI<0,1 lo que dio por resultado el llamado Pasaje 2 (P2). Se dejaron durante 96 h, hasta que se observaron los signos clásicos de la infección, y posteriormente se procedió a recolectar el sobrenadante del frasco. Este sobrenadante se centrifugó a 600g (Hermle Z 200 M/H, 340 rpm) durante 6 minutos a 4ºC (para que de esta manera precipiten los detritos celulares) y el sobrenadante obtenido, conteniendo la suspensión del baculovirus, se guardó a 4ºC. Asimismo, se guardaron alícuotas del baculovirus obtenido a -70ºC. Luego, la misma metodología se empleó para generar los pasajes siguientes.

4.11 Expresión de la proteína recombinante

Para optimizar la producción de las proteínas de VLA en sistema Baculovirus, se probaron distintas condiciones de infección y cosecha. Se ensayaron distintas MOIs (1, 5 y 10) y distintos tiempos de cosecha para MOI 5 (24, 48 y 72 h).

La producción se realizó en frascos tipo T (T25) conteniendo $2x10^6$ células totales para células Sf9. Luego de transcurrido el tiempo de incubación/infección, se recolectó el contenido de los frascos, se centrifugó a 600 xg (Hermle Z 200 M/H, 340 rpm) durante 6 minutos a 4ºC y el pellet obtenido (células) se resuspendió en 500 µl de medio de cultivo remanente + inhibidor de proteasa-PMSF 1mM-(Invitrogen), para luego almacenar las producciones a -70ºC.

4.11.1. Análisis de expresión

Las muestras se analizaron por western blot utilizando como anticuerpo detector primario un anti His Penta (Invitrogen). Se realizó la corrida electroforética en geles de poliacridamida-SDS (SDS-PAGE) al 8%, los cuales fueron transferidos a membranas de polivinil difluoruro (PVDF) para su posterior análisis por western blot.

Cada muestra (20 µl) se resuspendió con 5 µl de buffer carga 5X (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM PMSF, 1% SDS, 2mM DTT, 2% β-ME), se hirvió durante 5 minutos y 15 µl de las mezclas fueron sembradas en los geles, corriéndose a voltaje constante (120 V).

Los geles se transfirieron a una membrana de PVDF por transferencia semi húmeda a una corriente constante de 18 mA por 1 hora en solución de transferencia (39 mM glicina; 48 mM Tris base; 0,03% SDS; 20% metanol). La membrana fue bloqueada durante 1 hora a 37°C en solución de TBS-Tween0.1% y 3% leche descremada (el diluyente de todos los pasos siguientes fue el mismo buffer de bloqueo). Luego, la membrana se incubó con el anticuerpo primario (anti His penta, 1/5000) 1 h a 37 °C en agitación. Posteriormente, se lavó la membrana 3 veces con TBS-T 0,1 % y se la incubó con una dilución 1/3500 del anticuerpo conjugado anti-IgG de ratón, conjugado con peroxidasa durante 1 hora a 37°C, en buffer de bloqueo y en agitación. Luego, se realizaron tres lavados con TBS-T 0,1 % y un lavado con TBS 1X y se reveló la membrana, según las recomendaciones de los fabricantes, utilizando el sistema ECL (Western lighting plus ECL, Perkin Elmer).

4.11.2. Cuantificación estimada por comparación

Cada producción de antígeno fue revisada por western blot. Cuando se confirmó la producción para ambas proteínas recombinantes, se unificaron las producciones positivas en pooles. Dichos pooles se cuantificaron por western blot utilizando el anticuerpo anti His Penta (Invitrogen) y por comparación con una proteína de masa conocida: E2t de VDVB (producida por el mismo sistema baculovirus y cuantificada por ELISA[157]).

4.11.3. Cuantificación de proteínas totales

Para cuantificar proteínas totales en cada pool de antígeno expresado, se utilizó el kit Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific #23235, Pierce Biotechnology , lL USA). Se procedió según las indicaciones del fabricante. La misma arrojó resultados comparables para ambas proteínas de aproximadamente 1 mg/ml.

4.12. Caracterización antigénica: wb con sueros anti VLA

Las proteínas recombinantes producidas en esta tesis se caracterizaron antigénicamente enfrentándolas a un suero bovino anti VLA serotipo 4 de referencia. Se realizó la corrida electroforesis en SDS-PAGE (ver 4.11) y se utilizáron el anticuerpo primario (anti VLA4- AMES) y el anticuerpo conjugado (anti bovino peroxidasa) en diluciónes 1/500 y 1/1100, respectivamente.

4.13. Evaluación inmunogénica

4.13.1. Formulación de las vacunas

Las vacunas experimentales fueron formuladas en adyuvante oleoso ISA50 (40% antígeno, 60% adyuvante). Como control positivo se utilizó una vacuna formulada con el virus inactivado. El título del VLA pre inactivación fue de $1x10^6$ TCID50/ml. La inactivación con BEI se realizó según 4.13.2.

El antígeno se produjo como se menciona en 4.11. Brevemente, un frasco de cultivo T25 con una cantidad total de células sf9 de $2x10^6$ se infectó con 20 μl de baculovirus recombinante, antes mencionado como Pasaje 2. Esto se hizo para ambas construcciones: VP2 y APCH:VP2. El cultivo se cosechó según se especificó antes y se verificó la expresión por western blot. Varias producciones se unificaron en un pool y se cuantificaron también por western blot usando como patrón la proteína E2t de VDVB producida en sistema baculovirus y cuantificada por ELISA. Dado que se utilizó extracto de baculovirus entero, el método de lisis celular utilizado previo a la formulación de vacunas fue el de congelar y descongela a -80°C 3 veces.

4.13.2. Inactivación con BEI

Brevemente, la inactivación se realizó en dos grandes pasos, una primera concentración del virus[158] y la posterior inactivación con BEI. Brevemente: La concentración se realizó por precipitación del sobrenadante de un cultivo de células BHK21 infectadas con VLA (cepa 4/ARG/829/2001) con PEG-6000. La inactivación se realizó utilizando BEI al 1% v/v incubando 25 h a 37°C parando esta reacción con Tiosulfato de Sodio al 1% v/v. Para cada inactivación se realizaron controles de inactivado inoculando cultivos celulares de células BHK21 como se especifica en 4.3.2 sin ver EC.

4.14. Evaluación en cobayos

4.14.1. Animales

Se utilizaron cobayos cepa SSI:AL adultos (+ 90 días de edad), provistos por el Bioterio del CICVyA, INTA previamente testeados para demostrar que fueran seronegativos para VLA.

4.14.2. Diseño experimental

En la experiencia se plantearon los siguientes grupos experimentales:

GRUPO	n	antígeno	dosis
1	5	VP2	2.4 µg
2	5	VP2	0.6 µg
3	5	APCH:VP2	0.6 µg
4	5	APCH:VP2	0.15 µg
5	5	VLA inactivado	$8x10^6 TCID_{50}$
6	**5**	*Mock*	-

Tabla 4.13: Diseño experimental para experiencia en cobayos con vacuna recombinante para VLA serotipo 4

.

Los cobayos fueron inmunizados con dos dosis de la vacuna a ensayar, una al tiempo inicial y la otra a los 21 días post-primovacunación. La inmunización se realizó por la vía intramuscular en el flanco interno de la pata trasera. El volumen de cada inoculo fue de 0.6 ml con las dosis especificadas en la tabla 4.13.

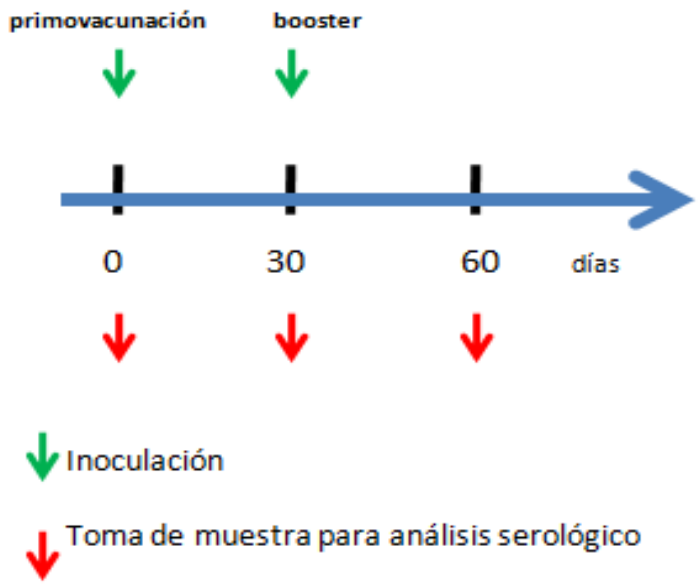

Figura. 4.2 Diseño experimental para experiencia en cobayos con vacuna recombinante para VLA serotipo 4. Las flechas verdes significan inoculación con vacunas recombinantes o inactivadas. Las flechas rojas indican tiempo de toma demuestra para análisis serológicos.

Se tomaron muestras de sangre a los días 0, 30 y 60 post primovacunación para el posterior análisis de anticuerpos neutralizantes en suero.

4.15. Evaluación en bovinos

4.15.1. Animales

Con el fin de evaluar la inmunogenicidad de VP2 y APCH:VP2 en bovinos, se inmunizaron bovinos Aberdeen Angus y careta (1-3 años de edad). Los mismos se obtuvieron

de las unidades experimentales de campo CICVyA, INTA. Todos los animales fueron controlados para la ausencia de anticuerpos específicos de VLA mediante la prueba de Seroneutralización y antígeno del VLA por RT-nPCR.

4.15.2. Diseño experimental

Se inmunizaron los animales con las proteínas producidas por el baculovirus recombinante. El diseño experimental utilizado es el que se muestra en la Tabla 4.14.

Se inmunizaron 5 bovinos por grupo experimental por la vía i.m con 3 ml de cada vacuna. El esquema de inmunización se representa en la figura 4.3. Se realizaron dos inoculaciones, una al tiempo inicial (T0) y la otra a los 30 días post-primovacunación. Se tomaron muestras de sangre como se muestra en la figura 4.3 para el posterior análisis de la respuesta inmune por Seroneutralización (VER 4.16), ELISA (VER 4.19 y 4.19) y Linfoproliferación (VER 4.21).

GRUPO	n	antígeno	dosis
1	5	VP2	3.6 µg
2	5	APCH-VP2	0.9 µg
3	5	VLA inactivado	$1.2x10^6 TCID_{50}$
4	**5**	*Mock*	-

Tabla 4.14: Diseño experimental para experiencia en bovinos con vacuna recombinante para VLA serotipo 4.

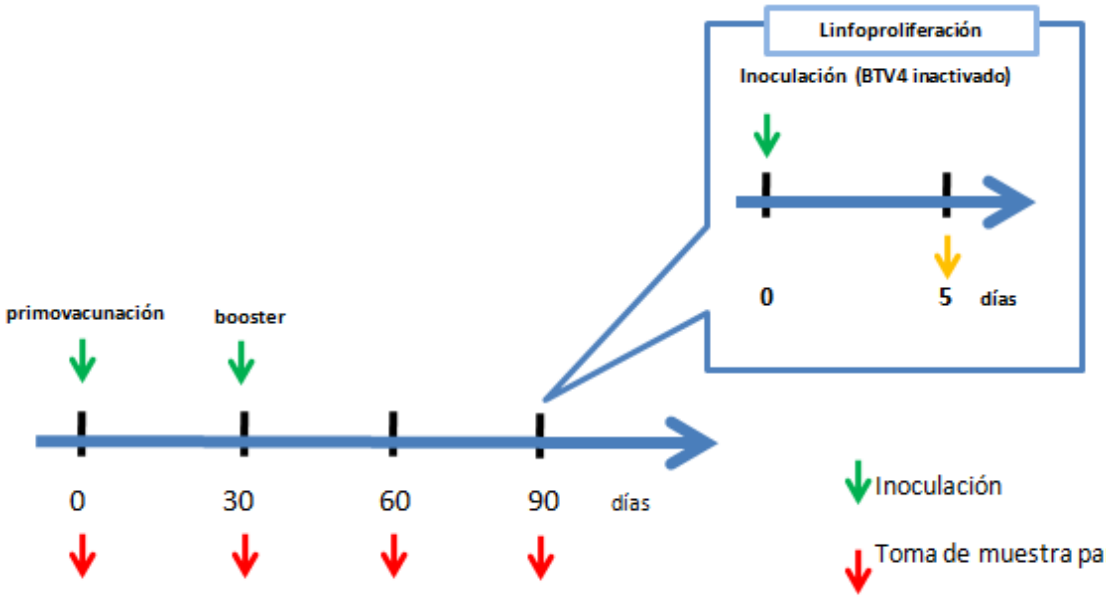

Figura 4.3: Diseño experimental para experiencia en bovinos con vacuna recombinante para VLA serotipo 4. Las flechas verdes indican los tiempos de inoculación. Las flechas rojas indican la toma de muestra para análisis serológicos. En el detalle se especifica los tiempos de inoculación y toma de muestra para ensayo de Linfoproliferación

4.16. Seroneutralización viral

Para la detección de AN contra el VLA en muestras de sueros se empleó el método de neutralización a virus fijo, donde diluciones seriadas (base 4) de los sueros, previamente inactivados (30 minutos a 56°C) se enfrentaron a una cantidad establecida y fija de virus (100 DICT50) de VLA, cepa 4/ARG/829/2001) por 1 h. a 37°C. Posteriormente, la mezcla fue adicionada a células BHK21 sembradas en placas de 96 wells ($1x10^4$ células/well).Finalmente, los cultivos fueron incubados por 4 – 6 días a 37°C hasta observar neutralización de efecto citopático. Se realizaron controles de células incubadas sin virus para descartar una posible toxicidad de los sueros. Los títulos de anticuerpos neutralizantes fueron determinados por el modo de Reed y Muench[151].

4.17 Inmunofluorescencia

Brevemente, el cultivo en un portaobjeto o chamber, se fija con acetona fría a -18°C por 20 minutos. Se retiró la acetona y se dejó secar a temperatura ambiente. Se agregó el anticuerpo conjugado según especificaciones del fabricante (BTV Direct FA Conjugated, VMRD inc), se incubó 45 minutos a 37°C. Luego se lavó 2 veces durante 5 minutos con PBS 1x y dos veces por 5 minutos con agua destilada. Se observó al microscopio con el objetivo de 40x.

4.18 ELISAc (kit comercial) para evaluar capacidad DIVA

Los sueros de los animales inmunizados y controles fueron evaluados mediante un ELISA comercial (VMRD), el cual constituye un ELISA de competición que emplea la proteína VP7 como antígeno viral.

4.19 Elisa isotipos

Para la detección de IgG1 e IgG2 se realizó un ELISA doble sándwich modificado a partir de los protocolos previamente descriptos en el grupo de trabajo. Placas de ELISA de 96 pocillos 1B (Maxisorp, NUNC) fueron sensibilizadas con 100 µl de una dilución 1/2 de sobrenadante de cultivo del virus VLA4 (4/ARG/829/2001) en células BHK21 o sobrenadante de células sin infectar. La dilución se realizó en buffer carbonato-bicarbonato pH:9,6. Las placas se incubaron durante 1,5 horas a 37°C y luego de 3 lavados se bloquearon con 100µl de solución de bloqueo (leche descremada al 1.5 % en PBS más 5% de SNE y 10% gelatina) a 37°C, durante 1.5 horas. A partir de este paso, los reactivos/muestras se colocaron en un volumen fijo de 50 µl/pocillo, por períodos de incubación de 1 hora a 37°C cada uno. Luego de cada incubación se realizaron 3 lavados con PBS pH:7,4 + Tween 20 (0.1 %). Seguido al bloqueo, se colocaron las muestras a analizar en diluciones seriadas en base 4 empezando por una dilución 1/8. Posteriormente, se agregaron los AcM anti-IgG1 e IgG2 específicos (DAS17 para IgG1, y DAS2 para IgG2) en una dilución de 1/10000 y 1/4000 respectivamente, seguido de una dilución 1/3000 de un conjugado comercial anti ratón marcado con peroxidasa (KLP). Finalmente, se adicionó

solución reveladora (H_2O_2 0,0015 volúmenes diluidos en buffer citrato/fosfato de sodio 50 mM, pH 5,3, orto-fenil-diamina (OPD, Sigma) 0,6 mg/ml) y se incubó a temperatura ambiente durante 20 min. La reacción se frenó con una solución de ácido sulfúrico 12 %. La absorbancia se midió a 490 nm en un lector de placas Thermo Scientifics MultiskanFC. Se consideraron positivos aquellos sueros que superaron la D.O. del punto de corte establecido como la media de las D.O. alcanzadas por los sueros negativos más dos desvíos estándar. Los títulos de Acs fueron obtenidos como la dilución de suero que otorga el 50% de la D.O. del promedio de absorbancia de los controles sin suero.

4.20 Obtención de linfocitos

Las muestras de sangre entera de los bovinos se obtuvieron por venopunción de vena yugular utilizando como anticoagulante una solución de citrato de sodio al 3,8% (Sigma). Luego, se trasvasó la sangre a tubos Falcon de 50ml en condiciones de esterilidad para ser centrifugadas por 30 min a 400 g (Eppendorf 5804 R; A-4-44; 1500 rpm) obteniéndose la capa leucoplaquetaria que se resuspendió en PBS 1x estéril en una relación 1:1 (sangre:PBS). La suspensión obtenida, se sembró sobre Ficoll-Hypaque, en una relación 2:1 (muestra:Ficoll) y se centrifugó durante 30 minutos a 871 g (Eppendorf 5804 R; A-4-44; 2200 rpm). Se recuperó la interfase conteniendo las células de interés y se realizaron 2 lavados con medio RPMI. Luego se realizó el conteo de células viables utilizando Azul Tripán.

4.21 Linfoproliferación dependiente de antígeno.

Para medir la respuesta inmune de las células T (LT) se llevó a cabo un ensayo de linfoproliferación, puesto a punto en el grupo de trabajo para VBDV y BHV. El stock de virus que se utilizó para estimular a los LT en el test de linfoproliferación, con un título de 10^7 $DICT_{50}$/ml, fue inactivado con luz ultravioleta (UV). Para ello se colocó el virus en una caja de Petri a una distancia de 10 cm de los tubos UV (General Electric G875) durante 1 minuto. El clarificado de células BHK21 usado como control (*mock*) también fue expuesto a la misma radiación. A lo largo de todo el ensayo se utilizó medio RPMI 1640 (suministrado por la sección de Cultivo de Tejidos del Instituto de Virología, INTA-Castelar) suplementado con Hepes 10 mM (Gibco), L-

glutamina 2 mM (Gibco), piruvato 1 mM (Gibco), b-mercaptoetanol 0.1% (Sigma), 10% SFB (Internegocios S.A.) y 1% de un coktail de antibióticos (pentamicina, estreptomicina y gentamicina) suministrado por la sección de Cultivo de Tejidos del Instituto de Virología, INTA-Castelar.

Se sembraron $2.5x10^5$ PBMC por pocillo, a las cuales se les agregó 100µl de los distintos antígenos diluidos en medio RPMI suplementado (Cada muestra se sembró por triplicado):

- VLA inactivado (MOI 0.1).
- *Mock* (sobrenadante clarificado de cultivo de células BHK21 sin infectar).
- Medio.
- Mitógeno Con A (Sigma) (1ug/pocillo como control positivo).

Los cultivos fueron incubados por 3 días a 37°C en estufa de CO_2.

4.22 Protocolo CFSE

Esta metodología se fundamenta en que el reactivo CFSE (Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester) se acopla irreversiblemente a las proteínas intracelulares y de membrana mediante una reacción con grupos aminos y residuos de lisina. Esta característica hace impermeable al colorante, sin interferir con la viabilidad celular, lo que posibilita la medición de la proliferación celular por el decaimiento de la fluorescencia. Para la marcación de las células mononucleares el reactivo CFSE fue resuspendido en DMSO llegando a una concentración final de 3mM, se llevó a cabo la optimización de la dilución de uso, seleccionando para los ensayos ulteriores una concentración final de 1µM para el tratamiento de la muestra.

Las células mononucleares obtenidas a través del protocolo descripto anteriormente, fueron suspendidas en PBS a una concentración de $1x10^7$ células/ml final, a las que se le agregó una dilución de CFSE para obtener una concentración final de 1µM. Se homogeneizó, y

se incubó a 37°C por 10-15 min. Luego, se frenó la reacción con el agregado de 4 volúmenes de RPMI completo x 5 min. A continuación se realizaron 3 lavados con RPMI completo a temperatura ambiente. El pellet final se resuspendió en el último lavado a una concentración de 5x106/ml para realizar la siembra de las células a una concentración de $5x10^5$/pocillo/100µl en placa de cultivo de 96 pocillos. Posteriormente, se agregaron los tratamientos siguiendo el procedimiento descripto en la linfoproliferación (LPAD).

4.23 Citometría

Se buscó identificar las poblaciones linfocitarias proliferantes en los ensayos de linfoproliferación mediante citometría de flujo (FACs). Para analizar la proliferación de linfocitos se utilizó el equipo FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson). Los datos fueron analizados con el programa Flowing Software V. 2.4.1. En los casos en los que necesario por postergación de la lectura en el citómetro las células fueron fijadas con una solución de paraformaldehído al 0,2%.

4.24 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados utilizando el programa Statistix 8 (Analitical Software, Tallahasee, USA) y GraphPad Prism 5.00 (Software Mackiev 2007). Las diferencias entre los títulos de anticuerpos en los distintos grupos fueron evaluadas por ANOVA y posterior test de contrastes ortogonales. En el caso del estudio realizado bajo condiciones controladas, los títulos de Ac obtenidos en las diferentes muestras analizadas, fueron sometidas a análisis de varianza de bajo un modelo de medidas repetidas en el tiempo. Para establecer la existencia de diferencias significativas entre tratamientos en cada punto se aplicó el test de contrastes ortogonales. En todos los casos los niveles de significación fueron fijados en un 5%.

Para el ELISA de isotipos, los títulos se transformaron por Log10 y las medias aritméticas de éstos, se analizaron por ANOVA y posterior test de Bartlett en el software GraphPad Prism 5.00.

4.25. Bienestar animal

Todos los ensayos con animales de experimentación requirieron la previa evaluación y aprobación del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación del INTA (CICUAE). Solicitudes N° 20/2010, 40/2013 y 45/2013

5. RESULTADOS

5.1 Aislamiento viral

El laboratorio contaba con 3 aislados obtenidos por la Dra. I Lager durante muestreos en los años 1999-2001 de ganado centinela.

Durante el desarrollo de esta tesis se aisló el virus en dos oportunidades más desde muestras de bovinos asintomáticos provenientes de la provincia de Corrientes (Fig. 5.1). Estos fueron detectados como seropositivos para VLA. Muestras de sangre fueron el inoculo inicial para el aislamiento como se describe en 4.1.

Dada la nomenclatura utilizada en bibliografía reciente sobre VLA y con fines prácticos de análisis y visualización, los aislamientos se nombraron según: serotipo/país de origen/código interno/año de aislamiento.

El listado de nombres asignados a cada aislamiento se detalla en la tabla 5.3. Así como también el origen geográfico y año de aislamiento. Todos los aislamientos fueron remitidos al banco de virus del centro de referencia para lengua azul en el Instituto de Salud Animal, Pirbright - Inglaterra.

Figura 5.1: Mapa mostrando las locaciones geográficas de origen de animales positivos para VLA

5.2 Amplificación de segmentos génicos.

La amplificación se logró según lo explicado en 4.5, utilizando primers específicos para cada uno de los 5 segmentos planteados y obteniendo el marco de lectura abierto de todos ellos. Dichas secuencias fueron enviadas a la base de datos pública del NCBI, GeneBank. En la tabla 5.3 se detallas los números de acceso para las secuencias obtenidas en dicha base de datos.

5.3 Análisis filogenético

Se realizó un análisis filogenético primario, esto es, una primera aproximación y caracterización de las secuencias obtenidas por métodos de distancia detallados en 5.3. Luego se obtuvieron nuevas secuencias de bases de datos, especialmente secuencias correspondientes a aislamientos americanos y se decidió hacer un análisis con algoritmos de búsqueda de carácter estadístico, como son los algoritmos basados en máxima verosimilitud. Se procedió, entonces a armar matrices de mayor tamaño, es decir, de mayor número de taxas analizado en las mismas. Dado que muchos grupos de secuencias disponibles en bases de datos provienen del mismo muestreo o de la misma región, se previó que estas podrían mostrar identidades nucleotídicas altas lo cual se traducirían en politomías en árboles de distancia, por esto mismo se decidió utilizar un método estadístico de búsqueda para definir más precisamente posibles indeterminaciones en ramas.

Por otro lado dada la genética segmentada del VLA y la falta de genomas completos disponibles en bases de datos, se enuncia y analiza cada segmento por separado. En la tabla 5.1 se detallan los modelos evolutivos calculados para cada matriz de cada segmento analizado. Así también para cada análisis, se detallan características de la matriz analizada en la tabla 5.2.

Segmento/matriz	Modelo AIC	Partición	p-inv	Gamma shape
Seg2	GTR+I+G	012345	0.0620	0.6990
Seg3	TIM2+I+G	010232	0.5180	1.0900
Seg6	GTR+I+G	012345	0.2760	0.5800
Seg7	TIM2+I+G	010232	0.3090	0.4010
Seg10	SYM+I+G	012345	0.0000	0.2780

Tabla 5.1: Modelos evolutivos propuestos por el software JModelTest para cada una de las matrices analizadas.

Segmento analizado	metodología	N
Seg2	NJ	28
	ML	184
Seg3	NJ	36
	ML	85
Seg6	NJ	31
	ML	150
Seg7	NJ	28
	ML	119
Seg10	NJ	29
	ML	158

Tabla 5.2: Número de secuencias incluidas en cada análisis para cada método de reconstrucción filogenética. ML: máxima verosimilitud, NJ: Neighbor Joining.

En cuanto a la comparación de los métodos de reconstrucción filogenética empleados, ambos resultaron en topologías congruentes aunque, como se dijo antes, los árboles obtenidos por métodos de máxima verosimilitud son de mayor tamaño en cuanto a número de taxas analizados, por esta razón se muestran en las figuras 5.2 a 5.6 la topología reducida con el detalle solo del clado informativo que contiene a los aislamientos argentinos. Los árboles obtenidos por métodos de distancias se muestran en material suplementario en las figuras de anexo, A1 a A5.

Nombre abreviado (*)	serotipo	Números de acceso GenBank	Provincia de origen	Año de obtención de la muestra	Año de aislamiento	Historia de pasajes (CRL1660# – BHK21¶)
4/ARG/99/2001	4	JX024940 al JX024944	Corrientes	1999-2001	2001	B3
4/ARG/102/2001	4	JX024945 al JX024949	Corrientes	1999-2001	2001	B3
4/ARG/829/2001	4	JX024950 al JX024954	Corrientes	1999-2001	2001	B3
4/ARG/01/2009	4	JX024955 al JX024959	Corrientes	2007	2009	C2/B3
4/ARG/01/2010	4	JX024960 al JX024964	Corrientes	2009	2010	C2/B3

Tabla 5.3: Información relativa a los aislamientos argentinos obtenidos y analizados en esta tesis. Leyenda: (*): clave de acuerdo a serotipo/código interno/país de origen/año de aislamiento. (#): Número de pasajes en células CRL1660. (¶): Número de pasajes en células BHK21.

5.3.1 Segmento 2

El árbol resultante del análisis del Segmento 2 segregó en grupos de nucleotipos y luego según serotipos de cada aislamiento. Las secuencias argentinas segregaron juntas dentro del nucleotipo A y también dentro del cluster del serotipo 4 (Fig. 5.2).

Los marcos de lectura abiertos de las secuencias argentinas mostraron un largo de 2871 nucleótidos (nt) con una secuencia de aminoácidos deducida de 957 residuos aminoacídicos (aa). El análisis de secuencias mostró que la identidad entre las secuencias argentinas osciló entre 94.7% y 99.7% en nucleótidos y 95.9 y 99.5% para aminoácidos. Aún dada esta alta identidad para ambos casos (nt y aa) no se vio otra tendencia de agrupamiento, es decir, el soporte estadístico de ramas no reveló una agrupación interna consistente dentro del cluster argentino. Las secuencias argentinas segregaron claramente no solo dentro de los grupos antes mencionados sino que formaron un grupo individual y bien soportado por valores de bootstrap de secuencias exclusivamente argentinas.

Dentro del nucleotipo A en este análisis se vio que las secuencias argentinas comparten el clado con secuencias referencia de los serotipos 10, 11, 17, 20 y 24. Todas estas referencias provenientes de Sudáfrica (Fig. 5.2)[112]. Dentro del clado de serotipo 4 agruparon con secuencias de aislamientos de Italia, Córsica, Portugal, Israel, Turquía y Grecia. En cuanto a los valores de identidades, se destacan en el grupo de serotipo 4 las siguientes secuencias enunciadas como país de procedencia y nombre asignado, seguido por el rango de identidades nucleotídicas (ident nt): Sudáfrica (4/SA/REF/1958, 90.6-91.3% ident nt), Grecia (4/GRE/M/1999, 90.5-91.3% ident nt), (4/GRE/00/1999, 90.2-90.9% ident nt), Turquia (4/TUR/00/1999, 90.2-90.9% ident nt), Corsica (4/COR/00/2003, 88.8-89.2% ident nt), Israel (4/ISR/22/2001, 4/ISR/26/2001, 4/ITA/69/2003, 89.7-90.7% ident nt), Italia (4/ITA/27/2002 y 4/ITA/53/2003, 89-89.8% ident nt) y Portugal (4/POR/45/2004, 88.9-89.3% ident nt).

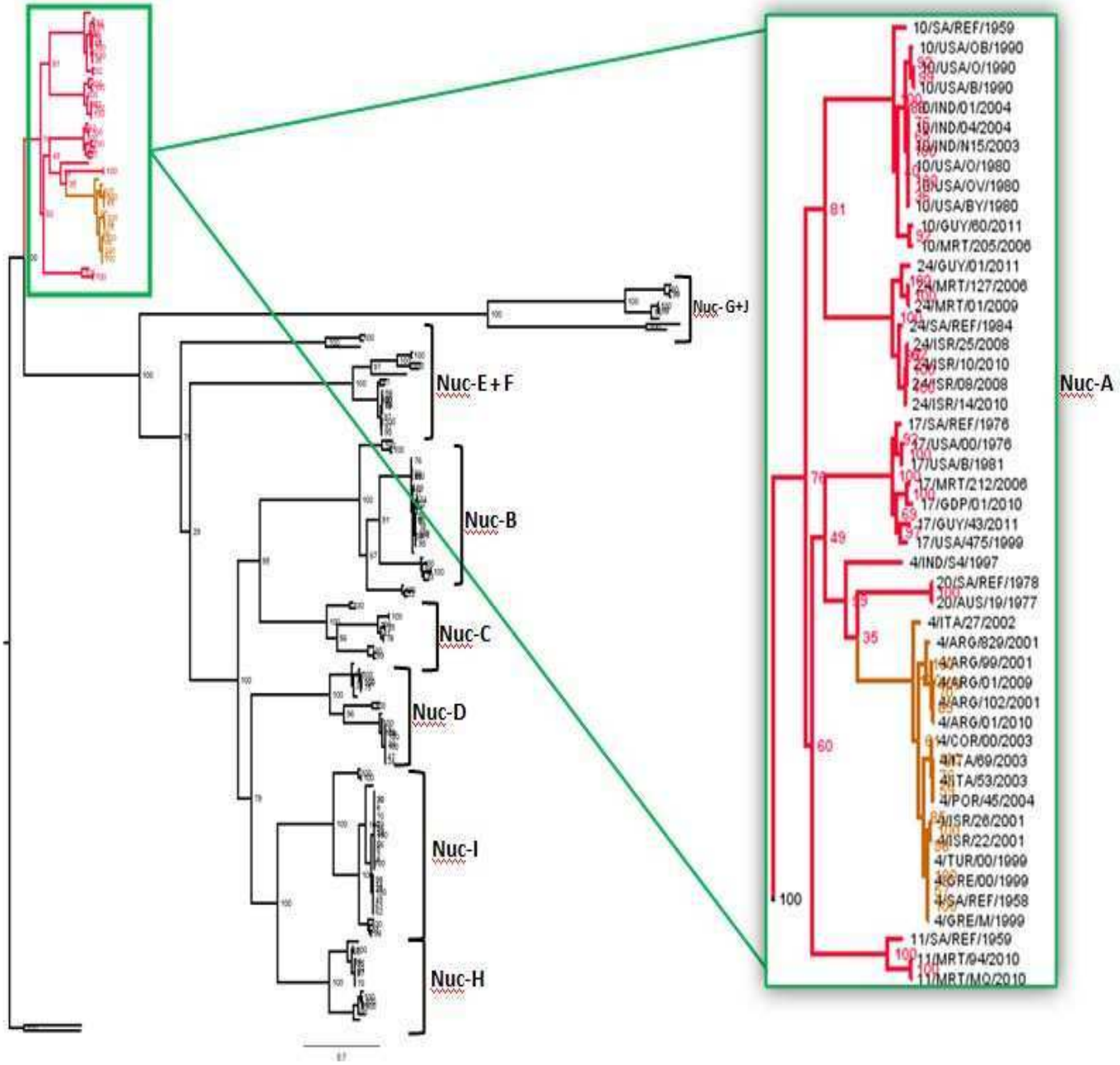

Figura 5.2: Árbol filogenético reconstruido por Máxima Verosimilitud mostrando las relaciones genéticas entre diferentes secuencias del Seg2 de VLA (cepas referencia y aislamientos de campo) de todo el mundo. El análisis filogenético fue llevado a cabo con el software PhyML. Los valores de bootstrap (1000 réplicas) son mostrados cerca de cada nodo.

5.3.2 Segmento 3

Las secuencias obtenidas mostraron que el marco de lectura abierto de las secuencias argentinas tienen un largo de 2706 nt y 902 aa, dada la deducción a partir de la secuencia nucleotídica. Al igual que para el análisis basado en el segmento 2 en el árbol resultante se vio a las 5 secuencias nacionales agrupando en un solo cluster de alto soporte estadístico (Fig 5.3). Dentro de este cluster argentino se vio un rango de identidades nucleotídicas de 92.5 a 99.7% y para el caso aminoacídico de 97.5 a 99.5%.

Para el análisis del árbol a nivel global, se ve una separación ya descripta en bibliografía en dos topotipos (origen geográfico diferencial) predominantes denominados *western* e *eastern* (se conserva en inglés para contrastarlo con bibliografía). En este caso se ven dos grandes grupos correspondientes a esos topotipos mencionados y un cluster conteniendo a los únicos exponentes del serotipo 25 y 26, clasificados en bibliografía como pertenecientes también al topotipo *western*. Las secuencias argentinas agruparon dentro del gran clado *western*, en el cual se ven, para este análisis, secuencias de aislamientos de Norteamérica, Caribe, África, países de la cuenca del Mediterráneo y algún exponente de Asia. Las secuencias argentinas mostraron una identidad nucleotídica de 86.9 a 90.5%, cuando fueron comparadas en grupo con el resto del cluster. Cuando se comparó el cluster argentino con el gran clado *Eastern*, se vio un rango de identidades nucleotídicas de 74.1 a 81%.

En este análisis, las secuencias argentinas estuvieron genéticamente relacionadas con secuencias correspondientes a aislamientos que se detallan a continuación (los porcentajes corresponden a la identidad nucleotídica): India (2/IND/02/2003, 89.1-90%), Francia (1/FRA/24/2008, 88.4-89.5%), Sudáfrica (1/RSA/REF/1966, 89.1-90%)(6/RSA/60/1958, 89.7-90.5%)(6/RSA/REF/1959, 89.8-90.6%)(9/RSA/REF/1959, 89.2-90%)(2/RSA/REF/1958, 89.2-90%), Holanda (8/NET/04/2006, 88.5-88.7%)(6/NET/05/2008, 89.7-90.5%)(8/NET/01/2007, 88.5-89.7%)(12/NET/04/2008, 89.6-90.4%), Martinique (11/MRT/01/2010, 91.3-92.7%), EEUU (6/USA/01/2006, 90.7-92.3%), Grecia (4/GRE/01/1979, 88.8-89.7) (4/GRE/15/1999, 88.8-89.6%)(4/GRE/09/1999, 88.7-89.6%)(4/GRE/04/1999, 88.7-89.6%)(4/GRE/07/2000, 4/GRE/10/1999, 4/GRE/07/1999, 4/GRE/01/1999, 88.6-89.7%) , Nigeria (16/NIG/10/1982, 88.9-89.6%)(1/NIG/01/1982, 89.9-89.9%), Israel (4/ISR/01/2001, 88.7-89.4%), Cyprus (4/CYP/03/2004, 88.7-89%), Zimbawe (16/ZIM/10/2003, 88.9-89.6%).

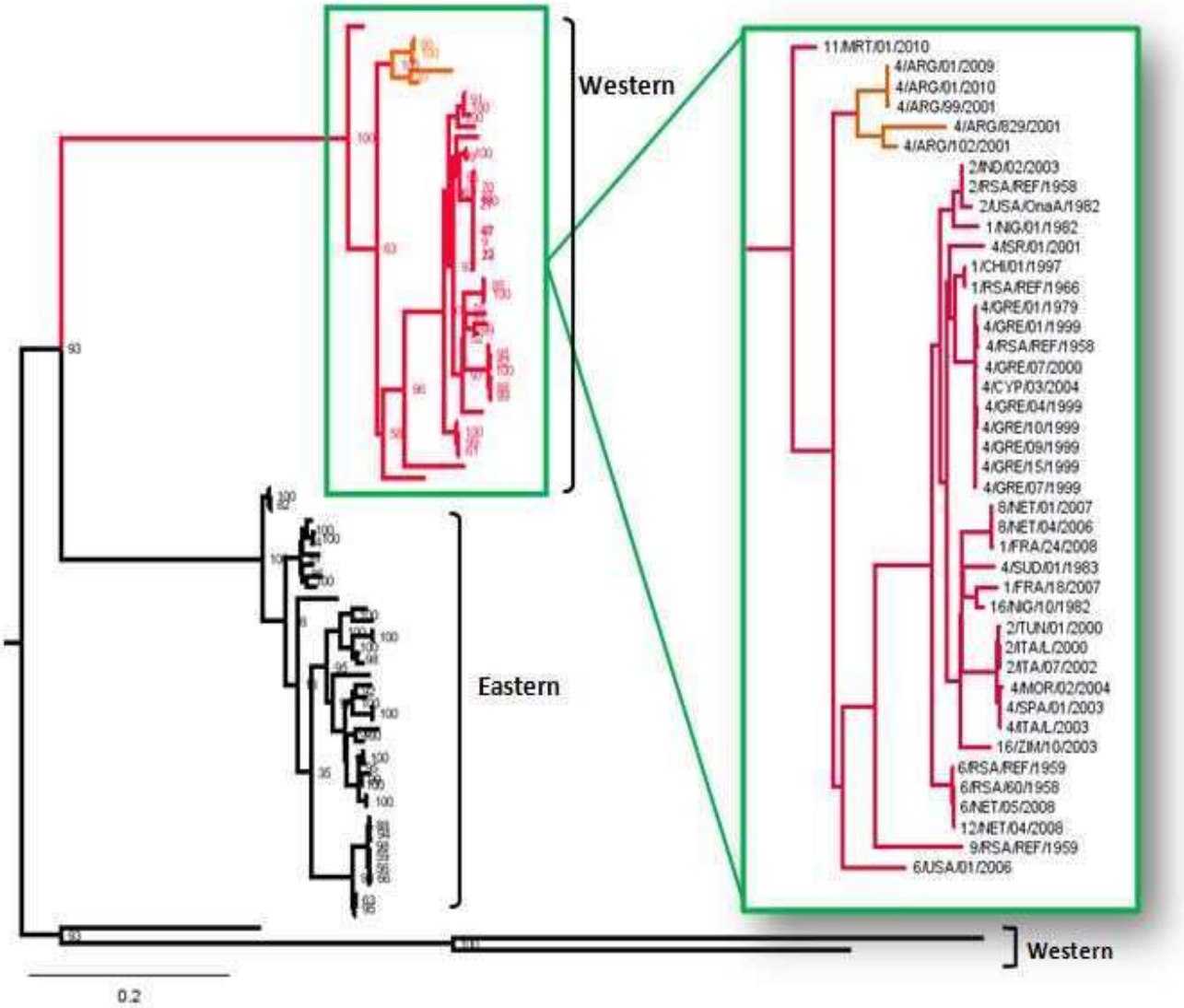

Figura 5.3: Árbol filogenético reconstruido por Máxima Verosimilitud mostrando las relaciones genéticas entre diferentes secuencias del Seg3 de VLA (cepas referencia y aislamientos de campo) de todo el mundo. El análisis filogenético fue llevado a cabo con el software PhyML. Los valores de bootstrap (1000 réplicas) son mostrados cerca de cada nodo.

5.3.3 Segmento 6

Los análisis hechos a partir de secuencias del segmento 6 (Fig. 5.4) muestran un primer nivel de segregación correspondiente a nucleotipos (definidos para este segmento, diferentes a los correspondientes para el Seg2). Luego no hay una correlación perfecta con el serotipo del aislamiento. En este análisis se observó la segregación en los 9 nucleotipos previamente definidos en bibliografía, las secuencias argentinas lo hicieron dentro del nucleotipo A. Compartiendo cluster con secuencias correspondientes a aislados de Sudáfrica, India, Australia, China, Sudán, Italia, España, Turquía, Grecia, Chipre, Alemania, EEUU y Martinique. Al igual que para los anteriores análisis las secuencias argentinas formaron un cluster bien soportado estadísticamente conteniendo las secuencias correspondientes a los 5 aislados analizados a lo largo de este trabajo. Dentro del grupo argentino se vio un rango de identidades nucleotídica de 98.6 a 99.8% y aminoacídicas de 99.4 a 99.9%. Las secuencias codificantes obtenidas mostraron un largo de 1581 nt correspondiente a 527 aa. Comparando dentro del cluster del nucleotipo A las secuencias nucleotídicas más cercanas al cluster argentino fueron (enunciadas como país, nombre asignado a la secuencia y rango de identidades nucleotídicas): Sudan (4/SUD/01/1983, 91.7-92.2%), Chipre (4/CYP/01/196991.9-92.5%), Turquía (4/TUR/01/1978, 91.9-92.4%), Grecia (4/GRE/01/2000, 91.9-92.5%), Sudáfrica (4/RSA/REF/1958, 91.9-92.5)(11/RSA/REF/1959, 92-92.6%)(17/RSA/REF/1976, 90.3-90.9%) (24/RSA/REF/1984, 92.1-92.5%), España (4/SPA/01/2003 y 4/SPA/02/2003, 89.8-90.3%), Italia (4/ITA/L/2003, 89.9-90.4%), Alemania (92-92.6%) y sobre todo el aislamiento de Argentina (4/ARG/01/2002, 99.2-99.6%).

Es de destacar que esta secuencia argentina se podía encontrar previamente en bases de datos, no se tiene información certera sobre la misma, pero sería resultante del mismo muestreo realizado por Lager y col. entre los años 1999-2001, muestreo del cual provienen tres de los aislamientos utilizados en esta tesis. Esta secuencia encontrada fue llamada 4/ARG/2002 y no sería el duplicado de ninguna de las enunciadas anteriormente. De todos modos la esta secuencia fue casi idéntica a las 5 obtenidas en esta tesis, de hecho la identidad nucleotídica de las 5 secuencias para con esta última fue del rango de 98.9-99.6%, mientras que el rango de la secuencia aminoacídica deducida fue de 99.4 a 100%.

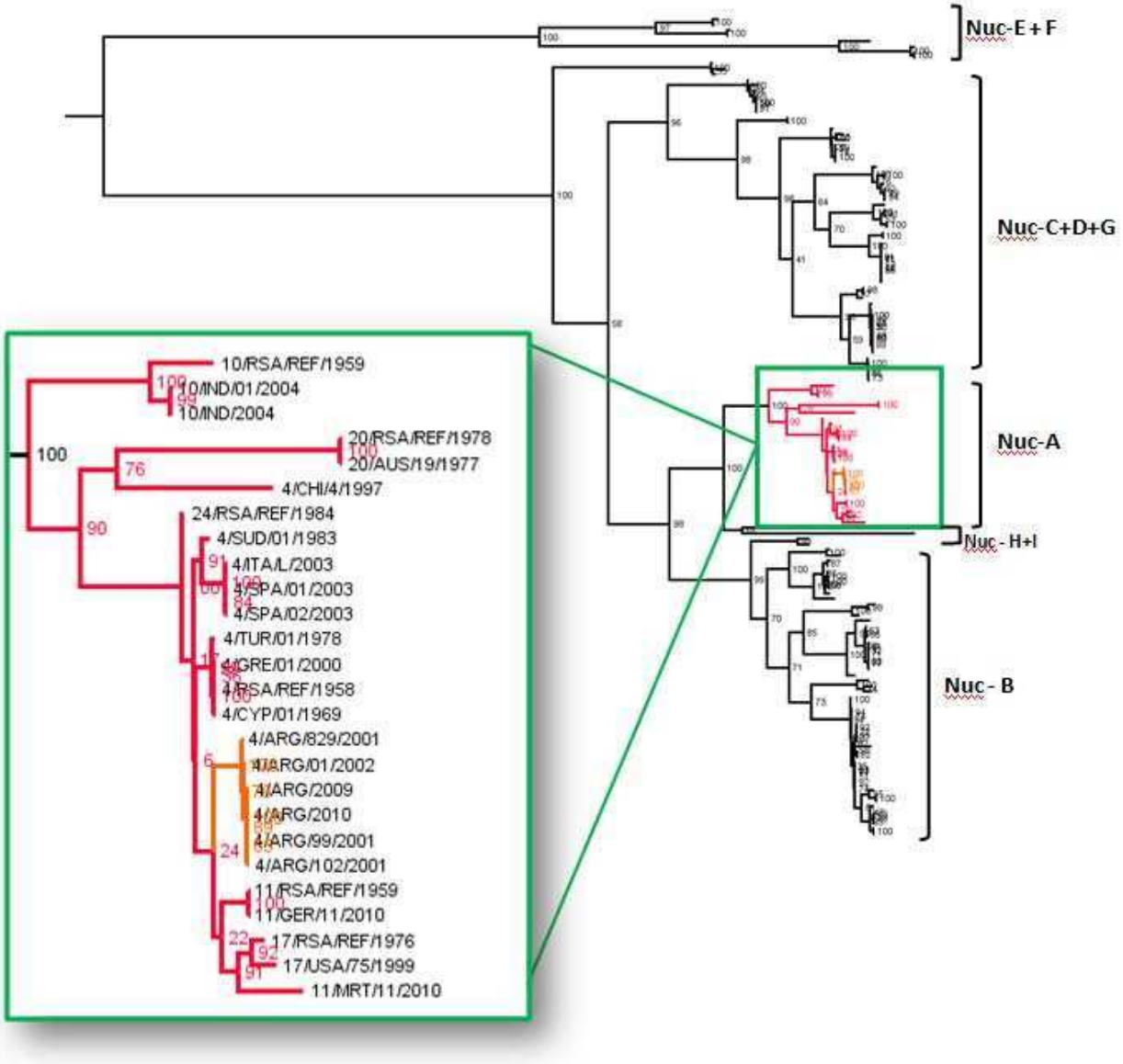

Figura 5.4: Árbol filogenético reconstruido por Máxima Verosimilitud mostrando las relaciones genéticas entre diferentes secuencias del Seg6 de VLA (cepas referencia y aislamientos de campo) de todo el mundo. El análisis filogenético fue llevado a cabo con el software PhyML. Los valores de bootstrap (1000 réplicas) son mostrados cerca de cada nodo.

5.3.4 Segmento 7

Las secuencias obtenidas mostraron un marco de lectura abierto de 1128 en nt y 376 aa deducidos a partir de la misma. Aquí se repitió el patrón visto para los anteriores análisis, los aislamientos argentinos agruparon juntos en un clado soportado fuertemente por análisis estadístico de bootstraping (Fig. 5.5). Dentro del grupo argentino el rango de identidad nucleotídica fue de 96.9-99.6% y 98.2-100% para aminoácidos deducidos.

Cabe destacar que muy cercana al grupo argentino, se ubica la única secuencia brasilera disponible a la fecha. La misma fue denominada 12/BRA/01/2001 aislada en un brote en Paraná, Brasil en el año 2001. La variabilidad entre esta secuencia y el cluster argentino fue de 95.4-96% identidad nucleotídica y 96.8-97.1% para identidad aminoacídicas. Del mismo modo se destaca que al analizar el alineamiento, la secuencia de Brasil comparte ciertas mutaciones puntuales con la secuencia correspondiente al aislamiento argentino denominada 4/ARG/829/2001 (Fig. 5.5).

Este cluster sudamericano agrupó dentro de un gran grupo de topotipo *western*, definido previamente en bibliografía. Para este segmento también se definen dos topotipos según origen geográfico, denominados *Western* y *Eastern*. En este clado topotípico se encontraron agrupando junto al cluster sudamericano secuencias de Norteamérica, Caribe, Centroamérica y algunas secuencias asiáticas. El grupo resulta heterogéneo en cuanto a los años en que cada aislamiento fue obtenido y el serotipo de éstos. Con respecto a los rangos de identidades (en nt), se destacan los aislamientos de: India (10/IND/01/2004, 91.-92.1%), Martinique (11/MRT/MQ/2010, 91-91.3%), Brasil (12/BRA/01/2001, 96.1-96.6%), Puerto Rico (17/PTR/300/1991 y 17/PTR/285/1991, 91.7-92.2%), Guatemala (17/GUA/240/1990, 3/GUA/350/1991 91.9-92.2%), Honduras (6/HON/233/1990, 91.9-92.1%), Jamaica (3/JAM/131/1989, 91.4-91.9%), EEUU (2/USA/OnaB/1982, 92.6-93.2%) (17/USA/475/1999, 91.9-62.4%) (2/USA/06/1999, 91.9-92.1%) (10/USA/01/1953, 91.9-92.2%) (17/USA/01/1962, 91.6-91.9%) (2/USA/01/2010, 92.6-93.2%).

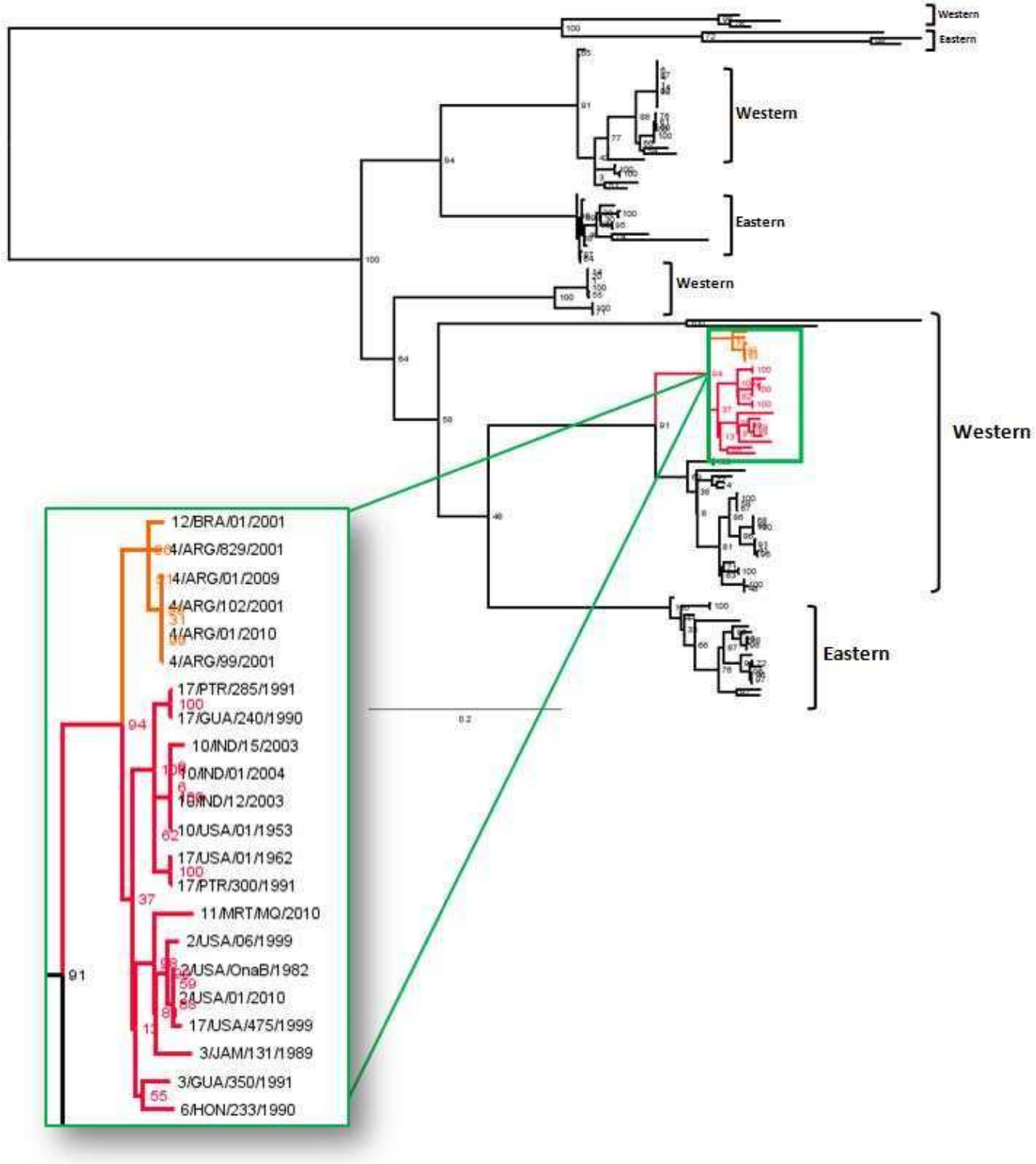

Figura 5.5: Árbol filogenético reconstruido por Máxima Verosimilitud mostrando las relaciones genéticas entre diferentes secuencias del Seg7 de VLA (cepas referencia y aislamientos de campo) de todo el mundo. El análisis filogenético fue llevado a cabo con el software PhyML. Los valores de bootstrap (1000 réplicas) son mostrados cerca de cada nodo.

5.3.5 Segmento 10

Por último, el análisis del segmento 10 mostró un marco de lectura abierto para las secuencias argentinas de 687 nt, codificantes según este mismo marco para 229 y 216 aa, recordando que Seg10 es codificante para dos proteínas no estructurales NS3 y NS3A. Aquí también se observó un agrupamiento de las secuencias argentinas en un único cluster sudamericano. Dentro del mismo, se obtuvieron rangos de identidades nucleotídicas de 95.6-99.8% y un rango de identidades aminoacídicas de 98.2-100%. Al igual que para los análisis del Seg3 y Seg7, para Seg10 también se definen cluster de topotipos, relativizando a las secuencias que se encuentran allí dentro como pertenecientes a linajes *Western* o *Eastern*. En este caso, el cluster argentino se agrupó con secuencias previamente descriptas como parte de un topotipo *Western*. Fig 5.6.

En cuanto a las comparaciones entre secuencias nacionales y el resto del mencionado cluster *Western* se encontraron aislamientos de Norteamérica, Caribe, Centroamérica e India. Mas precisamente, los valores obtenidos para los rangos de identidades nucleotídicas fueron: Honduras (1/HON/72/1989, 91.8-92.7%)(6/HON/87/1990, 91.6-93.2%), India (10/IND/01/2004, 91.2-92.9%), EEUU (10/USA/01/1953, 10/USA/10B/1981, 91.1-92.9%)(11/USA/11B/1980, 91.1-92.3%)(11/USA/11B/1981, 90.5-92.2%)(11/USA/11C/1981, 91.2-92.6%)(11/USA/11O/1979, 90.9-92.3%)(11/USA/11O/1981, 91.1-92.5%)(11/USA/11O/1981, 17/USA/17B/1981 17/USA/17O/1979, 91.1-92.6%)(17/USA/17B/1990, 17/USA/90Y/1990, 90.5-92.2), Martinique (11/MRT/MQ/2010, 90.8-92.6%), Guatemala (3/GUA/30/1990, 92.9-93.6%).

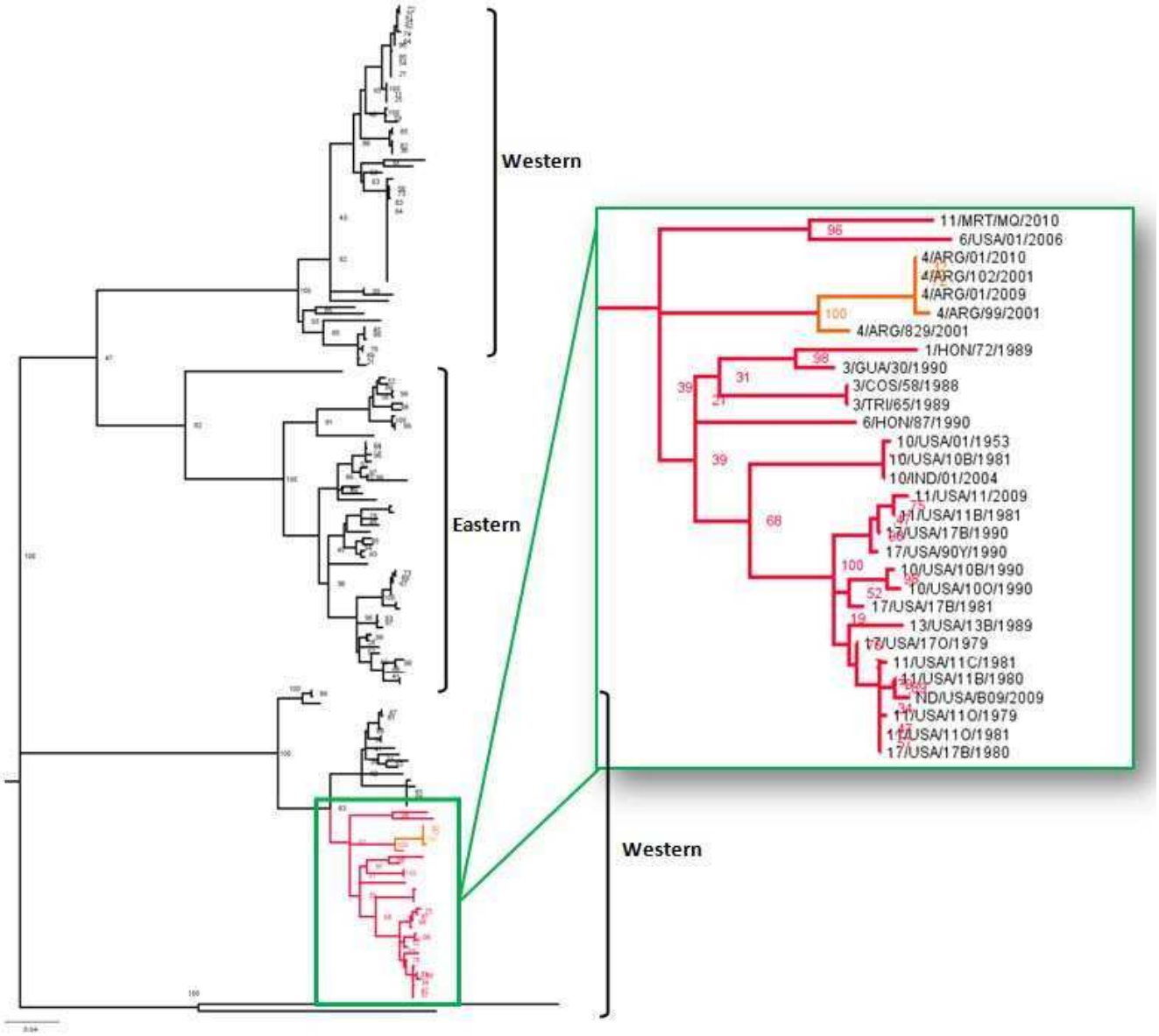

Figura 5.6: Árbol filogenético reconstruido por Máxima Verosimilitud mostrando las relaciones genéticas entre diferentes secuencias del Seg10 de VLA (cepas referencia y aislamientos de campo) de todo el mundo. El análisis filogenético fue llevado a cabo con el software PhyML. Los valores de bootstrap (1000 réplicas) son mostrados cerca de cada nodo.

5.4 Análisis de similitud de secuencias del Seg2.

Como consecuencia de la alta variabilidad del Seg2, se analizó mediante el software SimPlot el perfil de similitud entre las secuencias disponibles para el Seg2 del serotipo 4. En la fig. 5.7 se muestran las curvas graficadas para tres comparaciones. Para todo el análisis se definieron tres grupos, grupo conteniendo secuencias argentinas, grupo conteniendo la secuencia del Seg2 de la cepa vacunal y grupo conteniendo secuencias del Seg2 del serotipo 4 de aislamientos del resto del mundo (ver 4.8.3).

En los tres gráficos de la figura se observa que la variación general oscila entre 91% y 100%. Las curvas muestran patrones de variación conjunta en función de la posición para los tres gráficos. A nivel global se observó que el grupo de secuencias argentinas muestra mayor similitud con el grupo de aislamientos de VLA4 del resto del mundo que con el grupo de la cepa vacunal, siempre dentro del rango antes mencionado. Los mayores niveles de similitud se observaron en el rango de posiciones 1 a 450. Los menores de similitud se vieron en el rango de 450-750.

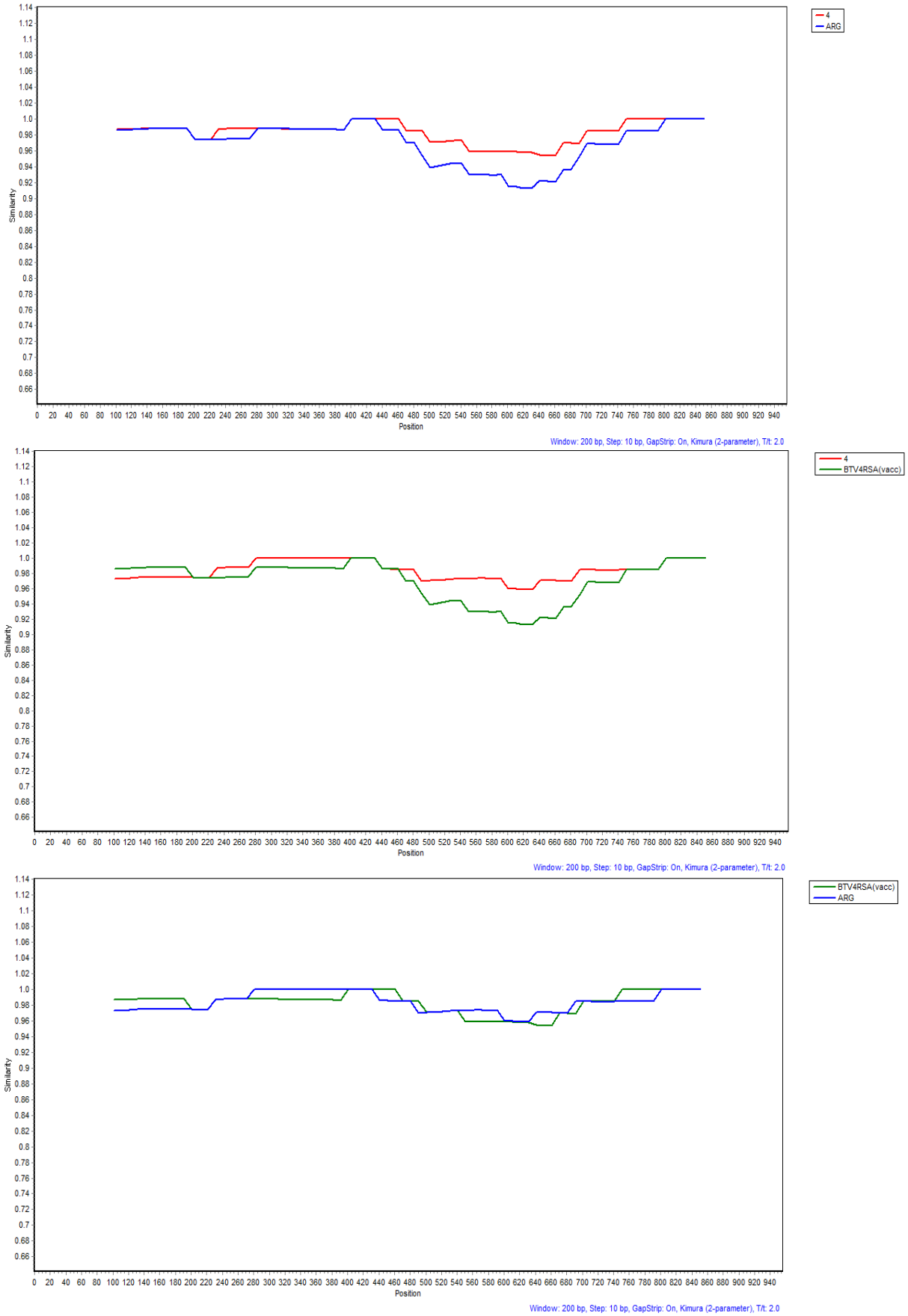

Figura 5.7: Curvas de similitud (generados con SimPlot) basada en Seg2 de un set de tres grupos previamente definidos. En color azul: secuencias argentinas, color verde: secuencia de cepa vacunal serotipo 4, color rojo: VLA4 resto del mundo. El panel superior muestra la secuencia vacunal como “blanco” (query), e panel intermedio se grafica con el grupo de secuencias argentinas como blanco y en el panel inferior, el grupo blanco es las secuencias de VLA4 del resto del mundo. Cada curva es una comparacion entre cada grupo de secuencias (referencias de cada análisis) y el grupo “blanco”. Cada punto graficado es la identidad porcentual dentro de la ventana de 200 pb (*window*) desplazándose de a 10 pb (*step*) centradas en la posición graficada.

DESARROLLO DE VACUNA A SUBUNDAD DIRIGIDA A CELULAS PRESENTADORAS DE ANTIGENO

5.5 Amplificación y clonado del gen de la proteína VP2.

A partir del aislamiento 4/ARG/829/2001, se amplificó exitosamente el fragmento de 2871 pb correspondiente al marco de lectura abierto codificante para la proteína viral VP2. Dicho maco se encuentra contenido en el Segmento 2 del genoma viral. Como se explicó en 4.9, la secuencia de clonado se realizó en dos pasos aprovechando un sitio de restricción natural para la enzima de restricción PmeI. Cada fragmento amplificado se clonó en el vector pGemT Easy, el cual fue el paso previo al clonado definitivo en el vector pFast Bac Dual. Las secuencias de ambas construcciones fueron confirmadas por secuenciación a fin de comprobar la integridad del marco de lectura. La segunda construcción se obtuvo insertando en el extremo 5´del Seg2 la secuencia codificante de APCH. Con estas construcciones se generaron los bácmidos correspondientes y se transfectaron células SF9 para generar a su vez el baculovirus recombinante.

5.6 Obtención del baculovirus recombinante

Con el objetivo de obtener la proteína VP2 de VLA para ser evaluada como vacuna a subunidad, se procedió a la expresión de la misma, utilizando el sistema de baculovirus recombinante.

Se ensayaron diferentes concentraciones de ADN bacmídico y lípido transfectante, resultando ser más efectiva la relación 2 µg de ADN bacmídico: 9 µl de lípido transfectante, dado que se observaron más células Sf9 con signos de infección en comparación con los controles negativos (Sf9 sin transfectar) luego de las 72 h.

5.7 Producción de las proteínas recombinantes.

5.7.1 Efecto citopático en células adherentes

Para los cultivos de células Sf9 en monocapa, se observó un mejor efecto citopático a las 96 h, empleando una MOI=5 (Figura 5.8).

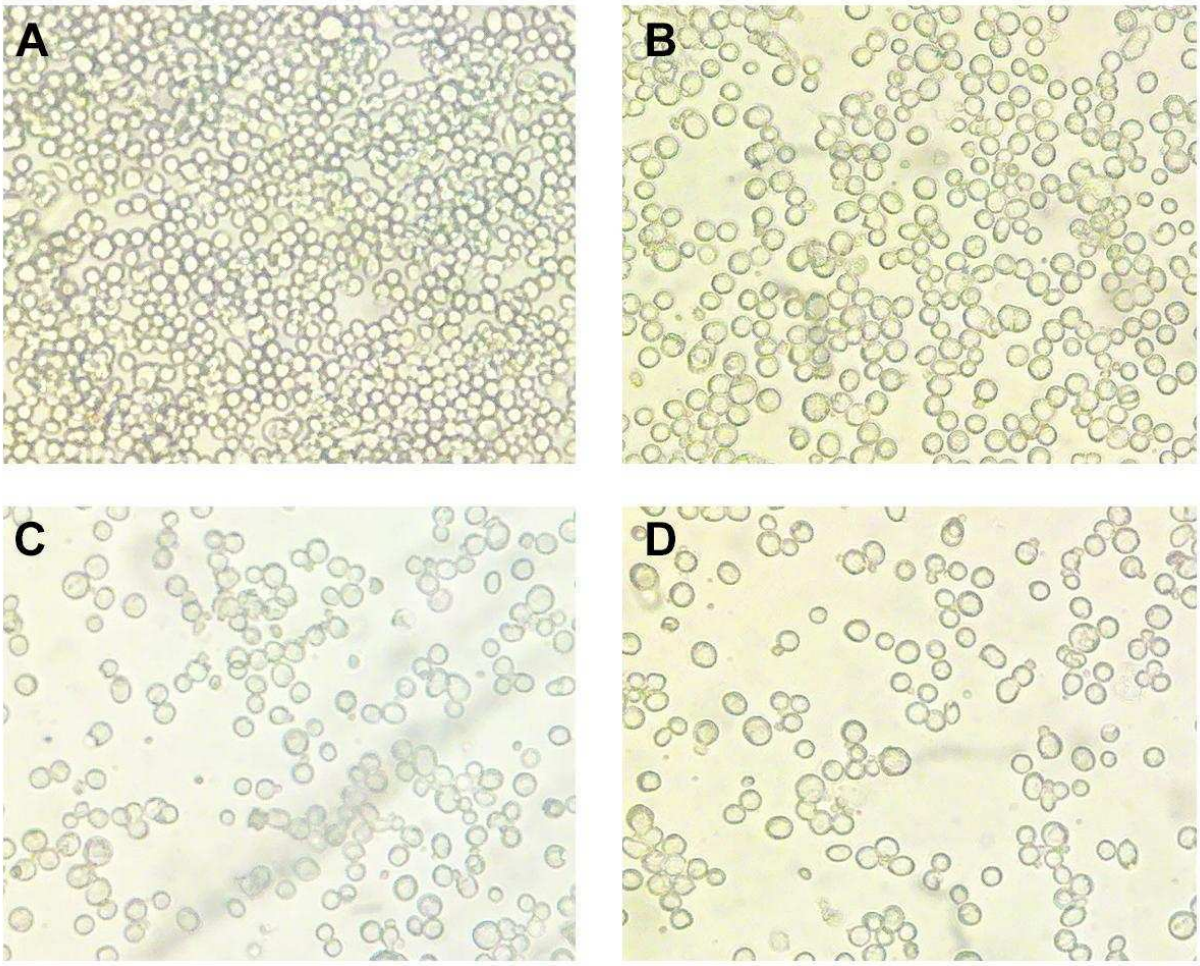

Figura 5.8: Efecto citopático en células Sf9. A: células Sf9 sin infectar 96 h. B-D: Células Sf9 Infectadas (B:24 h, C:48 h, D: 96 h.)

5.7.2 Evaluación de la expresión en células SF9.

En primera instancia se realizó un ensayo piloto de producción de antígeno, en el cual células SF9 fueron infectadas con el pasaje 2 de cada baculovirus recombinante. Los resultados se observan en la Fig. 5.9. Fue posible identificar las bandas correspondientes en el tamaño esperado para cada proteína (aprox. VP2=110 kDa, APCH-VP2=140 kDa).

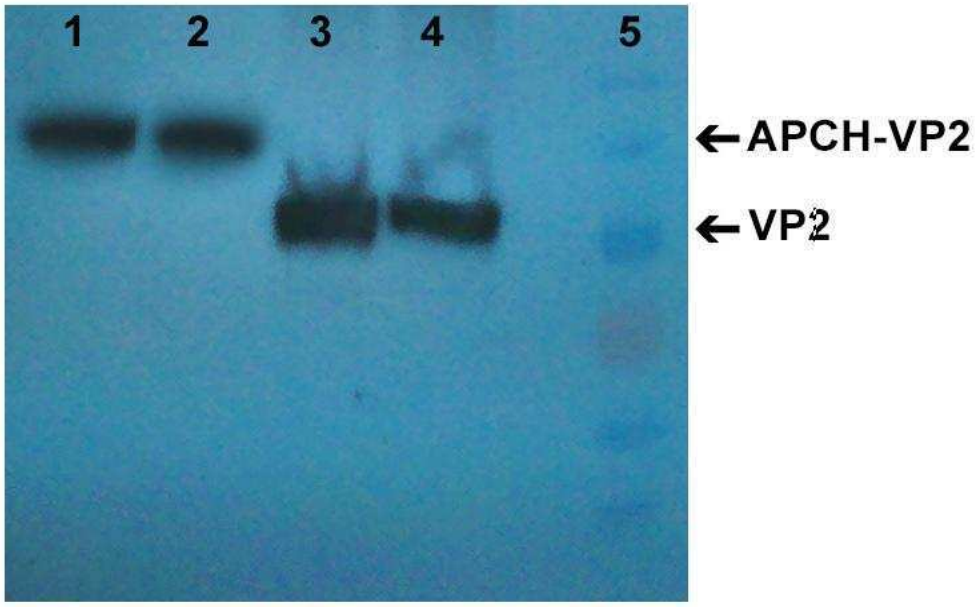

Figura 5.9: Western blot de prueba piloto de producción de antígeno. Los cultivos de células SF9 fueron infectados con un P2 de cada línea de baculovirus recombinante. La cosecha de proteínas fue a las 96 h. Se evaluó la expresión por wb utilizando como anticupero primerio un anticupero monoclonal anti Penta His. El revelado se realizó por ECL. Calle 1: APCH-VP2 baculovirus 1; calle 2: APCH-VP2 baculovirus 2; calle 3: VP2 baculovirus 1; calle 4: VP2 baculovirus 2; calle 5: marcador de peso molecular.

5.7.3 Optimización de condiciones de infección y cosecha.

En pos de optimizar la producción de antígeno, se evaluaron para ambos casos, distintas condiciones de expresión: multiplicidad de Infección (MOI por sus siglas en inglés) (Fig. 5.10); días de cosecha post infección (Fig. 5.11) y volumen de cultivo (Fig. 5.12).

5.7.3.1 Curva de MOI

Se infectaron células con diferentes multiplicidades de infección y se cosechó la producción a las 96 h. Los resultados cualitativos se presentan en la figura 5.10. Se pudo observar un incremento de la expresión utilizando MOI de 5 y 10 para ambas proteínas, por ello, se decidió emplear una MOI de 5 para los siguientes ensayos de expresión.

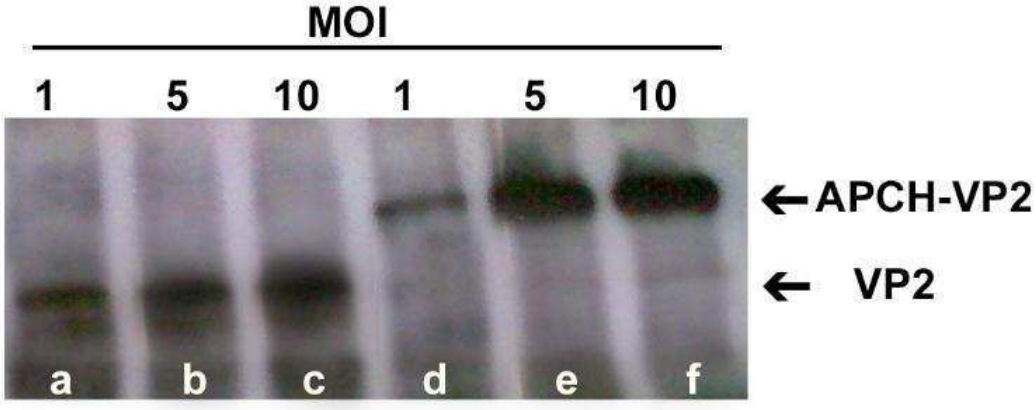

Figura 5.10: Western blot para prueba de infección con distintas MOI. Los cultivos de células SF9 fueron infectados con un P2 de una línea de cada baculovirus recombinante. La cosecha de proteínas fue a las 96 h. Se evaluó la expresión por wb utilizando como anticuerpo primario un anticuerpo monoclonal anti Penta His. El revelado se realizó por ECL. Calles (a-c): infección a MOI 1, 5 y 10 respectivamente con baculovirus recombinante VP2; Calles (d-f): infección a MOI 1, 5 y 10 respectivamente con baculovirus recombinante APCH-VP2

5.7.3.2 Curva de días de cosecha post infección

Se realizaron infecciones con ambos baculovirus a una MOI5 y se cosecharon las proteínas recombinantes a las 48, 96 y 144 h (Fig. 5.11). A las 48 h post infección, la expresión de ambas proteínas era prácticamente indetectable. A las 96 y 144 horas posteriores a la infección se observó un incremento en la producción de las proteínas APCH VP2; a estos tiempos, la proteína VP2 se expresó en niveles cualitativamente similares. Se eligió el tiempo 96 horas para la cosecha de VP2 y 144 horas para APCH VP2.

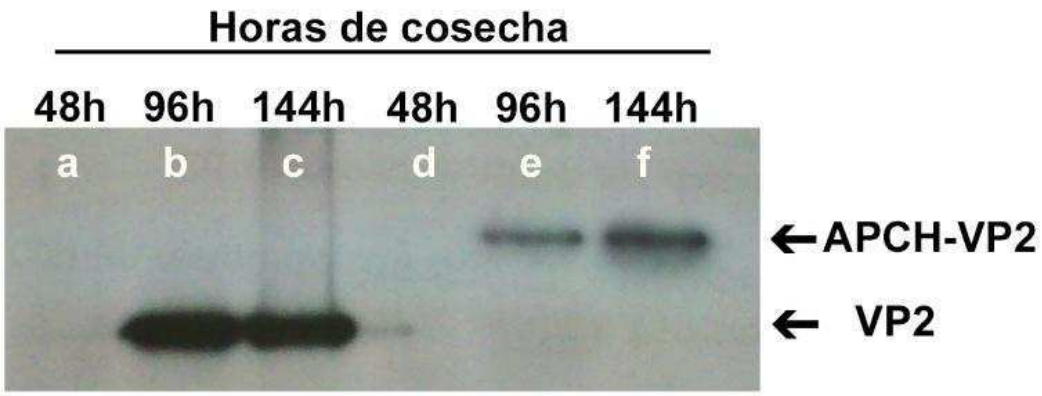

Figura. 5.11: Western blot para prueba de infección con distintos tiempos de cosecha 48 h=2 días, 96 h=4 días, 144 h= 6 días. Los cultivos de células SF9 fueron infectados con un P2 de una línea de cada baculovirus recombinante. La MOI de trabajo fue 5. Se evaluó la expresión por wb utilizando como anticuerpo primario un anticuerpo monoclonal anti Penta His. El revelado se realizó por ECL. Calles (a-c): cosecha a las 48 h, 96h y 144 h respectivamente con baculovirus recombinante VP2; Calles (d-f): cosecha a las 48h, 96h y 144h respectivamente con baculovirus recombinante APCH-VP2

5.7.3.3 Volumen de producción antigénica

Se evaluó de manera exploratoria la efectividad en la expresión de antígeno utilizando los volúmenes de frasco de cultivo (T-25 y T-75). Como se puede observar en la figura 5.12, la

Expresión en frascos T75 resultó cualitativamente más eficiente que en el frasco de menor volumen. Esto permitió aumentar tanto el volumen de expresión como la cantidad de proteína producida.

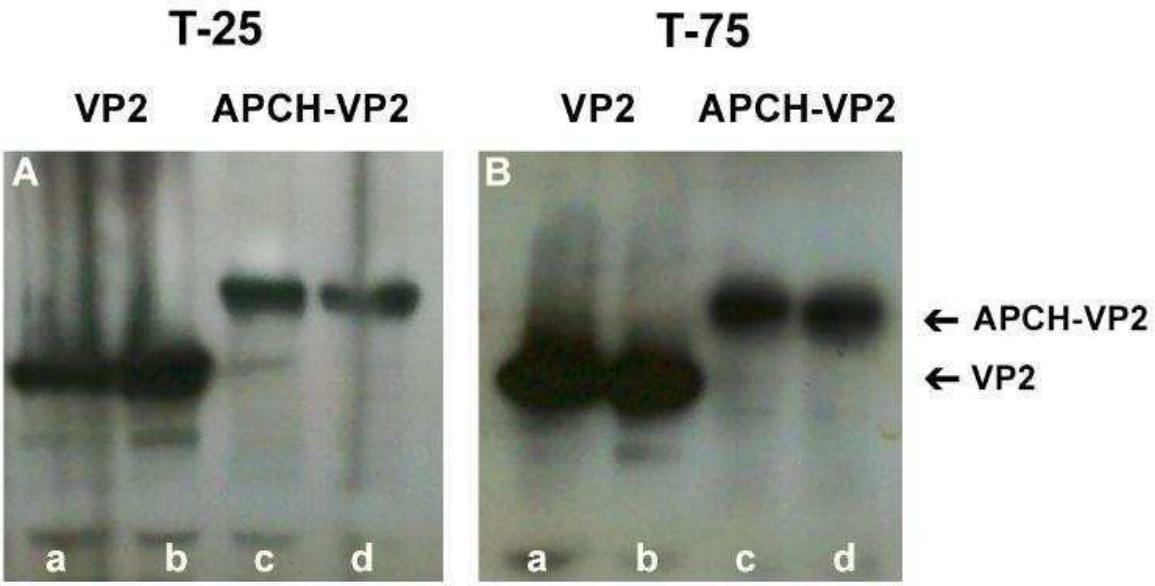

Figura. 5.12: Western blot para prueba de escalado primario de producción. Los cultivos de células SF9 fueron infectados con un P2 de una línea de cada baculovirus recombinante y cosechados a 96h para VP2 y 144h para APCH-VP2. El volumen final de obtención de las células cosechadas fue mantenido en proporción según la escala de cultivo para que los resultados sean comparables. La MOI de trabajo fue 5. Se evaluó la expresión por wb utilizando como anticuerpo primario un anticuerpo monoclonal anti Penta His. El revelado se realizó por ECL. Panel A: infección en frascos T-25, Panel B: infección en frascos T-75, Para ambos paneles: calles a y b: infección con baculovirus recombinante VP2, calles c y d: infección con baculovirus recombinante APCH-VP2.

5.8 Detección y caracterización antigénica de la proteína VP2 recombinante

Se realizó la producción de ambas proteínas recombinantes en las condiciones estandarizadas. Se realizó la detección y caracterización antigénica de las mismas empleando un anticuerpo anti-histidina y un suero policlonal bovino anti VLA4 de referencia, respectivamente.

Se observó un reconocimiento eficientemente de la proteína recombinante VP2 por ambos sueros, observándose una banda del tamaño esperado.

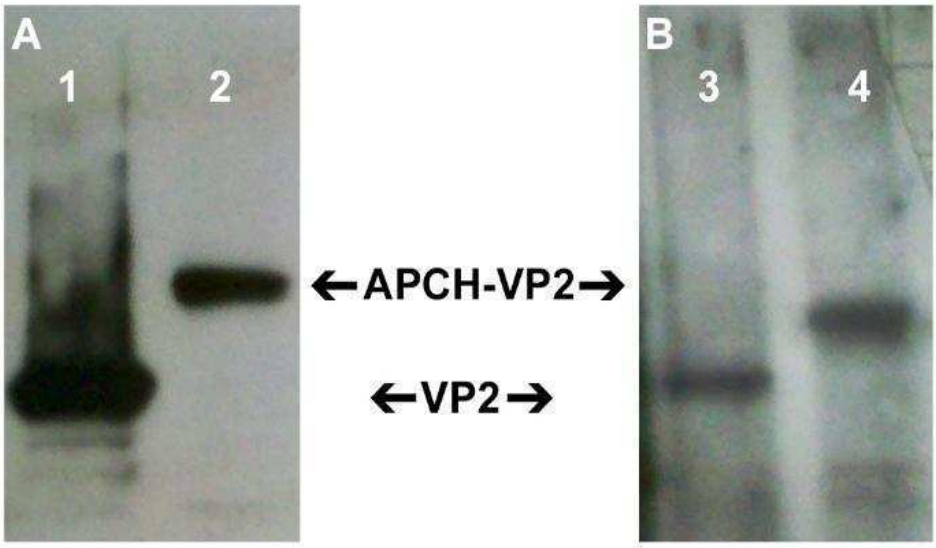

Figura. 5.13: Western blot de caracterización antigénica de las proteínas recombinantes. Los cultivos de células SF9 fueron infectados con un P2 de una línea de cada baculovirus recombinante y cosechados a 96h para VP2 y 144h para APCH-VP2. La MOI de trabajo fue 5. Se evaluó la expresión por wb. En ambos paneles (A y B) el orden de siembra es: calles 1/3: VP2, calles 2/4: APCH-VP2. Panel A: proteínas recombinantes reveladas con anticuerpo anti His-Penta (QIAGEN) y anti mouse peroxidasa. Panel B: proteínas recombinantes reveladas con policlonal bovino anti VLA4-AMES y

5.9 Cuantificación de la proteína recombinante

Mediante SDS PAGE WB, se estimó la cantidad de proteína recombinante producida, enfrentándola a una curva de otra proteína de masa conocida (proteína viral E2 truncada -E2t- del virus de la diarrea viral bovina, cuantificada por ELISA[157]) y producida por el mismo sistema (Fig. 5.14). La detección de las proteínas de la curva patrón y las proteínas a evaluar se realizó con el

anticuerpo anti-histidina.. Ambas proteínas (de VLA o de VDVB) son detectadas por el mismo anticuerpo anti histidina. Se hicieron *pooles* de distintas producciones previamente revisadas por SDS PAGE y se cuantificaron arrojando resultados de 3 ng/ul para VP2 y 0.75 ng/ul para APCH-VP2.

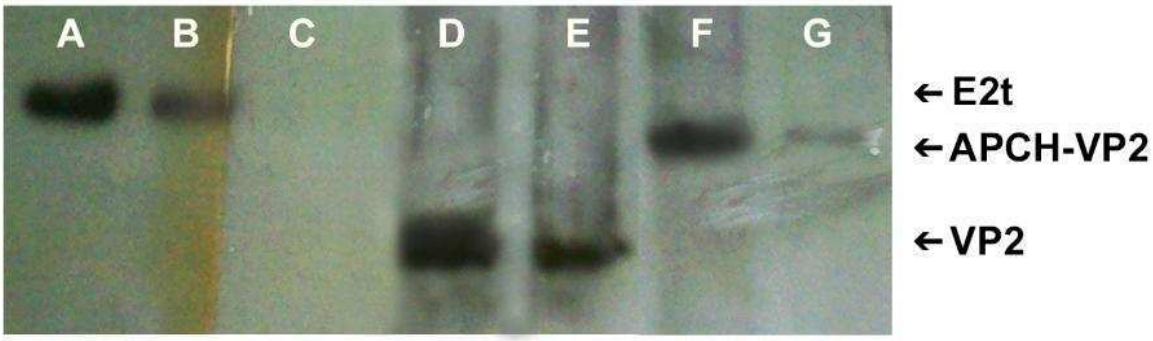

Figura 5.14: Cuantificación por wb de proteínas recombinantes. Los cultivos de células SF9 fueron infectados con un P2 de una línea de cada baculovirus recombinante y cosechados a 96h para VP2 y 144h para APCH-VP2, las producciones previamente verificadas se poolearon para obtener un volumen de uso para formular las vacunas. La MOI de trabajo fue 5. Se evaluó la expresión por wb utilizando como anticuerpo primario un anticuerpo monoclonal anti Penta His. El revelado se realizó por ECL. Calle A: proteína E2t VDVB 5 ng/μl, B: proteína E2t VDVB 2.5 ng/μl, C: proteína E2t VDVB 1.25 ng/μl, D: pool VP2 TC, E: pool VP2 1/2, F: pool APCH-VP2 TC, F: pool APCH-VP2 1/2.

5.10 Ensayos de inmunogenicidad en cobayo

Con el fin de evaluar la inmunogenicidad de las proteínas recombinantes producidas, se inocularon cobayos con vacunas formuladas con dos cantidades distintas de cada proteína.

Estas dos dosis se eligieron en base al nivel de producción de los baculovirus generados y a resultados obtenidos a partir de evaluaciones preliminares de la proteína APCH.E2t (Datos no mostrados). Como control positivo del ensayo se utilizó una vacuna formulada con virus inactivado. Se estudió la respuesta de anticuerpos inducida por la vacunación, para lo cual se tomaron muestras de suero a los 0, 30 y 60 días post vacunación y se detectaron anticuerpos específicos mediante la técnica de seroneutralización viral.

Al día 30 post vacunación, todos los animales inmunizados mostraron seroconversión (Fig. 5.15), mientras que el grupo sin inmunizar permaneció seronegativo durante toda la experiencia. Luego de la segunda inmunización se observó un incremento en el nivel de AN en todos los grupos vacunados. En este tiempo (60dpv), no se observaron diferencias significativas entre los grupos evaluados; ambas proteínas recombinantes (VP2 y APCH VP2) indujeron títulos de AN similares a los evocados por el control positivo. Asimismo, no se evidenciaron diferencias significativas entre las dosis evaluadas para cada proteína (VP2 0.6 ug y 2.4 ug; APCH VP2 0.15 ug y 0.6 ug).

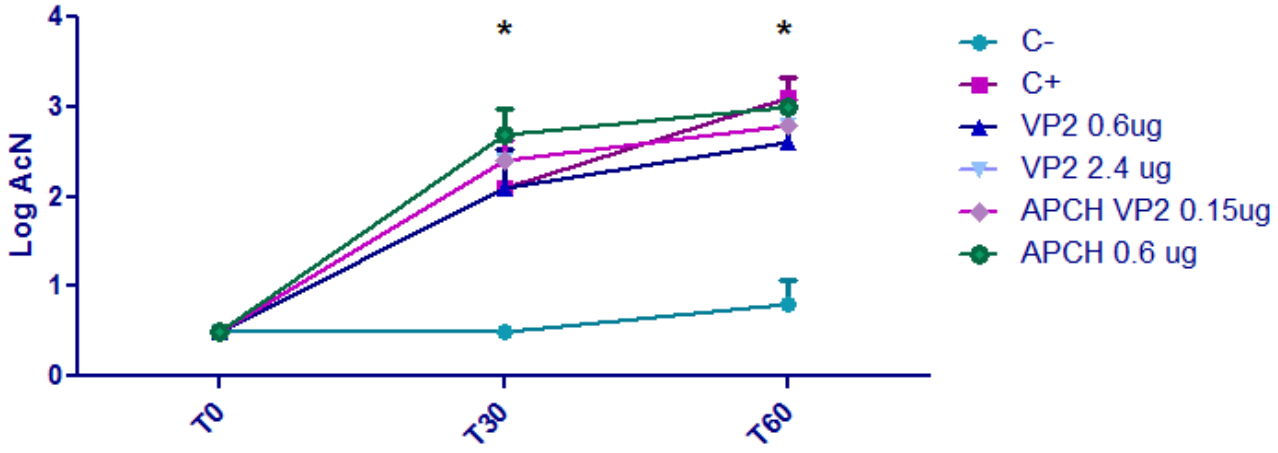

Figura 5.15. Ensayo de inmunogenicidad en cobayos. Título de anticuerpos neutralizantes evaluados por seroneutralización para VLA4. Eje Y: Log de la inversa de la máxima dilución a la que se observó ausencia de efecto citopático. Las barras de error expresan el desvío estándar de cada uno de los grupos en cada uno de los tiempos ensayados.

5.11 Ensayos de inmunogenicidad en bovinos

En base a los resultados obtenidos en cobayos, se decidió evaluar la inmunogenicidad de las proteínas recombinantes en el hospedador natural. Para ello, se inmunizaron bovinos del campo experimental del CNIA, INTA con ambos antígenos (VP2 y APCH VP2) en una dosis correspondiente a 6 veces la dosis menor empleada en cobayos. Asimismo, se incluyó en la

experiencia un control positivo inmunizado con una vacuna a virus inactivado y un grupo de animales permaneció sin inmunizar.

La respuesta de anticuerpos se evaluó a través de SN. Luego de la primovacunación, los animales que recibieron las vacunas formuladas con las proteínas recombinantes y el virus inactivado evidenciaron seroconversión. Luego de la segunda inmunización, el título de anticuerpos continuó elevándose alcanzando a los 90 dpv valores de 3. No se detectaron títulos de AN significativos en los animales del grupo control negativo a lo largo de toda la experiencia (Fig. 5.16)

Es importante destacar que el grupo inmunizado APCH-VP2, el cual recibió una dosis 4 veces inferior a la del grupo vacunado con VP2 (0.9 vs 3.6), no mostró diferencias significativas tanto con el grupo que recibió la proteína recombinante sola (VP2) como con el grupo inmunizado con una vacuna formulada con VLA inactivado (control positivo). Todos los grupos inmunizados mostraron diferencias significativas con respecto al control negativo. Este comportamiento se observó en todos los tiempos post vacunación evaluados.

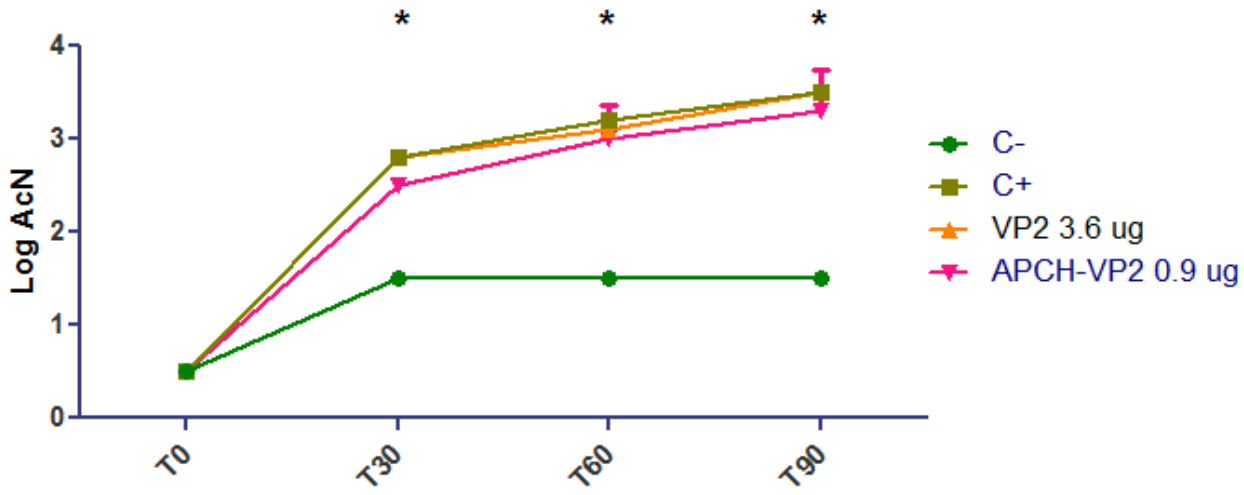

Figura 5.16 Ensayo de inmunogenicidad en bovinos. Título de anticuerpos neutralizantes evaluados por seroneutralización para VLA4. Eje Y: Log de la inversa de la máxima dilución a la que se observó ausencia de efecto citopático. Las barras de error expresan el desvío estándar de cada uno de los grupos en cada uno de los tiempos ensayados.

5.12 kit ELISA comercial

Como parte de la evaluación de la eficacia de la vacuna experimental, se propuso la utilización del kit ELISAc comercial, el cual constituye un ELISA de competición que determina anticuerpos contra la proteína VP7 del VLA, proteína no estructural altamente conservada entre cepas y determinante de serogrupo, para determinar la propiedad de la vacuna para permitir la diferenciación entre animales vacunados e infectados (DIVA).

Los resultados obtenidos demostraron que los animales inmunizados con las proteínas VP2 y APCH-VP2 no reaccionaron con el antígeno presente en el kit, al igual que los bovinos del control negativo. Por otro lado, los sueros del grupo control positivo generaron un alto porcentaje de inhibición, del mismo modo que sueros proveniente de animales infectados.

5.13 ELISA isotipos

En las muestras de suero tomadas a los 60 dpv se analizó el desarrollo de anticuerpos isotipo específico para VLA. Los resultados se muestran en la Fig. 5.17 como la media de los títulos calculados para cada grupo del ensayo (panel superior) y como la relación IgG1/IgG2 entre dichos títulos (panel inferior). Se destaca que, no se observaron diferencias significativas dentro del grupo de animales vacunados (sea con vacunas recombinantes o vacuna control inactivada). Aunque cada una de éstas, por separado, mostró diferencia significativa contra el control negativo (que no

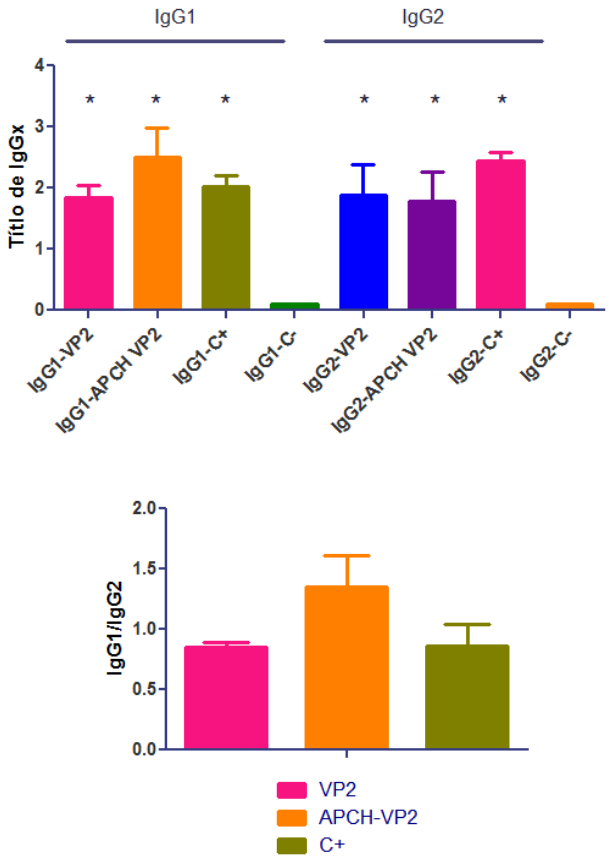

Figura 5.17 ELISA de isotipos. Panel superior: Títulos de IgG1 y 2 para cada grupo del ensayo de inmunogenicidad en bovinos. Panel Inferior: relación entre IgG1 e IgG2. Los resultados se expresaron como la razón entre las medias aritméticas de los títulos de anticuerpos para cada uno de los isotipos. Los datos graficados corresponden al día 60 ppv.

se muestra en la figura). Esto se evidenció tanto para IgG1 como para IgG2. En cuanto a la relación IgG1/IgG2, se repite la no-diferencia significativa entre las vacunas y entre éstas y la vacuna

inactivada pero se observa una tendencia diferencial: tanto la vacuna VP2 como la vacuna inactivada muestran valores de la relación IgG1/IgG2 cercanos a 0,8 mientras que para los animales vacunados con APCH-VP2 la media tiende a 1,4.

5.14 Linfoproliferación

Dentro del ensayo de inmunogenicidad en bovinos se propuso evaluar la respuesta inmune celular mediada por linfocitos T (LT) por linfoproliferación dependiente de antígeno. Para ello, los animales inmunizados y el grupo control recibieron un estímulo con una vacuna a virus inactivado a los 90 dpv y a los 5 días se tomaron muestras de sangre para obtener y purificar los linfocitos.

Los ensayos mostraron proliferación específica frente al estímulo con VLA4 para el grupo vacunado con VP2 recombinante (Fig. 5.18). Contrariamente a lo ocurrido con VP2, no se observó proliferación en las células provenientes de los grupos vacunados con APCH-VP2, VLA4 inactivado (control positivo) y animales sin inmunizar que fueron estimuladas *in vitro* con VLA4 inactivado. Estos resultados se repitieron en 3 ensayos independientes. Los resultados obtenidos mostraron la evocación eficiente de una respuesta celular por parte de la vacuna recombinante VP2, siendo esto requisito fundamental para la generación de una respuesta de memoria que pueda ser reactivada con vacunaciones subsiguientes durante la vida del animal.

.

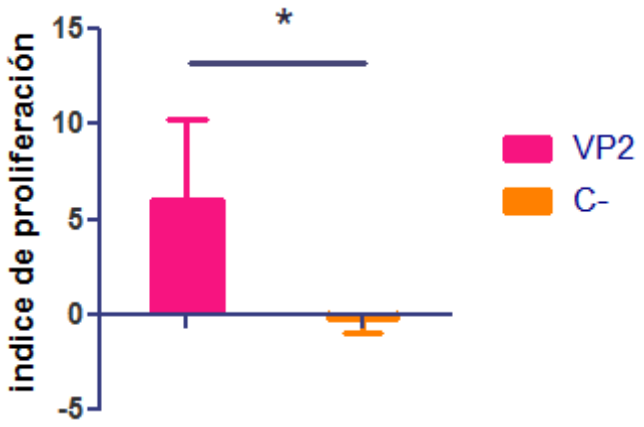

Figura 5.18. Proliferación celular evaluada a través de la técnica de CFSE para ensayo de inmunogenicidad en bovinos. Como estímulo se utilizó VLA4 (título $10^7 DICT_{50}$) inactivado por exposición a la luz. Los resultados son expresados como porcentajes de proliferación específica. Cada columna representa la media para cada grupo y su desvío estándar. Cada valor individual fue corregido restándole el porcentaje de proliferación inespecífico, evaluado con medio y *mock*, respectivamente.

6 . DISCUSIÓN

6.1 ESTUDIO FILOGENÉTICO DE AISLAMIENOS DE CAMPO ARGENTINOS PARA EL VIRUS DE LA LENGUA AZUL.

En Argentina y Sudamérica, el estado de conocimiento respecto a Lengua Azul y su agente etiológico, el Virus de la Lengua Azul, es escaso[5,22]. Hay informes serológicos que cubren la región sudamericana pero éstos no son recientes y además, estos datos serológicos no siempre provienen de relevamientos planificados, entonces significan datos del tipo "hallazgo" en consecuencia, salvo alguna excepciones no se han llevado a cabo relevamientos ordenados para verificar el status de Lengua Azul en Sudamérica. [3-5,22]

El VLA fue aislado por primera vez en Argentina por Lager y col[5] durante el seguimiento de animales centinela entre los años 1999 y 2001. Luego de ésto, los únicos nuevos aislamientos del VLA fueron logrados en el marco de este trabajo de tesis. A partir de todos ellos se obtuvo la secuencia de los marcos de lectura abierta de 5 de los 10 segmentos que constituyen el genoma viral. De este modo, los resultados de esta sección contribuyen significativamente al conocimiento del status del virus en la región así como también al conocimiento de las características genéticas de VLA en Sudamérica, estableciéndose como datos de referencia argentinos y más aún sudamericanos dado el escaso trabajo sobre VLA realizado en la región. Específicamente, y como se mencionó en la sección Introducción, hasta la fecha de realización del presente trabajo de tesis, el virus ha sido aislado solo en dos países sudamericanos, Argentina y Brasil[4,21]. En los últimos meses, sin embargo, han aparecido en bases de datos, secuencias del tercer país donde se ha aislado el virus, Guayana, aunque no hay reportes bibliográficos de los mismos.

Los tres aislamientos realizados por Lager y los realizados en esta tesis doctoral, fueron utilizados para caracterizar genéticamente las cepas circulantes en la región noreste argentina (NEA). Estos 5 aislamientos constituyen la primera evidencia no serológica de VLA circulando en la región noreste.

Dentro del contexto del VLA se ha reportado la presencia del virus en todos los continentes salvo la Antártida, dentro de esta distribución, el serotipo 4 ha sido aislado en diferentes partes del mundo; tal es así que su presencia ha sido reconocida en África, Europa,

Medio Oriente, Pakistán, India, Sudeste Asiático, Indonesia, China, América central y Sudamérica (http://www.reoviridae.org/dsRNA_virus_proteins/btv-serotype-distribution.htm).
Recientemente, este serotipo del virus ha sido descripta en brotes en Marruecos, Chipre, Grecia y España [21,159].

En Sudamérica pocos brotes de VLA han sido reportados. La situación real en cuanto a estado sanitario y el impacto que éste trae asociado a la interferencia con el movimiento de animales, productos y subproductos es desconocida; por consiguiente, no es posible evaluar el impacto que tendría la detección de un brote severo en la región o, más aún, el cambio de status de ciertos países sudamericanos en los cuales la enfermedad se considera exótica o de incursión aleatoria, como es el caso de nuestro país.

En este trabajo se describieron por primera vez las características genéticas de aislamientos argentinos y sudamericanos y se generaron datos genéticos de los segmentos virales 2, 3, 6, 7 y 10 de virus aislados entre los años 1999 y 2010. Esta contribución a las bases de datos genéticas es significativa dado que hasta la fecha solo se contaba con una secuencia parcial del Seg7 de un aislamiento brasilero VLA12 (número de acceso GenBank: AY263377.1) y una secuencia parcial del Seg6 Argentino VLA4 de un aislamiento de Lager y col[5]. Dado el creciente interés global por el virus, el conjunto de aislamientos y análisis genéticos que se desprenden de esta tesis constituyen datos de referencia regional y global.

La caracterización de las cepas aisladas en todo el mundo mediante el análisis filogenético es una técnica ampliamente abordada en bibliografía. Se destaca el análisis de segmentos por separado dado que la naturaleza segmentada el genoma viral prueba que la evolución de cada segmento es casi independiente. El análisis del Seg2 muestra correlación serotípica y luego, según su origen geográfico. El Seg6 no correlaciona perfectamente con el serotipo, pero sirve como segunda fase del genotipificado o tipificado de la cepa estudiada y los Seg3, 7 y 10 dan idea del origen de la cepa analizada dado su alto grado de conservación.

En este trabajo las secuencias obtenidas correspondiente al Seg2, sirvieron para confirmar los datos serológicos preexistentes para tres de los cinco aislamientos argentinos (4/ARG/99/2001, 4/ARG/102/2001, 4/ARG/829/2001), los cuales habían sido informados como serotipo 4 por

Seroneutralización. Esto es particularmente importante a la hora de caracterizar un hallazgo, dado que las detecciones y determinaciones por técnicas serológicas traen consigo un margen de error debido a que se pueden detectar reacciones cruzadas entre distintos serotipos de VLA y más aún, entre diferentes Orbivirus. Por otro lado, conocer el serotipo de un virus aislado nos da idea de la potencial virulencia de las cepas circulantes y los problemas que éstas pueden traer asociados.

El análisis filogenético arrojó topologías congruentes para los dos métodos de reconstrucción utilizados. Como era de esperar, el árbol mostró una segregación en nucleotipos y luego en serotipos. Dentro del cluster del serotipo 4 se encontró a las secuencias argentinas, segregando en un único clado con alto valor de bootstrap mostrando además un alto valor para las identidades nucleotídicas y aminoacídicas entre las mismas, indicando que este linaje argentino se diferencia fuertemente de las otras secuencias de VLA4 provenientes de otras partes del mundo. Se observó, durante el análisis del clado VLA4, una relación estrecha (por altos valores de porcentaje de identidad) entre las secuencias argentinas y secuencias de Sudáfrica, Grecia y Turquía. Como se dijo previamente, dentro de cada cluster de cada serotipo también se pueden diferenciar grupos bien soportados que denotan el posible origen geográfico del segmento analizado. En este caso las secuencias argentinas segregaron juntas en un cluster independiente, pero mostraron gran similitud con secuencias previamente clasificadas como pertenecientes al topotipo *western*, esto es, de origen Africano/Europeo. A lo largo de los análisis efectuados, se observó que las secuencias argentinas agruparon siempre juntas y con gran soporte estadístico formando así, un fuerte grupo de identidad sudamericana. Asimismo, se evidenció una estrecha relación entre las secuencias nacionales y la secuencia referencia para el serotipo 4, así como también con secuencias de Turquía y Grecia, sugiriendo que todas estas tienen un origen en común, aunque se supone en base a conocimiento de movimiento de animales, que éste no es muy reciente.

El análisis del Seg6 mostró un alto nivel de conservación entre las secuencias argentinas, concordantemente con lo ocurrido en el análisis de Seg2. Todas las secuencias argentinas agruparon dentro del clado de nucleotipo A (definido para este segmento génico) junto con aislamientos de África, Asia, Europa, Norteamérica y Caribe. Se observó dentro de este clado, una

alta relación con aislamientos de distintos años provenientes de Sudan, Grecia, Sudáfrica, Turquía y Chipre sugiriendo un origen común. Este dato concuerda con lo discutido para el Seg2.

En este análisis aparece la secuencia argentina previamente disponible en bases de datos, mencionada anteriormente en esta discusión, dicha secuencia corresponde a un aislamiento obtenido por Lager y col en el mismo muestreo que obtuvo las secuencias que aquí presentamos, aunque no es un duplicado de ninguna de ellas, por consiguiente, esta secuencia muestra una alta similitud tanto con las secuencias aquí analizadas correspondientes a dicho relevamiento (años 1999-2001) como con las secuencias aisladas en los años 2009 y 2010 (de muestras tomadas en años 2007 y 2009). En este caso se ve también la estabilidad génica observada en el análisis del Segmento 2 para virus obtenidos en campo entre los años 1999 y 2009.

El análisis filogenético de los segmentos 3, 7 y 10 también mostró a las secuencias nacionales agrupando juntas y presentando un alto grado de similitud entre ellas, independientemente de su fecha de obtención. En los 3 árboles, las secuencias argentinas agruparon junto a secuencias previamente caracterizadas como pertenecientes al grupo de topotipo *western* indicando que los virus circulantes detectados en el NEA argentino tienen un origen Africano/Europeo.

El análisis del segmento 3 demostró una estrecha relación entre aislamientos argentinos y las cepas referencia de Sudáfrica reportadas previamente como parte del topotipo *western*. También, se destaca un alto porcentaje de identidad con una cepa de serotipo 11 aislada en la isla Martinique, situada en las Antillas menores, en el mar Caribe. Dada la naturaleza segmentada de VLA, uno de sus mecanismos de evolución es su capacidad de generar reasociaciones (*reasortants en bibliografía)* durante una coinfección con dos cepas diferentes, si bien el análisis de solo una secuencia no basta para confirmar un evento de reasociación sugiere que dicho fenómeno pudo haber ocurrido en la evolución de las cepas circulantes en el continente americano.

En el análisis del segmento 7 se observó que las cepas argentinas agruparon estrechamente con un aislamiento brasilero de serotipo 12 aislado en el año 2001, mostrando también altos niveles de identidad genética y sugiriendo un origen en común. Se destaca también la presencia de mutaciones puntuales compartidas entre el aislamiento brasilero

(12/BRA/01/2001) y uno de los aislamientos argentinos 4/ARG/829/2001. Esto constituye un indicador de un origen en común más estrecho entre estas dos secuencias que el descripto para el grupo entero. Por otro lado, el hecho que el aislamiento brasilero sea de serotipo 12 y los argentinos sean de serotipo 4 apoya la idea de eventos de reasociación génica en la región como mecanismo evolutivo. En este mismo análisis se destacaron por su alta identidad respecto a las secuencias argentinas, aislamientos provenientes de India, Martinique, Puerto Rico, Guatemala, Honduras y EEUU. Muchas de estas secuencias fueron obtenidas durante un gran relevamiento que se realizó en Centroamérica y el Caribe a principios de la década de 1980 por el "International Bluetongue team"[31]. Todas estas secuencias, contenidas en este clado, fueron previamente clasificadas dentro del topotipo *western*, por lo que también las argentinas se ven incorporadas a él.

En el caso del análisis del segmento 10 se repite el patrón observado para los otros segmentos estudiados: las secuencias argentinas agrupan juntas con un cluster de alto valor de bootstrap. Las mismas se ubicaron dentro de un grupo previamente definido como de origen/topotipo *western*, junto con secuencias originarias de Norteamérica, Caribe, Centroamérica y África. Se destaca en este análisis (de 158 secuencias) la similitud entre las secuencias argentinas y los aislados de Honduras, India, EEUU, Martinique y Guatemala. Todas estas secuencias comparten un promedio de 92% de identidad nucleotídica con las secuencias argentinas siendo esto, aún para un segmento altamente conservado, un buen indicador de relación genealógica.

Las secuencias argentinas mostraron una fuerte identidad sudamericana cuando fueron sometidas al análisis de los 5 segmentos obtenidos, evidenciando un agrupamiento conjunto con fuerte sustento estadístico de bootstrap. Más allá de las mutaciones puntuales que las diferencian entre sí, esto es la traducción de la alta similitud que hay entre ellas. Los resultados obtenidos sugieren que existe una alta estabilidad genética entre los aislamientos argentinos y una evolución de un linaje independiente argentino que las agrupa. Adicionalmente, y soportando esta idea, la única secuencia de Brasil, Seg7, agrupó junto a las argentinas en el análisis correspondiente a ese segmento. Más aún, la secuencia del aislamiento 12/BRA/01/2001 comparte mutaciones puntuales que la emparentan más estrechamente con el aislamiento argentino 4/ARG/829/2001 que con los otros 4, aunque los valores globales para este grupo sudamericano se mantienen altos.

En ese mismo análisis (filogenia del Seg7), se evidencia la alta identidad de secuencias entre los aislamientos sudamericanos, diferenciándose del resto de los aislamientos analizados (un total de 119 secuencias). Como se discutió previamente, la proximidad genética entre secuencias de aislamientos de diferente serotipo podría ser una fuerte sugerencia de *reasociantes* génicos en la región.

Por otro lado, Balasuriya y col[65] han propuesto basados en análisis de Seg7 y Seg10 una continuidad génica en la región Centroamérica-Caribe-Norteamérica, estudiando aislamientos provenientes de todo el mundo, excepto Sudamérica. En base a los análisis de esta tesis, proponemos que dicha continuidad génica se extiende no solo al área estudiada por Balasuriya, sino también a Sudamérica. Ésta se manifiesta por la estrecha relación encontrada entre secuencias argentinas y de Martinique y EEUU en el análisis del segmento 3 y secuencias de Brasil, Centroamérica, Norteamérica y Caribe en el análisis de los segmento 7 y 10. En base a esto, hipotetizamos que la ruta de introducción de los virus aislados en el NEA Argentino sería Centroamérica/Caribe-Brasil. En concordancia con esta hipótesis, evidencia serológica de VLA ha sido descripta en Mato Groso do Sul, Brasil, una región cercana a la frontera Argentina-brasilero-paraguaya[49]. Por otro lado, Marcopido y col [17]mostraron que no habría circulación de VLA en el Noroeste argentino en camélidos sudamericanos. Esta falta de detección podría ser explicada por la falta de detección conjunta de vector en esa región, dada las condiciones climáticas que le impiden desarrollar su ciclo de vida. Aún más, en cuanto a la distribución general de VLA en Sudamérica como función de la distribución del vector hematófago, existe una restricción geográfica fuerte en la zona norte de Argentina, norte de Chile y sur y centro de Bolivia, esta región se cree que es un núcleo de imposibilidad de hallar vector y/o VLA.

Centrándonos en los resultados obtenidos en los análisis de los segmentos 2 y 6, y tomando en cuenta la pertenencia al topotipo *western* analizada en los segmentos 3, 7 y 10, se observa una fuerte cercanía génica de los aislamientos argentinos y otros de origen africano/europeo. Esto ocurre en primera instancia por el sesgo de información que hay respecto a secuencias sudamericanas y/o del continente entero considerando solo virus de serotipo 4. Este serotipo ha sido aislado en Centroamérica y Caribe aunque no se cuentan con secuencias correspondientes a esos aislamientos. El serotipo 4 ha incursionado en Europa y se han reportado

brotes del mismo en Grecia durante 1999 y 2000. Los virus aislados en esa ocasión resultaron estrechamente relacionados con virus anteriormente aislados en Chipre y Turquía (1969 y 1978)[160]. Así mismo estos aislados tienen gran cercanía genética con la cepa de referencia de posible origen Sudafricano (aunque también se sospecha que su origen sea en realidad Chipre). Otros aislamientos han sido reportados en las cercanías de esta región en Israel en los años 2001, 2002 y 2006, del mismo modo VLA serotipo 4 fue también detectado y aislado en España en los años 2003, 2004 y 2005. Por todo esto, se postula que el virus que originó estos brotes en las cercanías del Mediterráneo, se mantuvo circulando en el norte de África y desde allí eventualmente habría entrado a Europa por dos vías, el área de Marruecos-Túnez o Turquía. Este conocimiento previo nos lleva a la hipótesis que los aislamientos argentinos habrían tenido un origen común con esta cepa primitiva circulante en el norte de África, dado que se vio para el análisis de los segmentos 2 y 6 que las secuencias argentinas muestran estrecha relación con los aislamientos de VLA serotipo 4 antes mencionados, aunque formen el antes descripto cluster sudamericano.

Dada la distribución global y el relevamiento previamente realizado por Lager y col, Argentina es un país considerado como de incursión aleatoria, según los parámetros utilizados y con la información disponible hasta la fecha. Sin embargo, aquí mostramos que las secuencias de aislamientos obtenidos entre 1999 y 2009 son 99% idénticas en su secuencia. Esto indica una fuerte estabilidad genética que sugiere que la putativa cepa inicial, está aún circulando en la región. White y col [161] postulan que este fenómeno de estabilidad génica puede darse por la presencia de animales inmunológicamente *naive* los cuales se infectan cada año por la misma cepa viral y por otros factores no definidos (hospedadores, ambientales, virales) los cuales podrían actuar como herramientas de selección purificadora. Además, fue reportado que el VLA puede persistir en ganado asintomático por años[162].

La distribución y la ruta de introducción propuesta para la enfermedad en el NEA argentino podrían ser explicadas por el movimiento de animales, los factores climáticos preponderantes y la presencia del vector competente. De acuerdo a estudios previos, la especie dominante de *Culicoides* en la región es *C. insignis*, seguido por *C. paraensis* y *C. venezuelensis*[15]. Otros reportes también apuntan a *C. insignis* y *C. pusillus* como los más representativos del género

en las Américas. Sin embargo, no está identificada fehacientemente la/s especie/s que actúan como vector de VLA en la región[15].

Cabe mencionar que, previamente, como parte de un proyecto que se llevó a cabo en el Instituto de Virología, se intentó detectar VLA en *Culicoides Insignis* pero no se lograron resultados positivos, creemos que es un ensayo factible de abordar mediante la optimización de técnicas diagnósticas que permitan ensayos con mayor sensibilidad y especificidad.

La presencia de circulación viral en territorio nacional debe considerarse una preocupación sanitaria importante y merecedora de un programa de vigilancia y control oficial, que permita un análisis más profundo de la situación epidemiológica de la enfermedad en territorio argentino, y que evite nuevos ingresos y la diseminación de la infección existente. Porque aunque no tiene la significancia sanitaria de otras enfermedades como la Fiebre Aftosa, debe considerarse una enfermedad capaz de generar importantes pérdidas económicas.

Si bien nuestro país puede ser considerado "zona de incursión aleatoria" y en la mayor parte del territorio no están dadas las condiciones ecológicas para el establecimiento permanente de los vectores y que su introducción depende de condiciones climáticas especiales (aumentos de temperaturas, vientos, lluvias)[11,22,92,163-166], la presencia confirmada del virus así como la detección de animales seropositivos debe constituir una "alarma sanitaria", porque tal como lo demuestra la epidemia que sufrió Europa, la enfermedad puede ser responsable de importantes pérdidas económicas y significar una interferencia muy importante para el comercio exterior. Aunque las barreras climáticas y geográficas serían una limitante para la actividad viral porque depende esencialmente de la actividad de los vectores, la epidemiología de la enfermedad demuestra que existen condiciones dinámicas cambiantes que pueden permitir el ingreso del virus en nuestro país, y las pruebas obtenidas últimamente son un ejemplo de ello. De hecho, la detección y aislamiento de VLA en nuestro país a lo largo de una década comprendida entre los años 1999 y 2010, son la muestra fundamental que el virus es una amenaza real. Recientemente, en junio de 2013, un brote de VLA ha sido reportado en Rio de Janeiro, Brasil, constituyendo un nuevo indicador irrevocable de la presencia y circulación de VLA en la región[42,43].

Más secuencias regionales son necesarias para caracterizar el virus en Argentina y Sudamérica, para así poder expandir el conocimiento acerca de la circulación de VLA en el subcontinente y enmarcar la situación local en el contexto global. Esta necesidad se extiende, por supuesto, a la necesidad de nuevos datos serológicos logrados en relevamientos planificados o como parte de una red de vigilancia activa para el VLA y también para otros Orbivirus considerados emergentes o exóticos. Como se discutió anteriormente, los datos regionales disponibles son resultantes de relevamientos informales, y más aún, están realizados con técnicas poco precisas o metodologías no validadas. Esto hace aún más escasa la información sobre la enfermedad y/o sobre la circulación viral en nuestro país, la región y el continente. En este contexto y en un enfoque geográfico los datos obtenidos en el Noreste de nuestro país están aislados en cuanto a la imposibilidad de contar con información de las regiones circundantes. Aún así y como resultado de esta falta de información, las secuencias argentinas obtenidas en esta tesis se establecen como únicas referencias sudamericanas de la presencia del virus.

6.2 DESARROLLO DE UNA VACUNA A SUBUNIDAD, DIRECCIONADA A CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENOS, PARA EL VIRUS DE LA LENGUA AZUL

Se introdujo y se discutió acerca de la creciente importancia del VLA a nivel global. Habiendo caracterizado las cepas aisladas, circulantes en el país, para abordar posibles mecanismos de control y prevención es necesario contar con técnicas diagnósticas apropiadas y el desarrollo de vacunas seguras con características DIVA que permita estar preparados frente a la necesidad de vacunación. El desarrollo de un inmunógeno comenzó a desarrollarse en este proyecto de tesis.

Como se mencionó previamente, las vacunas clásicas, inactivadas o atenuadas son las más frecuentemente utilizadas y aplicadas a sistemas de prevención; las mismas son consideradas de bajo costo y fácil producción, pero en realidad traen asociado un considerable riesgo de manejo especialmente con agentes exóticos [63,117-120,122]. En el caso de las vacunas atenuadas, existe la posibilidad que se generen reasociaciones génicas con cepas circulantes de campo generando nuevas subespecies con características biológicas emergentes. Estas vacunas también pueden provocar efectos negativos teratogénicos en animales vacunados. Además, en el caso particular de nuestro país, las autoridades sanitarias no permiten el uso de vacunas atenuadas en el área veterinaria. Por otra parte, las vacunas inactivadas salvan estos peligros mencionados para las vacunas atenuadas, pero se necesitan mayores dosis para lograr una inmunogenicidad apropiada. Adicionalmente ninguno de los anteriores tipos de vacunas pueden ser utilizados para diferenciar animales vacunados de naturalmente infectados. Por todo esto, una gran alternativa son las vacunas a subunidad. Éstas salvan todos los riesgos anteriores siendo la posibilidad más prometedora de desarrollo[118,119]. Así mismo, la carencia de vacunas para el VLA de fabricación nacional y las condiciones de bioseguridad requeridas para producir las vacunas convencionales, incrementa las posibilidades de adopción de desarrollos biotecnológicos por parte de la industria.

La proteína VP2 del VLA ha sido caracterizada en varias oportunidades como la responsable de gran parte de la respuesta inmune al patógeno. VP2 es la proteína inmunodeterminante e inmunorrelevante dada su posición en el virión y su acción biológica asociada, en otras palabras, VP2 es el principal determinante de especificidad serotípica y es el

principal antígeno blanco para anticuerpos neutralizantes. Es de esperar que una vacuna pensada en torno a esta proteína sea efectiva. Por otro lado, la respuesta inmune asociada a una infección por el VLA, ha sido reportada no solo como respuesta humoral. Si bien niveles óptimos de anticuerpos neutralizantes son suficientes para generar protección frente a la infección, existen reportes en los cuales se describe protección en ausencia de anticuerpos neutralizantes, haciendo referencia a otros mecanismos de respuesta inmune celular como responsables de la protección observada [167-170]. Por esto, en adición a lo mencionado para la proteína VP2 y sus características inmunorelevantes, una vacuna a subunidad que unifique estas dos características es de particular interés.

El sistema de baculovirus ha sido ampliamente utilizado para expresar proteínas heterólogas provenientes ya sea de organismos eucariotas, procariotas y virus [129]. Las proteínas expresadas en el sistema baculoviral pueden alcanzar hasta la mitad de la proteína total de la célula de insecto, siendo una herramienta atractiva desde el punto de vista de la expresión masiva de proteínas. Los baculovirus poseen baja citotoxicidad en las células de mamífero (in vitro), incapacidad inherente de replicar en las mismas y ausencia de anticuerpos preexistentes en los animales, estas características los han convertido en candidatos para desarrollar vacunas contra distintos agentes. Del mismo modo, el potencial efecto adyuvante de los estos ha cobrado importancia en los últimos años [171-173].

En este trabajo de tesis, a partir de uno de los aislamientos (4/ARG/829/2001, accesion number JX024950.1) se obtuvo la secuencia para el marco de lectura abierto contenido en el Segmento 2, codificante para la proteína viral VP2. El mismo se pudo clonar en un vector para el sistema Bac to Bac, para luego generar partículas baculovirales recombinantes, expresando las dos proteínas a evaluar como inmunógenos experimentales: VP2 sola y APCH-VP2.

Dada la alta variabilidad existente entre secuencias del Seg2 de serotipos diferentes y aún dentro del mismo serotipo, se plantea el interrogante de la validez de una vacuna basada en una secuencia de un aislamiento en particular, más aún cuando esta secuencia y aislamiento muestra una evolución dentro de un linaje fuerte, como es el caso de las secuencias sudamericanas de VLA4 presentadas en este mismo trabajo de tesis. Se mencionó en el análisis filogenético del Seg2, que las secuencias argentinas agrupaban dentro de un cluster fuertemente soportado mostrando

una evolución regional independiente dentro del contexto global, pues bien, para analizar *a priori* este caso, se efectuaron comparaciones de secuencias aminoacídicas por grupos para contrastar las identidades compartidas entre todas las secuencias disponibles del Seg2 para el serotipo 4. Este análisis demostró que todas las secuencias comparten un nivel global de similitud que va de 91% a 100% y que las zonas de mayor variabilidad responden a una variabilidad conjunta, aunque de distinta intensidad. Los perfiles vistos en las curvas de cada una de las comparaciones mantienen un patrón similar y sugirieron una variación conjunta o basada en mutaciones fijadas y deriva génica y no producto de eventos de recombinación. A esto se suma la tendencia de mayor similitud entre el grupo de secuencias argentinas y el grupo de secuencias de todo el mundo que respecto al grupo conteniendo la secuencia de la cepa vacunal referencia para VLA4. Demaula y col. y Caporale y col. han reportado previamente regiones dentro del Seg2 donde se hallaron epítopes neutralizantes. DeMaula y col[67] reportaron estas regiones en las posiciones aminoacídicas 199-213 y 321-346 y Caporale y col[68] entre las posiciones 317-395. En las curvas generadas por el software SimPlot se ve una alta similitud entre los tres grupos para estas posiciones, lo cual indicaría que, a grandes rasgos, los epítopes putativos se mantendrían dentro del espectro de secuencias conocidas para el Seg2 de VLA4, esto es una primera aproximación analítica basada en las curvas de similitud obtenidas. De este mismo análisis se desprende la cualidad de mayor similitud entre todas las secuencias disponibles entre sí, más que con la cepa vacunal, esto daría una mayor confianza en una nueva vacuna basada en aislamientos con estas características génicas frente a la cepa vacunal clásica dado que sería en base a secuencias más representativas de la situación actual del serotipo 4 circulante no solo a nivel local, sino posiblemente a nivel regional y más aun, a nivel global.

La expresión de proteínas recombinantes por medio de los baculovirus generados, se evaluó para lograr niveles óptimos de producción, procurando obtener antígeno suficiente para el trabajo sobre animales. Así es que se evaluaron distintas condiciones de cultivo celular, distintas multiplicidades de infección, distintos tiempos de cosecha y distintos volúmenes de cultivo para obtener el más óptimo rendimiento para producción de antígeno. Con el mismo fin, las proteínas expresadas se caracterizaron antigénicamente por detección de las mismas con anticuerpos específicos para la construcción realizada y sueros policlonales de animales naturalmente infectados.

En este trabajo de tesis, se logró la expresión de las dos proteínas recombinantes planteadas, utilizando como plataforma de expresión el sistema baculovirus. Lo ensayos de inmunogenicidad mostraron que ambas vacunas experimentales fueron capaces de inducir anticuerpos neutralizantes (ANs) en cobayos y bovinos. Está reportado que los ANs juegan un rol preponderante en el desarrollo de protección frente a la infección viral.

Tanto en las pruebas de cobayos como en las de bovinos se vio que niveles comparables de ANs fueron alcanzados por masas muy distintas de antígeno, siendo la masa de APCH-VP2, 4 veces menor que las dosis de antígeno de VP2. Esta relación de masas de antígeno se mantuvo en todas las dosis de inmunización, demostrando la capacidad de la molécula APCH de potenciar la respuesta de ANs. Dicha capacidad se había puesto a prueba anteriormente en otros sistemas y para otros patógenos. Gil y col.[147] demostraron un aumento de la respuesta inmune para ratones vacunados con APCH-2L21 (péptido derivado de parvovirus canino) respecto a los vacunados con 2L21 (solo o asociados a moléculas *carriers* no relacionadas). Dichos resultados se repitieron para pruebas utilizando como antígeno la proteína VP60 de RHBV (virus de la enfermedad hemorrágica de conejo) en conejos, su hospedador natural. Adicionalmente, resultados previos de nuestro grupo demostraron que esta misma estrategia es exitosa para vacunas desarrolladas en plantas, como sistema de expresión, utilizando la proteína E2t (truncada) del virus de la diarrea viral bovina (BVDV)[174]. En dichos ensayos, la proteína producida con alfalfa (*Medigago sativa, L.*) fue efectiva como vacuna generando altos títulos de AN en cobayos y bovinos (siendo este último, el huésped natural del virus), con respuestas comparables a las obtenidas con virus inactivado aún para masas de APCH-E2t de 0.04 μg (cobayos) y 3 μg (bovinos). Del mismo modo que ocurría para el trabajo realizado por Gil y col.[147] en este trabajo con E2t producida en alfalfa, se alcanzaron niveles de AN comparables con los alcanzados en animales inmunizados con masas hasta 5 mayores de la proteína E2t (sin APCH). En este trabajo, se alcanzaron considerables niveles de AN tanto para el modelo animal planteado (cobayo) como para el hospedante natural (bovino). Es importante notar las masas mínimas ensayadas capaces de generar respuesta inmune para cada modelo. En cobayos, se reporta una masa mínima de VP2 de 0.6 μg y 0.15 μg para APCH-VP2. Para el caso del hospedante natural (bovinos) se reportaron masas de 3.6 μg para VP2 y 0.9 μg para APCH-VP2. En cada uno de los animales ensayados no se observaron diferencias significativas dentro y entre las dosis, y dentro y entre las moléculas utilizadas para inmunizar. Esto hace que la respuesta elicitada

por 0.15 μg de APCH-VP2 sea comparable con la producida por 2.4 μg de VP2. Estos ensayos constituyen otra prueba de la efectividad de la molécula direccionadora a células presentadoras de antígeno (APCH) como estimuladora de la respuesta humoral al momento de ser utilizadas como agentes vacunales en compañía de un antígeno, en este caso, viral. Este ensayo con constituye una aproximación a una curva "dosis respuesta"; por lo cual, un experimento de este tipo, ampliando el rango de masas antigénicas a evaluar, debería ser llevado a cabo para determinar la masa mínima de cada vacuna experimental capaz de evocar la repuesta de ANs deseada y para así, comprar mejor los inmunógenos ensayados . Sin embargo, se destaca nuevamente que una dosis 4 veces menor de APCH-VP2 induce niveles similares de ANs que los generados por VP2 sola. En este grupo de ensayos se planteó que dado que la dosis mínima de cobayo fue suficiente para inducir altos títulos de ANs, esta fue la base para los ensayos en bovinos. De acuerdo a experiencias del grupo, cuando el cobayo es empleado como modelo para evaluar potencia de vacunas (particularmente para virus del Complejo Respiratorio Bovino y Rotavirus), la dosis empleada en el bovino es 5 veces la del cobayo. Tomando todo esto en consideración, se eligió una dosis 6 veces mayor a la de cobayos para la prueba en bovinos.

En bibliografía de años atrás, se postulaba que la inmunogenicidad de VP2 se veía aumentada cuando se inmunizaba en expresión conjunta con VP5, dado que VP5 podría influenciar la conformación terciaria de VP2 y así tendría más representatividad en cuando a los antígenos conformacionales que caracterizan al VLA en infecciones naturales. Esto, en los últimos años se ha visto cuestionado dado que ensayos recientes[175] han demostrado que iguales o mayores grados de protección son alcanzados para vacunas basadas solo en VP2 en comparación contra la vacuna que combina VP2 y VP5 y más aún contra vacunas basadas en otras partículas virales (VP7, NS1, NS2).

A su vez, también se destacan dos propiedades de las vacunas experimentales ensayadas en la tesis, la primera es la seguridad/inocuidad de las vacunas presentada, dado que después de cada vacunación, ningún animal inmunizado mostró reacciones locales o efectos adversos. El segundo factor importante es la capacidad DIVA de estas vacunas, dado que en el ensayo realizado en bovinos, ningún animal vacunado con proteína producida en baculovirus fue detectada por el kit ELISA de competición (de disponibilidad comercial - VMRD) el cual detecta la proteína viral VP7,

por lo cual se enmarcan dentro de la definición de una vacuna DIVA es decir, con la capacidad de diferenciar animales vacunados de animales naturalmente infectados por el VLA. Se ha remarcado este concepto como de importancia mayor en situaciones de brotes dónde es necesario realizar una discriminación epidemiológica de los animales incluidos dentro de un área afectada.

Dentro del contexto del ensayo de bovinos, se propuso caracterizar la respuesta inmune en dos etapas más, primeramente buscó analizar el perfil de inmunoglobulinas G resultado de la inmunización con cada vacuna y luego se buscó analizar la presencia de células T de memoria mediante un ensayo de linfoproliferación. Para el primer caso, la caracterización del perfil de inmunoglobulinas no arrojó diferencias significativas entre los grupos, dentro de cada determinación, es decir, para la determinación de IgG1 no hubo diferencias significativas entre las dos vacunas experimentales y la vacuna inactivada, pero sí entre cada una de ellas y el control negativo del ensayo (animales sin inmunizar). El mismo patrón se observó para la determinación de IgG2. Cuando se analizó la relación entre títulos de IgG1/IgG2 se evidenció que existe una similitud de resultados para los bovinos vacunados con VP2 y la vacuna inactivada (aproximadamente una relación 0,8), pero se observó en el grupo de los bovinos vacunados con APCH-VP2 que dicha relación se invirtió, presentando un valor aproximado de 1,4.

En cuanto a el rol de cada uno de los isotipos de inmunoglobulinas G ensayados, se sabe que sólo IgG1 es capaz de enlazarse a un receptor (FcR) presente en el epitelio secretor de la glándula mamaria bovina que capta selectivamente la IgG1 sérica y la concentra en el momento de producción de calostro, por esto en los rumiantes la principal inmunoglobulina secretora en el calostro y en la leche es entonces IgG1, debido a dicha transferencia selectiva desde la circulación hacia la glándula mamaria[176]. Respecto a los resultados obtenidos en este trabajo, la misma tendencia se observó para la antes mencionada prueba de la vacuna APCH-E2t (proteína de la envoltura del virus de la diarrea viral bovina - BVDV - datos no publicados aún, parte de la tesis doctoral de la Vet. Maria Sol Perez Aguirreburualde). Como se dijo, en dicho ensayo la tendencia de la relación IgG1/IgG2 fue la misma indicando que el direccionamiento mediante la molecula APCH podría estar relacionado con este cambio de perfiles de subtipos de IgG en la respuesta inmune frente al perfil obtenido con VP2 sola. Estudios previos para la caracterización de la respuesta de vacunas basadas en APCH y en moléculas direccionadas a MHC clase II en ratón,

mostraron también una tendencia a la mayor producción de IgG1 frente a IgG2[147]. Es importante destacar que para VLA se ha detectado un grado importante de infección transplacental en hembras infectadas (ovinos y bovinos)[84,168,177,178] así como también, infección por consumo de calostro por parte de las crías. Por otro lado, varios estudios han demoestrado que la vacunación pasiva o alimentación con calostro conteniendo ANs podrían conferir protección a los animales frente a posibles infecciones[169]. Entonces en este contexto, una putativa vacuna que confiera la capacidad de incrementar la producción de ANs específicos de isotipos IgG1, los cuales serían concentrados en calostro sería de particular interés en condiciones de campo donde múltiples variables pueden afectar este proceso. Futuros experimentos deberán ser llevados a cabo para cotejar esta hipótesis.

En cuanto a los mecanismos que median la protección contra VLA, se sabe que además de la respuesta humoral, el factor celular emerge como otro actor clave en la inmunidad asociada a la infección/enfermedad, de hecho se postula que la inmunidad mediada por células (IMC) sería un factor clave en etapas tempranas de la infección reduciendo la propagación del virus, aunque sin eliminarlo completamente [179]. Las vacunas suelen estar diseñadas en torno a las moléculas virales dominantes en cuanto a la inmunidad humoral, aunque recientemente, nuevos estudios sobre inmunidad celular acompañan los desarrollos y pruebas de vacunas experimentales. En bibliografía, hasta la fecha se han caracterizado a las proteínas virales VP2, NS1 y NS2 como las mayores estimulantes de la inmunidad mediada por células, aunque NS1 y NS2 no son las inmunodominantes en cuanto a la respuesta humoral. En este trabajo de tesis se realizó un ensayo de linfoproliferación dependiente de antígeno en el cual se observó un considerable índice de proliferación específica en los bovinos vacunados con VP2. Se destaca la no proliferación *in vitro* de los linfocitos obtenidos de animales vacunados con APCH-VP2 tal vez debida a la baja masa con la que se inmunizó a los animales. En cuanto al resultado de los controles, los animales sin inmunizar (el control negativo) muestran valores ligeramente por debajo de cero, esto puede ocurrir por el tratamiento de datos, en el cual al porcentaje de proliferación frente a la estimulación (en este caso, VLA4 inactivado por UV) se le resta el porcentaje de proliferación inespecífico (*mock*) el cual en este caso, resultó ser ligeramente mayor. Esto podría deberse a que el "*mock*" (sobrenadante de células BHK21 sin infectar inactivado por UV) estaría presente en la vacuna contra Virus de la Fiebre Aftosa con la cual se vacuna a los animales del campo

experimental de INTA. Los valores del control negativo fueron comparables tanto a los valores de no proliferación de la vacuna APCH-VP2 y del control positivo, es decir, animales vacunados con VLA4 inactivado por BEI. Resultados similares en cuanto a la no proliferación de linfocitos provenientes de animales vacunados con VLA inactivado, fueron vistos por Top y col[175] en cuyo ensayo en ovinos no vieron proliferación específica significativa en ovejas vacunadas con VLA, también inactivado por BEI. Por otro lado, Anderson y col [130] no vieron proliferación específica al utilizar VP2 y NS2 como vacuna y posterior estimulo *in* vitro en bovinos, pero si para NS1 aunque los valores que reportan son bajos. Entonces, linfoproliferación específica dependiente de antígeno confirma la inmunogenicidad de la vacuna recombinante en términos de inmunidad celular. Sin embargo, otros antígenos deben evaluarse como estímulos para confirmar si los inmunógenos son capaces de generar IMC.

En el caso del VLA se conoce que el actor fundamental en cuanto a la protección frente a infecciones es la respuesta humoral, aún no está en claro el mecanismo por el cual la respuesta celular actúa aunque se sabe que lo hace, de hecho desde hace décadas se conoce que el nivel de AN no correlaciona del todo con el nivel de protección sin embargo, el rol de los linfocitos T en la protección contra la LA es aún controversial, el mayor ejemplo está dado por los ensayos dónde VLA inactivado es capaz de proteger totalmente al animal aunque no sea detectable una proliferación in vitro[175 180 179].

En esta sección del trabajo de tesis se verificó la factibilidad de un desarrollo de una vacuna a subunidad direccionada a células presentadoras de antígeno para el virus de la lengua azul. Para el desarrollo experimental, se determinaron las condiciones óptimas de expresión y se realizaron pruebas de inmunogenicidad en cobayos y uno de los hospedadores naturales (bovinos) siendo este último, de particular importancia dado que es un hospedador que no suele mostrar signos clínicos de infección, por lo cual se lo considera un importante reservorio del virus. Para caracterizar en un primer nivel, la respuesta inmune producida por la vacuna, se realizaron ensayos de análisis de isotipos de IgG y ensayos de inmunología asociada a la respuesta celular.

Todos estos resultados informados y discutidos constituyen un aporte original al estudio de las vacunas a subunidad contra VLA en cuanto a la estrategia utilizada (direccionamiento a CPA) y los ensayos realizados. Esto es también un antecedente para futuros desarrollos de vacunas

recombinantes para el VLA. Los resultados preliminares presentados en este trabajo de tesis deberán confirmarse con ensayos de protección en modelos experimentales o en el hospedador natural y con análisis más profundos de la respuesta inmune inducida, particularmente la respuesta inmune celular. De lograrse los resultados esperados, se podrá contar con una vacuna a subunidad para el VLA de eficacia comprobada que podría ser adoptada por la autoridad sanitaria y/o la industria cuando la vacunación frente al VLA se convierta en una necesidad para el país.

7. CONCLUSIONES FINALES

- Se logró aislar VLA en dos oportunidades a partir de muestras de sangre de animales naturalmente infectados.
- Fue posible secuenciar el marco de lectura abierto de 5 segmentos del genoma de VLA.
- Se realizó la primera caracterización genética de los aislamientos de campo argentinos de VLA.
- Los estudios filogenéticos permitieron caracterizar dichos aislamientos en cuanto a su origen y características genético-inmunológicas.
- Se generaron dos inmunógenos experimentales basados en la expresión de la proteína VP2 en el sistema de baculovirus recombinante
- Los inmunógenos desarrollados fueron capaces de inducir respuesta de anticuerpos y respuesta celular en bovinos y cobayos. Del mismo modo, la adición de la molécula APCH permitió disminuir al menos 4 veces la masa de antígeno en la formulación vacunal

Lic. Danilo M Legisa

Tesista doctoral.

Dra. Maria Jose Dus Santos

Directora de tesis.

8. ANEXO

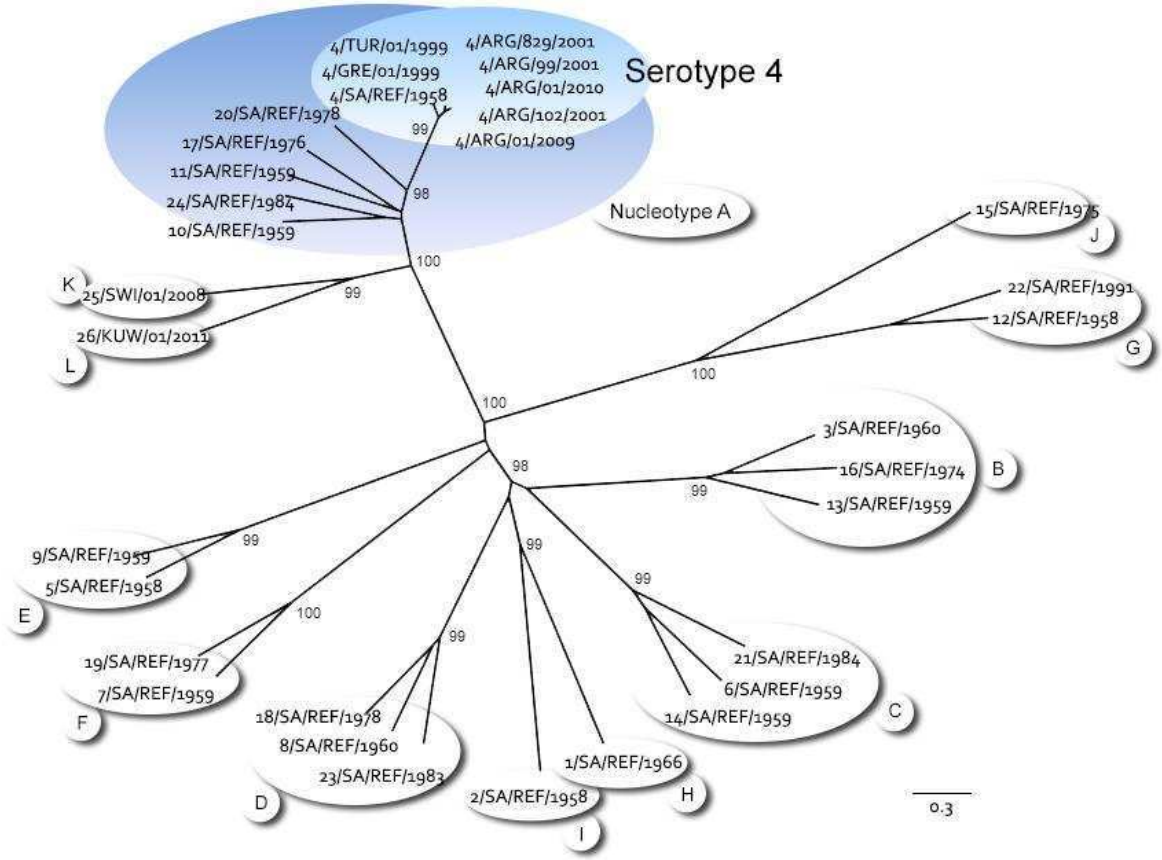

Figura A.1: Árbol filogenético reconstruido por Neighbor-joining mostrando relaciones genéticas entre diferentes secuencias del Seg2 de VLA (cepas referencia y aislamientos de campo) de todo el mundo. El análisis filogenético fue llevado a cabo con el software MEGA5. Los valores de bootstrap (1000 réplicas) son mostrados en los nodos informativos mejor soportados.

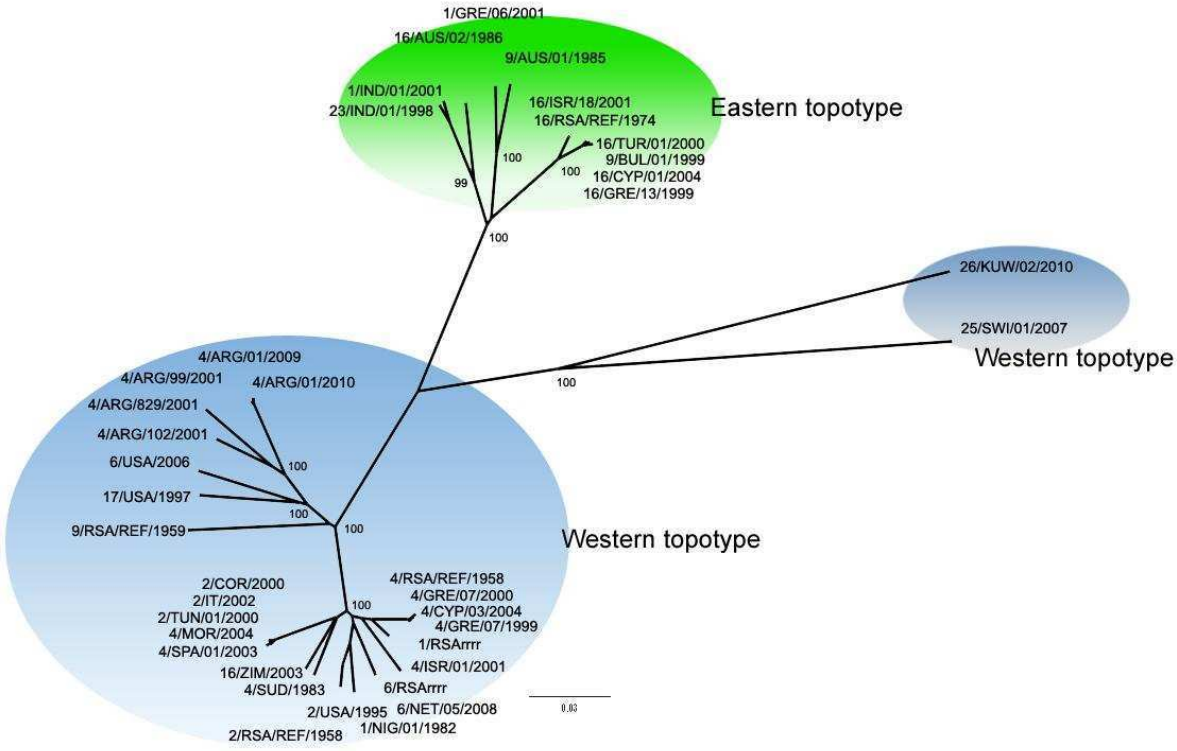

Figura A2: Árbol filogenético reconstruido por Neighbor-joining mostrando relaciones genéticas entre diferentes secuencias del Seg3 de VLA (cepas referencia y aislamientos de campo) de todo el mundo. El análisis filogenético fue llevado a cabo con el software MEGA5. Los valores de bootstrap (1000 réplicas) son mostrados en los nodos informativos mejor soportados.

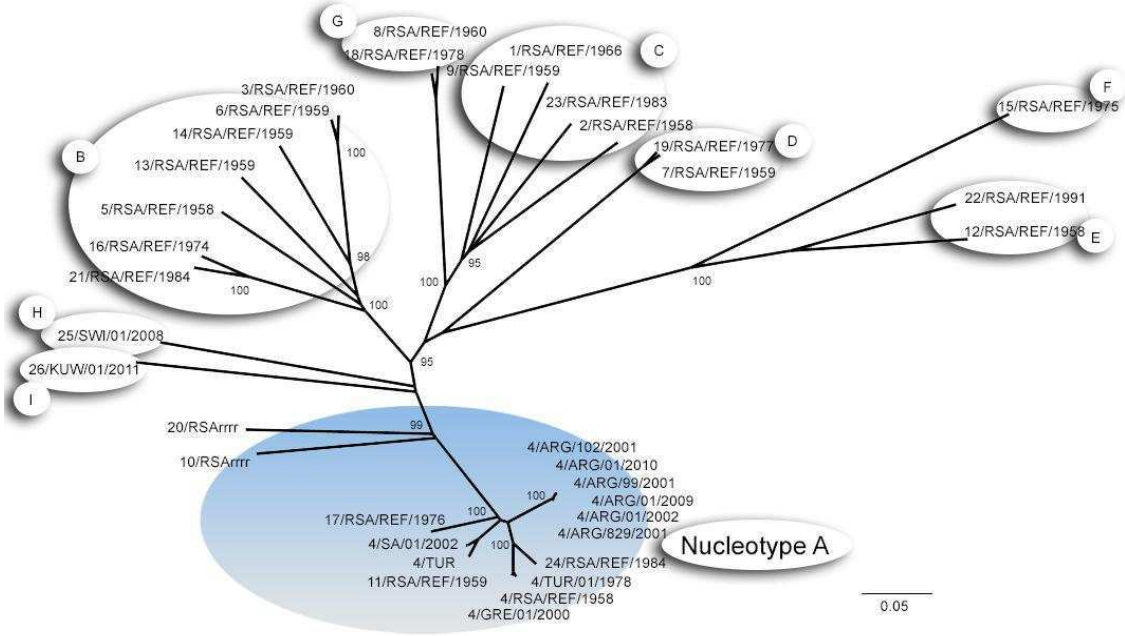

Figura A.3: Árbol filogenético reconstruido por Neighbor-joining mostrando relaciones genéticas entre diferentes secuencias del Seg6 de VLA (cepas referencia y aislamientos de campo) de todo el mundo. El análisis filogenético fue llevado a cabo con el software MEGA5. Los valores de bootstrap (1000 réplicas) son mostrados en los nodos informativos mejor soportados.

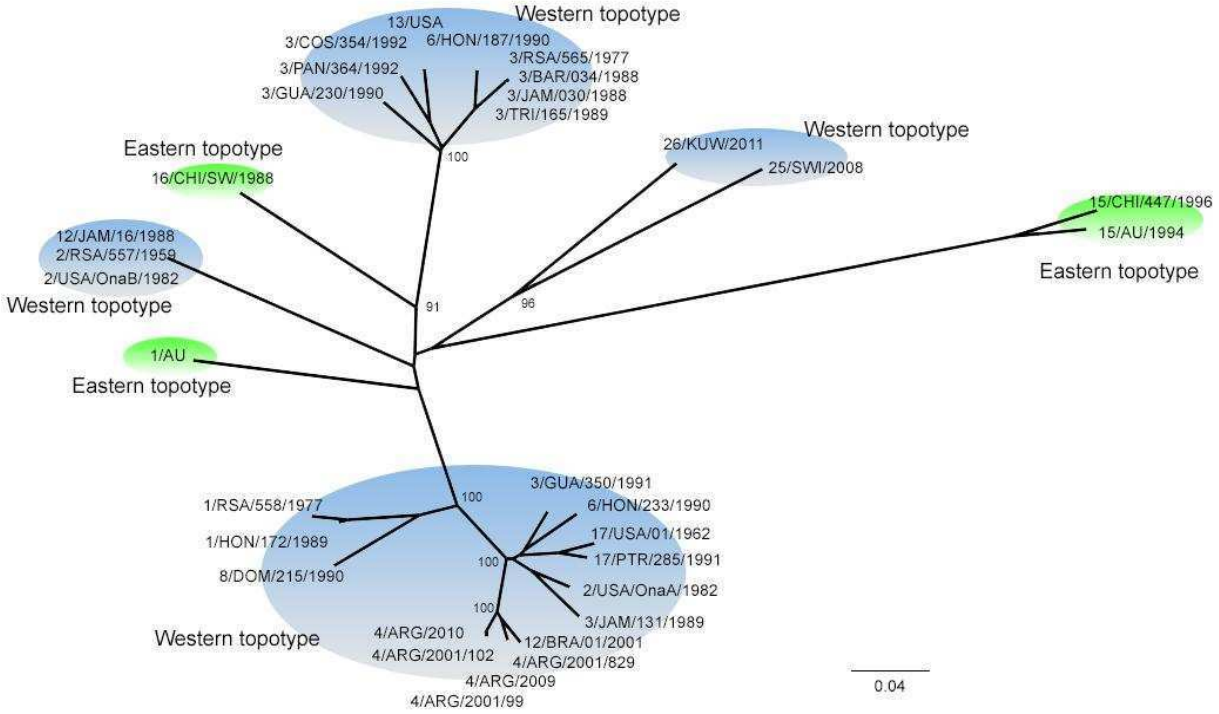

Figura A.4: Árbol filogenético reconstruido por Neighbor-joining mostrando relaciones genéticas entre diferentes secuencias del Seg7 de VLA (cepas referencia y aislamientos de campo) de todo el mundo. El análisis filogenético fue llevado a cabo con el software MEGA5. Los valores de bootstrap (1000 réplicas) son mostrados en los nodos informativos mejor soportados.

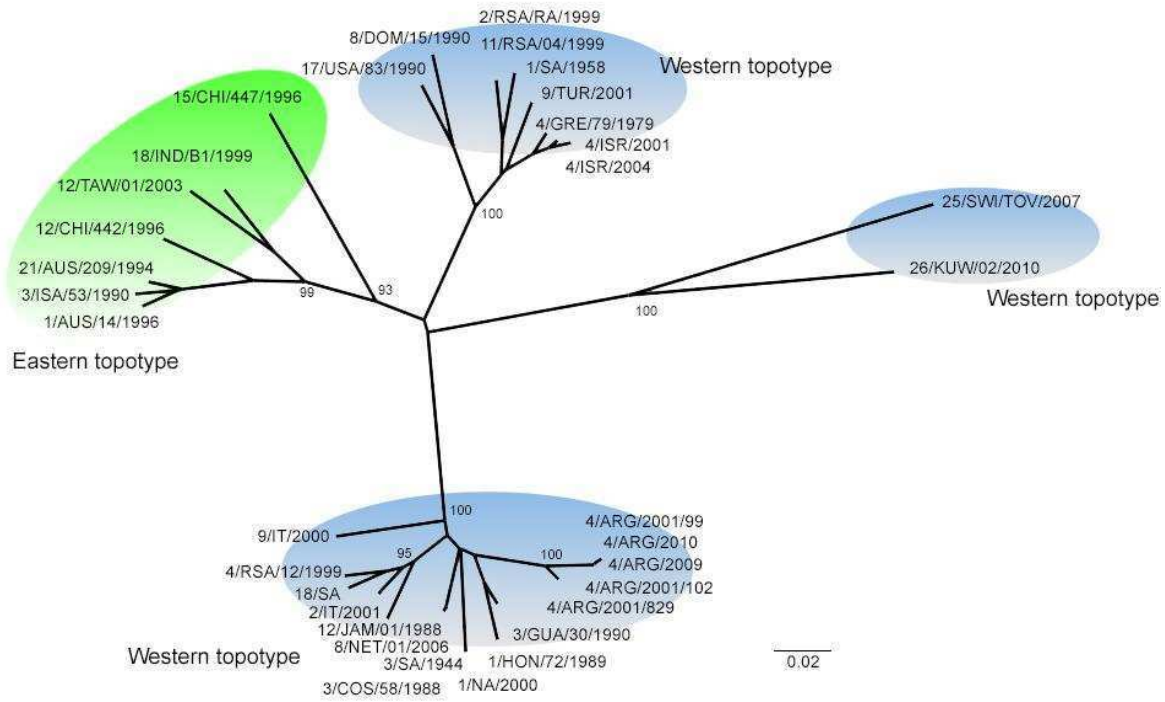

Figura A.5: Árbol filogenético reconstruido por Neighbor-joining mostrando relaciones genéticas entre diferentes secuencias del Seg10 de VLA (cepas referencia y aislamientos de campo) de todo el mundo. El análisis filogenético fue llevado a cabo con el software MEGA5. Los valores de bootstrap (1000 réplicas) son mostrados en los nodos informativos mejor soportados.

Nombre	Orientación	Segmento	Secuencia 5´-3´	Posición*
BTV/Seg2/01	Sentido	Seg2	AGAGTGTCCCACAATGGAGGAGT	7-29
BTV/Seg2/02	Antisentido	Seg2	CACTTAAGTACGTAAATACGGCTG	1770-1793
BTV/Seg2/03	Sentido	Seg2	TGGGATCAGGAGCGGTTTAAACT	1439-1461
BTV/Seg2/04	Antisentido	Seg2	TGTAAGAGGCCACAGGTCCGTG	2900-2921
BTV/Seg6/01	Sentido	Seg6	AAGTATTCTCCTACTCGC	7-24
BTV/Seg6/02	Antisentido	Seg6	TTGAACCTCATCATCAC	1077-1093
BTV/Seg6/03	Antisentido	Seg6	GTAAGTGTAAGCTTCTCC	1621-1638
BTV/Seg6/04	Sentido	Seg6	CAGAGAGAAGTCAAGATG	571-588
BTV/Seg10/01	Sentido	Seg10	AAAAGTGTCGCTGCCATGCTAT	5-26
BTV/Seg10/02	Antisentido	Seg10	GTGTGTAGCGCCGCGTACCCTC	797-818
BTV/Seg7/01	Sentido	Seg7	ATCTATAGAGATGGACACTATCG	8-31
BTV/Seg7/02	Antisentido	Seg7	AGTGTAATCTAAGAGACGTT	1135-1154
BTV/Seg3/01	Sentido	Seg3	GTTAAATTTCCGTAGCC	1-17
BTV/Seg3/02	Antisentido	Seg3	GCAACGAAAACACGGAGTGTAA	1629-1650
BTV/Seg3/03	Sentido	Seg3	ATGGCGAGACAGCTTGATATA	1197-1217
BTV/Seg3/04	Antisentido	Seg3	GTGTGTTTCCGCTGCCGCTAC	2748-2768

Tabla A1: Detalle de primers utilizados para obtener los segmentos para secuenciar. El diseño se realizó mediante el análisis de alineamiento de secuencias disponible en la base de datos GeneBank (NCBI). Para los segmentos más variables (Seg2 y Seg6) se alinearon particularmente secuencias correspondientes al serotipo 4 y al nucleotipo correspondiente, para los segmentos más conservados (Seg3, 7 y 10) se alinearon secuencias generales y se buscaron zonas conservadas. En general, se buscó amplificar por RT-PCR fragmentos de un promedio de 1,5 Kb Entonces se diseñaron primers de modo que los fragmentos obtenidos se solapen y cubran el segmento deseado.

(*) las posiciones son relativas a secuencias referencia: AJ585125(Seg2), DQ186795 (Seg3), AJ586682 (Seg 6), AY263377 (Seg7), AY426600 (Seg10).

Nombre de primer	Orientación	Inserto que clona	Secuencia 5´- 3´
L2 FW-SalI-ATG	sentido	Seg 2	GTCGAC**ATG**GAGGAGTTTGTCA
L2 Rv-His-NotI	antisentido	Seg 2	CGAAATTACTCAACGTTCATCACCATCACCATCAC**TAG**GCGGCCGC
APCH-EcoRI FW	sentido	APCH	GAATTC**ATG**GACTTCGGGTTGA
APCH Rv-SalI	antisentido	APCH	TCCGGTGGCGCTCTCGAGGTCGAC

Tabla A2: Detalle de primers utilizados para clonar el marco de lectura abierto codificante para VP2 de VLA.

9. BIBLIOGRAFÍA

1 Mertens, P., Baylis, M. & Mellor, P. S. *Bluetongue*. 1 edn, Vol. 1 (Elsevier, 2009).

2 Coetzee, P., Stokstad, M., Venter, E. H., Myrmel, M. & Van Vuuren, M. Bluetongue: a historical and epidemiological perspective with the emphasis on South Africa. *Virology journal* **9**, 198, doi:10.1186/1743-422X-9-198 (2012).

3 Gorchs, C. & Lager, I. Lengua Azul Actualización sobre el Agente y la Enfermedad. *Rev Argent Microbiol.* **33** (2001).

4 Clavijo, A. *et al.* Isolation of bluetongue virus serotype 12 from an outbreak of the disease in South America. *The Veterinary record* **151** (2012).

5 Lager, I. *et al.* Incidence and isolation of bluetongue virus infection in cattle of the Santo Tomé Department, Corrientes Province, Argentina. *Veterinaria Italiana* **40** (2004).

6 Zientara, S. & Sanchez-Vizcaino, J. M. Control of bluetongue in Europe. *Veterinary microbiology* **165**, 33-37, doi:10.1016/j.vetmic.2013.01.010 (2013).

7 Rao, P. P., Hedge, N. R. & Reddy, Y. K. Intercontinnental movement of bluetongue virus potential consequences to trade. *Journal of Virology* **86**, doi:10.1128/JVI.01024-12

10.1128/JVI.00968-12 (2012).

8 van Rijn, P. A., Heutink, R. G., Boonstra, J., Kramps, H. A. & van Gennip, R. G. Sustained high-throughput polymerase chain reaction diagnostics during the European epidemic of Bluetongue virus serotype 8. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* **24**, 469-478, doi:10.1177/1040638712440986 (2012).

9 van Rijn, P. A., Geurts, Y., van der Spek, A. N., Veldman, D. & van Gennip, R. G. Bluetongue virus serotype 6 in Europe in 2008-Emergence and disappearance of an unexpected non-virulent BTV. *Veterinary microbiology* **158**, 23-32, doi:10.1016/j.vetmic.2012.01.022 (2012).

10 Sperlova, A. & Zendulkova, D. Bluetongue: a review. *veterinaria medicina* (2011).

11 Wittmann, E. J. & Baylis, M. Climate change: effects on culicoides--transmitted viruses and implications for the UK. *Veterinary journal* **160**, 107-117, doi:10.1053/tvjl.2000.0470 (2000).

12 Wilson, A. & Mellor, P. Bluetongue in Europe: vectors, epidemiology and climate change. *Parasitology research* **103 Suppl 1**, S69-77, doi:10.1007/s00436-008-1053-x (2008).

13 Maan, S., Maan, N., mertens, P., Nomikou, K. & Belaganahalli, M. N. Reply to "Intercontinental Movement of Bluetongue Virus and Potential Consequences to Trade". *Journal of Virology* **86**, doi:10.1128/JVI.00968-12

10.1128/JVI.01024-12 (2012).

14 Purse, B. V. *et al.* Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. *Nature Reviews* (2006).

15 Ronderos, M. M., Spinelli, G. R., Lager, I. & Diaz, F. La importania sanitaria de los jejenes del genero Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) en la Argentina. *Entomolologia y Vectores* **10** (2003).

16 Puntel, M. *et al.* serological survey of viral antibodies in llamas (llama glama) in Argentina. *j. Vet. Med* **46** (1998).
17 Marcoppido, G., Parreno, V. & Vila, B. Antibodies to pathogenic livestock viruses in a wild vicuna (Vicugna vicugna) population in the Argentinean Andean altiplano. *J Wildl Dis* **46**, 608-614 (2010).
18 OIE. (26 – 29 de enero de 2009, 2008).
19 Saegerman, C., Berkvens, D. & Mellor, P. S. Bluetongue Epidemiology in the European Union. *Emerging infectious diseases* **14** (2008).
20 Boyle, D. B. *et al.* Genomic sequences of Australian bluetongue virus prototype serotypes reveal global relationships and possible routes of entry into Australia. *J Virol* **86**, 6724-6731, doi:10.1128/JVI.00182-12 (2012).
21 Legisa, D., Gonzalez, F., De Stefano, G., Pereda, A. & Dus Santos, M. J. Phylogenetic analysis of bluetongue virus serotype 4 field isolates from Argentina. *The Journal of general virology* **94**, 652-662, doi:10.1099/vir.0.046896-0 (2013).
22 Lager, I. A. Bluetongue virus in South America: overview of viruses, vectors, surveillance and unique features. *Vet Ital* **40**, 89-93 (2004).
23 Greiner, E. C. *et al.* Epidemiology of bluetongue in Central America and the Caribbean: initial entomological findings. *Medical Veterinary Entomology* **7**, 309-315 (1993).
24 Gibbs, E. P. J. *et al.* epidemiology of bluetongue viruses in the american tropics. *Trop. Vet. Med.* (1992).
25 Homan, E. J. *et al.* in *Bluetongue, African Horsesicknes and related Orbiviruses, Procedings of the second international symposium.*
26 Homan, E. J. *et al.* Epidemiologic study of bluetongue viruses in Central America and the Caribbean: 1986-1988. Regional Bluetongue Team. *Am J Vet Res* **51** (1990).
27 Greiner, E. C. *et al.* Bluetongue epidemiology in the Caribbean region: serological and entomological evidence from a pilot study in Barbados. *Medical and veterinary entomology* **4** (1990).
28 Greiner, E. C. *et al.* Bluetongue epidemiology in the Caribbean region:

serological and entomological findings from a pilot sentinel system in Trinidad and Tobago. *Medical and veterinary entomology* **3**, 101-105 (1989).
29 Lopez, W. A., Nicoletti, P. & Gibbs, E. P. J. Antibody to bluetongue virus in cattle in Ecuador. *Trop. Anim. Hilth, Prod.* **17** (1985).
30 Gumm, I. D. *et al.* Serological survey of ruminants in some Caribbean and South American countries for type-specific antibody to bluetongue and epizootic haemorrhagic disease viruses. *The Veterinary record* **114** (1984).
31 Gibbs, E. P. J., Greiner, E. C., Alexander, F. C. M., King, T. H. & Roach, J. Serological survey of ruminant livestock in some countries of the Caribbean region and South America for antibody to bluetongue virus. *The Veterinary record* **113** (1983).
32 Thompson, L. H., Mo, C. L., Oviedo, M. T., Homan, E. J. & team, I. b. in *Bluetongue, African Horsesickness and related Orbiviruses.*
33 Homan, E. J., Lorbacher de Ruiz, H., donato, A. P., taylor, W. P. & Yuill, T. M. A preliminary survey of the epidemiology of bluetongue in Costa Rica and Northern Colombia. *J. Hyg., Camb.* (1985).

34 Homan, E. J., Taylor, W. P., RUIZ, L. D. & Yuill, T. M. Bluetongue virus epizootic haemorrhagic disease of deer virus serotypes in northern Colombian cattle. *J Hyg. Camb* **95** (1985).
35 Homan, E. J., Lorbacher, H., Donato, A., Taylor, W. & Yuill, T. M. Bluetongue virus infection in Costa Rican and Colombian cattle. *Progress in clinical and biological research* **178**, 559-561 (1985).
36 Gonzalez, M. C. & Perez, N. Induced Bluetongue virus seroconversion in cattle from the state of Aragua, Venezuela. *rev. Fac. Cs. Vet. UCV* **42** (2001).
37 Perez Barrientos, M., de Siger, J., Avila, J. P., Roman, R. & Infante, G. Prevalencia de anticuerpos al virus de la lengua azulen rebaños bovinos del municipio La Cañada de Urdaneta del estado Zulia, Venezuela. *Revista Cientifica, FCV-LUZ* **5**, 77-85 (1995).
38 Siger, J., Pulgar, E. & Medina, G. Primer reporte de anticupero al virus de la lengua azul en Venezuela. *Arthropod borne virus information exchange*, 50-53 (1990).
39 Rivera, H., Madewell, B. R. & Ameghino, E. Serologic survey of viral antibodies in the Peruvian alpaca (Lama pacos). *Am J Vet Res.* **48** (1987).
40 Rosadio, R. H., Evermann, J. F. & DeMartini, J. C. A preliminary serological survey of viral antibodies in Peruvian sheep. *Veterinary microbiology* **10** (1984).
41 Silva, F. J. F. in *Comissão de Estudos do Ministério da Agricultura.*
42 Balaro, M. *Surto de língua azul, doença rara no Brasil, vitima rebanho de 99 ovinos em Vassouras (RJ) e gera prejuízos*, <http://pecuaria.ruralbr.com.br/noticia/2013/06/surto-de-lingua-azul-doenca-rara-no-brasil-vitima-rebanho-de-99-ovinos-em-vassouras-rj-e-gera-prejuizos-4178426.html> (2013).
43 RuralBR-ProMED. *Surto lingua azul 2013*, 2013).
44 MAPA-DSA. (ed PECUÁRIA E ABASTECIMENTO SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DEPARTAMENTO DE SAÚDE ANIMAL - DSA MINISTÉRIO DA AGRICULTURA) (2011).
45 Trangoni, M. D., Ceron Cucchi, M. E., Zumarraga, M., Brihuega, B. & Cravero, S. in *26º Congresso Brasileiro de Microbiologia - 2011.*
46 Azevedo Ramos, P. C., Ramos, O. S., Pereira da Silva, L. & Oliveira, L. C. in *Buiatrics 2010.*
47 Antoniassi, N. A., Pavarini, S. P., Henzel, A., Flores, E. F. & Driemeier, D. Aspiration pneumonia associated with oesophageal myonecrosis in sheep due to BTV infection in Brazil. *The Veterinary record* **166**, 52-53, doi:10.1136/vr.b4775 (2010).
48 Hellmeister de Campos Nogueira, A., Pituco, E. M., Stefano, E. d., Lorenzerri Magalhaes, V. C. & Cardoso, T. C. DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA LÍNGUA AZUL EM OVINOS NA REGIÃO DE ARAÇATUBA, SÃO PAULO, BRASIL. *Ciência Animal Brasileira* (2009).
49 Tomich, R. G. P. *et al.* Sorologia para o vírus da língua azul em bovinos de corte, ovinos e veados campeiros no Pantanal sul-mato-grossense. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* **61**, 1222-1226 (2009).
50 Alves, F. A. L., Alves, C. J. & Azevedo, S. S. Soroprevalência e fatores de risco para a língua azul em carneiros das mesorregiões do Sertão e da Borborema, semi-árido do Estado da Paraíba, Brasil. *Brasil. Ciência Rural* **39** (2009).
51 Hellmeister de Campos Nogueira, A. *PREVALÊNCIA DA LÍNGUA AZUL EM OVINOS DA REGIÃO DE ARAÇATUBA – SÃO PAULO, BRASIL*, UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, (2008).
52 Pinheiro, R. R. *et al.* in *Anais do III Simposio Iternacional sobre caprinos e ovinos de corte.*

53 Dias, R. P. *et al.* Soroprevalencia da lingua azul em rebanhos ovinos de sete municipios do estado do Ceará, Brasil. *Achievesof Veterinary Science* **12** (2007).
54 Costa, J. R. R., Lobato, Z. I. P., Herrmann, G. P., Leite, R. C. & Haddad, J. P. A. Prevalência de anticorpos contra o vírus da língua azul em bovinos e ovinos do sudoeste e

sudeste do Rio Grande do Sul. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* **58**, 273-275 (2006).
55 Melo, C. B., Oliveira, A. M., Azevedo, E. O., Lobato, Z. I. P. & Leite, R. C. Anticorpos contra o vírus da língua azul em bovinos do sertão da Paraíba. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* **52**, 19-20, doi:10.1590/s0102-09352000000100004 (2000).
56 Rezende Costa, J. R. *Producae e padronizacao de antigeno para lingua azul e prevalencia nas mesorregioes sudoeste do estado do Rio Grande Do Sul, 1999* Mestreem Medicina Veterinaria thesis, Escola de Veterinaria da universidade Federal de Minas Gerais, (2000).
57 Cunha, R. G., Souza, D. M. & Passos, W. S. Anticorpos para o vírus da língua azul em soros de bovinos do Estado de São Paulo e Região Sul do Brasil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinaria* **9** (1987).
58 Viegas de Abreu, V. L. *Prevalencia de bovideos reagentes a prova de imunodifusao para lingua azulna regiao norte do brasil*, Universidade Federal de MinasGerais, (1982).
59 Groocock, C. M. & Campbell, C. H. Isolation of an exoic serotype bluetongue virus from imported cattle in quarantine. *Can J comp Med* **46** (1982).
60 Mertens, P. *et al.* Bluetongue virus replication, molecular and structural biology. *Vet ital* **40**, 426-437 (2004).
61 Maan, S. *et al.* Complete genome characterisation of a novel 26th bluetongue virus serotype from Kuwait. *PloS one* **6**, e26147, doi:10.1371/journal.pone.0026147 (2011).
62 Mertens, P. P. & Diprose, J. The bluetongue virus core: a nano-scale transcription machine. *Virus research* **101**, 29-43, doi:10.1016/j.virusres.2003.12.004 (2004).
63 Schwartz-Cornil, I. *et al.* Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity. *Veterinary research* **39**, 46, doi:10.1051/vetres:2008023 (2008).
64 Ratinier, M. *et al.* Identification and characterization of a novel non-structural protein of bluetongue virus. *PLoS pathogens* **7**, e1002477, doi:10.1371/journal.ppat.1002477 (2011).
65 Balasuriya, U. B. *et al.* The NS3 proteins of global strains of bluetongue virus evolve into regional topotypes through negative (purifying) selection. *Veterinary microbiology* **126**, 91-100, doi:10.1016/j.vetmic.2007.07.006 (2008).
66 Maan, S. *et al.* Sequence analysis of bluetongue virus serotype 8 from the Netherlands 2006 and comparison to other European strains. *Virology* **377**, 308-318, doi:10.1016/j.virol.2008.04.028 (2008).
67 DeMaula, C. D., Bonneau, K. R. & MacLachlan, N. J. Changes in the outer capsid proteins of bluetongue virus serotype ten that abrogate neutralization by monoclonal antibodies. *Virus research* **67**, doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1702(00)00130-1 (2000).
68 Caporale, M. *et al.* Determinants of bluetongue virus virulence in murine models of disease. *J Virol* **85**, 11479-11489, doi:10.1128/JVI.05226-11 (2011).
69 Maan, S. *et al.* Analysis and phylogenetic comparisons of full-length VP2 genes of the 24 bluetongue virus serotypes. *The Journal of general virology* **88**, 621-630, doi:10.1099/vir.0.82456-0 (2007).
70 Zhang, X. *et al.* Bluetongue virus coat protein VP2 contains sialic acid-binding domains, and VP5 resembles enveloped virus fusion proteins. *Proceedings of the National Academy of*

Sciences of the United States of America **107**, 6292-6297, doi:10.1073/pnas.0913403107 (2010).
71 Rojas, J. M., Rodriguez-Calvo, T., Pena, L. & Sevilla, N. T cell responses to bluetongue virus are directed against multiple and identical CD4+ and CD8+ T cell epitopes from the VP7 core protein in mouse and sheep. *Vaccine* **29**, 6848-6857, doi:10.1016/j.vaccine.2011.07.061 (2011).
72 Pathak, K. B. *et al.* Prokaryotic expression of truncated VP7 of bluetongue virus (BTV) and reactivity of the purified recombinant protein with all BTV type-specific sera. *Journal of virological methods* **152**, 6-12, doi:10.1016/j.jviromet.2008.06.010 (2008).
73 Nomikou, K. *et al.* Evolution and phylogenetic analysis of full-length VP3 genes of Eastern Mediterranean bluetongue virus isolates. *PloS one* **4**, e6437, doi:10.1371/journal.pone.0006437 (2009).
74 Chauveau, E. *et al.* NS3 of bluetongue virus interferes with the induction of type I interferon. *J Virol* **87**, 8241-8246, doi:10.1128/JVI.00678-13 (2013).
75 Vishwaradhya, T. M. *et al.* Sensitive detection of novel Indian isolate of BTV 21 using ns1 gene based real-time PCR assay. *Veterinary World* **6**, 554, doi:10.5455/vetworld.2013.554-557 (2013).
76 Aguero, M., Arias, M., Romero, L. J., Zamora, M. J. & Sanchez Vizcaino, J. M. Molecular differentiation between NS1 gene of a field strain Bluetongue virus serotype 2 (BTV-2) and NS1 gene of an attenuated BTV-2 vaccine. *Veterinary microbiology* **86** (2002).
77 Lymperopoulos, K., Wirblich, C., Brierley, I. & Roy, P. Sequence specificity in the interaction of Bluetongue virus non-structural protein 2 (NS2) with viral RNA. *The Journal of biological chemistry* **278**, 31722-31730, doi:10.1074/jbc.M301072200 (2003).
78 Maclachlan, N. J. Bluetongue: history, global epidemiology, and pathogenesis. *Preventive veterinary medicine* **102**, 107-111, doi:10.1016/j.prevetmed.2011.04.005 (2011).
79 Schulz, C. *et al.* Cross-sectional study of bluetongue virus serotype 8 infection in South American camelids in Germany (2008/2009). *Veterinary microbiology* **160**, 35-42, doi:10.1016/j.vetmic.2012.05.028 (2012).
80 Schulz, C. *et al.* Experimental infection of South American camelids with bluetongue virus serotype 8. *Veterinary microbiology* **154**, 257-265, doi:10.1016/j.vetmic.2011.07.025 (2012).
81 Schwartz-Cornil, I. *et al.* Bluetongue virus: Virology, pathogenesis and immunity. (2008).
82 OIE. *Manual de la OIE sobre animales terrestres 2008*. (2008).
83 Russell, H., O'Toole, D. T., Bardsley, K., Davis, W. C. & Ellis, J. A. Comparative Effects of Bluetongue Virus Infection of Ovine and Bovine Endothelial Cells. *Veterinary pathology* **33**, 319-331, doi:10.1177/030098589603300309 (1996).
84 Falconi, C., Lopez-Olvera, J. R. & Gortazar, C. BTV infection in wild ruminants, with emphasis on red deer: a review. *Veterinary microbiology* **151**, 209-219, doi:10.1016/j.vetmic.2011.02.011 (2011).
85 wilson, W. C. *et al.* Phylogenetic relationships of bluetongue viruses based on gene S7. *Virus research* **67** (2000).
86 xu, G. *et al.* VP7: an attachment protein of bluetongue virus for cellular receptors in Culicoides variipennis. *Journal of General Virology* **78** (1997).

87 Tan, B. H. *et al.* RGD tripeptide of bluetongue virus VP7 protein is responsible for core attachment to Culicoides cells. *J Virol* **75**, 3937-3947, doi:10.1128/JVI.75.8.3937-3947.2001 (2001).
88 Jimenez-Clavero, M. A. Animal viral diseases and global change: bluetongue and West Nile fever as paradigms. *Frontiers in genetics* **3**, 105, doi:10.3389/fgene.2012.00105 (2012).
89 Wilson, W. C. *et al.* Phylogenetic relationships of bluetongue viruses based on gene S7. *Virus research* **67**, 141-151 (2000).
90 Mellor, P. S. & Hamblin, C. African horse sickness. *Veterinary research* **35**, 445-466, doi:10.1051/vetres:2004021 (2004).
91 Takamatsu, H. A possible overwintering mechanism for bluetongue virus in the absence of the insect vector. *Journal of General Virology* **84**, 227-235, doi:10.1099/vir.0.18705-0 (2003).
92 Takamatsu, H. H., Mellor, P. S. & Mertens, P. P. A potential overwintering mechanism for bluetongue virus--recent findings. *Vet Ital* **40**, 456-461 (2004).
93 Drolet, B. S. *et al.* Experimental infection of white-tailed deer (Odocoileus virginianus) with Northern European bluetongue virus serotype 8. *Veterinary microbiology*, doi:10.1016/j.vetmic.2013.05.027 (2013).
94 Bouwknegt, C. *et al.* Potential role of ticks as vectors of bluetongue virus. *Experimental & applied acarology* **52**, 183-192, doi:10.1007/s10493-010-9359-7 (2010).
95 Veggiani Aybar, C. A., dantur Juri, M. J., Santana, M., Lizarralde de Groso, M. S. & Spinelli, G. R. a. *Journal of Insect Science* **12** (2013).
96 Felippe-Bauer, M. L. *et al.* New records of Culicoides Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) from Peruvian Amazonian region. *Biota Neotrop* **8** (2008).
97 Gouveia, A. M. G. *et al.* in *CONGRESSO LATINOAMERICANO DE BUIATRIA* (Brazil, 2003).
98 Greiner, E. C. *et al.* in *Bluetongue, African horse sickness, and related orbiviruses: Proceedings of the Second International Symposium.*
99 OIE. in *OIE terrestrial manual* (2009).
100 Orru, G. *et al.* Differentiation of Italian field and South African vaccine strains of bluetongue virus serotype 2 using real-time PCR. *Journal of virological methods* **122**, 37-43, doi:10.1016/j.jviromet.2004.07.009 (2004).
101 Orru, G. *et al.* Rapid detection and quantitation of Bluetongue virus (BTV) using a Molecular Beacon fluorescent probe assay. *Journal of virological methods* **137**, 34-42, doi:10.1016/j.jviromet.2006.05.028 (2006).
102 Vanbinst, T., Vandenbussche, F., Dernelle, E. & De Clercq, K. A duplex real-time RT-PCR for the detection of bluetongue virus in bovine semen. *Journal of virological methods* **169**, 162-168, doi:10.1016/j.jviromet.2010.07.019 (2010).
103 Brito, B. P., Gardner, I. A., Hietala, S. K. & Crossley, B. M. Variation in Bluetongue virus real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay results in blood samples of sheep, cattle, and alpaca. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* **23**, 753-756, doi:10.1177/1040638711407881 (2011).
104 Breard, E. *et al.* The epidemiology and diagnosis of bluetongue with particular reference to Corsica. *Research in veterinary science* **77**, 1-8, doi:10.1016/j.rvsc.2003.08.004 (2004).

105 De Leeuw, I. *et al.* Bluetongue Virus RNA Detection by Real-Time RT-PCR in Post-Vaccination Samples from Cattle. *Transboundary and emerging diseases*, doi:10.1111/tbed.12100 (2013).
106 Del Amo, J. *et al.* A novel quantitative multiplex real-time RT-PCR for the simultaneous detection and differentiation of West Nile virus lineages 1 and 2, and of Usutu virus. *Journal of virological methods* **189**, 321-327, doi:10.1016/j.jviromet.2013.02.019 (2013).
107 Steinrigl, A., Revilla-Fernandez, S., Eichinger, M., Koefer, J. & Winter, P. Bluetongue virus RNA detection by RT-qPCR in blood samples of sheep vaccinated with a commercially available inactivated BTV-8 vaccine. *Vaccine* **28**, 5573-5581, doi:10.1016/j.vaccine.2010.06.034 (2010).
108 Shaw, A. E. *et al.* Development and initial evaluation of a real-time RT-PCR assay to detect bluetongue virus genome segment 1. *Journal of virological methods* **145**, 115-126, doi:10.1016/j.jviromet.2007.05.014 (2007).
109 Anthony, S. *et al.* A duplex RT-PCR assay for detection of genome segment 7 (VP7 gene) from 24 BTV serotypes. *Journal of virological methods* **141**, 188-197, doi:10.1016/j.jviromet.2006.12.013 (2007).
110 Mecham, J. O. & Johnson, D. J. Persistence of bluetongue virus serotype 2 (BTV-2) in the southeast United States. *Virus research* **113**, 116-122, doi:10.1016/j.virusres.2005.04.022 (2005).
111 Bonneau, K. R., Mullens, B. A. & MacLachlan, N. J. Occurrence of Genetic Drift and Founder Effect during Quasispecies Evolution of the VP2 and NS3/NS3A Genes of Bluetongue Virus upon Passage between Sheep, Cattle, and Culicoides sonorensis. *Journal of Virology* **75**, 8298-8305, doi:10.1128/jvi.75.17.8298-8305.2001 (2001).
112 Maan, S. *et al.* Completion of the sequence analysis and comparisons of genome segment 2 (encoding outter capsid protein VP2) from representative isolates of the 24 bluetongue virus serotypes. *Veterinaria Italiana* **40** (2004).
113 van Niekerk, M. Variation in the NS3 gene and protein in South African isolates of bluetongue and equine encephalosis viruses. *Journal of General Virology* **84**, 581-590, doi:10.1099/vir.0.18749-0 (2003).
114 Ozkul, A. *et al.* Segment 10 based molecular epidemiology of bluetongue virus (BTV) isolates from Turkey: 1999-2001. *Virus research* **142**, 134-139, doi:10.1016/j.virusres.2009.02.007 (2009).
115 Gould, A. R. Conserved and non conserved regions of the outer coat protein VP2 of the Australian bluetongue serotype 1 virus, revealed by sequence comparison tothe VP2 of Notrh American BTV serotype 10. *Virus research* **9** (1988).
116 Pritchard, L. I. *et al.* Complete nucleotide sequence of RNA segment 3

of bluetongue virus serotype 2 (Ona-A). Phylogenetic

analyses reveal the probable origin and relationship

with other orbiviruses. *Virus research* **35** (1995).
117 Savini, G., MacLachlan, N. J., Sanchez-Vizcaino, J. M. & Zientara, S. Vaccines against bluetongue in Europe. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* **31**, 101-120, doi:10.1016/j.cimid.2007.07.006 (2008).

118 Noad, R. & Roy, P. Bluetongue vaccines. *Vaccine* **27 Suppl 4**, D86-89, doi:10.1016/j.vaccine.2009.08.037 (2009).
119 Roy, P., Boyce, M. & Noad, R. Prospects for improved bluetongue vaccines. *Nature reviews. Microbiology* **7**, 120-128, doi:10.1038/nrmicro2052 (2009).
120 Murray, P. K. & Eaton, B. T. Vaccines for bluetongue. *Australian Veterinary Journal* **73** (1996).
121 Savini, G. *et al.* An inactivated vaccine for the control of bluetongue virus serotype 16 infection in sheep in Italy. *Veterinary microbiology* **124**, 140-146, doi:10.1016/j.vetmic.2007.04.017 (2007).
122 Savini, G. BIVALENT BTV2 BTV4 INACTIVATED VACCINE. *Veterinary-Microbiolo*.
123 Veronesi, E., Hamblin, C. & Mellor, P. S. Live attenuated bluetongue vaccine viruses in Dorset Poll sheep, before and after passage in vector midges (Diptera: Ceratopogonidae). *Vaccine* **23**, 5509-5516, doi:10.1016/j.vaccine.2005.07.039 (2005).
124 Stewart, M. *et al.* Validation of a novel approach for the rapid production of immunogenic virus-like particles for bluetongue virus. *Vaccine* **28**, 3047-3054, doi:10.1016/j.vaccine.2009.10.072 (2010).
125 Stewart, M. *et al.* Protective efficacy of Bluetongue virus-like and subvirus-like particles in sheep: presence of the serotype-specific VP2, independent of its geographic lineage, is essential for protection. *Vaccine* **30**, 2131-2139, doi:10.1016/j.vaccine.2012.01.042 (2012).
126 Calvo-Pinilla, E., Rodriguez-Calvo, T., Sevilla, N. & Ortego, J. Heterologous prime boost vaccination with DNA and recombinant modified vaccinia virus Ankara protects IFNAR(-/-) mice against lethal bluetongue infection. *Vaccine* **28**, 437-445, doi:10.1016/j.vaccine.2009.10.027 (2009).
127 French, T. J., Marshall, J. J. & Roy, P. Assembly of double-shelled, viruslike particles of bluetongue virus by the simultaneous expression of four structural proteins. *J Virol* **64**, 5695-5700 (1990).
128 Metz, S. W. & Pijlman, G. P. Arbovirus vaccines; opportunities for the baculovirus-insect cell expression system. *Journal of invertebrate pathology* **107 Suppl**, S16-30, doi:10.1016/j.jip.2011.05.002 (2011).
129 Liu, F., Wu, X., Li, L., Liu, Z. & Wang, Z. Use of baculovirus expression system for generation of virus-like particles: Successes and challenges. *Protein expression and purification* **90**, 104-116, doi:10.1016/j.pep.2013.05.009 (2013).
130 Anderson, J. *et al.* Evaluation of the immunogenicity of an experimental DIVA subunit vaccine against Bluetongue virus serotype 8 in cattle. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, doi:10.1128/CVI.00229-13 (2013).
131 Athmaram, T. N., Bali, G., Kahng, G. G. & Dwarakanath, S. Heterologous expression of Bluetongue VP2 viral protein fragment in Pichia pastoris. *Virus genes* **35**, 265-271, doi:10.1007/s11262-006-0061-0 (2007).
132 Boone, J. D. *et al.* Recombinant canarypox virus vaccine co-expressing genes encoding the VP2 and VP5 outer capsid proteins of bluetongue virus induces high level protection in sheep. *Vaccine* **25**, 672-678, doi:10.1016/j.vaccine.2006.08.025 (2007).
133 Stewart, M. *et al.* Bluetongue virus serotype 8 virus-like particles protect sheep against virulent virus infection as a single or multi-serotype cocktail immunogen. *Vaccine* **31**, 553-558, doi:10.1016/j.vaccine.2012.11.016 (2013).

134 Liu, F. *et al.* Virus-like particles: Promising platforms with characteristics of DIVA for veterinary vaccine design. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* **36**, 343-352, doi:10.1016/j.cimid.2013.02.002 (2013).
135 Wade Evans, A. M. *et al.* Expression of the Major Core Structural Protein (VP7) of Bluetongue Virus, by a Recombinant Capripox Virus, Provides Partial Protection of Sheep against a Virulent Heterotypic Bluetongue Virus Challenge. *Virology* **220** (1996).
136 (!!! INVALID CITATION !!!).
137 Bhanuprakash, V., Indrani, B. K., Hosamani, M., Balamurugan, V. & Singh, R. K. Bluetongue vaccines: the past, present and future. *Expert Rev Vaccines.* (2009).
138 Perrin, A. *et al.* Recombinant capripoxviruses expressing proteins of bluetongue virus: evaluation of immune responses and protection in small ruminants. *Vaccine* **25**, 6774-6783, doi:10.1016/j.vaccine.2007.06.052 (2007).
139 Andrew, M. *et al.* Antigen specificity of the ovine cytotoxic T lymphocyte response to bluetongue virus. *vet Immunol and Immunophatology* **47**, 311 - 322 (1995).
140 MacLachlan, N. J. in *Proceedings of the Third International Symposium.* (eds N. J. MacLachlan & J. E. Pearson) (veterinaria italiana).
141 Taraporewala, Z. F., Chen, D. & Patton, J. T. Multimers of the bluetongue virus nonstructural protein, NS2, possess nucleotidyl phosphatase activity: similarities between NS2 and rotavirus NSP2. *Virology* **280**, 221-231, doi:10.1006/viro.2000.0764 (2001).
142 Grossmann, C. *et al.* Enhancement of the priming efficacy of DNA vaccines encoding dendritic cell-targeted antigens by synergistic toll-like receptor ligands. *BMC Immunol* **10** (2009).
143 Bonifaz, L. C. *et al.* In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *J Exp Med.* **15** (2004).
144 Soares, H. *et al.* A subset of dendritic cells induces CD4+ T cells to produce IFN-gamma by an IL-12-independent but CD70-dependent mechanism in vivo. *J Exp Med.* **14** (2007).
145 Carter, R. W., Thompson, C., Reid, D. M., Wong, S. Y. C. & Tough, D. F. Preferential Induction of CD4+ T Cell Responses through In Vivo Targeting of Antigen to Dendritic Cell-Associated C-Type Lectin-1 *The Journal of Immunology* **177** (2006).
146 Sancho, D. *et al.* Tumor therapy in mice via antigen targeting to a novel, DC-restricted C-type lectin. *J Clin Invest.* **118** (2008).
147 Gil, F. *et al.* Targeting antigens to an invariant epitope of the MHC Class II DR molecule potentiates the immune response to subunit vaccines. *Virus research* **155**, 55-60, doi:10.1016/j.virusres.2010.08.022 (2011).
148 Tacken, P. J. *et al.* Effective induction of naive and recall T-cell responses by targeting antigen to human dendritic cells via a humanized anti-DC-SIGN antibody. *Blood* **160** (2005).
149 Bullido, R. *et al.* Characterization of five monoclonal antibodies specific for swine class II major histocompatibility antigens and crossreactivity studies with leukocytes of domestic animals. *21* **3** (1997).
150 ATCC. (ed ATCC) (2013).
151 Reed, L. J. & Muench, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *The American Journal of Hygiene* **27** (1938).
152 Hall, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **41** (1999).

153 Tamura, K. *et al.* MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molec Biology and Evolution* (2011).
154 Guindon, S. & Gascuel, O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* **52**, 696-704 (2003).
155 Posada, D.
156 Invitrogen. (ed Invitrogen) (2004).
157 Pecora, A. *et al.* Development and validation of an ELISA for quantitation of bovine viral diarrhea virus antigen in the critical stages of vaccine production. *J Viral Methods* **162**, 170-178 (2009).
158 Ramakrishnan, M. A., Pandey, A. B., Singh, K. P., Singh, R. & Mehrotra, M. L. Immune response and protective efficacy in sheep immunised with hydroxylamine-inactivated bluetongue virus vaccine. *vet ital* **41** (2005).
159 Legisa, D. M., Gonzalez, F. N. & Dus Santos, M. J. Bluetongue virus in South America, Central America and the Caribbean. *Virus research* **13**, doi:10.1016/j.virusres.2013.10.030 (2013).
160 Sellers, R. F., Gibbs, E. P. J., Herniman, K. A. J., Pedley, D. E. & Tucker, M. R. Possible origin of the bluetongue epidemic in Cyprus, August 1977. *J Hyg. Camb* **83** (1979).
161 White, D. M., Blair, C. D. & Beaty, B. J. Molecular epidemiology of Bluetongue virus in northern Colorado. *Virus research* **118**, 39-45, doi:10.1016/j.virusres.2005.11.008 (2006).
162 Breard, E. *et al.* Comparison of genome segments 2, 7 and 10 of bluetongue viruses serotype 2 for differentiation between field isolates and the vaccine strain. *Veterinary research* **34**, 777-789, doi:10.1051/vetres:2003036 (2003).
163 Mayo, C. E. *et al.* Anthropogenic and meteorological factors influence vector abundance and prevalence of bluetongue virus infection of dairy cattle in California. *Veterinary microbiology* **155**, 158-164, doi:10.1016/j.vetmic.2011.08.029 (2012).
164 Gualapuro Gualapuro, M. R. *Contribución al estudio de la fauna de Culicoides (Díptera: Ceratopogonidae) en la zona norte del Ecuador* Bachelor thesis, UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO, (2013).
165 Carpenter, S., Wilson, A. & Mellor, P. S. Culicoides and the emergence of bluetongue virus in northern Europe. *Trends in microbiology* **17**, 172-178, doi:10.1016/j.tim.2009.01.001 (2009).
166 Carpenter, S. Culicoides and the spread

of bluetongue: finding the

needle in the haystack. *Veterinary Record*, doi:10.1017/S0950268810002396

10.1136/vr.c6684

10.1136/vr.d1385 (2011).
167 Batten, C. A., Edwards, L. & Oura, C. A. Evaluation of the humoral immune responses in adult cattle and sheep, 4 and 2.5 years post-vaccination with a bluetongue serotype 8 inactivated vaccine. *Vaccine*, doi:10.1016/j.vaccine.2013.06.033 (2013).

168 van der Sluijs, M. T. *et al.* Transplacental transmission of BTV-8 in sheep: BTV viraemia, antibody responses and vaccine efficacy in lambs infected in utero. *Vaccine*, doi:10.1016/j.vaccine.2013.05.087 (2013).
169 Oura, C. A., Edwards, L. & Batten, C. A. Evaluation of the humoral immune response in adult dairy cattle three years after vaccination with a bluetongue serotype 8 inactivated vaccine. *Vaccine* **30**, 112-115, doi:10.1016/j.vaccine.2011.10.100 (2012).
170 Calvo-Pinilla, E., Rodriguez-Calvo, T., Anguita, J., Sevilla, N. & Ortego, J. Establishment of a bluetongue virus infection model in mice that are deficient in the alpha/beta interferon receptor. *PloS one* **4**, e5171, doi:10.1371/journal.pone.0005171 (2009).
171 Wilson, S., Baird, M. & Ward, V. K. Delivery of vaccine peptides by rapid conjugation to baculovirus particles. *Vaccine* **26**, 2451-2456 (2008).
172 Jordan, K. R., Crawford, F., Kappler, J. W. & Slansky, J. E. *Vaccination of mice with baculovirus-infected insect cells expressing antigenic proteins*. Vol. 2 (2009).
173 Molinari, P. *et al.* Baculovirus treatment fully protects mice against a lethal challenge of FMDV. *Antiviral research* **87** (2010).
174 Perez Aguirreburualde, M. *et al.* Efficacy of a BVDV subunit vaccine produced in alfalfa transgenic plants. *Vet Immunol and Immunophatology* (2013).
175 Top, S. *et al.* Myxomavirus as a vector for the immunisation of sheep: Protection study against challenge with bluetongue virus. *Vaccine* **30** (2012).
176 Tizard, I. R. *Inmunologia Veterinaria*. Vol. 8 (Elsevier, 2009).
177 Nusinovici, S., Seegers, H., Joly, A., Beaudeau, F. & Fourichon, C. Increase in the occurrence of abortions associated with exposure to the Bluetongue virus serotype 8 in naive dairy herds. *Theriogenology* **78**, 1140-1151, doi:10.1016/j.theriogenology.2012.05.010 (2012).
178 Darpel, K. E. *et al.* Transplacental transmission of bluetongue virus 8 in cattle, UK. *Emerging infectious diseases* **15**, 2025-2028, doi:10.3201/eid1512.090788 (2009).
179 Coetzee, P., van Vuuren, M., Venter, E. H. & Stokstad, M. A review of experimental infections with bluetongue virusin the mammalian host. *Virus research* **1**, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2013.12.044 (2014).
180 Calvo Panilla, E. *et al.* Recombinant vaccines against bluetongue virus. *Virus research*, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2013.11.013 (2013).