

## EL VIRUS DE LA LENGUA AZUL COMO MODELO PARA EL ESTUDIO DE LOS ORBIVIRUS

P. J. SÁNCHEZ CORDÓN<sup>1\*</sup>, B. RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ<sup>2</sup>, M. PEDRERA<sup>1</sup>, M.A. RISALDE<sup>1</sup>, V. MOLINA<sup>1</sup>, E. RUIZ-VILLAMOR<sup>3</sup>, J. M. SÁNCHEZ-VIZCAÍNO<sup>2</sup>, J.C. GÓMEZ-VILLAMANDOS<sup>1</sup>

### RESUMEN

Al género Orbivirus pertenecen tres virus transmitidos a través de vector, que afectan al ganado doméstico y a animales de vida libre (Lengua Azul, Peste Equina Africana y Enfermedad Hemorrágica Epizootica de los Ciervos), y que han causado en las dos últimas décadas, especialmente el virus de la Lengua Azul (vLA), pérdidas económicas cuantiosas en prácticamente toda Europa y en los países del sur y el este del Mediterráneo. Es importante, por tanto, profundizar en el conocimiento sobre los mecanismos de actuación de estos virus, tomando como base al vLA considerado como el virus modelo para el estudio de este género, y en los mecanismos que modulan la respuesta inmunológica del hospedador para poder mejorar el control de la enfermedad mediante vacunas más eficaces. Hasta el momento se desconocen aspectos tan importantes como la duración de la viremia en animales infectados, el papel de la inmunidad celular desencadenada en el hospedador o los mecanismos de “hibernación” que permitan al vLA “reaparecer” tras un periodo de ausencia del vector. Además, el hecho de que los tres compartan los mismos vectores, hace necesario analizar el riesgo de entrada de los virus de la Peste Equina Africana y de

<sup>1</sup> Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba, Edificio Sanidad Animal, Campus de Rabanales, 14014, Córdoba, España.

<sup>2</sup> *Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avda Puerta de Hierro s/n 28040 Madrid, España.*

<sup>3</sup>Laboratorio Central de Veterinaria de Santa Fe, Camino del Jau s/n, 18320, Santa Fe, Granada.

\* E-mail: an2sacop@uco.es

la Enfermedad Hemorrágica Epizootica de los Ciervos en España, -que actualmente se detectan en los países del África Subsahariana y en el sur y este del Mediterráneo, respectivamente-. Por último, se considera también imprescindible mejorar las técnicas de diagnóstico para el virus de la Enfermedad Hemorrágica Epizootica de los Ciervos y el virus de la Peste Equina Africana y desarrollar nuevos ensayos basados en las cepas circulantes por el área mediterránea.

## INTRODUCCIÓN

El género *Orbivirus* se localiza taxonómicamente dentro de la familia *Reoviridae*, que agrupa a virus cuya característica común es la de tener un genoma constituido por ARN de doble cadena segmentado en 10-12 fragmentos. Por lo demás, los virus de esta familia presentan una gran heterogeneidad. De entre todos los *Reovirus*, destacan los pertenecientes al género *Orbivirus*, en concreto el virus de la Lengua Azul, el virus de la Peste Equina Africana y el virus de la Enfermedad Hemorrágica Epizootica de los Ciervos.

La Lengua Azul (LA) es una enfermedad infecciosa no contagiosa de distribución mundial, que afecta tanto a rumiantes domésticos como salvajes con importantes diferencias según las especies afectadas y que se incluye en la antigua lista A de la Oficina Internacional de Epizootias (OIE). Está producida por un virus ARN del género *Orbivirus* (familia *Reoviridae*), considerado como el virus tipo de este género, del que se conocen al menos 24 serotipos diferentes, no todos patógenos, entre los que no existe inmunidad cruzada, lo que dificulta las estrategias de vacunación (1,2). Hasta el momento, en Europa se han detectado los serotipos 1, 2, 4, 6, 8, 9 y 16. La LA origina importantes restricciones comerciales en los países afectados así como pérdidas económicas que han sido estimadas entorno a unos 3 billones de dólares por año (3).

A este género pertenecen otros virus como el de la peste equina africana (vPEA), responsable de una devastadora enfermedad en caballos que provocó un brote que afectó a España, Portugal y Marruecos en 1987 y que desde su erradicación en 1991 no ha vuelto a ser detectado en Europa (4,5). El hecho de que a lo largo de los últimos años se hayan registrado varios brotes del serotipo 2 de este virus en regiones de África Central muy alejadas entre ellas (Senegal y Etiopía) hace pensar que existe virus activo circulando fuera la zona donde es endémico (principalmente en Sudáfrica). Este hecho, junto con el conocimiento de que vPEA comparte vectores de transmisión con vLA (*Culicoides imicola*), actualmente localizado en el norte de África y buena

parte de Europa, hace pensar que la llegada accidental de vPEA a Europa provocaría su diseminación a una región vastísima donde su vector podría transportar al virus. Además, la llegada de vLA al norte de Europa en 2006 demostró que otras especies de Culicoides, que nunca antes habían entrado en contacto con vLA, eran capaces de transmitir este virus de manera eficaz. Es posible que estos mismo *Culicoides* también sean compatibles con vPEA.

El otro miembro del género Orbivirus cuya situación epidemiológica nos interesa es el virus de la enfermedad hemorrágica epizootica del ciervo (vEHEC), presente en distintos países de la cuenca mediterránea (Marruecos, Algeria, Túnez e Israel) durante 2006-2007 (<http://www.promed.mail.org>), siendo escasos los datos sobre la situación de esta enfermedad, al no ser obligatoria su notificación a la OIE. Hasta que vEHEC comenzó a detectarse en 2006 por toda la costa este y sur del Mediterráneo, la información de la que se disponía sobre esta enfermedad estaba relacionada con los numerosos brotes producidos en Estados Unidos, sobre todo ligados a fauna silvestre. Los artículos que describen técnicas de PCR (Polymerase Chain Reaction) para detectar este virus se refieren siempre a fauna de vida libre. Cuando en 2006 se realizó una puesta a punto de estas técnicas en el Laboratorio Central de Algete (Madrid) se comprobó que algunas de las PCRs descritas para vEHEC reconocen también vLA de manera inespecífica. Por tanto, la mejora de técnicas de diagnóstico moleculares que permitan realizar un diagnóstico diferencial de estos virus (vLA, vPEA, vEHEC) y cuyo genoma presenta elevada homología, se presenta como un objetivo prioritario para los laboratorios de diagnóstico e investigación.

## EL VIRUS

El virus de la LA (vLA) se presenta como el modelo a seguir en el estudio de los Orbivirus, mostrando una importante capacidad de difusión y virulencia. A pesar de la gran variabilidad mostrada por las especies de virus del género Orbivirus, todos ellos muestran una serie de características comunes: (I) Cápside icosaédrica con dos capas de proteínas en la que se encuentran las proteínas estructurales VP2 y VP5, proteínas mayores de la capa externa que se pierde en la etapa inicial del proceso de infección, mientras que VP3 y VP7 son las principales proteínas de la capa interna, donde se localizan también las proteínas estructurales menores VP1, VP4 y VP6. Además de estas proteínas estructurales existen otras proteínas no estructurales (NS1, NS2, NS3 y NS3A) que parecen participar en la replicación, maduración y salida del virus de la célula infectada. (II) El genoma del vLA está compuesto por 10 segmentos de

ARN bicatenario empaquetados dentro de la cápside (6,7). Las proteínas VP3 y VP7, están altamente conservada en todos los Orbivirus (8,9), expresando determinantes antigénicos específicos de grupo (10).

El virus que causa la PEA (vPEA) presenta características genómicas idénticas a las descritas para vLA. Se han descrito 9 serotipos de este virus, cuya distribución es típicamente subsahariana, aunque se han producido varios episodios fuera de sus zonas endémicas, en uno de los cuales, el serotipo 4 de vPEA llegó a Marruecos, Portugal y España en 1987. En la actualidad existe un buen número de técnicas moleculares y serológicas para su diagnóstico, pero no se dispone de vacunas que permitan realizar un control efectivo de la enfermedad, a la vez que garanticen una eficaz diferenciación entre animales vacunados e infectados. Todo ello, a pesar de haberse ensayado vacunas de tercera generación (VLPs, *Virus Like Particles*) con elevada potencia.

En el caso del vEHEC, la situación es muy distinta. Dado que ha sido considerada una enfermedad que afectaba a la fauna silvestre, el control de la enfermedad se ha venido realizando mediante sacrificio de los animales infectados y control de los movimientos de poblaciones animales. Todavía hoy no se sabe cuántos serotipos distintos existen en el mundo (EHD1 y 2 en EEUU, tres aislados en Nigeria y cinco Australia, que podrían ser distintos serotipos) y el virus Ibaraki, que afecta a ganado bovino en Japón, se considera en la actualidad idéntico al serotipo 2 del vEHEC (11). Como ya se señaló en el apartado anterior, parece recomendable mejorar el diagnóstico diferencial para vEHEC buscando regiones únicas en su genoma.

## EL VECTOR Y LA TRANSMISIÓN DEL VIRUS

En lo sucesivo nos referiremos de manera genérica al vLA como virus tipo del género Orbivirus, pero la información se puede aplicar a vPEA y vEHEC excepto que se señale lo contrario.

La transmisión del vLA se produce por picadura de mosquitos del género *Culicoides* que se hayan infectado previamente a partir de un animal en fase virémica. El virus se multiplica en el interior de las células intestinales, diseminándose posteriormente hasta las glándulas salivares donde permanece hasta el momento de la picadura (12). La presencia y abundancia del vector condiciona la existencia de la enfermedad y su difusión (12). La transmisión vertical y mediante el coito por presencia de virus en el semen también ha sido descrita ocasionalmente (13). De las cientos de especies de *Culicoides* que se conocen en el mundo (más de 5000), sólo 32 están implicadas

en la transmisión del vLA (12 se encuentran en Europa), y es posible que no todas puedan transmitir los 24 serotipos diferentes que se conocen (14). Esta especificidad parece depender de los receptores que poseen las células intestinales, que reconocen a los virus y los fagocitan, permitiendo su multiplicación en el interior de las células y posterior diseminación hasta las glándulas salivares (12).

En Europa los vectores principales son *Culicoides imicola*, el complejo *Culicoides obsoletus*, *Culicoides dewulfi* y *Culicoides pulicaris*. Son las hembras de la especie las que se alimentan de sangre y las que posteriormente realizan la puesta. Sin embargo no se conoce que exista paso del virus a los ovarios, por lo que no parece que exista transmisión del vLA entre generaciones de estos insectos. Parece más bien, según estudios recientes, que los mecanismos de supervivencia del vector podrían estar relacionados con el aumento de la temperatura invernal en Europa durante los últimos tres años (15). Así, la infección del vector se tiene que producir siempre por ingestión de sangre de un animal virémico.

La temperatura de desarrollo varía según la especie, no siendo conocida con exactitud. La aparición de la enfermedad en países de la cuenca mediterránea, centro y norte de Europa ha estado favorecida por el cambio climático, lo que ha originado la llegada y la permanencia de los vectores (1,16,17). Tradicionalmente se establecían las latitudes 40°N y 35°S como áreas donde se encontraba presente *Culicoides imicola*, vector clásico de transmisión del vLA, el cual necesita temperaturas más elevadas para su supervivencia, alcanzando su pico de abundancia entre primavera y otoño. Sin embargo, el vector ha sido capaz de colonizar y permanecer en nuevas áreas localizadas en lugares de clima más frío (con 7°C pueden volar y transmitir la enfermedad), donde nunca antes había sido descrito (18) pudiendo, por tanto, infectar rumiantes en áreas previamente fuera de su rango de temperatura, y poniendo así el virus a disposición de otras especies como *Culicoides obsoletus*, no descritas antes como transmisoras del virus y que ahora juegan un importante papel en la hibernación del virus en áreas del norte de Europa (19). Esta especie abunda en Europa Central y en todo el tercio norte de España, donde aparece muy precozmente y puede estar presente todo el invierno, alcanzando sus máximos en los meses de verano. Igualmente, el transporte de animales facilita la diseminación de serotipos del vLA que actualmente afectan un área de Europa hacia áreas ocupadas por otras especies de *Culicoides* (20).

Hasta el momento, la transmisión del vPEA ha estado siempre asociada a la presencia de *Culicoides imicola* en el norte de África y el sur de Europa y a la existencia de *Culicoides bolitinos* en el centro y sur de África. Esta situación podría cambiar si, como ha ocurrido con vLA, otras especies de *Culicoides* que se localizan en regiones

geográficas más septentrionales fuesen capaces de transmitir eficazmente el vPEA, de características muy similares a vLA. El caso del vEHEC es muy parecido al de vPEA, ya que en el Mediterráneo siempre ha aparecido en regiones con gran abundancia de *C. imicola*.

Los *Culicoides* presentan actividad crepuscular o nocturna, pero con humedad y cielo cubierto, características propias de inviernos centroeuropeos, algunas especies como *Culicoides obsoletus* y *Culicoides dewulfi* pueden volar incluso en las horas centrales del día. A pesar de que con lluvia y viento no vuelan, en determinadas condiciones de temperatura y humedad, las corrientes de aire pueden desplazarlos cientos de kilómetros. Trabajos recientes también han demostrado que, pese a que suelen encontrarse fuera de las construcciones, *Culicoides obsoletus* y *Culicoide dewulfi* pueden encontrarse dentro de las instalaciones ganadera sobre todo en los meses invernales cuando las condiciones climáticas exteriores son más adversas (19).

## EVOLUCIÓN HISTÓRICA RECIENTE Y SITUACIÓN ACTUAL

Después de los brotes que afectaron a Europa hasta 1979 (21), una nueva ola de brotes comenzaron en 1998 con la aparición del serotipo 9, así como con la presencia en los años siguientes del serotipo 2, que barrió el Mediterráneo afectando a las Islas Baleares en 2000 (22), del serotipo 16 (23) y del serotipo 4 que volvió a afectar a las Islas Baleares en 2003 (11). En 2004, una cepa diferentes del serotipo 4 se detectó en Marruecos, así como en España y Portugal tras más de 40 años de silencio epizootológico (11). Posteriormente, en Julio de 2007 se detectó el serotipo 1 en el sur de España proveniente del norte de África, el cual apareció pocos meses después en el norte de España, junto al serotipo 8 (enero 2008) (7). Acorde con el Programa Nacional de Vigilancia Entomológica, no existía actividad de *Culicoides imicola* en el norte de España, lo que indicaba que otra especie de *Culicoides* debería estar implicada en la transmisión de estos serotipos. También se han detectado brotes del serotipo 8 en el sur del país, en áreas previamente afectadas por los serotipos 1 y 4, con campañas de vacunación para ambos serotipos. La causa de estos brotes no está clara, aunque el movimiento del vector o de animales infectados provenientes de la zona norte podría ser su origen. Por tanto, el país entero es ahora zona de restricción para los serotipos 1 y 8 (zona norte y sureste) o para los serotipos 1, 4 y 8 (zona suroeste). En la mitad sur de Portugal, la evolución fue similar a la descrita en el suroeste español (serotipos 1 y 4), siendo recientemente declarada zona restringida para serotipo 1 la mitad norte del país (Defra, Ref. VITT 1200/BT-EU/14-Nov-08).

Con respecto al resto de Europa, Italia ha sido el país en el que se han detectado más serotipos (1, 2, 4, 9 y 16). La visión tradicional que se tenía de la lengua azul como enfermedad restringida al área mediterránea cambió cuando en agosto de 2006 Holanda, Bélgica, Alemania y Francia notificaron la presencia del serotipo 8, nunca antes descrito en Europa, siendo la zona más septentrional del mundo en la que hasta ese momento la enfermedad había sido detectada. Tras un silencio invernal reapareció en julio de 2007 extendiéndose por Centroeuropa y alcanzando territorios hasta entonces libres como los países escandinavos (Dinamarca y Suecia) y Reino Unido (24). En la actualidad, el serotipo 1 también se ha extendido por Francia y Holanda, mientras que se ha producido la aparición del serotipo 6 en Holanda y Alemania, el cual comparte el 99,9% de su genoma con parte de la cepa de la vacuna viva usada en Sudáfrica como parte de una vacuna pentavalente, siendo probable que fuera introducida de forma ilegal, aspecto éste bajo investigación epidemiológica. Su capacidad de diseminación es desconocida y es difícil determinar si seguirá el patrón del serotipo 8 (Defra, Ref. VITT 1200/BT-EU/14-Nov-08).

La peste equina africana (PEA) es endémica en la región tropical y subtropical del África subsahariana. A mediados de los años 60, el serotipo 9 del vPEA se extendió por Túnez, Argelia y Marruecos y llegó a España en 1966. En Gibraltar, 637 caballos tuvieron que ser sacrificados y el brote se controló mediante vacunación y sacrificio de los animales infectados (25). Veinte años más tarde, el serotipo 4 de vPEA se detectó en el Safari Park de Madrid. Esta vez la causa del brote se debió a la importación desde Namibia de cebras infectadas de manera subclínica. Unos 38.000 animales tuvieron que ser vacunados y 300 fueron sacrificados. Hoy en día disponemos de técnicas de diagnóstico para PEA, pero es necesario también realizar vigilancia sanitaria y conocer los serotipos que circulan fuera de las áreas donde son endémicos, así como un control del transporte de animales desde países donde se ha declarado la enfermedad. El hecho de que se hayan encontrado especies de Culicoides en regiones del norte de Europa capaces de transmitir el vLA hace sospechar que podrían transmitir también el vPEA, incrementando el área donde podría producirse la infección.

El vEHEC se ha asociado tradicionalmente con brotes en fauna silvestre en Estados Unidos (26). Sin embargo, en 2006 se detectó un elevado número de casos de EHEC en el norte de África –Mauritania, Marruecos, Argelia, Túnez y Libia- causados por el serotipo 9 del vEHEC y, casi simultáneamente, se detectó el serotipo 7 en Israel. Todos estos brotes se controlaron a finales de 2006 y no se han vuelto a declarar brotes en esta región desde entonces.

## CLÍNICA Y LESIONES

Tanto la evolución clínica de la enfermedad como la gravedad de las lesiones dependerán tanto del serotipo implicado como de la especie animal que se vea afectada, existiendo una clara diferencia de susceptibilidad frente al vLA cuyas causas aún no han sido esclarecidas. Así, la aparición de nuevos serotipos que afectan a especies que tradicionalmente se han considerado asintomáticas, no hace sino arrojar aún más incógnitas sobre cuales son los determinantes patogénicos implicados en este proceso.

La LA se manifiesta sobre todo en ovino, con cursos que van desde formas subclínicas a formas agudas fatales, aunque la raza (son más sensibles las europeas), la edad (la susceptibilidad aumenta con esta) y, como ya se ha indicado, el serotipo implicado, son factores influyentes (27,28), con una mortalidad al cabo de 8-10 días que oscila entre el 2 y el 50%. Así, en el brote de serotipo 4 de nuestro país se produjo una escasa mortalidad, mientras que el serotipo 1 llegó a producir mortalidades puntuales de hasta el 30%. Destacar que el brote declarado de serotipo 8 en el sur de España afectó a ovejas, especie que también se ha visto afectada por este serotipo en el norte de Europa (29).

El ganado bovino al igual que el caprino y los rumiantes de vida libre normalmente se han mostrado como hospedadores asintomáticos de la LA (27,30). Sin embargo, tanto en la última epizootia en los países del centro de Europa (2006, serotipo 8), como con el serotipo 1 en la península se ha podido observar una importante sintomatología clínica en la especie bovina y caprina así como en diferentes especies de rumiantes salvajes (29,31,32). Con respecto al serotipo 6 parece que es capaz de producir signos clínicos en vacuno, no observados por el momento en el ganado ovino (Defra, Ref. VITT 1200/BT-EU/14-Nov-08).

Los signos clínicos incluyen fiebre, taquipnea, letargia, cojeras, sialorrea, lagrimeo, exudado nasal de seroso a mucopurulento y pérdida de lana. Los animales muestran leucopenia que afecta a todos los tipos de linfocitos, pero especialmente a los T CD8+, trombocitopenia y alteración de los factores de coagulación (33). Las lesiones más características son la presencia de un edema generalizado que afecta a los labios, párpados, zona submandibular y cuello, hiperemia y hemorragias en mucosa oral, nasal y palpebral, edema y congestión en la lengua que aparece cianótica, erosiones-ulceras en la mucosa oral e inflamación de la banda coronaria. Durante la necropsia se puede observar linfadenitis hemorrágica generalizada y esplenomegalia, congestión, edema y hemorragia en la mucosa oral y respiratoria, hidrotórax, hidropericardio,



edema alveolar, hemorragias subendocárdicas y subepicárdicas así como hemorragias en la base de la arteria pulmonar. Las lesiones microscópicas incluyen, además de edema y hemorragias, hipertrofia endotelial, trombosis microvascular, infartación y necrosis isquémica que pueden afectar tanto al corazón como en la musculatura estriada, donde además se puede apreciar un edema intermuscular.

El vLA, dada su capacidad de atravesar la placeta, también puede dar lugar a un síndrome reproductivo cuyas consecuencias dependerán del período de gestación en el momento de la infección, dando lugar a muerte embrionaria y fetal, anomalías congénitas del sistema nervioso central, abortos, así como el nacimiento de animales normales seronegativos.

### PATOGÉNESIS DEL VLA

Tras la inoculación del vLA por la picadura de vector, éste replica en los nódulos linfáticos que drenan el lugar de inoculación. Después, el virus se disemina vía linfática y sanguínea hacia localizaciones secundarias, principalmente pulmón y bazo, donde replica en células endoteliales y fagocitos mononucleares (30,34). Una vez producida la replicación el virus se extiende vía sanguínea a todos los órganos. El virus está presente, principalmente, en la fracción celular (leucocitos y eritrocitos) y en menor medida en el plasma, donde su presencia es transitoria, siendo la viremia asociada a células de larga duración.

Existe controversia en cuanto al tiempo de duración de la viremia tanto en ovino como en vacuno. Distintos trabajos señalan que la duración de la viremia oscila entre los 3-20 días en oveja y los 50-80 días en ganado bovino, mientras que otros señalan una duración mayor de entre 30 y 54 días en ovino (35) y entre 145 y 222 días en bovino (36,37), apuntando a esta especie como principal reservorio de la enfermedad. El virus puede ser detectado en vesículas intracelulares de los eritrocitos, en las cuales no replica pero persiste en invaginaciones de la membrana celular, siendo detectado en estas células desde 24 horas después de la infección y persistir durante la viremia (38,39,40). Otras células inmunocompetentes en la que replica el virus son monocitos y macrófagos y en menor medida algunas subpoblaciones de linfocitos T. Sin embargo, queda aún por aclarar el papel que estas células desempeñan en los mecanismos patogénicos de la LA *in vivo*, siendo además escasos los trabajos que afrontan el estudio de dichos mecanismo *in vitro*.

Los animales que sobreviven a procesos de LA, además de lesiones erosivas en superficies mucosas e interdigitales, pueden desarrollar una dermatitis crónica (41).

En ovejas de raza Dorset, se ha señalado la capacidad que el vLA tiene de hibernar en linfocitos T $\gamma\delta$  infectados persistentemente en la piel tras la recuperación de los animales, los cuales llegan a ser avirémicos. La picadura del vector produce una inflamación la piel que induce el reclutamiento de linfocitos T $\gamma\delta$  persistentemente infectados, que al interactuar con los fibroblastos podrían resultar en un incremento de la producción de virus en el lugar de la picadura, favoreciendo su transmisión al insecto vector para iniciar un nuevo ciclo epidémico (42). Sin embargo esta hipótesis no fue confirmada cuando en otro estudio se emplearon ovejas de raza Merina (43).

Las células endoteliales se muestran como las principales células blanco del vLA, siendo la microvasculatura del pulmón especialmente susceptible a sufrir alteraciones en la permeabilidad vascular. El virus produce a nivel local una trombosis microvascular y aumento de la permeabilidad, dando lugar a la hipertrofia del endotelio así como a la presencia de trombos de fibrina y plaquetas en los vasos pequeños (trombosis microvascular), con edemas y hemorragias en el tejido circundante junto a la aparición de una necrosis isquémica en muchos tejidos. La trombocitopenia que caracteriza a la enfermedad junto a la alteración de los factores de coagulación provoca una coagulopatía de consumo que favorecerá la aparición de hemorragias.

## REPUESTA INMUNE FRENTE AL VLA

La vacunación, junto a la restricción de movimientos es uno de los pilares básicos en el control de la LA. Existen vacunas vivas atenuadas, de gran eficacia inmunológica, pero actualmente en desuso debido a su bajo perfil de seguridad, pudiendo provocar efectos teratógenos, así como transmisión del virus vacunal a animales no vacunados. Otras vacunas son las inactivadas, las cuales confieren periodos de inmunidad menores, aunque son más seguras. Destacar también las VLP (*virus-like particles*), complejos de proteínas estructurales (VP2, VP5, VP7) carentes de material genético (por tanto no replicativas) que se ensamblan formando estructuras semejantes al virus auténtico. Son muy seguras, permiten diferenciar animales vacunados de infectados y pueden proteger frente a distintos serotipos, por lo que serán las vacunas del futuro. Nuestro grupo de trabajo ha realizado experimentos preliminares para probar la potencia de este tipo de vacunas y los resultados son prometedores. Sin embargo, la efectividad de las vacunas se determina principalmente en base a que exista una buena respuesta de anticuerpos específicos frente al virus y a que no exista viremia. Sin embargo, no se conocen los mecanismos básicos que operan en los animales vacunados para conferirles protección, siendo muy escasos los estudios realizados.

Estudios de transferencia pasiva de suero han demostrado que los anticuerpos específicos frente al vLA pueden conferir protección específica frente a un serotipo, sugiriendo un papel *in vivo* para la neutralización viral mediada por anticuerpos, cuyos mecanismos son desconocidos hasta la fecha pese a los intentos de demostrar, tanto en bovino como en ovino, una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos o del complemento. Los animales inmunocompetentes que sobreviven a la infección por el vLA desarrollan anticuerpos específicos en 5-10 días. VP2 y VP5 son las únicas proteínas que han demostrado ser capaces de inducir anticuerpos neutralizantes, siendo la VP2 la proteína mayor involucrada en la especificidad de serotipo (44). Los anticuerpos neutralizantes específicos de tipo frente a la VP2 y la VP7 persisten durante toda la vida del animal, mientras que los anticuerpos específicos de grupo frente a la VP7 persisten sólo durante 6-18 meses (45). Por tanto, los rumiantes infectados de manera natural con un serotipo del vLA muestran una inmunidad sólida de por vida al serotipo homólogo pero parcial o inexistente frente a otros (heterólogos) serotipos.

La inmunidad protectora suele asociarse a anticuerpos neutralizantes aunque, ocasionalmente, ciertos animales sin anticuerpos neutralizantes demostrables, resisten la infección frente a vLA virulentos. Parece que la inmunidad mediada por células frente a la infección por el vLA en ovino es protectora y, de hecho, parece ser menos específica de serotipo que la respuesta humoral (46). Las ovejas que se recuperan de una infección por un vLA virulento muestran protección parcial cuando se enfrentan a un serotipo virulento heterólogo y protección completa si se infectan de nuevo, a pesar de la ausencia completa de anticuerpos neutralizantes demostrables frente a los virus de la segunda y tercera infección (47). Parece ser que son los linfocitos T CD4+ los efectores inmunes involucrados en la protección, aunque su contribución funcional directa aún no ha sido esclarecida.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía a través del proyecto P05-AGR-00132 y por el Ministerio de Educación y Ciencia a través del proyecto RASVE 274/2007. Pedro José Sánchez Cordero es beneficiario de un contrato dentro del "Programa Ramón y Cajal" del Ministerio de Ciencia e Innovación, España.

## REFERENCIAS

1. Mellor P.S., Wittmann E.J., Bluetongue virus in the Mediterranean Basin 1998-2001, *Vet. J.* (2002) 164:20-37.
2. Mertens P.P.C., Maan S., Samuel A., Attoui H., Orbivirus, Reoviridae, In: Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A. (Eds.), *Virus taxonomy*, VIIIth report of the ICTV, Elsevier/Academic press, London, UK, (2004), pp. 466-483.
3. Tabachnick WJ, Robertson MA, Murphy KE. *Culicoides variipennis* and bluetongue disease. Research on arthropod-borne animal diseases for control and prevention in the year 2000. *Ann N Y Acad Sci.* (1996) 791:219-26. Review.
4. Rawlings, P., M. J. Pro, I. Pena, M. D. Ortega, and R. Capela, Spatial and seasonal distribution of *Culicoides imicola* in Iberia in relation to the transmission of African horse sickness virus. *Med. Vet. Entomol.* (1997)11, 49–57.
5. Sanchez-Vizcaino, J. M.. Control and eradication of African horse sickness with vaccine. *Dev: Biol.* (2004) 119, 255–268.
6. Roy, P., Orbivirus structure and assembly. *Virology.* (1996) 216, 1–11.
7. Rodríguez-Sánchez B, Iglesias-Martín I, Martínez-Avilés M, Sánchez-Vizcaíno JM. Orbiviruses in the Mediterranean basin: updated epidemiological situation of Bluetongue and new methods for the detection of BTV serotype 4. *Transbound Emerg Dis.* (2008) 55(5-6):205-14.
8. Roy P., Bluetongue virus proteins, *J. Gen. Virol.* (1992) 73:3051-3064 .
9. Tan B.H., Nason E., Staeuber N., Jiang W., Monastyrskaya K., Roy P., RGD tripeptide of bluetongue virus VP7 protein is responsible for core attachment to *Culicoides* cells, *J. Virol.* (2001) 75:3937-3947.
10. Anthony S., Jones H., Darpel K.E., Elliott H., Maan S., Samuel A., et al., A duplex RT-PCR assay for detection of genome segment 7 (VP7 gene) from 24 BTV serotypes, *J. Virol. Methods* (2007) 141:188-197.
11. Breard, E., C. Hamblin, S. Hammoumi, C. Sailleau, G. Dauphin, and S. Zientara, The epidemiology and diagnosis of blue tongue with particular reference to Corsica. *Res. Vet. Sci.* (2004) 77, 1–8.
12. Mellor P.S., Boorman J, Baylis M. *Culicoides* biting midges: their role as arbovirus vectors. *Annu Rev Entomol.* (2000) 45:307-40. Review.
13. Parsonson I.M., Pathology and pathogenesis of bluetongue infections, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* (1990) 162:119-141.
14. Conrath F.J., Kramer M., Freuling C., Hoffmann B., Staubach C., Bluetongue disease in Germany: clinical aspects, diagnosis and epidemiology. *Praktische Tierarzt.* (2007) 88, 9-15.
15. Wilson W.C., Bernard K.A., Israel B.A., Mecham J.O., Bluetongue virus serotype 17 sequence variation associated with neutralization, *DNA Seq.* (2008) 237-240.
16. Purse B.V., Mellor P.S., Rogers D.J., Samuel A.R., Mertens P.P., Baylis M., Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe, *Nat. Rev. Microbiol.* (2005) 3:171-181.
17. Purse BV, Tatem AJ, Caracappa S, Rogers DJ, Mellor PS, Baylis M, Torina A. Modelling the distributions of *Culicoides* bluetongue virus vectors in Sicily in relation to satellite-derived climate variables. *Med Vet Entomol.* (2004)18(2):90-101.
18. Toussaint, J. F., F. Vandenbussche, J. Mast, L. De Meester, N. Goris, W. Van Dessel, E. Vanopdenbosche, P. Kerkhofs, K. De Clercq, S. Zientara, C. Sailleau, G. Czapllicki, G. Depoorter, and J. M. Dochy, Bluetongue in Northern Europe. *Vet. Rec.* (2006) 2, 327.
19. Mehlhorn, H., V. Walldorf, S. Klimpel, B. Jahn, F. Jaeger, J. Eschweiler, B. Hoffmann, and M. Beer, First occurrence of *Culicoides obsoletus*-transmitted Bluetongue virus epidemic in Central Europe. *Parasitol. Res.* (2007) 101, 219–228.
20. Calvete C, Calvo JH, Calavia R, Miranda MA, Borrás D, Estrada R, Lucientes J, Mañuz B, Ro-

- mero L. *Culicoides* species and transmission of bluetongue virus in Spain. *Vet Rec.* (2008) 23; 162(8):255.
21. Sellers, R. F., and D. E. Pedgley, Possible windborne spread to western Turkey of bluetongue virus in 1977 and of Akabane virus in 1979. *J. Hyg.* (1985) 5, 149–158.
  22. Potgieter, A. C., F. Monaco, O. Mangana, K. Nomikou, H. Yadin, and G. Savini, VP2-segment sequence analysis of some isolates of bluetongue virus recovered in the Mediterranean basin during the 1998–2003 outbreak. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* (2005) 52, 372–379.
  23. Shimshony, A., Bluetongue in Israel—a brief historical overview. *Vet. Ital.* (2004) 40, 116–118.
  24. Schwartz-Cornil, I., Mertens, P.P.C., Contreras, V., Hemati, B., Pascale, F., Bréard, E., Mellor, P.S., MacLachlan, N.J., Zientara, S. Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity. *Vet. Res.* (2008) 39, 46.
  25. Rodríguez M, Hooghuis H, Castaño M. African horse sickness in Spain. *Vet Microbiol.* (1992)33(1-4):129-42. Review.
  26. Gorman BM. The bluetongue viruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* (1990) 162:1-19. Review.
  27. MacLachlan, N.J. The pathogenesis and immunology of bluetongue virus infection of ruminants. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* (1994)17, 197-206.
  28. MacLachlan, N.J., Crafford, J.E., Vernau, W., Gardner, I.A., Goddard, A., Guthrie, A.J., Venter E.H. Experimental reproduction of severe bluetongue in sheep. *Vet. Pathol.* (2008) 45, 310-315.
  29. Elbers A.R., Backx A., Ekker H.M., van der Spek A.N., van Rijn P.A., Performance of clinical signs to detect bluetongue virus serotype 8 outbreaks in cattle and sheep during the 2006-epidemic in The Netherlands, *Vet. Microbiol.* (2008) 129:156-162.
  30. Barrat-Boyes, S.M., Rossitto, P.V., Taylor, B.C., Ellis, J.A., MacLachlan, N.J. Response of the regional lymph node to bluetongue virus infection in calves. *Vet. Immunol. Immunopathol.* (1995) 45, 73-84.
  31. Dercksen D, Groot Nibbelink N, Paauwe R, Backx A, van Rijn P, Vellema P. [First outbreak of bluetongue in goats in The Netherlands] *Tijdschr Diergeneeskd.* (2007) 15;132(20):786-90. Dutch.
  32. Rodríguez-Sánchez B, P.J. Sánchez-Cordón, V. Molina, M.A. Rialde, A.C. Pérez de Diego, J.C. Gómez-Villamandos, J.M. Sánchez-Vizcaíno. Detection of bluetongue serotype 4 in mouflons (*ovies aries musimon*) from Spain. *Vet microbiol* (2009) (en prensa).
  33. Ellis J.A., Luedke A.J., Davis W.C., Wechsler S.J., Mecham J.O., Pratt D.L., Elliott J.D., T lymphocyte subset alterations following bluetongue virus infection in sheep and cattle, *Vet. Immunol. Immunopathol.* (1990) 24:49-67.
  34. Barrat-Boyes SM, MacLachlan N.J., Dynamics of viral spread in bluetongue virus infected calves. *Vet. Microbiol.* (1994). 40 (3-4): 361-71.
  35. Koumbati M, Mangana O, Nomikou K, Mellor PS, Papadopoulos O. Duration of bluetongue viraemia and serological responses in experimentally infected European breeds of sheep and goats. *Vet Microbiol.* (1998)12;64(4):277-85.
  36. Brewer AW, MacLachlan NJ. The pathogenesis of bluetongue virus infection of bovine blood cells in vitro: ultrastructural characterization. *Arch Virol.* (1994)136(3-4):287-98.
  37. Bonneau K.R., DeMaula C.D., Mullens B.A., MacLachlan N.J., Duration of viraemia infectious to *Culicoides sonorensis* in bluetongue virus-infected cattle and sheep, *Vet. Microbiol.* (2002) 88:115-125.
  38. Shad G., Wilson W.C., Mecham J.O., Evermann J.F., Bluetongue virus detection: a safer reverse-transcriptase polymerase chain reaction for prediction of viremia in sheep, *J. Vet. Diagn. Invest.* (1997) 9:118-124 .
  39. Whetter L.E., MacLachlan N.J., Gebhard D.H., Heidner H.W., Moore P.F., Bluetongue virus infection of bovine monocytes, *J. Gen. Virol.* (1989) 70:1663-1676.

40. MacLachlan N.J., Nunamaker R.A., Katz J.B., Sawyer M.M., Akita G.Y., Osburn B.I., Tabachnick W.J., Detection of bluetongue virus in the blood of inoculated calves: comparison of virus isolation, PCR assay, and in vitro feeding of *Culicoides variipennis*, *Arch. Virol.* (1994) 136:1-8.
41. Brodie S.J., Wilson W.C., O'Hearn P.M., Muthui D., Diem K., Pearson L.D., The effects of pharmacological and lentivirus-induced immune suppression on orbivirus pathogenesis: assessment of virus burden in blood monocytes and tissues by reverse transcription in situ PCR, *J. Virol.* (1998) 72:5599-5609.
42. Takamatsu H., Mellor P.S., Mertens P.P., Kirkham P.A., Burroughs J.N., Parkhouse R.M., A possible overwintering mechanism for bluetongue virus in the absence of the insect vector, *J. Gen. Virol.* (2003) 84:227-235.
43. Lunt R.A., Melville L., Hunt N., Davis S., Rootes C.L., Newberry K.M., et al., Cultured skin fibroblast cells derived from bluetongue virus-inoculated sheep and field-infected cattle are not a source of late and protracted recoverable virus, *J. Gen. Virol.* (2006) 87:3661-3666 .
44. Lobato Z.I., Coupar B.E., Gray C.P., Lunt R., Andrew M.E., Antibody responses and protective immunity to recombinant vaccinia virus-expressed bluetongue virus antigens, *Vet. Immunol. Immunopathol.* (1997) 59:293-309 .
45. Erasmus B.J. Bluetongue virus. In: Dinter Z., Morein B., editors. *Virus infections of ruminants.* (1990) Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V.p. 227-237.
46. Jeggo M.H., Wardley R.C., and Brownlie J. A study of the role of cell-mediated immunity in blue tongue virus infection in sheep, using cellular adoptive transfer techniques. *Immunology* (1984) 52, 403-410.
47. Jeggo M.H., Gumm I.D., Taylor W.P., Clinical and serological response of sheep to serial challenge with different bluetongue virus types, *Res. Vet. Sci.* (1983) 34:205-211.