

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA



TESIS DOCTORAL

**Mejora y evaluación de vacunas basadas en vectores víricos
frente a orbivirus y bunyavirus transmitidos por vectores**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Sandra Moreno Fernández

Directores

Alejandro Brun Torres
Francisco Javier Ortego Alonso

Madrid

© Sandra Moreno Fernández, 2021



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

**MEJORA Y EVALUACIÓN DE
VACUNAS BASADAS EN
VECTORES VÍRICOS FRENTE A
ORBIVIRUS Y BUNYAVIRUS
TRANSMITIDOS POR VECTORES**

TESIS DOCTORAL

Sandra Moreno Fernández

Directores

Alejandro Brun Torres

Francisco Javier Ortego Alonso

Madrid, 2020

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA

**Instituto Nacional de Investigación y tecnología agraria y alimentaria.
Centro de Investigación en Sanidad Animal. INIA-CISA**



Memoria presentada por Sandra Moreno Fernández para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid. Madrid, 4 de Noviembre de 2020.

El trabajo recogido en esta memoria ha sido realizado en el grupo de Inmunoprofilaxis de enfermedades virales transmitidas por vectores, en el Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA) perteneciente al Instituto Nacional de Investigación y tecnología Agraria y alimentaria (INIA).

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dar las gracias a todos los que me han apoyado en este camino y los que han contribuido en este trabajo. En primer lugar, muchas gracias a mis directores, Javier y Alejandro. Gracias a los dos por darme la oportunidad de trabajar con vosotros, por abrirme las puertas de vuestros laboratorios y dedicarme todo el tiempo necesario, gracias por todo lo que me habéis enseñado.

Gracias a Alex, que con infinita paciencia respondía a todas nuestras dudas a pesar de tener detrás siempre a varios pollitos y aun así siempre tenía un momento para ayudarnos y solucionar cualquiera de nuestros líos (y también por jugar al pingpong conmigo, para eso también hay que tener mucha paciencia). Muchas gracias a Eva, gracias por ayudarme con todos los experimentos, por ayudarme con el citómetro, por enseñarme a manipular ratones y sobre todo por tu apoyo y tu buen humor. Y en general muchas gracias a todo el L-18, los que estuvieron y los que estais, Aitor, Sergio y Luis. Muchísimas gracias Gema, por todos tus consejos, los del laboratorio y también los de la vida, ha sido un placer compartir laboratorio contigo. Muchas gracias Belén, por estar siempre dispuesta a solucionarme cualquier duda y por tus consejos cuando tenía que dar charlas. A Elena, que aunque haga algún tiempo que dejo de estar por aquí, siempre será la mejor compi de labo del mundo, gracias por los ratos buenos y también por tu apoyo en los no tan buenos. Miles de gracias a los chicos del L-5, Miguel, Dani y José, más que compañeros amigos, gracias por los ratos de café con charlas científicas y no tan científicas, gracias por las risas y gracias por solucionarme dudas y dejar que de vez en cuando os tome prestado algún reactivo. Gracias especiales a Dani por aguantar mis charlas en días malos y convertirlos en mejores con conversaciones sin sentido. Muchas gracias a Nuria, por estar siempre dispuesta a echarme una mano. Gracias al Dr Friedemann Weber y Stephanie DeVignot, sin su colaboración esta tesis no se habría podido llevar a cabo. Gracias a Julio Benavides por su ayuda en los experimentos de ovejas. Me gustaría acordarme también de gente de prácticas que ha pasado por el laboratorio en este tiempo, como Raquel, María, Miguel Ángel y María Elena: gracias por los momentos que hemos compartido. Gracias Ana Domench por estar siempre pendiente de todos los papeleos y fechas y siempre dispuesta a ayudarme con cualquier cosa.

Gracias también a mi familia, primos, tíos, por vuestro interés y apoyo. A mis amigos, en especial a Bea que lleva apoyándome desde que teníamos 6 años y todavía me aguanta estoicamente. Muchísimas gracias María, no habría llegado hasta aquí sin ti. Muchísimas gracias a mis padres, por todo, por ayudarme a conseguir mis metas y por vuestro interés sobre mi trabajo en el laboratorio.

ÍNDICE

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR	7
DECLARO QUE:	7
ABREVIATURAS	17
I. SUMMARY IN ENGLISH	23
II. RESUMEN EN ESPAÑOL.....	27
III. INTRODUCCIÓN	31
1 Historia y distribución geográfica	33
2 Morfología y genoma viral.....	36
1.1 Segmento L.....	37
1.2 Segmento M.....	37
1.3 Segmento S	38
2. Diversidad genética	39
3. Ciclo de infección viral	40
4. Transmisión de la enfermedad	42
5. Patogénesis de RVFV en ganado y humanos.....	45
6. Vacunas	46
6.1 Vacunas inactivadas.....	47
6.2 Vacunas atenuadas.....	47
6.2.1 Vacuna Smithburn	47
6.2.2 MP-12.....	47
6.2.3 Clone 13.....	48
6.3 Vacunas recombinantes.....	48
6.3.1 Vacunas basadas en vectores virales	48
6.3.2 Vacunas ADN	49
6.3.3 VLPs.....	49
6.3.4 Genética reversa.....	50
7. Virus de la lengua azul (BTV)	51
7.1 Historia y distribución.....	51
7.2 Genoma y morfología de BTV	52
7.2.1 VP2	54
7.2.2 NS1.....	54
7.3 Ciclo de replicación.....	55
7.4 Enfermedad y signos clínicos	56

7.5	Vacunas.....	58
7.5.1	Vacunas vivas atenuadas.....	58
7.5.2	Virus inactivados.....	58
7.5.3	Vacunas recombinantes	59
7.6	Modelo animal para lengua azul, ratones A129 (IFNAR -/-)	61
IV.	OBJETIVOS	62
V.	MATERIALES Y MÉTODOS	66
1.	Líneas celulares	68
2.	Virus	68
3.	Ratones y ovejas.....	68
5.	Generación de rRVFVs que expresan genes heterólogos.	70
6.	Clonaje de los virus recombinantes	71
7.	Análisis de la expresión <i>in vitro</i> de los virus rZH548-ΔNSs::BTV.....	73
8.	Radioinmunoprecipitación	74
9.	Análisis de la estabilidad de los virus recombinantes RVFV	75
10.	Generación de VLPs	76
11.	Generación de MVAs duales.....	77
12.	Análisis de la expresión <i>in vitro</i> de los virus rMVA duales	79
13.	Inmunización de ratones con rZH548-ΔNSs:: VP2 _{BTV-4}	80
14.	Inmunización con rZH548-ΔNSs::NS1Nt _{BTV-4} y detección de respuestas T CD8 ⁺ específicas por ICCS.....	81
15.	Transferencia pasiva de suero inmune	82
16.	Inmunización de ovejas con rZH548-ΔNSs::BTV y desafío con BTV-4.....	83
17.	Inmunización de ratones IFNAR-/- con VLPs de RVFV que expresan proteínas.....	83
18.	Inmunización con rMVA-GnGc-VP2, rMVA-GnGc-NS1 y rMVA-GnGc-NS1Nt y desafío con BTV-4 o RVFV	84
19.	Inmunización con rMVA-GnGc-NS1 y desafío con RVFV	85
20.	Inmunización de ovejas con rMVA-GnGc-NS1 y desafío con BTV-4 y RVFV.....	85
21.	Ensayo de neutralización para RVFV.....	86
22.	Ensayo de neutralización para BTV.....	86
23.	ELISA NP, VP2, VP7 y extracto de BTV-4	87
24.	Análisis bioquímicos	87
25.	Análisis estadístico	88
VI.	RESULTADOS	89
CAPITULO 1	91

1. Generación de virus recombinantes de RVFV que expresan antígenos de BTV.	93
2. Expresión de antígenos de BTV por los virus recombinantes RVFV	94
3. Caracterización de los virus recombinantes RVFV in vitro	96
4. Estabilidad genética de los rRVFV-BTV	98
5. Caracterización <i>in vivo</i> y evaluación de la atenuación de los rRVFV-BTV.....	100
6. Análisis de la respuesta humoral protectora frente a BTV tras la inoculación con rZH548- Δ NSsVP2 _{BTV-4} en ratones Balb/c.....	102
7. Protección inducida por rZH548- Δ NSs::VP2 _{BTV-4}	104
8. Respuesta celular inducida mediante la vacunación con rZH548- Δ NSs::NS1Nt _{BTV-4}	106
9. Inmunogenicidad inducida por los virus recombinantes en oveja	109
10. Eficacia de rRVFVs frente a desafío con BTV-4M en ovejas.....	112
11. Signos clínicos y viremia	112
12. Replicación de BTV-4 en las ovejas vacunadas	114
13. Análisis bioquímico de muestras de suero	114
CAPITULO 2	117
1. Generación de VLPs recombinantes de RVFV que expresan antígenos de BTV.....	119
2. Inoculación de VLPs en ratones IFNAR(-/-) y evaluación de su eficacia de protección en un desafío con BTV.....	120
CAPITULO 3	122
1. Expresión de proteínas heterólogas por parte del vector MVA	124
2. Respuesta inmune inducida por los rMVAs duales frente a RVFV y BTV en ratón	125
3. Protección frente a BTV en ratones IFNAR (-/-)	127
4. Protección frente a RVFV en ratones Balb/c.....	129
5. Respuesta inmune en ovejas inmunizadas con rMVA-GnGc-NS1.....	130
6. La vacunación con rMVA-GnGc-NS1 confiere protección frente a BTV en ovejas	131
7. La vacunación con rMVA-GnGc-NS1 confiere protección en oveja después de un desafío con RVFV	133
8. Parámetros bioquímicos tras la infección con RVFV	135
9. Estudio histopatológico tras la infección con RVFV	137
VII. DISCUSIÓN.....	139
1. Generación de virus recombinantes del virus de la fiebre del Valle del Rift que expresan antígenos heterólogos.....	141
2. Protección inducida por los virus recombinantes rRVFV en ratón	145
3. Protección inducida por los virus recombinantes en ovejas	147

4. Generación de rMVAs duales y análisis de la protección generada en el modelo murino	149
5. Evaluación de la protección inducida por el rMVA-GnGc-NS1 en el hospedador natural	150
VIII. CONCLUSIONES.....	155
IX. BIBLIOGRAFIA.....	159

ANEXO I. *Recombinant Rift Valley fever viruses encoding bluetongue virus (BTV): immunity and efficacy studies upon a BTV-4 challenge.* Sandra Moreno, Eva Calvo-Pinilla, Stephanie Devignot, Friedemann Weber, Javier Ortego and Alejandro Brun. (PLOS Neglected Tropical diseases aceptado, 2020)

ANEXO II. *A protective bivalent vaccine against Rift Valley fever and Bluetongue.* Eva Calvo, Alejandro Marin-Lopez, Sandra Moreno, Gema Lorenzo, Sergio Utrilla-Trigo. (NPJ vaccines, 2020).

ABREVIATURAS

A continuación se listan las abreviaturas y unidades más utilizadas en este trabajo. Para las abreviaturas, en algunos casos se indica su significado en inglés y en otros casos su traducción al castellano.

°C: Grados Celsius

aa: Aminoácido

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AHSV: African Horse Sickness virus

APS: Persulfato de amonio

ARV: Avian reovirus

ARN: Ácido ribonucleico

ARNcd: ARN de doble cadena

ARNes: ARN de cadena simple

ARNm: ARN mensajero

BHK-21: Baby hamster kidney

BSA: Albúmina de suero bovino

BTV: Bluetongue virus

CLP: Core-like particle

CMV: Citomegalovirus

ConA: Concanavalina A

C-terminal: Carboxilo terminal

CTL: Linfocito T citotóxico

DAPI: 4'-6-diamina-2'-fenilindol clorohidrato

DF-1: Douglas Foster-1, fibroblastos de embrión de pollo

DISA: Por sus siglas en inglés, Disabled Infectious Single Animal

DISC: Por sus siglas en inglés, Disabled Infectious Single Cycle

DIVA: Diferenciación entre animales infectados y vacunados

DL: Dosis letal

DMEM: Medio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco

dNTP: Desoxirribonucleótido trifosfato

D.O.: Densidad óptica

d.p.i: Días post-infección

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EHDV: Epizootic Hemorrhagic Disease virus

ELISA: Ensayo inmunoenzimático
EU: Unión Europea
g: Gramo
h: Horas
H5: High Five cells
HEK293: Células de riñón de embrión humano
HIV: Virus de la inmunodeficiencia humana
h.p.i.: Horas post-infección
His: histidina
IF: Inmunofluorescencia
IgG: Inmunoglobulina G
IP: Inmunoprecipitación
IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
Kb: Kilobases
kDa: Kilodalton
LB: Luria broth
log₁₀: Logaritmo en base 10
M: Molar
Min: Minutos
ml: Mililitro
MLV: Modified-live virus, virus vivo modificado
M.O.I.: Multiplicidad de infección
MS: Microesfera
MVA: Virus vaccinia modificado cepa Ankara
N: Normal
NP: nucleoproteína de RVFV
NSP: Proteína no estructural
Nt: nucleótido.
N-terminal: Amino terminal
ORF: Pauta abierta de lectura
OIE: Organización mundial para la salud animal
PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS: Tampón fosfato salino
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PFA: Paraformaldehído
Pol I: Polimerasa I
Pol: T7 Polimerasa T7
p/p: Peso/peso
p/v: Peso/volumen
RNasa: Ribonucleasa
RNP: Ribonucleoproteína
rNTP: Ribonucleótido trifosfato
RT: Retrotranscripción
RVFV: Virus de la fiebre del valle del Rift
SDS: Dodecilsulfato sódico
SFB: Suero fetal bovino
TA: Temperatura ambiente
TBS: Tampón tris salino
TBST: Tampón tris salino con Tween-20
TEMED: Tretametil etilendiamina
TMB: Tetrametil bencidina
µg: Microgramo
PFU: Unidades formadoras de placas
µL: Microlitro
UTR: Región no traducida
V: Voltio
Vero: African green monkey kidney
VNT: Test de neutralización viral
VV: Virus vaccinia.
VLP: Virus-like particle
VNT: Test de neutralización viral
VP: Proteína viral eestructural
v/v: Volumen/volumen
WB: Western blot
x-GAL: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranósido

I. SUMMARY IN ENGLISH

Climate and globalization can be major drivers for the spread of arboviral diseases. Bluetongue (BT), is a viral haemorrhagic disease of ruminants, causing high morbidity and mortality, highly prevalent in tropical and subtropical regions coinciding with the presence of competent *Culicoides* vectors. It became endemic in Europe since its first introduction from Africa and, nowadays, can only be controlled by vaccination. In the context of accelerated global warming other arboviral diseases of ruminants, such as Rift Valley fever (RVF), could follow similar introductory patterns, with unpredictable consequences for both animal and public health. Rift Valley fever virus (RVFV) is an arbovirus that causes periodic outbreaks in sub-Saharan Africa, Egypt, Yemen, Saudi Arabia and the Indian Ocean islands. In Africa, the re-emergence of Rift Valley fever (RVF) is usually associated to heavy rainfall seasons favouring overgrowth of mosquito species capable to transmit the virus transovarially. Preventive vaccination measures when risk of disease outbreak is high could help to ameliorate such consequences but these measures should bring additional benefits. A potential strategy to overcome this problem would be the use of multivalent vaccines that could provide immunity against a prevalent disease for which vaccination is mandatory while immunizing against other diseases of more sporadic nature.

In this work we explored three strategies for developing dual BT and RVF vaccines. Firstly, by generating recombinant RVF viruses encoding BTV antigens, secondly, by generating RVFV VLPs also encoding BTV antigens, and finally by the use of MVA recombinant virus expressing both RVFV and BTV vaccine antigens. We have used a RNA Pol I/II dependent reverse genetics system to generate both the recombinant RVFV and the RVFV VLPs that express the structural protein VP2 and the non-structural protein NS1 of Bluetongue virus (BTV). The recombinant viruses and the VLPs were characterized phenotypically and tested for their ability to induce protective immune responses against both RVFV and BTV antigens in mice. Our data strongly supported the feasibility of using RVFV as a viral vector vaccine. When assayed in mice the rRVFV and the rMVA vaccines were able to elicit specific immune responses against the heterologous antigens, demonstrating the induction of immunity and protection after challenge. Both vaccine strategies were also assayed in natural hosts (sheep) and evaluated in terms of immune responses induction and efficacy upon challenge.

II. RESUMEN EN ESPAÑOL

El clima y la globalización pueden ser causas fundamentales para la dispersión de enfermedades transmitidas por artrópodos. Lengua azul, es una enfermedad vírica hemorrágica que se da en rumiantes, causando una alta morbilidad y mortalidad, muy prevalente en regiones tropicales y subtropicales en los que hay presencia de vectores culex competentes. Es endémica en Europa desde la primera vez que fue introducida desde África y, hoy en día, solo se puede controlar mediante vacunación. En el contexto de un cambio climático global acelerado otras enfermedades arbovirales de rumiantes, como la fiebre del valle del Rift, podrían seguir patrones de introducción similares, con consecuencias impredecibles tanto para la salud animal como para la salud pública. El virus de la fiebre del valle del Rift es un arbovirus que causa brotes periódicos en el África sub-sahariana, Egipto, Yemen, Arabia Saudí y las islas del océano pacífico. En África, la re-emergencia de la fiebre del valle del Rift se asocia habitualmente con épocas de lluvias abundantes que favorecen el sobrecrecimiento de especies de mosquito capaces de transmitir el virus transováricamente. La vacunación preventiva cuando existe un alto riesgo de que ocurra un brote podría ayudar a disminuir las consecuencias pero estas medidas además podrían aportar beneficios adicionales. Una estrategia potencial para evitar este problema sería la utilización de vacunas multivalentes que pudieran conferir inmunidad frente a una enfermedad prevalente para la cual la vacunación fuera obligatoria y de esta manera inmunizar frente a otras enfermedades que se dan de manera más esporádica.

En este trabajo hemos explorado tres estrategias para desarrollar vacunas duales frente a lengua azul y fiebre del valle del Rift. La primera estrategia ha sido el desarrollo de virus de la fiebre del valle del Rift recombinantes que codifican antígenos del virus de la lengua azul, en segundo lugar hemos generado VLPs de RVFV que expresan antígenos del virus de la lengua azul y por último hemos utilizado virus MVA recombinantes que expresan antígenos vacunales tanto de BTV como de RVFV.

Para la generación de los virus recombinantes y las VLPs de RVFV hemos utilizado un sistema de genética *reversa* dependiente de ARN Pol I/II. Estas construcciones van a expresar la proteína estructural VP2 y la proteína no estructural NS1 de BTV. Tanto los virus de la fiebre del valle del Rift recombinantes, como las VLPs y los rMVAs se caracterizaron fenotípicamente y se testó su habilidad para inducir respuestas inmunes protectoras frente a RVFV y BTV en ratones. Nuestros datos con respecto a los rRVFVs apoyaban firmemente la viabilidad de usar RVFV como vector vacunal. Cuando se ensayaron en ratón los rRVFVs y los rMVAs fueron capaces de inducir una respuesta

inmune frente a los antígenos heterólogos, demostrando la inducción de inmunidad y protección después del desafío. Estas dos estrategias también se probaron en el hospedador natural (oveja) y se evaluó la inducción de respuesta inmune y su eficacia en un desafío.

III. INTRODUCCIÓN

El virus de la fiebre del Valle del Rift (RVFV) es un arbovirus perteneciente al género *Phlebovirus* de la familia *Phenuiviridae*, Orden Bunyvirales causante de una enfermedad homónima que afecta principalmente a rumiantes como ovejas, vacas y cabras, camellos, búfalos y otros, provocando abortos en hembras gestantes y alta mortalidad en animales neonatos. Es de carácter zoonótico y en el hombre produce generalmente síntomas leves similares a una gripe con fiebre, dolores articulares y dolor de cabeza. Más raramente la enfermedad causa en un 1-2% de los casos hepatitis, encefalitis y retinitis. En determinados casos, evoluciona a una enfermedad más grave, que puede conllevar disfunción neurológica en un 8% de los casos y fiebre hemorrágica en un 1% de los casos. De estos últimos un 50% de los casos pueden acabar en muerte (LaBeaud, Pfeil et al. 2015).

El virus se transmite principalmente a través de picaduras de mosquitos, aunque la transmisión también puede producirse por contacto directo con fluidos de animales virémicos o aerosoles. En África, los brotes de RVF son cíclicos, estando asociados a las épocas de fuertes lluvias tras largos períodos de sequías. Estas condiciones de aumento de humedad favorecen la eclosión de los huevos de mosquitos que se encuentran en diapausa (un estado de baja actividad metabólica) y por tanto el aumento de poblaciones de mosquitos que transmiten el virus entre los diversos hospedadores susceptibles.

La enfermedad es endémica en el África subsahariana, Egipto y Arabia Saudí, aunque existe riesgo de distribución del virus a zonas libres de enfermedad, debido al potencial de dispersión del virus y la presencia de vectores competentes en esas áreas. Por ello, RVFV está considerado como un patógeno zoonótico emergente/reemergente clasificado como un agente de nivel de bioseguridad BSL-3 en Europa y un agente BSL-4Ag en Estados Unidos.

1 Historia y distribución geográfica

El virus de la fiebre del Valle del Rift se identificó por primera vez en 1931 (Daubney 1931), en un brote que se originó en una granja en las cercanías del lago Naivasha en el Valle del Rift en Kenia, aunque ya se habían descrito con anterioridad brotes de una enfermedad de origen desconocido que causaba muertes en corderos y ovejas desde el año 1912 en la misma zona (Easterday 1965). Desde el primer gran brote, su distribución geográfica ha ido aumentando considerablemente.

La enfermedad estuvo limitada a la región oriental del Valle del Rift hasta la aparición del brote de 1950-51 en Sudáfrica. Durante este brote se contabilizaron 100.000 muertes y 500.000 abortos en ovejas. El agente causante de estos primeros brotes no fue identificado hasta el desarrollo de la enfermedad por parte del personal expuesto a los animales infectados (Mundel and Gear 1951). Posteriormente, tuvieron lugar brotes de la enfermedad en ganado vacuno y ovino en países subsaharianos como Zimbawe, Zambia y Mozambique (Dautu, Sindato et al. 2012)

En 1977 se reportó el primer brote en Egipto. El virus fue introducido a lo largo del curso del Nilo debido al comercio de ganado infectado (Johnson, Chanas et al. 1978). Durante este brote se detectaron 200.000 infecciones en humanos y al menos 594 muertes, además de grandes pérdidas económicas. La mortalidad y morbilidad observada en humanos durante este brote no había sido descrita anteriormente. Posteriormente, tuvieron lugar en el país más brotes en los años 1993, 1994, 1997 y 2003, que causaron muertes en el ganado aunque con un menor número de infecciones en humanos (Ahmed Kamal 2011).

En 1987, la enfermedad se detectó por primera vez en el oeste de África en Mauritania y Senegal. En los países del norte y oeste de África los brotes no están relacionados con la presencia de fuertes lluvias, sino que surgen asociados a la presencia de grandes ríos y a la construcción de presas (Saluzzo, Digoutte et al. 1987). Posteriormente en 1997-98, se reportaron brotes en Kenia, Somalia y Tanzania después de que ocurriera el fenómeno climático de El Niño y hubiera grandes inundaciones.

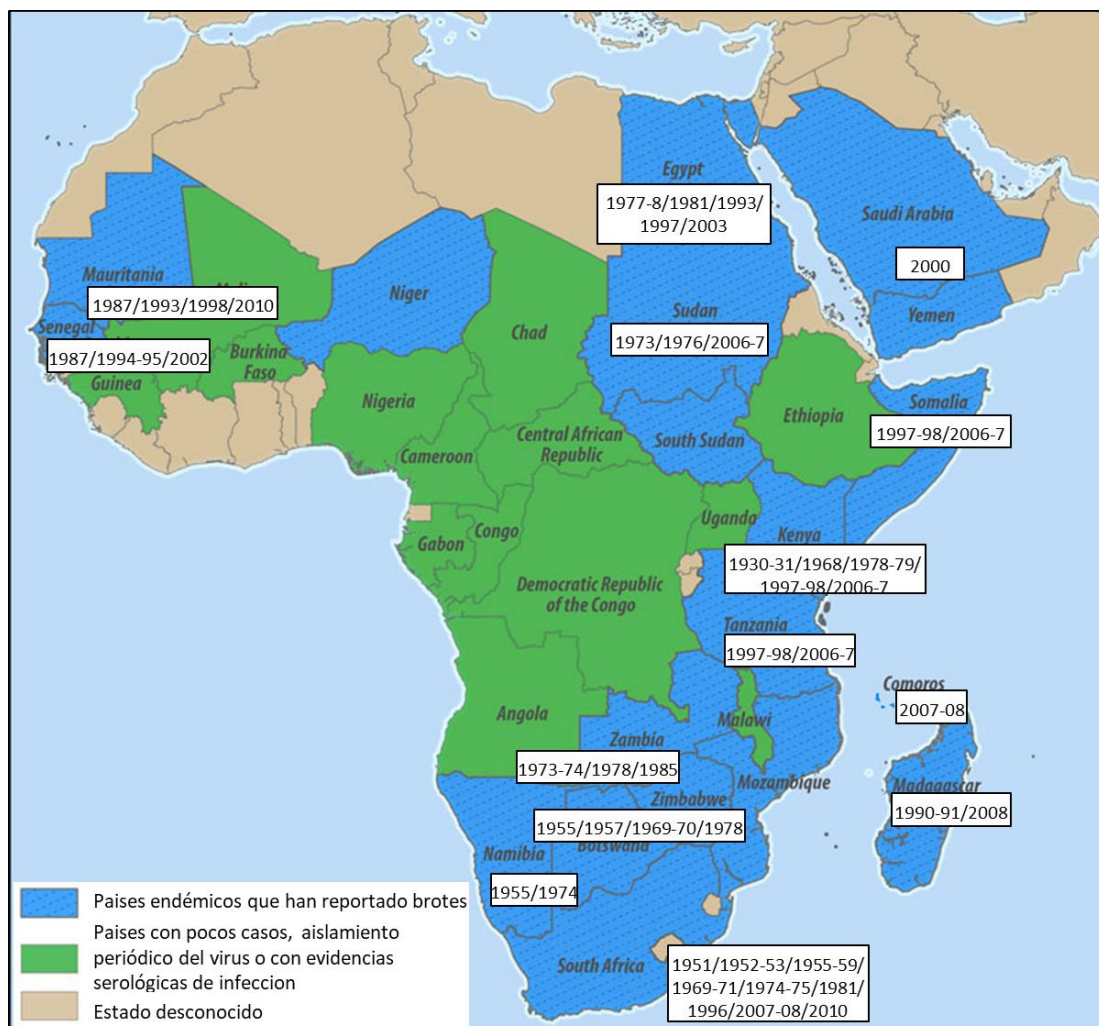
Los primeros focos de la enfermedad identificados fuera de África, se señalaron en Arabia Saudí y en Yemen en el año 2000 (Al-Hazmi, Ayoola et al. 2003), donde causó 2000 infecciones en humanos y 245 muertes además de una alta mortalidad en el ganado ovino y caprino (Ahmad 2000). De nuevo, la causa del brote se debió a la importación de animales infectados procedentes del Este de África. A su vez, las fuertes lluvias y la temperatura adecuada favoreció la presencia de vectores dando lugar a la aparición de la enfermedad (Jup, Kemp et al. 2002).

Además, el virus se ha detectado en Madagascar, Comoros y la isla francesa de Mayotte (Sissoko, Giry et al. 2009). Los brotes más recientes de la enfermedad se han localizado en el este de África, Somalia (2006–2007), Kenia (2006–2007), Tanzania (2007), Sudán (2007–2008), Sudáfrica (2010), República de Mauritania (2012) y República de Níger (2016). Según la organización mundial de la salud, durante el brote

de 2012 se comunicaron 36 casos de enfermedad en humanos con un resultado final de 18 muertes, y en el brote de 2016 se reportaron 105 casos entre los que hubo 28 muertes.

Actualmente, la enfermedad se considera endémica en Gambia, Senegal, Mauritania, Namibia, Sudáfrica, Mozambique, Zimbabwe, Zambia, Kenia, Tanzania, Sudán, Egipto, Madagascar, Arabia Saudí y Yemen. Los países que han presentado casos aislados, aislamiento periódico de virus o evidencia serológica de RVF han sido: Botsuana, Angola, República Democrática del Congo, Congo, Gabón, Camerún, Nigeria, República Central Africana, Chad, Níger, Burkina Faso, Mali, Guinea, Malawi, Uganda, Etiopía y Somalia (Figura 1.1).

Figura 1.1 Distribución geográfica y año de los brotes de RVF. Imagen adaptada del CDC



(www.cdc.gov)

Debido al incremento del alcance del virus, el alto número de posibles vectores que existen en zonas actualmente libres, como Europa, la intensificación del comercio internacional de ganado y el impacto del cambio climático, se cree que existe riesgo de introducción del virus en zonas libres de la enfermedad. RVFV está considerado como un patógeno zoonótico emergente.

2 Morfología y genoma viral

Los viriones del virus de la fiebre del Valle del Rift son esféricos con un tamaño de entre 80-120 nm de diámetro. La envuelta viral está formada por una bicapa lipídica de 7 nm cubierta con 122 capsómeros formados por heterodímeros de las glicoproteínas Gn y Gc dispuestos en una red icosaédrica y carece de proteína de matriz. La superficie de la envuelta presenta espículas de 9 nm de longitud que se encuentran embebidas en la bicapa lipídica. Esta envuelta se encuentra rodeando al genoma viral que tienen un tamaño de 12 kilobases (kb) y está formado por tres segmentos genómicos de ARN de polaridad negativa y cadena sencilla, denominados L, M y S.

Las ribonucleoproteínas (RNP) de los bunyavirus son filamentosas y tienen una longitud de entre 200-3000 nm y se sabe que es una estructura en forma de cuerda a diferencia de las otras RNPs de virus de ARN de polaridad negativa (Gaudreault et al., 2019; Ikegami, 2012). La proteína N forma estructuras hexaméricas en forma de anillo y se cree que el ARN viral se enlaza con esta estructura.

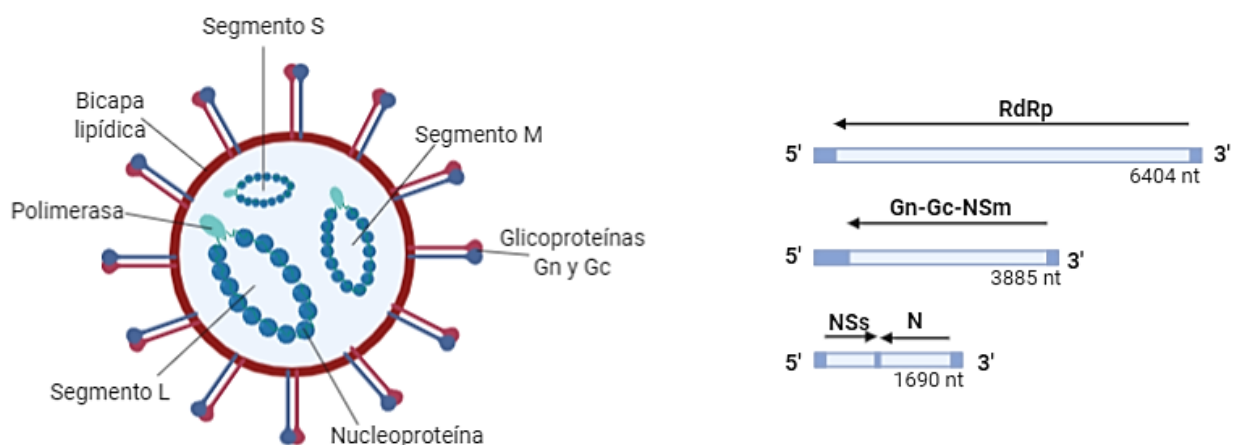


Figura 1. 2 A. Representación de la partícula viral, en la que se muestran las glicoproteínas insertadas en la envuelta del virus. En su interior se pueden ver los tres segmentos del genoma del virus. Representación esquemática de los tres segmentos del genoma del RVFV. Las flechas indican los ORF en cada segmento, que están flanqueados por las regiones no codificantes.

1.1 Segmento L

El segmento L, de 6404 nucleótidos, codifica la ARN polimerasa dependiente de ARN. Es la proteína viral de mayor tamaño con 238 kDa siendo crucial para el ciclo del virus, ya que sintetiza tanto el ARNm viral como el ARN genómico. Es esencial que forme oligómeros para la realización de sus funciones (Zamoto-Niikura, Terasaki et al. 2009), la replicación y transcripción del genoma viral junto a la nucleoproteína (Lopez, Muller et al. 1995), y para su actividad endonucleasa (Reguera, Weber et al. 2010).

1.2 Segmento M

El segmento M, de 3885 nucleótidos, codifica inicialmente una poliproteína que es posteriormente dividida en 5 proteínas mediante una endopeptidasa no caracterizada (Ikegami, 2012). Las 5 proteínas a las que da lugar son, la glicoproteína Gn de 56 kDa, la glicoproteína Gc de 65 kDa, la proteína no estructural NSm de 14 kDa, y una proteína de 78 kDa que es una forma conjunta de las proteínas NSm-Gn (Won, Ikegami et al. 2006, Gerrard, Bird et al. 2007). Para la generación de estas 5 proteínas el segmento M contiene cinco codones de iniciación potenciales situados en dirección 5' de la región codificante de Gn. En un estudio realizado por Kreher et al se vio que el codón AUG 3 inicia la expresión de una proteína denominada P78, que lleva las proteínas NSm y Gn fusionadas, que influye críticamente la diseminación del virus en el huésped invertebrado.

Las glicoproteínas Gn y Gc, se encuentran en la superficie del virión formando espículas que se agrupan en capsómeros. Son responsables del reconocimiento y unión al receptor celular. Al ser los componentes más expuestos durante la infección, son reconocidos por el sistema inmune y son capaces de inducir una respuesta inmune protectora en el hospedador mediada por anticuerpos neutralizantes (Pepin, Bouloy et al. 2010). Diferentes ensayos han descrito la presencia de epítomos neutralizantes en las glicoproteínas Gn y Gc de RVFV (Keegan and Collett 1986, Besselaar and Blackburn 1991). También se ha demostrado que la región C-terminal de la glicoproteína Gn es imprescindible para la inducción de anticuerpos neutralizantes (Dalrymple 1989). Cuando la glicoproteína Gc se expresa individualmente se localiza en el retículo endoplasmático pero cuando se co-expresa con Gn se localizan en el aparato de Golgi, donde ambas proteínas son glicosiladas (Gerrard and Nichol 2002). El correcto procesamiento de las glicoproteínas y su co-localización en el aparato de Golgi son esenciales para la maduración y la salida del virión. Se ha buscado la

secuencia exacta de la que depende la localización, pero debido a lo poco conservadas que están las secuencias de las regiones carboxi-terminales de Gn dentro de los diferentes miembros del género, es posible que existan diferentes estrategias para la localización. Debido a que los bunyavirus no tienen proteínas de la matriz, se supone que las glicoproteínas son responsables del reclutamiento de los demás componentes del core del virión. Y también se ha sugerido en algunos trabajos que la Gc del RVFV interacciona con las RNPs y es la responsable del empaquetamiento del genoma y de la salida de los viriones tal y como ya se ha descrito para otros Phlebovirus (Overby, Pettersson et al. 2007).

Con respecto a la función de la proteína NSm varios estudios sugieren que esta región codificante inmediatamente anterior a Gn tiene un papel modulando la apoptosis inducida por el virus (Won, Ikegami et al. 2007). En otros estudios en los que se empleó un virus virulento al que se le había delecionado el gen NSm, no se observaron alteraciones en la virulencia o la letalidad. Por lo tanto, su papel exacto en la patogénesis todavía se desconoce.

1.3 Segmento S

El segmento S, de 1690 nucleótidos, codifica los ORFs de la nucleoproteína N, de 25 kDa, y de la proteína no estructural NSs, de 31 kDa. El ARNm de la nucleoproteína se transcribe en sentido genómico mientras que el ARNm de la proteína NSs se transcribe en sentido antígenómico.

La nucleoproteína N es una proteína estructural de 27 kDa que forma estructuras en forma de anillos hexaméricos (Ferron, Li et al. 2011) y junto con la RdRp es indispensable para la replicación y transcripción viral, así como para el empaquetamiento del ARN. Esta es la proteína más abundante en el virión y tiene un papel importante en la protección del ARN viral al que envuelve para formar la ribonucleocapside. Además la proteína N juega un papel activo tanto en la replicación y transcripción del ARN como en el ensamblaje del virus. N es la proteína más conservada dentro del género Phlebovirus (Xu, Watts et al. 2013). Aunque se sabe que la nucleoproteína no está directamente involucrada en la patogénesis, experimentos utilizando proteína N recombinante han mostrado que confiere una protección inmune parcial (Lagerqvist, Naslund et al. 2009). La proteína N es muy inmunogénica y produce una gran cantidad de anticuerpos no neutralizantes en los animales infectados (Wallace, Ellis et al. 2006). Esta propiedad ha permitido el desarrollo de metodologías para la

detección serológica de la infección el virus en animales, siendo posiblemente el método de diagnóstico más empleado en la actualidad.

La proteína NSs posee tropismo nuclear, donde forma estructuras filamentosas e interacciona con diferentes proteínas de la célula (Swanepoel and Blackburn 1977). Es considerada el principal factor de virulencia responsable de facilitar la traducción viral y reprimir la respuesta innata inmune del hospedador ya que inhibe de forma específica la activación del promotor de IFN- β (Boshra, Lorenzo et al. 2011, Ly and Ikegami 2016, Wuerth and Weber 2016). La NSs expresada en momentos tempranos de la infección actúa como un represor de la transcripción celular del hospedador y está involucrada en la inducción de la parada del ciclo celular. La proteína NSs también promueve la degradación de la PKR (Habjan, Pichlmair et al. 2009) lo que interfiere con las defensas antivirales del hospedador mediante la inactivación de un importante sensor citosólico de intermediarios de replicación viral (Dauber and Wolff 2009). Aparte de estas funciones se han descrito otras muchas relacionadas con la interrupción de síntesis de proteínas de la célula huésped. Los mutantes de delección de NSs son la base para la generación de virus vacunales atenuados (Muller, Saluzzo et al. 1995).

2. Diversidad genética

RVFV presenta un único serotipo, y existen, según análisis filogenéticos realizados con secuencias genómicas parciales del segmento M, quince linajes (Grobbelaar, Weyer et al. 2011). Dentro de estos linajes, se pueden encontrar cepas de distinta procedencia.

Dado que tienen el genoma segmentado, los virus pertenecientes a la familia *Bunyaviridae* pueden intercambiar segmentos completos entre miembros del mismo género o serogrupo. La primera evidencia de recombinación para RVFV fue detectada por Sall *et al.*, que descubrió que un virus aislado en 1987 en Mauritania presentaba segmentos de dos clusters distintos, llegándose a detectar en un 25% de las cepas analizadas (Sall, Zanotto et al. 1999) estas combinaciones de segmentos genómicos de virus de distintos orígenes geográficos indican que la mayoría de las veces la recombinación se da cuando ocurre una coinfección de un único individuo con dos cepas de virus. También existen estudios en los que se han comprobado estos intercambios tanto *in vitro* en infecciones de cultivo celular (Saluzzo and Smith 1990), como *in vivo* en infecciones experimentales con dos cepas virales en mosquitos (Turell, Saluzzo et al. 1990).

Por último, se ha propuesto que la divergencia del RVFV con respecto a un ancestro común ocurrió en los años 1880/90, asociado a la introducción de un gran número de ovejas y terneros procedentes de Europa durante el período colonial que facilitaron un nuevo nicho para un virus progenitor desconocido. Posteriormente, los ratios de evolución del virus han sido similares a los de otros virus ARN. Por todo ello, la baja diversidad de nucleótidos está relacionada probablemente a la reciente derivación de un ancestro común, más que a la estabilidad del genoma del virus (Grobbelaar, Weyer *et al.* 2011).

3. Ciclo de infección viral

Los bunyavirus se diferencian de la mayoría de los virus de ARN de cadena doble en que ellos suelen ensamblarse en factorías virales en forma de tubo que construyen en torno al aparato de Golgi.

La unión celular de los flebovirus se lleva a cabo mediante interacción de las glicoproteínas con factores celulares del hospedador como DC-SIGN (Lozach, Kuhbacher *et al.* 2011), heparán sulfato o miosina no muscular. Se ha demostrado que DC-SIGN se une al virus directamente e interacciona con los N-glicanos ricos en manosa de las glicoproteínas virales, lo cual permite la entrada del virus en la célula y la infección de la misma (Meier, Helenius *et al.* 2012). Dado que los N-glicanos son típicos en las glicoproteínas derivadas de insectos, las interacciones entre DC-SIGN y los arbovirus son especialmente importantes (Svajger, Anderluh *et al.* 2010).

Por otra parte, se ha analizado el papel del glicosoaminoglicano heparán sulfato como receptor, ya que éste se localiza en la superficie de la mayoría de las células eucariotas. Este receptor es ampliamente utilizado por otros virus, y se ha demostrado que su presencia es requerida para la entrada eficiente del virus (de Boer, Kortekaas *et al.* 2012). A pesar de observarse una gran disminución de la infección por RVFV en células deficientes tanto en el receptor DC-SIGN como en glicosoaminoglicano heparán sulfato, existe una infección residual que indica la presencia de un factor de unión aún no identificado.

Después de la entrada del virus en la célula, los viriones que se encuentran en la endosoma temprano se disocian de DC-SIGN y continúan la vía de degradación hacia el endosoma tardío. El endosoma se acidifica lo que permite la fusión con la membrana viral, evitándose la degradación del virus (Lozach, Mancini *et al.* 2010). Diferentes análisis sugieren que la Gc es una proteína de fusión viral de clase II, y está

implicada en el proceso de fusión que permite la translocación del genoma viral al citoplasma (Garry and Garry 2004, de Boer, Kortekaas et al. 2012).

La fusión de las membranas endosomales y virales permiten la liberación del complejo de la ribonucleoproteína al citoplasma, lugar donde se producirá la transcripción y la replicación. Una vez en el citosol, se transcriben los tres segmentos virales a ARNm, y se sintetiza el ARN complementario (ARNc) que sirve de molde para el ARN viral durante la replicación viral. Las glicoproteínas Gn y Gc se traducen en el retículo endoplasmático rugoso como la proteína precursora Gn/Gc que será procesada por una señal peptidasa. La nucleoproteína y la polimerasa viral son sintetizadas en el citoplasma donde forman juntas con el nuevo ARN genómico producido el complejo de la ribonucleoproteína. Post-transcripcionalmente, la RdRp obtiene secuencias cap del ARNm del hospedador que se añaden al extremo 5' del ARNm viral, no siendo necesaria una cola de poliadenina en su extremo 3' para su posterior traducción en los ribosomas celulares. Las glicoproteínas se transportan al aparato de Golgi en ausencia de las otras proteínas virales, siguiendo la señal de localización que contiene la Gn, donde son glicosiladas. También se recluta el genoma y el resto de proteínas estructurales necesarias, antes de que se produzca la maduración de las partículas virales mediante *budding* en el lumen del aparato de Golgi. Por último, se produce la fusión de las vesículas citoplasmáticas con la membrana plasmática y se libera al exterior celular el virión maduro (Gerrard and Nichol 2002) como se muestra en la figura 1.3.

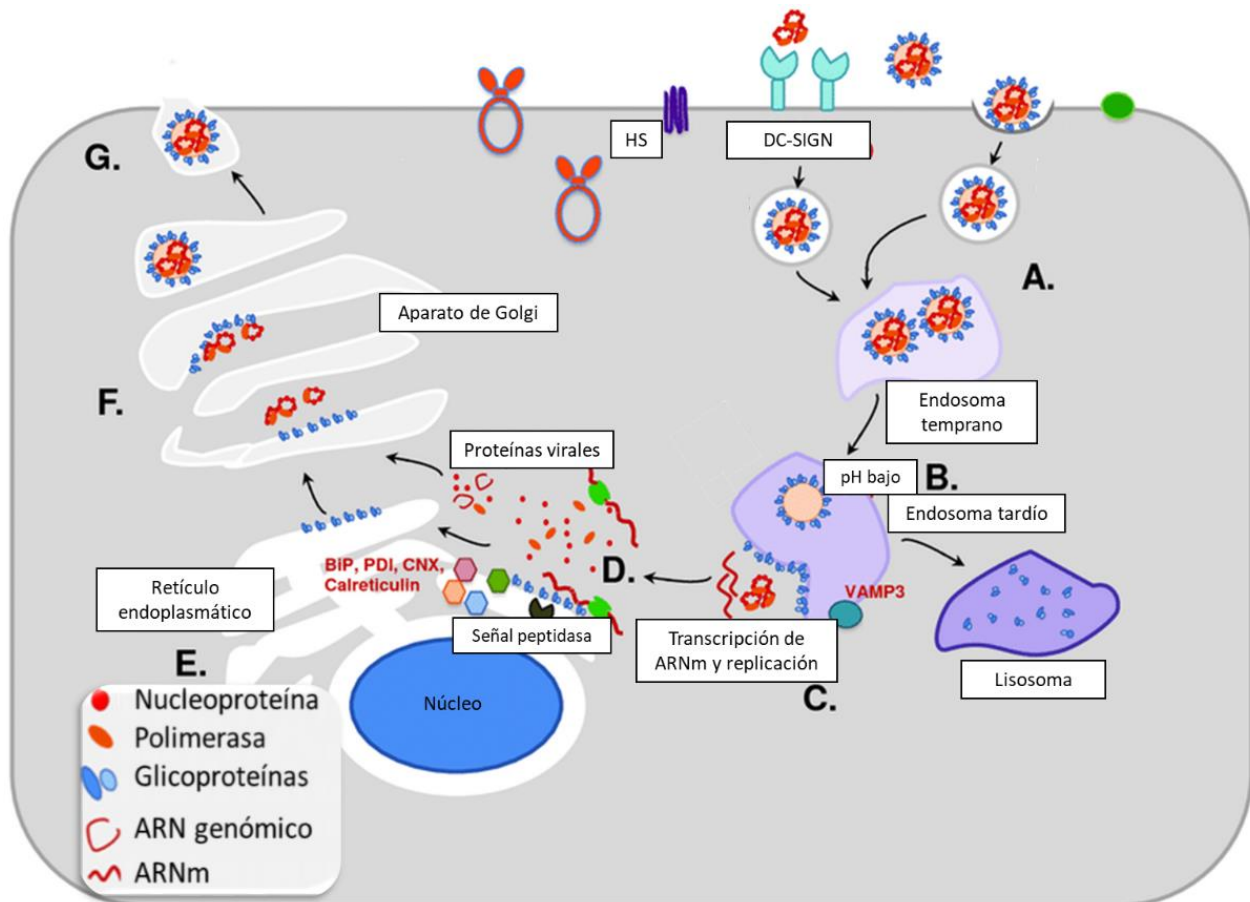


Figura 1.3. Representación del ciclo de replicación de RVFV. Imagen adaptada de (Wichgers Schreur, van Keulen et al. 2016)

4. Transmisión de la enfermedad

La transmisión del virus puede realizarse a través de mosquitos, por contacto directo al manipular tejidos procedentes de animales virémicos, así como por la inhalación de aerosoles y la ingestión de leche no pasteurizada o carne cruda de animales (Bouloy and Flick 2009).

RVFV ha sido aislado de distintos vectores incluyendo mosquitos, garrapatas y pulgas. Con respecto a los mosquitos se ha podido detectar en 30 especies diferentes. Los mosquitos del género *Aedes* son considerados el reservorio principal y los causantes del inicio de los brotes, ya que mantienen el virus durante las épocas secas en los huevos a los que se transmite por vía transovárica y que son resistentes a las épocas de sequía, pudiendo aguantar varios años enterrados (Balenghien, Cardinale et al. 2013). Se cree que los mosquitos del género *Culex* son importantes en la amplificación de la presencia del virus durante los brotes, alimentándose de rumiantes y humanos virémicos (Pepin, Bouloy *et al.* 2010). El virus también se ha detectado en flebotomos, mosquitos culicoides, y garrapatas del género *Amblyomma* aunque no se sabe con exactitud si estas

infecciones desempeñan un papel importante en el ciclo de vida del virus o en la configuración de brote de la enfermedad (Crabtree, Kent Crockett et al. 2012).

Los brotes de la enfermedad son cíclicos, y surgen en zonas habitualmente secas después de que se produzca un periodo de precipitaciones intensas o un aumento de la humedad. Estas condiciones favorecen la cría y el establecimiento de las poblaciones de mosquitos a partir de los huevos de *Aedes*, transmitiendo el virus entre los diversos hospedadores susceptibles. Posteriormente los animales infectados pueden ser picados por mosquitos del género *Culex* que amplificaran la presencia del virus permitiendo la dispersión (Lorenzo, Lopez-Gil et al. 2015). Los brotes ocurren cada 5-15 años en las regiones húmedas del Sur y Este de África donde los brotes están asociados a fuertes lluvias. Mientras que en las regiones secas del Norte y Oeste de África los brotes surgen cada 15-30 años relacionados con la presencia de campos de regadío y la construcción de presas (Gerdes 2004).

Se ha estudiado la posible existencia de reservorios entre diferentes animales salvajes, como búfalos, que podrían estar implicados en el mantenimiento del virus pero no se ha podido demostrar (Roger, Beral et al. 2014). Por otro lado, se detectó la presencia de anticuerpos frente al RVFV en pequeños roedores de la especie *Aethomys namaquensis* durante el período interepizootico de 1986-1990 en Sudáfrica (Pretorius, Oelofsen et al. 1997). Además, se ha logrado aislar virus en la especie *Rattus rattus* durante el brote ocurrido en Egipto durante el año 1977 (Imam, El-Karamany et al. 1979), lo que indicaría el posible papel de estos animales en el mantenimiento del patógeno.

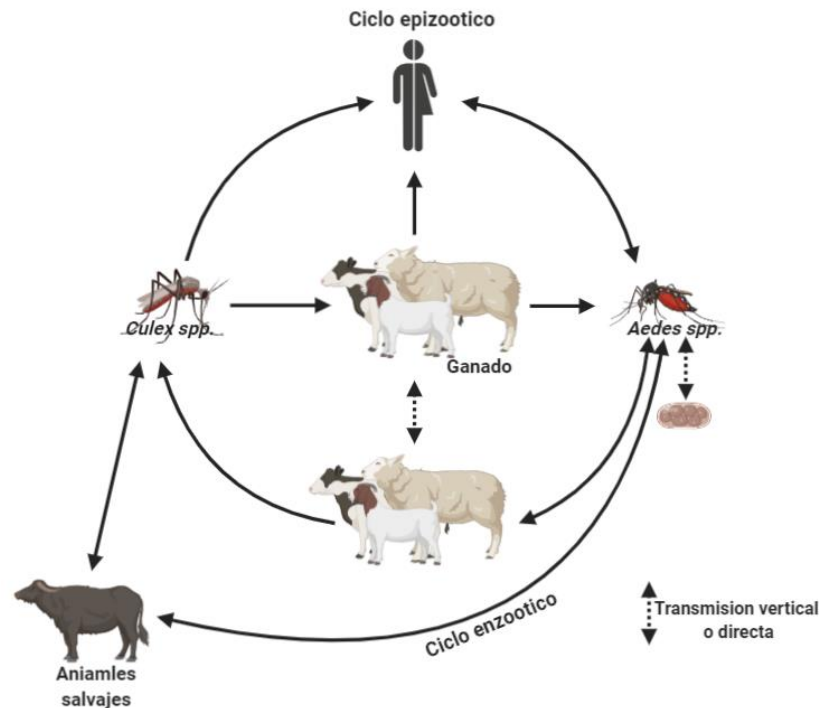


Figura 1.4. Ciclo de transmisión de RVFV. Imagen adaptada de Balenghien *et al.*, 2013.

Ciclo

Además de los brotes recurrentes que se dan en las zonas enzoóticas, en las últimas décadas el virus se ha dispersado a otros países dentro y fuera del continente africano, aparentemente debido al transporte comercial de animales infectados o el movimiento de mosquitos infectados. Estos brotes pueden ocurrir de dos maneras; en el primer caso el virus importado se introduce directamente al ganado y después ocurre una rápida amplificación y dispersión entre animales y humanos asociada a mosquitos, causando un ciclo epizoótico que será seguido de una epidemia. Si el virus también es transmitido a animales salvajes podría ocurrir que tras la epidemia, el virus persista en el ambiente volviéndose endémico de esa nueva región, (esto no ha ocurrido por el momento en ningún país de fuera de África). Una segunda opción es que el nuevo virus introducido infecte primero a los animales reservorio y mosquitos y se mantenga en el ambiente a un nivel bajo y que posteriormente emerja causando un brote entre el ganado y los humanos cuando las lluvias aumenten la población de mosquitos (Grobbelaar, Weyer *et al.* 2011).

Es complicado asegurar que el virus se ha establecido en países fuera de su área enzoótica original en África. Por ejemplo en Egipto han ocurrido varios brotes que sugieren que la enfermedad es ahora enzoótica en ese país y que se mantiene bajo

control gracias a la vacunación (Ahmed Kamal 2011), sin embargo en Madagascar también se han reportado varios brotes pero se cree que se deben todos a la introducción repetida de virus desde África más que a la persistencia del virus en el país (Carroll, Reynes et al. 2011).

5. Patogénesis de RVFV en ganado y humanos

Se cree RVFV invade los nódulos linfáticos subcutáneos del animal infectado donde se produce una primera replicación viral, y por los vasos linfáticos eferentes alcanza la circulación sanguínea para poder dirigirse a los órganos diana: hígado, bazo y cerebro. En el hígado la infección produce un daño celular que progresa en poco tiempo a necrosis hepática masiva, que es en humanos y animales la mayor lesión macroscópica que se puede observar. Además, se detectan alteraciones como hemorragias y petequias originadas por la vasculitis y la necrosis hepática producida por el virus. En el cerebro infecta neuronas lo que da lugar a encefalitis (Coetzer 1977, Coetzer and Ishak 1982). Los animales infectados presentan leucopenia, elevación de enzimas hepáticas asociados con daño hepático y trombocitopenia (Gerdes 2004). Se ha descrito la presencia de antígeno viral también en riñón, así como en la mayoría de células de bazo e hígado (Van der Lugt, Coetzer et al. 1996).

El virus tiene un amplio rango de hospedadores vertebrados donde los más susceptibles a la infección por el RVFV son las ovejas mientras que las vacas, cabras y camellos presentan una susceptibilidad variable. De las hembras gestantes entre el 90-100% abortan y el feto suele presentar malformaciones (Fafetine, Tijhaar et al. 2007). La mortalidad alcanza el 90%-100% en corderos menores de una semana de edad, además sufren una enfermedad aguda caracterizada por cursar con hepatitis necrótica. Sin embargo, las ovejas adultas son menos susceptibles con una mortalidad entre el 10% y el 30%. Aunque hay algunas razas de ovejas que también presentan signos hemorrágicos similares a los observados en humanos, los corderos tienen un período corto de incubación de 12 a 24 h con presencia de fiebre alta y mueren a las 24-72 h tras la infección.

En los terneros menores de 1 semana de edad se observa una mortalidad más baja, entre el 10% y el 70%, y la mortalidad en adultos también es menor, entre el 5% y el 10%. No obstante, el 90%-100% de las hembras gestantes infectadas abortan.

Los signos clínicos de los animales infectados son: fiebre, letargia, ictericia, descarga nasal, vómitos y diarrea fétida frecuentemente hemorrágica. Las lesiones

más frecuentes aparecen en hígado y pulmón, además de hemorragias y linfadenopatías. Estas lesiones se observan también en los fetos junto con placentitis necrótica.

En rumiantes silvestres la infección es inaparente, pero se ha observado abortos en hembras gestantes tanto en búfalos africanos como en camellos (Gerdes 2004, Flick and Bouloy 2005, Bird, Ksiazek et al. 2009, Ikegami and Makino 2011) y otras evidencias de infección en especies como camellos, murciélagos, leones y elefantes.

En el hombre, la aparición de síntomas tiene lugar tras un período de incubación de 4-6 días, típicamente comienza agudamente con fiebre y escalofríos, pudiéndose observar fiebre, mialgia, náuseas, debilidad, dolor articular y de cabeza (Ikegami 2012). Normalmente los síntomas iniciales se resuelven en 3-4 días pero suele haber recaídas y una recuperación completa puede tardar semanas. En muchos casos se presenta como una enfermedad leve, pero en 1-2% de casos se complica con la aparición de hepatitis, encefalitis, retinitis con pérdida transitoria de la visión, o fiebre hemorrágica pudiendo alcanzar en estos casos una mortalidad del 10-20% (Bird, Ksiazek *et al.* 2009). Algunos pacientes también desarrollan trastornos neurológicos cuando ya han pasado semanas o incluso meses de la aparición de la enfermedad.

6. Vacunas

Los brotes de RVFV indican que las infecciones humanas de FVR están causadas por contacto con ganado infectado, el que se considera el hospedador intermediario entre el vector y los humanos. Por tanto la vacunación rutinaria se considera esencial para controlar las infecciones de animales en los países endémicos y de esta manera controlar los grandes brotes de la enfermedad, la aparición de casos en humanos y las pérdidas económicas causadas por los brotes. Se sabe que la inmunidad humoral es suficiente para proteger frente a las infecciones por RVFV (Niklasson, Meadors et al. 1984) mientras que no se conoce con exactitud qué papel juega la inmunidad celular. En la actualidad no existe ninguna vacuna aprobada para su uso en humanos, sin embargo para el ámbito veterinario existen tres vacunas aprobadas que se utilizan para rumiantes en países endémicos.

La vacuna ideal de RVFV debe ser eficiente, segura, estable, debe conferir una respuesta humoral rápida y duradera además tener un bajo coste. Las primeras vacunas generadas frente a la enfermedad estaban basadas en virus atenuados o inactivados. Las vacunas inactivadas son más seguras pero menos inmunogénicas mientras que las

atenuadas inducen una elevada inmunogenicidad tras una única dosis pero presentan efectos adversos como abortos y teratogénesis. El principal inconveniente de las vacunas atenuadas es su posible reversión a la virulencia, estando por ello prohibido su empleo en países no endémicos.

6.1 Vacunas inactivadas

La primera vacuna frente a RVFV, denominada NDBR103 (Randall *et al.*, 1962), estaba inactivada mediante formalina y se desarrolló a partir de la cepa Entebe aislada de mosquitos en Uganda. Esta vacuna se usó para vacunación de seres humanos en el brote de Egipto de 1977. Posteriormente se generó otra vacuna mediante inactivación con formalina a partir de la cepa Smithburn, denominada TSI-GSD200 (Pittman *et al.*, 1999), que se utilizó para la vacunación de soldados. Todas estas vacunas causaban eritema, sensibilidad, inflamación y dolor en la zona de inyección. La necesidad de revacunaciones y los altos costes de producción son algunos de los inconvenientes de estas vacunas.

6.2 Vacunas atenuadas

6.2.1 Vacuna Smithburn

La vacuna Smithburn es una de las más antiguas y ampliamente utilizadas para el control de la enfermedad. El virus fue aislado en 1944 en Uganda a partir de un mosquito. Se trata de una cepa neurotrópica obtenida tras 82 pases en cerebro de ratón lactante, donde adquirió neurotropismo y perdió hepatotropismo (Smithburn 1949). Esta vacuna confiere protección tras una única dosis y la inmunidad conferida es de larga duración.

A pesar de la potencia y el bajo coste de producción, esta vacuna presenta varias desventajas como una patogenicidad residual, abortos, teratogénesis y reversión de la virulencia. Debido a todos estos efectos secundarios se prohíbe su uso en hembras gestantes y su uso no está permitido a países que estén libres del virus (Botros, Omar *et al.* 2006).

6.2.2 MP-12

Esta vacuna fue generada mediante 12 pases sucesivos de la cepa virulenta ZH548 en presencia del agente mutagénico 5-fluoracilo. Es una vacuna sensible a temperatura y que presenta mutaciones en sus 3 segmentos que son los que le confieren la atenuación.

La vacuna se evaluó en ovejas gestantes e interesantemente no produjo abortos, anomalías fetales o eliminación del virus a través de la leche. Solo produjo algunos

abortos o malformaciones cuando se administró en etapas tempranas de la gestación (Hunter, Erasmus et al. 2002). Esta vacuna induce unos niveles de anticuerpos neutralizantes que suficientes para proteger tras una única dosis.

Para los humanos, la vacuna MP12 ha demostrado ser segura e inmunogénica, y actualmente ha finalizado la Fase Clínica II como se detalla en la página web <http://clinicaltrials.gov/> (Bouloy and Flick 2009, Ikegami and Makino 2009).

6.2.3 *Clon 13*

El clon 13 se generó mediante la delección natural de un 70% del gen de la proteína NSs (549 nucleótidos) (Muller, Saluzzo *et al.* 1995). Se trata de un clon que se generó a partir de una placa de un virus previamente aislado de pacientes inmunocompetentes infectados con la cepa 74HB59 (Kortekaas, Oreshkova et al. 2011).

El clon 13 es una vacuna muy inmunogénica y se ha demostrado su capacidad para inducir anticuerpos neutralizantes capaces de proteger frente a un desafío viral también en terneros (Dungu, Louw et al. 2010, von Teichman, Engelbrecht et al. 2011). A pesar de que existen algunos estudios que dicen que la vacuna puede producir malformaciones y abortos (Makoschey, van Kilsdonk et al. 2016) también existen estudios realizados en vacas gestantes en las que se ha visto que no producía abortos ni efectos teratogénicos (Njenga, Njagi et al. 2015). Además se considera segura porque no produce viremia detectable en los animales vacunados lo cual reduce la posibilidad de transmisión del virus a mosquitos.

Otra ventaja de esta vacuna es que permite diferenciar fácilmente a los animales vacunados de los infectados (DIVA) ya que los animales inmunizados no desarrollarían anticuerpos frente a la proteína NSs. La principal desventaja de esta vacuna es que no produce una respuesta inmune a largo plazo (Fowzy and Helmy, 2019). Esta vacuna tiene licencia para ser utilizada en animales de granja en algunos países como Sudáfrica, Kenia, Botsuana y Namibia.

6.3 *Vacunas recombinantes*

6.3.1 *Vacunas basadas en vectores virales*

Actualmente se han utilizado muchos vectores virales que se pueden utilizar en la vacunación para controlar RVFV, entre ellos encontramos replicones de *Alphavirus*,

Adenovirus, *Poxvirus* y *Paramixovirus*. Estos vectores expresan las glicoproteínas Gn y/o Gc o proteínas no estructurales del virus.

Un ejemplo de este tipo de vacunas es la basada en el adenovirus de chimpancé ChAdOx1-GnGc que expresa ambas glicoproteínas e induce inmunidad tanto humoral como celular confiriendo una protección completa frente a la enfermedad en rumiantes (Warimwe, Lorenzo et al. 2013, Warimwe, Gesharisha et al. 2016). Otro ejemplo es una vacuna basada en el virus vaccinia modificado de la cepa Ankara (MVA) que expresa las glicoproteínas de RVFV y ha demostrado ser eficaz en el modelo murino (Lorenzo, Lopez-Gil et al. 2018).

6.3.2 Vacunas ADN

Desde que se descubrió que el ADN se podía introducir en los tejidos y expresar antígenos se han generado vacunas frente a varias enfermedades basadas en la utilización de plásmidos con un promotor fuerte que van a expresar antígenos protectores (Rajcani, Mosko et al. 2005). *Wallace et al.* generaron una vacuna basada en ADN que expresaba las dos glicoproteínas de RVFV e inducía una respuesta de anticuerpos protectores frente a la enfermedad pero que solo tenía una tasa de supervivencia del 20% en los ensayos en ratones. Una de las mayores ventajas de la utilización de vacunas de ADN es su gran estabilidad y su eficacia variable y su baja inmunogenicidad se puede mejorar a través de la aplicación de dosis de recuerdo con vacunas atenuadas o vectoriales (Lorenzo, Martin-Folgar et al. 2010).

6.3.3 VLPs

Las VLPs son partículas virales deficientes en replicación que son seguras para su utilización como vacunas ya que no contienen material genético y son muy inmunogénicas al ser morfológicamente muy similares al virus infeccioso. En el caso de RVFV se sabe que la vacunación con VLPs puede inducir la producción de anticuerpos neutralizantes hasta títulos de 1:1.250 y es capaz de proteger a ratones y ratas frente a un desafío con la cepa virulenta ZH548 (Naslund, Lagerqvist et al. 2009, Mandell, Koukuntla et al. 2010). La principal desventaja de las VLPs está asociada con los costes de producción y su baja estabilidad.

6.3.4 Genética reversa

Los sistemas de genética reversa han brindado la posibilidad de manipular cada segmento de RVFV para generar de este modo virus atenuados que han dado lugar a nuevas vacunas más seguras frente a la enfermedad. Estas vacunas presentan además la ventaja de ser DIVA, ya que la eliminación de un gen viral hace que se pueda diferenciar a los animales vacunados de los infectados.

Mediante estos sistemas se han generado diferentes mutantes de delección en los que se han eliminado las proteínas no estructurales, NSs y NSm, que se conocen como los principales factores de virulencia del virus. En 2008 se generó el virus rRVFV- Δ NSs:GFP- Δ NSm (Bird, Albarino et al. 2008) que está altamente atenuado debido a la ausencia de las proteínas NSs y NSm. Además se demostró que es altamente inmunogénico en ratas. La vacuna DDvax presenta igualmente delecionadas ambas proteínas y se ha demostrado su eficacia en terneras preñadas sin efectos adversos para los recién nacidos (Bird, Maartens et al. 2011).

Tanto los virus que presentan una delección como los que presentan las dos han demostrado ser muy inmunogénicos, induciendo fuertes respuestas de anticuerpos. Estos virus son seguros, sin producir reacciones adversas, ni provocar signos clínicos o inducir una viremia detectable en los animales.

La generación de todos estos mutantes de delección han demostrado la gran plasticidad del genoma del virus, que es capaz de aceptar secuencias de inserción e incluso segmentos extra en su genoma, lo cual abre la puerta a su utilización como vector vacunal. El primer RVFV que se generó que expresaba una proteína heteróloga fue el rRVFV- Δ NSs:GFP- Δ NSm que expresaba GFP. Posteriormente, Oreskova *et al* demostraron que se podían generar virus recombinantes que expresaran antígenos de otros virus generando un rRVFV que expresaba la hemaglutinina del virus influenza (HA) o un péptido CD8 asociado a tumores con el que se consiguió controlar el crecimiento de células de linfoma *in vivo*. A pesar de todos estos resultados exitosos, no se han hecho muchos más avances para intentar utilizar RVFV como un posible vector vacunal de otros antígenos relevantes en la vacunación frente a enfermedades de rumiantes. Esta carencia, junto con el ejemplo de éxito de la vacuna atenuada Y17D de la fiebre amarilla han sido el germen para el planteamiento experimental desarrollado en esta tesis doctoral. Nuestro objetivo por lo tanto ha sido explorar la utilización del RVFV atenuado como un vector vacunal para otras enfermedades de rumiantes, como es el caso de la enfermedad de la lengua azul (BTV).

7. Virus de la lengua azul (BTV)

El virus de la lengua azul (bluetongue virus, BTV) pertenece al género *Orbivirus* dentro de la familia *Reoviridae*. Por el momento, se han descrito 27 serotipos, aunque se están estudiando nuevos aislados que podrían ser nuevos serotipos del virus (Saegerman, Berkvens *et al.* 2008). BTV es el agente causal de la enfermedad de la lengua azul (bluetongue, BT) o fiebre catarral ovina, una enfermedad hemorrágica que afecta a rumiantes silvestres y domésticos y también a camélidos. Es transmitida por la mordedura de las hembras del género *Culicoides* (Maclachlan, Drew *et al.* 2009).

7.1 Historia y distribución

La lengua azul fue reconocida por primera vez cuando se introdujeron ovejas merinas en Sudáfrica a finales del siglo XVIII (Spreull 1905, Verwoerd and Gebhardt 2004), aunque seguramente la infección era endémica en rumiantes africanos desde la antigüedad. Hasta los años 40, la lengua azul fue una enfermedad endémica y exclusiva del continente africano, pero a partir de entonces se ha extendió por todos los continentes menos la Antártida. El primer brote de BTV confirmado fuera de África fue en Chipre en 1943 (Gambles 1949), y estuvo seguido de otros en Israel (Komarov 1951), Pakistán (Sarwar 1962) y en India (Sapre 1964). En los años en 50, se confirmó la infección de BTV en ovejas en California (Hardy and Price 1952, McKercher, McGowan *et al.* 1953). Sin embargo los análisis genéticos posteriores indicaron que algunos serotipos de BTV comparten una larga historia evolutiva en América del Norte (Heidner, Jezzi *et al.* 1991).

Actualmente la distribución geográfica de este virus es muy amplia. En el año 2006, con la aparición de brotes de BTV-8 en el norte de Europa, el virus cruzó el límite norte previamente descrito (Toussaint, Vandenbussche *et al.* 2006). En España el primer foco apareció en 1956, causado por BTV-10 (Manso-Ribeiro, 1957). Tras una campaña masiva de cuarentena, sacrificio y vacunación se llegó a erradicar el virus (Gorman 1990). Más tarde la enfermedad se trasladó a otros países europeos como Portugal (1959), Suecia (1960) y Grecia (1989). A partir de 2000 se declararon diversos focos en España, por BTV-2 y BTV-4. En 2006 sólo BTV-4 apareció en la península. En 2007, BTV-1 comenzó a afectar a toda España y el número de brotes declarados de serotipos 1 y 4 ascendió a 1.276. Mientras que los movimientos de BTV-2, 4, 9 y 16 parecen estar restringidos a la cuenca mediterránea, el área afectada por serotipo 1 se ha extendido recientemente a través de la Península Ibérica y Francia (Maclachlan, Drew *et al.* 2009). BTV puede ser introducido en áreas nuevas por el movimiento de rumiantes infectados o

por la dispersión de insectos infectados con el ganado o con el viento (Mintiens, Meroc et al. 2008). En agosto de 2006, BTV-8 fue detectado por primera vez en los Países Bajos (Enserink 2006). A finales del año 2006, aparecieron nuevos casos en Bélgica, Francia, Luxemburgo y Alemania (Saegerman, Berkvens *et al.* 2008). En enero de 2007, cuando la estación de los vectores finalizó, los brotes cesaron pero, sorprendentemente, el virus reapareció poco tiempo después (Hoffmann, Sasserath et al. 2008). Se cree que esta rápida re-emergencia de BTV-8 se debió a la supervivencia del virus durante el invierno. Tras el invierno de 2007, BTV-8 se siguió extendiendo dramáticamente por Europa y finalmente llegó al norte de España a principios del 2008. Aunque el brote fue controlado en el año 2010 gracias a la vacunación, el virus re-emergió de nuevo en Francia en el año 2015 muy posiblemente debido al uso de semen de toro congelado contaminado con BTV-8 (Pascall, Nomikou et al. 2020).

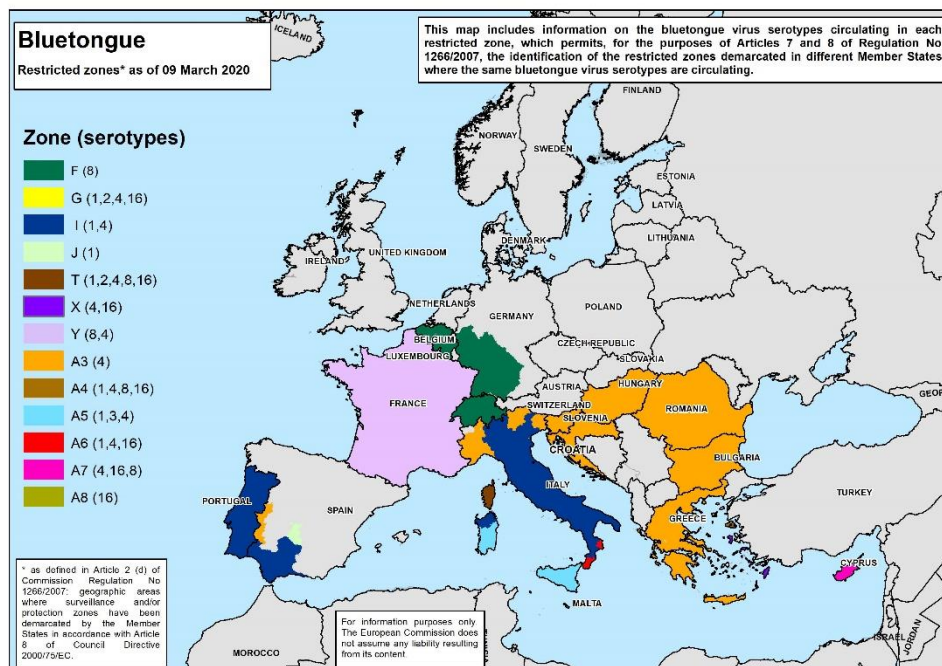


Figura 1.5. Mapa de UE con restricciones de movimiento de ganado por presencia de BTV (Comisión europea, Junio 2020). Origen:

https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/animals/docs/ad_control-measures_bt_restrictedzones-map.jpg

7.2 Genoma y morfología de BTV

El virus de la lengua azul posee un genoma segmentado compuesto por diez segmentos de ARN de doble cadena, los cuales en total son 19.200 pares de bases (pb). Tradicionalmente se creía que cada uno de estos segmentos era monocistrónico, codificando una única proteína. Sin embargo, recientemente se ha comprobado que dos de los segmentos genómicos presentan dos marcos abiertos de lectura diferentes (ORF)

(Belhouchet, Mohd Jaafar et al. 2011, Ratinier, Caporale et al. 2011, Stewart, Hardy et al. 2015). Cada uno de los segmentos codifica un único polipéptido, con excepción de los dos segmentos más pequeños (9 y 10), que codifican las proteínas VP6 y NS4, y NS3/NS3A y NS5, respectivamente (Mertens, Brown et al. 1984, Belhouchet, Mohd Jaafar et al. 2011, Stewart, Hardy et al. 2015).

El virión de BTV está formado por siete proteínas estructurales, de VP1 a VP7, que se disponen en tres capas concéntricas sin envoltura y con geometría icosaédrica con aproximadamente 80 nm de diámetro. La capa interna formada por VP3 define el core, donde se encuentra el genoma del virus (Gouet, Diprose et al. 1999). En torno al core se encuentra la capa intermedia formada por VP7 y finalmente rodeándolo todo se encuentra la capa externa formada por VP2 y VP5. Además durante el ciclo de infección se producen 5 proteínas no estructurales, NS1, NS2, NS3/ NS3A, NS4 and NS5 que no forman parte de la estructura del virión (Belhouchet, Mohd Jaafar et al. 2011, Ratinier, Caporale et al. 2011, Stewart, Hardy et al. 2015). La función y localización de cada proteína se encuentra descrita en la tabla 1.1.

Proteína	Localización	Función
VP1	Interior del core	ARN polimerasa dependiente de ARN
VP2	Cápside externa	Hemaglutinación Entrada en la célula Inducción de ab dependientes de serotipo
VP3	Core	Forma el soporte para el anclaje de VP7 Necesaria para la formación del virión
VP4	Interior del core	Cataliza la adición de residuos cap a los ARNm
VP5	Cápside externa	Permeabilización celular
VP6	Interior del core	Une ARNcs y ARNcd
VP7	Superficie del core	Posible función de entrada celular en el vector
NS1	No estructural	Forma estructuras tubulares citoplasmáticas. Regula la síntesis de las proteínas virales
NS2	No estructural	Forma cuerpos de inclusión

NS3/NS3A	No estructural	Salida del virión Modulación de la transcripción celular
NS4	No estructural	Antagonista de IFN Determinante de virulencia
NS5	No estructural	Posibles funciones nucleolares

Tabla 1.1 Función y localización proteínas de BTV

7.2.1 VP2

La proteína VP2 es la responsable de la unión al receptor celular (Huisman and Erasmus 1981), además se sabe que tiene capacidad hemaglutinante (Cowley and Gorman 1990) y es la principal inductora de anticuerpos neutralizantes durante la infección (Eaton and Cramer 1989, Urakawa, French et al. 1994, Hassan and Roy 1999).

VP2 es la proteína menos conservada del virión, siendo por tanto el principal determinante del serotipo de BTV, y por ello se utiliza a menudo en el diagnóstico de nuevos brotes de BTV (Mertens, Maan et al. 2007). Además es la diana principal de los anticuerpos neutralizantes generados por el sistema inmune del hospedador, por lo que se ha utilizado frecuentemente para el desarrollo de vacunas frente a la enfermedad.

7.2.2 NS1

NS1 es una proteína de expresión temprana en células infectadas y que se expresa en una cantidad mucho mayor que el resto de proteínas no estructurales (Kerviel, Ge et al. 2019). Se sabe que una vez en el citoplasma de la célula, múltiples copias de NS1 se ensamblan dando lugar a estructuras tubulares, típicas de las infecciones de orbivirus. Estas estructuras se asocian también con las factorías virales, y se ha sugerido que pueden tener un papel regulador en la síntesis de proteínas virales y la patogénesis (Owens, Limn et al. 2004, Kerviel, Ge et al. 2019). También se cree que podrían estar implicados en el transporte de las partículas virales hacia la membrana de la célula antes de su liberación.

En las infecciones por BTV se pueden detectar altos títulos de anticuerpos dirigidos frente a NS1, probablemente por su abundancia en el citoplasma (Richards, MacLachlan et al. 1988), aunque estos anticuerpos no presentan características neutralizantes. Sin embargo, una de las principales ventajas de esta proteína es que está altamente conservada y existen estudios que demuestran que es capaz de conferir protección multiserotipo (Marin-Lopez, Calvo-Pinilla et al. 2018). NS1 contiene epítomos asociados tanto con respuestas humorales como celulares de tipo T, que pueden ser importantes para la

protección. La zona más antigénica se encuentra localizada en su extremo C-terminal, sin embargo la mayoría de epítomos T CD8 se han identificado en el extremo N-terminal de la proteína NS1. Los estudios de Marín-López *et al.* Y Utrilla-Trigo *et al.* demuestran que la inmunización con la proteína NS1 o con su extremo N-terminal reducen la viremia a niveles asintomáticos en los animales vacunados minimizando la posibilidad de adquisición del virus por parte de los vectores (Marin-Lopez, Calvo-Pinilla *et al.* 2018, Utrilla-Trigo, Jimenez-Cabello *et al.* 2020).

7.3 Ciclo de replicación

El ciclo de replicación comienza con la unión del virión a la superficie celular por interacción entre VP2 y los receptores celulares (Eaton and Crameri 1989, Hassan and Roy 1999, Forzan, Wirblich *et al.* 2004). Las partículas del virus son internalizadas mediante endosomas revestidos por clatrina (Forzan, Marsh *et al.* 2007). Recientemente, se ha descrito que BTV puede llevar a cabo otras vías de endocitosis como la macropinocitosis (Gold, Monaghan *et al.* 2010) que no requiere de receptores celulares específicos. El aumento de la acidez de los endosomas, provoca el desensamblaje de la cápside proteica exterior (Eaton, Hyatt *et al.* 1990) y el core transcripcionalmente activo se libera al citosol celular (Huismans, van Dijk *et al.* 1987). La permeabilización de los dominios de VP5 da lugar a poros en la membrana endosomal (Hassan and Roy 1999) por donde se liberará el core, mientras que las proteínas de la cápside exterior quedan retenidas en el endosoma. BTV replica dentro del citoplasma de las células infectadas. Dentro del core, la proteína VP1 transcribe las copias de sentido positivo de ARNcs de cada uno de los diez segmentos (Boyce, Wehrfritz *et al.* 2004). A los ARN mensajeros resultantes la proteína VP4 les añade un residuo “cap” (Sutton, Grimes *et al.* 2007) y se liberan al citoplasma por canales localizados en los ejes del core (Mertens and Diprose 2004). Los ARNm virales actúan como molde para la traducción de las proteínas virales (Diprose *et al.*, 2001). Los ARNcs positivos son dirigidos a los cuerpos de inclusión viral (VIB) formados por NS2 fosforilada (Modrof, Lympelopoulos *et al.* 2005) y se encapsidan los diferentes segmentos dentro de la capa formada por la proteína VP3. Posteriormente, la proteína VP1 sintetiza las cadenas negativas de ARN para producir los ARNs de doble cadena (Boyce, Wehrfritz *et al.* 2004). Se ha propuesto que cada segmento de ARNcd se asocia con un complejo de transcripción diferente (VP1, VP4 y VP6) localizado por debajo de la capa formada por VP3, a lo largo de los 5 ejes observándose una forma de flor por criomicroscopía (Nason, Rothagel *et al.* 2004). Las proteínas VP2

y VP5 parecen ser añadidas a la superficie del core en la periferia de los VIB. Las partículas virales maduras son transportadas dentro del citoplasma a través de microtúbulos debido a la interacción de VP2 con la vimentina (Bhattacharya, Noad et al. 2007). La liberación de los ocurre por la desestabilización de la membrana celular mediante la actividad viroporina de la proteína NS3 (Han and Harty 2004) y probablemente facilitado por NS1 (Hyatt, Zhao et al. 1993, Guirakhoo, Catalan et al. 1995) en algunos casos vía *budding*, o como resultado de la lisis celular. Los 10 segmentos del genoma viral permanecen dentro del core a lo largo del ciclo de replicación, lo que evita la activación de los mecanismos de defensa de la célula. Tras la liberación de las nuevas partículas virales, estas iniciarán un nuevo ciclo de replicación en las células cercanas.

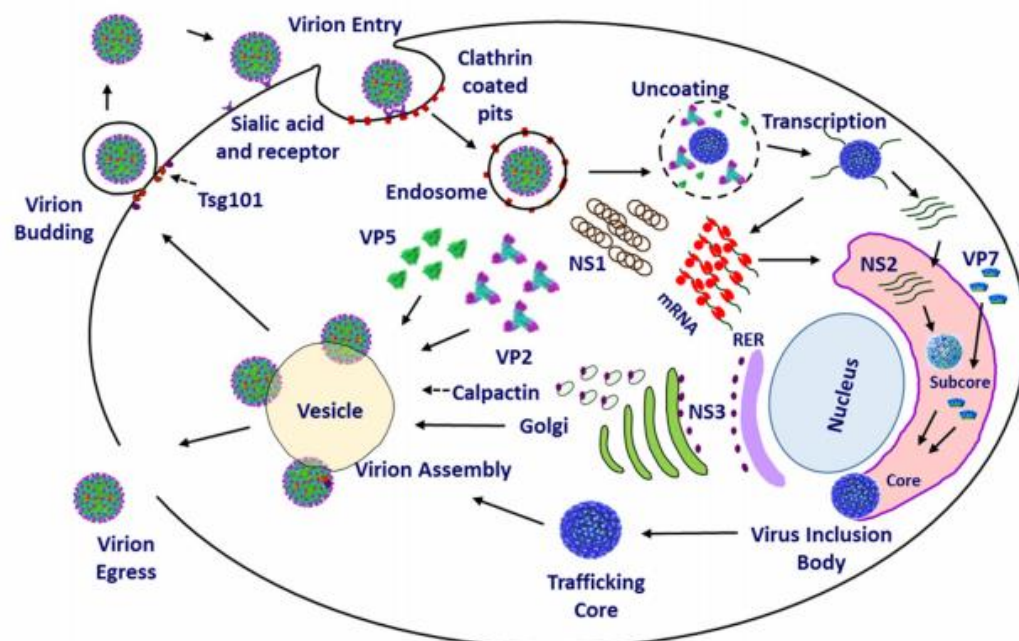


Figura 1.6. Ciclo de replicación de BTV. Imagen adaptada de Patel and Roy, 2014.

7.4 Enfermedad y signos clínicos

Los signos clínicos de esta enfermedad varían considerablemente entre los distintos hospedadores y las cepas virales (Maclachlan, Drew et al. 2009). El serotipo no presenta relación directa con la virulencia ya que existen cepas muy virulentas y otras más leves dentro del mismo serotipo (Kirkland and Hawkes 2004, Maclachlan, Drew et al. 2009). Aunque BTV afecta a muchas especies de rumiantes, el cuadro clínico completo suele darse en la oveja (Roy, Urakawa et al. 1990). Los signos clínicos suelen ser fiebre alta durante algunos días así como congestión, descarga ocular y nasal, apatía, rigidez muscular y cojera (Wilson, Darpel et al. 2008). También se produce un deterioro de la

lana y un empeoramiento del estado general del animal, acompañado de pérdida de peso y reducción de la producción de leche. Otras lesiones típicas son edema facial, laminitis, necrosis en el músculo esquelético y cardíaco (MacLachlan, Crafford et al. 2008), edemas y úlceras necróticas en la mucosa oral, edema pulmonar y trombosis vascular (MacLachlan 1994). El signo clínico que da nombre a la enfermedad, la cianosis de la lengua, se produce solo en algunas ocasiones. Otro signo clínico de la enfermedad es la aparición de hemorragias en la base de la arteria pulmonar.

Las razas de ovejas de las regiones donde BTV es endémico, raramente se ven afectadas; mientras que otras razas de ovejas son particularmente susceptibles (Veronesi, Darpel et al. 2010, Worwa, Hilbe et al. 2010). Se sabe que existen factores como la exposición a la luz solar (Roy, Urakawa *et al.* 1990) o la inmunodeficiencia provocada por infecciones simultáneas (Brodie, Wilson et al. 1998) que pueden exacerbar la gravedad de la enfermedad. En general, la morbilidad es variable y puede llegar a ser del 100%. La tasa de mortalidad, varía mucho entre especies y serotipos. Una infección aguda severa puede llevar a la muerte del animal en unos 14 días.

El resto de especies de rumiantes a los que infecta el virus no suelen desarrollar signos clínicos, sobre todo los animales silvestres. El ganado bovino se considera como un reservorio importante debido a que presentan viremias prolongadas y no desarrollan signos clínicos. Se puede recuperar virus infeccioso de la sangre de los rumiantes infectados durante aproximadamente dos meses, mientras que el ARN viral puede ser detectado durante más tiempo (Katz, Alstad et al. 1994). Aunque la viremia es prolongada, sobre todo en ganado bovino, no es persistente, y los animales que se recuperan serán inmunes a una reinfección por el mismo serotipo (MacLachlan, Jagels et al. 1990).

Esta enfermedad se asocia con un daño en el endotelio vascular, con una consiguiente diseminación de la coagulación intravascular y necrosis en los tejidos que eran regados por los capilares dañados (Mahrt and Osburn 1986).

Tras la infección, BTV comienza a replicar en las células diana de la piel y es transportado a los nódulos linfáticos regionales por células dendríticas migradoras (Hemati, Contreras et al. 2009, Darpel, Monaghan et al. 2012). Después se produce una replicación secundaria en otros nódulos linfáticos, timo y bazo (Barratt-Boyes, Rossitto et al. 1995). La progenie viral producida es liberada al torrente sanguíneo donde se producen grandes cantidades de virus en las células sanguíneas mononucleares periféricas (PBMC) y en el endotelio infectado, lo que conduce a la necrosis vascular y al daño tisular

(Mahrt and Osburn 1986, Barratt-Boyes and MacLachlan 1994, Drew, Gardner et al. 2010).

7.5 Vacunas

7.5.1 Vacunas vivas atenuadas

La primera vacuna atenuada frente a BT se originó en 1906 y provenía de un aislado del serotipo 4 que se había pasado varias veces en oveja y fue utilizado en Sudáfrica durante más de 40 años. Posteriormente se desarrollaron también en Sudáfrica más vacunas atenuadas mediante más de 100 pases seriados del virus en embrión de pollo. Posteriormente para mejorar la inmunogenicidad y limitar la patogenicidad, después de los pases en embrión de pollo, se sometía a los virus a varios pases en líneas celulares como las BHK-21. Cuando se optimizó el cultivo en células para BTV, estas se empezaron a utilizar para la propagación de virus, ya que de este modo se puede refinar la cepa vacunal por purificación en placa (Verwoerd and Gebhardt 2004). En ese momento ya se pudo observar que la protección era específica de serotipo y se desarrolló una vacuna que contenía 14 serotipos aunque esta no era totalmente eficaz en oveja (Bhanuprakash, Singh et al. 2017).

La mayor ventaja de estas vacunas es que la replicación del virus en los animales inmunizados va a inducir una respuesta inmune elevada. Por otro lado, se sabe que las vacunas atenuadas pueden causar enfermedad y viremia en algunas razas ovinas, lo que causa que el virus pueda ser transmitido por vectores, haciendo que cepas vacunales circulen en poblaciones de animales no vacunados como ocurrió en Italia y Croacia (Ferrari, De Liberato et al. 2005, Listes, Monaco et al. 2009). Finalmente también está descrito para los virus de genomas segmentados que cuando se produce una infección simultánea de 2 o más cepas en la misma célula estos pueden intercambiar sus segmentos genómicos. Por tanto la vacunación con un coctel de varias cepas atenuadas de BTV conlleva el riesgo de que se produzca una reorganización de segmentos del genoma, como ya se ha documentado anteriormente (Oberst, Stott et al. 1987, Samal, Livingston et al. 1987, de Mattos, de Mattos et al. 1991).

7.5.2 Virus inactivados

Las vacunas inactivadas presentan numerosas ventajas, no producen viremia por lo que no pueden ser transmitidas por vectores, la virulencia no puede revertir, no producen infecciones fetales y tampoco se pueden dar fenómenos de reorganización de segmentos

genómicos. Las primeras vacunas inactivadas frente a BT se desarrollaron entre 1970 y 1980 (Parker, Herniman et al. 1975) pero no estuvieron disponibles en el mercado hasta años después. Posteriormente, cuando la enfermedad emergió en Europa, estas se convirtieron en el tipo de vacuna favorito ya que son totalmente seguras (Ramakrishnan, Pandey et al. 2006). La primera vacuna que estuvo disponible en el mercado fue frente al serotipo 2 y posteriormente se desarrolló una vacuna frente al serotipo 4 y otra bivalente frente al 2 y al 4, que se han utilizado en el sur de Europa (Savini, Hamers et al. 2009). Posteriormente salieron al mercado también vacunas inactivadas frente a BTV-1 y BTV-8.

Las vacunas inactivadas también presentan algunos aspectos negativos, como el hecho de que pueden inducir nula o escasa inmunidad frente a las proteínas no estructurales del virus (Alpar 2009, Marin-Lopez, Calvo-Pinilla et al. 2017) o que requieren del uso de adyuvantes.

7.5.3 *Vacunas recombinantes*

Los sistemas de ADN recombinante ofrecen ventajas sustanciales en términos de seguridad y eficacia y poseen un gran potencial a la hora de desarrollar vacunas DIVA. Estos sistemas implican la síntesis de proteínas inmunogénicas que inducen respuestas inmunes protectoras. Varias de estas vacunas han sido probadas ya de manera experimental y han demostrado presentar numerosas ventajas como una inducción rápida de inmunidad, imposibilidad de transmisión y la potencial posibilidad de desarrollar una protección polivalente.

Hay numerosas posibilidades, una opción segura es la vacunación con viriones incompletos o proteínas virales individuales como la VP2. Así mismo con las proteínas purificadas a partir de baculovirus se pueden generar VLPs. Otras estrategias utilizadas para mejorar la inmunogenicidad de las vacunas subunidad es la fusión de las proteínas recombinantes con partículas que faciliten su reconocimiento por parte de las células del sistema inmune (Legisa, Perez Aguirreburualde et al. 2015, Marin-Lopez, Calvo-Pinilla et al. 2017). También se ha descrito el uso de vectores ADN para expresar antígenos y se está trabajando para optimizarlo, aunque en el caso de BTV siempre se ha utilizado en combinación con otras estrategias vacunales (Calvo-Pinilla, Navasa et al. 2012).

La genética reversa ha aportado la posibilidad de generar vacunas vivas atenuadas como es el caso de las vacunas DISA en las que se ha mutado el segmento 10 que codifica la proteína NS3, obteniéndose un virus con escasa capacidad para propagarse, pero que

replica perfectamente y se ha podido comprobar su eficacia en ensayos con ovejas. Posteriormente se generaron vacunas DISA con varias VP2 de distintos serotipos e incluso con VP2 quiméricas con el fin de desarrollar vacunas multiserotipo (Feenstra, Pap et al. 2015). Otro tipo de vacunas basadas en esta tecnología son las vacunas DISC, que solo pueden llevar a cabo un ciclo de replicación porque se ha delecionado en ellas el segmento que codifica la proteína VP6. Se utilizó como base BTV-1, y en se sustituyeron los segmentos codificantes de VP2 y VP5 de BTV-1 por los de BTV-2, 4, 8, 10, 13 y 21, y todas estas construcciones fueron testadas en vacas y como cóctel de vacunas en ovejas, protegiendo frente a la infección y generando anticuerpos neutralizantes frente a cada uno de los serotipos (Matsuo, Celma et al. 2011, Celma, Boyce et al. 2013).

Otra estrategia vacunal consiste en la utilización de vectores virales como los poxvirus para expresar antígenos inmunogénicos. La ventaja de la utilización de vectores virales es que son altamente inmunogénicos, activando tanto la respuesta inmune humoral como celular, por lo que son una buena herramienta para inducir protección cruzada. Existen numerosos ejemplos de vacunas basadas en estos vectores frente a diversas infecciones tanto virales como bacterianas o producidas por parásitos (Draper, Goodman et al. 2009, Volz, Kupke et al. 2015, Batra, Shanthalingam et al. 2017). Se han desarrollado varias vacunas frente a BTV utilizando poxvirus como vector viral. En 2007 se describió una vacuna basada en virus canarypox recombinantes que expresan VP2/VP5 y se vio que esta inducía una alta y efectiva inmunidad protectora en ovejas (Boone, Balasuriya et al. 2007), aunque era específica de serotipo.

En nuestro laboratorio se han analizado distintas estrategias. En primer lugar se estudió la eficacia de una estrategia de vacunación-dosis de recuerdo (*prime-boost*) basada en una dosis de ADN y una segunda dosis con MVA que expresaban las proteínas VP2, VP5 y VP7 de BTV-4 en ratones A129 (IFNAR(-/-)), observándose una eficacia del 100% en animales desafiados con el virus homólogo, mientras que la protección frente al desafío heterólogo fue parcial (Calvo-Pinilla, Rodríguez-Calvo et al. 2009). Con el fin de mejorar la eficacia en los desafíos heterólogos, se llevó a cabo otro estudio en el cual se generaron un ADN y un MVA que expresaban la proteína NS1, proteína descrita como la mayor inductora de respuesta inmune celular, muy relacionada con la protección multiserotipo. Estos se utilizaron en combinación con los ADNs y MVAs que expresaban VP2 y VP7, se consiguió una protección total tanto frente al serotipo homólogo como a los heterólogos (Calvo-Pinilla, Navasa et al. 2012).

El desarrollo de vectores vacunales que expresen antígenos inmunodominantes conservados entre serotipos y que aumenten su presentación al sistema inmune podría reducir el número de vacunaciones individuales frente a los distintos serotipos, y así generar una vacuna más barata, efectiva y de amplio espectro.

7.6 Modelo animal para lengua azul, ratones A129 (IFNAR -/-)

El hospedador natural, principalmente ovejas, ha sido utilizado tradicionalmente para el estudio de BTV, tanto para el estudio de aspectos biológicos como para ensayos de vacunación. La dificultad que entraña el manejo de estos grandes animales, así como los costes derivados de su mantenimiento o la necesidad de disponer de grandes instalaciones, dificultan la realización de estos estudios. Para evitar todos estos problemas se decidió buscar un modelo animal, siendo el más común el ratón. El principal problema es que los ratones adultos no son susceptibles a la infección por BTV.

En nuestro laboratorio, se propuso como modelo de animal de laboratorio un ratón *knockout* deficiente en la subunidad β del receptor de IFN tipo I, el ratón IFNAR(-/-) y se caracterizó su utilidad para los estudios de respuesta inmune y eficacia de vacunas frente a BTV (Calvo-Pinilla, Rodríguez-Calvo et al. 2009). Puesto que BTV induce una fuerte respuesta de IFN α en el hospedador natural (Jameson, Schoenherr et al. 1978) y este IFN tiene un papel esencial para alcanzar el estado antiviral (Foster, Luedke et al. 1991), los ratones IFNAR(-/-) fueron susceptibles y altamente sensibles a la infección por BTV, a pesar de mantener el resto del sistema inmune prácticamente intacto (Fiette, Aubert et al. 1995).

En los ensayos realizados se comprobó que el virus utiliza los mismos órganos diana que en el hospedador natural (bazo, pulmón, timo y linfonodos), reproduciendo los daños que ocurren en rumiantes. Además, se ha confirmado la utilidad del modelo para estudiar la eficacia de vacunas (Marin-Lopez, Otero-Romero et al. 2014, Ortego, de la Poza et al. 2014, Marin-Lopez, Bermudez et al. 2016) . Actualmente este modelo es utilizado por algunas empresas farmacéuticas en sanidad animal para los estudios de potencia de sus vacunas antes de salir al mercado.

IV. OBJETIVOS

El objetivo general de la tesis es la generación de vacunas bivalentes frente a dos enfermedades de rumiantes, la fiebre del Valle del Rift y Lengua azul, mediante la utilización de varias estrategias vacunales; utilización del virus de la fiebre del Valle del Rift como vector de antígenos del virus de la Lengua azul; VLPs del virus de la fiebre del Valle del Rift portadoras de antígenos del virus de la Lengua azul y rMVAs duales que expresan las glicoproteínas GnGc de RVFV y las proteínas VP2, NS1 o el extremo N-terminal de la proteína NS1 de BTV.

Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Generación de virus de la fiebre del Valle del Rift recombinantes atenuados que expresan antígenos del virus de la lengua azul, mediante sistemas de genética reversa basados en la utilización de Pol I/Pol II. Caracterización de los virus RVFV recombinantes generados y evaluación de la influencia de los antígenos heterólogos en la cinética, fenotipo e inmunogenicidad de los virus.
2. Evaluación de la respuesta inmune humoral y celular y la protección inducida por los diferentes virus generados en el modelo murino para evaluar el potencial vacunal de los virus rRVFV-BTV recombinantes.
3. Análisis del potencial vacunal de los virus rRVFV-BTV recombinantes en el hospedador natural.
4. Evaluación de la respuesta inmune humoral y celular y la protección inducida por las VLPs de RVFV que expresan VP2 o NS1Nt en el modelo murino.
5. Generar rMVAs duales que expresan tanto las glicoproteínas de RVFV como una proteína de BTV, VP2, NS1 o NS1Nt.
6. Estudiar la respuesta inmune humoral y celular y la protección inducida por los rMVAs en el modelo murino.
7. Estudiar la inmunogenicidad y protección en ovino del rMVA que de mejores resultados de eficacia en el modelo de ratón.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Líneas celulares

Las líneas celulares usadas en los ensayos fueron HEK293 (células embrionarias de riñón humanas, ATCC CRL-3216), Vero (células de riñón de mono verde africano, ATCC CCL-81), DF-1 (Fibroblastos de embrión de pollo, ATCC CRL-12203) y BHK-21 (fibroblastos de riñón de hámster lactante, ATCC CCL-10). Todas las líneas celulares fueron crecidas en *Dulbecco's modified Eagle medium* (Invitrogen) y suplementadas con 10% de suero fetal bovino (SFB), 2 mM L-glutamina, 1% 100X aminoácidos no esenciales, 100 U/ml penicilina/100 µg/ml estreptomicina. Todas las células fueron mantenidas a 37° en presencia de un 5% de CO₂. Estas líneas celulares fueron proporcionadas por el servicio de cultivos celulares del CISA-INIA.

Para el crecimiento de los plásmidos se utilizaron la cepa bacteriana de *Escherichia coli* Top10 (Thermofisher) El cultivo de estas células se realizó en medio líquido (LB Broth, Sigma Aldrich) y en medio sólido (LB Agar, Sigma Aldrich). Este medio fue suplementado con ampicilina a una concentración final de 100µg/ml.

2. Virus

Para el desarrollo de estos estudios se utilizaron varios virus pertenecientes a la colección del CISA. Del virus de la fiebre del Valle del Rift se utilizó la cepa atenuada MP12 y la cepa virulenta RVFV 56/74 de origen sudafricano. Los virus de la lengua azul utilizados en este trabajo fueron BTV-4 (SPA2004/02) y BTV-4M (MOR2009/09).

3. Ratones y ovejas

Los animales se mantuvieron libres de patógenos en un animalario de nivel de seguridad 3 (BSL-3) en el Centro de Investigación en Sanidad animal. Todos los experimentos con animales vivos se llevaron a cabo siguiendo la normativa de la Comunidad Europea 2010/63/EU y fueron aprobados previamente por el comité de ética del INIA y el órgano habilitado de la Comunidad de Madrid (PROEX 037/15). En este trabajo se han utilizado ratones A129 (IFNAR -/-) deficientes en el receptor del interferón tipo I, 129 Sv/Ev y BALB/c.

4. Generación de plásmidos

Los plásmidos pI.18_RVFFV_L, pI.18_RVFFV_N, pHH21_RVFFV_vL, pHH21_RVFFV_vM, pHH21_RVFFV_vN_GFP y pHH21-RVFFV-vN_TCS se utilizaron como se describe en Habjan *et al.*, 2008. Los plásmidos (figura 1) pHH21-RVFFV-vN-VP2, pHH21-RVFFV-vN-NS1, pHH21-RVFFV-vN-NS1Nt y pHH21-RVFFV-vN-NS1NtV5tag fueron generados a partir del plásmido pHH21-RVFFV-vN_TCS. Las secuencias heterólogas fueron insertadas en el sitio de clonaje (TCS, *tandem cloning site*) mediante dos sitios de restricción AarI que generaron extremos compatibles con NcoI y XhoI.

La secuencia del gen heterólogo que codifica la proteína VP2 de BTV-4 fue amplificada por PCR a partir del plásmido pcADN3-VP2 utilizando la pareja de oligonucleotidos (tabla 1) VP2_NcoI_fwd y VP2_XhoI_rev. El segmento 5 de BTV-4 que codifica la proteína NS1 se amplificó o a partir del plásmido pSC11-NS1 utilizando la pareja de oligonucleotidos NS1_NcoI_fwd y NS1_XhoI_rev generándose el plásmido pHH21-RVFFV-vN-NS1 y NS1_NcoI_fwd y NS1Nt_XhoI_rev para la generación del plásmido pHH21-RVFFV-vN-NS1Nt. El gen que codifica NS1 contiene un sitio de restricción XhoI en su secuencia que tuvo que ser eliminado para que su inserción en el sitio de clonaje fuera posible. La secuencia se modificó en el plásmido pSC11-NS1 mediante PCR utilizando la pareja de oligonucleotidos NS1_fw_GxC y NS1_rev_GxC. El plásmido pSC11-NS1 modificado se utilizó posteriormente para la generación de todos los plásmidos pHH21 que llevan la secuencia de la proteína NS1. La generación del plásmido pHH21-RVFFV-vN-NS1NtV5tag se llevó a cabo utilizando la pareja de oligonucleotidos NS1Nt_V5tag_fwd y NS1Nt_V5tag_rev para insertar la secuencia marcadora V5 en el extremo C-terminal de NS1Nt.

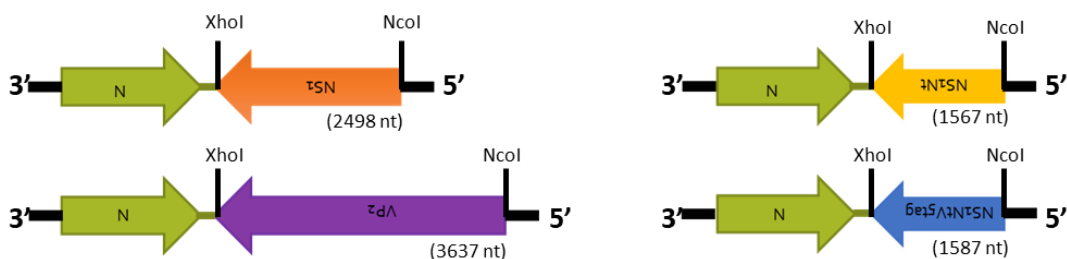


Figura 1. Representación esquemática de los plásmidos de recuperación (rescate). Plásmidos codificando NS1, NS1Nt, NS1NtV5tag y VP2.

Oligonucleótido	Secuencia
VP2_NcoI_fwd	catgCCATGGatggaggagttgtcattcc
VP2_XhoI_rev	ccgCTCGAGctaaacgttgagtaatttcg
NS1_NcoI_fwd	catgCCATGGatggagcgcctttttgagaaa
NS1_XhoI_rev	ccgCTCGAGctaataattccatccacatctga
NS1Nt_XhoI_rev	ccgCTCGAGctaacctgttgaacccttc
NS1_fw_GxC	Gcgggtgcggggtgcaactgctggaggattaccg
NS1_rev_GxC	Cggtaatcctggagcagttgcaccccgaccgc
NS1Nt_V5tag_fwd	Ctactaggcctagattagatgtggatggaatattag
NS1Nt_V5tag_rev	Ggggttgggtatacctgttgaaccct

Tabla 1. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para generar los plásmidos de recuperación. Las mayúsculas indican el sitio de restricción que se insertó en la secuencia. CCATGG: NcoI; CTCGAG: XhoI

5. Generación de rRVFVs que expresan genes heterólogos.

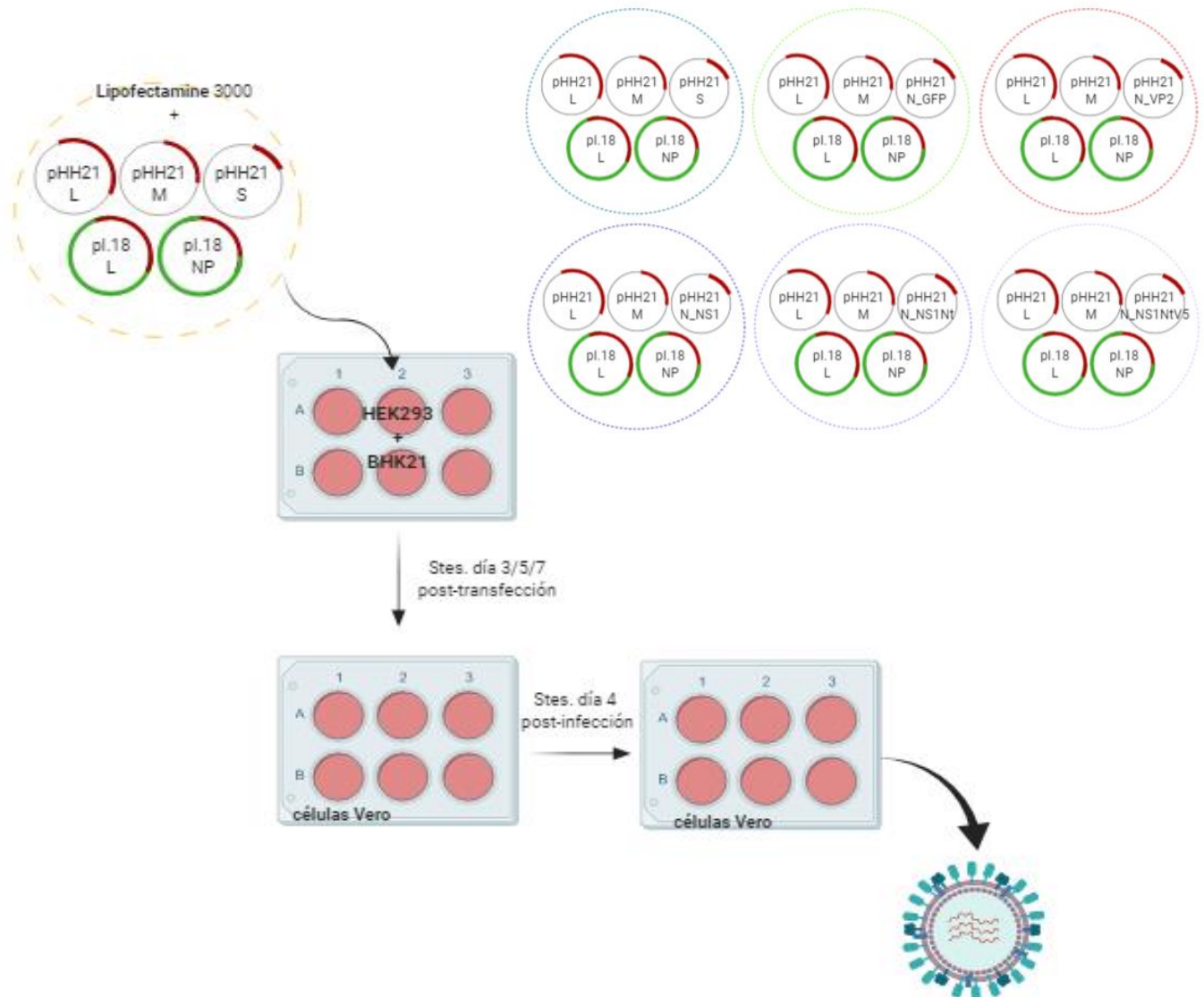
Para generar virus recombinantes de la fiebre del Valle del Rift empleamos un sistema basado en la utilización de ARN polimerasas I y II (Sistema de rescate basado en la pol I/II, Habjan *et al.*, 2008).

Para la recuperación de los virus se sembraron placas de 6 pocillos con un co-cultivo de células HEK293 y BHK-21 en un ratio 1:1. Con las placas semiconfluentes se realizó una co-transfección con 1 µg de cada uno de los plásmidos pHH21-RVFV-vL, pHH21-RVFV-vM, pHH21-RVFV-vS/pHH21-RVFV-vN_GFP/pHH21-RVFV-vN-VP2/pHH21-RVFV-vN-NS1Nt y con 0.5 µg de los plásmidos pI.18-RVFV-L y pI.18-RVFV-N. Se utilizaron 13.5 µL de Lipofectamina 3000 (Invitrogen) por pocillo para la transfección. El proceso de transfección se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del proveedor.

Los sobrenadantes de las células transfectadas fueron recogidos a días 3, 5 y 7 post-transfección y las células suplementadas con medio DMEM-10% SFB fresco. Para verificar la presencia de virus recombinantes, 500 µL de los sobrenadantes fueron inoculados en placas M6 tapizadas con células Vero. La aparición de efecto citopático, la expresión de GFP y la realización de inmunofluorescencia indirecta (IFI) con anticuerpos específicos a 4 días post-inoculación confirmó la presencia de virus recombinantes. Posteriormente los virus fueron crecidos en células Vero infectadas a una MOI de 0,1

durante 72 horas hasta que el efecto citopático fue evidente. Los extractos celulares se procesaron mediante 3 ciclos de congelación-descongelación y sonicación.

Figura 2. Esquema de la generación de virus recombinantes del virus de la fiebre del Valle del Rift que



expresan antígenos del virus de la lengua azul.

6. Clonaje de los virus recombinantes

Para asegurar la heterogeneidad y la correcta expresión de los virus se llevó a cabo un clonaje mediante plaqueo y selección de placas con rojo neutro. Placas de 6 pocillos tapizadas con células Vero fueron infectadas con diluciones seriadas partiendo de una dilución de 10^{-2} , tras una adsorción de 1 hora, se retiró el medio y se añadió DMEM fresco, incubándose a 37°C durante 72 horas. Posteriormente se retiró el medio y se añadió DMEM con 0.6% de agar noble, se esperó a que solidificara y sobre él se añadió rojo neutro al 0.01% en PBS 1X. Se incubaron las células con el rojo neutro durante 1 hora a

37°C, después se retiró el rojo neutro y se incubó 30 minutos más a 37°C. Finalmente se seleccionaron placas de virus recombinante y se procesaron mediante tres ciclos de congelación-descongelación y sonicación. Se confirmó la expresión de los virus seleccionados mediante IFI y PCR. Los clones que resultaron positivos fueron sometidos a un nuevo ciclo de clonaje siguiendo el mismo proceso. Tras la segunda ronda los clones que resultaron positivos se amplificaron en células Vero.

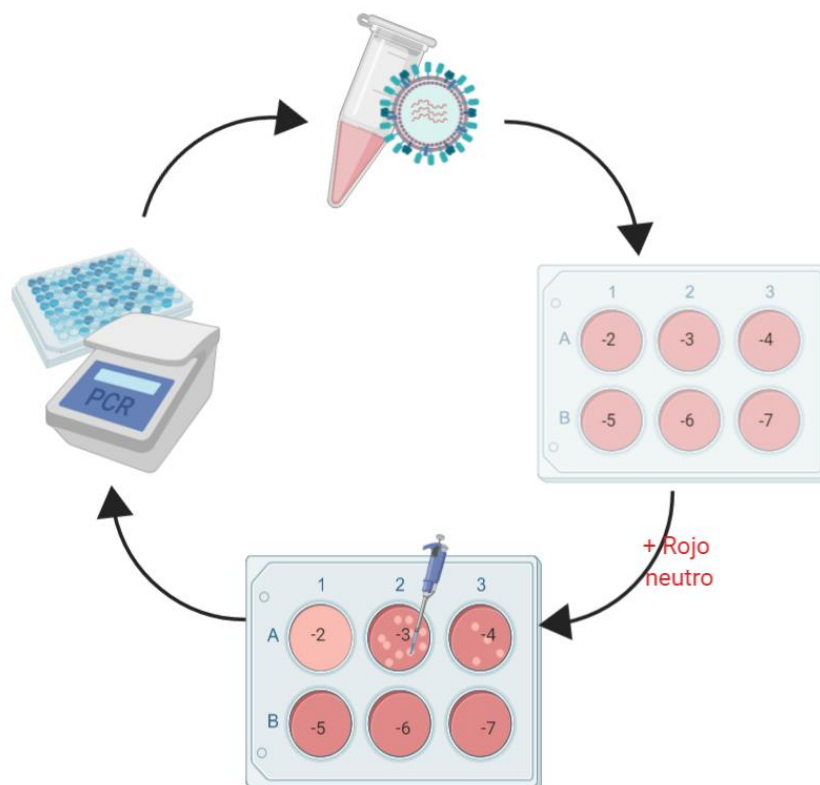


Figura 3.
de los virus

Clonaje

recombinantes. Después de seleccionar placas de virus, se confirmó su presencia y correcta expresión mediante PCR o IFI respectivamente. Las placas positivas se sometieron a un segundo ciclo de clonaje antes de ser amplificadas en células Vero.

La titulación del stock viral generado se realizó mediante ensayos de formación de placas en medio sólido. Para ello, células Vero en placas de 12 pocillos se infectaron con diluciones seriadas en base 10 partiendo de una dilución de 10^{-2} en DMEM con 10% SFBi, en un volumen de 500µl/pocillo. Tras una adsorción de 1 hora, se retiró el medio y se añadió DMEM 2x con carboximetil-celulosa, incubándose a 37°C durante 72 horas para los virus rZH548-ΔNSs::GFP y rZH548-ΔNSs::VP2_{BTv-4} y 5 días para el virus rZH548-ΔNSs::NS1Nt_{BTv-4}. Posteriormente las células se fijaron y tiñeron con 10% (v/v) de

formaldehído (Sigma Aldrich) y 2% (p/v) de cristal violeta (SERVA) en PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄).

7. Análisis de la expresión *in vitro* de los virus rZH548-ΔNSs::BTV

Para verificar la correcta expresión de los genes heterólogos, se infectaron células Vero con cada uno de los virus recombinantes. Como control negativo del ensayo se utilizaron células sin infectar y como control positivo células infectadas con BTV-4.

Para realizar ensayos de inmunofluorescencia las células fueron sembradas en placas M24 sobre cristales y posteriormente infectadas. 48 horas post-infección las células fueron fijadas con metanol-acetona (60:40) e incubadas 20 minutos a -20°C. La solución de metanol-acetona fue retirada, se añadió PBS-SFB 20% y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Después se lavó una vez con PBS 1X y se añadió el anticuerpo primario diluido en PBS-SFB 20%. El suero policlonal de ratón frente a VP2 y el suero policlonal de conejo frente a RVFV se utilizaron a una dilución de 1:200 y el anticuerpo monoclonal de ratón frente a la secuencia marcadora V5 (Bio-Rad) a una dilución 1:500. Los anticuerpos primarios se incubaron durante una hora a 37° o a 4° durante toda la noche. Después de la incubación con el anticuerpo primario se realizaron 3 lavados con PBS 1X de 10 minutos cada uno. Después se añadieron los anticuerpos secundarios conjugados (ThermoFisher), Goat un anti-Ratón hecho en cabra Alexa Fluor 488 y un anti-Ratón hecho en cabra Alexa Fluor 594, a una dilución de 1:1.000. La incubación con el anticuerpo secundario se realizó en oscuridad, durante 30 minutos a temperatura ambiente y fue seguida de dos lavados con PBS 1X y un último lavado con DAPI diluido 1:10.000 en PBS 1X. Tras este último lavado los cristales se montaron utilizando Mowiol© 4-88 (Sigma-Aldrich).

Para los ensayos de *western blot* las células se sembraron en placas M12 y fueron posteriormente infectadas. El extracto para el virus rZH548-ΔNSs::VP2_{BTV-4} se recogió a las 48 horas y el del virus rZH548-ΔNSs::NS1Nt_{BTV-4} se recogió a las 24 horas post-infección. Las células se lavaron dos veces con PBS antes de ser resuspendidas en PBS 1X con buffer de carga 4X. Las muestras se analizaron en condiciones desnaturalizantes mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE) en tampón de Laemmli. A continuación, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Whatmann) y se bloquearon con TBST (20 mM Tris-HCl pH7,5, 150mM NaCl, 0,1%

Tween-20) con leche en polvo desnatada al 5% durante 1 hora a temperatura ambiente. Después se añadió el anticuerpo primario diluido en TBST-leche desnatada 5%. El suero policlonal de ratón frente a VP2 se utilizó a una dilución de 1:200, el anticuerpo monoclonal de ratón frente a la *secuencia marcadora* V5 se utilizó a una dilución 1:500 y el anticuerpo monoclonal de ratón 2B1 frente a la nucleoproteína de RVFV a una dilución 1:1.000. Los anticuerpos primarios se incubaron durante una hora a temperatura ambiente o a 4°C durante toda la noche. Después de la incubación con el anticuerpo primario se realizaron tres lavados con TBST 1X de 10 minutos cada uno. Después se añadió el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa a una dilución 1:1.000. La incubación con el anticuerpo secundario fue de 1 hora a temperatura ambiente y seguida de 3 lavados con TBST 1X. Para la detección de las proteínas se añadió el sustrato Amersham ECL *Western blotting detection system* (GE Healthcare), y se reveló utilizando un lector de imágenes, el ChemiDoc (Bio-Rad).

8. Radioinmunoprecipitación

Células Vero fueron infectadas con los virus rZH548 Δ NSs::VP2_{BTV-4}, rZH548 Δ NSs::NS1Nt_{BTV-4}, BTV-4 o MP12. A las 24 hpi el inóculo se eliminó y se añadieron 200 μ Ci de solución [S35]-Metionina-Cisteína (ThermoFisher) por pocillo. Después de 24 horas, se eliminó el sobrenadante de cultivo, las células se lisaron en buffer de radioinmunoprecipitación (RIPA) y posteriormente se congelaron a -80°C para su posterior análisis.

“Beads” (partículas magnéticas con revestimiento) con proteína-G (Invitrogen) fueron incubadas en rotación con 15 μ L de un suero anti-BTV-4 NS1/VP2/VP7 diluido en 200 μ L de PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. El inmunocomplejo anticuerpo-“bead” fue lavado con PBS-Tween 20 y después se le añadieron 250 μ L de las muestras incubándose con rotación durante toda la noche a 4°C. El inmunocomplejo “bead”-anticuerpo-antígeno se lavó tres veces con buffer de lavado y se le añadieron 20 μ L de PBS y 10 μ L buffer de carga de PAGE calentándose después durante 5 minutos a 100°C. Los inmunocomplejos se separaron mediante SDS-PAGE en geles al 12%. Los geles se fijaron con una solución de isopropanol:agua:ácido acético (25:65:10) y fueron tratados con solución fluorográfica (Amplify, Amersham) para amplificar la señal. Después de secar los geles se expusieron a una película de rayos-X (AGFA Health Care NV).

9. Análisis de la estabilidad de los virus recombinantes RVFV

La estabilidad de los virus recombinantes se analizó mediante extracción de *ARN* total a partir de células Vero infectadas con los virus recombinantes usando el kit Speedtools RNA virus extraction kit (Biotools) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células Vero se infectaron a una MOI de 1 con 5 pases secuenciales de los virus recombinantes y estos extractos fueron posteriormente recogidos para la extracción del *ARN*.

Para el virus rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} se utilizó la enzima Superscript IV para realizar la transcripción inversa. El *ADNc* fue amplificado por PCR utilizando parejas de oligonucleotidos (Tabla 2) para el gen de la nucleoproteína y para el gen heterólogo VP2.

Para el virus rZH548- Δ NSs::NS1Nt_{BTV} se realizó una RT-PCR a tiempo real, con oligonucleotidos específicos para detectar el segmento L de RVFV y el gen de NS1. En este caso la amplificación de los productos se detectó usando la sonda Taqman 5' FAM.

La estabilidad del virus rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} también se analizó mediante secuenciación. El *ARN* fue extraído de células Vero infectadas con el virus recombinante y con BTV-4. El *ADNc* fue amplificado en fragmentos solapantes (Figura 4) mediante PCR utilizando varias parejas de oligonucleotidos (Tabla 2) y posteriormente secuenciado.

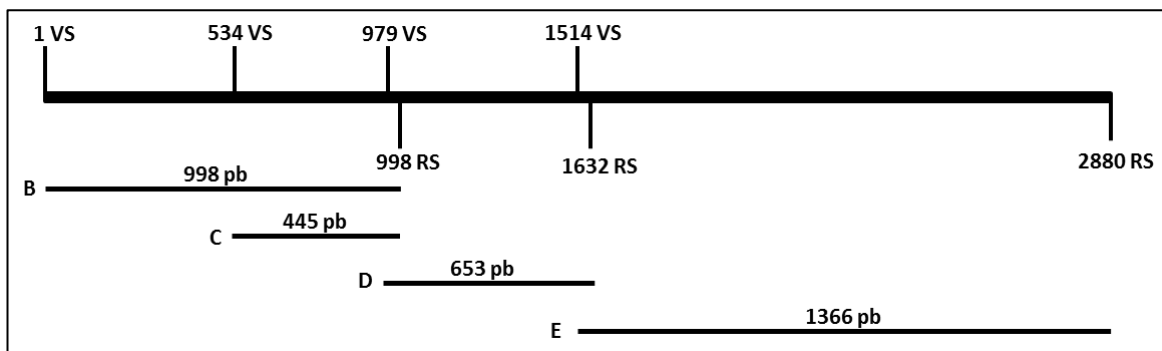


Figura 4. Esquema de los fragmentos generados a partir de *ARN* extraído de células Vero infectadas con el virus rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4}

Oligonucléotido	Secuencia (5'-3')
NΔ9fwd	tcgaaagaaggcaaa
RTss1	ctattacaataatggacaactatcaagagc
VP2 fwd 979	cggacgagtgggctgccac
VP2 rev 1632	cctattccacggatcggccg
Lseg forward	ttctttgcttctgataccctctg
Lseg reverse	gtccacttccttgcacatctg
FAM taqman L-probe	ttgcacaagtccacacagggccct
BTS5F1-19	ggcaacyaccaaacatgga
BTS5R76-57	aaagtyctcgtggcattwgc
BTV4-1 VS	cgcccgggatggaggagtttgattcc
BTV4-534 VS	ccacgtacttcaaggcgctgc
BTV4-979 VS	cggacgagtgggctgccac
BTV4-1514 VS	cggaactagtgtcccaaac
BTV4-998 RS	gtggcagccccactcgtccg
BTV4-1632 RS	cctattccacggatcggccg
BTV4-2852 RS	cgcccgggctaacggtgagtaattcg

Tabla 2. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para analizar la estabilidad de las secuencias de los virus recombinantes

10. Generación de VLPs

La generación de las VLPs ha sido descrita en Habjan *et al*, 2008. Para la generación de las VLPs se utilizaron placas M6 con monocapas confluentes de células HEK293. Las células se transfectaron con un cóctel de plásmidos de la misma forma que se realizó la generación de los virus recombinantes pero en este caso entre los plásmidos uno de ellos contiene el gen de la *Renilla* luciferasa que se utiliza como marcador y otro los distintos genes de BTV. Los sobrenadantes se recogieron a distintos tiempos y las células se lisaron para medir la actividad luciferasa como control de la generación de las VLPs. Los

sobrenadantes una vez recogidos se trataron con benzonasa y se centrifugaron para purificar las VLPs.

Posteriormente las VLPs se titularon mediante inmunofluorescencia con un anticuerpo monoclonal (2B1) frente a la nucleoproteína a una dilución 1:1.000 en PBS-SFB 20% y esas concentraciones se confirmaron también por *western blot* y ensayos de detección de luciferasa.

11. Generación de MVAs duales

Los rMVA recombinantes generados fueron rMVA-GnGc-VP2, rMVA-GnGc-NS1 y rMVA-GnGc-NS1Nt. Estos tres MVA recombinantes se generaron a partir del MVA- Δ F13L (Sánchez-Puig and Blasco, 2005) proporcionado por el Doctor Rafael Blasco. Para la inserción de los genes heterólogos se utilizaron los plásmidos pMVA-M4, psC11-VP2, psC11-NS1 y psC11-NS1Nt descritos anteriormente.

La secuencia de las glicoproteínas GnGc se amplificó mediante PCR a partir del plásmido pMVA-M4, que se utilizó como molde junto con la pareja de oligonucleótidos 5'-CGGAATTCATGGCAGGGATTGCAATGACAGTCC-3' que contiene la secuencia de EcoRI (subrayado) y 5'-CGGGATCCACTGATCTATGAGGCCTTCTTAGTG-3' que contiene la secuencia de BamHI (subrayado) y posteriormente se insertó en el plásmido pMVA- β Gus que había sido previamente digerido con las enzimas EcoRI y BamHI, para generar el plásmido pMVA-GnGc. El plásmido de transferencia pMVA-GnGc contiene el gen F13L del MVA y el gen GnGc un bajo promotor temprano/tardío del virus vaccinia (VV).

La generación de los MVA recombinantes se realizó en placas de cultivo de 6 pocillos sembradas con células DF-1. Estas células se infectaron con el MVA- Δ F13L, que no forma placas de lisis y contiene el gen dsRed, a una MOI de 1 durante 2 horas. Posteriormente, éstas se transfectaron con 1 μ g del plásmido de transferencia pMVA-GnGc, junto a 10 μ g de Lipofectamina (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del proveedor. Tras una incubación de 4 horas a 37°C, se retiró el medio y se añadió DMEM al 5% SFBi, incubándose durante 72 horas a 37°C. Por recombinación homóloga el gen dsRed es reemplazado por el gen heterólogo, GnGc, que contiene el gen F13L, lo que hace que el virus generado replique eficientemente, vuelva a producir placas y no presente fluorescencia. Se seleccionaron placas de virus recombinante que no expresaran dsRed y

se procesaron mediante 3 ciclos de congelación-descongelación y sonicación. El proceso de clonaje se repitió 4 veces.

Una vez generado el virus recombinante MVA-GnGc, este se utilizó para generar los virus recombinantes MVA-GnGc-VP2, MVA-GnGc-NS1 y MVA-GnGc-NS1Nt. Para ello infectamos células DF-1 con MVA-GnGc a una MOI de 0.5 durante 2 horas. Después, éstas se transfectaron con 1µg del plásmido de transferencia correspondiente psC11-VP2, psC11-NS1 y psC11-NS1Nt, junto a 10µg de Lipofectamina (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del proveedor. Por recombinación homóloga en el locus del gen de la timidina kinasa (TK) se insertó el nuevo gen heterólogo y el gen marcador LacZ, que hace que los nuevos virus generados den lugar a placas de color azul al añadir el sustrato X-Gal, lo que nos permitió seleccionar placas de virus recombinante que posteriormente se procesaron mediante 3 ciclos de congelación-descongelación y sonicación. Los MVA duales se clonaron 4 veces mediante aislamiento de placa.

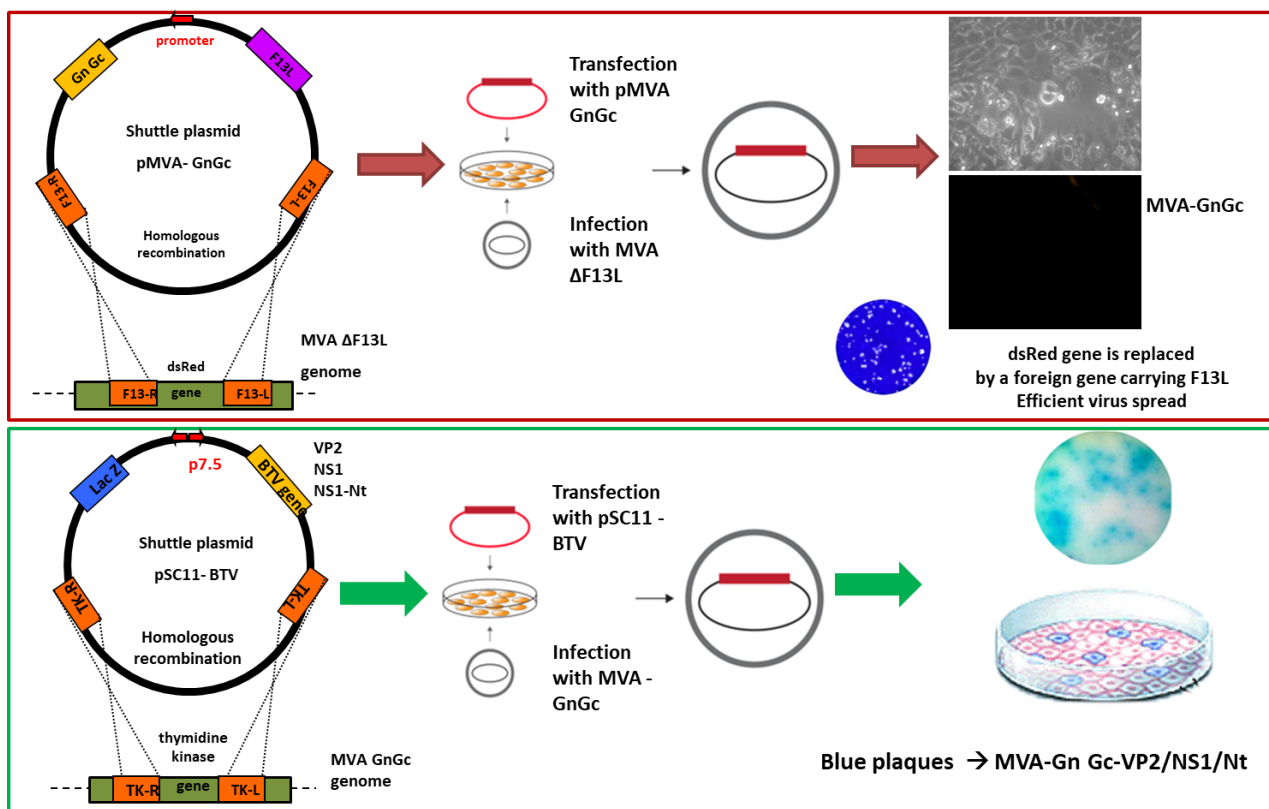


Figura 5. Esquema de generación de rMVAs

Una vez clonado el MVA recombinante, se amplificó el virus en células DF-1 infectando a una MOI de 0.1 durante 72 horas hasta que el ECP fue evidente. El virus

intracelular junto con el virus extracelular se procesó mediante 3 ciclos de congelación-descongelación y sonicación.

La titulación del stock viral se realizó mediante ensayos de formación de placas en medio líquido. Para ello, se infectaron células DF-1 en placas de 12 pocillos por duplicado con diluciones seriadas en base 10 partiendo de una dilución de 10^{-2} en DMEM con 10% SFBi, en un volumen de 500µl/pocillo. Tras una adsorción de 90 min, se retiró el medio y se añadió de nuevo DMEM con 10% SFBi, incubándose a 37°C durante 3 días. Para la visualización de las placas, el medio fue retirado y las células se fijaron y tiñeron con 10% (v/v) de formaldehído (Sigma Aldrich) y 2% (p/v) de cristal violeta (SERVA) en PBS.

12. Análisis de la expresión *in vitro* de los virus rMVA duales

Para verificar la correcta expresión de los genes heterólogos, se infectaron células DF-1 con cada uno de los virus recombinantes. Como control negativo del ensayo se utilizaron células sin infectar y como control positivo se emplearon células infectadas con BTV-4 o MP12.

Para realizar ensayos de inmunofluorescencia las células fueron sembradas en placas M24 con cristales y posteriormente infectadas. 48 horas post-infección las células se fijaron con paraformaldehído 4% (Merck Millipore) durante 10 minutos. Las células se permeabilizaron utilizando Triton X-100 (Sigma Aldrich) al 0,1% en PBS durante 5 minutos. Las uniones inespecíficas se bloquearon mediante una incubación con PBS-SFB 20% durante una hora a temperatura ambiente. Después se lavó una vez con PBS 1X y se añadió el anticuerpo primario diluido en PBS-SFB 20%. Los sueros utilizados fueron un suero policlonal de oveja frente a RVFV y un suero policlonal de ratón frente a BTV y ambos se emplearon a una dilución de 1:200. Los anticuerpos primarios se incubaron durante 4°C durante toda la noche. Después de la incubación con el anticuerpo primario se realizaron 3 lavados con PBS 1X de 10 minutos cada uno. Después se añadieron los anticuerpos secundarios, un anti-Ratón hecho en cabra Alexa Fluor 594 y un anti-oveja hecho en cabra Alexa Fluor 488 (Invitrogen), a una dilución de 1:1.000. La incubación con el anticuerpo secundario se realizó en oscuridad, durante 30 minutos a temperatura ambiente y fue seguida de 2 lavados con PBS 1X y un último lavado con DAPI diluido 1:10.000 en PBS 1X. Tras este último lavado los cristales se montaron utilizando

Mowiol© 4-881. Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal Zeiss Axiovert LSM 880. Las imágenes se analizaron con los softwares Zen 2.0 (Carl Zeiss) and Fiji (NIH).

13. Inmunización de ratones con rZH548-ΔNSs::VP2_{BTV-4}

Ocho grupos de ratones BALB/c (n=4) fueron inoculados con 10^7 , 10^4 o 10 PFU del virus rZH548-ΔNSs::VP2_{BTV-4} intraperitonealmente. Se recogieron muestras de sangre fueron los días 7 y 14 post-inoculación para evaluar la correcta inducción de anticuerpos neutralizantes frente a RVFV y BTV.

Cuatro de los grupos recibieron una segunda dosis con 10^5 PFU de BTV-4 a día 14 post-inoculación. Se tomaron nuevas muestras de sangre a día 7 y 14 después de la dosis de recuerdo que fueron utilizadas para la realización de ensayos de seroneutralización frente a BTV.

Los otros cuatro grupos inoculados con rZH548-ΔNSs::VP2_{BTV-4}, fueron desafiados con 500 PFU de la cepa virulenta RVFV-56/74. Los ratones se mantuvieron bajo observación monitorizando diariamente los signos clínicos durante dos semanas. Se tomaron muestras de sangre con EDTA a día 3 post-desafío para evaluar la viremia.

Grupo	Día 0	Día 14
1A	rZH548-ΔNSs::VP2 _{BTV-4} , 10^7 PFU/ratón	500 PFU 56/74 RVFV
1B	rZH548-ΔNSs::VP2 _{BTV-4} , 10^7 PFU/ratón	10^5 PFU BTV-4
2A	rZH548-ΔNSs::VP2 _{BTV-4} , 10^4 PFU/ratón	500 PFU 56/74 RVFV
2B	rZH548-ΔNSs::VP2 _{BTV-4} , 10^4 PFU/ratón	10^5 PFU BTV-4
3A	rZH548-ΔNSs::VP2 _{BTV-4} , 10PFU/ratón	500 PFU 56/74 RVFV
3B	rZH548-ΔNSs::VP2 _{BTV-4} , 10PFU/ratón	10^5 PFU BTV-4

4A	-	500 PFU 56/74 RVFV
4B	-	10 ⁵ PFU BTV-4

Tabla 3. Grupos de ratones, vacunación y desafío

14. Inmunización con rZH548-ΔNSs::NS1Nt_{BTV-4} y detección de respuestas T CD8⁺ específicas por ICCS

Dos grupos de 4 ratones A129 Sv/Ev se inocularon con 10⁷ PFU de rZH548-ΔNSs::NS1Nt_{BTV-4} intraperitonealmente. Tres semanas después de la inmunización, un grupo recibió una segunda dosis con 10⁵ PFU de BTV-4 y otro grupo recibió una segunda dosis con 10⁷ PFU de rMVA-NS1. Muestras de sangre fueron recogidas a día 7 y 14 post-inoculación y también a 14 días después de la dosis de recuerdo para evaluar la inducción de anticuerpos. Como control, 3 grupos de ratones fueron vacunados con una única dosis de rMVA-NS1, BTV-4 o rZH548-ΔNSs::NS1Nt_{BTV-4}. Dos semanas después de la segunda dosis o de la primera en el caso de los controles, los ratones fueron sacrificados y sus bazo extraídos para analizarlos mediante un ensayo de ICCS (*intracellular cytokine staining*) y ELISPOT.

Un total 3x10⁶ esplenocitos fueron estimulados con 10 μg/ml de los péptidos seleccionados durante 6 horas, o con 5 μg /ml de la proteína de interés durante toda la noche. Células control positivas fueron estimuladas con concanavalina A (ConA) (8 μg/ml) (Sigma-Aldrich) y las células control negativas fueron estimuladas con medio RPMI completo. Después de la estimulación, las células fueron lavadas y teñidas con marcadores de superficie, fijadas, permeabilizadas y marcadas con marcadores intracelulares con los fluorocromos adecuados. Se utilizaron los siguientes anticuerpos conjugados con fluorocromos: CD8-PerCP, IFN γ PE and CD4-FITC. Los datos fueron analizados utilizando el programa FlowJo™ v10.0.8 (Tree Star, Ashland, OR).

Para realizar el ensayo de ELISPOT se tapizó una placa Immobilon (Millipore MAIPS-4510) con 50μl del anticuerpo de captura anti-ratón IFN γ (AG-18/RA-6A2, BD). Se incubó durante toda la noche y la placa se bloqueó con medio RPMI completo durante 1 hora a 37°C. Un total de 5x10⁵ esplenocitos se añadieron a cada pocillo y se re-estimularon con los péptidos #152 (10 μg /ml) o #14 (10 μg /ml) durante 18-20 horas a 37°C con 5% CO₂. Como control las células se estimularon con fitohemaglutinina M

(PHA-M) (8 µg /ml) (Sigma-Aldrich) o con medio RPMI completo. Después de la incubación las placas se lavaron con H₂O y posteriormente 5 veces con PBS 1X. Una vez terminados los lavados se añadió un anticuerpo anti-ratón IFN γ conjugado con biotina (R46A2, BD) y se incubó durante 2 horas. Se repitió el paso de lavado con PBS1X y después se añadió estreptavidina conjugada con peroxidasa, incubándose durante 1 hora a RT. Tras un último lavado con PBS se añadió el sustrato (BD Elispot AEC substrate) a RT hasta que aparecieron puntos de tinción (*spots*) visibles, parándose la reacción con agua. Los puntos se cuantificaron usando un AID EliSpot Reader (Autoimmun Diagnostika, GmbH).

Grupo	Día 0	Día 21	Día 36
1	rZH548- Δ NSs::NS1N _t _{BTV} 10 ⁷ PFU	MVA-NS1 10 ⁷ PFU	
2	rZH548- Δ NSs::NS1N _t _{BTV} 10 ⁷ PFU	BTV-4 10 ⁵ PFU	Sacrificio y aislamiento de esplenocitos
3	-	MVA-NS1 10 ⁷ PFU	
4	-	BTV-4 10 ⁵ PFU	
5	-	rZH548- Δ NSs::NS1N _t _{BTV} 10 ⁷ PFU	

Tabla 4. Grupos de ratones y esquema de vacunación

15. Transferencia pasiva de suero inmune

Para este ensayo se utilizaron sueros procedentes del experimento detallado en el apartado 13. Se generaron pools de sueros agrupando todos aquellos que procedían del mismo grupo. Se utilizaron los sueros del grupo 1A, 1B y 4B de la tabla 3. Los sueros fueron inactivados durante 30 minutos a 56°C y utilizados para inocular intraperitonealmente a ratones IFNAR^{-/-} (n=4). El suero se administró a los ratones una hora antes de ser desafiados con 500 PFU de BTV-4 administrado por vía subcutánea. Para el control positivo se utilizó suero de ratones vacunados y posteriormente desafiados

con BTV-4 procedente de experimentos anteriores. Los signos clínicos y la viremia se monitorizaron en todos los animales después del desafío.

16. Inmunización de ovejas con rZH548- Δ NSs::BTV y desafío con BTV-4

Tres grupos de cuatro ovejas (raza churra) de aproximadamente 4-5 meses de edad fueron inoculadas subcutáneamente con 10^7 PFU de rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4}, rZH548- Δ NSs::NS1Nt_{BTV-4} y rZH548- Δ NSs::GFP, este último se utilizó como control negativo. Muestras de sangre se recogieron a 4, 7, 14 y 21 días post-inoculación para evaluar la inducción de anticuerpos neutralizantes. Veintiún días post-inoculación las ovejas fueron desafiadas con 10^6 PFU de BTV-4M. Los animales fueron mantenidos bajo observación y los signos clínicos fueron monitorizados durante dos semanas. Para medir los títulos de viremia se tomaron muestras de sangre a distintos tiempos después del desafío.

17. Inmunización de ratones IFNAR^{-/-} con VLPs de RVFV que expresan proteínas de BTV

Grupos de 5 ratones IFNAR^{-/-} fueron inoculados con 3 dosis de VLPs o 2 dosis de VLPs y una tercera dosis de rMVA. Las inoculaciones con VLPs fueron de 10^4 partículas y la dosis de rMVA fue de 10^7 PFU. Después de cada inmunización se tomaron muestras de suero para evaluar la respuesta humoral.

Dos semanas después de la tercera inoculación, los ratones fueron desafiados con 500 PFU de BTV-4 administrado por vía subcutánea. Después del desafío los ratones se mantuvieron bajo observación y los signos clínicos se monitorizaron hasta su muerte. Muestras de sangre fueron tomadas a distintos días post-desafío para evaluar la viremia.

Grupos	Día 0	Día 14	Día 28	Día 40
1	RVF VLPs-VP2	RVF VLPs-VP2	RVF VLPs-VP2	BTV-4
2	RVF VLPs-VP2	RVF VLPs-VP2	rMVA-VP2	BTV-4
3	RVF VLPs-NT	RVF VLPs-NT	RVF VLPs-NT	BTV-4
4	RVF VLPs-NT	RVF VLPs-NT	rMVA-NT	BTV-4
5	RVF VLPs-Ren	RVF VLPs-Ren	RVF VLPs-Ren	BTV-4
6	RVF VLPs-Ren	RVF VLPs-Ren	rMVA-WT	BTV-4

Tabla 5. Grupos de ratones y esquema de vacunación

18. Inmunización con rMVA-GnGc-VP2, rMVA-GnGc-NS1 y rMVA-GnGc-NS1Nt y desafío con BTV-4 o RVFV

Tres grupos de cinco ratones A129 IFNAR ^{-/-} fueron inoculados intraperitonealmente con 10⁷ PFU/ratón de rMVA-GnGc-VP2, rMVA-GnGc-NS1 y rMVA-GnGc-NS1Nt respectivamente. A los 21 días se les inoculó de nuevo con la misma dosis de virus y dos semanas más tarde fueron desafiados con 10³ PFU/ratón de BTV-4 por vía subcutánea. Se tomaron muestras de sangre antes y después del desafío para evaluar la inducción de anticuerpos neutralizantes frente a RVFV y BTV. Los signos clínicos y la viremia se monitorizaron en todos los animales después de la infección.

Asimismo tres grupos de cuatro ratones IFNAR ^{-/-} siguieron el mismo protocolo de vacunación y dos semanas después de la segunda dosis fueron sacrificados para extraer sus esplenocitos y llevar a cabo ensayos de respuesta celular. Un total 3x10⁶ esplenocitos fueron estimulados con 10 µg /ml de los péptidos seleccionados durante 6 horas, o con 5 µg /ml de la proteína de interés durante toda la noche. Células control positivas fueron estimuladas con ConA (8 µg /ml) y las células control negativas fueron estimuladas con medio RPMI completo. Después de la estimulación, las células fueron lavadas y teñidas con marcadores de superficie, fijadas, permeabilizadas y marcadas con marcadores intracelulares con los fluorocromos adecuados como se indica en el apartado 14 de Materiales y Métodos.

Grupo	Día 0	Día 21	Día 35
1	MVA-GnGc-VP2 10 ⁷ PFU/ratón	MVA-GnGc-VP2 10 ⁷ PFU/ratón	
2	MVA-GnGc-NS1 10 ⁷ PFU/ratón	MVA-GnGc-NS1 10 ⁷ PFU/ratón	BTV-4
3	MVA-GnGc-NS1Nt 10 ⁷ PFU/ratón	MVA-GnGc-NS1Nt 10 ⁷ PFU/ratón	10 ³ PFU/ratón
4	MVA-GnGc-VP2 10 ⁷ PFU/ratón	MVA-GnGc-VP2 10 ⁷ PFU/ratón	Sacrificio y
5	MVA-GnGc-NS1 10 ⁷ PFU/ratón	MVA-GnGc-NS1 10 ⁷ PFU/ratón	aislamiento de esplenocitos

6	MVA-GnGc-NS1Nt 10 ⁷ PFU/ratón	MVA-GnGc-NS1Nt 10 ⁷ PFU/ratón
----------	---	---

Tabla 6. Grupos de ratones y esquema de vacunación

19. Inmunización con rMVA-GnGc-NS1 y desafío con RVFV

Un grupo de cinco ratones BALB/c recibió dos dosis de 10⁷ PFU/ratón de rMVA-GnGc-NS1, otro grupo recibió una única dosis de 10⁷ PFU/ratón de rMVA-GnGc-NS1 y un último grupo fue inoculado con 10⁷ PFU/ratón de MVA-wt. Dos semanas después de la última inoculación de cada grupo, los ratones fueron desafiados con 500 PFU de la cepa virulenta 56/74 de RVFV. Previamente al desafío se midieron los niveles de anticuerpos neutralizantes y posteriormente al desafío se monitorizaron los signos clínicos, el peso corporal y la viremia.

Grupo	Día 0	Día 21	Día 35
1	rMVA-GnGc-NS1 10 ⁷ PFU/ratón	rrMVA-GnGc-NS1 10 ⁷ PFU/ratón	
2		rMVA-GnGc-NS1 10 ⁷ PFU/ratón	RVFV 500 PFU/ratón
3		rMVA-WT 10 ⁷ PFU/ratón	

Tabla 7. Grupos de ratones y esquema de vacunación

20. Inmunización de ovejas con rMVA-GnGc-NS1 y desafío con BTV-4 y RVFV

Dos grupos de tres ovejas fueron inoculados con 10⁸ PFU/oveja de rMVA-GnGc-NS1 o MVA-wt. 21 días post-inoculación las ovejas recibieron una segunda dosis y 59 días después de la primera inoculación fueron desafiadas con 10⁶ PFU de BTV-4M. Previo al desafío se tomaron muestras de sangre para determinar la inducción de anticuerpos neutralizantes frente a RVFV y la respuesta celular inducida por la vacuna. Post-desafío los animales fueron monitorizados y se tomaron muestras de sangre a distintos tiempos para determinar los niveles de viremia.

Ochenta días después de la primera inoculación y una vez que las ovejas se habían recuperado del desafío con BTV, fueron desafiadas con 10^7 PFU de RVFV. Después del desafío con RVFV los animales fueron monitorizados y se tomaron muestras de sangre a distintos tiempos para determinar los niveles de viremia.

Grupo	Día 0	Día 21	Día 59	Día 80
1	rMVA-GnGc-NS1 10^8 PFU/oveja	rMVA-GnGc-NS1 10^8 PFU/oveja	10^6 PFU	10^7 PFU
2	rMVA-WT 10^8 PFU/oveja	rMVA-WT 10^8 PFU/oveja	BTV-4M	RVFV

Tabla 8. Grupos de ovejas y esquema de vacunación y desafío

21. Ensayo de neutralización para RVFV

El suero de los ratones vacunados fue inactivado a 56°C durante 30 minutos, posteriormente se utilizó para realizar diluciones en base dos, empezando en 1:20, en DMEM y mezclado con un volumen igual de medio que contenía 10^3 PFU de un stock de virus MP12. Tras una hora de incubación a 37°C , esta mezcla se añadió a monocapas de células Vero sembradas en placas de 96 pocillos. Después de 3 días a 37°C en presencia de un 5% de CO_2 , las células se fijaron y se tiñeron con una solución que contenía el 2% de cristal violeta en 10% de formaldehído (Sigma Aldrich). El título de anticuerpos neutralizantes se determinó como la dilución más alta que reducía el ECP al 50%.

22. Ensayo de neutralización para BTV

Las muestras de suero de los ratones se inactivaron durante 30 minutos a 56°C y luego se realizaron diluciones en base diez que se incubaron con 100 PFU de BTV-4 durante 1 hora a 37°C y después se añadieron a placas de 12 pocillos sembradas con células Vero. Las células Vero se tuvieron con la muestra durante una hora y después el inóculo se retiró y se añadió DMEM fresco con un 0,4% de Agar Noble (Difco). Tras 5 días de incubación a 37°C con 5% de CO_2 las placas se fijaron y se tiñeron con una solución que contenía el 2% de cristal violeta en 10% de formaldehído (Sigma Aldrich). El título de anticuerpos neutralizantes se determinó como la dilución más alta que reducía el número de placas al 50%.

23. ELISA NP, VP2, VP7 y extracto de BTV-4

Se tapizaron placas de ELISA con 100 ng de la nucleoproteína de RVFV o con 150 ng de la proteína VP2 o 100 ng de la proteína VP7 diluidas en buffer carbonato/bicarbonato, pH 9,6 y se incubaron a 4°C durante toda la noche. Después de bloquear las placas con leche en polvo desnatada al 5% en PBS durante 1 hora a 37°C, se añadió el anticuerpo primario (suero de ratón o de oveja) diluidos en leche desnatada al 5% en PBS y se incubó durante una hora a 37°C. Los sueros se utilizaron a diluciones desde 1:50 a 1:200. Después se eliminó el anticuerpo primario y las placas se lavaron 3 veces con PBS antes de añadir el anticuerpo secundario específico de especie (un anti-ratón u anti-oveja) conjugado con peroxidasa (Invitrogen), diluido 1:1000 en leche desnatada al 5% en PBS que se incubó durante 1 hora a 37°C. Después de la incubación se repitieron los pasos de lavado y se añadió el sustrato que se mantuvo durante 10 minutos antes de parar la reacción con H₂SO₄ 1N. Las densidades ópticas se midieron en un espectrofotómetro a 450 nm.

Para el ELISA con extracto de células infectadas con BTV se preparó una dilución 1:25 del extracto en buffer carbonato/bicarbonato que posteriormente se sonicó durante 30 segundos a una amplitud del 70%. Con esto se tapizaron las placas durante toda la noche a 4°C. Después se retiró y se realizaron 3 lavados consecutivos con 200 µl/pocillo de PBS 1X. Las placas se bloquearon con leche desnatada al 2% en PBS1X durante 1 hora a 37°C y posteriormente se repitió el paso de lavado. Los sueros, de ratón o de oveja, se añadieron diluidos desde 1:50 a 1:200 en leche desnatada al 2% en PBS y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Se repitió una vez más el paso de lavado y después se añadió el anticuerpo secundario, anti-ratón o anti-oveja (Invitrogen), diluido 1:1.000 y se incubó durante 1 hora a 37°C. las placas se lavaron una vez más antes de añadir el sustrato que se incubó en oscuridad a temperatura ambiente durante 20 minutos antes de parar la reacción con H₂SO₄. Las densidades ópticas se midieron a 450 nm.

24. Análisis bioquímicos

Alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), lactato deshidrogenasa (LDH) y las proteínas totales (TP) entre otros parámetros bioquímicos fueron medidos en sueros de ovejas recogido a distintos tiempos post-infección en el analizador Saturno 100 analyser (Crony Instruments, Rome, Italy) utilizando reactivos

específicos según las especificaciones del fabricante. La actividad de las enzimas está expresada en unidades internacionales por litro (U/l), las proteínas del suero en g/dL y los compuestos orgánicos en mg/dL.

25. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa GraphPad PRISM versión 6.00 (GraphPad Software, San Diego, CA). Las diferencias en los niveles de anticuerpos, las repuestas de células T, los parámetros bioquímicos y las viremia entre grupos se calcularon con un test ANOVA no paramétrico o t test múltiple. Los datos de supervivencia se analizaron utilizando un test de rango logarítmico con los ratones agrupados por estrategia de inmunización. Un nivel de significación de $P < 0.05$ se fijó para todos los análisis.

VI. RESULTADOS

CAPITULO 1

1. Generación de virus recombinantes de RVFV que expresan antígenos de BTV.

Se utilizó un sistema de genética reversa basado en la utilización de la ARN polimerasa I y II (Habjan, Penski et al. 2008) para generar los virus recombinantes de RVFV. Los genes que codifican la proteína estructural VP2 o la proteína no estructural NS1 de BTV-4 se amplificaron a partir de plásmidos que contenían esas secuencias utilizando primers que contenían los sitios de restricción NcoI y XhoI en el extremo 5' y 3' respectivamente. Los productos de PCR fueron purificados e insertados en el plásmido pHH21-RVFV-vN_TCS, previamente digerido con la enzima AarI, en el que la secuencia de NSs ha sido reemplazada con un sitio de clonaje denominado TCS (Tandem cloning site). Los virus recombinantes RVFV- Δ NSs se generaron (rescataron) en un co-cultivo de células BHK-21 y HEK293 mediante co-transfección con un cóctel de cinco plásmidos que contenían los genes de BTV-4 VP2 (cóctel VP2_{BTV-4}) o NS1 (cóctel NS1_{BTV-4}) como se muestra en la figura 2 de materiales y métodos.

Como controles del rescate de los virus, se generaron los virus recombinantes rZH548wt y rZH548- Δ NSs::GFP mediante transfección. Tras varios pases ciegos a partir del sobrenadante de transfección con el cóctel VP2_{BTV-4} se observó efecto citopático (Figura 1.1), lo cual era indicativo de la posible generación del virus recombinante rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4}. Por el contrario, no se observó efecto citopático en ninguno de los intentos que se realizaron para generar virus a partir de la transfección con el cóctel NS1_{BTV-4}. Para intentar evitar un posible efecto tóxico inducido por la proteína NS1 completa, se clonó únicamente la mitad N-terminal de la proteína NS1 (aminoácidos 1 a 270). La transfección realizada con este plásmido produjo un efecto citopático evidente (Figura 1.1) tras varios pases, indicativo de la posible generación del virus rZH548- Δ NSs::NS1Nt_{BTV-4}. Para facilitar la detección del gen heterólogo NS1-Nt posteriormente se generó un plásmido pHH21-RVFV-vN_NS1NtV5tag que codificaba la región N-terminal de la proteína NS1 en fase con la secuencia marcadora (tag) V5 (IPNPLLGLD) en el extremo C-terminal. Tras la transfección con este plásmido y varios pases ciegos se observó efecto citopático indicativo del rescate del virus recombinante rZH548- Δ NSs::NS1NtV5tag_{BTV-4}, al que durante el resto del texto nos referiremos únicamente como rZH548- Δ NSs::NS1Nt_{BTV-4}. La presencia de virus recombinante en los sobrenadantes se confirmó mediante ensayos de formación de placa en células Vero. En la tabla 1.1 se encuentran recogidos los datos de la eficacia de rescate para los distintos virus y los títulos alcanzados por estos.

	rZH548- Δ NSs::GFP	rZH548- Δ NSs::VP2 _{BTV-4}	rZH548- Δ NSs::NS1 _{BTV-4}	rZH548- Δ NSs::NS1Nt _{BTV-4}
Eficacia de rescate	2/2	1/3	0/2	1/1
Título viral (PFU/ml)	10 ⁶	10 ⁷	ND	10 ⁷

Tabla 1.1. Eficacia de rescate con los diferentes virus y título alcanzado tras el rescate.

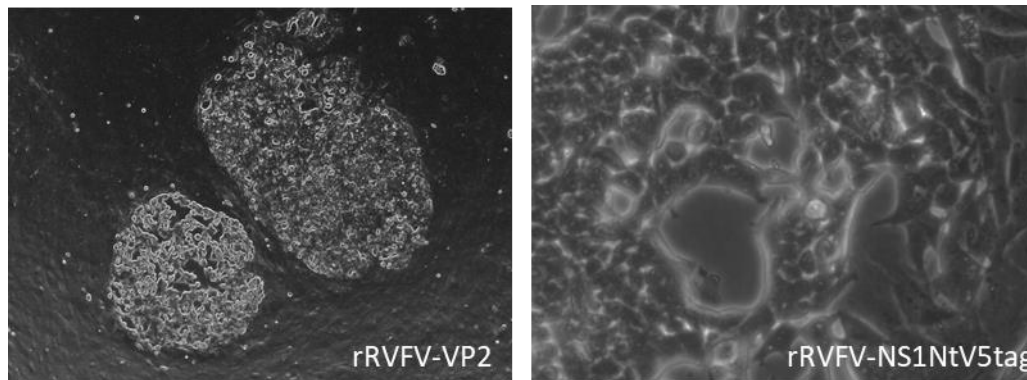


Figura 1.1. Efecto citopático observado en células Vero tras el primer pase ciego del sobrenadante de transfección.

2. Expresión de antígenos de BTV por los virus recombinantes RVFV

Para comprobar que los virus recombinantes generados expresaban correctamente los genes heterólogos, cultivos de células Vero fueron infectados con los distintos virus y la expresión de VP2 y NS1-Nt fue analizada mediante inmunofluorescencia utilizando bien un suero policlonal de ratón anti-BTV4-VP2, un suero hiperinmune específico de BTV-16 o un anticuerpo monoclonal frente a la secuencia marcadora V5. Las preparaciones se observaron mediante microscopía confocal.

El patrón de expresión observado para la proteína VP2 era similar al descrito para esta proteína en una infección con BTV, observándose una fluorescencia citoplasmática difusa. Para el virus rZH548- Δ NSs::NS1Nt_{BTV-4} se pudo detectar la expresión de la proteína NS1 truncada mediante el anticuerpo monoclonal que reconoce la secuencia marcadora V5. El patrón de expresión en este último caso también fue granular o en forma de agregados lo que concuerda con el tipo de formaciones que produce la proteína NS1 (datos no mostrados).

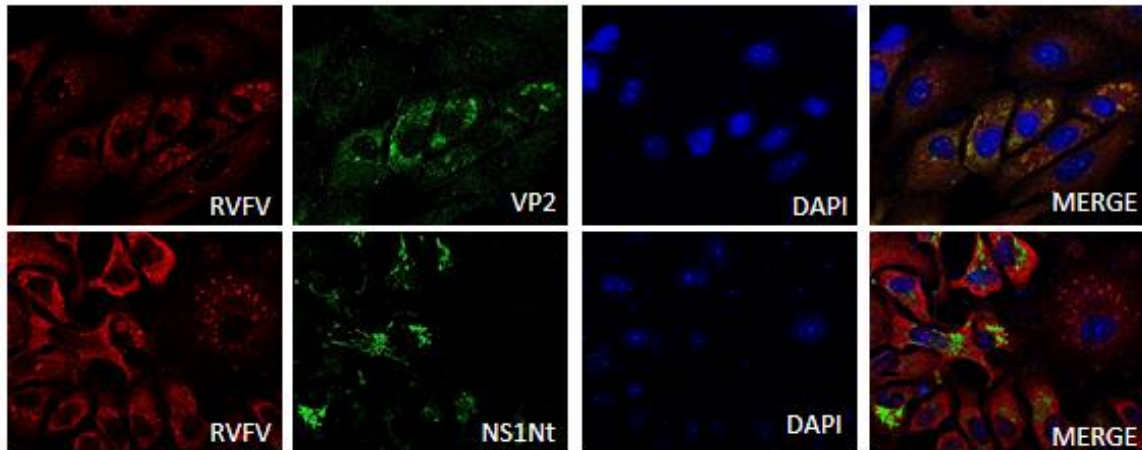


Figura 1.2. Expresión de los genes heterólogos por parte de los rRVFVs. El reconocimiento del virus se obtuvo mediante la utilización de un anticuerpo policlonal anti-RVFV de conejo. El reconocimiento de la proteína VP2 se llevó a cabo utilizando un anticuerpo policlonal de ratón anti-VP2 y de la proteína NS1Nt mediante el anticuerpo monoclonal anti-V5tag de ratón.

Ensayos de western blot de lisados de células Vero infectadas con el virus rZH548- Δ NSs::NS1Nt_{BTV-4} mostraron que la proteína heteróloga se expresaba con el tamaño esperado (32 kDa). Dado que la proteína VP2 de BTV es difícil de detectar por western blot debido a que la mayoría de los anticuerpos que induce son conformacionales, la expresión de VP2 en células infectadas con el virus rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} se observó mediante un ensayo de radioinmunoprecipitación. Se observó un patrón múltiple de bandas de proteínas minoritarias, una de las cuales coincidía aproximadamente con el tamaño esperado de la proteína VP2 completa (110 kDa), mientras que la especie proteica más abundantemente detectada fue un polipéptido de unos 25 kDa. La presencia de un patrón de bandas similar se había descrito anteriormente (Cowley et Gorman, 1990) y se atribuye a la presencia de varios sitios de procesamiento proteolítico dentro de la proteína VP2 que daría lugar a fragmentos de aproximadamente 93, 76, 54 and 25 kDa. Este patrón de bandas múltiples no se observa en la inmunoprecipitación de lisados infectados con el virus rZH548- Δ NSs::NS1Nt_{BTV-4} (utilizado aquí como control) confirmando la especificidad del mismo.

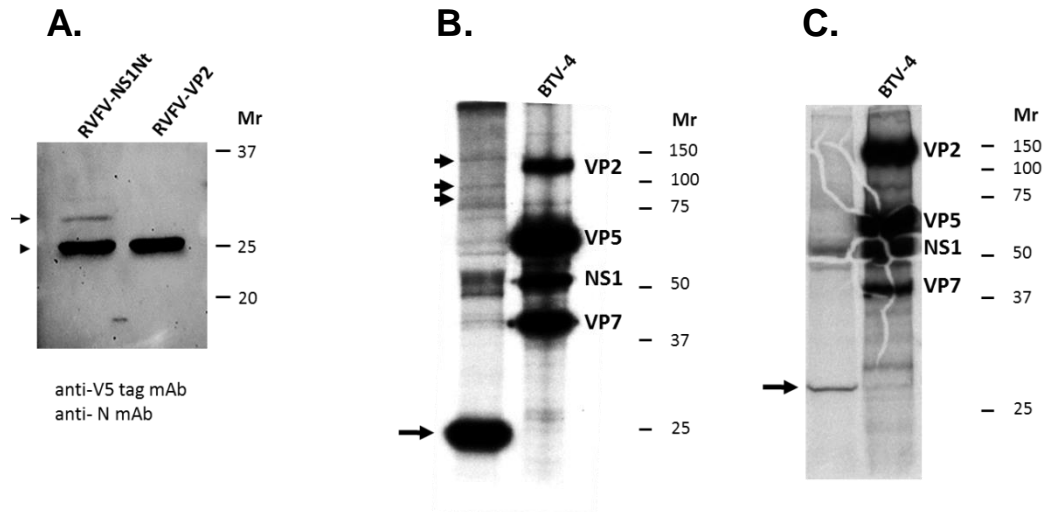


Figura 1.3. **A.** Análisis mediante western blot de células Vero infectadas con rZH548- Δ NSs-NS1Nt_{BTV}. Se utilizó un anticuerpo monoclonal frente a la secuencia marcadora V5 para la detección del extremo N-terminal de la proteína NS1. Para detectar la nucleoproteína N de RVFV se utilizó un anticuerpo policlonal de ratón como control de la infección. **B y C.** Ensayo de radioinmunoprecipitación de células Vero infectadas con rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} y BTV-4 durante 48 horas. Se ha descrito previamente que la proteína VP2 presenta varios sitios de corte (que dan lugar a polipéptidos de 93, 76, 54 y 25 kDa), algunos de los cuales corresponden con las bandas observadas en la imagen y marcadas con las flechas. También detectamos la proteína al completo (flecha superior) con un tamaño aproximado de 110 kDa.

3. Caracterización de los virus recombinantes RVFV *in vitro*

Una vez que se confirmó la expresión de los genes heterólogos, se analizó el fenotipo de los virus recombinantes generados. La cinética de crecimiento *in vitro* de los dos virus recombinantes se comparó con la del virus recombinante parental (rZH548wt) y con la del mutante de delección que expresa GFP (rZH548- Δ NSs::GFP) en células Vero y HEK293 utilizando una MOI baja (0.01 PFU). Los sobrenadantes se recogieron a diferentes tiempos post-infección y los títulos virales se determinaron por plaqueo en células Vero. Independientemente de la línea celular usada, las tasas de crecimiento y los títulos finales de los virus rRVFV-BTV fueron similares a los del virus rZH548- Δ NSs::GFP, pero notablemente inferiores comparados con el virus rZH548wt, lo cual concuerda con un fenotipo atenuado. Tal y como se esperaba, en células capaces de responder a la inducción del IFN de tipo I como son las células HEK293 los virus con el gen NSs delecionado mostraron cinéticas y títulos finales menores. Los virus rRVFV-BTV presentaron un fenotipo de placa de lisis difusa, aunque menos de lo esperado para virus en los que se ha delecionado la proteína NSs. El tamaño de placa también difería ligeramente; rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} mostró un tamaño de placa menor que rZH548- Δ NSs::NS1Nt_{BTV-4} o rZH548- Δ NSs::GFP.

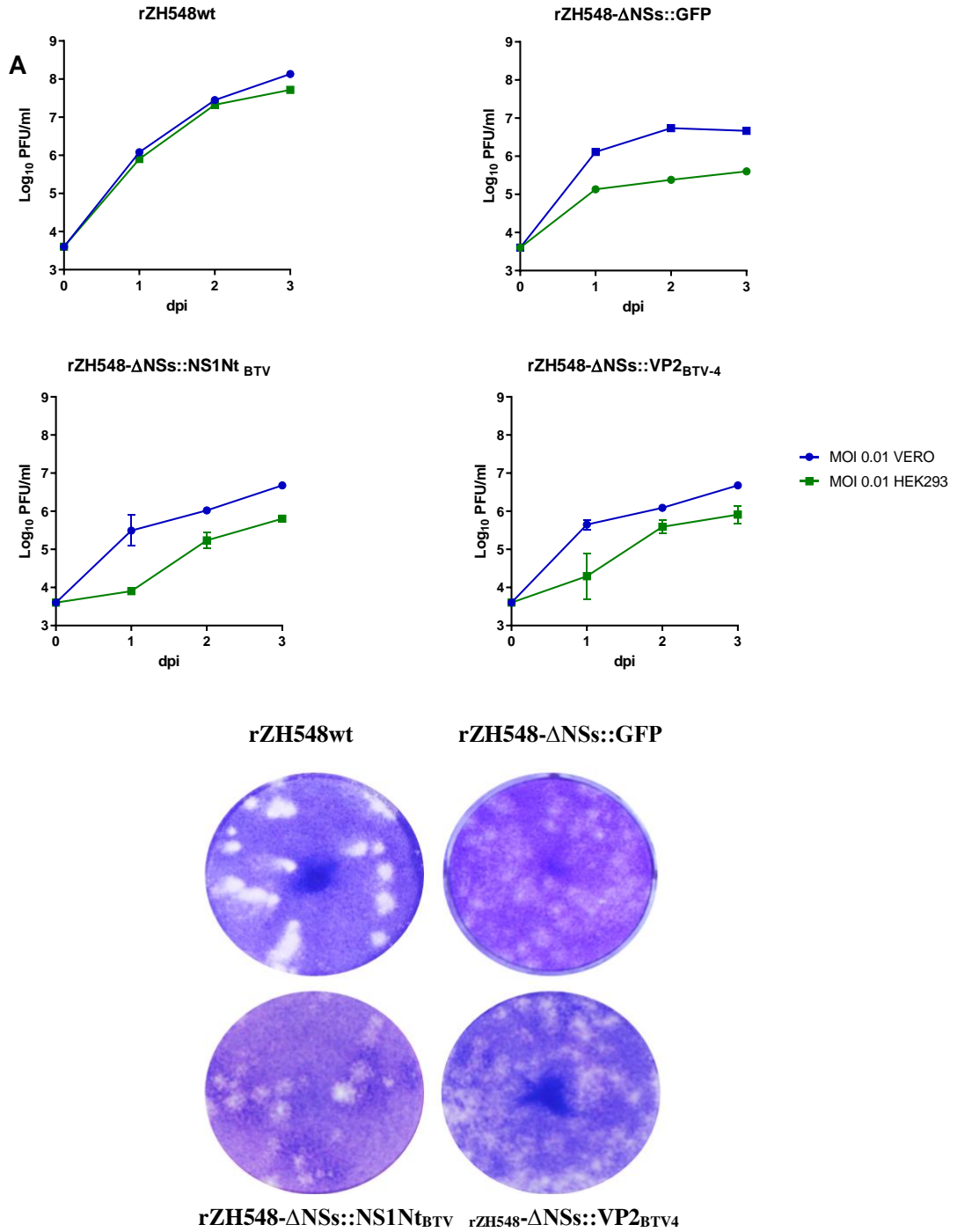


Figura 1.4. Caracterización fenotípica de los virus recombinantes. Fenotipos de placa y curvas de crecimiento de los virus recombinantes. Células Vero y HEK293 fueron infectadas a una MOI de 0,01 y los sobrenadantes se recogieron a los tiempos indicados. Los títulos se determinaron mediante infección de células Vero con diluciones seriadas de los sobrenadantes.

4. Estabilidad genética de los rRVFV-BTV

Dado que las secuencias introducidas en el genoma de los virus recombinantes alteran el tamaño y secuencia normales del segmento S del ARN del virus, comprobamos si estos cambios se mantenían estables tras varios pases seriados en cultivo celular. Utilizamos ARN extraído de cultivos celulares infectados con virus tras un número consecutivo de pases y analizamos la presencia de los genes heterólogos en el segmento clonado bien mediante qPCR en tiempo real (NS1) o PCR tradicional (VP2). Los niveles de detección de los genes de NS1 o VP2 se normalizaron con relación al gen de la polimerasa viral (segmento L) o al gen de la nucleoproteína N (segmento S), respectivamente, para dar valores de detección relativos.

Después de cuatro pases consecutivos ambos genes heterólogos se pudieron detectar con ratios consistentes con respecto a la detección de los genes del virus (Figura 1.5). Además, se pudo seguir observando efecto citopático después de cada pase así como expresión de las proteínas recombinantes mediante IFI con anticuerpos específicos (Figura 1.6).

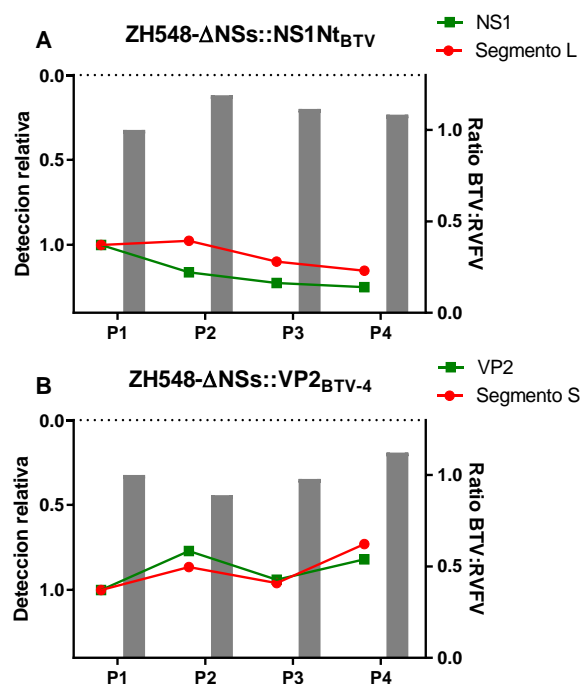


Figura 1.5. Estabilidad genética analizada mediante qPCR a tiempo real (rZH548-ΔNSs::NS1Nt_{BTV}) o PCR convencional (rZH548-ΔNSs::VP2_{BTV-4}). Para representar los datos en la gráfica se ha obtenido la detección relativa de las proteínas, tomando como referencia el valor obtenido en el pase 1 que es el que tomamos como nivel de expresión basal para ver si los niveles se mantienen con los pases. El ratio representa la detección relativa al calcular el cociente entre el nivel de detección del gen heterólogo y el nivel de detección de la proteína viral.

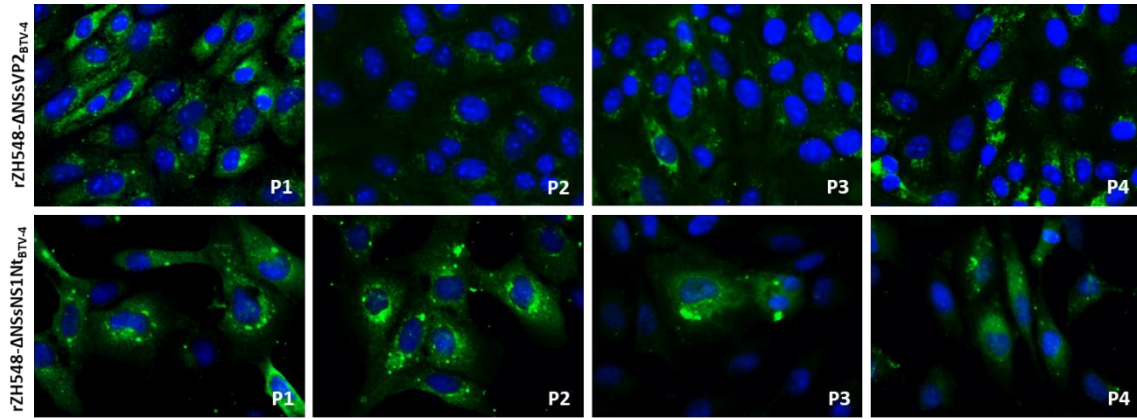


Figura 1.6. Análisis de la estabilidad de la expresión de las proteínas recombinantes mediante IFI con anticuerpos específicos. Células vero se infectaron a una MOI de 1 durante 24 horas. Para la detección de rZH548-ΔNSs::VP2_{BTV-4} se utilizó un suero de ratón inmunizado con rMVA-VP2/VP7/NS1 y desafiado con BTV-4. Para la detección de rZH548-ΔNSs::NS1_{BTV-4} se utilizó un anticuerpo monoclonal frente a la secuencia marcadora V5.

Además de comprobar la presencia del gen, en el caso del virus rZH548-ΔNSs::VP2_{BTV-4} se amplificaron fragmentos solapantes del gen (Figura 1.7) y se secuenciaron para descartar la presencia de truncamientos o mutaciones que pudieran afectar a su expresión. Amplificamos 4 fragmentos con distintos primers tal y como se describe en materiales y métodos (Figura 4); los fragmentos tienen 1366 pb, 998 pb, 653 pb y 445 pb. Estos fragmentos se amplificaron también a partir de ARN de células infectadas con BTV-4 y al secuenciar no se observaron cambios que afecten a la expresión de VP2.

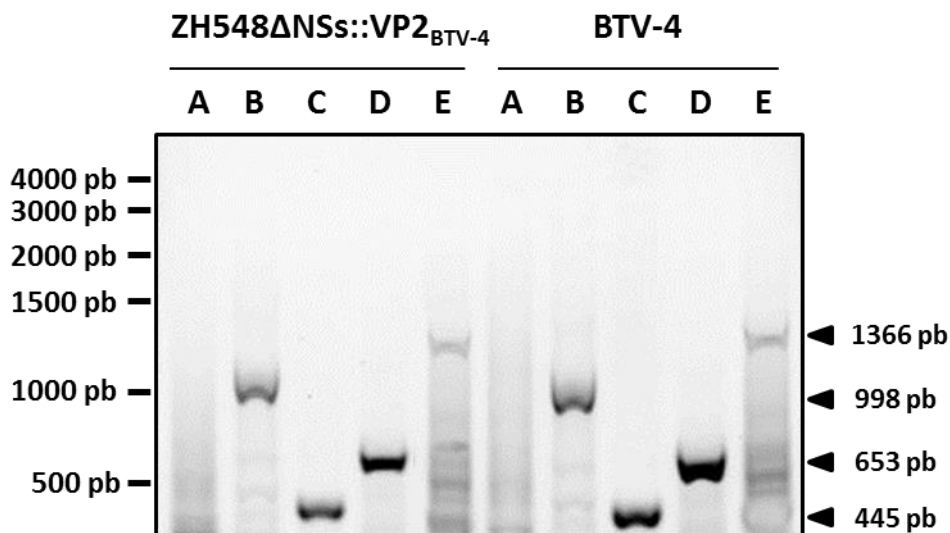
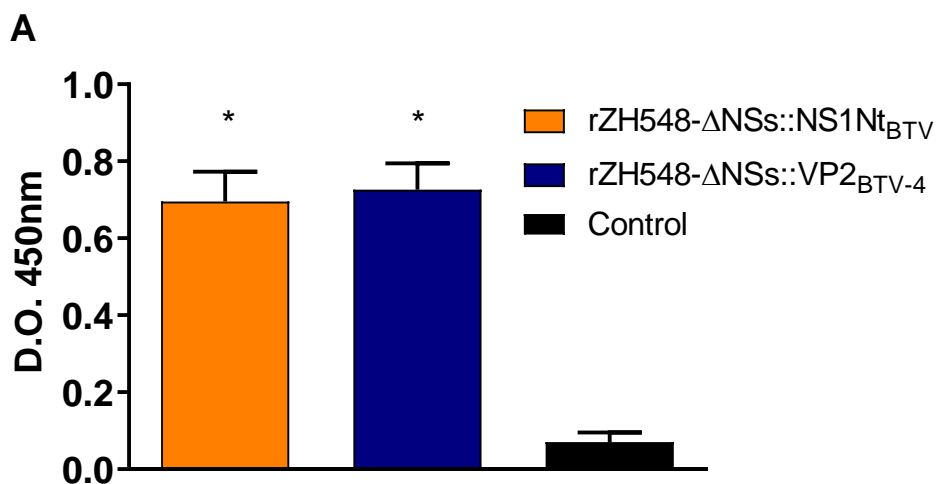


Figura 1.7. Amplificación de fragmentos solapantes del gen de VP2 en el virus rZH548-ΔNSs::VP2_{BTV-4} y en BTV-4.

5. Caracterización *in vivo* y evaluación de la atenuación de los rRVFV-BTV

Los virus RVFV- Δ NSs presentan un fenotipo muy atenuado en ratones IFN-competentes e inducen una fuerte respuesta inmune rápidamente después de la inoculación (Muller, Saluzzo *et al.*, 1995). Para confirmar que los virus generados estaban atenuados, se inocularon ratones Balb/c intraperitonealmente con 10^7 , 10^4 y 10 PFU de rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} o rZH548- Δ NSs::NS1Nt_{BTV-4}. Todos los ratones sobrevivieron a la infección (figura 1.8), incluso cuando fueron inoculados con la dosis más alta de virus (10^7 PFU), lo cual indica que los virus mantienen la atenuación producida por la eliminación del gen NSs y que ésta se mantiene a pesar de la expresión de los antígenos de BTV. Se analizó la presencia de anticuerpos específicos frente a la nucleoproteína N de RVFV en los sueros de los ratones infectados y se detectaron niveles similares para todos los virus. Los elevados niveles de anticuerpos anti-N detectados (figura 1.8A) indican que a pesar de la atenuación y la presencia adicional de genes heterólogos estos virus son capaces de replicar eficientemente *in vivo*. La inducción de anticuerpos anti-N fue dependiente de dosis, y aumentó significativamente a lo largo del tiempo como muestra la cinética de IgGs (Figura 1.9 A) después de la infección con rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4}. Los sueros de los ratones infectados con 10^7 y 10^4 PFU de rRVFV-BTV presentaron altos niveles de anticuerpos neutralizantes. Niveles sensiblemente menores de neutralización se detectaron en los ratones inoculados con 10 PFU (figura 1.8B).



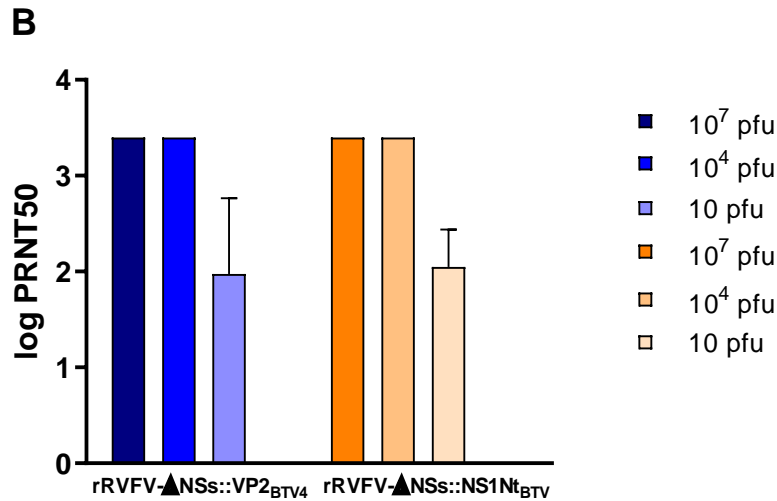
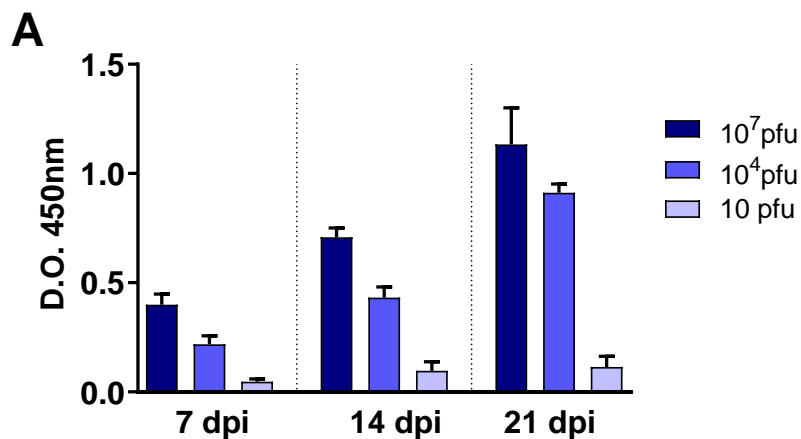
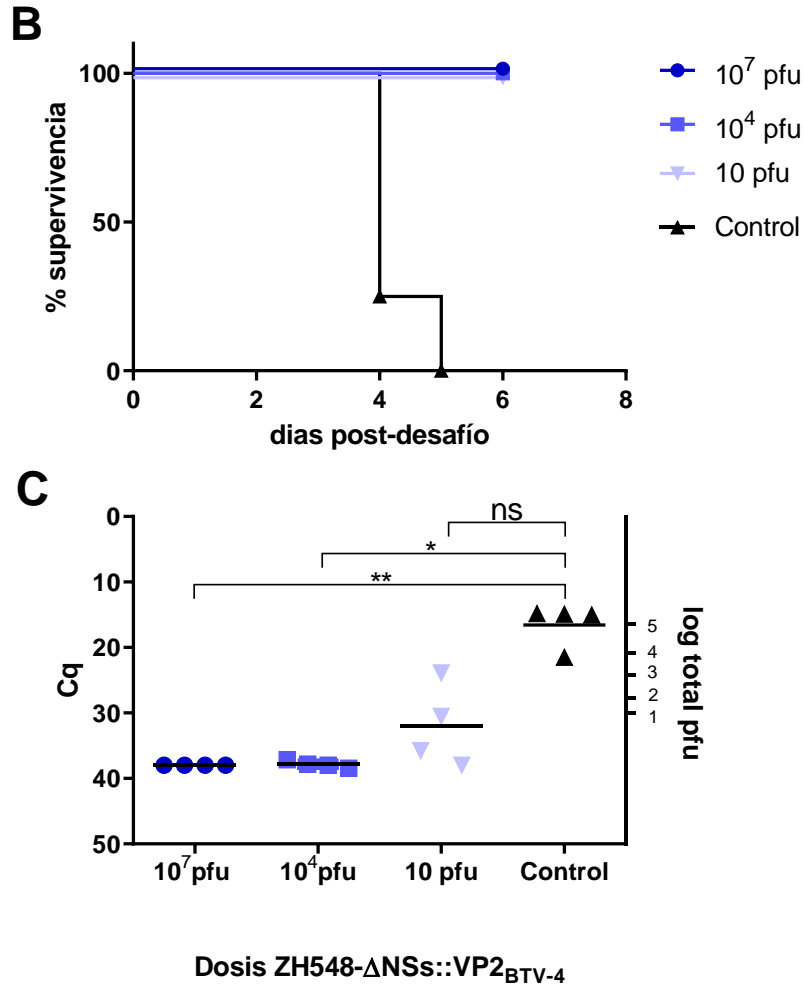


Figura 1.8. A. Detección de anticuerpos frente a la nucleoproteína del virus en suero de ratones inoculados con 10⁷ PFU de los virus recombinantes B. Detección de anticuerpos neutralizantes frente a RVFV en suero de ratones inoculados con distintas dosis de rZH548-ΔNSs::VP2_{BTV-4} y rZH548-ΔNSs::NS1N_{tBTV}.

Para comprobar si a pesar de la atenuación los virus eran capaces de replicar hasta un punto que permitiera la inducción de una respuesta inmune protectora, los ratones se desafiaron con una dosis letal de la cepa virulenta 56/74 de RVFV dos semanas después de la inoculación. Pese a la diferencia observada en los niveles de anticuerpos neutralizantes en el grupo inoculado con la dosis menor, tras el desafío se pudo ver que todos los ratones estaban protegidos. Todos los ratones sobrevivieron sin signos clínicos, excepto aquellos que pertenecían al grupo control, que murieron entre los días 4-6 (Figura 1.9 B). A día 3 post desafío se pudieron detectar altas cargas virales en los ratones del grupo control y niveles inferiores en el grupo inoculado con 10 PFU, mientras que los ratones de los otros grupos no mostraron viremia (Figura 1.9 C).





Dosis ZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4}
Figural 1.9. A. Detección de anticuerpos frente a la nucleoproteína del virus en suero de ratones inoculados con distintas dosis de rZH548- Δ NSsVP2_{BTV-4}. B. Curva de supervivencia tras la inoculación intraperitoneal de una dosis letal de la cepa virulenta 56/74 a los ratones inmunizados con las distintas dosis del virus rZH548- Δ NSsVP2_{BTV-4}. C. Detección de títulos de viremia por RT-PCR a día 3 post-infección. Los datos están mostrados para cada ratón individual (n=4) con medias y *P<0.05

De la misma forma se inocularon ratones IFNAR $-/-$ para valorar el nivel de atenuación de los virus. Está descrito (Bouloy, Janzen et al. 2001) que otras cepas atenuadas de RVFV distintas a las usadas en este trabajo son virulentas para estos ratones deficientes en la ruta de interferón tipo I. Se inocularon ratones IFNAR $-/-$ con las mismas dosis que los ratones Balb/c. En este caso todos los ratones murieron tras la inoculación de los virus recombinantes, indicando que los virus Δ NSs son virulentos en esta cepa de ratón y que la expresión de ambos genes heterólogos no altera este fenotipo.

6. Análisis de la respuesta humoral protectora frente a BTV tras la inoculación con rZH548- Δ NSsVP2_{BTV-4} en ratones Balb/c

Para analizar si la inoculación con rZH548- Δ NSsVP2_{BTV-4} había inducido anticuerpos anti-VP2, se tapizaron placas de ELISA con un lisado de células infectadas

con BTV-4 y se determinó la presencia de anticuerpos anti-VP2 en los sueros de los ratones. En los sueros de los ratones vacunados con la dosis más alta se detectaban niveles más altos de anticuerpos con respecto a los grupos que habían recibido dosis menores lo cual indicaba una inducción de anticuerpos dependiente de dosis (Figura 1.10 A). En el caso de los sueros de los ratones inoculados con 10^4 y 10^7 PFU del virus recombinante los niveles de anticuerpos eran prácticamente idénticos. Para confirmar la inducción de anticuerpos específicos frente a VP2, los sueros también se utilizaron para realizar ensayos de seroneutralización frente a BTV-4. Los grupos vacunados con 10^7 y 10^4 PFU mostraron niveles muy similares de anticuerpos neutralizantes, 1,52 y 1,45 (\log_{10}) a día 7 y 1,82 y 1,60 a día 14 post-inmunización, respectivamente. También se pudo observar que los niveles de anticuerpos alcanzaban un máximo a día 14 y que descendían notablemente hasta el día 21, especialmente en el grupo inoculado con 10^4 PFU. En el caso de los ratones inoculados con únicamente 10 PFU no se detectaron anticuerpos neutralizantes, lo que sugiere que la inducción de anticuerpos neutralizantes también es dependiente de dosis.

Para comprobar si la dosis de rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} había sido capaz de primar adecuadamente a los ratones para generar respuestas de memoria posteriores tras una segunda exposición al antígeno, se inoculó a los ratones con una dosis de 10^5 PFU de BTV-4 21 días después de la primera inoculación. A esta segunda vacunación con BTV-4 la denominamos segunda dosis en vez de desafío dado que este virus no replica en ratones Balb/c. Está descrito que el único modelo de ratón susceptible a la infección con BTV son los ratones IFNAR^{-/-} cuya deficiencia en la respuesta de interferón tipo I permite la replicación del virus y muestran por tanto signos clínicos y mortalidad a dosis letales (Marin-Lopez, Bermudez et al. 2016).

Al evaluar los niveles de anticuerpos por ELISA (Figura 1.10 A) después de la dosis con BTV-4 se detectó que los niveles habían aumentado sólo en el grupo inoculado con 10^7 PFU. Por el contrario, se observó que en todos los grupos aumentaba significativamente la actividad neutralizante (Figura 1.10 B), incluido el grupo inoculado con la dosis más baja de rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4}, siendo estos niveles de anticuerpos en todos los casos significativamente superiores a los detectados en el grupo control, lo cual indica que existe un efecto de primado por parte del virus recombinante incluso cuando los animales son inoculados con la dosis más baja.

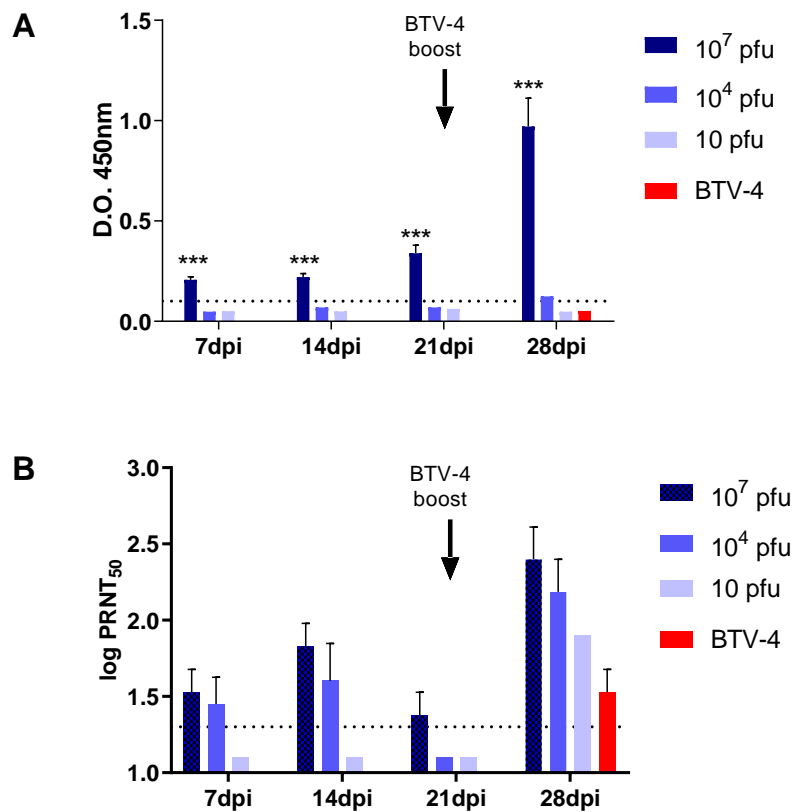


Figura 1.10. A. Detección de anticuerpos frente a VP2 en sueros de ratones inoculados con diferentes dosis del virus rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4}. Placas de ELISA tapizadas con proteína recombinante se utilizaron para incubar el suero obtenido a distintos tiempos post-inoculación. *P<0.05. **B.** Cinética de anticuerpos neutralizantes antes y después de la segunda dosis con BTV-4.

7. Protección inducida por rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4}

En los ratones BALB/C la vacunación con rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} indujo una respuesta humoral frente a VP2 como pudimos comprobar tanto por ELISA como por seroneutralización. Dado que los anticuerpos frente a VP2 se asocian con protección frente a BTV (Schwartz-Cornil, Mertens et al. 2008) la inoculación con este virus podría haber conferido protección frente a un desafío con BTV-4. Sin embargo, dado que el

modelo animal para los ensayos de desafío con lengua azul son los ratones IFNAR $-/-$, y estos son muy susceptibles a la inoculación con RVFV, la eficacia de la protección inducida por el virus rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} no se puede evaluar directamente. En su lugar realizamos un ensayo de transferencia pasiva de anticuerpos. En este ensayo se inoculó a los ratones IFNAR $-/-$ con pools de sueros procedentes de los ratones inmunizados con (i) 10^7 PFU de rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} (dosis única), (ii) 10^7 PFU de rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} y 10^5 PFU de BTV-4 (grupo *prime-boost*), (iii) 10^5 PFU de BTV-4 (grupo control), y (iv) suero negativo (grupo control negativo). Posteriormente se les desafió con una dosis letal de 500 PFU de BTV-4. Se eligió el suero de los ratones inoculados con 10^7 PFU ya que tanto en los ensayos de ELISA como de seroneutralización se observó que esta dosis era la que más anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes inducía.

Tras el desafío, únicamente sobrevivieron (Figura 1.11A) los ratones que habían sido inoculados con el suero procedente de ratones que habían sido vacunados con el virus recombinante y posteriormente con una segunda dosis con BTV-4, sin mostrar ningún signo clínico. Por el contrario, los ratones inoculados con una única dosis del virus recombinante sucumbieron al desafío, aunque mostraron un pequeño retraso con respecto al grupo control inoculado con BTV-4. A tres días post-desafío todos los grupos presentaban viremias más bajas que las del grupo control negativo y aquellos inoculados con en el régimen *prime-boost* presentaban diferencias significativas. Tal y como se esperaba por los datos de supervivencia, las cargas virales más bajas se detectaron en el grupo del *prime-boost*. Estos resultados sugieren que una única dosis de rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} o de BTV-4 no confieren una respuesta humoral protectora completa. Sin embargo, rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} es eficiente primando a los animales como se ha demostrado con la eficacia del régimen *prime-boost*.

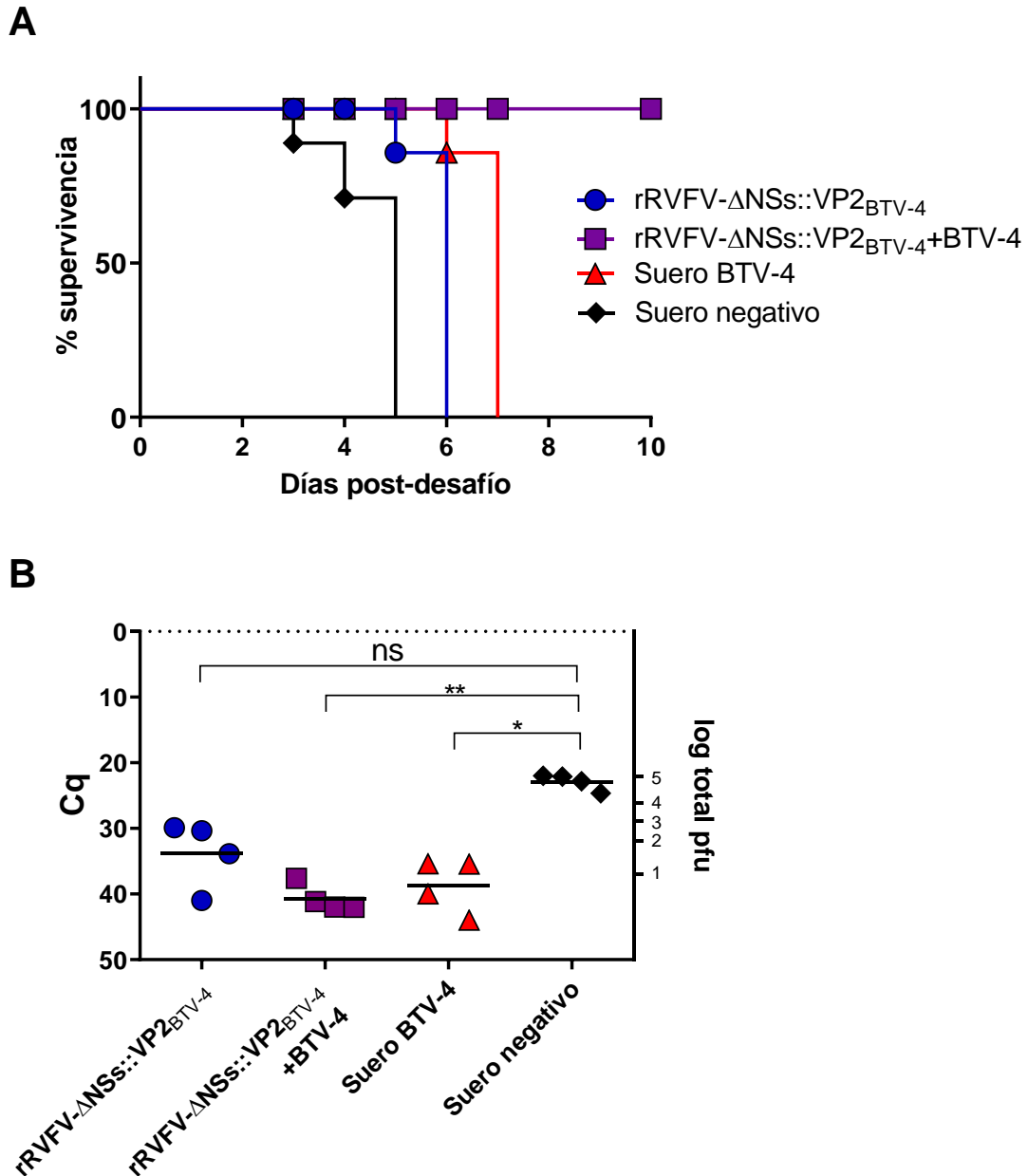


Figura 1.11. **A.** Curva de supervivencia de los ratones ($n=4$) tras el desafío por vía subcutánea con una dosis letal de BTV-4. **B.** Detección de títulos de viremia mediante RT-qPCR a tiempo real a día 3 post-desafío. Los datos se muestran individualmente ($n=4$)

8. Respuesta celular inducida mediante la vacunación con rZH548- Δ NSs::NS1Nt_{BTV-4}

La proteína NS1 de BTV se ha propuesto como antígeno candidato para el desarrollo de vacunas multiserotipo frente a BTV debido a su alto nivel de conservación entre la mayoría de serotipos del virus además de por la presencia de epítopos de inmunidad celular (Marin-Lopez, Calvo-Pinilla et al. 2018). Por tanto se decidió evaluar la respuesta

inmune celular inducida por el virus recombinante rZH548- Δ NSs::NS1Nt_{BTV}, para lo cual inoculamos ratones 129 Sv con una única dosis del virus recombinante, una única dosis de rMVA-NS1 o de BTV-4; o con una dosis del virus recombinante y una segunda dosis de BTV-4 o rMVA-NS1. Los ratones utilizados fueron 129 Sv ya que los ratones IFNAR -/- que son el modelo para BTV tienen como origen los ratones 129 Sv. La dosis de inmunización de rZH548- Δ NSs::NS1Nt_{BTV} fue 10^7 PFU, que había sido determinada como dosis óptima en los ensayos de inmunización con rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4}.

La respuesta celular inducida fue evaluada dos semanas después de la última inmunización, tanto para los ratones inmunizados una única vez como para los ratones que habían sido inmunizados dos veces. Los ratones fueron sacrificados y sus esplenocitos aislados para llevar a cabo una caracterización de la respuesta celular inducida por las inmunizaciones por ensayos de tinción intracelular de citoquinas (ICCs) y ELISPOT. Los esplenocitos se estimularon con la proteína NS1 recombinante o con el péptido específico de NS1 denominado “152” (GQIVNPTFI), un péptido previamente identificado como relevante para la inducción de inmunidad celular específica de la proteína NS1 (Marin-Lopez, Calvo-Pinilla et al. 2017).

Tras la estimulación de linfocitos esplénicos con el péptido 152 se observó una expresión significativa de IFN- γ por parte de células T-CD8+ en aquellos ratones que habían sido primados con rZH548- Δ NSs::NS1Nt_{BTV-4} y después re-inmunizados con rMVA-NS1 (6,446%) o BTV-4 (4,095%), mientras que los niveles de estimulación observados fueron inferiores en aquellos ratones que recibieron únicamente una dosis de cualquiera de los inóculos rZH548- Δ NSs::NS1Nt_{BTV-4}, rMVA-NS1, BTV-4, (0,7975%, 0,2175% y 0,5575%, respectivamente). Igualmente se observó una expresión significativa de células T-CD8+CD107+ después de la estimulación con el péptido 152 en aquellos ratones que habían sido inmunizados con el virus recombinante y posteriormente habían recibido una segunda dosis bien con rMVA-NS1 o BTV-4 comparado con el resto de grupos.

Con respecto al ELISPOT, se detectó un mayor nivel de estimulación de células secretoras de IFN- γ con el péptido 152 en aquellos animales que habían sido inmunizados con el virus recombinante y después habían recibido una segunda dosis con rMVA-NS1 o BTV-4 en comparación con los grupos de dosis única. Otra observación interesante es que el grupo inoculado únicamente con el virus recombinante rZH548- Δ NSs::NS1Nt_{BTV}.

4 mostro niveles superiores de células estimuladas comparado con los otros grupos inoculados con una única dosis de rMVA-NS1 o BTV-4, aunque estas diferencias no alcanzaron significación estadística .

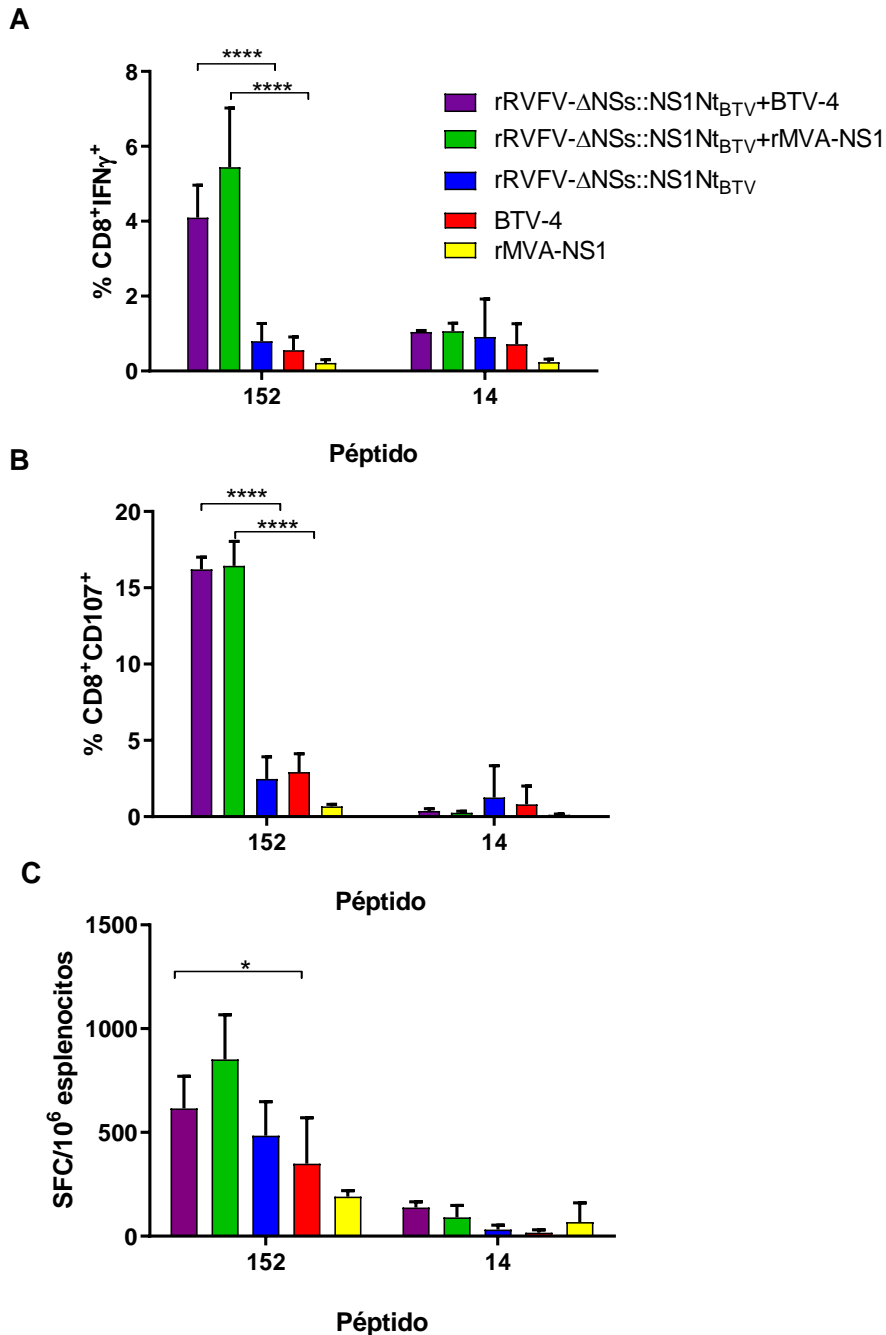


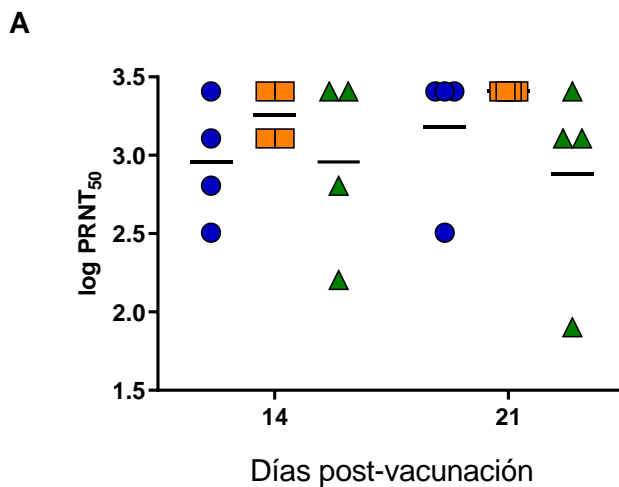
Figura 1.12. Análisis de la respuesta inmune celular **A.** Porcentaje de células CD8+ IFN- γ + después de la estimulación con los péptidos 152 y 14. **B.** Porcentaje de células CD8+ CD107 + después de la estimulación con los péptidos 152 y 14. Las columnas representan la media del grupo y las barras de error la SD. **C.** ELISPOT

9. Inmunogenicidad inducida por los virus recombinantes en oveja

Los resultados obtenidos en los modelos de ratón para BTV y RVFV sugerían que rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} y rZH548- Δ NSs::NS1N_{tBTV-4} inducían una respuesta inmune protectora frente a estos dos virus. Se decidió por tanto realizar un ensayo de inmunización en ovejas, su hospedador natural. Para realizar este ensayo se inocularon tres grupos de 4 ovejas con 10^7 PFU de los virus recombinantes rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4}, rZH548- Δ NSs::NS1N_{tBTV} y rZH548- Δ NSs::GFP como control negativo.

Con los sueros se realizó en primer lugar un ELISA frente a la nucleoproteína de RVFV para comprobar que los virus eran capaces de replicar *in vivo*. Como se puede ver en la gráfica, se detectaron altos niveles de anticuerpos específicos frente a la nucleoproteína en todos los grupos, indicando que los tres virus estaban replicando a niveles similares. Los niveles de anticuerpos anti-N detectados fueron ligeramente inferiores en las ovejas vacunadas con rZH548- Δ NSs::GFP aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

A día 3 post-inoculación se llevó a cabo una RT-qPCR para determinar si la vacunación estaba produciendo viremia. La RT-qPCR resultó negativa en todos los grupos lo cual indicaba que a pesar de que el virus estaba replicando no lo hacía a niveles tan altos como para producir viremia. También se intentó el aislamiento de virus a partir de sangre de día 3 post-inoculación, ensayo que también resultó negativo, confirmando la ausencia de virus infeccioso en sangre. Datos no mostrados?



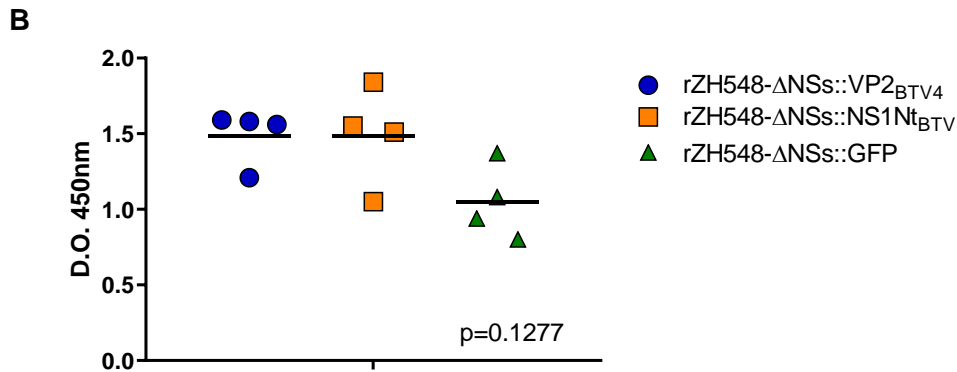
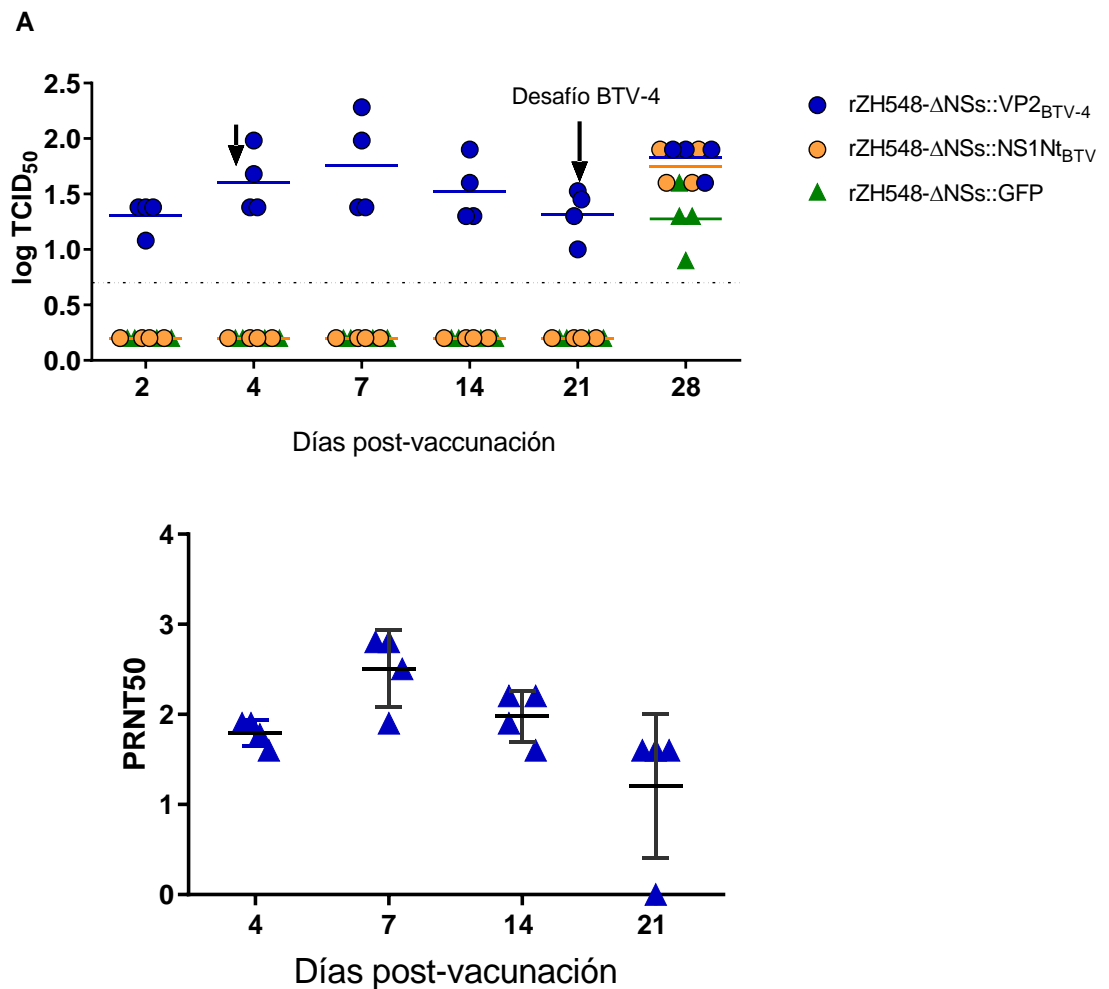


Figura 1.13. Respuestas inmunes en ovejas vacunadas con rZH548-ΔNSs::VP2_{BTV4}, rZH548-ΔNSsNS1Nt_{BTV} o rZH548-ΔNSs::GFP. **A.** Detección de anticuerpos neutralizantes frente a RVFV en el suero de las ovejas a días 14 y 21 días post-vacunación. **B.** Anticuerpos frente a la nucleoproteína en suero de ovejas vacunadas a 7 días post-vacunación.

Para medir la inmunidad generada específica de BTV se realizaron ensayos de seroneutralización, por reducción de placas y también en líquido, con los sueros de varios días post-inoculación. La cinética de anticuerpos neutralizantes frente a BTV después de la inmunización mostró que en las ovejas inoculadas con rZH548-ΔNSs::VP2_{BTV4} a día 4 ya se podían detectar anticuerpos neutralizantes. El título más alto de anticuerpos neutralizantes frente a BTV-4 se detectó a día 7 post-inoculación con un valor medio de 1.75 (log₁₀) en los ensayos de seroneutralización en líquido y un valor de 2.5 en los ensayos de reducción de placa. A día 21 post-inoculación, día en que se llevó a cabo el desafío se podían seguir detectando anticuerpos neutralizantes, aunque los niveles habían descendido a 1.31 en los ensayos en líquido y a 1.2 en los ensayos de reducción de placa. En el caso de las ovejas vacunadas con rZH548-ΔNSs::NS1Nt_{BTV4} o rZH548-ΔNSs::GFP no se detectaron anticuerpos neutralizantes tal y como se esperaba. Sin embargo, los anticuerpos neutralizantes frente a RVFV alcanzaron su nivel máximo a día 14 y se mantuvieron hasta el día 21 como se observa en la figura 1.12. La cinética de anticuerpos neutralizantes frente a RVFV fue muy similar en los tres grupos, lo cual indica que la expresión de los antígenos heterólogos no afecta negativamente a la inducción de inmunidad humoral frente a RVFV en ovejas.

Para caracterizar mejor la respuesta humoral inducida por la vacunación con rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4}, se llevaron a cabo ELISAs frente a dos isotipos de inmunoglobulinas, IgM e IgG. Se detectó la presencia en suero de IgMs a día 2 aumentando hasta día 7, punto a partir del cual ya no fueron detectables. Sin embargo, a partir del día 7 los niveles de IgG específicas aumentaron progresivamente hasta el día del desafío. Estos datos sugieren que los niveles más altos de anticuerpos neutralizantes podrían corresponderse con los niveles de IgM detectados a día 7 post-inoculación. Esto explicaría el descenso observado en los niveles de anticuerpos neutralizantes a partir del día 7.

Después del desafío también se analizaron los niveles de anticuerpos frente a la proteína VP2 y en todos los grupos se pudo ver un aumento de estos tanto a día 7 post-desafío como a día 14 post-desafío. Esto indica igual que en ocasiones anteriores con los ratones que las ovejas estaban primadas ya que el aumento fue superior en el grupo rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4}.



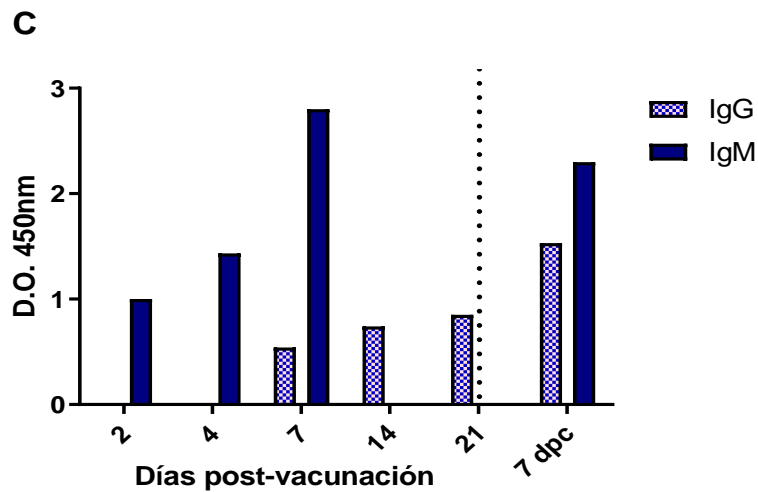


Figura 1.14. **A.** Ensayo de seroneutralización por reducción de placa de BTV-4 con sueros de ovejas vacunadas con rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} a diferentes tiempos post-vacunación. Cinética de los anticuerpos neutralizantes antes y después del desafío frente a BTV-4. **B.** Ensayo de seroneutralización en líquido con sueros de ovejas vacunadas con rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4}, rZH548- Δ NSs::NS1Nt_{BTV-4O} rZH548- Δ NSs::GFP a distintos tiempos pre y post-desafío **C.** ELISA IgM e IgG con sueros de ovejas vacunadas con rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} a distintos tiempos pre y post-desafío.

10. Eficacia de rRVFVs frente a desafío con BTV-4M en ovejas

Para evaluar la eficacia de la inmunidad conferida por las vacunas, las ovejas fueron desafiadas con una dosis de 10^6 PFU de la cepa virulenta BTV-4M (BTV-4 Morocco) una cepa *reassortant* con BTV-1.

11. Signos clínicos y viremia

Después del desafío con BTV-4 las ovejas se monitorizaron diariamente para registrar la aparición de signos clínicos, fiebre y viremia. A pesar de que la vacunación con ninguno de los tres virus evitó la aparición de fiebre, el grupo inmunizado con rZH548- Δ NSs::NS1Nt_{BTV-4} presentó temperaturas rectales medias más bajas, un retraso en la aparición de fiebre y el periodo febril se redujo en dos días. Tanto el grupo inoculado con rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} como el inoculado con rZH548- Δ NSs::NS1Nt_{BTV-4} mostraron una menor gravedad en los signos clínicos mostrados y títulos de viremia inferiores con respecto al grupo control. El valor medio de la viremia, (determinada mediante RT-qPCR) fue de 10^4 PFU/ml para el grupo de las ovejas control mientras que para el grupo vacunado con rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} fue de 6×10^3 PFU/ml y para el grupo inoculado con rZH548- Δ NSs::NS1Nt_{BTV-4} de 5×10^3 PFU/ml.

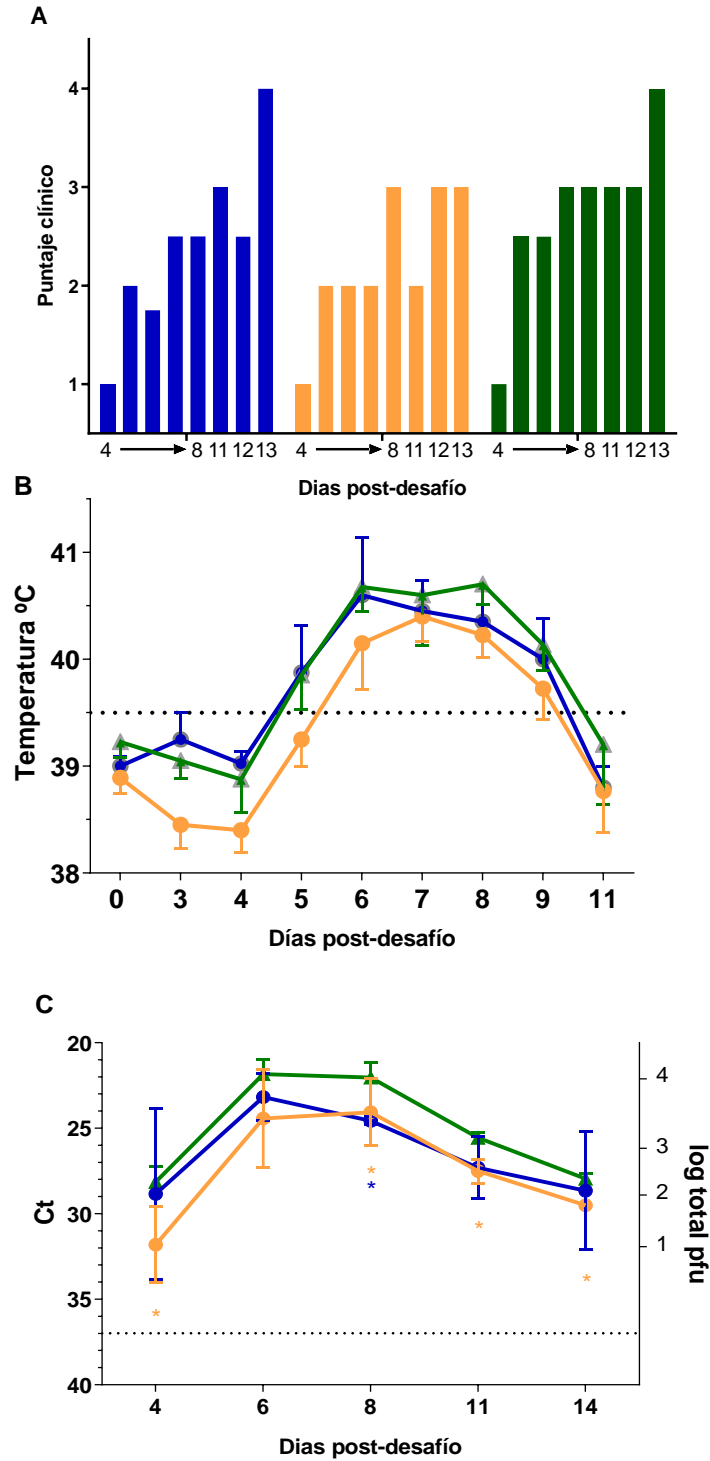


Figura 1.15. Signos clínicos y viremia tras el desafío con BTV-4. Los animales se monitorizaron durante 2 semanas tras el desafío. **A.** Valoración clínica de los animales después del desafío. Los grupos que mantuvieron el puntaje clínico más bajo durante todo el experimento fueron los inoculados con rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} o rZH548- Δ NSs::NS1N_{tBTV}. **B.** Temperaturas de los animales después del desafío. **C.** Detección de títulos de viremia mediante RT-PCR a tiempo real a distintos días post-desafío. Los datos se muestran como la media del grupo y las barras de error muestran la desviación estándar (n=4)

12. Replicación de BTV-4 en las ovejas vacunadas

Se analizaron los sueros tras el desafío mediante un ELISA tapizado con la proteína VP7 de BTV-4 para evaluar si el virus había replicado en todos los grupos al mismo nivel. En este ELISA se pudo observar que los niveles de anticuerpos frente a VP7 eran significativamente mayores en aquellas ovejas que habían sido inmunizadas con el virus control rZH548- Δ NSs::GFP. Las diferencias en los niveles de anticuerpos si comparamos los grupos vacunados con rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} y rZH548- Δ NSs::NS1N_{tBTV} con el grupo control son estadísticamente significativos, $p=0,02$ y $0,0012$ respectivamente. Estos resultados indicaban que el nivel de replicación del virus BTV-4 era inferior en las ovejas inmunizadas con rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} y especialmente en las vacunadas con rZH548- Δ NSs::NS1N_{tBTV} lo que sugería que estos virus recombinantes inducían cierto grado de protección frente a BTV-4.

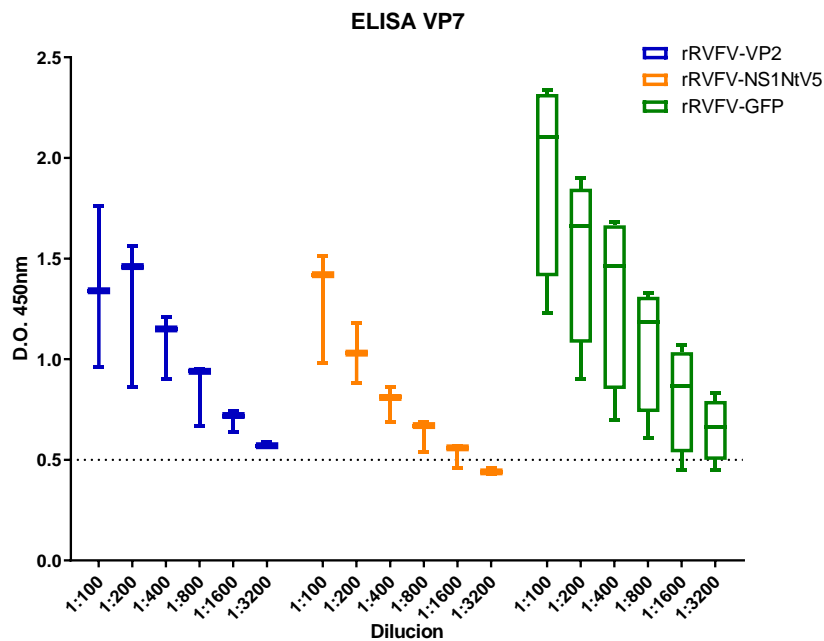


Figura 1.16. ELISA frente a VP7 con sueros de las ovejas vacunadas post-desafío. La grafica muestra el rango intercuartilico y la mediana de los valores obtenidos con cada dilución de suero

13. Análisis bioquímico de muestras de suero

Se realizaron análisis bioquímicos de los sueros de las ovejas recogidos a distintos tiempos post-inoculación y post-desafío. Después de la vacunación se observó un descenso en los niveles de fosfatasa alcalina (ALP) y lactato deshidrogenasa (LDH) en todas las ovejas. El desafío con BTV tuvo un efecto en todas las ovejas, elevando los niveles de bilirrubina y urea después de una semana, alcanzando los niveles basales a día 14 post-desafío. Es interesante remarcar que los animales del grupo control y del grupo

vacunado con rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} mostraron un incremento en los niveles de AST y ALT después del desafío mientras que los niveles en el suero de los animales del grupo inoculado con rZH548- Δ NSsNS1N_{BTV}, no variaron tras la infección con BTV-4, lo cual concuerda con el menor impacto del desafío con BTV-4 en este grupo.

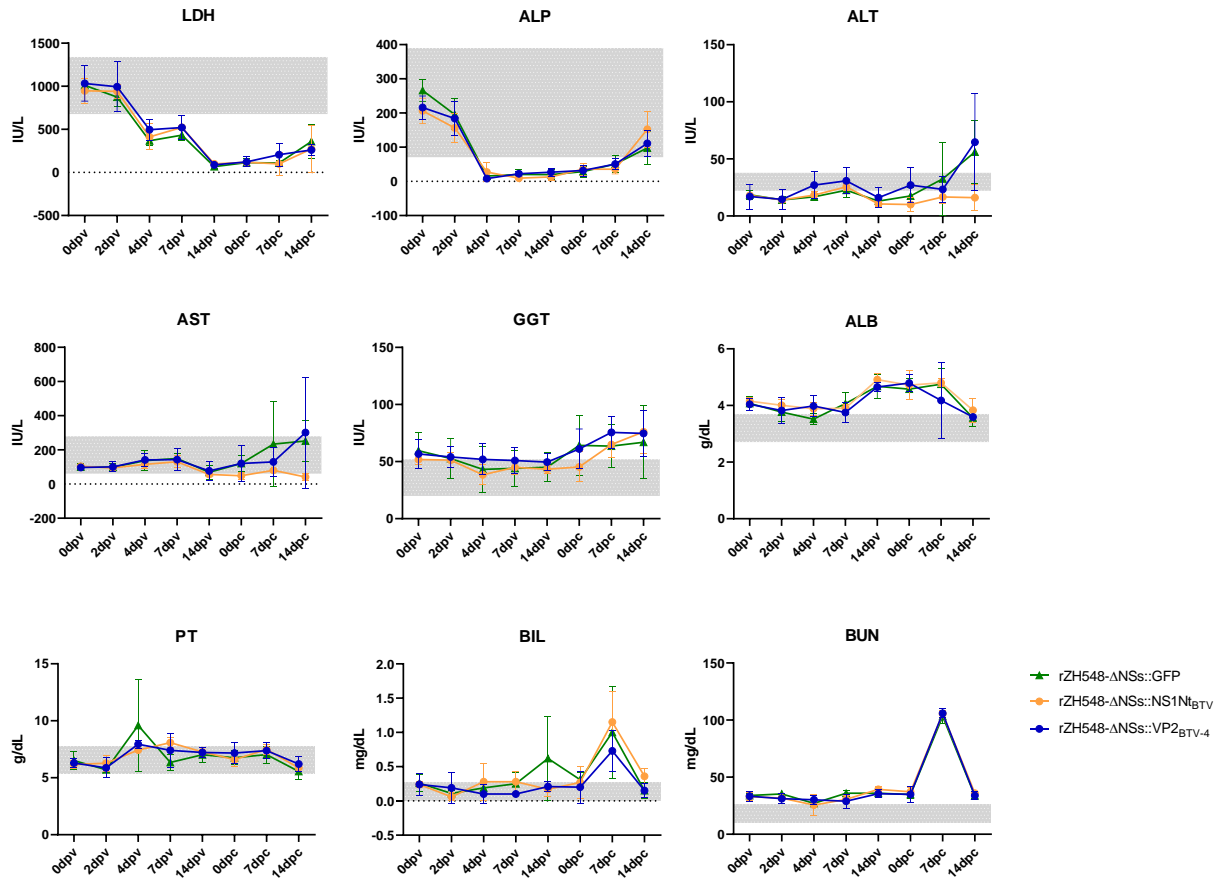


Figura 1.18. Análisis bioquímico de muestras de suero. Las barras de error representan la desviación estándar. Dpv: días post-vacunación, dpc: días post-challenge. Los valores de referencia considerados normales en ganado ovino se han representado con el sombreado gris.

CAPITULO 2

La segunda aproximación que estudiamos para la generación de vacunas bivalentes fue la generación de VLPs recombinantes del virus de la fiebre del Valle del Rift. Las VLPs presentan numerosas ventajas como una gran inmunogenicidad y seguridad. Estas VLPs (Habjan et al., 2009), contienen la nucleocápside formada por la proteína N, con las glicoproteínas en la superficie y un minigenoma transcripcionalmente activo con un gen reportero o nuestro gen de interés, pero son incapaces de replicar o producir progenie.

1. Generación de VLPs recombinantes de RVFV que expresan antígenos de BTV

Para la generación de VLPs de RVFV se utiliza un sistema semejante al de los virus recombinantes rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} y rZH548- Δ NSs::NS1Nt_{BTV-4} pero en esta ocasión se utilizan únicamente 3 plásmidos, los dos plásmidos de expresión pI.28_RVFV_N y pI.18_RVFV_L y el plásmido pHH21_RVFV_vMReN o pHH21_RVFV_vMBTV. Se intentó generar VLPs que expresaran la proteína NS1 al completo pero al igual que con los virus recombinantes esta partícula no se pudo rescatar. Las VLPs que se generaron fueron las que expresaban la proteína VP2 de BTV-4 y también la proteína NS1 truncada.

La generación de las VLPs se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. Weber y posteriormente se analizó su eficacia como vacuna en nuestro laboratorio del INIA-CISA. El análisis de la correcta generación de las VLPs se llevó a cabo también en el laboratorio en el que se generaron, para lo cual se utilizó un anticuerpo frente a la nucleoproteína de RVFV (Figura 2.1). La expresión de la nucleoproteína se pudo detectar fácilmente lo cual indicaba que las VLPs se estaban generando correctamente.

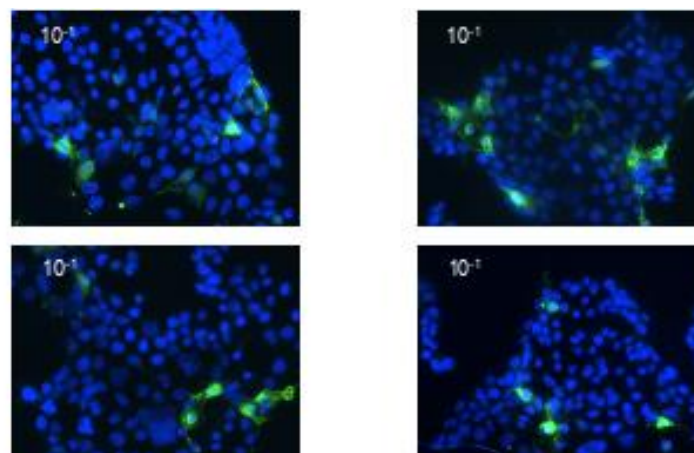


Figura 2.1. Detección de la presencia de VLPs de RVFV en células HEK293. Para la detección se utilizó un anticuerpo monoclonal frente a la nucleoproteína del virus.

2. Inoculación de VLPs en ratones IFNAR(-/-) y evaluación de su eficacia de protección en un desafío con BTV

Para evaluar la capacidad de protección las VLPs, estas se inocularon en ratones IFNAR (-/-) solas o en combinación con el rMVA-NS1Nt y posteriormente estos ratones se desafiaron con una dosis letal de BTV-4. Además de la supervivencia, antes del desafío también se evaluó la respuesta inmune humoral inducida por las VLPs, para lo cual se realizaron ensayos de seroneutralización frente a RVFV y BTV y ELISAs frente a VP2 y la nucleoproteína de RVFV.

En las seroneutralizaciones frente a RVFV se detectaron altos niveles de anticuerpos neutralizantes en todos los grupos. Sin embargo, no se pudieron detectar anticuerpos neutralizantes frente a BTV en ningún grupo. Mediante un ELISA (Figura 2.2) se detectaron anticuerpos frente a VP2 tanto en el grupo inoculado con las 3 dosis de VLPs como en el grupo inoculado con dos dosis de VLPs-VP2_{BTV-4} y una dosis de rMVA-VP2. El nivel de anticuerpos es significativamente superior en el grupo inoculado con las 2 dosis de VLPs y la de rMVA-VP2 en comparación con los otros dos grupos.

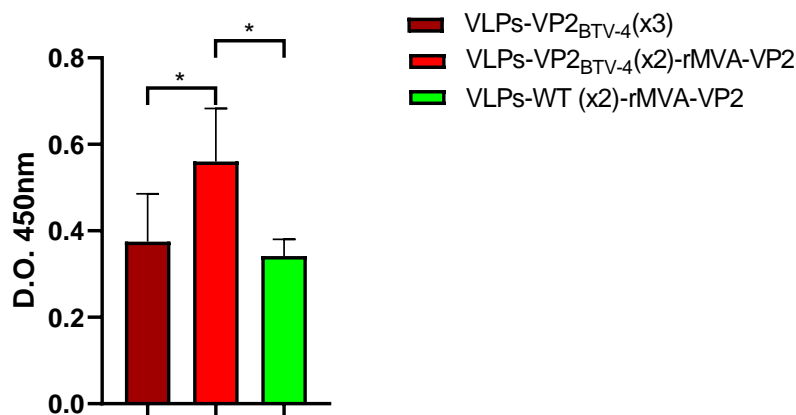


Figura 2.2. ELISA de VP2 con sueros de ratones inoculados con VLPs o VLPs y rMVA. $p \leq 0.05$

Tras el desafío los ratones empezaron a mostrar signos clínicos a día 3 post-desafío y empezaron a morir a día 4 (Figura 2.3). Los signos clínicos más leves los mostraron los ratones de los dos grupos inoculados con 2 dosis de VLPs (VP2 o NS1Nt) y una dosis de rMVA (VP2 o NS1Nt), sus signos clínicos fueron significativamente inferiores a los del grupo inoculado con 2 dosis de VLPs-WT y rMVA-NS1Nt ($p=0.0045$). En estos dos grupos también se observaron las mayores supervivencias y un retraso en la aparición de mortalidad. El grupo inoculado con VLPs-NS1Nt_{BTV-4}-rMVA-NS1 tuvo una

supervivencia del 50% y el grupo inoculado con VLPs-VP2_{BTV-4}-rMVA-VP2 tuvo una supervivencia del 20%.

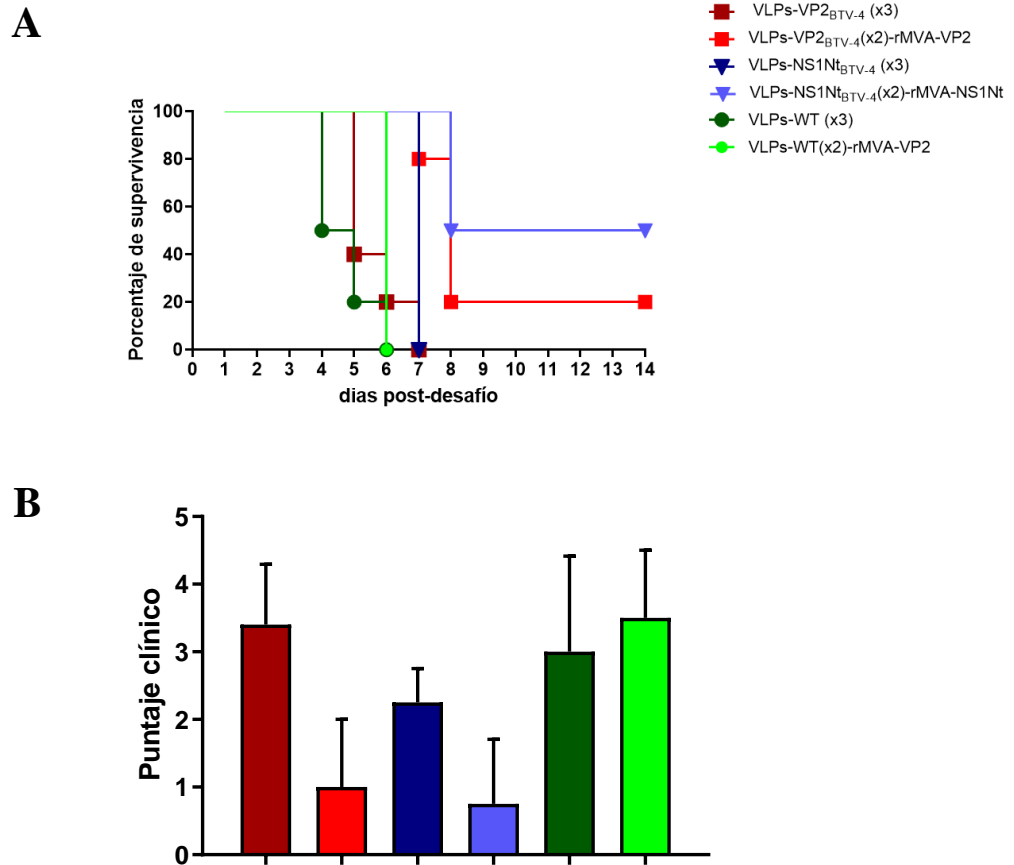


Figura 2.3. A. Grafica de supervivencia de los ratones inmunizados con las VLPs y desafiados con BTBV. **B.** Puntaje clínico de los ratones. Los signos clínicos que se consideraron fueron pelo erizado, arqueamiento dorsal, deshidratación, hipotermia y alteraciones de la movilidad. Las columnas muestran la media del grupo y las barras de error la desviación estándar. ($p \leq 0.05$).

A día 4 post-desafío se extrajeron muestras de sangre de los ratones y se realizó un ensayo de aislamiento viral para evaluar la viremia. Tal y como se esperaba, los dos grupos inoculados con 2 dosis de VLPs (VP2 o NS1Nt) y una dosis de rMVA (VP2 o NS1Nt) no presentaron viremia, lo cual concuerda con la menor aparición de signos clínicos y de mortalidad. Al igual que ocurre con los virus recombinantes se ve que estos son buenos para primar a los animales pero que por si solos no son capaces de inducir inmunidad, sin embargo son efectivos en combinación con otra vacuna.

CAPITULO 3

Con el fin de desarrollar una vacuna bivalente frente a estas dos enfermedades, se desarrolló otra estrategia vacunal, está basada en la utilización de rMVA como vector viral vacunal para expresar las glicoproteínas Gn y Gc de RVFV y las proteínas VP2, NS1 o NS1 truncada de BTV serotipo 4.

1. Expresión de proteínas heterólogas por parte del vector MVA

Se generaron rMVAs duales que expresaban las glicoproteínas Gn y Gc de RVFV y las proteínas VP2, NS1 o la forma truncada de la proteína NS1 (NS1Nt) de BTV-4. La secuencia de las glicoproteínas GnGc se clonó en el plásmido pRB21 bajo el control de un promotor temprano/tardío del virus vaccinia. Mediante recombinación homóloga se insertó la secuencia de la poliproteína GnGc en el locus *F13L* del genoma de MVA mientras que los distintos genes de las proteínas de BTV se insertaron en el locus *TK* utilizando los plásmidos pSC11-VP2, pSC11-NS1 y pSC11-NS1Nt, generándose las construcciones rMVA-GnGc-VP2, rMVA-GnGc-NS1 and rMVA-GnGc-NS1-Nt tal y como se describe en materiales y métodos.

Para determinar si los rMVAs duales expresaban correctamente las proteínas heterólogas de RVFV y BTV, se infectaron células DF-1 con los virus recombinantes durante 48 horas y la expresión de GnGc, VP2 y NS1 se analizó mediante inmunofluorescencia (Figura 3.1) utilizando bien un suero policlonal de ratón anti-BTV-4 o un suero policlonal de oveja anti-RVFV. El patrón de expresión observado tanto para la proteína VP2 como para la proteína NS1 y NS1Nt fue el esperado: citoplasmático difuso para VP2 y granular en el caso de las dos formas de NS1. En el caso de GnGc la expresión fue en forma de agregados. No se observó co-localización de la expresión de las proteínas de BTV y RVFV en ninguno de los casos analizados.

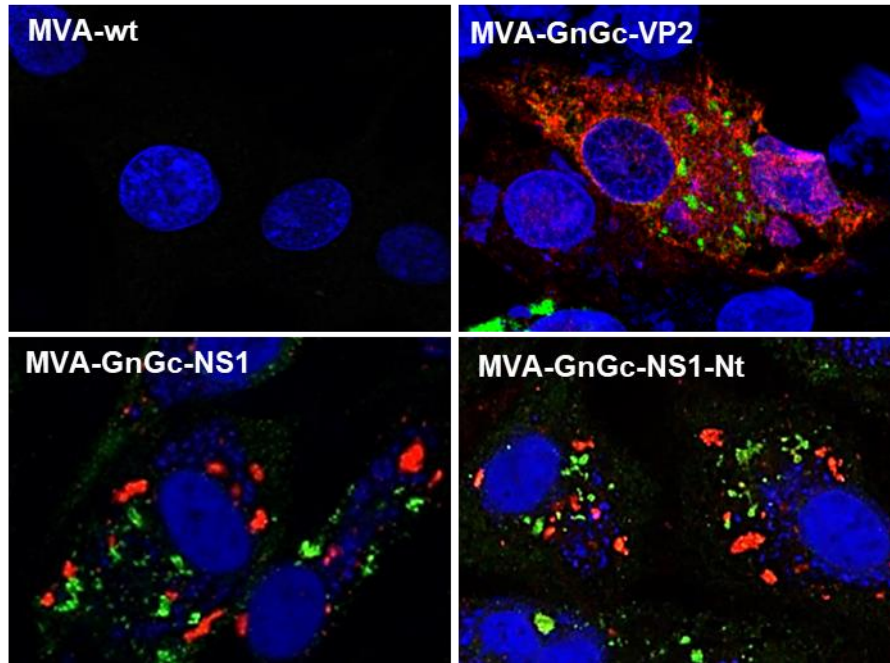


Figura 3.1. Análisis de la expresión de las proteínas heterólogas por parte de los rMVAs. Células DF-1 se infectaron con rMVAs (MOI 0.1) y se llevaron a cabo análisis de inmunofluorescencia a 48 hpi. La expresión de Gn y Gc se detectó con un suero de una oveja infectada con RVFV y un anticuerpo secundario verde. Las proteínas de BTV (VP2, NS1 y NS1nt) se detectaron con un suero de ratón infectado con BTV y un anticuerpo secundario rojo. Las imágenes están tomadas en un microscopio confocal (63x)

2. Respuesta inmune inducida por los rMVAs duales frente a RVFV y BTV en ratón

Con el fin de analizar la respuesta inmune inducida por los rMVAs duales se inmunizaron ratones IFNAR (-/-) con dos dosis de rMVA-GnGc-NS1, rMVA-GnGc-NS1-Nt, rMVA-GnGc-VP2 o rMVA-WT. Posteriormente se analizaron la respuesta inmune humoral y la celular a día 14 y día 10 *post-boost*, respectivamente. Los animales inoculados con el rMVA-GnGc-VP2 desarrollaron una fuerte respuesta humoral frente a BTV-4 y RVFV (Figura 3.2), con una media de 2.21 ± 0.24 y 4.06 ± 0.22 respectivamente en un ensayo de seroneutralización por reducción de placas (PRNT50). Los virus recombinantes rMVA-GnGc-NS1 y rMVA-GnGc-NS1-Nt indujeron anticuerpos neutralizantes frente a RVFV pero tal y como se esperaba no indujeron anticuerpos neutralizantes frente a BTV-4 (Figura 3.2 A y B).

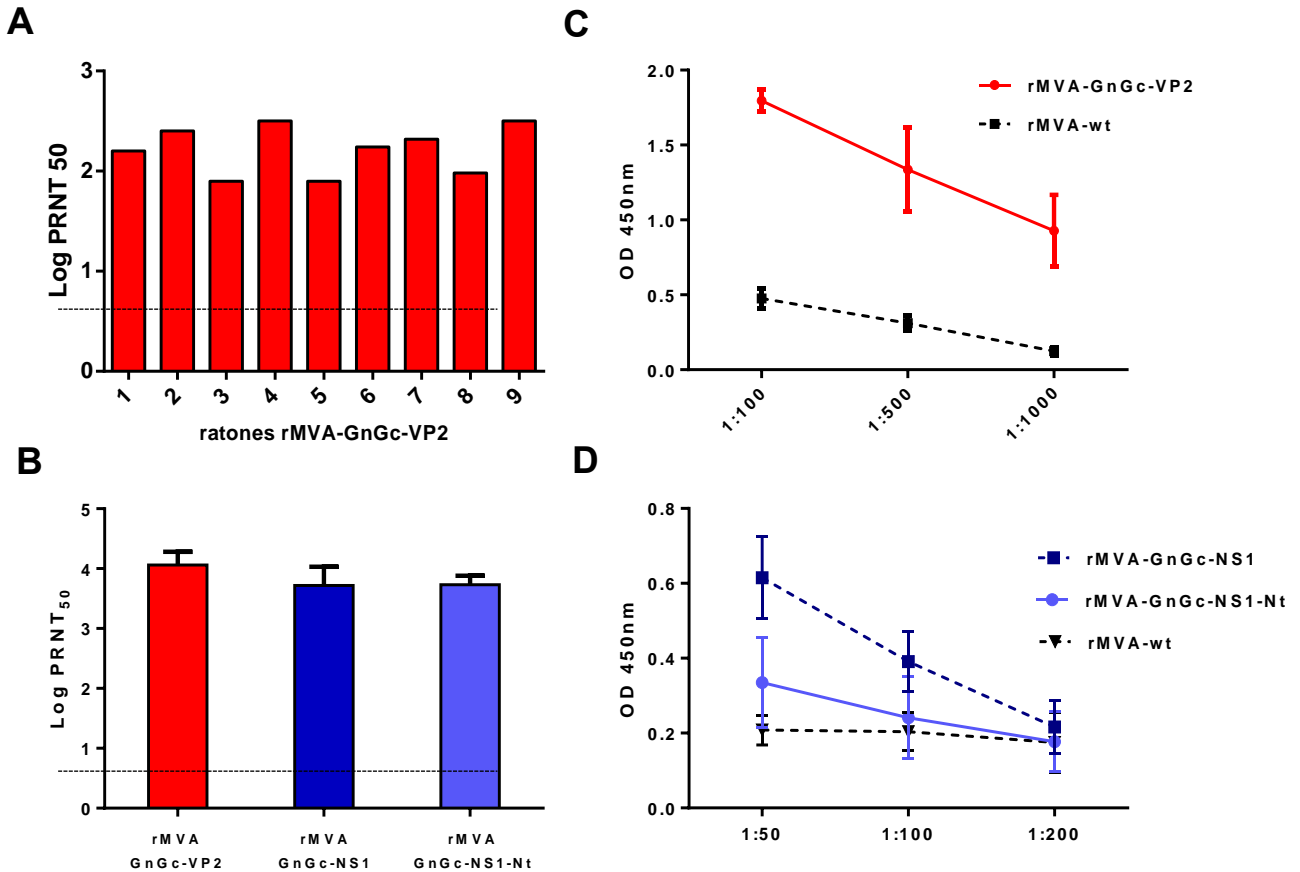


Figura 3.2. Inducción de anticuerpos neutralizantes frente a BTV (A) y RVFV (B) en animales inmunizados con rMVA en un ensayo de reducción de placa. Las columnas representan la media del grupo y las líneas de error la desviación estándar. C. inducción de anticuerpos IgM frente a VP2 mediante un ELISA indirecto en el grupo vacunado con MVA-GnGc-VP2. Se utilizaron tres diluciones de suero y las líneas representan la media. D. inducción de anticuerpos IgM frente a NS1 en un ELISA indirecto en sueros de ratones vacunados con MVA-GnGc-NS1 y MVA-GnGc-NS1Nt. Se utilizaron tres diluciones de suero. Las líneas representan la media y las barras de error la desviación estándar.

Se analizó la presencia de anticuerpos específicos anti VP2 (Figura 3.2 C) y NS1 (Figura 3.2 D) en los sueros a día 14 *post-boost* mediante ELISA. En estos ensayos se detectaron anticuerpos frente a la proteína VP2 en aquellos ratones inoculados con rMVA-GnGc-VP2, indicando seroconversión en esos animales. También se detectaron anticuerpos específicos frente a la proteína NS1 tanto en el grupo de ratones inoculados con rMVA-GnGc-NS1 como con rMVA-GnGc-NS1Nt, con valores medios de DO450nm de 0.62 y 0.34 respectivamente, en la dilución de suero testada más baja.

Determinamos la capacidad de las vacunas duales rMVA-GnGc-NS1 y rMVA-GnGc-NS1Nt de inducir una respuesta celular T específica mediante marcaje intracelular de citoquinas (intracellular cytokine staining, ICCS). Diez días después de la segunda vacunación con los rMVAs, se aislaron los esplenocitos de los ratones y se re-estimularon con un péptido de la proteína NS1 que mimetiza un epítipo T CD8 denominado 152, un péptido irrelevante denominado 14, la proteína recombinante VP2 y la proteína

recombinante Gn durante 6 horas. Tras la estimulación con las proteínas recombinantes Gn y VP2 se observó un ligero incremento de los niveles de células CD8+CD107+ y CD8+IFN- γ + (Figura 3.3) en los animales inmunizados, sin embargo este aumento no era estadísticamente significativo cuando se comparaba con los animales no inmunizados (dato no mostrado). Por otro lado, la re-estimulación de los esplenocitos con el péptido 152 (Figura 3.3) de la proteína NS1 aumento significativamente ($P < 0.05$) la expresión de CD107a y IFN- γ por parte de células T CD8+ de ratones que habían sido inoculados con rMVA-GnGc-NS1 y rMVA-GnGc-NS1Nt, lo cual indicaba que los antígenos NS1 y NS1Nt expresados por las vacunas MVA duales eran capaces de inducir una fuerte respuesta de células T CD8+ y de activar la inducción de CTLs *in vivo*.

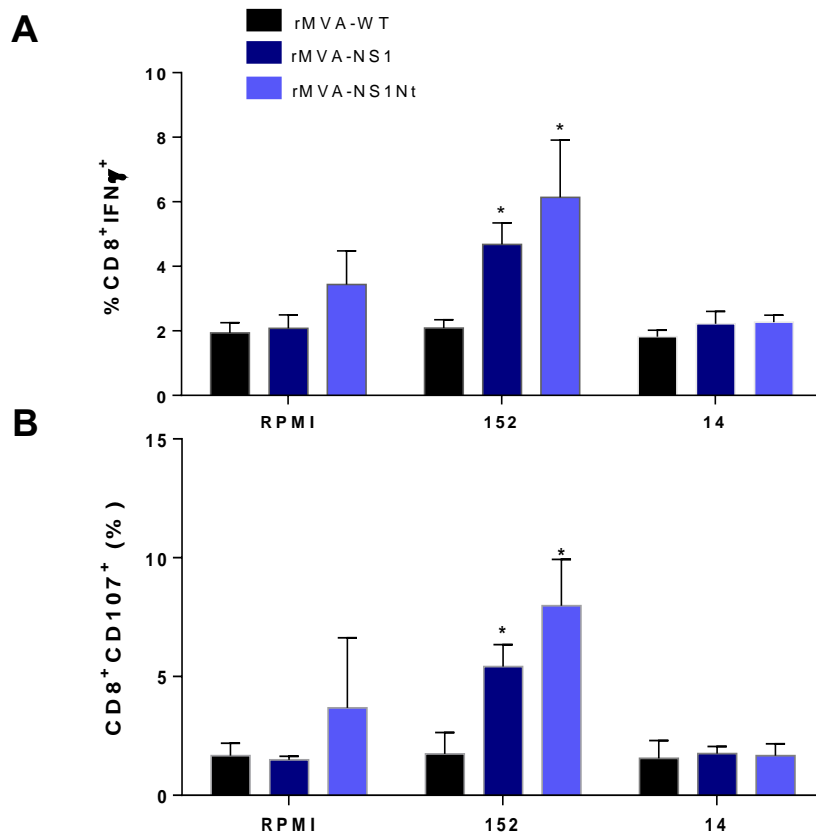


Figura 3.3. Porcentaje de células CD8+ IFN- γ (A) y CD8+CD107+ (B) después de la estimulación con el péptido 152 y el péptido 14 o sin estimulación (RPMI). Las columnas representan la media del grupo y las barras de error la desviación estándar. Para las comparaciones estadísticas se utilizó el test de Mann-Whitney.

3. Protección frente a BTV en ratones IFNAR (-/-)

Para determinar la capacidad protectora de los rMVAs generados, grupos de cinco ratones IFNAR (-/-) fueron inmunizados con rMVA-GnGc-NS1, rMVA-GnGc-NS1-Nt, rMVA-GnGc-VP2 o rMVA-WT en un régimen de *prime-boost* con un intervalo de 3

semanas entre inmunizaciones y posteriormente fueron desafiados dos semanas después de la segunda inmunización con una dosis letal de BTV-4 (10^7 PFU por ratón). Los ratones no inmunizados comenzaron a mostrar signos clínicos a los 3 días post-desafío. Estos signos clínicos incluyeron pelo erizado, descarga ocular y poca actividad. La viremia (Figura 3.5.a) aumentó rápidamente en todos los ratones no vacunados a día 3 post-desafío alcanzando valores medios de 3.65 log de PFU/ml a día 5 post-desafío. Todos los ratones inmunizados con el rMVA-GnGc-VP2 permanecieron sanos durante todo el experimento, excepto un ratón que mostro signos clínicos y viremia a día 5 post-desafío y que tuvo que ser sacrificado. Por el contrario ningún ratón vacunado con rMVA-GnGc-NS1 o rMVA-GnGc-NS1Nt desarrolló signos clínicos a lo largo del experimento. Tampoco se pudo detectar viremia en ninguna de las muestras de sangre tomadas a distintos tiempos. Todos estos datos indican que la inmunización con rMVA-GnGc-NS1 y rMVA-GnGc-NS1Nt induce protección total en ratones IFNAR (-/-) tras el desafío con BTV-4.

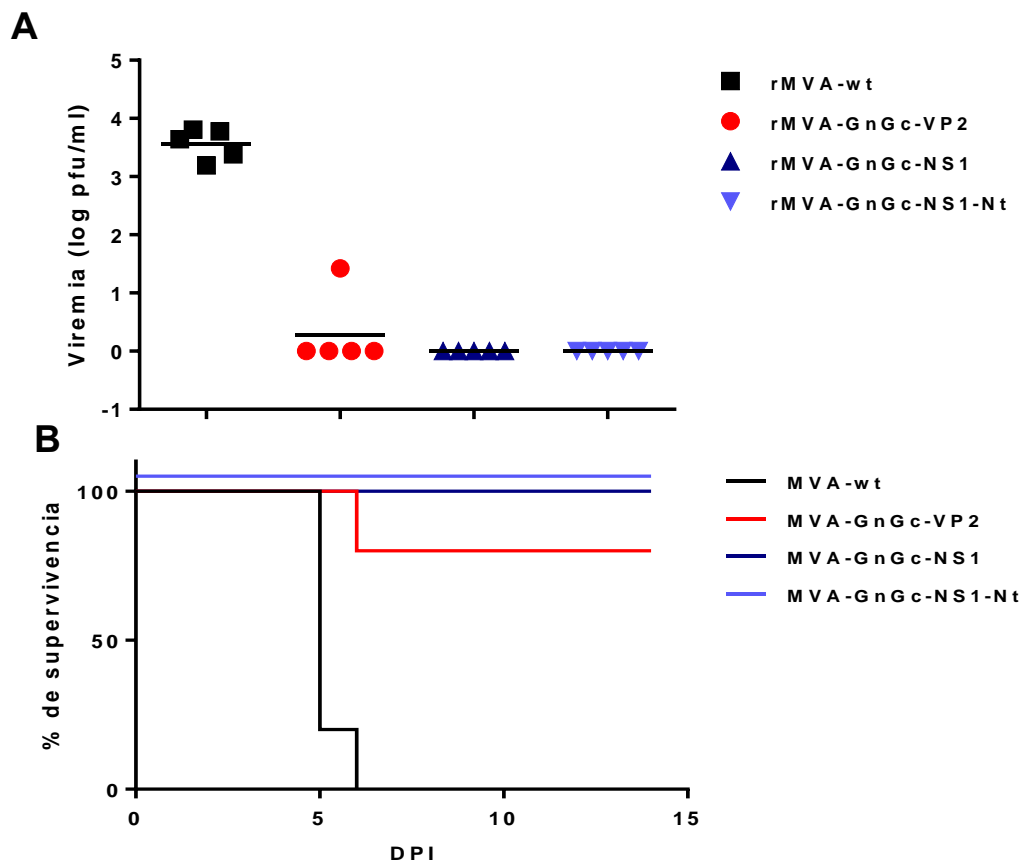


Figura 3.5. A) Viremia a día 5 post-desafío expresada como Log PFU/ml de los ratones a día 5 después del desafío con 500 PFU de BTV-4. B) tasas de supervivencia de los ratones vacunados y no vacunados después del desafío.

4. Protección frente a RVFV en ratones Balb/c

Trabajos previos en nuestro laboratorio han demostrado que la vacuna rMVA-NS1 confiere protección multiserotipo frente a BTV, no así la vacuna rMVA-VP2 que es específica de serotipo. Después de determinar la eficacia de las vacunas frente a un desafío con BTV y basándonos en nuestros resultados previos decidimos continuar nuestros estudios con el mejor candidato vacunal, rMVA-GnGc-NS1, para evaluar su inmunogenicidad y eficacia en un desafío frente a RVFV. Grupos de cinco ratones Balb/c se inocularon con dos dosis de rMVA-wt o rMVA-GnGc-NS1, con tres semanas de separación entre dosis. A día 14 *post-boost*, se obtuvieron muestras de sangre de los ratones para realizar un análisis de la respuesta inmune humoral y después se los desafío con 500 PFU de la cepa 56/74 de RVFV. La viremia se evaluó a día 3 post-desafío y los signos clínicos se monitorizaron durante dos semanas.

La inmunización de los ratones con rMVA-GnGc-NS1 dio lugar a una fuerte respuesta de anticuerpos neutralizantes específicos de RVFV, similar a la observada en los ratones IFNAR(-/-) alcanzando, en ensayos de seroneutralización por reducción de placa (PRNT 50), un título de 3.29 ± 0.03 en los ratones inoculados con dos dosis, mientras que los inoculados con una única dosis alcanzaron títulos de 2.61 ± 0.13 .

A día 3 post-desafío, todos los ratones que no fueron inmunizados mostraron signos clínicos, como pelo erizado, pérdida de peso y un descenso de su actividad. Tres de los ratones control fueron eutanasiados debido a las altas puntuaciones clínicas que alcanzaron. Los dos ratones control restantes se recuperaron 7 días después del desafío. Por otro lado, todos los ratones inmunizados con el rMVA-GnGc-NS1 no desarrollaron signos clínicos y se mantuvieron sanos durante todo el experimento. No se pudo detectar virus infeccioso en sangre en ninguno de los ratones vacunados con el rMVA-GnGc-NS1, mientras que en todos los ratones control se detectaron títulos de viremia entre 5.2×10^3 y 1.2×10^4 PFU/ml a día 3 post-desafío.

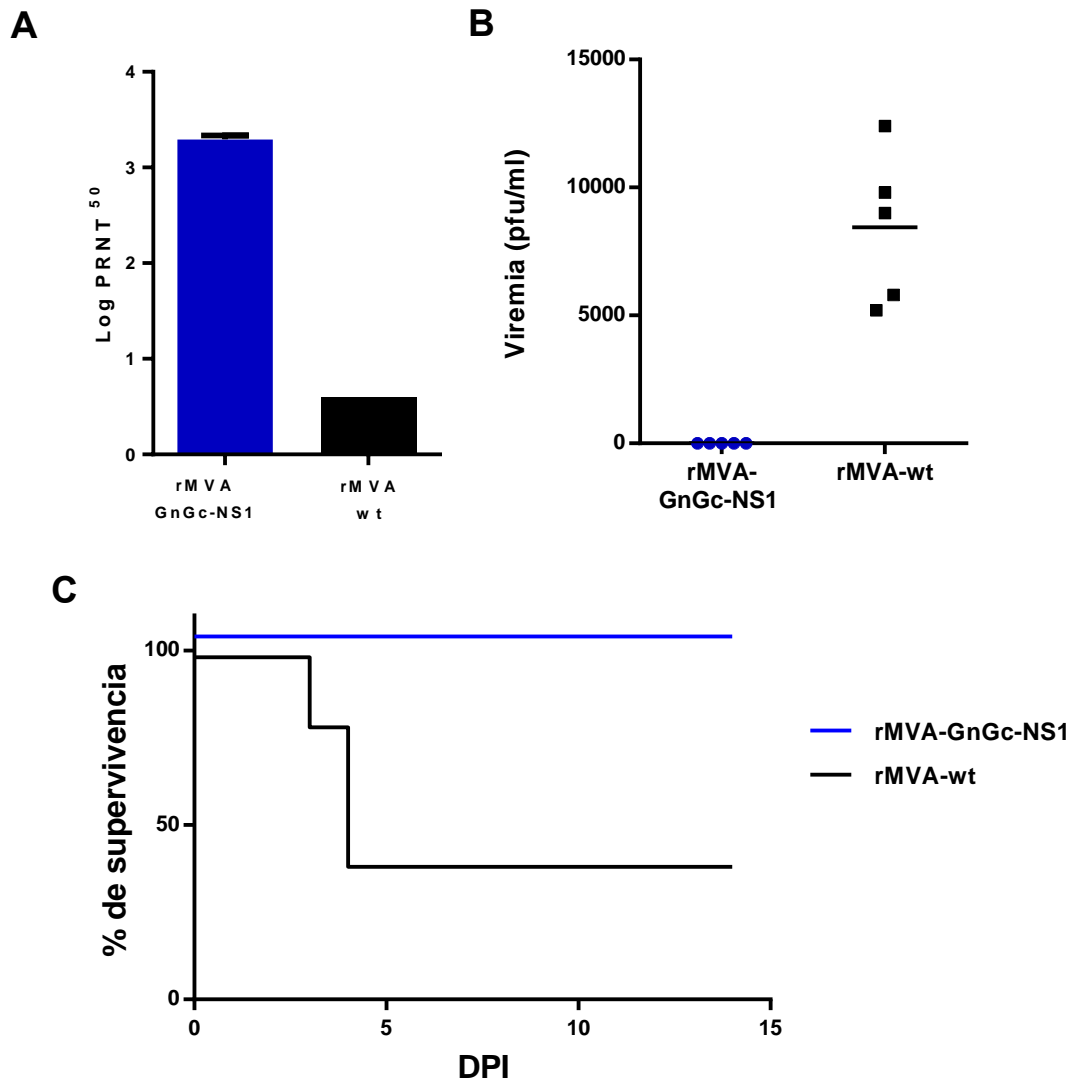


Figura 3.6. Ratones Balb/c fueron inoculados con rMVA-wt o rMVA-GnGc-NS1 y después desafiados con 500 PFU de RVFV a día 35. A. Nivel de anticuerpos neutralizantes frente a RVFV. B. Viremia a día 3 medida mediante un ensayo de reducción de placa en células Vero y expresada como PFU/ml. C. Tasas de supervivencia en ratones vacunados y no vacunados después del desafío.

5. Respuesta inmune en ovejas inmunizadas con rMVA-GnGc-NS1

Una vez comprobada la eficacia en ratón de los candidatos vacunales, se evaluó la capacidad protectora de rMVA-GnGc-NS1 en ovejas, huésped natural de BTV y RVFV. Se inmunizaron dos grupos de 3 ovejas con dos dosis de 10^8 PFU de rMVA-GnGc-NS1 o rMVA-wt a días 0 y 28. Tras la inoculación no se observó en los animales ningún signo clínico ni efecto adverso debido al inmunógeno. Tres semanas después de la última inmunización, se observó una elevada respuesta de anticuerpos neutralizantes frente a RVFV en el suero de todas las ovejas vacunadas, alcanzando niveles de PRNT50 que iban desde 2.8 a 2.96 logaritmos. Como se esperaba, no se detectó seroconversión en el grupo control.

Por otro lado, las sangres de las ovejas fueron estimuladas *in vitro* con estímulos específicos e inespecíficos y se analizó la secreción de IFN- γ por parte de las células estimuladas mediante ELISA a las 72 horas post-estimulación. Las sangres de las ovejas vacunadas se estimularon con la cepa atenuada MP12 de RVFV, un pool de péptidos de la proteína Gn de RVFV y un pool de péptidos de la proteína NS1 de BTV. Se obtuvieron unos valores medios de IFN- γ secretado de 0.78, 0.46 y 0.174 respectivamente; mientras que las sangres de las ovejas control dieron niveles medios de secreción de 0.047, 0.173 y 0.022 respectivamente. Viendo estos niveles podemos afirmar que los niveles de producción de IFN- γ fueron superiores en las células de las ovejas vacunadas comparado con las no vacunadas, lo cual indica una activación de la respuesta inmune celular específica debida a la vacunación.

6. La vacunación con rMVA-GnGc-NS1 confiere protección frente a BTV en ovejas

Un mes después de la última vacunación, las ovejas fueron desafiadas por vía subcutánea con una dosis de 10^6 PFU de BTV-4-M, virus aislado en células de insecto que mantiene una alta virulencia en ovejas. La viremia y los signos clínicos se monitorizaron durante 3 semanas. A día 7, todas las ovejas del grupo control presentaron fiebre con un valor medio de 40.47°C, mientras que las ovejas vacunadas mostraron temperaturas sensiblemente más bajas, con una media de 40.16°C. Además, en las ovejas control la fiebre perduró hasta el día 8 post-infección, mientras que la temperatura rectal media de las ovejas vacunadas descendió hasta niveles basales.

Muestras de sangre obtenidas a distintos tiempos post-desafío se utilizaron para realizar RT-qPCR para determinar la presencia de viremia. Se pudo detectar ARN viral en las muestras de las ovejas no vacunadas dos días después del desafío. Los títulos virales en sangre aumentaron rápido y alcanzaron a día 7 post-desafío niveles mucho más altos que los detectados en las sangres de las ovejas vacunadas (medias de Ct de 20.9 y 24.9 respectivamente). En el caso de las ovejas vacunadas solo se pudo detectar virus en sangre en una de las tres ovejas a día 7 post-desafío. Estos resultados indican que la inmunización de ovejas con un *prime-boost* homólogo con rMVA-GnGc-NS1 confiere protección frente a BTV-4M y reduce la viremia así como los signos clínicos.

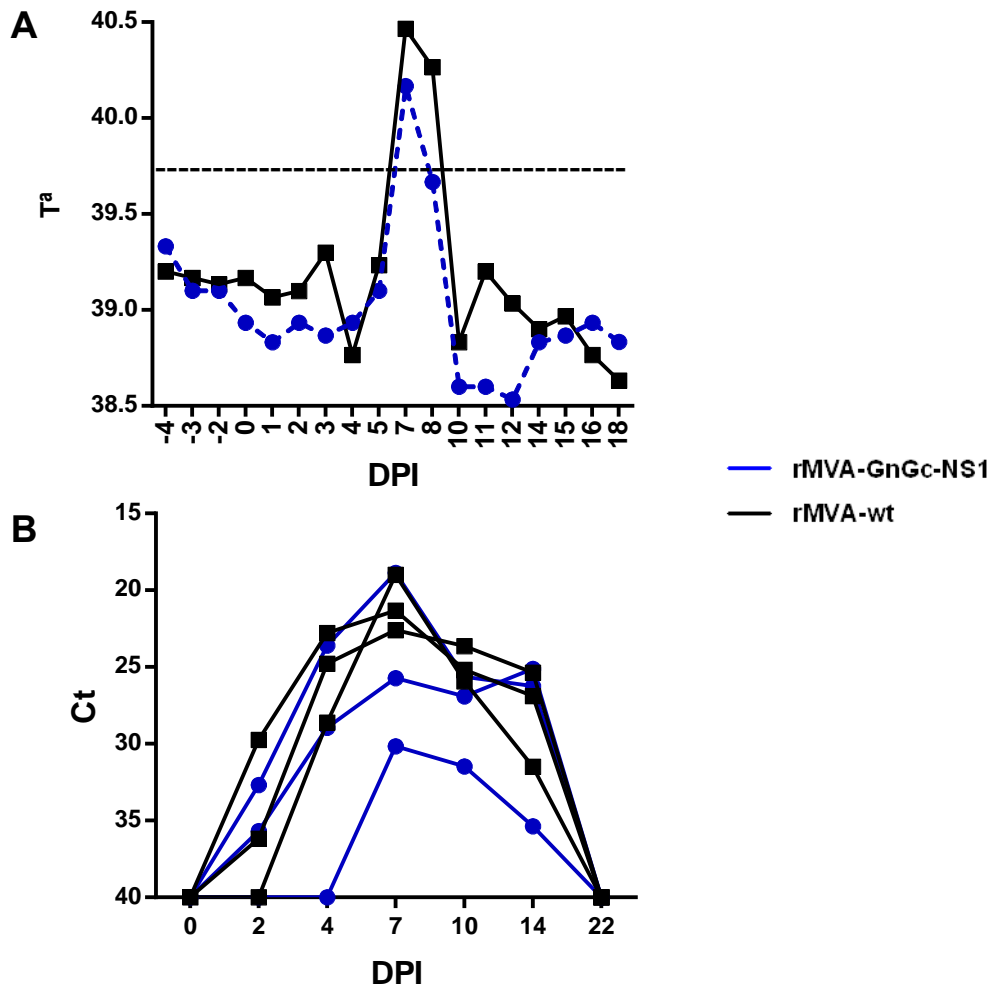


Figura 3.7. Análisis de protección inducida por la inmunización con rMVA-GnGc-NS1 en ovejas tras el desafío con BTV. A. Temperaturas rectales medias en animales inmunizados con MVA-GnGc-NS1 y MVA-wt desde 4 días antes del desafío a 18 dpi. **B.** Títulos de viremia analizados por RT-PCR a tiempo real desde el día 0 al 22 post-desafío. Azul: Grupo inoculado con rMVA-GnGc-NS1, Negro: Grupo inoculado con rMVA-WT.

Con el fin de analizar la replicación de BTV en los animales tras el desafío con BTV, se determinó mediante ELISA la presencia de anticuerpos específicos de la proteína VP7 en los sueros de las ovejas tras la infección. En este ELISA se observó que los niveles de anticuerpos frente a VP7 eran significativamente mayores en aquellas ovejas del grupo control respecto a las inmunizadas. Estos resultados indicaron que el nivel de replicación de BTV-4M fue menor en las ovejas inmunizadas con rMVA-GnGc-NS1 lo que indicaba que la inmunización generaba protección frente a BTV.

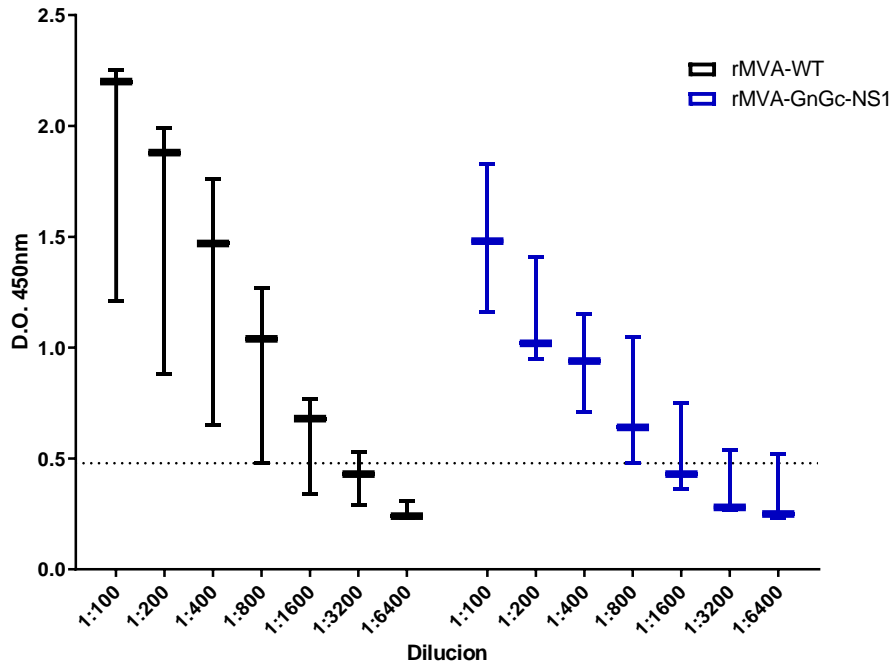


Figura 3.8. ELISA frente a VP7 con sueros de las ovejas vacunadas 7 días después del desafío con BTV. El nivel de anticuerpos frente a VP7 es significativamente superior en el grupo control lo que indica que el virus replicó mejor en estos animales que en los vacunados. Se ensayó una curva de dilución con los sueros de todos los animales individualmente. En la gráfica se muestra el valor medio del grupo y su desviación estándar.

7. La vacunación con rMVA-GnGc-NS1 confiere protección en oveja después de un desafío con RVFV

Tres semanas después de la infección con BTV, se comprobó que los animales estuvieran completamente recuperados y se les analizó la presencia de anticuerpos neutralizantes frente a RVFV. Los títulos de anticuerpos oscilaban desde 2.23 a 2.37 logPRNT₅₀. A día 87 después de la primera vacunación, las ovejas fueron desafiadas subcutáneamente con una dosis de 10^7 PFU de la cepa virulenta 56/74 de RVFV y se las monitorizó durante 8 días.

Al primer día post-infección, todos los animales no vacunados desarrollaron pirexia (media 40.23°C) y presentaron un pico de fiebre a día 2 post-infección. Por otro lado, en los animales vacunados no se detectó un aumento de la temperatura rectal a día 2 post-infección (39.4°C) comparada con su temperatura media a día 0 (39.73°C). Aunque a día 1 si superaron ligeramente su umbral de fiebre, su temperatura siguió siendo muy inferior a la del grupo control (Figura 3.9).

En las ovejas no vacunadas, se detectaron altos niveles de viremia entre los días 1 y 3, observándose el valor medio más alto 4.21×10^4 PFU/ml a día 2 post-infección. Los niveles medios de viremia en los animales no vacunados fueron significativamente superiores a los detectados en el grupo de ovejas inmunizadas los días 2 y 3 post-infección. Por otro lado, solo una oveja de las vacunadas mostró viremia a día 3 post-desafío, aunque ésta era significativamente inferior a la de las ovejas no vacunadas. Las otras dos ovejas no desarrollaron viremia en ningún momento del experimento.

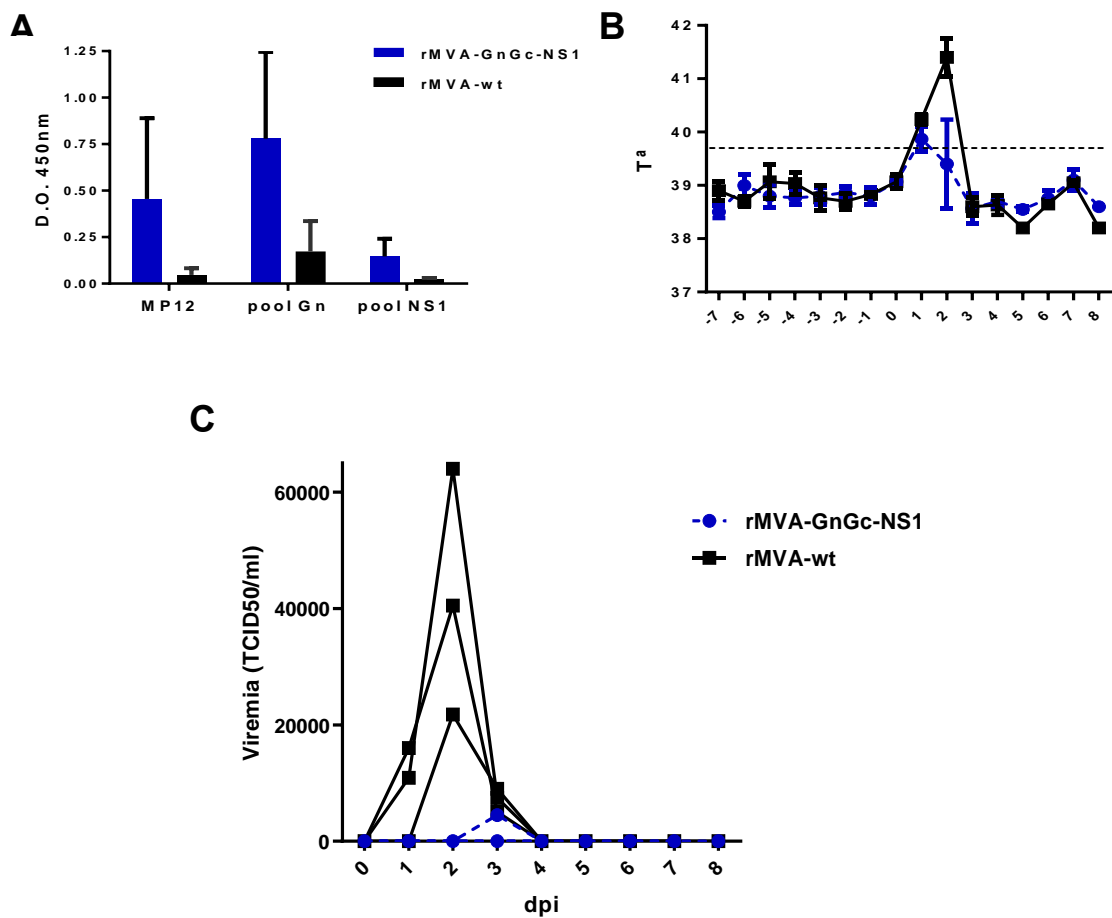


Figura 3.9. Inmunidad protectora conferida por la vacunación de ovejas con rMVA-GnGc-NS1 tras su desafío con RVFV. **A.** ELISA de IFN- γ . Sangre completa fue estimulada con la cepa MP-12, un pool de péptidos de la proteína Gn y un pool de péptidos de la proteína NS1. **B.** Temperaturas rectales medias en ovejas vacunadas y no vacunadas después de la infección con RVFV. **C.** Títulos medios de viremia analizados por reducción de placa. Las barras de error representan la desviación estándar.

8. Parámetros bioquímicos tras la infección con RVFV

La infección con RVFV induce alteraciones en varios parámetros bioquímicos del suero, especialmente los relacionados con las enzimas hepáticas. Para confirmar la protección generada por rMVA-GnGc-NS1, se analizaron varios parámetros bioquímicos en los sueros de las ovejas tras la infección con RVFV y se pudieron detectar cambios notables tras la infección entre animales inmunizados y no inmunizados. El grupo control presentó niveles elevados de la enzima aspartato transaminasa (AST) desde el día 2 al 7 post-infección con niveles máximos de 470.2 U/l a día 3 post-infección (valores en rango normal= 60–280 U/l). Sin embargo, las ovejas vacunadas con MVA-GnGc-NS1 mantuvieron sus niveles basales de AST en suero durante todo el estudio. Además, los niveles de AST fueron significativamente superiores en el grupo control comparado con los del grupo vacunado a días 2 y 3 post-infección. Los niveles de Gamma-glutamilttransferasa (GGT) también aumentaron significativamente en el grupo no vacunado desde el día 2 post-infección, alcanzando un nivel máximo de 137 U/l. El aumento de GGT fue estadísticamente significativo a días 3, 5 y 7 post-infección comparado con el de las ovejas vacunadas, en las que se mantuvieron en sus niveles basales durante todo el estudio. También se detectaron diferencias en los niveles de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) entre las ovejas vacunadas y las no vacunadas después de la infección con RVFV. Las ovejas no vacunadas respondieron al desafío con concentraciones elevadas de LDH alcanzando el máximo nivel a día 3 con un valor de 2816 U/l. Este aumento del nivel de LDH en las ovejas control fue estadísticamente significativo comparado con los animales vacunados.

También se analizó la concentración de proteínas totales en el suero y los animales control mostraron valores inferiores después de la infección. En todos los animales no vacunados, las medias de concentración de proteínas totales fueron significativamente inferiores que en las ovejas vacunadas desde el día 3 al 7 post-infección con RVFV. En concreto, en las ovejas no vacunadas se observó un descenso significativo en los niveles de albumina a día 3 post-infección. Estos resultados son consistentes con otros estudios de infecciones virales que mostraron un descenso en las proteínas totales presentes en el suero y también en los niveles de albumina tras la infección (Maharjan 2017; Shivaji 2018).

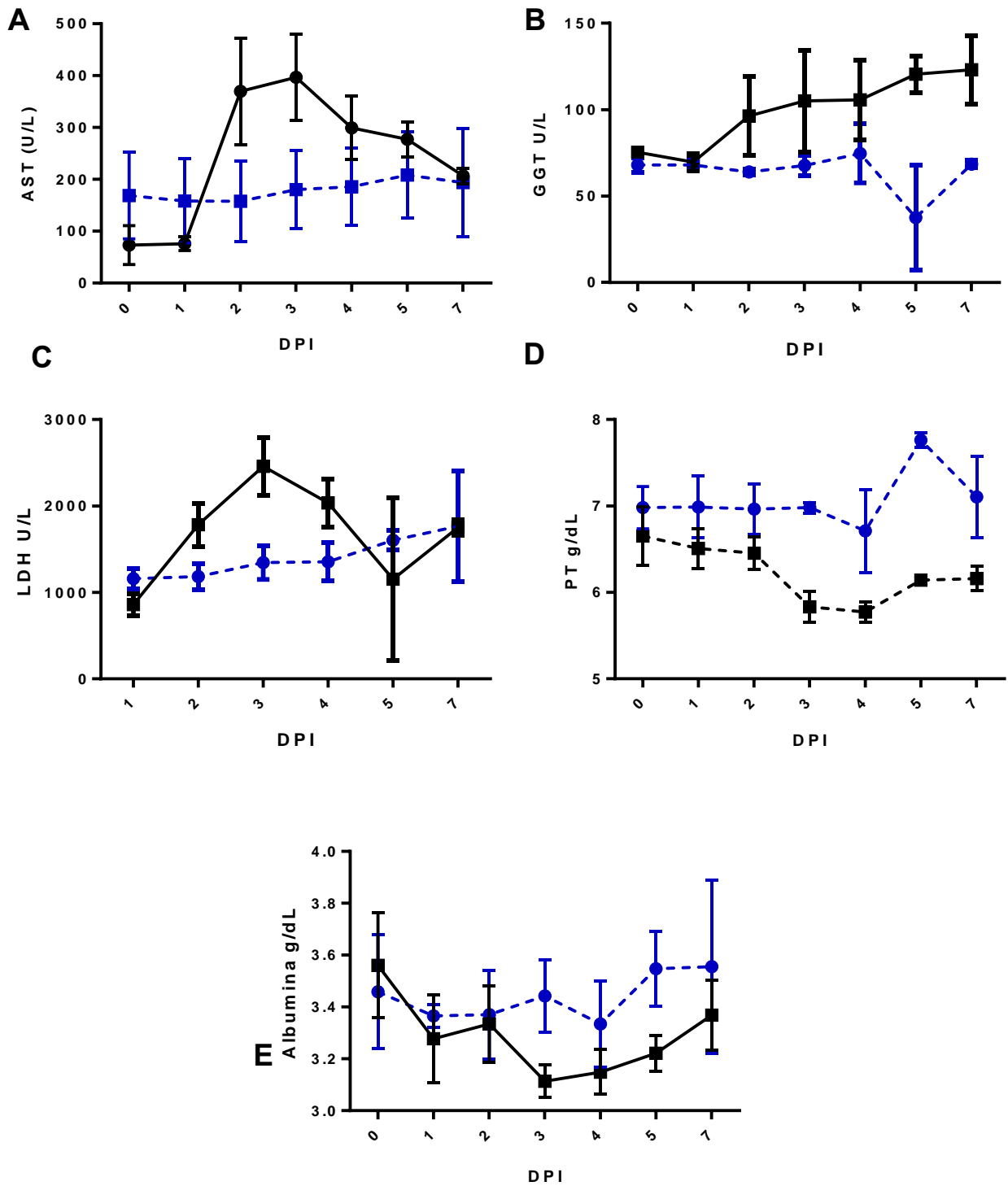


Figura 3.10. Parámetros bioquímicos en ovejas inmunizadas con MVA-GnGc-NS1 y MVA-wt después del desafío con RVFV. **A.** Aspartato transaminasa (AST). **B.** Gamma-glutamilttransferasa (GGT). **C.** Lactato deshidrogenasa (LDH). **D.** Proteínas totales. **E.** Albumina. Las barras de error representan la desviación estándar.

9. Estudio histopatológico tras la infección con RVFV

La hepatitis multifocal necrótica es la lesión más característica de la fiebre del Valle del Rift en ovejas adultas. Para evaluar la protección conferida por la inmunización con rMVA-GnGc-NS1 frente a RVFV, se analizaron histológicamente e inmuohistoquímicamente muestras *post mortem* del hígado de las ovejas.

En todas las muestras de hígado de las ovejas no vacunadas se detectó hepatitis multifocal. Las lesiones más graves se detectaron en una oveja eutanasiada a 4 días post-desafío, en la que se observaron varios focos con áreas centrales de necrosis y rodeados por hemorragias con una moderada infiltración de linfocitos, macrófagos y algunos neutrófilos. Las lesiones en la oveja eutanasiada a día 7 fueron similares pero más leves, dado que los focos eran más pequeños y estaban compuestos principalmente por infiltrado inflamatorio sin apenas necrosis. Por último, la oveja eutanasiada a día 8 mostro hiper celularidad portal leve y pequeños agregados de células inflamatorias en el parénquima. Las muestras de las ovejas vacunadas solo mostraron hiper celularidad portal leve.

El análisis inmuohistoquímico confirmó la presencia del virus en los focos necróticos e inflamatorios del hígados de los animales no vacunados, mientras que no se pudo detectar virus en las muestras de los animales vacunados, excepto por un pequeño foco aislado de células infectadas en la oveja 982, que también mostro bajos niveles de viremia. Todos estos datos indican que la inmunización de ovejas con rMVA-GnGc-NS1 confiere una protección considerable frente al desafío con RVFV y reduce o elimina la aparición de viremia y signos clínicos.

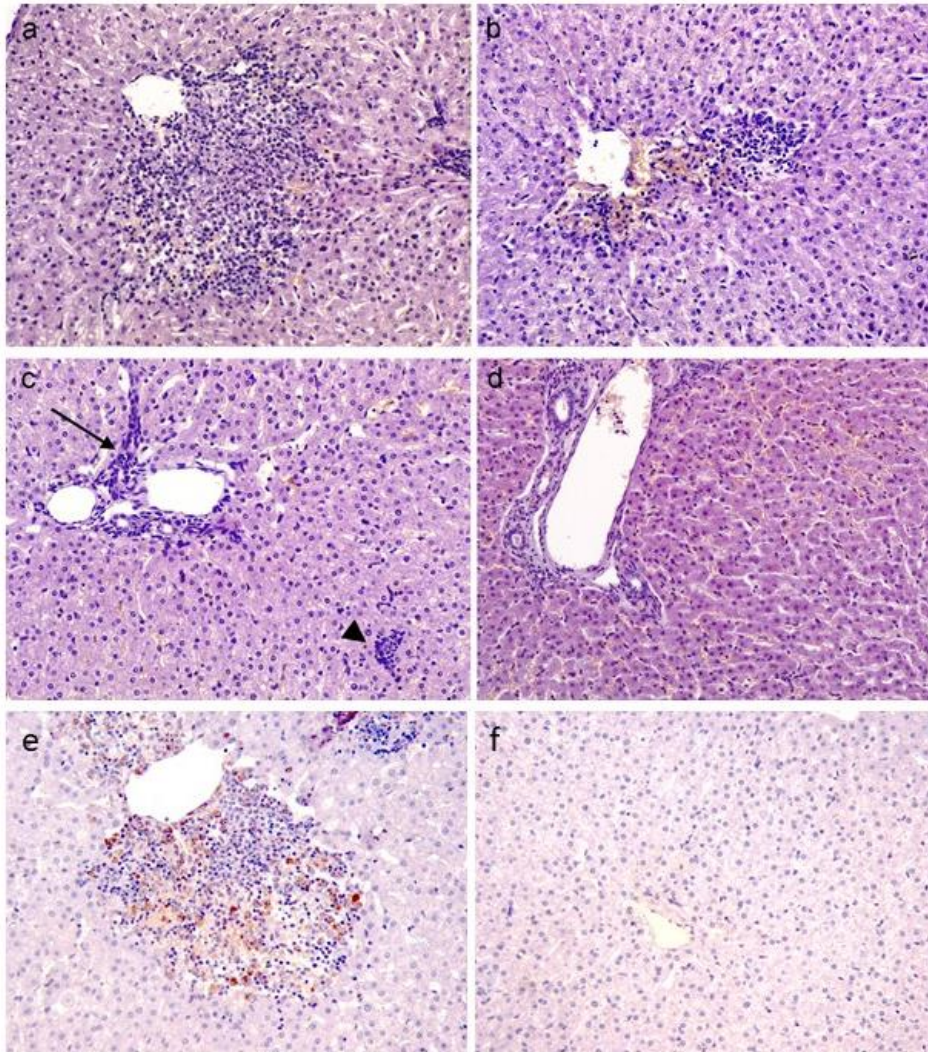


Figura 3.11. Análisis inmunohistoquímico de hígados de ovejas vacunadas y no vacunadas después del desafío con RVFV. **A.** Oveja no vacunada 4 dpi. Se observa hepatitis necrótica caracterizada por un foco de necrosis central, rodeado de un infiltrado con linfocitos, macrófagos y células plasmáticas, junto a la vena centrolobulillar. **B.** Oveja no vacunada 7 dpi. Lesión similar pero mas leve que la de la oveja anterior. En este caso, no hay un área central evidente de necrosis y el infiltrado inflamatorio está formado principalmente por células mononucleares. **C.** Oveja no vacunada 8 dpi. Hepatitis leve no purulenta. Se observa un aumento de células mononucleares en el área portal (flecha) y un pequeño agregado de linfocitos y macrófagos (Punta de flecha). **D.** Oveja vacunada 7 dpi. No se observan lesiones hepáticas significativas en los animales vacunados **E.** Oveja no vacunada 4 dpi. Marcaje intracelular de RVFV (color marrón-dorado) dentro de un foco de necrosis e inflamación junto a la vena centrolobulillar. IHQ de RVFV. **F.** Oveja vacunada 4 dpi. Lóbulo hepático sin lesiones significativas o marcaje del antígeno viral. Aumento de 200x.

VII.DISCUSIÓN

La fiebre del Valle del Rift es una enfermedad endémica en un gran número de países del continente africano y en la península arábiga, donde aparecen periódicamente brotes de la enfermedad. Los brotes de esta enfermedad provocan serias consecuencias para el hombre así como graves pérdidas económicas en el ganado.

Se considera una enfermedad con un alto riesgo de emergencia en países que ahora mismo se encuentran libres de ella debido en gran parte al cambio climático observado en estos últimos años que ha favorecido el desplazamiento de mosquitos a zonas más templadas, lo que, junto al aumento del comercio internacional de animales, podría facilitar el establecimiento de la enfermedad en nuevas regiones, hecho ya descrito para otros arbovirus como el virus del Nilo Occidental (WNV) y el virus de la Lengua Azul (BTV) (Pfeffer and Dobler 2010, Weaver and Reisen 2010). Otro punto a tener en cuenta es la alta competencia vectorial que se conoce para RVFV pues existen múltiples especies de mosquitos presentes en Europa y América que podrían permitir la transmisión y el establecimiento de la enfermedad (Gargan, Clark et al. 1988, Chevalier, Pepin et al. 2010). Por todo ello, la aparición de brotes epizooticos de RVF en zonas no endémicas sería posible con el consiguiente riesgo tanto para la salud pública como animal.

Actualmente se considera que la medida más efectiva para el control y la prevención de la enfermedad es la vacunación. Tanto las vacunas atenuadas e inactivadas desarrolladas para combatir la enfermedad en África han presentado diversos efectos adversos como teratogénesis, abortos o falta de eficacia respectivamente, por lo que ninguna de ellas se ha aprobado para su uso en humanos o en el ganado de países no endémicos (Ikegami and Makino 2009). Ante esta situación diversos grupos de investigación se han centrado en el desarrollo de vacunas más seguras y eficaces, como las vacunas basadas en virus recombinantes, que además permitan diferenciar animales infectados de vacunados y que sean válidas para su uso tanto en el hombre como en el ganado.

A pesar de que la vacunación es la única estrategia para prevenir los brotes de RVF, la imposibilidad de predecir cuándo van a ocurrir hace muy difícil la implantación de campañas de vacunación periódicas (Nanyingi, Munyua et al. 2015). Por eso en este trabajo hemos creído que una buena estrategia para contribuir a mejorar esta situación sería aprovechar las campañas de vacunación de otras enfermedades de rumiantes con mayor prevalencia y que ocurran de manera periódica o estacional e introducir a la vez la

vacunación frente a RVF. Una enfermedad que encaja perfectamente con este planteamiento es la Lengua azul; es endémica en muchos países en los que se dan brotes de RVF, está lejos de ser erradicada y además también causa grandes pérdidas económicas. Las campañas de vacunación frente a BTV son actualmente necesarias en Europa para controlar su diseminación, ya que se ha convertido en una enfermedad enzoótica del sur de Europa (Rao, Hegde et al. 2017). A pesar de la disponibilidad de vacunas atenuadas e inactivadas frente a BTV, ambas presentaciones tienen numerosas limitaciones y problemas de seguridad. Muchas vacunas experimentales frente a BTV se encuentran ahora mismo en desarrollo y presentan mejoras con respecto a las vacunas clásicas como una mayor seguridad o la posibilidad de diferenciar a los animales vacunados de los infectados (estrategias DIVA), especialmente aquellas basadas en vectores poxvirus (Boone, Balasuriya et al. 2007, Perrin, Albina et al. 2007, Calvo-Pinilla, Navasa et al. 2012, Marin-Lopez, Calvo-Pinilla et al. 2018) y genética reversa (Matsuo, Celma et al. 2011, Feenstra, Pap et al. 2015).

Nuestro objetivo principal por tanto ha sido la generación de vacunas duales, mediante tres estrategias distintas; el uso de sistemas de genética reversa para generar virus de la fiebre del Valle del Rift que actúen como vector vacunal expresando proteínas de BTV; la generación de VLPs de RVFV que expresen antígenos de BTV; y por último vacunas basadas en el vector viral recombinante MVA codificando los antígenos más relevantes de RVFV y BTV desde el punto de vista vacunal. Además, se ha evaluado la respuesta inmune y protección inducidas por cada uno de estos sistemas tanto en el modelo murino como en la oveja, hospedador natural de ambos virus.

1. Generación de virus recombinantes del virus de la fiebre del Valle del Rift que expresan antígenos heterólogos

Como ya hemos mencionado con anterioridad, la vacunación se considera una medida muy efectiva para controlar los brotes de fiebre del valle del Rift en ganado mediante la inducción de inmunidad de grupo. La existencia de sistemas de rescate de virus recombinantes para virus de cadena simple de RNA de polaridad negativa han permitido la manipulación del genoma de RVFV y por lo tanto la generación de varias vacunas atenuadas experimentales que han demostrado ser muy eficaces en rumiantes. Estudios previos utilizando sistemas de genética reversa también han demostrado la gran

plasticidad del genoma del virus de la fiebre del Valle del Rift, siendo capaz de aceptar inserción de secuencias e incluso segmentos extra en su genoma.

La primera demostración de que era viable generar RVFV recombinantes a los que se les había delecionado el gen NSs y que además expresaban antígenos heterólogos se llevó a cabo mediante la generación de un rRVFV que expresaba GFP. Posteriormente, también se llevó a cabo la generación de un replicón de RVFV sin capacidad de propagación que codificaba la hemaglutinina de influenza (HA) o un péptido CD8 asociado a tumores. Se pudo observar en ratones una respuesta inmunitaria específica frente a HA y se consiguió controlar el crecimiento de células de linfoma *in vivo* (Oreshkova, Cornelissen et al. 2014). A pesar de estos resultados exitosos, no se hicieron muchos más avances para intentar utilizar RVFV como vector de otros antígenos relevantes en la vacunación frente a enfermedades de rumiantes. Nuestro objetivo por lo tanto ha sido explorar la posibilidad de utilizar RVFV como un vector vacunal para otras enfermedades de rumiantes y además así desarrollar una vacuna dual, para promover la vacunación en países donde ocurren brotes esporádicos de FVR. La epidemiología de la FVR es un proceso multifactorial muy complejo que involucra a seres humanos, mosquitos competentes, animales salvajes y domésticos y también al medioambiente, lo cual resulta en brotes muy graves después de largos periodos en los que no se puede detectar la circulación del virus (Oreshkova, Spel et al. 2015, Wichgers Schreur, van Keulen et al. 2017). Aunque una vacuna para RVF estuviera fácilmente disponible, la impredecibilidad de los brotes hace muy complicada la implantación de campañas de vacunación periódicas, ya que los ganaderos no las perciben como necesarias, sobre todo cuando no existen políticas que puedan dirigir la utilización de dichas vacunas (Nanyingi, Munyua et al. 2015). Por eso una buena estrategia para mejorar esta situación sería beneficiarse de otras campañas periódicas de vacunación frente a otras enfermedades de rumiantes con mayor prevalencia e introducir a la vez la vacunación frente a RVF.

Las características epidemiológicas de la enfermedad de la Lengua azul encajan perfectamente con el escenario descrito en el párrafo anterior. Se trata de una enfermedad endémica en muchos países en los que se dan brotes de RVF y está lejos de ser erradicada, debido principalmente a la presencia de culicoides infectados que sobreviven al invierno en regiones con temperaturas más altas, favoreciendo los brotes recurrentes de la enfermedad.

Debido a esto, lo primero que nos plantemos hacer fue comprobar que RVFV era capaz de expresar antígenos de BTV de manera estable. Las vacunas de BTV se basan principalmente en la inducción de una fuerte respuesta de anticuerpos frente a la proteína VP2, la proteína mayoritaria de la cápside y la principal inductora de anticuerpos neutralizantes específicos de serotipo (Stewart, Hardy et al. 2015). Recientemente, se ha descrito la proteína NS1 de BTV como un antígeno prometedor para generar una protección multiserotipo. La protección inducida por NS1 se basa en la activación de una respuesta inmunitaria de CTLs con reactividad cruzada entre serotipos (Schwartz-Cornil, Mertens et al. 2008, Hartman 2017). Las ventajas que ofrece la proteína NS1 como antígeno vacunal es que está altamente conservada entre todos los serotipos de BTV y además es la proteína vírica más abundante en las células infectadas por BTV (Gachohi, Njenga et al. 2016). La proteína NS1 contiene epítomos asociados tanto con respuestas de células T como con respuesta humoral. La respuesta de anticuerpos frente a la proteína NS1 puede ser también importante en la protección a pesar de que los anticuerpos anti-NS1 son no neutralizantes. Basándonos en todo esto, seleccionamos ambos antígenos como modelo para testar nuestra hipótesis.

La proteína VP2 de BTV-4 fue expresada mediante el virus recombinante rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4}. Mediante inmunofluorescencia indirecta, el patrón de expresión de VP2 en células infectadas estaba en consonancia con el patrón de expresión observado en infecciones *in vitro* con BTV, es decir, un marcaje citoplasmático sin compartimentalización subcelular clara (Calvo-Pinilla, Navasa et al. 2012). Tras el marcaje metabólico con ³⁵S-Metionina se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de extractos de células Vero 48 h después de la infección con rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4}. Los resultados obtenidos sugerían que el antígeno VP2 se degradaba rápidamente a un polipéptido de unos 25 kDa, lo cual indicaría una falta de estabilidad para el antígeno nativo. En este sentido, la expresión de VP2 recombinante mediante un vector MVA mostró también una banda de degradación prominente de 25 kDa tan solo 16 horas después de la infección (Marin-Lopez and Ortego 2016). Además se sabe que la proteína VP2 es altamente sensible a la digestión con proteasas dando lugar, entre otras, a un polipéptido de 25 kDa (Cowley and Gorman 1990). Esta observación sugería que después de su síntesis, la proteína VP2 se procesaría rápidamente quizás por proteasas específicas y/o debido a la falta de otras proteínas de BTV que son esenciales para estabilizar el trímero de VP2. Se ha sugerido que la proteína VP5, también presente en la capa externa

de la cápside del virus, puede ayudar a mantener la conformación terciaria de VP2 (Roy, Urakawa et al. 1990). Así mismo se cree que esta proteína, posiblemente mediante interacción con VP2, estimula las respuestas de neutralización (Mohd Jaafar, Belhouchet et al. 2014). A pesar de esto, los niveles de expresión de VP2 fueron suficientes para inducir inmunidad frente a BTV según indicaron los datos de seroneutralización.

Por otro lado, el rescate del virus recombinante que expresaba la proteína NS1 al completo no fue posible, a pesar de los intentos que se realizaron. Así mismo la generación de VLPs fue igualmente infructuosa. Se ha descrito que la proteína NS1 en su forma completa forma estructuras complejas similares a túbulos cuando se expresa en células infectadas con BTV y que regula la expresión de genes virales mediante su unión con el mRNA viral (Kerviel, Ge et al. 2019). Además, también se ha sugerido que NS1 puede tener un rol citopatogénico (Owens, Limn et al. 2004). Quizá la formación de estas estructuras intracelulares evita que RVFV complete su ciclo replicativo, impidiendo por tanto la generación de partículas virales infectivas. A pesar de esto, conseguimos expresar una versión truncada de esta proteína (NS1Nt) fusionada a la secuencia marcadora V5 (para facilitar su detección) mediante la infección con el virus rZH548- Δ NSs::NS1Nt_{BTV-4}. En estudios previos con esta proteína se demostró que la mayoría de los epítomos teóricos CD8⁺ se encuentran en la mitad amino-terminal, es decir en el fragmento NS1Nt (Marin-Lopez, Calvo-Pinilla et al. 2018). Este hecho nos permitió asegurar la presentación antigénica de regiones que se han descrito previamente como involucradas en la inducción de una respuesta inmunitaria celular. El patrón de expresión de esta proteína es totalmente diferente del de la proteína VP2, pero es muy semejante al patrón observado en la proteína NS1 cuando se realizan marcajes de células infectadas con BTV (Andrew, Whiteley et al. 1995), como se observó en los datos obtenidos mediante microscopia confocal.

Tanto el virus rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} como el rZH548- Δ NSs::NS1Nt_{BTV-4} fueron estables durante pases seriados en cultivo celular. La ausencia de expresión de la proteína NSs da lugar a virus menos citolíticos en células permisivas dando lugar a un fenotipo de placa de aspecto turbio (Ikegami, Won et al. 2006) y una capacidad de replicación menor en líneas celulares respondedoras a la señalización mediada por interferón de tipo I, de acuerdo con el papel antagonista de la proteína NSs frente al sistema de IFN antiviral. Es interesante remarcar que el tamaño de placa en células Vero de ambos virus recombinantes difería del de otros virus recombinantes sin expresión de NSs, como el que

expresa GFP. Estos cambios en el fenotipo de placa se los atribuimos a la expresión de los genes heterólogos lo que podría indicar un cierto efecto citopatogénico.

La utilización del locus NSs para la inserción de los genes heterólogos asegura a priori que el virus resultante no expresa la proteína NSs y por tanto será un virus con un fenotipo atenuado *in vivo*. Nosotros confirmamos esta atenuación en nuestros virus recombinantes dado que una inoculación con una dosis alta (10^7 PFU/ratón) de ambos virus quiméricos fue avirulenta en animales inmunocompetentes (BALB/c). Por otro lado, los virus recombinantes mantuvieron un fenotipo altamente virulento en ratones A129 (IFNAR $-/-$) que son no respondedores a IFN de tipo I, lo que indica que su capacidad para replicar *in vivo* no se veía alterada por la expresión de los genes heterólogos de BTV-4. Este hecho hizo que no nos fuera posible analizar directamente la eficacia protectora de estos virus recombinantes en un ensayo de desafío frente a BTV, ya que el modelo de animal de laboratorio que reproduce una infección de BTV son los ratones IFNAR $-/-$ (Calvo-Pinilla, Rodriguez-Calvo et al. 2009, Marin-Lopez, Bermudez et al. 2016). Debido a este contratiempo, pensamos que si se generaba una respuesta humoral apropiada frente al antígeno heterólogo VP2, la transferencia pasiva de suero inmune permitiría demostrar su capacidad protectora.

2. Protección inducida por los virus recombinantes rRVFV en ratón

La idea de la transferencia pasiva estaba apoyada por el hecho de que el suero que se iba a transferir tenía actividad neutralizante frente a BTV-4 *in vitro*. A pesar de todos los indicios positivos, la transferencia de suero inmune de ratones vacunados con rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} no fue suficiente para proporcionar protección completa, solo se pudo observar un ligero retraso en la aparición de mortalidad, signos clínicos y viremia, lo cual indicaba que la respuesta humoral generada frente a VP2 no era suficientemente fuerte o que la cantidad de suero transferido era inferior a la necesaria para poder proporcionar protección. Sin embargo, el suero de ratones que habían recibido una segunda dosis con BTV-4 tuvo un efecto totalmente protector en el mismo ensayo de transferencia pasiva. Estos datos sugerían que la vacunación con rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} había primado correctamente el sistema inmunitario de los ratones pero que quizá los bajos niveles de expresión de VP2 completa limitaron la inducción de una respuesta humoral fuerte frente a BTV *in vivo*, a pesar de la detección de anticuerpos neutralizantes *in vitro*. Otro aspecto a tener en cuenta es que parte de los anticuerpos protectores que se

generan frente a VP2 son conformacionales; la baja estabilidad de la expresión de la proteína hace que quizá parte de los epítomos conformacionales se pierdan o no sean accesibles a los linfocitos B haciendo que la respuesta humoral no sea completa y parte de los anticuerpos necesarios para la protección no se generen (Mohd Jaafar, Belhouchet et al. 2014, Fay, Attoui et al. 2019). Sin embargo, la inmunidad humoral proporcionada frente a RVFV fue totalmente protectora. Los ratones mostraron una protección completa frente a un desafío con una cepa de RVFV virulenta incluso cuando la dosis de inoculación había sido de tan solo 10 PFU/ratón. Ningún grupo de ratones desarrollo signos clínicos ni viremia excepto el grupo control. Nosotros teorizamos con la posibilidad de que para inducir una protección más fuerte frente a BTV es necesario estimular otros mecanismos distintos de la inmunidad humoral. Esto se confirmó dado que la transferencia de un suero inmune frente a BTV tampoco indujo protección

Con respecto al otro virus quimérico generado en este trabajo, la vacunación de ratones 129Sv con rZH548- Δ NSs::NS1Nt_{BTV-4} dio lugar a una respuesta de linfocitos T CD8⁺ específicos frente a la proteína NS1 de BTV. Dado que se ha demostrado previamente el tropismo del RVFV por células dendríticas y células del linaje de los monocitos y los macrófagos (Kerviel, Ge et al. 2019) es razonable pensar que la expresión de los antígenos recombinantes se estaría produciendo en un contexto apropiado para su presentación al sistema inmunitario, apoyando la utilización de RVFV atenuados como vector vacunal. La protección en ratón que confiere rZH548- Δ NSs::NS1Nt_{BTV-4} no se comprobó mediante ensayos de transferencia pasiva ya que esta proteína no induce una respuesta humoral protectora. Sin embargo cuando los esplenocitos de ratones inmunizados con el virus se estimularon con un péptido T CD8⁺ relevante de NS1 se pudo observar una expresión significativa de IFN γ en aquellos ratones que habían sido primero primados con el virus y después inoculados con BTV-4. Estos datos sugieren que rZH548- Δ NSs::NS1Nt_{BTV-4} también es capaz de primar eficientemente el sistema inmune pero que aun así no es suficiente para proteger completamente. Por tanto, en ausencia de un modelo de desafío apropiado en el que probar la eficacia, la capacidad de protección de ambos virus recombinantes en ratón todavía tiene que ser determinada.

En los ensayos llevados a cabo con las VLPs-VP2, se determinó que estas eran capaces de inducir anticuerpos neutralizantes frente a BTV y de nuevo se vio un gran efecto de primado tanto de las VLPs-VP2 como de las VLPs-NS1Nt cuando se utilizaban en combinación con un rMVA-VP2 o rMVA-NS1Nt. El mayor problema que hay que

afrontar con las VLPs es que su producción en títulos elevados era complicada, por lo que la dosis inoculada a los ratones fue probablemente subóptima. Sería interesante poder repetir estos experimentos aumentando la dosis de inoculación.

3. Protección inducida por los virus recombinantes en ovejas

Para determinar por tanto la capacidad inmunogénica y de protección de nuestros virus recombinantes se realizaron ensayos de inmunización y desafío en oveja, su hospedador natural. Con este propósito, se inocularon ovejas con una dosis de 10^7 PFU y se analizó la presencia de anticuerpos neutralizantes frente a BTV-4 y RVFV. En todos los grupos se detectaron anticuerpos neutralizantes frente a RVFV con niveles que se pueden considerar protectores según se ha descrito por otros autores (Faburay, Lebedev et al. 2012) y también se pudo detectar en el grupo inoculado con rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} una inducción de anticuerpos neutralizantes mayor y más rápida frente a BTV-4 que la obtenida con otras vacunas inactivadas o atenuadas frente a BTV después de dos dosis (Celma, Boyce et al. 2013, Zhugunissov, Yershebulov et al. 2015). Los niveles de anticuerpos neutralizantes presentaron un pico a día siete, descendiendo poco después, presentando una cinética muy similar a la inducción de IgMs. A pesar de esto, los niveles de anticuerpos neutralizantes detectados después de una sola dosis, indicaban que la vacuna rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} inducía inmunidad humoral. Con respecto al virus rZH548- Δ NSs::NS1N_{BTV}, tal y como se esperaba no se detectaron anticuerpos neutralizantes frente a BTV-4.

Dado que los niveles de anticuerpos neutralizantes alcanzados se podían considerar protectores según se había descrito en estudios previos (Fay, Attoui et al. 2019), esperábamos obtener un mayor grado de protección después de desafiar a las ovejas con BTV-4. A pesar de que se pudo detectar viremia en todos los grupos, es importante remarcar que los niveles detectados en el grupo inoculado con rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} fueron ligeramente inferiores que los detectados en el grupo control. Es importante también destacar que las ovejas vacunadas con rZH548- Δ NSs::NS1N_{BTV} quedaron parcialmente protegidas frente a BTV como se puede ver tanto en los niveles de viremia determinados mediante qPCR como en los niveles de anticuerpos generados frente a VP7 después del desafío. Estos niveles más bajos de anticuerpos frente a VP7 observados se pueden asociar a una replicación menor de BTV-4 en las ovejas vacunadas con rZH548- Δ NSs::NS1N_{BTV-4}. Se ha demostrado en infecciones experimentales de *Culicoides*

sonorensis con sangre infectada por BTV-11 y BTV-1 que la eficiencia de infección de los culicoides era dependiente de dosis estimándose su dosis infectiva alimentaria 50% (MAID50%) en torno a un título en sangre de $\pm 2 \times 10^5$ y $\pm 10^6$ TCID₅₀/ml para BTV-11 y BTV-1, respectivamente (Feenstra, Drolet et al. 2015, van Gennip, Drolet et al. 2019). De acuerdo con estos experimentos, el nivel de virus detectado en la sangre de las ovejas vacunadas tanto con rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} como con rZH548- Δ NSs::NS1N_{tBTV} fue 40 veces inferior al necesario para que el virus pueda ser transmisible al vector. Por último, los niveles de ALT y AST, marcadores de daño hepático, aumentaron de manera rápida y significativa después del desafío en el grupo control y el grupo inoculado con rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} pero no en el grupo inoculado con rZH548- Δ NSs::NS1N_{tBTV-4}.

A pesar de que BTV no presenta tropismo por las células hepáticas, el aumento en los niveles de estas enzimas se considera indicador de procesos inflamatorios, daño del tejido blando y lesiones en órganos como los pulmones (Sobharani, Singh et al. 2019). Los niveles aumentados observados en este estudio en las ovejas vacunadas con rZH548- Δ NSs::GFP correlacionan perfectamente con estudios previos en los que se describieron niveles elevados de estas enzimas en ovejas que habían sido infectadas experimentalmente con BTV (Aytekin, Aksit et al. 2015).

Una explicación para la eficacia parcial observada en estos experimentos podría ser la alta dosis de desafío administrada a nuestras ovejas, sobre todo si consideramos que la cepa BTV4-Morocco, cepa de BTV-4 aislada en células de insecto y nunca propagada en cultivos de células de mamífero, mantiene una mayor virulencia. Otra explicación podría ser que la dosis utilizada para inmunizar a las ovejas fue la misma que la utilizada para inmunizar ratones, por lo que es posible que la dosis de vacunación utilizada estuviera por debajo del límite óptimo. Alternativamente, aunque se observó una clara actividad neutralizante *in vitro*, puede que para proteger a las ovejas del desafío con BTV se necesite alcanzar afinidades más altas para los anticuerpos mediante un cambio de subclase de inmunoglobulina para los anticuerpos específicos de VP2, que eran principalmente IgM como hemos mostrado mediante ELISA. A pesar de esto, los datos obtenidos son bastante prometedores y sería interesante comprobar su capacidad de actuar como *prime* o *boost* en combinación con otra vacuna de BTV. Dado que cada proteína heteróloga expresada aporta una parte importante para la inmunidad de los animales también se deberán realizar más ensayos para evaluar la eficacia de la administración combinada de los dos virus recombinantes tras un desafío con BTV. En conjunto podrían

servir como un medio para proteger frente a RVF a la vez que se daría una dosis de recuerdo a aquellas ovejas que ya hubieran sido vacunadas frente a BTV y además apoya la utilización de RVFV como vector vacunal.

4. Generación de rMVAs duales y análisis de la protección generada en el modelo murino

Otra de las estrategias utilizadas en este trabajo en el desarrollo de vacunas bivalentes frente a RVFV y BTV es la basada en el vector viral MVA. Este vector es muy utilizado por su elevada seguridad y por su excelente capacidad para generar respuestas humorales y respuestas mediadas por linfocitos T frente al antígeno de interés insertado (Drexler, Staib et al. 2004). Ya se ha demostrado en numerosas ocasiones que la vacunas MVA son efectivas frente a un gran número de enfermedades virales (Gilbert 2013). Además en nuestro laboratorio se han llevado a cabo varios estudios exitosos utilizando MVA tanto para RVFV como BTV y AHSV (Calvo-Pinilla, Gubbins et al. 2018, Lorenzo, Lopez-Gil et al. 2018, Marin-Lopez, Calvo-Pinilla et al. 2018).

Para este estudio, se generaron varios MVAs recombinantes que expresaban proteínas tanto de RVFV como de BTV. Realizando estudios *in vivo* se demostró que una estrategia de inmunización con un prime-boost homólogo con cualquiera de los virus generados, rMVA-GnGc-VP2, rMVA-GnGc-NS1, o rMVA-GnGc-NS1-Nt, protegía a ratones frente a un desafío letal con BTV-4.

El virus rMVA-GnGc-VP2 indujo altos niveles de anticuerpos neutralizantes específicos frente a BTV-4. Está demostrado que la inmunidad conferida por la proteína VP2 es suficiente para inducir una respuesta inmune protectora frente a BTV (Huisman, van der Walt et al. 1987). De hecho, a pesar de inducir una inmunidad específica de serotipo, las vacunas experimentales frente a BTV solían incluir esta proteína en su composición (Jabbar, Calvo-Pinilla et al. 2013, Feenstra and van Rijn 2017, van Rijn 2019). Los ratones inmunizados con el rMVA-GnGc-NS1 o rMVA-GnGc-NS1Nt no desarrollaron anticuerpos neutralizantes específicos frente a BTV-4 pero sí que mostraron una fuerte respuesta citotóxica mediada por células T-CD8 frente a la proteína NS1 y también mostraron estar protegidos frente a un desafío con una dosis letal del virus. En trabajos previos en nuestro laboratorio se ha demostrado que la respuesta de células T-CD8 frente a la proteína NS1 juega un papel muy importante en la inducción de una

respuesta protectora frente a múltiples serotipos de BTV (Marin-Lopez, Calvo-Pinilla et al. 2017, Marin-Lopez, Calvo-Pinilla et al. 2018).

Dado que la protección inducida frente a BTV por los tres rMVAs generados fue muy similar en ratón y que lo más interesante para BTV sería desarrollar una vacuna universal multiserotipo, se decidió evaluar la protección inducida frente a RVFV mediante una vacunación en ratón con el rMVA-GnGc-NS1. A pesar de no llevar a cabo un ensayo de protección frente a RVFV con los tres virus recombinantes, si pudimos comprobar que la vacunación con los tres inducía una fuerte respuesta de anticuerpos neutralizantes frente a RVFV, sin diferencias significativas entre los tres rMVAs. Los ratones inmunizados con rMVA-GnGc-NS1 no desarrollaron signos clínicos ni viremia después del desafío con RVFV y se mantuvieron sanos durante todo el experimento. Estos datos confirmaban que la inmunización de ratones con rMVA-GnGc-NS1 les protegía frente a un desafío letal tanto con BTV-4 como con RVFV.

5. Evaluación de la protección inducida por el rMVA-GnGc-NS1 en el hospedador natural

Para los estudios de eficacia de estos candidatos vacunales en ovejas también decidimos centrarnos únicamente en el virus rMVA-GnGc-NS1 dados los buenos resultados que habíamos obtenido en ratón. Las ovejas vacunadas con el rMVA-GnGc-NS1 mostraron una viremia inferior así como signos clínicos más leves que los animales no vacunados después del desafío con BTV-4M. A pesar de que no se evitó la viremia por completo, los títulos de virus alcanzados fueron inferiores a 10^3 PFU/ml en 2 de las 3 ovejas. De acuerdo con los ensayos experimentales de los que hablamos anteriormente sobre los niveles necesarios para que el virus sea transmisible, el nivel de virus detectado en la sangre de las ovejas vacunadas con el rMVA-GnGc-NS1 era 200 veces inferior a la dosis mínima necesaria para infectar al vector, por lo tanto no podrían infectar a los culicoides impidiendo la transmisión del virus.

Después del desafío de las ovejas con RVFV, las temperaturas rectales medias eran inferiores en las ovejas vacunadas con rMVA-GnGc-NS1 que en las no vacunadas. Además, la viremia era significativamente más baja comparada con la del grupo control. Es importante destacar que no se pudo detectar virus infeccioso en ningún momento del experimento en la sangre de 2 de las 3 ovejas vacunadas. Estos resultados indican que la vacunación con rMVA-GnGc-NS1 induce protección frente a RVFV. Curiosamente,

ensayos previos de inmunización con vacunas similares de rMVA-GnGc no indujeron fuertes respuesta de anticuerpos neutralizantes frente a RVFV ni en ratón ni en oveja (Lopez-Gil, Lorenzo et al. 2013, Lorenzo, Lopez-Gil et al. 2018) y fueron incapaces de proteger a ovejas que habían sido inmunizadas con dos dosis (Lorenzo, Lopez-Gil et al. 2018). Aunque se deberían realizar experimentos comparativos, es razonable especular que la diferente procedencia del vector MVA y/o el diferente locus y promotor utilizado en este trabajo podrían explicar por qué estas vacunas inducen una mayor respuesta inmunológica frente a las glicoproteínas de RVFV. Además en las construcciones previas de rMVA-GnGc (Lopez-Gil, Lorenzo et al. 2013), el gen heterólogo estaba clonado bajo control del promotor de vaccinia 7.5k temprano/tardío mientras que en el rMVA-GnGc-NS1 descrito en este trabajo las glicoproteínas de RVFV se encuentran bajo control de un promotor temprano optimizado (Chakrabarti, Sisler et al. 1997, Sanchez-Puig, Lorenzo et al. 2012). Los diferentes locus y promotores bajo los que se encuentra el gen GnGc en el rMVA podrían explicar las diferencias observadas en la protección frente a RVFV entre el rMVA-GnGc y el rMVA-GnGc-NS1. Además, las pequeñas diferencias en las secuencias insertadas en el vector (ausencia de péptido señal tpA en el extremo N-terminal o tags marcadores en el C-terminal) también podrían contribuir a las diferencias de inmunogenicidad y eficacia observadas. En cualquier caso, estos datos claramente muestran que la vacuna MVA desarrollada en este trabajo es un recurso válido para el desarrollo de futuras vacunas frente a RVF.

Por otra parte las ovejas vacunadas no mostraron signos clínicos evidentes y la viremia se vio reducida o evitada. Los marcadores de daño hepático y los análisis patológicos confirmaron la eficacia del rMVA-GnGc-NS1 en la protección frente a RVFV, bloqueando la diseminación en tejidos secundarios. El aumento en los niveles de actividad de las enzimas AST, LDH y GGT en el suero son indicadores de daño hepático (Kramer 1997, Meyer and Harvey 1998, Chaudhary and Chauhan 2015). En este ensayo, pudimos observar un aumento de estas enzimas en las ovejas no vacunadas después del desafío con RVFV con respecto a las ovejas vacunadas. El aumento de AST, GGT y LDH después de la infección con RVFV se debe muy probablemente a lesiones hepáticas tal y como se ha descrito con anterioridad (Madani, Al-Mazrou et al. 2003, Faburay, Gaudreault et al. 2016, Lorenzo, Lopez-Gil et al. 2018). Al igual que no se pudo observar daño hepático en las ovejas vacunadas después del desafío, tampoco se observó un cambio significativo en sus niveles de AST, GGT y LDH. Estos resultados confirman que

la inmunización con rMVA-GnGc-NS1 protege a los animales frente al daño hepático causado por RVFV. Finalmente, cuando se llevaron a cabo estudios post-mortem, las ovejas no vacunadas y desafiadas con RVFV mostraron hepatitis necrótica multifocal entre leve y moderada y el antígeno viral se pudo detectar en relación con esas lesiones. Estos hallazgos son similares a las lesiones que se encuentran en los casos naturales de infección por RVFV, donde la hepatitis necrotizante es la lesión típica (Flick and Bouloy 2005, Odendaal, Clift et al. 2019). Por otro lado, las ovejas vacunadas no mostraron ni necrosis ni agregación de células inflamatorias en el parénquima hepático, donde el virus está prácticamente ausente en 2 de 3 ovejas.

Además de la demostrada eficacia del MVA como vector vacunal frente a BTV y RVFV individualmente, nosotros hemos aprovechado su capacidad para expresar varios genes heterólogos en su genoma para así poder generar vacunas bivalentes frente a estos dos virus. Una vacuna bivalente capaz de proteger frente a BTV y RVFV, sería útil en África y también fuera del continente, y serviría para promover la vacunación de rumiantes en países donde ocurren brotes esporádicos de la enfermedad. Las vacunas basadas en MVA generadas en este trabajo nos brindan la oportunidad de proteger potencialmente frente a ambas infecciones de rumiantes. Además, la variabilidad antigénica de BTV, con sus al menos 27 serotipos, es un problema para el control de la diseminación del virus mediante campañas de vacunación y la inclusión de NS1 en la composición de las vacunas puede ayudarnos a superar este problema, lo cual supondría un gran avance con respecto a las vacunas existentes al abordar todos los serotipos de BTV.

Nuestros resultados son muy prometedores y apoyan la posibilidad de generar vacunas bivalentes capaces de proteger frente a BTV y RVFV. Dos de las tres estrategias que hemos desarrollado han sido capaces de proteger a ratones frente a un desafío con RVFV, sin embargo para poder probar la eficacia de la vacunación con los virus recombinantes de RVFV en el modelo de ratón frente a lengua azul se necesitaría conseguir en estos una mayor atenuación. Con respecto a los rMVAs han presentado una gran eficacia, lo cual es especialmente importante en el caso de rMVA-GnGc-NS1 ya que esta vacuna supone un avance crucial para generar vacunas multiserotipo frente a esta enfermedad. En oveja hemos podido observar que ambas vacunas reducen los signos clínicos, así como la pirexia y la viremia dejándola en ambos casos en valores inferiores a los necesarios para que la enfermedad sea transmisible. Los resultados sugieren que los

virus rRVFV son eficientes para primar a los animales, por lo que sería interesante realizar más experimentos en los que poder probar una estrategia combinada por ejemplo de los y los rMVA y poder a la vez optimizar la dosis de inoculación. Por otro lado, las vacunas basadas en rRVFV serían de especial interés en países en los que ambas enfermedades son endémicas, ya que BTV se controla principalmente mediante campañas de vacunación anuales. De esta forma se tendría al ganado también protegido frente a los brotes esporádicos de RVFV que como ya hemos dicho son difíciles de predecir.

VIII. CONCLUSIONES

1. Se han generado virus recombinantes, atenuados mediante la sustitución del gen NSs, del virus de la fiebre del Valle del Rift que expresan los antígenos heterólogos, GFP (rZH548- Δ NSs::GFP), la proteína del virus de la lengua azul VP2 (rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4}) y la mitad amino terminal de la proteína NS1 (rZH548- Δ NSs::NS1N_{tBTV}). A pesar de la atenuación de los virus, estos mantienen un fenotipo virulento en ratones inmunodeficientes IFNAR (-/-).
2. La vacunación de ratones inmunocompetentes con rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} o rZH548- Δ NSs::NS1N_{tBTV-4} induce una fuerte respuesta humoral neutralizante que confiere protección tras un desafío letal con RVFV, hasta con una dosis de vacunación de tan solo 10 PFU/ratón, indicando que la expresión de ambos transgenes no condiciona la inmunogenicidad de los virus recombinantes.
3. La vacunación de ratones 129Sv con una única inoculación de rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} induce una respuesta humoral neutralizante dependiente de dosis. Aunque la transferencia pasiva del suero de ratones inmunizados no fue suficiente para proteger a ratones IFNAR-/- tras un desafío con BTV-4, la transferencia pasiva de suero de ratones que habían sido primados con rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} y que recibieron una dosis de recuerdo con BTV-4 o con rMVA-VP2 protegió a ratones IFNAR-/- tras un desafío con letal con BTV-4.
4. La vacunación de ratones 129Sv con rZH548- Δ NSs::NS1N_{tBTV-4} induce una respuesta de linfocitos T-CD8 específica de NS1.
5. Los virus recombinantes son capaces de primar eficientemente el sistema inmune pero no en una medida suficiente para proteger completamente tras una única dosis.
6. La inmunización de ovejas con los rRVFVs induce una fuerte respuesta humoral neutralizante frente a RVFV. El virus rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} también induce una respuesta humoral neutralizante frente a BTV-4. Ambos virus, aunque en mayor medida rZH548- Δ NSs::NS1N_{tBTV-4}, mejoraron el estado general de los animales, acortaron la duración del estado febril y redujeron la viremia tras un desafío con BTV-4M.
7. La vacunación de ratones con rMVA-GnGc-VP2, rMVA-GnGc-NS1 o rMVA-GnGc-NS1N_t indujo una protección completa tras el desafío con RVFV, mediada por una potente inmunidad humoral. Así mismo, estas vacunas indujeron protección tras un desafío con BTV-4 en ratones. El virus rMVA-GnGc-NS1 fue capaz de inducir una protección total en ausencia de anticuerpos y es una estrategia prometedora para el desarrollo de vacunas multiserotipo.

- 8.** La vacunación de ovejas con rMVA-GnGc-NS1 mitiga la aparición de signos clínicos de BT y reduce la viremia a niveles en los que el virus no es transmisible. Con respecto a RVFV, esta vacuna evitó la aparición de signos clínicos, disminuyó la pirexia y evitó o redujo la viremia.
- 9.** Tanto los virus recombinantes rRVFV como los rMVAs duales nos brindan estrategias prometedoras para generar vacunas eficaces frente a ambas enfermedades de rumiantes. La utilización de NS1 como antígeno vacunal supondría un gran avance para abordar la generación de vacunas frente a todos los serotipos de BTV.

IX. BIBLIOGRAFIA

6. Andrew, M., et al. (1995). "Antigen specificity of the ovine cytotoxic T lymphocyte response to bluetongue virus." *Vet Immunol Immunopathol* **47**(3-4): 311-322.
7. Aytekin, I., et al. (2015). "Evaluation of oxidative stress via total antioxidant status, sialic acid, malondialdehyde and RT-PCR findings in sheep affected with bluetongue." *Vet Rec Open* **2**(1): e000054.
8. Boone, J. D., et al. (2007). "Recombinant canarypox virus vaccine co-expressing genes encoding the VP2 and VP5 outer capsid proteins of bluetongue virus induces high level protection in sheep." *Vaccine* **25**(4): 672-678.
9. Calvo-Pinilla, E., et al. (2018). "The immunogenicity of recombinant vaccines based on modified Vaccinia Ankara (MVA) viruses expressing African horse sickness virus VP2 antigens depends on the levels of expressed VP2 protein delivered to the host." *Antiviral Res* **154**: 132-139.
10. Calvo-Pinilla, E., et al. (2012). "Multiserotype protection elicited by a combinatorial prime-boost vaccination strategy against bluetongue virus." *PLoS One* **7**(4): e34735.
11. Calvo-Pinilla, E., et al. (2009). "Establishment of a bluetongue virus infection model in mice that are deficient in the alpha/beta interferon receptor." *PLoS One* **4**(4): e5171.
12. Celma, C. C., et al. (2013). "Rapid generation of replication-deficient monovalent and multivalent vaccines for bluetongue virus: protection against virulent virus challenge in cattle and sheep." *J Virol* **87**(17): 9856-9864.
13. Chakrabarti, S., et al. (1997). "Compact, synthetic, vaccinia virus early/late promoter for protein expression." *Biotechniques* **23**(6): 1094-1097.
14. Chaudhary, A. and V. Chauhan (2015). "Lactate Dehydrogenase as an indicator of Liver Diseases." *J Adv Med Dent Scie Res* **3**(5): 20-22.
15. Chevalier, V., et al. (2010). "Rift Valley fever--a threat for Europe?" *Euro Surveill* **15**(10): 19506.
16. Cowley, J. A. and B. M. Gorman (1990). "Effects of proteolytic enzymes on the infectivity, haemagglutinating activity and protein composition of bluetongue virus type 20." *Vet Microbiol* **22**(2-3): 137-152.
17. Drexler, I., et al. (2004). "Modified vaccinia virus Ankara as antigen delivery system: how can we best use its potential?" *Curr Opin Biotechnol* **15**(6): 506-512.
18. Faburay, B., et al. (2016). "Development of a sheep challenge model for Rift Valley fever." *Virology* **489**: 128-140.
19. Faburay, B., et al. (2012). "A glycoprotein subunit vaccine elicits a strong Rift Valley fever virus neutralizing antibody response in sheep." *Vector Borne Zoonotic Dis* **14**(10): 746-756.
20. Fay, P., et al. (2019). "Bluetongue virus outer-capsid protein VP2 expressed in *Nicotiana benthamiana* raises neutralising antibodies and a protective immune response in IFNAR -/- mice." *Vaccine: X* **2**: 100026.
21. Feenstra, F., et al. (2015). "Non-structural protein NS3/NS3a is required for propagation of bluetongue virus in *Culicoides sonorensis*." *Parasit Vectors* **8**: 476.
22. Feenstra, F., et al. (2015). "Application of bluetongue Disabled Infectious Single Animal (DISA) vaccine for different serotypes by VP2 exchange or incorporation of chimeric VP2." *Vaccine* **33**(6): 812-818.
23. Feenstra, F. and P. A. van Rijn (2017). "Current and next-generation bluetongue vaccines: Requirements, strategies, and prospects for different field situations." *Crit Rev Microbiol* **43**(2): 142-155.
24. Flick, R. and M. Bouloy (2005). "Rift Valley fever virus." *Curr Mol Med* **5**(8): 827-834.
25. Gachohi, J. M., et al. (2016). "Modelling Vaccination Strategies against Rift Valley Fever in Livestock in Kenya." *PLoS Negl Trop Dis* **10**(12): e0005049.
26. Gargan, T. P., 2nd, et al. (1988). "Vector potential of selected North American mosquito species for Rift Valley fever virus." *Am J Trop Med Hyg* **38**(2): 440-446.
27. Gilbert, S. C. (2013). "Clinical development of Modified Vaccinia virus Ankara vaccines." *Vaccine* **31**(39): 4241-4246.
28. Hartman, A. (2017). "Rift Valley Fever." *Clin Lab Med* **37**(2): 285-301.
29. Huismans, H., et al. (1987). "Isolation of a capsid protein of bluetongue virus that induces a protective immune response in sheep." *Virology* **157**(1): 172-179.

30. Ikegami, T. and S. Makino (2009). "Rift valley fever vaccines." *Vaccine* **27 Suppl 4**: D69-72
31. Ikegami, T., et al. (2006). "Rescue of infectious rift valley fever virus entirely from cDNA, analysis of virus lacking the NSs gene, and expression of a foreign gene." *J Virol* **80**(6): 2933-2940.
32. Jabbar, T. K., et al. (2013). "Protection of IFNAR (-/-) mice against bluetongue virus serotype 8, by heterologous (DNA/rMVA) and homologous (rMVA/rMVA) vaccination, expressing outer-capsid protein VP2." *PLoS One* **8**(4): e60574.
33. Kerviel, A., et al. (2019). "Atomic structure of the translation regulatory protein NS1 of bluetongue virus." *Nat Microbiol* **4**(5): 837-845.
34. Kramer, J. W. a. H., W.E. (1997). *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Clinical Enzymology J. J. Kaneko, J. W. Harvey and M. L. Bruss. San Diego,
35. London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto.: 303-325. .
36. Lopez-Gil, E., et al. (2013). "A single immunization with MVA expressing GnGc glycoproteins promotes epitope-specific CD8+T cell activation and protects immune-competent mice against a lethal RVFV infection." *PLoS Negl Trop Dis* **7**(7): e2309.
37. Lorenzo, G., et al. (2018). "Efficacy of different DNA and MVA prime-boost vaccination regimens against a Rift Valley fever virus (RVFV) challenge in sheep 12 weeks following vaccination." *Vet Res* **49**(1): 21.
38. Madani, T. A., et al. (2003). "Rift Valley fever epidemic in Saudi Arabia: epidemiological, clinical, and laboratory characteristics." *Clin Infect Dis* **37**(8): 1084-1092.
39. Marin-Lopez, A., et al. (2016). "Pathological Characterization Of IFNAR(-/-) Mice Infected With Bluetongue Virus Serotype 4." *Int J Biol Sci* **12**(12): 1448-1460.
40. Marin-Lopez, A., et al. (2017). "Microspheres-prime/rMVA-boost vaccination enhances humoral and cellular immune response in IFNAR(-/-) mice conferring protection against serotypes 1 and 4 of bluetongue virus." *Antiviral Res* **142**: 55-62.
41. Marin-Lopez, A., et al. (2018). "CD8 T Cell Responses to an Immunodominant Epitope within the Nonstructural Protein NS1 Provide Wide Immunoprotection against Bluetongue Virus in IFNAR(-/-) Mice." *J Virol* **92**(16).
42. Marin-Lopez, A. and J. Ortego (2016). "Generation of Recombinant Modified Vaccinia Virus Ankara Encoding VP2, NS1, and VP7 Proteins of Bluetongue Virus." *Methods Mol Biol* **1349**: 137-150.
43. Matsuo, E., et al. (2011). "Generation of replication-defective virus-based vaccines that confer full protection in sheep against virulent bluetongue virus challenge." *J Virol* **85**(19): 10213-10221.
44. Meyer, D. J. and J. W. Harvey (1998). Evaluation of hepatobiliary system and skeletal muscle and lipid disorders. *Veterinary Laboratory Medicine. Interpretation and Diagnosis*. D. J. Meyer and J. W. Harvey, Saunders company Philadelphia: 157-187.
45. Mohd Jaafar, F., et al. (2014). "Immunisation with bacterial expressed VP2 and VP5 of bluetongue virus (BTV) protect α/β interferon-receptor knock-out (IFNAR $^{-/-}$) mice from homologous lethal challenge." *Vaccine* **32**(32): 4059-4067.
46. Nanyingi, M. O., et al. (2015). "A systematic review of Rift Valley Fever epidemiology 1931-2014." *Infect Ecol Epidemiol* **5**: 28024.
47. Odendaal, L., et al. (2019). "Lesions and Cellular Tropism of Natural Rift Valley Fever Virus Infection in Adult Sheep." *Vet Pathol* **56**(1): 61-77.
48. Oreshkova, N., et al. (2015). "Preliminary Evaluation of a Bunyavirus Vector for Cancer Immunotherapy." *J Virol* **89**(17): 9124-9127.
49. Owens, R. J., et al. (2004). "Role of an arbovirus nonstructural protein in cellular pathogenesis and virus release." *J Virol* **78**(12): 6649-6656.
50. Perrin, A., et al. (2007). "Recombinant capripoxviruses expressing proteins of bluetongue virus: evaluation of immune responses and protection in small ruminants." *Vaccine* **25**(37-38): 6774-6783.
51. Pfeffer, M. and G. Dobler (2010). "Emergence of zoonotic arboviruses by animal trade and migration." *Parasit Vectors* **3**(1): 35.
52. Rao, P. P., et al. (2017). Bluetongue : Aetiology, Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis and Control. *Emerging and Re-emerging Infectious Diseases of Livestock*. J. Bayry.

53. Roy, P., et al. (1990). "Recombinant virus vaccine for bluetongue disease in sheep." J Virol **64**(5): 1998-2003.
54. Sanchez-Puig, J. M., et al. (2012). "Isolation of recombinant MVA using F13L selection." Methods Mol Biol **890**: 93-111.
55. Schwartz-Cornil, I., et al. (2008). "Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity." Vet Res **39**(5): 46.
56. Sobharani, V., et al. (2019). "Comparative study on hemato-biochemical alterations and selected acute phase protein response in native sheep experimentally infected with bluetongue virus serotypes 10 and 24. ." Comp Clin Pathol **28**: 1153–1163
57. Stewart, M., et al. (2015). "Characterization of a second open reading frame in genome segment 10 of bluetongue virus." J Gen Virol **96**(11): 3280-3293.
58. van Gennip, R. G. P., et al. (2019). "Vector competence is strongly affected by a small deletion or point mutations in bluetongue virus." Parasit Vectors **12**(1): 470.
59. van Rijn, P. A. (2019). "Prospects of Next-Generation Vaccines for Bluetongue." Front Vet Sci **6**: 407.
60. Weaver, S. C. and W. K. Reisen (2010). "Present and future arboviral threats." Antiviral Res **85**(2): 328-345.
61. Wichgers Schreur, P. J., et al. (2017). "Four-segmented Rift Valley fever virus-based vaccines can be applied safely in ewes during pregnancy." Vaccine **35**(23): 3123-3128.
62. Wong, Y. C., et al. (2019). "Modified Vaccinia Virus Ankara Can Induce Optimal CD8(+) T Cell Responses to Directly Primed Antigens Depending on Vaccine Design." J Virol **93**(21).
63. Zhugunissov, K., et al. (2015). "Duration of protective immunity after a single vaccination with a live attenuated bivalent bluetongue vaccine." Vet Res Commun **39**(4): 203-210.
64. Ahmad, K. (2000). "More deaths from Rift Valley fever in Saudi Arabia and Yemen." Lancet **356**(9239): 1422.
65. Ahmed Kamal, S. (2011). "Observations on rift valley fever virus and vaccines in Egypt." Virology **43**: 532.
66. Al-Hazmi, M., et al. (2003). "Epidemic Rift Valley fever in Saudi Arabia: a clinical study of severe illness in humans." Clin Infect Dis **36**(3): 245-252.
67. Alpar, O. H., Bramwell, W.V., Veronesi, E., Darpel, E.K., Pastore, P.P., Mertens, P.P.C. (2009). Bluetongue virus vaccines past and present.
68. Andrew, M., et al. (1995). "Antigen specificity of the ovine cytotoxic T lymphocyte response to bluetongue virus." Vet Immunol Immunopathol **47**(3-4): 311-322.
69. Aytakin, I., et al. (2015). "Evaluation of oxidative stress via total antioxidant status, sialic acid, malondialdehyde and RT-PCR findings in sheep affected with bluetongue." Vet Rec Open **2**(1): e000054.
70. Balenghien, T., et al. (2013). "Towards a better understanding of Rift Valley fever epidemiology in the south-west of the Indian Ocean." Vet Res **44**: 78.
71. Barratt-Boyes, S. M. and N. J. MacLachlan (1994). "Dynamics of viral spread in bluetongue virus infected calves." Vet Microbiol **40**(3-4): 361-371.
72. Barratt-Boyes, S. M., et al. (1995). "Response of the regional lymph node to bluetongue virus infection in calves." Vet Immunol Immunopathol **45**(1-2): 73-84.
73. Batra, S. A., et al. (2017). "Immunization of bighorn sheep against Mannheimia haemolytica with a bovine herpesvirus 1-vectored vaccine." Vaccine **35**(12): 1630-1636.
74. Belhouchet, M., et al. (2011). "Detection of a fourth orbivirus non-structural protein." PLoS One **6**(10): e25697.
75. Besselaar, T. G. and N. K. Blackburn (1991). "Topological mapping of antigenic sites on the Rift Valley fever virus envelope glycoproteins using monoclonal antibodies." Arch Virol **121**(1-4): 111-124.
76. Bhanuprakash, V., et al. (2017). "Comparative expression profile of NOD1/2 and certain acute inflammatory cytokines in thermal-stressed cell culture model of native and crossbred cattle." Int J Biometeorol **61**(5): 931-941.
77. Bhattacharya, B., et al. (2007). "Interaction between Bluetongue virus outer capsid protein VP2 and vimentin is necessary for virus egress." Virology **361**: 7.

78. Bird, B. H., et al. (2008). "Rift valley fever virus lacking the NSs and NSm genes is highly attenuated, confers protective immunity from virulent virus challenge, and allows for differential identification of infected and vaccinated animals." J Virol **82**(6): 2681-2691.
79. Bird, B. H., et al. (2009). "Rift Valley fever virus." J Am Vet Med Assoc **234**(7): 883-893.
80. Bird, B. H., et al. (2011). "Rift Valley fever virus vaccine lacking the NSs and NSm genes is safe, nonteratogenic, and confers protection from viremia, pyrexia, and abortion following challenge in adult and pregnant sheep." J Virol **85**(24): 12901-12909.
81. Boone, J. D., et al. (2007). "Recombinant canarypox virus vaccine co-expressing genes encoding the VP2 and VP5 outer capsid proteins of bluetongue virus induces high level protection in sheep." Vaccine **25**(4): 672-678.
82. Boshra, H., et al. (2011). "Rift valley fever: recent insights into pathogenesis and prevention." J Virol **85**(13): 6098-6105.
83. Botros, B., et al. (2006). "Adverse response of non-indigenous cattle of European breeds to live attenuated Smithburn Rift Valley fever vaccine." J Med Virol **78**(6): 787-791.
84. Bouloy, M. and R. Flick (2009). "Reverse genetics technology for Rift Valley fever virus: current and future applications for the development of therapeutics and vaccines." Antiviral Res **84**(2): 101-118.
85. Bouloy, M., et al. (2001). "Genetic evidence for an interferon-antagonistic function of rift valley fever virus nonstructural protein NSs." J Virol **75**(3): 1371-1377.
86. Boyce, M., et al. (2004). "Purified recombinant bluetongue virus VP1 exhibits RNA replicase activity." J Virol **78**(8): 3994-4002.
87. Brodie, S. J., et al. (1998). "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 **72**(7): 5599-5609.
88. Calvo-Pinilla, E., et al. (2018). "The immunogenicity of recombinant vaccines based on modified Vaccinia Ankara (MVA) viruses expressing African horse sickness virus VP2 antigens depends on the levels of expressed VP2 protein delivered to the host." Antiviral Res **154**: 132-139.
89. Calvo-Pinilla, E., et al. (2012). "Multiserotype protection elicited by a combinatorial prime-boost vaccination strategy against bluetongue virus." PLoS One **7**(4): e34735.
90. Calvo-Pinilla, E., et al. (2009). "Establishment of a bluetongue virus infection model in mice that are deficient in the alpha/beta interferon receptor." PLoS One **4**(4): e5171.
91. Calvo-Pinilla, E., et al. (2009). "Heterologous prime boost vaccination with DNA and recombinant modified vaccinia virus Ankara protects IFNAR(-/-) mice against lethal bluetongue infection." Vaccine **28**(2): 437-445.
92. Carroll, S. A., et al. (2011). "Genetic evidence for Rift Valley fever outbreaks in Madagascar resulting from virus introductions from the East African mainland rather than enzootic maintenance." J Virol **85**(13): 6162-6167.
93. Celma, C. C., et al. (2013). "Rapid generation of replication-deficient monovalent and multivalent vaccines for bluetongue virus: protection against virulent virus challenge in cattle and sheep." J Virol **87**(17): 9856-9864.
94. Chakrabarti, S., et al. (1997). "Compact, synthetic, vaccinia virus early/late promoter for protein expression." Biotechniques **23**(6): 1094-1097.
95. Chaudhary, A. and V. Chauhan (2015). "Lactate Dehydrogenase as an indicator of Liver Diseases." J Adv Med Dent Scie Res **3**(5): 20-22.
96. Chevalier, V., et al. (2010). "Rift Valley fever--a threat for Europe?" Euro Surveill **15**(10): 19506.
97. Coetzer, J. A. (1977). "The pathology of Rift Valley fever. I. Lesions occurring in natural cases in new-born lambs." Onderstepoort J Vet Res **44**(4): 205-211.
98. Coetzer, J. A. and K. G. Ishak (1982). "Sequential development of the liver lesions in new-born lambs infected with Rift Valley fever virus. I. Macroscopic and microscopic pathology." Onderstepoort J Vet Res **49**(2): 103-108.
99. Cowley, J. A. and B. M. Gorman (1990). "Effects of proteolytic enzymes on the infectivity, haemagglutinating activity and protein composition of bluetongue virus type 20." Vet Microbiol **22**(2-3): 137-152.

100. Crabtree, M. B., et al. (2012). "Infection and transmission of Rift Valley fever viruses lacking the NSs and/or NSm genes in mosquitoes: potential role for NSm in mosquito infection." PLoS Negl Trop Dis **6**(5): e1639.
101. Dalrymple, J., Hasty SE, Kakach LT, Collett MS. (1989). "Mapping protective determinants of Rift Valley fever virus using recombinant vaccinia viruses." Vaccines 89' Cold Spring Harbor Laboratory; 1989. p. 371–375.
102. Darpel, K. E., et al. (2012). "Involvement of the skin during bluetongue virus infection and replication in the ruminant host." Vet Res **43**: 40.
103. Dauber, B. and T. Wolff (2009). "Activation of the Antiviral Kinase PKR and Viral Countermeasures." Viruses **1**(3): 523-544.
104. Daubney, R. J., Hudson J.R. and Garnham P.C. (1931). "Enzootic hepatitis of Rift Valley Fever: an undescribed virus disease of sheep, cattle and man from East Africa." J. Pathol. Bacteriol. **34**,543-579.
105. Dautu, G., et al. (2012). "Rift Valley fever: Real or perceived threat for Zambia?" Onderstepoort J Vet Res **79**(2): E1-6.
106. de Boer, S. M., et al. (2012). "Heparan sulfate facilitates Rift Valley fever virus entry into the cell." J Virol **86**(24): 13767-13771.
107. de Boer, S. M., et al. (2012). "Acid-activated structural reorganization of the Rift Valley fever virus Gc fusion protein." J Virol **86**(24): 13642-13652.
108. de Mattos, C. C., et al. (1991). "Evidence of genome segment 5 reassortment in bluetongue virus field isolates." Am J Vet Res **52**(11): 1794-1798.
109. Draper, S. J., et al. (2009). "Recombinant viral vaccines expressing merozoite surface protein-1 induce antibody- and T cell-mediated multistage protection against malaria." Cell Host Microbe **5**(1): 95-105.
110. Drew, C. P., et al. (2010). "Bluetongue virus infection alters the impedance of monolayers of bovine endothelial cells as a result of cell death." Vet Immunol Immunopathol **136**(1-2): 108-115.
111. Drexler, I., et al. (2004). "Modified vaccinia virus Ankara as antigen delivery system: how can we best use its potential?" Curr Opin Biotechnol **15**(6): 506-512.
112. Dungu, B., et al. (2010). "Evaluation of the efficacy and safety of the Rift Valley Fever Clone 13 vaccine in sheep." Vaccine **28**(29): 4581-4587.
113. Easterday, B. C. (1965). "Rift valley fever." Adv Vet Sci **10**: 65-127.
114. Eaton, B. T. and G. S. Crameri (1989). "The site of bluetongue virus attachment to glycoporphins from a number of animal erythrocytes." J Gen Virol **70** (Pt 12): 3347-3353.
115. Eaton, B. T., et al. (1990). "The replication of bluetongue virus." Curr Top Microbiol Immunol **162**: 89-118.
116. Enserink, M. (2006). "Emerging infectious diseases. During a hot summer, bluetongue virus invades northern Europe." Science **313**(5791): 1218-1219.
117. Faburay, B., et al. (2016). "Development of a sheep challenge model for Rift Valley fever." Virology **489**: 128-140.
118. Faburay, B., et al. (2012). "A glycoprotein subunit vaccine elicits a strong Rift Valley fever virus neutralizing antibody response in sheep." Vector Borne Zoonotic Dis **14**(10): 746-756.
119. Fafetine, J. M., et al. (2007). "Cloning and expression of Rift Valley fever virus nucleocapsid (N) protein and evaluation of a N-protein based indirect ELISA for the detection of specific IgG and IgM antibodies in domestic ruminants." Vet Microbiol **121**(1-2): 29-38.
120. Fay, P., et al. (2019). "Bluetongue virus outer-capsid protein VP2 expressed in *Nicotiana benthamiana* raises neutralising antibodies and a protective immune response in IFNAR -/- mice." Vaccine: **X** **2**: 100026.
121. Feenstra, F., et al. (2015). "Non-structural protein NS3/NS3a is required for propagation of bluetongue virus in *Culicoides sonorensis*." Parasit Vectors **8**: 476.
122. Feenstra, F., et al. (2015). "Application of bluetongue Disabled Infectious Single Animal (DISA) vaccine for different serotypes by VP2 exchange or incorporation of chimeric VP2." Vaccine **33**(6): 812-818.

123. Feenstra, F. and P. A. van Rijn (2017). "Current and next-generation bluetongue vaccines: Requirements, strategies, and prospects for different field situations." Crit Rev Microbiol **43**(2): 142-155.
124. Ferrari, G., et al. (2005). "Active circulation of bluetongue vaccine virus serotype-2 among unvaccinated cattle in central Italy." Prev Vet Med **68**(2-4): 103-113.
125. Ferron, F., et al. (2011). "The hexamer structure of Rift Valley fever virus nucleoprotein suggests a mechanism for its assembly into ribonucleoprotein complexes." PLoS Pathog **7**(5): e1002030.
126. Fiette, L., et al. (1995). "Theiler's virus infection of 129Sv mice that lack the interferon alpha/beta or interferon gamma receptors." J Exp Med **181**(6): 2069-2076.
127. Flick, R. and M. Bouloy (2005). "Rift Valley fever virus." Curr Mol Med **5**(8): 827-834.
128. Forzan, M., et al. (2007). "Bluetongue virus entry into cells." J Virol **81**(9): 4819-4827.
129. Forzan, M., et al. (2004). "A capsid protein of nonenveloped Bluetongue virus exhibits membrane fusion activity." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(7): 2100-2105.
130. Foster, N. M., et al. (1991). "Temporal relationships of viremia, interferon activity, and antibody responses of sheep infected with several bluetongue virus strains." Am J Vet Res **52**(2): 192-196.
131. Gachohi, J. M., et al. (2016). "Modelling Vaccination Strategies against Rift Valley Fever in Livestock in Kenya." PLoS Negl Trop Dis **10**(12): e0005049.
132. Gargan, T. P., 2nd, et al. (1988). "Vector potential of selected North American mosquito species for Rift Valley fever virus." Am J Trop Med Hyg **38**(2): 440-446.
133. Garry, C. E. and R. F. Garry (2004). "Proteomics computational analyses suggest that the carboxyl terminal glycoproteins of Bunyaviruses are class II viral fusion protein (beta-penitrenes)." Theor Biol Med Model **1**: 10.
134. Gerdes, G. H. (2004). "Rift Valley fever." Rev Sci Tech **23**(2): 613-623.
135. Gerrard, S. R., et al. (2007). "The NSm proteins of Rift Valley fever virus are dispensable for maturation, replication and infection." Virology **359**(2): 459-465.
136. Gerrard, S. R. and S. T. Nichol (2002). "Characterization of the Golgi retention motif of Rift Valley fever virus G(N) glycoprotein." J Virol **76**(23): 12200-12210.
137. Gilbert, S. C. (2013). "Clinical development of Modified Vaccinia virus Ankara vaccines." Vaccine **31**(39): 4241-4246
138. Gold, S., et al. (2010). "A clathrin independent macropinocytosis-like entry mechanism used by bluetongue virus-1 during infection of BHK cells." PLoS One **5**(6): e11360.
139. Gorman, B. M. (1990). "The bluetongue viruses." Curr Top Microbiol Immunol **162**: 1-19.
140. Gouet, P., et al. (1999). "The highly ordered double-stranded RNA genome of bluetongue virus revealed by crystallography." Cell **97**(4): 481-490.
141. Grobelaar, A. A., et al. (2011). "Molecular epidemiology of Rift Valley fever virus." Emerg Infect Dis **17**(12): 2270-2276.
142. Guirakhoo, F., et al. (1995). "Adaptation of bluetongue virus in mosquito cells results in overexpression of NS3 proteins and release of virus particles." Arch Virol **140**(5): 967-974.
143. Habjan, M., et al. (2008). "T7 RNA polymerase-dependent and -independent systems for cDNA-based rescue of Rift Valley fever virus." J Gen Virol **89**(Pt 9): 2157-2166.
144. Habjan, M., et al. (2009). "NSs protein of rift valley fever virus induces the specific degradation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase." J Virol **83**(9): 4365-4375.
145. Han, Z. and R. N. Harty (2004). "The NS3 protein of bluetongue virus exhibits viroporin-like properties." J Biol Chem **279**(41): 43092-43097.
146. Hardy, W. T. and D. A. Price (1952). "Soremuzzle of sheep." J Am Vet Med Assoc **120**(898): 23-25.
147. Hartman, A. (2017). "Rift Valley Fever." Clin Lab Med **37**(2): 285-301.
148. Hassan, S. S. and P. Roy (1999). "Expression and functional characterization of bluetongue virus VP2 protein: role in cell entry." J Virol **73**(12): 9832-9842.
149. Heidner, H. W., et al. (1991). "Genetic variation and evolutionary relationships amongst bluetongue viruses endemic in the United States." Virus Res **21**(2): 91-109.

150. Hemati, B., et al. (2009). "Bluetongue virus targets conventional dendritic cells in skin lymph." *J Virol* **83**(17): 8789-8799.
151. Hoffmann, B., et al. (2008). "Bluetongue virus serotype 8 reemergence in Germany, 2007 and 2008." *Emerg Infect Dis* **14**(9): 1421-1423.
152. Huismans, H. and B. J. Erasmus (1981). "Identification of the serotype-specific and group-specific antigens of bluetongue virus." *Onderstepoort J Vet Res* **48**(2): 51-58.
153. Huismans, H., et al. (1987). "Isolation of a capsid protein of bluetongue virus that induces a protective immune response in sheep." *Virology* **157**(1): 172-179.
154. Huismans, H., et al. (1987). "Uncoating of parental bluetongue virus to core and subcore particles in infected L cells." *Virology* **157**(1): 180-188.
155. Hunter, P., et al. (2002). "Teratogenicity of a mutagenised Rift Valley fever virus (MVP 12) in sheep." *Onderstepoort J Vet Res* **69**(1): 95-98.
156. Hyatt, A. D., et al. (1993). "Release of bluetongue virus-like particles from insect cells is mediated by BTV nonstructural protein NS3/NS3A." *Virology* **193**(2): 592-603.
157. Ikegami, T. (2012). "Molecular biology and genetic diversity of Rift Valley fever virus." *Antiviral Res* **95**(3): 293-310.
158. Ikegami, T. and S. Makino (2009). "Rift valley fever vaccines." *Vaccine* **27 Suppl 4**: D69-72.
159. Ikegami, T. and S. Makino (2011). "The pathogenesis of Rift Valley fever." *Viruses* **3**(5): 493-519.
160. Ikegami, T., et al. (2006). "Rescue of infectious rift valley fever virus entirely from cDNA, analysis of virus lacking the NSs gene, and expression of a foreign gene." *J Virol* **80**(6): 2933-2940.
161. Imam, I. Z., et al. (1979). "An epidemic of Rift Valley fever in Egypt. 2. Isolation of the virus from animals." *Bull World Health Organ* **57**(3): 441-443.
162. Jabbar, T. K., et al. (2013). "Protection of IFNAR (-/-) mice against bluetongue virus serotype 8, by heterologous (DNA/rMVA) and homologous (rMVA/rMVA) vaccination, expressing outer-capsid protein VP2." *PLoS One* **8**(4): e60574.
163. Jameson, P., et al. (1978). "Bluetongue virus, an exceptionally potent interferon inducer in mice." *Infect Immun* **20**(1): 321-323.
164. Johnson, B. K., et al. (1978). "Rift Valley fever in Egypt, 1978." *Lancet* **2**(8092 Pt 1): 745.
165. Jup, P. G., et al. (2002). "The 2000 epidemic of Rift Valley fever in Saudi Arabia: mosquito vector studies." *Med Vet Entomol* **16**(3): 245-252.
166. Katz, J., et al. (1994). "Diagnostic analysis of the prolonged bluetongue virus RNA presence found in the blood of naturally infected cattle and experimentally infected sheep." *J Vet Diagn Invest* **6**(2): 139-142.
167. Keegan, K. and M. S. Collett (1986). "Use of bacterial expression cloning to define the amino acid sequences of antigenic determinants on the G2 glycoprotein of Rift Valley fever virus." *J Virol* **58**(2): 263-270.
168. Kerviel, A., et al. (2019). "Atomic structure of the translation regulatory protein NS1 of bluetongue virus." *Nat Microbiol* **4**(5): 837-845.
169. Kirkland, P. D. and R. A. Hawkes (2004). "A comparison of laboratory and 'wild' strains of bluetongue virus--is there any difference and does it matter?" *Vet Ital* **40**(4): 448-455.
170. Kortekaas, J., et al. (2011). "Creation of a nonspreading Rift Valley fever virus." *J Virol* **85**(23): 12622-12630.
171. Kramer, J. W. a. H., W.E. (1997). *Clinical Biochemistry of Domestic Animals. Clinical Enzymology* J. J. Kaneko, J. W. Harvey and M. L. Bruss. San Diego,
172. London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto.: 303-325. .
173. LaBeaud, A. D., et al. (2015). "Factors associated with severe human Rift Valley fever in Sangailu, Garissa County, Kenya." *PLoS Negl Trop Dis* **9**(3): e0003548.
174. Lagerqvist, N., et al. (2009). "Characterisation of immune responses and protective efficacy in mice after immunisation with Rift Valley Fever virus cDNA constructs." *Virol J* **6**: 6.

175. Legisa, D. M., et al. (2015). "An experimental subunit vaccine based on Bluetongue virus 4 VP2 protein fused to an antigen-presenting cells single chain antibody elicits cellular and humoral immune responses in cattle, guinea pigs and IFNAR(-/-) mice." Vaccine **33**(22): 2614-2619.
176. Listes, E., et al. (2009). "First evidence of bluetongue virus serotype 16 in Croatia." Vet Microbiol **138**(1-2): 92-97.
177. Lopez-Gil, E., et al. (2013). "A single immunization with MVA expressing GnGc glycoproteins promotes epitope-specific CD8⁺-T cell activation and protects immune-competent mice against a lethal RVFV infection." PLoS Negl Trop Dis **7**(7): e2309.
178. Lopez, N., et al. (1995). "The L protein of Rift Valley fever virus can rescue viral ribonucleoproteins and transcribe synthetic genome-like RNA molecules." J Virol **69**(7): 3972-3979.
179. Lorenzo, G., et al. (2018). "Efficacy of different DNA and MVA prime-boost vaccination regimens against a Rift Valley fever virus (RVFV) challenge in sheep 12 weeks following vaccination." Vet Res **49**(1): 21.
180. Lorenzo, G., et al. (2015). "Understanding Rift Valley fever: contributions of animal models to disease characterization and control." Mol Immunol **66**(1): 78-88.
181. Lorenzo, G., et al. (2010). "Protection against lethal Rift Valley fever virus (RVFV) infection in transgenic IFNAR(-/-) mice induced by different DNA vaccination regimens." Vaccine **28**(17): 2937-2944.
182. Lozach, P. Y., et al. (2011). "DC-SIGN as a receptor for phleboviruses." Cell Host Microbe **10**(1): 75-88.
183. Lozach, P. Y., et al. (2010). "Entry of bunyaviruses into mammalian cells." Cell Host Microbe **7**(6): 488-499.
184. Ly, H. J. and T. Ikegami (2016). "Rift Valley fever virus NSs protein functions and the similarity to other bunyavirus NSs proteins." Virol J **13**: 118.
185. MacLachlan, N. J. (1994). "The pathogenesis and immunology of bluetongue virus infection of ruminants." Comp Immunol Microbiol Infect Dis **17**(3-4): 197-206.
186. MacLachlan, N. J., et al. (2008). "Experimental reproduction of severe bluetongue in sheep." Vet Pathol **45**(3): 310-315.
187. Maclachlan, N. J., et al. (2009). "The pathology and pathogenesis of bluetongue." J Comp Pathol **141**(1): 1-16.
188. MacLachlan, N. J., et al. (1990). "The pathogenesis of experimental bluetongue virus infection of calves." Vet Pathol **27**(4): 223-229.
189. Madani, T. A., et al. (2003). "Rift Valley fever epidemic in Saudi Arabia: epidemiological, clinical, and laboratory characteristics." Clin Infect Dis **37**(8): 1084-1092.
190. Mahrt, C. R. and B. I. Osburn (1986). "Experimental bluetongue virus infection of sheep; effect of vaccination: pathologic, immunofluorescent, and ultrastructural studies." Am J Vet Res **47**(6): 1198-1203.
191. Makoschey, B., et al. (2016). "Rift Valley Fever Vaccine Virus Clone 13 Is Able to Cross the Ovine Placental Barrier Associated with Foetal Infections, Malformations, and Stillbirths." PLoS Negl Trop Dis **10**(3): e0004550.
192. Mandell, R. B., et al. (2010). "A replication-incompetent Rift Valley fever vaccine: chimeric virus-like particles protect mice and rats against lethal challenge." Virology **397**(1): 187-198.
193. Marin-Lopez, A., et al. (2016). "Pathological Characterization Of IFNAR(-/-) Mice Infected With Bluetongue Virus Serotype 4." Int J Biol Sci **12**(12): 1448-1460.
194. Marin-Lopez, A., et al. (2017). "Microspheres-prime/rMVA-boost vaccination enhances humoral and cellular immune response in IFNAR(-/-) mice conferring protection against serotypes 1 and 4 of bluetongue virus." Antiviral Res **142**: 55-62.
195. Marin-Lopez, A., et al. (2018). "CD8 T Cell Responses to an Immunodominant Epitope within the Nonstructural Protein NS1 Provide Wide Immunoprotection against Bluetongue Virus in IFNAR(-/-) Mice." J Virol **92**(16).

196. Marin-Lopez, A. and J. Ortego (2016). "Generation of Recombinant Modified Vaccinia Virus Ankara Encoding VP2, NS1, and VP7 Proteins of Bluetongue Virus." Methods Mol Biol **1349**: 137-150.
197. Marin-Lopez, A., et al. (2014). "VP2, VP7, and NS1 proteins of bluetongue virus targeted in avian reovirus muNS-Mi microspheres elicit a protective immune response in IFNAR(-/-) mice." Antiviral Res **110**: 42-51.
198. Matsuo, E., et al. (2011). "Generation of replication-defective virus-based vaccines that confer full protection in sheep against virulent bluetongue virus challenge." J Virol **85**(19): 10213-10221.
199. McKercher, D. G., et al. (1953). "A preliminary report on the isolation and identification of the bluetongue virus from sheep in California." J Am Vet Med Assoc **122**(913): 300-301.
200. Meier, R., et al. (2012). "[DC-SIGN, a receptor for phlebovirus]." Med Sci (Paris) **28**(1): 16-18.
201. Mertens, P. P., et al. (1984). "Assignment of the genome segments of bluetongue virus type 1 to the proteins which they encode." Virology **135**(1): 207-217.
202. Mertens, P. P. and J. Diprose (2004). "The bluetongue virus core: a nano-scale transcription machine." Virus Res **101**(1): 29-43.
203. Mertens, P. P. C., et al. (2007). "Design of primers and use of RT-PCR assays for typing European bluetongue virus isolates: differentiation of field and vaccine strains." Journal of General Virology **88**(10): 2811-2823.
204. Meyer, D. J. and J. W. Harvey (1998). Evaluation of hepatobiliary system and skeletal muscle and lipid disorders. Veterinary Laboratory Medicine. Interpretation and Diagnosis. D. J. Meyer and J. W. Harvey, Saunders company Philadelphia: 157-187.
205. Mintiens, K., et al. (2008). "Possible routes of introduction of bluetongue virus serotype 8 into the epicentre of the 2006 epidemic in north-western Europe." Prev Vet Med **87**(1-2): 131-144.
206. Modrof, J., et al. (2005). "Phosphorylation of bluetongue virus nonstructural protein 2 is essential for formation of viral inclusion bodies." J Virol **79**(15): 10023-10031.
207. Mohd Jaafar, F., et al. (2014). "Immunisation with bacterial expressed VP2 and VP5 of bluetongue virus (BTV) protect α/β interferon-receptor knock-out (IFNAR $^{-/-}$) mice from homologous lethal challenge." Vaccine **32**(32): 4059-4067.
208. Muller, R., et al. (1995). "Characterization of clone 13, a naturally attenuated avirulent isolate of Rift Valley fever virus, which is altered in the small segment." Am J Trop Med Hyg **53**(4): 405-411.
209. Mundel, B. and J. Gear (1951). "Rift valley fever; I. The occurrence of human cases in Johannesburg." S Afr Med J **25**(44): 797-800.
210. Nanyingi, M. O., et al. (2015). "A systematic review of Rift Valley Fever epidemiology 1931-2014." Infect Ecol Epidemiol **5**: 28024.
211. Naslund, J., et al. (2009). "Vaccination with virus-like particles protects mice from lethal infection of Rift Valley Fever Virus." Virology **385**(2): 409-415.
212. Nason, E. L., et al. (2004). "Interactions between the inner and outer capsids of bluetongue virus." J Virol **78**(15): 8059-8067.
213. Niklasson, B. S., et al. (1984). "Active and passive immunization against Rift Valley fever virus infection in Syrian hamsters." Acta Pathol Microbiol Immunol Scand C **92**(4): 197-200.
214. Njenga, M. K., et al. (2015). "Randomized controlled field trial to assess the immunogenicity and safety of rift valley fever clone 13 vaccine in livestock." PLoS Negl Trop Dis **9**(3): e0003550.
215. Oberst, R. D., et al. (1987). "Genetic reassortment of bluetongue virus serotype 11 strains in the bovine." Vet Microbiol **15**(1-2): 11-18.
216. Odendaal, L., et al. (2019). "Lesions and Cellular Tropism of Natural Rift Valley Fever Virus Infection in Adult Sheep." Vet Pathol **56**(1): 61-77.
217. Oreshkova, N., et al. (2014). "Evaluation of nonspreading Rift Valley fever virus as a vaccine vector using influenza virus hemagglutinin as a model antigen." Vaccine **32**(41): 5323-5329.

218. Oreshkova, N., et al. (2015). "Preliminary Evaluation of a Bunyavirus Vector for Cancer Immunotherapy." *J Virol* **89**(17): 9124-9127.
219. Ortego, J., et al. (2014). "Interferon alpha/beta receptor knockout mice as a model to study bluetongue virus infection." *Virus Res* **182**: 35-42.
220. Overby, A. K., et al. (2007). "The glycoprotein cytoplasmic tail of Uukuniemi virus (Bunyaviridae) interacts with ribonucleoproteins and is critical for genome packaging." *J Virol* **81**(7): 3198-3205.
221. Owens, R. J., et al. (2004). "Role of an arbovirus nonstructural protein in cellular pathogenesis and virus release." *J Virol* **78**(12): 6649-6656.
222. Parker, J., et al. (1975). "An experimental inactivated vaccine against bluetongue." *Vet Rec* **96**(13): 284-287.
223. Pascall, D. J., et al. (2020). "'Frozen evolution" of an RNA virus suggests accidental release as a potential cause of arbovirus re-emergence." *PLoS Biol* **18**(4): e3000673.
224. Pepin, M., et al. (2010). "Rift Valley fever virus(Bunyaviridae: Phlebovirus): an update on pathogenesis, molecular epidemiology, vectors, diagnostics and prevention." *Vet Res* **41**(6): 61.
225. Perrin, A., et al. (2007). "Recombinant capripoxviruses expressing proteins of bluetongue virus: evaluation of immune responses and protection in small ruminants." *Vaccine* **25**(37-38): 6774-6783.
226. Pfeffer, M. and G. Dobler (2010). "Emergence of zoonotic arboviruses by animal trade and migration." *Parasit Vectors* **3**(1): 35.
227. Pretorius, A., et al. (1997). "Rift Valley fever virus: a seroepidemiologic study of small terrestrial vertebrates in South Africa." *Am J Trop Med Hyg* **57**(6): 693-698.
228. Rajcani, J., et al. (2005). "Current developments in viral DNA vaccines: shall they solve the unsolved?" *Rev Med Virol* **15**(5): 303-325.
229. Ramakrishnan, M. A., et al. (2006). "Immune responses and protective efficacy of binary ethylenimine (BEI)-inactivated bluetongue virus vaccines in sheep." *Vet Res Commun* **30**(8): 873-880.
230. Rao, P. P., et al. (2017). Bluetongue : Aetiology, Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis and Control. *Emerging and Re-emerging Infectious Diseases of Livestock*. J. Bayry.
231. Ratnier, M., et al. (2011). "Identification and characterization of a novel non-structural protein of bluetongue virus." *PLoS Pathog* **7**(12): e1002477
232. Reguera, J., et al. (2010). "Bunyaviridae RNA polymerases (L-protein) have an N-terminal, influenza-like endonuclease domain, essential for viral cap-dependent transcription." *PLoS Pathog* **6**(9): e1001101.
233. Richards, R. G., et al. (1988). "Comparison of virologic and serologic responses of lambs and calves infected with bluetongue virus serotype 10." *Vet Microbiol* **18**(3-4): 233-242.
234. Roger, M., et al. (2014). "Evidence for circulation of the rift valley fever virus among livestock in the union of Comoros." *PLoS Negl Trop Dis* **8**(7): e3045.
235. Roy, P., et al. (1990). "Recombinant virus vaccine for bluetongue disease in sheep." *J Virol* **64**(5): 1998-2003.
236. Saegerman, C., et al. (2008). "Bluetongue epidemiology in the European Union." *Emerg Infect Dis* **14**(4): 539-544.
237. Sall, A. A., et al. (1999). "Genetic reassortment of Rift Valley fever virus in nature." *J Virol* **73**(10): 8196-8200.
238. Saluzzo, J. F., et al. (1987). "Focus of Rift Valley fever virus transmission in southern Mauritania." *Lancet* **1**(8531): 504.
239. Saluzzo, J. F. and J. F. Smith (1990). "Use of reassortant viruses to map attenuating and temperature-sensitive mutations of the Rift Valley fever virus MP-12 vaccine." *Vaccine* **8**(4): 369-375.
240. Samal, S. K., et al. (1987). "Analysis of mixed infection of sheep with bluetongue virus serotypes 10 and 17: evidence for genetic reassortment in the vertebrate host." *J Virol* **61**(4): 1086-1091.
241. Sanchez-Puig, J. M., et al. (2012). "Isolation of recombinant MVA using F13L selection." *Methods Mol Biol* **890**: 93-111.

242. Savini, G., et al. (2009). "Assessment of efficacy of a bivalent BTV-2 and BTV-4 inactivated vaccine by vaccination and challenge in cattle." *Vet Microbiol* **133**(1-2): 1-8.
243. Schwartz-Cornil, I., et al. (2008). "Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity." *Vet Res* **39**(5): 46.
244. Sissoko, D., et al. (2009). "Rift Valley fever, Mayotte, 2007-2008." *Emerg Infect Dis* **15**(4): 568-570.
245. Smithburn, K. C. (1949). "Rift Valley fever; the neurotropic adaptation of the virus and the experimental use of this modified virus as a vaccine." *Br J Exp Pathol* **30**(1): 1-16.
246. Sobharani, V., et al. (2019). "Comparative study on hemato-biochemical alterations and selected acute phase protein response in native sheep experimentally infected with bluetongue virus serotypes 10 and 24. ." *Comp Clin Pathol* **28**: 1153–1163
247. Spreull, J. (1905). "Malarial catarrhal fever (bluetongue) of sheep in South Africa." *J. Comp Pathol Ther.* **18**: 321-337.
248. Stewart, M., et al. (2015). "Characterization of a second open reading frame in genome segment 10 of bluetongue virus." *J Gen Virol* **96**(11): 3280-3293.
249. Sutton, G., et al. (2007). "Bluetongue virus VP4 is an RNA-capping assembly line." *Nat Struct Mol Biol* **14**(5): 449-451.
250. Svajger, U., et al. (2010). "C-type lectin DC-SIGN: an adhesion, signalling and antigen-uptake molecule that guides dendritic cells in immunity." *Cell Signal* **22**(10): 1397-1405.
251. Swanepoel, R. and N. K. Blackburn (1977). "Demonstration of nuclear immunofluorescence in Rift Valley fever infected cells." *J Gen Virol* **34**(3): 557-561.
252. Toussaint, J. F., et al. (2006). "Bluetongue in northern Europe." *Vet Rec* **159**(10): 327.
253. Turell, M. J., et al. (1990). "Generation and transmission of Rift Valley fever viral reassortants by the mosquito *Culex pipiens*." *J Gen Virol* **71** (Pt 10): 2307-2312.
254. Urakawa, T., et al. (1994). "Synthesis of recombinant baculoviruses expressing the outer capsid protein VP2 of five BTV serotypes and the induction of neutralizing antibodies to homologous and heterologous BTV serotypes." *Virus Res* **31**(2): 149-161.
255. Utrilla-Trigo, S., et al. (2020). "Heterologous Combination of ChAdOx1 and MVA Vectors Expressing Protein NS1 as Vaccination Strategy to Induce Durable and Cross-Protective CD8+ T Cell Immunity to Bluetongue Virus." *Vaccines (Basel)* **8**(3).
256. Van der Lugt, J. J., et al. (1996). "Distribution of viral antigen in tissues of new-born lambs infected with Rift Valley fever virus." *Onderstepoort J Vet Res* **63**(4): 341-347.
257. van Gennip, R. G. P., et al. (2019). "Vector competence is strongly affected by a small deletion or point mutations in bluetongue virus." *Parasit Vectors* **12**(1): 470.
258. van Rijn, P. A. (2019). "Prospects of Next-Generation Vaccines for Bluetongue." *Front Vet Sci* **6**: 407.
259. Veronesi, E., et al. (2010). "Viraemia and clinical disease in Dorset Poll sheep following vaccination with live attenuated bluetongue virus vaccines serotypes 16 and 4." *Vaccine* **28**(5): 1397-1403.
260. Verwoerd, G. R. and G. S. Gebhardt (2004). "Group A beta-haemolytic streptococcal toxic shock syndrome presenting as suspected ileo-femoral thrombosis in the puerperium." *J Obstet Gynaecol* **24**(8): 934.
261. Volz, A., et al. (2015). "Protective Efficacy of Recombinant Modified Vaccinia Virus Ankara Delivering Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Glycoprotein." *J Virol* **89**(16): 8651-8656.
262. von Teichman, B., et al. (2011). "Safety and efficacy of Rift Valley fever Smithburn and Clone 13 vaccines in calves." *Vaccine* **29**(34): 5771-5777.
263. Wallace, D. B., et al. (2006). "Protective immune responses induced by different recombinant vaccine regimes to Rift Valley fever." *Vaccine* **24**(49-50): 7181-7189.
264. Warimwe, G. M., et al. (2016). "Chimpanzee Adenovirus Vaccine Provides Multispecies Protection against Rift Valley Fever." *Sci Rep* **6**: 20617.
265. Warimwe, G. M., et al. (2013). "Immunogenicity and efficacy of a chimpanzee adenovirus-vectored Rift Valley Fever vaccine in mice." *Virology* **10**(1): 349.
266. Weaver, S. C. and W. K. Reisen (2010). "Present and future arboviral threats." *Antiviral Res* **85**(2): 328-345.

267. Wichgers Schreur, P. J., et al. (2017). "Four-segmented Rift Valley fever virus-based vaccines can be applied safely in ewes during pregnancy." *Vaccine* **35**(23): 3123-3128.
268. Wichgers Schreur, P. J., et al. (2016). "Co-housing of Rift Valley Fever Virus Infected Lambs with Immunocompetent or Immunosuppressed Lambs Does Not Result in Virus Transmission." *Front Microbiol* **7**: 287.
269. Wilson, A., et al. (2008). "Where does bluetongue virus sleep in the winter?" *PLoS Biol* **6**(8): e210.
270. Won, S., et al. (2006). "NSm and 78-kilodalton proteins of Rift Valley fever virus are nonessential for viral replication in cell culture." *J Virol* **80**(16): 8274-8278.
271. Won, S., et al. (2007). "NSm protein of Rift Valley fever virus suppresses virus-induced apoptosis." *J Virol* **81**(24): 13335-13345.
272. Worwa, G., et al. (2010). "Virological and pathological findings in Bluetongue virus serotype 8 infected sheep." *Vet Microbiol* **144**(3-4): 264-273.
273. Wuerth, J. D. and F. Weber (2016). "Phleboviruses and the Type I Interferon Response." *Viruses* **8**(6).
274. Xu, W., et al. (2013). "The nucleocapsid protein of Rift Valley fever virus is a potent human CD8+ T cell antigen and elicits memory responses." *PLoS One* **8**(3): e59210.
275. Zamoto-Niikura, A., et al. (2009). "Rift valley fever virus L protein forms a biologically active oligomer." *J Virol* **83**(24): 12779-12789.
276. Zhugunisso, K., et al. (2015). "Duration of protective immunity after a single vaccination with a live attenuated bivalent bluetongue vaccine." *Vet Res Commun* **39**(4): 203-210.

1 **Recombinant Rift Valley fever viruses encoding bluetongue virus (BTV):**
2 **immunity and efficacy studies upon a BTV-4 challenge.**

3 **Sandra Moreno¹, Eva Calvo-Pinilla¹, Stephanie Devignot², Friedemann Weber², Javier Ortego^{1*}**
4 **and Alejandro Brun^{1*}**

5 ¹Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA). Instituto Nacional de Investigación y
6 Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). Valdeolmos (Madrid). Spain

7 ²Institute for Virology, FB10-Veterinary Medicine, Justus-Liebig University, D-35392 Giessen,
8 Germany

9 *Corresponding author(s)

10 E-mail: brun@inia.es (AB); ortego@inia.es (JO)

11 Short title: Recombinant Rift Valley fever virus encoding BTV antigens

12 **Abstract**

13 Background: Many ruminant diseases of viral aetiology can be effectively prevented using
14 appropriate vaccination measures. For diseases such as Rift Valley fever (RVF) the long inter-
15 epizootic periods make routine vaccination programs unfeasible. Coupling RVF prophylaxis
16 with seasonal vaccination programmes by means of multivalent vaccine platforms would help to
17 reduce the risk of new RVF outbreaks.

18 Methodology / Principal Findings: In this work we generated recombinant attenuated Rift
19 Valley fever viruses (RVFVs) encoding in place of the virulence factor NSs either the VP2
20 capsid protein or a truncated form of the non-structural NS1 protein of bluetongue virus
21 serotype 4 (BTV-4). The recombinant viruses were able to carry and express the heterologous
22 BTV genes upon consecutive passages in cell cultures. In murine models, a single immunization
23 was sufficient to protect mice upon RVFV challenge and to elicit a specific immune response
24 against BTV-4 antigens that was fully protective after a BTV-4 boost. In sheep, a natural host
25 for RVFV and BTV, both vaccines proved immunogenic although conferred only partial
26 protection after a virulent BTV-4 reassortant Morocco strain challenge.

27 Conclusions/Significance: Though additional optimization will be needed to improve the
28 efficacy data against BTV in sheep our findings warrant further developments of attenuated
29 RVFV as a dual vaccine platform carrying heterologous immune relevant antigens for ruminant
30 diseases in RVF risk areas.

31 **Author summary**

32 Live attenuated Rift Valley fever (RVF) vaccines constitute a reliable intervention measure to
33 reduce the burden of the disease in endemic countries. In this work we report the generation of
34 attenuated Rift Valley fever virus (RVFV) that express vaccine antigens of bluetongue virus
35 (BTV) instead of the virulence factor NSs. The recombinant viruses were able to induce
36 protective immune responses against both RVFV and BTV when administered as vaccines in
37 mice and sheep respectively. Though further optimization is needed to enhance the level of
38 protection in sheep, these results demonstrate the potential of attenuated RVFV as a vaccine
39 vector for other ruminant diseases, in this case enabling bluetongue vaccination while
40 immunizing against RVF. Since RVF outbreaks are sporadic events, preventive vaccination is
41 often not perceived as a real need. In such scenario a bivalent vaccine strategy would make RVF
42 vaccination more appealing.

43 **Introduction**

44 Rift Valley fever virus (RVFV) is a mosquito-borne pathogen causing severe disease
45 outbreaks affecting humans and livestock in sub-Saharan Africa, Egypt, Yemen, Saudi Arabia
46 and the Indian Ocean islands [1]. In Africa, the re-emergence of Rift Valley fever (RVF) is
47 usually associated to heavy rainfall seasons favoring overgrowth of mosquito species capable to
48 transmit the virus trans-ovarially. It has been proposed that the virus is able to resist desiccation
49 for long periods within mosquito eggs, which hatch upon flooding starting a new infectious
50 cycle [2, 3]. RVFV belongs to the Phlebovirus genus from the *Phenuiviridae* family, Order
51 Bunyavirales. It is an enveloped, single-stranded RNA virus with a segmented genome of
52 negative and ambisense polarity [4]. The virus particles contain three genomic RNA segments:

53 the L (large) segment encodes the viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp); the M
54 (medium) segment codes for a polyprotein precursor that is further processed into two surface
55 glycoproteins (Gn and Gc), a 13-14kDa non-structural protein (NSm) that has been shown to
56 play a role in the suppression of apoptosis in infected cells [5], and a 78kDa polypeptide
57 (comprising NSm and Gn sequences) that is incorporated into virions produced in infected
58 insect cells [6]; the S (small) segment encodes in an ambisense orientation the viral
59 nucleoprotein N and the non-structural protein NSs, considered a virulence factor responsible of
60 host general transcription suppression, the suppression of antiviral interferon (IFN)- β gene
61 activation and the facilitation of viral translation [7, 8]. The NSs protein is not essential for virus
62 replication. In fact, natural NSs deletion mutants were found with an attenuated or avirulent
63 phenotype [9] due to the presence of an activated IFN system [7, 8]. One of these NSs deletion
64 mutants, Clone 13, constitutes a live attenuated vaccine derivative considered now as a
65 promising control measure in African countries. In spite of the availability of effective RVF
66 vaccines in Africa, the sporadic, often unpredictable, RVF outbreaks after long inter-epizootic
67 periods makes annual vaccination programs difficult to be established. A potential strategy to
68 overcome this problem would be the use of multivalent vaccines that could provide immunity
69 against a prevalent disease for which vaccination is mandatory while immunizing against other
70 diseases of more sporadic nature.

71 Bluetongue (BT) is a viral hemorrhagic disease of ruminants, causing high morbidity and
72 mortality, highly prevalent in tropical and subtropical regions coinciding with the presence of
73 competent *Culicoides* vectors [10]. Bluetongue virus (BTV) outbreaks have been reported in
74 several European, Asian and American countries and is considered an endemic disease in
75 temperate settings with established vector populations. BTV is an Orbivirus that belongs to the
76 *Reoviridae* family. The BTV genome consists of ten linear dsRNA segments that encode seven
77 structural and five non-structural (NS) proteins [11-13]. The outer VP2 capsid protein is the
78 main target for virus neutralizing antibodies [14] whereas the non-structural NS1 protein
79 contains epitopes associated with both cellular and humoral responses [15]. Effective control of

80 BT relies in vaccination campaigns against the prevalent or seasonal BTV serotype using
81 available modified-live and inactivated vaccines, although these types of vaccines still offer
82 opportunities for improvement [16].

83 Reverse genetics allowed to rescue RVFV entirely from cDNA [17-19]. RVF viruses with
84 modified genomes lacking non-structural virus genes constitute now relevant vaccine candidates
85 [20-27]. The possibility of manipulating the RVFV genome by means of reverse genetic
86 systems brought also an opportunity for generating attenuated RVFV that encode and express
87 heterologous genes [28]. In this work, using our reverse genetics system [19], we generated
88 recombinant RVFV able to express either a truncated BTV-4 NS1 protein (amino acids 1 to
89 270) or the VP2 capsid antigen. The recombinant viruses were characterized phenotypically and
90 tested for their ability to induce protective immune responses against both RVFV and BTV
91 antigens in mice and sheep as well. Our data strongly supports the feasibility of using RVFV as
92 a viral vaccine vector for ruminants; in this example enabling vaccination against a prevalent
93 bluetongue disease while immunizing against Rift Valley fever.

94 **Methods**

95 **Viruses and cells**

96 The cell lines used for this study were HEK293T (human embryonic kidney 293 cells, ATCC
97 CRL-3216), Vero (African green monkey kidney cells, ATCC CCL-81) and BHK-21 (baby
98 hamster kidney fibroblasts, ATCC CCL-10). All cell lines were grown in Dulbecco's modified
99 Eagle medium (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-
100 glutamine, 1% 100X non-essential amino acids, 100 U/ml penicillin/100 µg/ml streptomycin.
101 All cells were incubated at 37° C in the presence of 5% CO₂. BTV serotype 4 Morocco strain
102 MOR2009/09 (BTV-4M) [29], BTV serotype 4 SPA2004/02 (BTV-4), RVFV strain 56/74 and
103 RVFV-MP-12 viruses were used in the experiments.

104 **Mice**

105 Type-I interferon receptor defective mice (IFNAR^{-/-}) on a 129 Sv/Ev background (A129), wild-
106 type 129 Sv/Ev and BALB/C were used for the in vivo studies. Mice were housed in biosafety
107 level 3 (BSL-3) animal facilities at INIA-CISA before use. All experiments with live animals
108 were performed under EC guidelines (86/609) upon approval by the Ethical Review and Animal
109 Care Committees of INIA and Comunidad de Madrid (permit number: PROEX 037/15).

110 **Plasmid construction**

111 Plasmids pI.18_RVFFV_L, pI.18_RVFFV_N, pHH21_RVFFV_vL, pHH21_RVFFV_vM,
112 pHH21_RVFFV_vN_GFP and pHH21-RVFFV-vN_TCS were previously described [19].
113 Plasmids pHH21-RVFFV-vN-VP2, pHH21-RVFFV-vN-NS1, and pHH21-RVFFV-vN-
114 NS1NtV5tag were derived from pHH21-RVFFV-vN_TCS. The heterologous sequences were
115 inserted into the TCS (tandem cloning site) region via two *AarI* restriction sites that generate
116 NcoI/XhoI-compatible ends (Fig 1A).

117 The sequences of the BTV-4 heterologous genes were amplified by PCR from pcDNA3-VP2
118 using primer pairs (Supplemental Table S1) VP2_NcoI_fwd and VP2_XhoI_rev or from
119 pSC11-NS1 using primer pairs NS1_NcoI_fwd and NS1_XhoI_rev (for the generation of
120 pHH21-RVFFV-vN-NS1) and NS1_NcoI_fwd and NS1Nt_XhoI_rev (for the generation of
121 pHH21-RVFFV-vN-NS1Nt) (Fig 1B). The NS1 gene has a *XhoI* site that had to be removed in
122 order to be inserted into the TCS. This *XhoI* site was removed from pSC11-NS1 by PCR using
123 primer pairs NS1_fw_GxC and NS1_rev_GxC. The generation of the pHH21-RVFFV-vN-
124 NS1NtV5tag was carried out using the pSC11-NS1 that had been already modified to remove
125 the *XhoI* site, using primer pairs NS1Nt_V5tag_fwd and NS1Nt_V5tag_rev to insert the V5tag
126 epitope at the C-terminus of NS1Nt.

127 **Rescue of recombinant rRVFFVs expressing heterologous BTV antigens**

128 To recover recombinant RVFFV with the pol I/II rescue system [19], HEK293 and BHK-21 cells
129 were seeded in a 1:1 ratio in six-well plates. Semi-confluent layers of co-cultured cells were
130 transfected with 1 µg each of pHH21-RVFFV-vL, pHH21-RVFFV-vM, pHH21-RVFFV-vN_GFP

131 pHH21-RVFFV-vN-VP2 pHH21-RVFFV-vN-NS1Nt and with 0.5 µg of pI.18-RVFFV-L and
132 pI.18-RVFFV-N using 13.5 µL of Lipofectamine 3000 (Invitrogen). The supernatants of
133 transfected cells were harvested on day 3, 5 and 7 post-transfection. To screen for the presence
134 of recombinant virus, Vero cells grown in six-well plates were inoculated with 500 µL of each
135 supernatants. CPE detection, GFP expression or immunofluorescence with specific antibodies at
136 4 days post-infection (dpi) indicated the presence of recombinant virus. As a positive control,
137 the parental rZH548 virus was also rescued. Rescued viruses were further propagated in cell
138 cultures. At post-transfection passage 2, the presence of rescued virus was confirmed by plaque
139 assay on Vero cell cultures and the virus encoding VP2 transgene was plaque purified twice.
140 Further two passages were performed to generate a virus stock for the present experiments.

141 **Plaque assay**

142 Vero cells grown in 12-well plates were inoculated with ten-fold serial dilutions of supernatants
143 from infected cells in DMEM with 10% FCS. After 1 h incubation at 37°C, the inoculum was
144 removed and cells were overlaid with EMEM-carboxymethylcellulose semi-solid medium and
145 further incubated for 72-96 h at 37°C with rZH548ΔNSs::GFP, rZH548ΔNSs::VP2_{BTv-4} or 5
146 days at 37°C for rZH548ΔNSs::NS1Nt_{BTv-4}. Cells were fixed with 10% formaldehyde, stained
147 with 2% crystal violet and titres were calculated from the plaque numbers obtained for each
148 dilution.

149 **In vitro expression analysis of heterologous genes**

150 In order to verify the expression of the heterologous genes, Vero cells were infected with each
151 recombinant virus. At 48 hours post-infection cells were fixed with 1:1 methanol-acetone
152 solution and incubated 20 minutes at -20°C. Methanol-acetone was removed and PBS-FCS 20%
153 added and incubated for one hour at room temperature. After washing once with PBS the
154 primary antibody was added (diluted 1:200 in PBS-FCS 20% for serum and 1:500 for
155 monoclonal antibody). A polyclonal mouse serum was used for the detection of VP2 [30], a
156 mouse monoclonal antibody against the V5tag (Bio-Rad) was used for the detection of NS1Nt

157 and a polyclonal rabbit anti-RVFPV serum [31] was used for the detection of RVFPV proteins.
158 Primary antibodies were incubated for one hour at 37°C or 4°C overnight. After incubation with
159 the primary antibody, cells were washed three times with PBS-T (PBS with 0.05% Tween-20)
160 and incubated for 30 min at room temperature with goat anti-mouse Alexa Fluor 488 or goat
161 anti-rabbit Alexa Fluor 594 (Thermo), followed again by three PBS-T washes .

162 For western blot analysis, monolayers of Vero cells were infected with rZH548-ΔNSs::VP2_{BTV-4}
163 or rZH548-ΔNSs::NS1Nt_{BTV-4}. After 24 hours, cells were washed twice with PBS and lysed in
164 SDS-PAGE sample buffer. Samples were analysed by SDS-PAGE in reducing conditions.
165 Proteins were transferred to nitrocellulose membrane (Whatmann). The membrane was
166 incubated for one hour with 5% skimmed milk in Tris buffered saline (TBS). Upon blocking,
167 anti-V5 epitope mAb or the 2B1 anti-RVFPV-N mAb (unpublished) were added diluted 1:1000
168 in 5% milk-TBS-T (TBS with 0.05% Twen-20) and incubated at 4°C overnight. The membranes
169 were then washed three times with TBS-T and incubated for 1 hour at room temperature with an
170 anti-mouse IgG-HRPO conjugated antibody. The membrane was washed again three times with
171 TBS-T before adding luminescent substrate (ECL-GE Healthcare). Gel images were visualized
172 using a Chemidoc apparatus (Bio-Rad).

173 For immunoprecipitation analysis monolayers of Vero cells were infected with rZH548-
174 ΔNSs::VP2_{BTV-4}, rZH548-ΔNSs::NS1Nt_{BTV-4}, BTV-4 or MP12 virus. At 24 hpi the inoculum
175 was removed and 200μCi of [S35]-Methionine-Cysteine solution (Thermo) in Met-Cys free
176 medium were added to each well. 24 hours later the cells were lysed in radio-
177 immunoprecipitation assay (RIPA) buffer and frozen at -80°C until use. Protein-G beads
178 (Invitrogen) were incubated with rotation with 15 μl of a mouse anti-BTV-4 NS1/VP2/VP7
179 serum [32] in a final volume of 200 μl of PBS for 1 hour at room temperature. The bead-Ab
180 immunocomplexes were washed once with PBS-T and then 250μl of the radiolabelled lysate
181 were added and incubated with rotation overnight at 4°C. Upon three additional washes,
182 Laemmli buffer was added and the samples boiled for 5 minutes. The immunocomplexes were
183 then separated by 12% SDS-PAGE. Fixed gels were subjected to fluorographic enhancement

184 using Amplify solution (Amersham). Dried gels were exposed to X-ray films for several hours
185 and developed.

186 **RT-qPCR assays**

187 Mouse blood samples were collected at specific times upon challenge and RNA was extracted
188 using a RNA virus extraction kit (Speedtools, 180 Biotools BM). A real-time RT-qPCR specific
189 for BTV segment 5 and or RVFV L-segment were performed as described [33][34]. To
190 establish a correspondence between Cq values and plaque forming units (pfus), blood samples
191 from naïve mice were spiked with 10^1 to 10^5 pfus of either BTV-4 or RVFV and RNA was
192 extracted for RT-qPCR as above.

193 **Analysis of genetic stability**

194 Vero cell supernatants upon a first, second, third and fourth serial passages of each recombinant
195 virus were titrated and used to infect Vero cell monolayers using a MOI of 1. 72 hours later
196 supernatants were collected and RNA extracted using a RNA virus extraction kit as above.
197 Superscript IV (Thermo) was used for reverse transcription of RNA from rZH-548-
198 Δ NSs::VP2_{BTV-4} infection using a genomic S-segment specific primer. The resulting cDNA was
199 amplified by PCR using primer pairs for the nucleoprotein N gene and the heterologous VP2
200 gene (Supplemental Table 1). RNA extracted from ZH548- Δ NSs::NS1N_{tBTV-4} infected cell
201 culture supernatants was used to perform one-step real time-PCR with primer pairs specific for
202 the NS1 gene and the L segment of RVFV as described elsewhere [15, 35]. In this case the
203 amplification products were detected using Taqman 5' FAM probes (Supplemental Table 1).

204 **ELISA**

205 ELISA plates were coated overnight at 4°C with the antigen of interest (either BTV-4 infected
206 cell lysates or purified recombinant RVFV-N protein) diluted in carbonate/bicarbonate buffer,
207 pH 9.6. After blocking at 37°C with 5% skim milk in PBS, the primary antibody was added
208 diluted in 5% skim milk in PBS and incubated for 1 hour at 37°C. After three consecutive
209 washes with PBS, the secondary antibody, a HRPO-conjugated goat-anti-mouse, was added and

210 incubated for one hour at 37°C. After incubation and washing steps, the TMB substrate (Sigma)
211 was added for 10 min, followed by one volume of stopping solution (1N H₂SO₄). Optical
212 densities were measured at 450 nm.

213 **Assessment of humoral immune responses against rZH548-ΔNSs::VP2_{BTV-4}**

214 Groups of BALB/c mice (n=4) were inoculated intraperitoneally with 10⁷, 10⁴ or 10 pfu of
215 rZH548-ΔNSs::VP2_{BTV-4}. Blood samples were collected at days 7 and 14 post-inoculation to
216 examine the induction of neutralizing antibodies. Four groups were inoculated with 10⁵ pfu of
217 BTV-4 at day 14. Blood samples were taken again at days 7 and 14 post-viral boost and were
218 used in sero-neutralization assays. Four groups were then challenged with 500 pfu of virulent
219 RVFV-56/74 strain and mice were maintained under observation for clinical signs and mortality
220 for two weeks.

221 **RVFV neutralization assay**

222 Sera from vaccinated mice were heat-inactivated at 56°C for 30 minutes and two-fold diluted
223 (starting in 1:20) in DMEM and mixed with an equal volume (50 μl) of medium containing 10³
224 pfu of a viral stock (RVFV-MP12 strain). After one hour of incubation at 37°C, this mixture
225 was added to Vero cell monolayers seeded in 96-well plates. After 3 days at 37°C in the
226 presence of 5% CO₂, cells were fixed and stained with a solution containing 2% crystal violet in
227 10% formaldehyde. The titre of neutralizing antibodies was determined as the highest dilution
228 that reduced the CPE by 50%.

229 **BTV-4 PRNT₅₀ neutralization assay**

230 Serum samples from mice were heat-inactivated for 30 min at 56°C and ten-fold serial dilutions
231 were incubated with 100 pfu of BTV-4 for 1 h at 37°C. Vero cells in 12-well plates were
232 infected with the serum and virus mixture and incubated for 1 hour; then the inoculum was
233 removed and fresh DMEM with 0.4% agar was added. After 5 days at 37°C, 5% CO₂ the plates
234 were fixed and stained with 2% crystal violet solution in 10% formaldehyde. The titre of

235 neutralizing antibodies was determined as the highest dilution that reduced the number of
236 plaques by 50%.

237 **Passive immunisation with donor antiserum**

238 Donor antisera were prepared by pooling individual serum samples from mice inoculated with
239 the recombinant viruses or BTV-4. The donor antisera were inactivated 30 min at 56 °C and
240 used for intraperitoneal injection of groups of four A129 (IFNAR^{-/-}) mice. 100 µl of each
241 antiserum was administered 1 hour before sc challenge with 500 pfu of BTV-4.

242 Positive control mice were administered with a pooled sera from BTV-4 challenged mice from
243 previous experiments at the same time as the recipients. Clinical signs and viremia were
244 evaluated in all the animals following challenge.

245 **Analysis of cellular immune responses to rZH548-ΔNSs::NS1Nt_{BTV-4}**

246 Two groups of four 129 Sv/Ev mice were inoculated with 10⁷ pfu of rZH548-ΔNSs::NS1Nt_{BTV-4}
247 intraperitoneally. Three weeks later one of the groups and an additional group of naïve mice
248 received a booster dose with 10⁵ pfu of BTV-4. Two weeks after the last immunization, mice
249 were sacrificed and their spleens collected for intracellular cytokine staining assay (ICCS).

250 Spleen cells (3 x 10⁶) were stimulated with 10 µg/ml of a NS1-specific peptide or control peptide
251 for 6 hours. For assay performance and background controls, cells were also stimulated with
252 ConA (8 µg/ml) or maintained with complete culture medium, respectively. After stimulation,
253 cells were washed, stained with surface markers, fixed, permeabilized and stained intracellularly
254 using appropriate fluorochromes. For immunostaining, the following fluorochrome-conjugated
255 anti-mouse antibodies were used: anti-CD8-PerCP, anti-IFNγPE and anti-CD4-FITC (Miltenyi).
256 Data were acquired by FACS analysis on a FACSCalibur (Becton Dickinson). Data analyses
257 were performed using the FlowJo software version X0.7 (Tree Star, Ashland, OR). The number
258 of lymphocyte-gated events was 5 x 10⁴.

259 For ELISPOT assay, Immobilon-P plates (Millipore MAIPS-4510) were coated with 50µl of
260 anti-mouse IFN γ capture antibody (AG-18/RA-6A2, BD). After overnight incubation the plates
261 were blocked with RPMI complete medium for 1 hour at 37°C. A total of 5x10⁵ spleen cells
262 were added to each well and re-stimulated with peptides #152 (10 ug/ml) and #14 (10 ug/ml) for
263 18-20 hours at 37°C with 5% CO₂. As controls, cell were stimulated either with PHA (8 ug/ml)
264 or with RPMI complete medium. After incubation the plates were washed with ddH₂O and 5
265 times with PBS. A biotin-conjugated anti-mouse IFN γ antibody (R46A2, BD) was then added
266 and incubated for 2 hours. The PBS wash step was repeated and then peroxidase-conjugated
267 streptavidin was added and incubated for 1 hour at RT. After a last PBS wash 3-amino-9-
268 ethylcarbazole substrate (BD Elispot AEC substrate) was added and incubated at RT until spots
269 were visible. Spots were quantified using an AID EliSpot Reader (Autoimmun Diagnostika,
270 GmbH).

271 **Sheep immunization**

272 Three groups of four sheep (autochthonous Churra breed) of approximately 4-5 months old
273 were inoculated subcutaneously (sc) with 10⁷ pfu of both recombinant viruses or with ZH548-
274 Δ NSs::GFP expressing virus (negative control). Blood and serum samples were collected at 4,
275 7, 14 and 21 days post-inoculation for the assessment of neutralizing antibodies. At 21 days
276 post-inoculation sheep were challenged sc with 10⁶ pfu of BTV-4M. Clinical signs were
277 monitored for two weeks by veterinary personnel blinded to the experimental setting. A
278 clinical score was given for the severity of signs (from 0-3) based on explorations of oral and
279 nasal tissues, (including discharges), postural (inflammation of coronary band, lameness) or
280 behavioural signs (depression, weakness). Viremia titres and antibody levels were estimated in
281 blood and sera samples taken at different time points after challenge.

282 **BTV-4 TCID₅₀ neutralization assay**

283 Sera from vaccinated sheep were heat-inactivated at 56°C for 30 minutes, two-fold diluted
284 (starting in 1:2) in DMEM and mixed with an equal volume (50 µl) of medium containing 10³
285 pfu of BTV-4. After one hour of incubation at 37°C, trypsinized Vero cells in a volume of 100

286 μ l were added to this mixture in 96-well plates. After 5 days at 37°C in the presence of 5%
287 CO₂, cells were fixed and stained with 2% crystal violet solution in 10% formaldehyde. The
288 titre of neutralizing antibodies was determined as the highest dilution showing 50% of CPE
289 reduction.

290 **Biochemical determinations in blood samples**

291 Whole blood samples were collected at different time points post BTV-4 challenge in BD
292 Vacutainer® tubes for serum clotting. Serum was separated by centrifugation (1500 x g for 10
293 min) and kept to -20°C until use. Alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase
294 (AST), lactate dehydrogenase (LDH), gamma-glutamyltransferase (GGT), alkaline phosphatase
295 (ALP), albumin (ALB), bilirubin (BIL), blood urea nitrogen (BUN) and total protein (TP) were
296 measured in sheep sera in a Saturno 100 analyser (Crony Instruments, Rome, Italy) using
297 specific reagents according to the manufacturer's instructions (Spin React, Vall D'En Bas,
298 Spain). The activity of enzymes was expressed as international units per litre (IU/l), serum
299 proteins in g/dL and organic compounds in mg/dL.

300 **Statistical analysis**

301 Statistical analyses were performed using GraphPad PRISM version 6.00 (GraphPad
302 Software, San Diego, CA). Differences in antibody levels, T-cell responses, serum biochemical
303 parameters, fever and viremia between vaccine groups were calculated by ANOVA tests..
304 Survival data were analyzed using a log rank test with mice grouped by immunization strategy.
305 A significance level of $P < 0.05$ was set in all analyses.

306

307 **Results**

308 **Rescue and characterization of recombinant Rift Valley fever viruses expressing** 309 **BTV proteins**

310 Our RNA pol I/II promoter-driven reverse genetic system [19] was used to rescue
311 recombinant RVFV. The genes encoding either the full-length BTV-4 VP2 or NS1 proteins
312 were amplified from plasmids encoding BTV-4 VP2 or NS1 genes using forward and reverse
313 primers including *Nco*I and *Xho*I restriction sites at 5' respectively (Supplemental Table S1).
314 The PCR products were purified and inserted into *Aar*I digested-plasmid pHH21-RVFV-
315 vN_TCS in which the NSs sequence was replaced with a unique tandem cloning site (TCS).
316 Recombinant NSs deleted viruses (RVFV- Δ NSs) were generated in co-cultured BHK-21 and
317 HEK293 cells by co-transfection with mixtures of five plasmids containing either VP2 or NS1
318 genes. (Fig 1).

319 **Fig 1. Outline for the generation of recombinant RVF viruses.** (A) Schematic representation
320 of the cloning site of plasmid pHH21-RVFV-vN_TCS based on [19]. The viral N gene and the
321 tandem cloning site (TCS) are symbolised by boxes. Nucleotide sequence of the TCS is shown.
322 The two *Aar*I sites were used for the insertion of BTV-4 ORFs. Digestion with *Aar*I restriction
323 enzyme generates compatible *Nco*I and *Xho*I recognition sequences, indicated by lines and
324 arrows. Nucleotide numbers refer to the full-length S virus segment in positive-sense. (B)
325 Schematics of plasmids showing different inserted BTV-4 sequences. Inverted writing denotes
326 the coding orientation with respect to the nucleoprotein ORF in the viral genome. Nucleotide
327 numbers indicates the size of the inserted foreign sequences.

328 As a control of virus rescue experiments, recombinant RVFV-ZH548 (rZH548wt) and RVFV-
329 ZH548- Δ NSs::GFP (rZH548- Δ NSs::GFP) were rescued upon plasmid transfection. Extensive
330 cytopathic effect (CPE) was observed after serial blind passages of cell culture supernatants
331 from the transfection mixture that included the plasmid encoding BTV-4 VP2 gene, indicative
332 of the potential rescue of a recombinant rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} virus. In contrast, all attempts
333 made to rescue virus from mixtures that included the plasmid encoding BTV-4 NS1 gene were
334 unsuccessful since no evident CPE was detected upon any subsequent passages. To overcome
335 potential toxic effects induced by full-length NS1 gene expression, a truncated version of the
336 NS1 gene encoding the N-terminal half of the protein (amino acids 1 to 270) in frame with the

337 V5 epitope tag (IPNPLLGLD) at the C- terminus (NS1Nt-V5) was also cloned into plasmid
338 pHH21-RV-FV-vN_TCS. The use of this transfection mixture produced an evident CPE after
339 serial cell culture passages, indicating the putative rescue of a rZH548- Δ NSs::NS1Nt_{BTV-4} virus.
340 The presence of recombinant virus in the supernatants was further confirmed by plaque forming
341 assay in Vero cells (as described in Methods section). To check whether the rescued viruses
342 were expressing the heterologous genes, infected cultures were analyzed by
343 immunofluorescence using either a polyclonal anti-BTV-4 VP2 serum raised in mice or a
344 monoclonal antibody anti-V5 tag (Fig 2A). VP2 expression was predominantly cytoplasmic
345 (Fig 2A, upper panel) while NS1Nt (Fig 2A, bottom) expression was observed in the form of
346 discrete granular or aggregated bodies. Western blot analysis of infected cell lysates showed that
347 rZH548- Δ NSsNS1Nt_{BTV-4} expressed NS1Nt in agreement with the predicted size of 31kDa (Fig.
348 2B). In contrast, the expression of intact VP2 was difficult to detect. Instead, a major 25 kDa
349 form was observed upon immunoprecipitation of rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} infected Vero cells
350 (Fig. 2C). The presence of VP2 viral mRNA was analyzed by RT-PCR from rZH548-
351 Δ NSs::VP2_{BTV-4} infected cell cultures (Supplemental Fig 1). PCR fragments were subjected to
352 Sanger sequencing to detect the presence of frameshifts that could explain the synthesis of the
353 25kDa form. No changes affecting the full VP2 ORF were found by this analysis.

354 **Fig 2. Detection of recombinant BTV-4 gene expression in RVFV infected cell cultures A.**

355 Indirect immunofluorescence analysis of rescued RVFVs infected Vero cells. A rabbit anti-
356 RVFV polyclonal serum was used for the detection of RVFV antigens (red fluorescence).

357 Mouse anti-VP2 polyclonal serum was used for VP2 detection and an anti-V5 mAb was used
358 for the detection of NS1Nt (green fluorescence). B. Western blot analysis of rZH548-

359 Δ NSs::NS1Nt_{BTV-4} infected Vero cells (lane 1) or rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} (lane 2). Anti-

360 V5tag mAb was used for the detection of NS1Nt (arrow). As a control of infection,

361 nucleoprotein N (arrowhead) was detected using 2B1 mAb. Mr: relative molecular mass in kDa.

362 C. Immunoprecipitation analysis of rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} (RVFV-VP2), rZH548-

363 Δ NSs::NS1Nt_{BTV-4} (RVFV-NS1Nt) or BTV-4 infected cell lysates (BTV-4). Mouse anti-BTV

364 polyclonal serum was used for the detection of BTV specific antigens. Images were
365 overexposed to visualize upper putative VP2 protein bands (arrowheads). Major
366 immunoprecipitated products in both rRVFV lysates are indicated by arrows. The identity of
367 proteins immunoprecipitated in the control BTV-4 lysate is indicated. Mr: relative molecular
368 mass in kDa.

369 The *in vitro* growth kinetics for the recombinant viruses were compared with that of
370 recombinant wt RVFV (rZH548) and the GFP-expressing NSs deletion mutant rZH548-
371 Δ NSs::GFP, in Vero and HEK293 cells using low MOI (0.01 PFU/cell). Supernatants were
372 harvested at different times post-infection and virus titers were determined by plaque assay in
373 Vero cells (Fig 3). Independent of the cell line used, growth rates and end titers of both rRVFVs
374 expressing BTV-4 proteins were similar to those of rZH548- Δ NSs::GFP, but were consistently
375 lower if compared with the recombinant wt rZH548 virus (Fig 3A). All three Δ NSs viruses
376 evidenced turbid plaques, slower kinetics and lower titers in HEK293 cells, consistent with the
377 IFN-competent phenotype of these cells [19]. Interestingly, rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} and
378 rZH548- Δ NSs::NS1Nt_{BTV-4} viruses showed different plaque phenotypes when compared to
379 rZH548- Δ NSs::GFP. (Fig. 3B)

380 **Fig 3. Phenotypic characterization of the recombinant viruses** A. Growth kinetics of
381 rRVFVs. Vero or HEK293 cells were infected with a MOI of 0.01 and supernatants were
382 harvested at the indicated time points. Viral titers were determined by infection of Vero cells
383 with serial dilutions of the supernatants. B. Plaque phenotypes of the rescued recombinant
384 viruses. Cell lysis was visualized at 3-5 days post infection upon Crystal Violet staining.

385 **Analysis of the stability upon cell passage of rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} and rZH548-**
386 **Δ NSs::NS1Nt_{BTV-4}**

387 Since the foreign sequences introduced in the genome of the recombinant viruses altered
388 the normal size and gene sequence of the small (S) RNA genomic segment, we tested whether
389 this novel genomic architecture remained conserved upon four serial passages in cell culture.

390 Using RNA extracted from infected cell culture supernatants with different passage history we
391 analyzed the presence of both S-segment transgenes by either a quantitative (NS1 gene) or gel-
392 based (VP2 gene) PCR (Supplemental Fig 2A) The detection levels for BTV-NS1 or BTV-VP2
393 gene sequences were normalized to those of RVFV viral RNA polymerase (RdRp) gene (L-
394 segment) or the nucleoprotein N gene (S segment), respectively, to provide relative detection
395 values. After four consecutive passages both transgenes were detected with consistent ratios
396 respect to the RdRp or nucleoprotein genes (Supplemental Fig 2B and 2C). Most importantly,
397 CPE was observed along each passage together with the detection of the transgene expression
398 by IFI using specific antibodies (Supplemental Fig 2D). These data were consistent with
399 genomic stability of both viruses in terms of transgene integrity along a number of cell
400 passages.

401 **Assessment of infectivity and immunogenicity of recombinant rZH548-**

402 **Δ NSs::VP2_{BTV-4} and rZH548- Δ NSs::NS1Nt_{BTV-4} in mice**

403 RVF virus lacking the NSs gene are highly attenuated in type I IFN-competent mice,
404 and induce a strong immune response shortly after inoculation [9, 36]. To confirm that both
405 rescued rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} and rZH548- Δ NSs::NS1Nt_{BTV-4} maintained a non-virulent
406 phenotype, BALB/c mice were inoculated intraperitoneally with a high dose (10^7 pfu) of either
407 rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} or rZH548- Δ NSs::NS1Nt_{BTV-4}. All mice survived the challenge
408 without apparent clinical signs inducing similar titers of anti-N antibodies as judged by ELISA
409 (Supplemental Fig 3), indicating that the attenuated phenotype was not affected by the encoded
410 VP2 or NS1Nt transgenes. The induction of anti-N humoral responses was dose dependent,
411 increasing significantly along time as shown by the kinetics of anti-N IgGs upon infection with
412 rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} (Fig 4A). To test whether the inoculation induced protection against a
413 virulent RVFV challenge, these mice were subsequently inoculated with a lethal dose of the
414 RVFV-56/74 virulent strain three weeks after the first inoculation with rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4}.
415 All mice survived with no clinical signs, except those mice belonging to the mock inoculated
416 (PBS) control group, which died between 4-6 days (Fig 4B). At day 3 post RVFV-56/74

417 challenge high viral RNA loads were detected in the mice from the control group and lower
418 levels in the group inoculated with 10 pfu of the recombinant virus, while the mice from the
419 other groups showed no detectable viraemia (Fig 4C).

420 **Fig 4. *In vivo* infectivity of the recombinant rZH548-ΔNSs::VP2_{BTV-4} virus** A. Kinetics of
421 anti-RVSV nucleoprotein antibodies in serum from mice inoculated with different doses of
422 rZH548-ΔNSs::VP2_{BTV-4}. Bars represent median plus interquartile range. B. Survival curves of
423 mice (n=4) after intraperitoneal inoculation at the indicated doses of rZH548-ΔNSs::VP2_{BTV-4}.
424 C. Viremia titers by RT-PCR at day 3 after RVSV 56/74 challenge. The correlation of Cq
425 (quantification cycle) data with pfu equivalents is indicated in the right Y axis. The data are
426 plotted for individual mice (n=4) with means (horizontal lines). *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001
427 (Anova, non-parametric Kruskal-Wallis test).

428 **Analysis of anti-BTV protective antibody responses upon inoculation of mice with** 429 **rZH548-ΔNSsVP2_{BTV-4}**

430 To analyze whether the inoculation of rZH548-ΔNSs::VP2_{BTV-4} induced anti-VP2
431 antibodies, ELISA plates were coated with a BTV-4 infected cell lysate and the presence of
432 serum anti-VP2 antibodies in mice determined. The mice inoculated with the highest dose of the
433 virus (10⁷ pfu) showed significantly increased amounts of anti-VP2 antibodies with respect to
434 the groups receiving lower doses (10⁴ and 10¹ pfu) indicating a dose-dependent antibody
435 induction (Fig 5A). To confirm the induction of VP2-specific antibodies, the sera were used in a
436 BTV-4 seroneutralization assay. Here, titers of BTV-4 neutralizing antibodies (nAb) were
437 observed in the sera of mice vaccinated with 10⁷ and 10⁴ pfu. However, nAb titers peaked at 14
438 days post inoculation (dpi) dropping by 21dpi in the sera from both groups. In contrast, no
439 neutralizing antibodies were detected in animals immunized with only 10 pfu, suggesting that
440 the induction and duration of serum nAbs was also dose dependent (Fig 5B). To test if the first
441 dose of rZH548-ΔNSs::VP2_{BTV-4} administered to the mice was able to prime adequately for
442 further memory responses after a second antigen exposure, a dose of 10⁵ pfu of BTV-4 virus
443 was inoculated 21 days after the initial inoculation. The booster dose with BTV-4 increased the

444 titers of anti-VP2 antibodies in the 10^7 pfu group as judged by ELISA (Fig 5A). In contrast, all
445 groups increased the levels of nAbs as measured 7 days after boosting. Interestingly, the group
446 of mice immunized with the lowest dose (10 pfu) showed higher levels of neutralizing
447 antibodies than the control, indicative of an effective immune priming by the recombinant virus
448 (Fig 5B).

449 **Fig 5. Anti-VP2 responses upon single dose rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} inoculation of mice.**

450 A. Detection by ELISA of anti-BTV serum antibodies upon inoculation of different doses of the
451 recombinant virus. ELISA plates were coated with BTV-4 infected antigen lysate. Serum
452 samples diluted 1/100 were obtained at the indicated days post inoculation and 7 days after a
453 BTV-4 boost (arrow) ***P<0.001 (two-way Anova test). B. Kinetics of neutralizing antibody
454 induction before and after boosting with BTV-4 virus (arrow). Horizontal dotted lines represent
455 assays' sensitivity limits.

456 BALB/C mice elicited humoral anti-VP2 responses upon rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4}
457 inoculation as shown by ELISA or seroneutralization assays. Since anti-VP2 nAbs associate
458 with protection against BTV [14] the inoculation of this recombinant virus could have conferred
459 protection against a BTV-4 challenge to the mice. However, since BALB/C mice are refractory
460 to BTV-4 infection, we had no means for a direct estimation of the efficacy of this vaccine
461 strategy against a BTV-4 challenge. To overcome this obstacle we performed a passive serum
462 transfer experiment in BTV-sensitive A129 mice (IFNAR^{-/-}), using pooled sera from groups of
463 BALB/C mice immunized with either (i) 10^7 pfu of rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} (prime only
464 group), (ii) 10^7 pfu of rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} and 10^5 pfu of BTV-4 (prime-boost group), (iii)
465 10^5 pfu of BTV-4 (control group), and (iv) mock immunized mice (negative control). After
466 passive transfer, each mouse was challenged with a lethal BTV-4 dose of 5×10^2 pfu. Only the
467 mice that received serum from the prime-boost approach survived the challenge, without
468 showing any clinical manifestation. In contrast, the mice receiving serum from either BTV-4 or
469 prime only mice succumbed to the challenge, although with a slight delay with respect to the
470 control mice (Fig 6A). At day three post-challenge all groups showed lower viremia levels than

471 the mock inoculated group and those of BTV or prime-boost groups reached statistical
472 significance (Fig 6B). In agreement with the survival data the lowest viral RNA loads were
473 found in those mice from the prime boost group. This result suggest that, as for BTV-4, a single
474 dose of rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} induces humoral immunity to levels that reduce viremia
475 without conferring a fully protective response. However rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} works
476 efficiently as a priming agent as shown by the efficacy after a booster dose.

477 **Fig 6. Passive transfer experiment of immune sera in A129 mice.** Groups of n=5 mice were
478 inoculated ip with serum pools from BALB/C vaccinated mice with rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4},
479 before (prime only) and after BTV-4 boost (prime-boost), with anti -BTV-4 mouse serum or
480 with negative mouse serum. **A.** Survival of A129 mice after challenge with BTV-4. **B.**
481 Detection of BTV-4 viremia in A129 mice by rt-PCR at day three post BTV-4 challenge.
482 **P<0.01; P* <0.05 (one way non-parametric Anova). Horizontal dotted line represent the cut-
483 off Cq value. The correlation of Cq (quantification cycle) data with pfu is indicated in the right
484 Y axis.

485 **Analysis of the cellular immune response induced upon inoculation of rZH548-**
486 **Δ NSs::NS1Nt_{BTV-4} in mice**

487 The BTV-4 NS1 protein has been proposed as a candidate antigen to develop multi-
488 serotype BTV vaccines due to its high degree of conservation among most BTV serotypes as
489 well as to the presence of molecular determinants of cellular immunity [15]. Thus, the cellular
490 anti-BTV immune response elicited by the recombinant virus rZH548- Δ NSs::NS1Nt_{BTV-4} was
491 assessed in mice two weeks after the last immunization in the presence or absence of a booster
492 dose of BTV-4. The mice were sacrificed and spleen cells were isolated to perform intracellular
493 IFN- γ staining (ICCS) of T-lymphocytes and to determine the number of IFN- γ -producing
494 spleen cells by ELISPOT. Spleen cells were stimulated with the immunodominant CD8+ T cell
495 NS1 peptide (GQIVNPTFI, namely #152), or an irrelevant peptide (#14) to determine the assay
496 background. A significant percentage of IFN- γ + CD8+ T cells upon stimulation with the peptide

497 #152 was observed in mice primed with rZH548-ΔNSs::NS1Nt_{BTV-4} and boosted with BTV-4
498 (4,095%), while lower stimulation levels were observed in those mice that were only primed
499 with one dose of rZH548-ΔNSs::NS1Nt_{BTV-4} or BTV-4 (0,7975% and 0,5575%, respectively)
500 (Fig 7A). ELISPOT data confirmed that higher numbers of IFN-γ secreting cells responded to
501 the stimulation with peptide #152 in those mice that were immunized with rZH548-
502 ΔNSs::NS1Nt_{BTV-4} and boosted with BTV-4 compared to the other groups. Interestingly, the
503 rZH548-ΔNSs::NS1Nt_{BTV-4} primed-only group showed higher numbers of stimulated cells with
504 respect to the groups primed with BTV-4 alone although these differences did not reach
505 statistical significance (fig 7B).

506 **Fig 7. Analysis of cellular immune responses.** Groups of n=4 mice were inoculated with
507 BTV-4, rZH548-ΔNSs::NS1Nt_{BTV-4} before (prime only) or after BTV-4 boost (prime-boost) **A.**
508 Intracellular cytokine cell staining (ICCS). Percentage of CD8⁺ IFN-γ⁺ cells after re-stimulation
509 with NS1 peptide #152 or peptide #14 (irrelevant peptide). **B.** ELISPOT assay of re-stimulated
510 spleen cells. Bars represent mean plus SD. *P<0.05, ****P<0.0001 (one way non-parametric
511 Anova).

512 **Immunogenicity and efficacy against BTV challenge of the recombinant viruses in**
513 **sheep.**

514 The data on the attenuation, stability upon cell passage and immunity conferred by the
515 rescued viruses to mice prompted us to test the efficacy of both rZH548ΔNSs::NS1Nt_{BTV-4} and
516 rZH548-ΔNSs::VP2_{BTV-4} as potential vaccines for ruminants. With this aim we set a preliminary
517 vaccination experiment using three groups of n=4 sheep each. Two groups were vaccinated with
518 10⁷ pfu of either rZH548-ΔNSs::VP2_{BTV-4} or rZH548ΔNSs::NS1Nt_{BTV-4}, and the third group
519 received a similar dose of rZH548-ΔNSs::GFP as a negative control. The kinetics of the
520 antibody response after immunization showed that BTV-4 neutralizing antibodies were present
521 in the serum from the rZH548-ΔNSs::VP2_{BTV-4} vaccinated group as early as 4 dpi, reaching
522 maximum levels at 7 dpi, and clearly decreasing by days 14 and 21 post vaccination (Fig 8A).

523 As expected, neutralizing activity was not found in the sera from sheep immunized with
524 rZH548- Δ NSs::NS1Nt_{BTV-4} or rZH548- Δ NSs::GFP. In contrast, RVFV neutralizing antibody
525 titers reached maximum levels by day 14 and were maintained at 21dpi (Fig 8B). The RVFV
526 neutralizing antibody kinetics were similar in all three groups of sheep, irrespective of the
527 vaccine used, indicating that the expression of heterologous antigens was not detrimental for the
528 induction of anti-RVFV humoral immunity in sheep. Interestingly, the level of anti-RVFV-N
529 antibodies detected by ELISA was slightly lower in the sheep vaccinated with
530 rZH548 Δ NSs::GFP, although these differences were not statistically significant (Fig 8C).

531 **Fig 8. Antibody responses in sheep upon vaccination with the recombinant viruses. A.**
532 Anti-BTV neutralizing antibody kinetics before (post-immunization) or after challenge with
533 BTV-4 virus measured as 50% infective titers in tissue culture. The limit of sensitivity
534 (horizontal line) was set to 0.69 (1:5 dilution). Values below this threshold were assigned an
535 arbitrary value of 0.2. **B.** Detection of RVFV neutralizing antibodies in sheep sera at 14 and 21
536 days post-vaccination by plaque reduction neutralization assay (PRNT₅₀). The limit of
537 sensitivity (dotted line) was set to 1.3log (1:20 dilution). **C.** Nucleoprotein antibodies in sheep
538 sera at 7 days post-vaccination measured by anti-nucleoprotein ELISA (p value ANOVA test
539 assuming non-parametric distribution). Individual (symbols) and mean values (horizontal bars)
540 are represented. Blue symbols: sheep vaccinated with rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} Orange
541 symbols: rZH548- Δ NSs::NS1Nt_{BTV4}. Green symbols rZH548- Δ NSs::GFP.

542 In order to test the efficacy of the immunity provided, the sheep were challenged with a
543 10⁶ pfu dose of the virulent Morocco BTV-4 reassortant strain. Upon virus challenge,
544 vaccination with any of the three recombinant viruses did not abolish the onset of fever although
545 the group of rZH548- Δ NSs::NS1Nt_{BTV4} immunized sheep showed lower mean temperatures,
546 delayed and reduced onset and duration of pyrexia (Fig 9A). In addition, control animals
547 immunized with rZH548- Δ NSs::GFP showed slightly higher sums of clinical scores than the
548 animals vaccinated with rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} or rZH548- Δ NSs::NS1Nt_{BTV-4}. (Supplemental
549 Fig 4A). Kinetics of viremia levels for BTV-4 measured by qRT-PCR indicated Ct values in the

550 rZH548-ΔNSs::GFP group that were significantly lower than those from the other two groups at
551 some time points (Fig 9B). The correspondence between Ct levels and viral titers in blood
552 indicated that rZH548-ΔNSs::GFP reached a viremia equivalent to 10^4 pfu/ml while in the other
553 two groups the viraemia titers remained below that threshold. Finally, post-challenge sera were
554 tested in a BTV-VP7 ELISA to confirm whether the virus had replicated to different extent
555 between groups. In this ELISA we could observe that anti-VP7 antibody levels were
556 consistently higher in sheep from the rZH548-ΔNSs::GFP group (Fig. 9C). Altogether, these
557 data suggest that the BTV-4 replication occurred at lower levels in the animals immunized with
558 the recombinant viruses, especially in sheep vaccinated with rZH548-ΔNSs::NS1Nt_{BTV-4}.

559 **Figure 9. Efficacy assessment after a virulent BTV-4 challenge in sheep vaccinated with**
560 **the recombinant RVF viruses. A.** Mean rectal temperatures after BTV-4 challenge. Dotted
561 line represents the fever threshold level determined before challenge. **B.** Viremia analyzed by
562 real time RT-PCR from 4 to 14 dpi. Sheep were monitored daily for two weeks after challenge.
563 The correlation of Ct (threshold cycle) data with pfu equivalents is indicated in the right Y axis.
564 * $P < 0.05$ (multiple comparisons t-test). **C.** Detection of anti- BTV-VP7 antibodies by ELISA in
565 sheep sera taken two weeks after challenge. Mean values (horizontal bars) and standard errors
566 (SEM) are represented. Two-way ANOVA P values (taking vaccines groups as the source of
567 variation) are indicated for each graph. Asterisks denote significant variation ($P < 0.05$) upon
568 Dunnett's multiple comparison test.

569 Blood chemistry analysis were performed using serum samples collected at different days post
570 vaccination (dpv) and challenge (dpc) (Supplemental Fig 4B). A decrease in the serum levels of
571 alkaline phosphatase (ALP) and lactate dehydrogenase (LDH) was noted upon vaccination in all
572 sheep. While most of the parameters measured were similar in all groups the BTV challenge
573 had an effect in all sheep by elevating the levels of bilirubin (BIL) and blood urea nitrogen
574 (BUN) a week after, reaching baseline values at day 14 post challenge. Interestingly, animals
575 from both the control and rZH548-ΔNSs::VP2_{BTV-4} groups showed higher mean levels of
576 aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) after BTV-4 challenge

577 compared to the animals in rZH548-ΔNSs::NS1Nt_{BTV-4} group, in agreement with the lower
578 impact of the BTV challenge in this group of sheep (Supplemental Fig. 4B).

579 **Discussion**

580 Vaccination is proposed as a powerful measure to control Rift Valley fever outbreaks in
581 livestock and humans by means of inducing herd immunity [37, 38]. The availability of
582 ssRNA(-) virus rescue systems has allowed the manipulation of the RVFV genome [39] and,
583 hence, the generation of several live attenuated experimental RVF vaccines that have proved
584 highly efficacious in ruminants [20-24, 26, 27]. Previous works using reverse genetics
585 technology also demonstrated the remarkable plasticity of the RVFV genome in accepting
586 foreign insert sequences or even extra genome RNA segments [25, 40]. Expression of GFP by
587 means of a recombinant RVFV (rRVFV) was the first demonstration of the viability of a deleted
588 NSs virus expressing a foreign/heterologous antigen [17-19]. Moreover, expression of
589 influenza hemagglutinin (HA) or a tumor-associated CD8 peptide was also possible by means of
590 a non-spreading RVFV replicon [28, 41]. Nonetheless, no additional attempts were made to
591 extend the vector potential of RVFV to other relevant vaccine antigens for ruminants. Our aim
592 since was to explore the feasibility of using RVFV as a vaccine vector for other ruminant viral
593 diseases as well as to provide an appealing strategy to promote vaccination in countries where
594 sporadic RVF disease outbreaks occur. RVF epidemiology is a complex multifactorial process
595 involving susceptible human beings, competent mosquitoes, wild and domesticated animals, and
596 the environment, resulting in severe outbreaks after long inter-epizootic periods with no
597 detectable virus circulation [42, 43]. Even if a RVF vaccine was easily available, such
598 unpredictable conditions challenges the implementation of periodic vaccination campaigns,
599 particularly when no policies that can guide utilization of RVF vaccines are provided [44]. A
600 potential approach to overcome this scenario would be to take advantage of periodic vaccination
601 campaigns against more prevalent ruminant diseases, to introduce vaccination against RVF.
602 Bluetongue disease features fit well in this scenario since it is endemic in many countries where
603 RVF epizootics occur and it is far from being eradicated, in particular due to the presence of

604 infected *Culicoides* midges that overcome winter in more temperate regions, favoring recurrent
605 disease outbreaks.

606 Thus, we first sought to check if RVFV could support the expression of BTV antigens. BTV
607 vaccines rely in the induction of antibody responses against VP2, the major capsid protein and
608 the main inducer of serotype-specific neutralizing antibodies [14]. Other BTV antigen that has
609 shown promise for triggering potential multi-serotype protection was the non-structural NS1
610 protein. NS1-based protection relies in the elicitation of cross-reactive CTL immune responses
611 [45] [15]. NS1 is highly conserved among the various BTV serotypes and it is also the most
612 synthesized viral protein in BTV-infected cells [46]. NS1 contains epitopes associated with both
613 T cell and humoral responses. Antibody responses against NS1 protein may be also important
614 contributors to immune protection even though those antibodies are non-neutralizing. We thus
615 selected both antigens as models to test our hypothesis.

616 The BTV-4 VP2 antigen was expressed by means of a recombinant RVFV ZH548 virus. The
617 pattern of expression of VP2 in rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} infected Vero cells was in agreement
618 with what was seen upon in vitro infection with BTV: an extended cytoplasmic staining with no
619 clear subcellular compartmentalization [47]. Immunoprecipitation analysis of rZH548-
620 Δ NSs::VP2_{BTV-4} in 48hpi infected Vero cells suggested that the VP2 antigen is rapidly
621 degraded to an abundant 25kDa polypeptide, indicative of a poor stability for the native antigen.
622 In this sense, recombinant VP2 expression by means of a modified vaccinia Ankara (MVA)
623 vector showed also a prominent 25kDa degradation product as early as 16 hpi [32]. Moreover, it
624 is known that the outer VP2 protein is highly sensitive to protease digestion rendering, among
625 others, a 25kDa polypeptide [48]. This finding suggested that upon synthesis, VP2 protein is
626 rapidly processed perhaps by specific proteases or, alternatively, due to the lack of other BTV
627 proteins essential to stabilize the VP2 trimer. Nonetheless, the levels of VP2 expression were
628 sufficient to elicit anti-BTV immunity as shown by sero-neutralization data.

629 On the other hand, expression of the full-length BTV-4 NS1 protein by means of rRVFV
630 infection in Vero cells was unsuccessful, in spite of the number of attempts made, nor it was

631 achieved using a VLP based transcriptional replicon system (S. Devignot and F. Weber,
632 unpublished data). It is known that the full-length NS1 protein forms complex tubular-like
633 structures when expressed in BTV infected cells [49] and that NS1 regulates viral gene
634 expression by binding to viral mRNA [50]. In addition, a cytopathogenic role for NS1 has been
635 also suggested [46]. Perhaps the nature of these intracellular structures precluded the RVFV to
636 complete a viral replicative cycle, therefore impeding the generation of infectious progeny
637 particles. Nonetheless, the expression of a truncated version of this protein (NS1Nt) was
638 possible by means of rZH548- Δ NSs::NS1Nt_{BTV-4}. It has been shown in previous studies that the
639 majority of the theoretical CD8+ T cell epitopes are located within the amino terminus end of
640 the protein (NS1Nt) [15]. This ensured the presentation of previously reported regions involved
641 in the stimulation of cellular immune responses. The pattern of expression of NS1Nt was
642 markedly different to that of VP2 and it showed a high resemblance to the pattern observed in
643 BTV infected cells [47] as shown by confocal microscopy data. Vaccination of 129 mice with
644 rZH548- Δ NSs::NS1Nt_{BTV-4} resulted in a NS1 epitope-specific CD8-T cell response in
645 agreement with the immune cell targeting described for RVFV [51].

646 The use of the RVFV NSs locus to insert foreign genes ensures *a priori* that the resulting
647 rescued virus (lacking NSs expression) should have an attenuated phenotype *in vivo*. We could
648 confirm this attenuation since a high dose (up to 10^7 pfu/mouse) inoculation of both
649 recombinant viruses was non-virulent in immune competent animals. In contrast, the
650 recombinant viruses retained a highly virulent phenotype in type-I interferon unresponsive
651 A129 mice (IFNAR^{-/-} mice) indicating that their replicative ability *in vivo* was not altered by the
652 expression of the heterologous BTV-4 genes. This fact did not allow us to directly prove the
653 protective efficacy of these recombinant viruses against a BTV challenge since our BTV
654 challenge mouse model relies in the use of IFNAR^{-/-} mice [52, 53]. Therefore, we hypothesized
655 that if an appropriate immune response was generated against the heterologous BTV-4 VP2
656 antigen, the transfer of immune serum could provide a mean to prove that protective immune
657 responses had been elicited. This was supported by the fact that the transferred serum had *in*

658 *in vitro* BTV-4 neutralizing activity. However, transfer of immune serum from rZH548-
659 Δ NSs::VP2_{BTV-4} vaccinated mice was not sufficient to provide full protection (only a slight delay
660 in mortality was observed) indicating that the humoral anti-VP2 immune response was not
661 strong enough or that the amount of serum transferred was still below a protective threshold.
662 However, upon BTV-4 boost the serum was fully protective upon passive transfer. These data
663 pointed out that rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} vaccination effectively primed the immune system but
664 perhaps the low expression levels of full-length VP2 limited the induction of stronger anti-BTV
665 humoral immune responses *in vivo*, in spite of the detection of *in vitro* neutralizing antibodies.
666 However, since the transfer of BTV immune sera alone did not provide protection, it could be
667 hypothesized that other mechanisms distinct from humoral immunity need to be stimulated or
668 combined.

669 We also tested whether our recombinant viruses were able to provide immunity in a large
670 animal model. With this purpose, sheep were inoculated with a dose of 10^7 pfu and serum
671 antibodies tested for neutralizing activity against both BTV-4 and RVFV. Anti-RVFV
672 neutralizing titers were produced to protective levels as reported elsewhere [54] and, notably,
673 anti BTV-4 neutralizing antibodies were raised faster and to higher titers than those described
674 for other attenuated or inactivated BTV vaccines after two vaccine doses [55, 56]. These
675 antibody titers peaked by day seven, decreasing shortly afterwards upon immunization,
676 resembling IgM kinetics. Nonetheless, based on the levels of neutralizing antibody titers
677 induced after a single dose, the rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} vaccine appears very efficient
678 providing anti-VP2 immunity. Since the neutralizing antibody titers reached protective levels as
679 reported by others we expected higher degree of protection after the BTV-4 viral challenge in
680 the sheep. The levels detected in the rZH548- Δ NSs::VP2_{BTV-4} group were slightly lower than
681 those of the control group Sheep vaccinated with rZH548- Δ NSs::NS1Nt_{BTV-4}. were better
682 protected against viremia as judged by the levels of anti-BTV VP7 antibodies after challenge.
683 These lower antibody levels could be associated with lower rates of virus replication in those
684 sheep vaccinated with rZH548- Δ NSs::NS1Nt_{BTV-4}. Accordingly, ALT and AST levels increased

685 after challenge in both the control and the rZH548-ΔNSs::VP2_{BTV-4} group but not in the
686 rZH548-ΔNSs::NS1Nt_{BTV-4} group. Though BTV does not target hepatic cells, increased levels of
687 these enzymes might reflect consequences of an inflammatory process triggered upon infection,
688 soft tissue damage and injury to organs such as the lungs [57]. The increased levels observed in
689 this study in sheep upon challenge are in agreement with earlier reports of sheep experimentally
690 infected with BTV [58]. One explanation for the incomplete efficacy observed in these
691 experiments could be the high challenge dose administered to our sheep, taking in account the
692 particular virulence of the Morocco strain. Another explanation could be that the dose proved to
693 protect mice was as high as the one used for sheep (10^7 pfu/animal) so it could be possible that
694 the vaccine dose used in our sheep trial was below an optimal protective threshold.
695 Alternatively, though the nAb titers demonstrated a clear neutralizing activity in vitro, in order
696 to protect sheep from BT it might be necessary to achieve higher affinities upon
697 immunoglobulin subclass-switch for the VP2 specific antibodies. Nonetheless, these data are
698 promising enough to test both recombinant viruses for priming or boosting BTV vaccine doses
699 either alone or in combination. Altogether, they may contribute to support the use of vectored
700 rRVFV-BTV-4 vaccines as a mean to protect against both diseases.

701 **Acknowledgements**

702 This work was supported by grants AGL2014-57430R and AGL2017-83226R and AGL2017-
703 82570R, from the Spanish Ministry of Science, S2018/BAA 4370 from Comunidad de Madrid
704 R&D in Technologies Program and Pale-blue (EU-H2020 grant proposal 727393-2). SMF was a
705 recipient of a pre-doctoral fellowship program from the Spanish Ministry of Science. FW is
706 supported by the CCHVaccine consortium that has received funding from the European Union's
707 Horizon 2020 research and innovation program under grant agreement no. 732732, and by the
708 Swedish Research Council (Vetenskapsrådet, VR) section Research Environment, Infection
709 Biology (contract number 2018-05766). We thank the animal care and biosafety staff for their
710 excellent technical assistance. The funding sources had no involvement in the study design nor
711 in the writing of the report and the decision to submit the article for publication.

712 **References**

- 713 1. Bird BH, Ksiazek TG, Nichol ST, Maclachlan NJ. Rift Valley fever virus. *J Am Vet Med*
714 *Assoc.* 2009;234(7):883-93. Epub 2009/04/02. doi: 10.2460/javma.234.7.883. PubMed PMID:
715 19335238.
- 716 2. Linthicum KJ, Davies FG, Kairo A, Bailey CL. Rift Valley fever virus (family
717 *Bunyaviridae*, genus *Phlebovirus*). Isolations from Diptera collected during an inter-epizootic
718 period in Kenya. *J Hyg (Lond)*. 1985;95(1):197-209. Epub 1985/08/01. PubMed PMID:
719 2862206.
- 720 3. Lumley S, Horton DL, Hernandez-Triana LLM, Johnson N, Fooks AR, Hewson R. Rift
721 Valley fever virus: strategies for maintenance, survival and vertical transmission in
722 mosquitoes. *J Gen Virol*. 2017;98(5):875-87. Epub 2017/05/31. doi: 10.1099/jgv.0.000765.
723 PubMed PMID: 28555542.
- 724 4. Boshra H, Lorenzo G, Busquets N, Brun A. Rift valley fever: recent insights into
725 pathogenesis and prevention. *J Virol*. 2011;85(13):6098-105. Epub 2011/04/01. doi:
726 JVI.02641-10 [pii]
727 10.1128/JVI.02641-10. PubMed PMID: 21450816.
- 728 5. Won S, Ikegami T, Peters CJ, Makino S. NSm protein of Rift Valley fever virus
729 suppresses virus-induced apoptosis. *J Virol*. 2007;81(24):13335-45. Epub 2007/10/05. doi:
730 JVI.01238-07 [pii]
731 10.1128/JVI.01238-07. PubMed PMID: 17913816.
- 732 6. Weingartl HM, Zhang S, Marszal P, McGreevy A, Burton L, Wilson WC. Rift Valley
733 fever virus incorporates the 78 kDa glycoprotein into virions matured in mosquito C6/36
734 cells. *PLoS One*. 2014;9(1):e87385. Epub 2014/02/04. doi: 10.1371/journal.pone.0087385
735 PONE-D-13-31002 [pii]. PubMed PMID: 24489907.
- 736 7. Ly HJ, Ikegami T. Rift Valley fever virus NSs protein functions and the similarity to
737 other bunyavirus NSs proteins. *Virol J*. 2016;13:118. Epub 2016/07/03. doi: 10.1186/s12985-
738 016-0573-8
739 10.1186/s12985-016-0573-8 [pii]. PubMed PMID: 27368371; PubMed Central PMCID:
740 PMC4930582.
- 741 8. Wuerth JD, Weber F. Phleboviruses and the Type I Interferon Response. *Viruses*.
742 2016;8(6). Epub 2016/06/25. doi: 10.3390/v8060174
743 E174 [pii]
744 v8060174 [pii]. PubMed PMID: 27338447; PubMed Central PMCID: PMC4926194.
- 745 9. Muller R, Saluzzo JF, Lopez N, Dreier T, Turell M, Smith J, et al. Characterization of
746 clone 13, a naturally attenuated avirulent isolate of Rift Valley fever virus, which is altered in
747 the small segment. *Am J Trop Med Hyg*. 1995;53(4):405-11. Epub 1995/10/01. PubMed
748 PMID: 7485695.
- 749 10. Mellor PS, Boorman J, Baylis M. *Culicoides* biting midges: their role as arbovirus
750 vectors. *Annu Rev Entomol*. 2000;45:307-40. Epub 2000/04/13. doi:
751 10.1146/annurev.ento.45.1.307. PubMed PMID: 10761580.
- 752 11. Roy P. Bluetongue virus proteins. *J Gen Virol*. 1992;73 (Pt 12):3051-64. Epub
753 1992/12/01. PubMed PMID: 1335020.
- 754 12. Ratinier M, Caporale M, Golder M, Franzoni G, Allan K, Nunes SF, et al. Identification
755 and characterization of a novel non-structural protein of bluetongue virus. *PLoS Pathog*.
756 2011;7(12):e1002477. Epub 2012/01/14. doi: 10.1371/journal.ppat.1002477

757 PPATHOGENS-D-11-01450 [pii]. PubMed PMID: 22241985; PubMed Central PMCID:
758 PMC3248566.

759 13. Stewart M, Hardy A, Barry G, Pinto RM, Caporale M, Melzi E, et al. Characterization
760 of a second open reading frame in genome segment 10 of bluetongue virus. *J Gen Virol*.
761 2015;96(11):3280-93. Epub 2015/08/21. doi: 10.1099/jgv.0.000267. PubMed PMID:
762 26290332; PubMed Central PMCID: PMC4806581.

763 14. Schwartz-Cornil I, Mertens PP, Contreras V, Hemati B, Pascale F, Breard E, et al.
764 Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity. *Vet Res*. 2008;39(5):46. Epub
765 2008/05/23. doi: 10.1051/vetres:2008023

766 v08240 [pii]. PubMed PMID: 18495078.

767 15. Marin-Lopez A, Calvo-Pinilla E, Barriaes D, Lorenzo G, Brun A, Anguita J, et al. CD8 T
768 Cell Responses to an Immunodominant Epitope within the Nonstructural Protein NS1
769 Provide Wide Immunoprotection against Bluetongue Virus in IFNAR(-/-) Mice. *J Virol*.
770 2018;92(16). Epub 2018/06/08. doi: e00938-18 [pii]

771 10.1128/JVI.00938-18

772 JVI.00938-18 [pii]. PubMed PMID: 29875250; PubMed Central PMCID: PMC6069212.

773 16. Feenstra F, van Rijn PA. Current and next-generation bluetongue vaccines:
774 Requirements, strategies, and prospects for different field situations. *Crit Rev Microbiol*.
775 2017;43(2):142-55. Epub 2016/11/02. doi: 10.1080/1040841X.2016.1186005. PubMed PMID:
776 27800699.

777 17. Ikegami T, Won S, Peters CJ, Makino S. Rescue of infectious rift valley fever virus
778 entirely from cDNA, analysis of virus lacking the NSs gene, and expression of a foreign gene. *J*
779 *Virol*. 2006;80(6):2933-40. Epub 2006/02/28. doi: 80/6/2933 [pii]

780 10.1128/JVI.80.6.2933-2940.2006. PubMed PMID: 16501102.

781 18. Billecocq A, Gauliard N, Le May N, Elliott RM, Flick R, Bouloy M. RNA polymerase I-
782 mediated expression of viral RNA for the rescue of infectious virulent and avirulent Rift
783 Valley fever viruses. *Virology*. 2008;378(2):377-84. Epub 2008/07/11. doi: S0042-
784 6822(08)00382-6 [pii]

785 10.1016/j.virol.2008.05.033. PubMed PMID: 18614193.

786 19. Habjan M, Penski N, Spiegel M, Weber F. T7 RNA polymerase-dependent and -
787 independent systems for cDNA-based rescue of Rift Valley fever virus. *J Gen Virol*.
788 2008;89(Pt 9):2157-66. Epub 2008/08/30. doi: 89/9/2157 [pii]

789 10.1099/vir.0.2008/002097-0. PubMed PMID: 18753225.

790 20. Bird BH, Maartens LH, Campbell S, Erasmus BJ, Erickson BR, Dodd KA, et al. Rift
791 Valley fever virus vaccine lacking the NSs and NSm genes is safe, nonteratogenic, and confers
792 protection from viremia, pyrexia, and abortion following challenge in adult and pregnant
793 sheep. *J Virol*. 2011;85(24):12901-9. Epub 2011/10/07. doi: JVI.06046-11 [pii]

794 10.1128/JVI.06046-11. PubMed PMID: 21976656.

795 21. Morrill JC, Laughlin RC, Lokugamage N, Pugh R, Sbrana E, Weise WJ, et al. Safety and
796 immunogenicity of recombinant Rift Valley fever MP-12 vaccine candidates in sheep.
797 *Vaccine*. 2013;31(3):559-65. Epub 2012/11/17. doi: S0264-410X(12)01596-4 [pii]

798 10.1016/j.vaccine.2012.10.118. PubMed PMID: 23153443.

799 22. Morrill JC, Laughlin RC, Lokugamage N, Wu J, Pugh R, Kanani P, et al. Immunogenicity
800 of a recombinant Rift Valley fever MP-12-NSm deletion vaccine candidate in calves. *Vaccine*.
801 2013;31(43):4988-94. Epub 2013/09/03. doi: S0264-410X(13)01087-6 [pii]

802 10.1016/j.vaccine.2013.08.003. PubMed PMID: 23994375.

- 803 23. Oreshkova N, van Keulen L, Kant J, Moormann RJ, Kortekaas J. A single vaccination
804 with an improved nonspreading Rift Valley fever virus vaccine provides sterile immunity in
805 lambs. *PLoS One*. 2013;8(10):e77461. Epub 2013/10/30. doi: 10.1371/journal.pone.0077461
806 PONE-D-13-29449 [pii]. PubMed PMID: 24167574.
- 807 24. Weingartl HM, Nfon CK, Zhang S, Marszal P, Wilson WC, Morrill JC, et al. Efficacy of a
808 recombinant Rift Valley fever virus MP-12 with NSm deletion as a vaccine candidate in
809 sheep. *Vaccine*. 2014;32(20):2345-9. Epub 2014/01/28. doi: S0264-410X(13)01815-X [pii]
810 10.1016/j.vaccine.2013.12.064. PubMed PMID: 24462482.
- 811 25. Wichgers Schreur PJ, Kant J, van Keulen L, Moormann RJ, Kortekaas J. Four-
812 segmented Rift Valley fever virus induces sterile immunity in sheep after a single
813 vaccination. *Vaccine*. 2015;33(12):1459-64. Epub 2015/02/11. doi: S0264-410X(15)00134-6
814 [pii]
815 10.1016/j.vaccine.2015.01.077. PubMed PMID: 25665959.
- 816 26. Boumart Z, Daouam S, Bamouh Z, Jazouli M, Tadlaoui KO, Dungu B, et al. Safety and
817 immunogenicity of a live attenuated Rift Valley Fever recombinant arMP-12DeltaNSm21/384
818 vaccine candidate for sheep, goats and calves. *Vaccine*. 2019;37(12):1642-50. Epub
819 2019/02/19. doi: S0264-410X(19)30152-5 [pii]
820 10.1016/j.vaccine.2019.01.067. PubMed PMID: 30773401.
- 821 27. Nyundo S, Adamson E, Rowland J, Palermo PM, Matiko M, Bettinger GE, et al. Safety
822 and immunogenicity of Rift Valley fever MP-12 and arMP-12DeltaNSm21/384 vaccine
823 candidates in goats (*Capra aegagrus hircus*) from Tanzania. *Onderstepoort J Vet Res*.
824 2019;86(1):e1-e8. Epub 2019/03/08. doi: 10.4102/ojvr.v86i1.1683. PubMed PMID: 30843406;
825 PubMed Central PMCID: PMC6407455.
- 826 28. Oreshkova N, Cornelissen LA, de Haan CA, Moormann RJ, Kortekaas J. Evaluation of
827 nonspreading Rift Valley fever virus as a vaccine vector using influenza virus hemagglutinin
828 as a model antigen. *Vaccine*. 2014;32(41):5323-9. Epub 2014/07/30. doi: S0264-
829 410X(14)00994-3 [pii]
830 10.1016/j.vaccine.2014.07.051. PubMed PMID: 25066737.
- 831 29. Nomikou K, Hughes J, Wash R, Kellam P, Breard E, Zientara S, et al. Widespread
832 Reassortment Shapes the Evolution and Epidemiology of Bluetongue Virus following
833 European Invasion. *PLoS Pathog*. 2015;11(8):e1005056. Epub 2015/08/08. doi:
834 10.1371/journal.ppat.1005056
835 PPATHOGENS-D-14-02759 [pii]. PubMed PMID: 26252219; PubMed Central PMCID:
836 PMC4529188.
- 837 30. Marin-Lopez A, Otero-Romero I, de la Poza F, Menaya-Vargas R, Calvo-Pinilla E,
838 Benavente J, et al. VP2, VP7, and NS1 proteins of bluetongue virus targeted in avian reovirus
839 muNS-Mi microspheres elicit a protective immune response in IFNAR(-/-) mice. *Antiviral Res*.
840 2014;110:42-51. Epub 2014/07/25. doi: 10.1016/j.antiviral.2014.07.008
841 S0166-3542(14)00207-1 [pii]. PubMed PMID: 25057758.
- 842 31. Martin-Folgar R, Lorenzo G, Boshra H, Iglesias J, Mateos F, Borrego B, et al.
843 Development and characterization of monoclonal antibodies against Rift Valley fever virus
844 nucleocapsid protein generated by DNA immunization. *MAbs*. 2010;2(3):275-84. Epub
845 2010/04/20. doi: 11676 [pii]. PubMed PMID: 20400862.
- 846 32. Marin-Lopez A, Ortego J. Generation of Recombinant Modified Vaccinia Virus Ankara
847 Encoding VP2, NS1, and VP7 Proteins of Bluetongue Virus. *Methods Mol Biol*. 2016;1349:137-
848 50. Epub 2015/10/16. doi: 10.1007/978-1-4939-3008-1_9. PubMed PMID: 26458834.

849 33. Toussaint JF, Sailleau C, Breard E, Zientara S, De Clercq K. Bluetongue virus detection
850 by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments. *J Virol Methods*.
851 2007;140(1-2):115-23. Epub 2007/01/02. doi: S0166-0934(06)00392-2 [pii]
852 10.1016/j.jviromet.2006.11.007. PubMed PMID: 17196266.

853 34. Borrego B, de Avila AI, Domingo E, Brun A. Lethal Mutagenesis of Rift Valley Fever
854 Virus Induced by Favipiravir. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019;63(8). Epub 2019/05/16.
855 doi: e00669-19 [pii]
856 10.1128/AAC.00669-19

857 AAC.00669-19 [pii]. PubMed PMID: 31085519; PubMed Central PMCID: PMC6658772.

858 35. Busquets N, Xavier F, Martin-Folgar R, Lorenzo G, Galindo-Cardiel I, del Val BP, et al.
859 Experimental infection of young adult European breed sheep with Rift Valley fever virus field
860 isolates. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2010;10(7):689-96. Epub 2010/09/22. doi:
861 10.1089/vbz.2009.0205. PubMed PMID: 20854022.

862 36. Dungu B, Louw I, Lubisi A, Hunter P, von Teichman BF, Bouloy M. Evaluation of the
863 efficacy and safety of the Rift Valley Fever Clone 13 vaccine in sheep. *Vaccine*.
864 2010;28(29):4581-7. Epub 2010/05/18. doi: S0264-410X(10)00621-3 [pii]
865 10.1016/j.vaccine.2010.04.085. PubMed PMID: 20470792.

866 37. Dungu B, Lubisi BA, Ikegami T. Rift Valley fever vaccines: current and future needs.
867 *Curr Opin Virol*. 2018;29:8-15. Epub 2018/03/08. doi: S1879-6257(18)30002-6 [pii]
868 10.1016/j.coviro.2018.02.001. PubMed PMID: 29514112.

869 38. Bird BH, Nichol ST. Breaking the chain: Rift Valley fever virus control via livestock
870 vaccination. *Curr Opin Virol*. 2012;2(3):315-23. Epub 2012/04/03. doi: S1879-6257(12)00045-
871 4 [pii]
872 10.1016/j.coviro.2012.02.017. PubMed PMID: 22463980.

873 39. Bouloy M, Flick R. Reverse genetics technology for Rift Valley fever virus: current and
874 future applications for the development of therapeutics and vaccines. *Antiviral Res*.
875 2009;84(2):101-18. Epub 2009/08/18. doi: S0166-3542(09)00419-7 [pii]
876 10.1016/j.antiviral.2009.08.002. PubMed PMID: 19682499.

877 40. Wichgers Schreur PJ, van Keulen L, Kant J, Kortekaas J. Four-segmented Rift Valley
878 fever virus-based vaccines can be applied safely in ewes during pregnancy. *Vaccine*.
879 2017;35(23):3123-8. Epub 2017/05/02. doi: S0264-410X(17)30498-X [pii]
880 10.1016/j.vaccine.2017.04.024. PubMed PMID: 28457675.

881 41. Oreshkova N, Spel L, Vloet RP, Wichgers Schreur PJ, Moormann RJ, Boes M, et al.
882 Preliminary Evaluation of a Bunyavirus Vector for Cancer Immunotherapy. *J Virol*.
883 2015;89(17):9124-7. Epub 2015/06/19. doi: 10.1128/JVI.01105-15
884 JVI.01105-15 [pii]. PubMed PMID: 26085169; PubMed Central PMCID: PMC4524072.

885 42. Nanyingi MO, Munyua P, Kiama SG, Muchemi GM, Thumbi SM, Bitek AO, et al. A
886 systematic review of Rift Valley Fever epidemiology 1931-2014. *Infect Ecol Epidemiol*.
887 2015;5:28024. Epub 2015/08/04. doi: 28024 [pii]. PubMed PMID: 26234531.

888 43. Hartman A. Rift Valley Fever. *Clin Lab Med*. 2017;37(2):285-301. Epub 2017/05/02.
889 doi: S0272-2712(17)30006-9 [pii]
890 10.1016/j.cll.2017.01.004. PubMed PMID: 28457351.

891 44. Gachohi JM, Njenga MK, Kitala P, Bett B. Modelling Vaccination Strategies against
892 Rift Valley Fever in Livestock in Kenya. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(12):e0005049. Epub
893 2016/12/16. doi: 10.1371/journal.pntd.0005049

894 PNTD-D-15-01722 [pii]. PubMed PMID: 27973528; PubMed Central PMCID: PMC5156372.
895 45. Andrew M, Whiteley P, Janardhana V, Lobato Z, Gould A, Coupar B. Antigen
896 specificity of the ovine cytotoxic T lymphocyte response to bluetongue virus. *Vet Immunol*
897 *Immunopathol.* 1995;47(3-4):311-22. Epub 1995/08/01. PubMed PMID: 8571549.
898 46. Owens RJ, Limn C, Roy P. Role of an arbovirus nonstructural protein in cellular
899 pathogenesis and virus release. *J Virol.* 2004;78(12):6649-56. Epub 2004/05/28. doi:
900 10.1128/JVI.78.12.6649-6656.2004

901 78/12/6649 [pii]. PubMed PMID: 15163755.
902 47. Calvo-Pinilla E, Navasa N, Anguita J, Ortego J. Multiserotype protection elicited by a
903 combinatorial prime-boost vaccination strategy against bluetongue virus. *PLoS One.*
904 2012;7(4):e34735. Epub 2012/04/20. doi: 10.1371/journal.pone.0034735

905 PONE-D-12-01868 [pii]. PubMed PMID: 22514660; PubMed Central PMCID: PMC3326038.
906 48. Cowley JA, Gorman BM. Effects of proteolytic enzymes on the infectivity,
907 haemagglutinating activity and protein composition of bluetongue virus type 20. *Vet*
908 *Microbiol.* 1990;22(2-3):137-52. Epub 1990/04/01. doi: 0378-1135(90)90101-Z [pii]. PubMed
909 PMID: 2162095.
910 49. Kerviel A, Ge P, Lai M, Jih J, Boyce M, Zhang X, et al. Atomic structure of the
911 translation regulatory protein NS1 of bluetongue virus. *Nat Microbiol.* 2019;4(5):837-45.
912 Epub 2019/02/20. doi: 10.1038/s41564-019-0369-x

913 10.1038/s41564-019-0369-x [pii]. PubMed PMID: 30778144; PubMed Central PMCID:
914 PMC6482088.
915 50. Boyce M, Celma CC, Roy P. Bluetongue virus non-structural protein 1 is a positive
916 regulator of viral protein synthesis. *Virology.* 2012;9:178. Epub 2012/08/31. doi: 10.1186/1743-
917 422X-9-178

918 1743-422X-9-178 [pii]. PubMed PMID: 22931514; PubMed Central PMCID: PMC3479040.
919 51. Gomet C, Billecocq A, Jouvion G, Hasan M, Zaverucha do Valle T, Guillemot L, et al.
920 Tissue tropism and target cells of NSs-deleted rift valley fever virus in live immunodeficient
921 mice. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(12):e1421. Epub 2011/12/14. doi:
922 10.1371/journal.pntd.0001421

923 PNTD-D-11-00535 [pii]. PubMed PMID: 22163058.
924 52. Calvo-Pinilla E, Rodriguez-Calvo T, Anguita J, Sevilla N, Ortego J. Establishment of a
925 bluetongue virus infection model in mice that are deficient in the alpha/beta interferon
926 receptor. *PLoS One.* 2009;4(4):e5171. Epub 2009/04/10. doi: 10.1371/journal.pone.0005171.
927 PubMed PMID: 19357779; PubMed Central PMCID: PMC2663843.
928 53. Marin-Lopez A, Bermudez R, Calvo-Pinilla E, Moreno S, Brun A, Ortego J. Pathological
929 Characterization Of IFNAR(-/-) Mice Infected With Bluetongue Virus Serotype 4. *Int J Biol Sci.*
930 2016;12(12):1448-60. Epub 2016/12/21. doi: 10.7150/ijbs.14967

931 ijbsv12p1448 [pii]. PubMed PMID: 27994510; PubMed Central PMCID: PMC5166487.
932 54. Faburay B, Lebedev M, McVey DS, Wilson W, Morozov I, Young A, et al. A
933 glycoprotein subunit vaccine elicits a strong Rift Valley fever virus neutralizing antibody
934 response in sheep. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2012;14(10):746-56. Epub 2014/10/18. doi:
935 10.1089/vbz.2014.1650. PubMed PMID: 25325319.
936 55. Zhugunissov K, Yershebulov Z, Barakbayev K, Bulatov Y, Taranov D, Amanova Z, et al.
937 Duration of protective immunity after a single vaccination with a live attenuated bivalent
938 bluetongue vaccine. *Vet Res Commun.* 2015;39(4):203-10. Epub 2015/08/19. doi:
939 10.1007/s11259-015-9643-4

940 **10.1007/s11259-015-9643-4 [pii]. PubMed PMID: 26280208; PubMed Central PMCID:**
 941 **PMC4643103.**
 942 **56. Celma CC, Boyce M, van Rijn PA, Eschbaumer M, Wernike K, Hoffmann B, et al. Rapid**
 943 **generation of replication-deficient monovalent and multivalent vaccines for bluetongue**
 944 **virus: protection against virulent virus challenge in cattle and sheep. J Virol.**
 945 **2013;87(17):9856-64. Epub 2013/07/05. doi: 10.1128/JVI.01514-13**
 946 **JVI.01514-13 [pii]. PubMed PMID: 23824810; PubMed Central PMCID: PMC3754119.**
 947 **57. Sobharani V, Singh KP, Maity M, Sharma GK, Saminathan M, Sahoo D, et al.**
 948 **Comparative study on hemato-biochemical alterations and selected acute phase protein**
 949 **response in native sheep experimentally infected with bluetongue virus serotypes 10 and 24.**
 950 **. Comp Clin Pathol 2019;28:1153–63 doi: doi:10.1007/s00580-019-02950-x.**
 951 **58. Aytakin I, Aksit H, Sait A, Kaya F, Aksit D, Gokmen M, et al. Evaluation of oxidative**
 952 **stress via total antioxidant status, sialic acid, malondialdehyde and RT-PCR findings in sheep**
 953 **affected with bluetongue. Vet Rec Open. 2015;2(1):e000054. Epub 2015/09/24. doi:**
 954 **10.1136/vetreco-2014-000054**
 955 **vetreco-2014-000054 [pii]. PubMed PMID: 26392885; PubMed Central PMCID: PMC4567142.**
 956 **59. Lorenzo G, Lopez-Gil E, Ortego J, Brun A. Efficacy of different DNA and MVA prime-**
 957 **boost vaccination regimens against a Rift Valley fever virus (RVFV) challenge in sheep 12**
 958 **weeks following vaccination. Vet Res. 2018;49(1):21. Epub 2018/02/23. doi: 10.1186/s13567-**
 959 **018-0516-z**
 960 **10.1186/s13567-018-0516-z [pii]. PubMed PMID: 29467018; PubMed Central PMCID:**
 961 **PMC5822472.**

962
 963

964 **Supporting information Captions**

965 **S1 Fig. Detection of the VP2 gene by PCR in infected rZH548-ΔNSs::VP2_{BTV-4} or BTV-4 cultures.**
 966 A Schematic of the amplification strategy. Different size VP2 fragments were amplified from cDNA
 967 templates. cDNA primers used for first strand synthesis are depicted in red. B Detection of specific
 968 fragment by agarose gel electrophoresis.

969 **S2 Fig. Analysis of the genomic stability of the recombinant viruses.** A. Schematic of the passage
 970 history of the recombinant viruses. Vero cell monolayers were infected with of a MOI of 1 with each
 971 virus from a first (P1), second (P2), third (P3), or fourth (P4) passage. B. Relative detection of L segment
 972 RNA (red line) and NS1Nt gene (green) from ZH548-ΔNSs::NS1Nt_{BTV-4} by RT-qPCR (left Y axis). Bars
 973 represent the L/NS1 ratio from Ct values (right Y axis). C. Relative detection of RVFV nucleoprotein N
 974 (red) and BTV VP2 (green) genes from ZH548-ΔNSs::VP2_{BTV-4} by PCR. Bars represent the S-
 975 segment/VP2 ratio from densitometry values of gel-based DNA fragments of 521bp and 653bp
 976 corresponding to the N and VP2 genes respectively.

977 **S3 Fig. Antibody ELISA.** Detection of anti-RVFV nucleoprotein N antibodies 14 days upon inoculation
 978 with 10⁷ pfu of rZH548-ΔNSs::VP2_{BTV-4} and rZH548-ΔNSs::NS1Nt_{BTV-4} or PBS (mock inoculated

979 control) by ELISA. Bars represent median plus interquartile range. *P<0.05 (Anova, non-parametric
980 Kruskal-Wallis test).

981 **S4 Fig. Clinical evaluation of sheep** A. Clinical display of vaccinated sheep groups at different days
982 after challenge. Scoring was based on the severity of signs observed by blinded veterinary personnel (see
983 Methods). The graph represent the mean (horizontal lines) and min to max values (bars). B. Blood
984 chemistry analysis in RVFV vaccinated and challenged sheep. The following biochemical parameters
985 were measured in serum taken at the indicated days post vaccination (dpv) or post challenge (dpc): AST:
986 Aspartate aminotransferase. ALT: Alanine aminotransferase. LDH: Lactate dehydrogenase. GGT:
987 Gamma-glutamyltransferase. ALP: Alkaline phosphatase. ALB: serum albumin. BIL: serum bilirubin.
988 BUN: serum urea nitrogen. TP: serum total protein. Error bars represent SD. Shaded areas denote
989 normal sheep enzyme values as described previously [59].

990

991

ARTICLE OPEN



A protective bivalent vaccine against Rift Valley fever and bluetongue

Eva Calvo-Pinilla¹, Alejandro Marín-López^{1,2}, Sandra Moreno¹, Gema Lorenzo¹, Sergio Utrilla-Trigo¹, Luis Jiménez-Cabello¹, Julio Benavides³, Aitor Nogales¹, Rafael Blasco⁴, Alejandro Brun¹✉ and Javier Ortego¹✉

Rift Valley fever (RVF) and bluetongue (BT) are two important ruminant diseases transmitted by arthropods. Both viruses have shown important geographic spread leading to endemicity of BT virus (BTV) in Africa and Europe. In this work, we report a dual vaccine that simultaneously induces protective immune responses against BTV and RVFV based on modified vaccinia Ankara virus (MVA) expressing BTV proteins VP2, NS1, or a truncated form of NS1 (NS1-Nt), and RVFV Gn and Gc glycoproteins. IFNAR^(-/-) mice immunized with two doses of MVA-GnGc-VP2 developed a significant neutralizing antibody response against BTV-4 and RVFV. Furthermore, the homologous prime-boost immunization with MVA-GnGc-NS1 or MVA-GnGc-NS1-Nt triggered neutralizing antibodies against RVFV and NS1-specific cytotoxic CD8⁺ T cells in mice. Moreover, all mice immunized with MVA-GnGc-NS1 or MVA-GnGc-NS1-Nt remained healthy after lethal challenge with RVFV or BTV-4. The homologous prime-boost vaccination with MVA-GnGc-NS1, which was the best immunization strategy observed in mice, was assayed in sheep. Clinical signs and viremia were absent or highly reduced in vaccinated sheep after challenge with BTV-4 or RVFV. These results indicate that MVA-GnGc-NS1 vaccination elicits immune protection against RVFV and BTV in sheep.

npj Vaccines (2020)5:70; <https://doi.org/10.1038/s41541-020-00218-y>

INTRODUCTION

Ruminants are affected by a variety of viral infections, including Rift Valley fever virus (RVFV) and bluetongue virus (BTV). These pathogens cause epidemics of severe disease, particularly in sheep, with serious implications for agricultural livestock and trade. BTV is globally distributed, being the Antarctica the only continent free of BTV infection for now¹. Although RVFV is mainly present in Africa, recent outbreaks in the Middle East have demonstrated its potential to spread beyond the African continent². As vector-borne diseases, these viruses can be transmitted very rapidly through several species of hematophagous insects^{3,4}; which, coupled with global climate change increase the risk of introduction of these viruses in non-endemic regions by the expansion of the vector's range. In order to prevent the spread of these arboviruses, improved vaccination strategies need to be developed. The use of multivalent vaccines that could provide immunity against a prevalent disease for which vaccination is mandatory, i.e., BTV in Europe, while immunizing against other diseases of more sporadic nature, such as RVFV would be a potential strategy to overcome this problem and to reduce the cost of vaccine production.

Although live-attenuated RVF vaccines are used to control the disease in Africa, they have major safety concerns⁵. RVFV is a negative single-stranded RNA virus belonging to the *Bunyavirales* order and family *Phenuviridae* that occurs as a single serotype. The RVFV genome is composed of three segments, large (L), medium (M), and small (S; Fig. 1). The M segment encodes two glycoproteins Gn and Gc, involved in cell attachment and virus-cell membrane fusion, and two accessory proteins⁶. As Gn and Gc are the major antigenic components on the viral membrane and are the main inducers of neutralizing antibodies⁷, they are ideal targets for vaccine development. These glycosylated

proteins have been also shown to stimulate a robust T-cell response correlated with protective immunity against virus infection^{8–10}.

BTV belongs to the *Reoviridae* family, genus *Orbivirus*, and has a segmented dsRNA genome¹¹. This virus has undergone considerable expansion worldwide over the past decades with 27 serotypes described to date¹². Control of BT mainly relies in the use of inactivated vaccines against prevalent BTV; however, these do not offer cross-protection among serotypes. Antigenic variability of BTV is the major obstacle of cross-protective immunity. VP2 protein forms, together with VP5, the outer capsid of BTV particle (Fig. 1), and is involved in cell attachment and virus entry^{11,13}. This protein is the main target of neutralizing antibodies¹⁴. Although neutralizing antibodies directed to BTV VP2 protein can prevent infection with homologous BTV, these are serotype specific. Thus, vaccines that induce a cross-reactive T-cell response are needed to elicit multiserotype protection. NS1 is the most synthesized viral protein in BTV-infected cells and is involved in upregulation of viral protein synthesis¹⁵. This protein contains epitopes associated with both T-cell and humoral responses^{16,17}. Importantly, the amino acid sequence of BTV NS1 protein is highly conserved between BTV serotypes, and we have previously shown that the cellular immune response against NS1 or its N-terminal region (NS1-Nt) is protective against heterologous serotypes^{18,19}.

In previous works, BTV NS1 and VP2 proteins and RVFV Gn/Gc proteins were described as promising candidate antigens for the development of recombinant vaccines. Recombinant MVAs expressing those proteins were able to provide efficient protection against BTV or RVFV virulent challenge in mice^{19–21}. In this work, MVA-vectored vaccines were designed to express these highly immunogenic antigens of BTV and RVFV simultaneously. We analyzed the adaptive immune responses and protection of these

¹Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Centro de Investigación en Sanidad Animal (INIA-CISA), Madrid, Spain. ²Section of Infectious Diseases, Department of Internal Medicine, Yale University School of Medicine, New Haven, CT, USA. ³Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-Universidad de León), León, Spain. ⁴Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Departamento de Biotecnología, Madrid, Spain. ✉email: brun@inia.es; ortego@inia.es

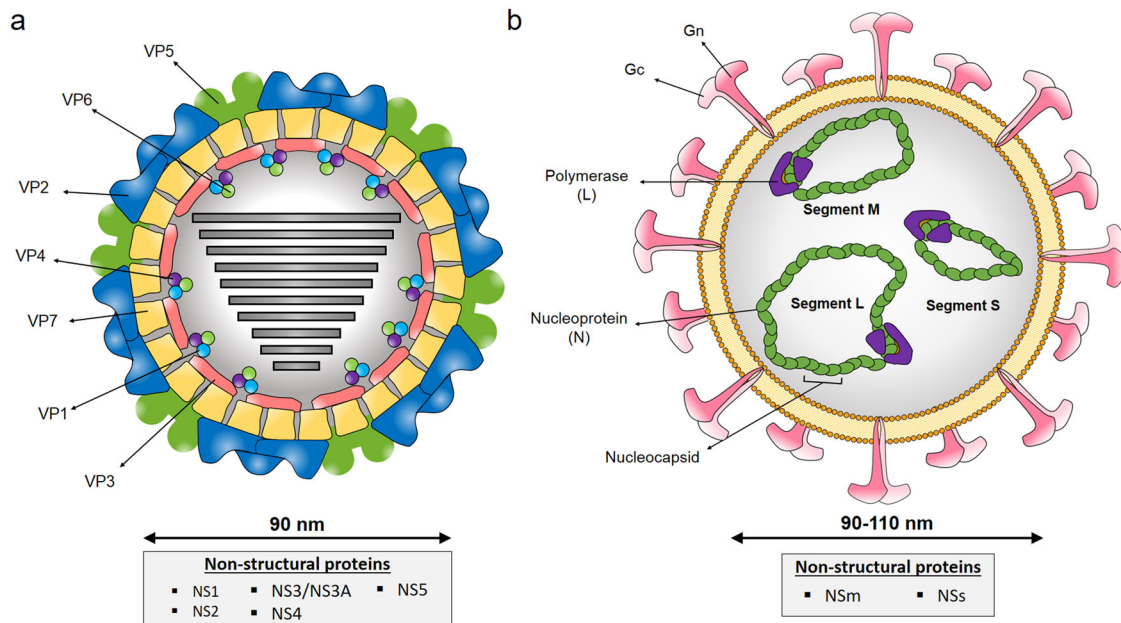


Fig. 1 Diagrammatic representation of the viral particles of BTV and RVFV. **a** Three concentric layers constituted by VP2 and VP5 (outer capsid), VP7 (intermediate layer), and VP3 (subcore) characterized BTV virions (~90 nm in diameter). The RNA polymerase complex, which is located inside the inner capsid, is composed by structural proteins VP1, VP4, and VP6. Five additional proteins (NS1, NS2, NS3/NS3A, NS4, and NS5) are synthesized inside the cell during the replicative cycle. VP2 and NS1 proteins of BTV are expressed by the recombinant MVAs. **b** Enveloped virions of RVFV (~90–110 nm in diameter) are characterized by a negative or ambisense RNA genome composed of three single-stranded segments (designated L, M, and S). These three RNA molecules are encapsidated by the nucleoprotein (N), shaping the nucleocapsid which interacts with the viral polymerase (L). Glycoproteins Gn and Gc, expressed by recombinant MVAs, elicit production of virus-neutralizing antibodies. Nonstructural proteins NSm and NSs are expressed during infection.

vaccines in both mice and sheep, and we showed that MVA-GnGc-NS1 conferred protection against BTV or RVFV challenges in both, the murine model and the natural host.

RESULTS

Expression of heterologous proteins by MVA vectors

Recombinant dual MVA viruses expressing the RVFV Gn and Gc glycoproteins, and BTV proteins VP2, NS1, or a truncated form of NS1 (NS1-Nt) were generated. A RVFV GnGc polyprotein sequence was inserted into the F13L locus, while the BTV segments were cloned into the TK locus, generating the MVA-GnGc-VP2, MVA-GnGc-NS1, and MVA-GnGc-NS1-Nt constructs as described in “Methods” section. To determine whether the heterologous BTV and RVFV proteins were efficiently expressed by the dual MVA system, DF-1 cells were infected with each recombinant virus for 48 h and immunofluorescence assays were carried out. Figure 2 confirms the efficient expression of RVFV glycoprotein antigens, and BTV VP2, NS1, and NS1-Nt proteins in cells infected with the dual MVA vaccine vectors that were used for immunization subsequently.

Immune responses induced by dual MVA against proteins of RVFV and BTV in mice

A number of experimental vaccines for BTV and RVFV have been previously studied in the mouse model based on IFNAR^(-/-) mice^{22–28}. Although extrapolation of findings in mice to natural hosts must be done with care due to differences in the biology between mouse and ruminants, experimental infections of IFNAR^(-/-) mice with several studied arboviruses, such as BTV and RVFV closely mimics hallmarks of these viruses in their natural host²⁹.

IFNAR^(-/-) mice were immunized twice with MVA-GnGc-NS1, MVA-GnGc-NS1-Nt, MVA-GnGc-VP2, or MVA-wt (mock-vaccinated

control), and humoral and cellular immune responses were measured 14 or 10 days after boost, respectively. MVA-GnGc-VP2-immunized animals developed significant neutralizing antibody response against BTV-4 (Fig. 3a) and RVFV (Fig. 3b) compared to mock-vaccinated mice; with a mean of 2.21 ± 0.24 and 4.06 ± 0.22 log PRNT₅₀ (plaque reduction neutralization test), respectively. The recombinants MVA-GnGc-NS1 and MVA-GnGc-NS1-Nt induced neutralizing antibodies specific of RVFV in the immunized mice (log PRNT₅₀ of 3.72 ± 0.31 and 3.73 ± 0.15 , respectively; Fig. 3b), but not against BTV-4 as expected¹⁹ (Fig. 3a).

The presence of specific antibodies to VP2 and NS1 in serum was also analyzed by ELISA at 14 days after boost. Antibodies against VP2 were observed in MVA-GnGc-VP2-vaccinated mice indicating seroconversion (Fig. 3c), with a mean value of 1.79 optical density (OD)_{450nm} (1/50 serum dilution). On the other hand, NS1-specific antibodies were detected in the groups immunized with MVA-GnGc-NS1 and MVA-GnGc-NS1-Nt, with mean levels of 0.62 and 0.34 OD_{450nm}, respectively, at the lowest serum dilution tested (Fig. 3d).

In addition to the virus-neutralizing activity induced by either GnGc or VP2 proteins delivered by the recombinant MVAs, we determined, by intracellular cytokine staining, the ability of NS1 and NS1-Nt proteins expressed by the dual MVAs to elicit specific T-cell immune responses. Ten days after the second vaccination with MVA-GnGc-NS1 and MVA-GnGc-NS1-Nt, whole splenocytes from mice ($n = 4$) were restimulated with the NS1-specific T-cell peptide (namely #152), as well as with an irrelevant (off target) peptide (namely #14), for 6 h. The restimulation of spleen cells with the NS1 peptide 152 significantly increased ($p < 0.05$) the expression of IFN- γ and CD107a by CD8+ T cells from MVA-GnGc-NS1 and MVA-GnGc-NS1-Nt-vaccinated mice (Fig. 4). CD107a has been described as a marker of cytotoxic CD8+ T-cell degranulation and cytotoxic activity³⁰, and these results indicated that NS1 and NS1-Nt antigens expressed by dual MVA vaccines were

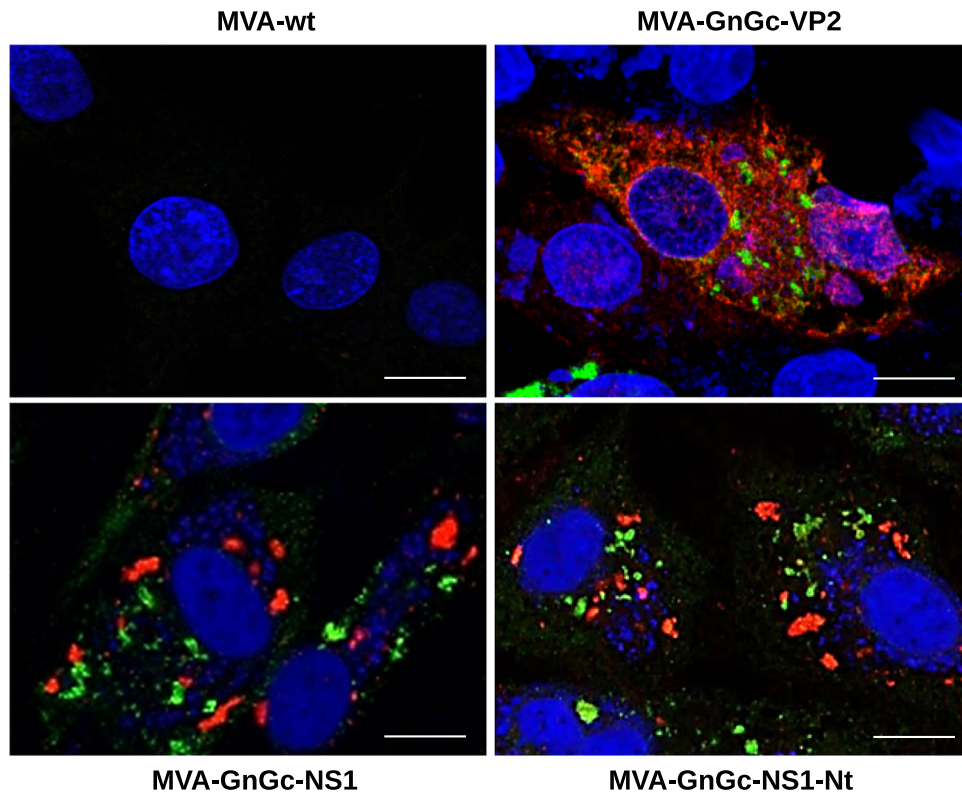


Fig. 2 Expression analysis of heterologous proteins by MVA-GnGc-VP2, MVA-GnGc-NS1, and MVA-GnGc-NS1-Nt vectors. DF-1 cells were infected with recombinant MVAs (MOI 0.1) and immunofluorescence analysis was performed at 48 h.p.i. Expression of Gn and Gc was detected by staining with serum from sheep infected with RVFV and a secondary green antibody. BTV proteins (VP2, NS1, and NS1-Nt) were detected with BTV-infected mouse serum and a secondary red antibody. Images visualized by confocal microscopy (63 \times). Scale bars 10 μ m.

capable of inducing a strong CD8⁺ T-cell response, and activating the induction of CTLs *in vivo*.

Protection against BTV in IFNAR^(-/-) mice

We then determined the protective capacity of immunization regimes with MVA-GnGc-NS1, MVA-GnGc-NS1-Nt, and MVA-GnGc-VP2. Groups of IFNAR^(-/-) mice ($n = 5$) immunized in a prime-boost regimen at 3-week interval with the recombinant MVAs or with MVA-wt were challenged 2 weeks after the second immunization with a lethal dose of BTV-4 (10^7 plaque forming units (PFU) per mouse). The non-immunized animals showed clinical signs as early as 3 d.p.i., including ruffled hair, ocular discharges, and reduced activity. These mice were euthanized between 5 and 6 d.p.i. when clinical scores reached humane endpoint. Viremia rapidly increased in all non-vaccinated mice at 3 d.p.i. and reached a mean value of 3.56 log PFU/ml at 5 d.p.i. (Fig. 5a). All mice immunized with MVA-GnGc-VP2 remained healthy, except for one individual, which displayed clinical signs and viremia at 5 d.p.i. and was euthanized (Fig. 5a, b). In contrast, none of the mice vaccinated with two doses of MVA-GnGc-NS1 and MVA-GnGc-NS1-Nt developed clinical signs of disease throughout the experiment. Viremia was not detected at any time point during the experiment in the latter groups of mice (Fig. 5a). Together, these data indicate that immunization with MVA-GnGc-VP2, MVA-GnGc-NS1, or MVA-GnGc-NS1-Nt induces protection in IFNAR^(-/-) mice upon a lethal BTV-4 challenge.

Protection against RVFV in BALB/c mice

Previous work in our laboratory has shown that MVA-NS1 protects against multiple serotypes of BTV¹⁹. Based in our previous results, we chose the best vaccine candidate, MVA-GnGc-NS1, to continue our studies in order to assess its immunogenicity and protective

efficacy against RVFV. To analyze the protective immunity elicited upon MVA-GnGc-NS1 immunization, BALB/c mice were used as mouse model for RVFV challenge. Groups of mice ($n = 5$) were inoculated with two doses of MVA-wt or MVA-GnGc-NS1 3 weeks apart. At day 14 post booster, mice were bled for antibody analysis and challenged with a dose of 500 PFU of RVFV 56/74 strain, viremia was assessed at 3 d.p.i. and clinical manifestations were monitored for 2 weeks. MVA-GnGc-NS1 immunization in BALB/c mice resulted in a robust anti-RVFV neutralizing antibody response, similar to that observed in IFNAR^(-/-) mice, reaching a log PRNT₅₀ titer of 3.29 ± 0.03 (Fig. 6a). At 3 d.p.i., all non-vaccinated mice displayed clinical signs of disease, including ruffled hair, hunching, weight loss, and reduced activity. Three of these mice had to be euthanized following clinical scores reaching the humane endpoint. The remaining two mice recovered by 7 d.p.i. (Fig. 6c). In contrast, all MVA-GnGc-NS1-immunized mice did not develop any clinical signs and were healthy throughout the experiment. Viremia was detected in all non-vaccinated animals at 3 d.p.i., with titers between 5.2×10^3 and 1.2×10^4 PFU/ml, whereas no infectious virus was found in blood of any mice that received MVA-GnGc-NS1 vaccine (Fig. 6b).

MVA-GnGc-NS1 confers protection in sheep after BTV challenge

The data on protection against BTV-4 and RVFV conferred by MVA-GnGc-NS1 to mouse models prompted us to test its efficacy as potential vaccine for ruminants. Three sheep were inoculated twice with 10^8 PFU of either MVA-GnGc-NS1 or MVA-wt at days 0 and 28, and no clinical display nor adverse effects were noticed in any animal. At 31 days post boost (d.p.b.), the sheep were challenged subcutaneously with 10^6 PFU of BTV-4M strain (isolated from sheep blood in KC insect cells and not previously passed through mammalian cell lines), and viremia and clinical

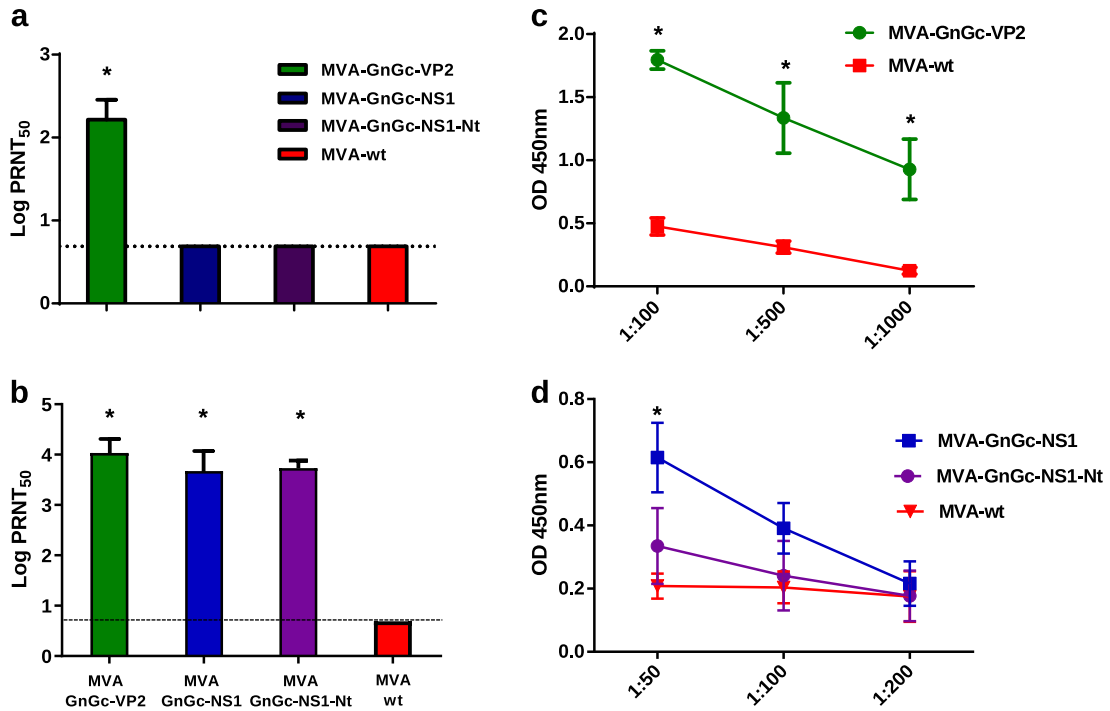


Fig. 3 Humoral responses against BTV and RVFV elicited by MVA recombinant vaccines 2 weeks post booster in mice. Induction of virus-neutralizing antibodies against BTV **a** and RVFV **b** in animals immunized with MVA recombinant vaccines by plaque reduction neutralization assay. The columns represent the mean of the group and error bars that indicate the SD. Cutoff: 0.69 (log 5). **c** Induction of IgG VP2 antibodies by indirect ELISA in MVA-GnGc-VP2-vaccinated animals. Three dilutions of sera were tested (x-axis) and lines represent media. **d** Induction of IgG NS1 antibodies by indirect ELISA in MVA-GnGc-NS1- and MVA-GnGc-NS1-Nt-vaccinated mice. Three dilutions of sera were tested (x-axis). Lines represent means and error bars the SD. Statistical differences were calculated by Mann-Whitney nonparametric tests; * $p \leq 0.05$.

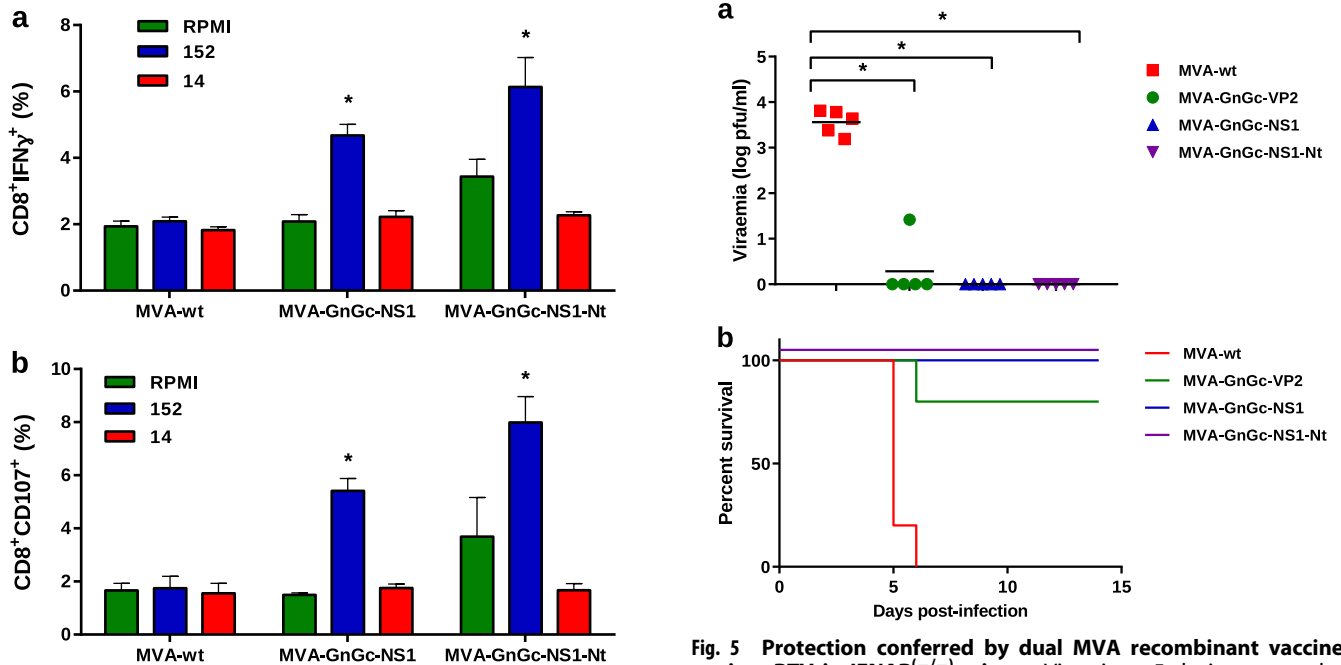


Fig. 4 MVA recombinant vaccines in mice elicit cellular immune responses. Percentage of CD8⁺IFN γ ⁺ cells (**a**) and CD8⁺CD107⁺ (**b**) after stimulation with peptides 152 and 14 (irrelevant peptide) or no stimulation (RPMI). The columns represent mean of the group and error bars the SD. The Mann-Whitney *U* test was used for statistical comparisons; * $p \leq 0.05$.

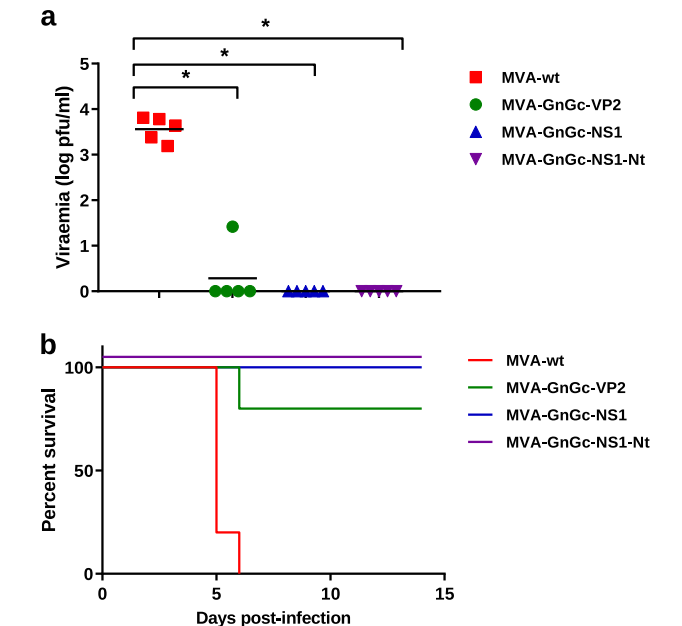


Fig. 5 Protection conferred by dual MVA recombinant vaccines against BTV in IFNAR^{-/-} mice. **a** Viraemia at 5 d.p.i. expressed as log PFU/ml of mice at day 5 after challenge with 500 PFU of BTV-4. Differences between groups were calculated by multiple *t*-test analysis using the Sidak-Bonferroni method. **b** Survival rates of vaccinated and non-vaccinated mice after challenge. Survival data were analyzed using a log-rank test with mice grouped by immunization strategy; * $p \leq 0.05$.

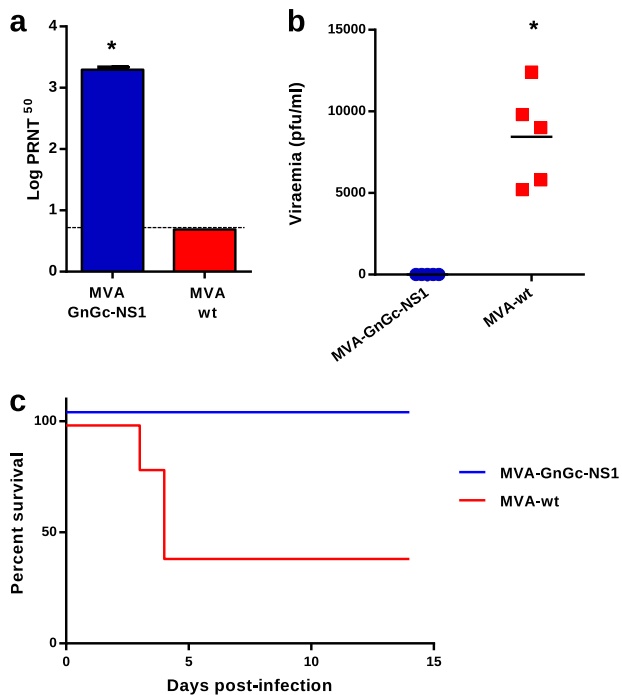


Fig. 6 Protective efficacy by dual MVA-GnGc-NS1 immunization after challenge with RVFV. Balb/C mice were inoculated with MVA-wt or MVA-GnGc-NS1, and then infected with 500 PFU of RVFV at day 35. **a** Level of neutralizing antibodies against RVFV at 14 d.p.v. **b** Viraemia at 3 d.p.i. measured by plaque assay on Vero cells and expressed as PFU/ml. Horizontal lines indicate mean. Statistical differences were calculated by Mann-Whitney nonparametric tests. **c** Survival rates of vaccinated and non-vaccinated mice after challenge; * $p \leq 0.05$.

signs analyzed for 3 weeks. At 7 d.p.i., all non-vaccinated sheep developed pyrexia with a mean value of 40.47 °C, whereas vaccinated sheep showed lower temperature (mean 40.16 °C). Moreover, pyrexia in control animals persisted at 8 d.p.i. (mean 40.27 °C), while the mean rectal temperature of vaccinated sheep decreased below the baseline levels (39.6 °C; fever threshold ≥ 39.73 °C, described in “Methods” section; Fig. 7a).

Since the virus present in the blood of sheep infected with BTV-4M does not form lysis plaques in Vero cells, viraemia was tested by real-time RT-PCR (Fig. 7b). Viral RNA was detected in non-vaccinated sheep starting from 2 d.p.i., reaching higher levels at 7 d.p.i. (mean Ct 20.9, $\geq 10^4$ PFU/ml). In contrast, lower levels of viral RNA were detected in MVA-GnGc-NS1-immunized group from 2 to 14 d.p.i. (mean Ct 24.9 and two out of three sheep $\leq 10^3$ PFU/ml at 7 d.p.i.) compared to control sheep, indicating that the vaccinated sheep partially prevented BTV replication. These results indicate that the immunization of sheep with a homologous prime-boost of MVA-GnGc-NS1 confers partial protection against BTV-4M and reduces viraemia and clinical signs.

MVA-GnGc-NS1 confers protection in sheep after RVFV challenge

Three weeks after BTV infection, animals were completely recovered and were bled to analyze RVFV neutralizing antibodies. Titers of antibodies ranged from 2.23 to 2.37 log PRNT₅₀. At 52 d.p.b., sheep were challenged subcutaneously with a dose of 10^7 PFU of virulent RVFV 56/74 strain and monitored for 8 days.

After infection, all non-vaccinated animals responded with pyrexia at 1 d.p.i. (mean 40.23 °C) and peak temperatures occurred in this group at 2 d.p.i. (mean 41.4 °C). In contrast, vaccinated animals did not increase in mean rectal temperature at 2 d.p.i. (39.4 °C) compared to their mean baseline value at 0 d.p.i. (39.73 °C).

Although at 1 d.p.i., vaccinated sheep did slightly surpass (mean 39.8 °C) the fever threshold, they had lower temperatures compared to control group (Fig. 7c).

High levels of viraemia were found in non-vaccinated sheep from 1 to 3 d.p.i. (Fig. 7d), with a mean peak value of 4.21×10^4 PFU/ml at 2 d.p.i. In contrast, only one vaccinated sheep (number 982) showed viraemia at 3 d.p.i. (4.5×10^3 PFU/ml), but lower than the non-vaccinated sheep and the two remaining sheep did not developed viraemia at any time of the experiment.

Biochemical parameters after RVFV infection

RVFV infection induces aberrations in biochemistry values, especially in liver enzymes. To confirm the protection elicited by MVA-GnGc-NS1, blood biochemistry parameters were analyzed in immunized and non-immunized sheep after infection with RVFV. The control group responded with increased concentrations of the enzyme aspartate transaminase (AST) from 2 to 7 d.p.i. with peak levels of 470.2 U/l occurring at 3 d.p.i. (normal range = 60–280 U/l). In contrast, MVA-GnGc-NS1-vaccinated sheep maintained their serum AST concentrations at baseline levels throughout the study (Fig. 8a). Moreover, AST concentrations were significantly higher in the control group compared to the vaccinated group at 2 and 3 d.p.i. ($P < 0.05$). Gamma-glutamyltransferase (GGT) serum levels notably increased in the non-vaccinated group from 2 d.p.i., reaching peak levels of 137 U/l. GGT increases were statistically significant at 3, 5, and 7 d.p.i. when compared to vaccinated sheep (Fig. 8b), in which concentrations of GGT remained at baseline levels throughout the study. There were also differences in the levels of the enzyme lactate dehydrogenase (LDH) between vaccinated and non-vaccinated sheep after infection with RVFV (Fig. 8c). Non-vaccinated sheep responded to challenge with increased concentrations of LDH, reaching peak levels of 2816 U/l at 3 d.p.i. This elevation in the level of LDH in control sheep was statistically significant compared to vaccinated animals.

Total protein concentration in serum was also analyzed and control animals showed decreased values after infection (Fig. 8d). In non-vaccinated animals, the means of total protein concentrations were significantly lower than in vaccinated sheep from 3 to 7 d.p.i. Albumin level in sera from non-vaccinated sheep also decreased after infection with RVFV. In particular, there was a significant decline in albumin levels at 3 d.p.i. compared to vaccinated animals (Fig. 8e). These results are consistent with other studies of viral infections like hepatitis B or HIV that showed a decrease in the serum total protein and albumin level^{31,32}. Therefore, the study of biochemical markers showed that sheep vaccinated with MVA-GnGc-NS1 were protected against RVFV infection.

Histological findings

Multifocal necrotizing hepatitis is the most characteristic lesion of RVF cases in adult sheep³³. To assess the protection conferred by MVA-GnGc-NS1 immunization against RVFV, postmortem samples of the liver from all sheep were evaluated through histological and immunohistochemical methods. Multifocal hepatitis was found in every liver sample from the non-vaccinated RVFV-challenged animals. The most severe lesions were found in non-vaccinated sheep euthanized at 4 d.p.i., as there were several foci with central area of necrosis and hemorrhage surrounded by a moderate infiltration of lymphocytes, macrophages, and less numerous, neutrophils (Fig. 9a). The lesions in non-vaccinated ewe culled at 7 d.p.i. were similar but milder, as the foci were smaller and they were mainly composed of inflammatory infiltrate, where the necrosis was mostly absent (Fig. 9b). Finally, non-vaccinated sheep culled at 8 d.p.i. showed mild portal hypercellularity and small and scant aggregates of non-purulent inflammatory cells in the parenchyma (Fig. 9c). Samples from vaccinated sheep only showed mild portal hypercellularity

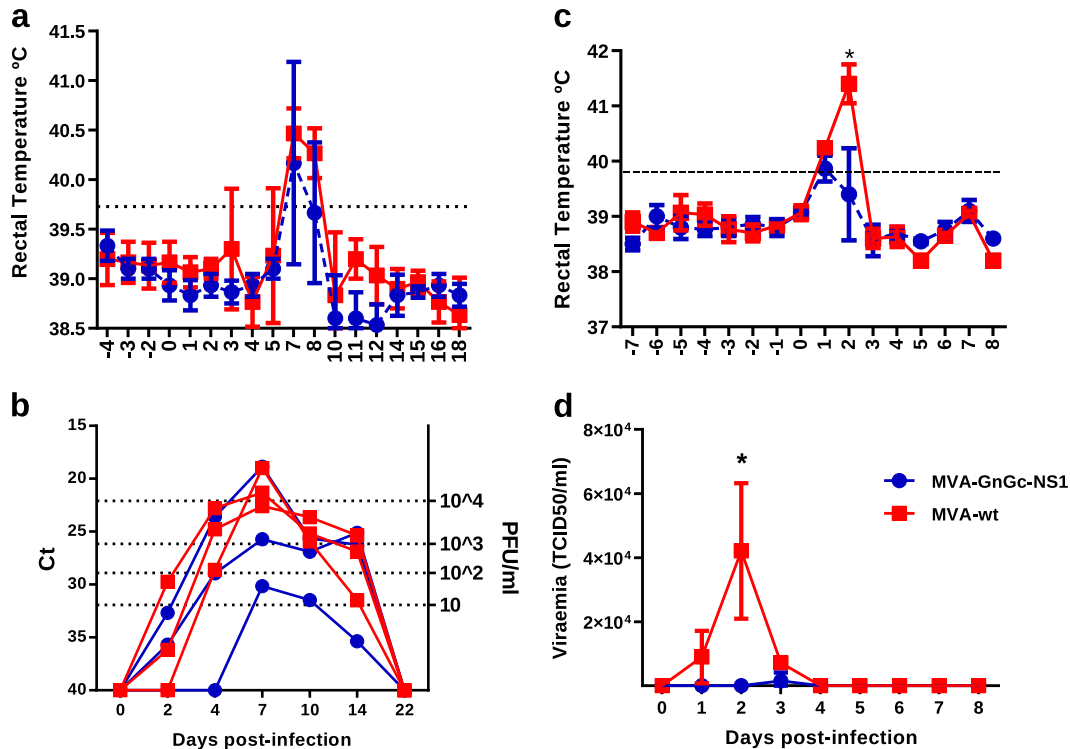


Fig. 7 Analysis of protection elicited by MVA-GnGc-NS1 immunization in sheep after infection with BTv or RVFV. **a** Mean rectal temperature responses in MVA-GnGc-NS1-vaccinated and MVA-wt non-vaccinated sheep from -4 to 18 d.p.i. with BTv. **b** Viraemia analyzed by real-time RT-PCR from 0 to 22 d.p.i. with BTv. Results are expressed as Ct (left y-axis) and PFU equivalents (right y-axis and dotted horizontal lines). The real-time RT-qPCR specific for BTv segment 5 was performed as described by Toussaint et al.⁵⁹ and sheep blood containing different known concentrations of virus were used as internal standards, and the Ct values indicated in the left y-axis¹⁹. **c** Mean rectal temperatures in vaccinated and non-vaccinated sheep after RVFV infection. Dotted line represents the fever threshold. **d** Means of viraemia analyzed by plaque assay after infection with RVFV. Dots indicate media of the group. Error bars represent SD. Differences between groups were calculated by multiple *t*-test analysis using the Sidak-Bonferroni method; * $p \leq 0.05$.

(Fig. 9d). Immunohistochemical labeling of RVFV antigen showed the presence of the virus in relation to the necrotic and inflammatory foci in the liver from non-vaccinated animals (Fig. 9e), while no detection of viral antigen was observed in samples from vaccinated sheep (Fig. 9f), except for one small isolated foci of infected cells in the vaccinated sheep #982 that displayed mild viraemia levels (data not shown). All these data indicate that immunization of sheep with MVA-GnGc-NS1 confers considerable protection against a RVFV challenge, and reduces or abrogates viraemia and clinical signs.

DISCUSSION

RVFV and BTv are two important pathogens that seriously affect ruminants, causing huge losses in livestock. These viruses share several epidemiology aspects, making highly favorable the development of a bivalent vaccine to protect against both viruses. The main hosts of RVFV and BTv are ruminants, and particularly sheep that is severely affected. Periodic vaccination campaigns in Europe are needed to control the spread of BTv, that has become endemic to Southern Europe³⁴. However, current BTv vaccines are serotype specific³⁴. On the other hand, the vector competence of European mosquitoes indicates that RVF outbreaks in Europe are possible³⁵. Over the past decades, diverse recombinant vaccine candidates have been explored to prevent BTv or RVFV separately. However, immunization with multivalent vaccines has potential advantages in reducing costs. In this work, we describe a bivalent vaccination approach that offers high protection against BTv and RVFV simultaneously.

MVA vector vaccines for viral infections have proven to be effective against a wide range of viral diseases³⁶. Moreover, the use

of MVA deployed as viral vaccine vector induces strong antibody and long-lasting T-cell responses targeting intracellular pathogens^{37–39}. In the present study, several recombinant MVAs expressing BTv and RVFV proteins were generated. In vivo studies demonstrated that homologous prime-boost immunizations with MVA-GnGc-VP2-, MVA-GnGc-NS1-, or MVA-GnGc-NS1-Nt-protected mice against a lethal challenge with BTv. MVA-GnGc-VP2 induced high levels of neutralizing antibodies specific of BTv-4. It has been demonstrated that VP2 alone is sufficient to elicit protective immune responses against BTv¹⁴. In fact, experimental protein-based BTv vaccines used to include the immunodominant VP2 protein, although they are serotype specific^{40–42}. MVA-GnGc-NS1- or MVA-GnGc-NS1-Nt-immunized mice did not elicit neutralizing antibodies specific of BTv-4, but developed strong cytotoxic CD8 T-cell responses against NS1 and they were protected against BTv. Previous work in our laboratory showed that CD8 T-cell responses raised against NS1 protein plays a role in cross-protective immunity among BTv serotypes^{18,19}. Since the protection against BTv induced by the three rMVAs generated was very similar in mice and that a multisero-type vaccine against BTv is being sought, we decided to test the protection elicited against RVFV by rMVA-GnGc-NS1. Furthermore, vaccination with the three recombinant MVAs also triggered a robust response of RVFV neutralizing antibodies and we did not observe significant differences among the three rMVAs. MVA-GnGc-NS1-immunized mice did not develop any clinical signs or viraemia after infection with RVFV and were healthy throughout the experiment. Importantly, the immunization with MVA-GnGc-NS1 conferred protection against a lethal challenge with BTv-4 and RVFV in mice.

Notably, prime-boost immunization with MVA-GnGc-NS1 was able to provide immunity against BTv and RVFV in sheep. Two out

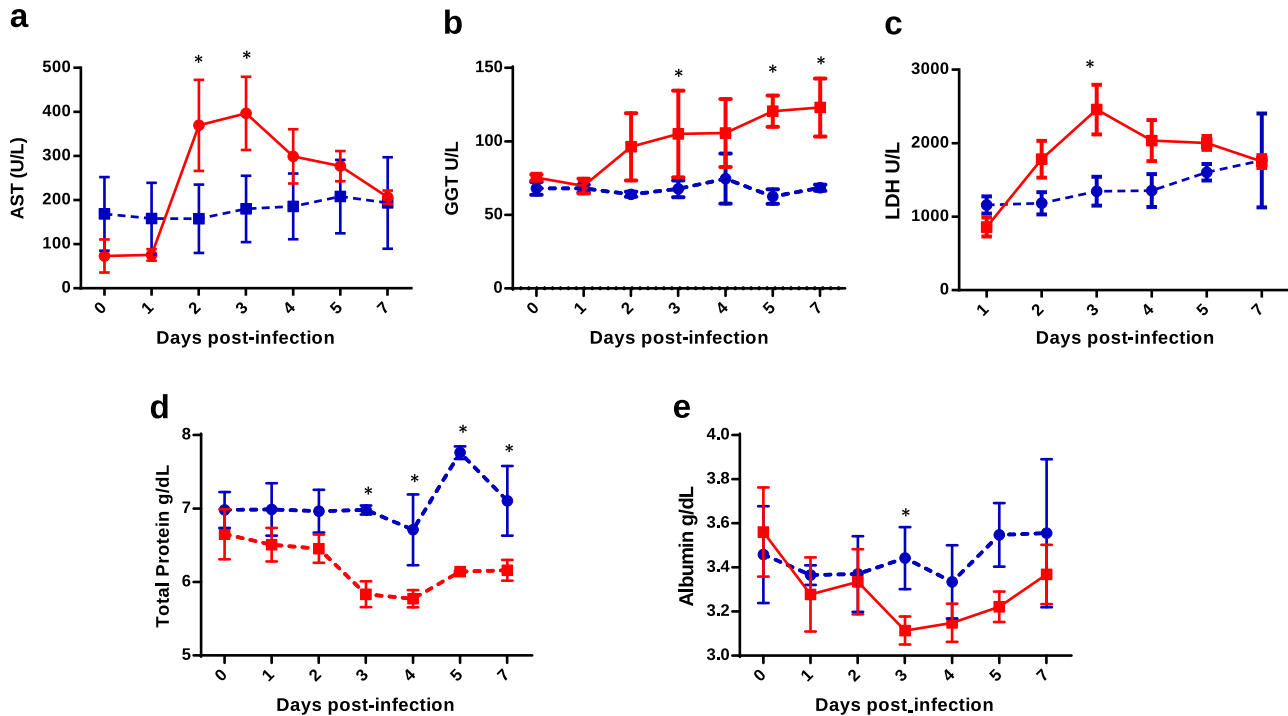


Fig. 8 Biochemistry parameters in MVA-GnGc-NS1 and MVA-wt immunized sheep after challenge with RVFV. a Aspartate transaminase (AST). **b** Gamma-glutamyltransferase (GGT). **c** Lactate dehydrogenase (LDH). **d** Total protein. **e** Albumin. Error bars represent SD. Statistical differences were calculated by multiple *t*-tests; **p* ≤ 0.05.

of the three animals vaccinated with MVA-GnGc-NS1 showed lower viremia and clinical signs than non-vaccinated animals after challenge with BTV-4M. Although the viremia was not abrogated in the immunized sheep, the titers of virus found in two out of three sheep were 10^3 PFU/ml or lower. Experimental infections of *Culicoides sonorensis* with BTV-11 and BTV-1 infected blood showed that the efficiency of infection of midges was dose-dependent and the 50% Midge Alimentary Infective Dose (MAID₅₀) was roughly calculated to a blood meal titer of $\pm 2 \times 10^5$ and $\pm 10^6$ Median Tissue Culture Infectious Dose (TCID₅₀)/ml for BTV-11 and BTV-1, respectively^{43,44}. According to these experimental infections, the level of virus detected in the blood of the MVA-GnGc-NS1-vaccinated sheep was 200 times lower than the minimal dose required for the insect vector infection, not being sufficient to infect midges and then avoiding the transmission of the virus.

After RVFV infection in sheep, mean rectal temperatures were lower in MVA-GnGc-NS1 vaccinated than in non-vaccinated animals. Moreover, viremia was significantly reduced in vaccinated animals compared to controls. Importantly, no infectious virus was detected in blood from two out of three vaccinated animals throughout the experiment. These results indicate that MVA-GnGc-NS1 immunization elicits immune protection against RVFV. Interestingly, previous works of immunization with a similar rMVA-GnGc vaccine did not show a strong RVFV neutralizing antibody response in mouse or sheep^{10,21} and failed to protect sheep upon two serial immunizations²¹. Although comparative (side by side) experiments might be needed, it is reasonable to speculate that the different source of MVA vector and/or the different locus/promoter used in this work could explain the improved immunogenicity against the encoded RVFV glycoprotein antigens. In this sense, it has been described that genome location and TK function can contribute to the relative immunogenicity of antigens when expressed from rMVA⁴⁵. In addition, in previous rMVA-GnGc vaccine construct¹⁰, the heterologous gene was cloned under the control of the vaccinia 7.5 k early/late promoter,

while in the MVA-GnGc-NS1 describe here the RVFV glycoproteins genes were placed under the control of an optimized strong early/late promoter^{46,47}. The different locus and promoters where GnGc was located in the MVA could explain the differences between rMVA-GnGc and MVA-GnGc-NS1 observed in protection against RVFV. Moreover, the slight differences in the encoded sequences (lack of N-terminal tpA signal peptide, or C-terminal marker tags) may also account for the differences in immunity and efficacy observed. In any case, these data clearly shown that our MVA-based vaccine approach remains as a valid resource strategy for further RVF vaccine developments.

Besides vaccinated sheep showed no obvious clinical signs and viremia was reduced or eliminated, the study of markers of liver damage and the pathological analysis confirmed the efficacy of MVA-GnGc-NS1 in protection against RVFV, blocking viral dissemination in secondary tissues. Increased AST, LDH, and GGT enzyme activity in the serum are sensitive markers of liver damage^{48–50}. We observed a significant increase of these enzymes in non-immunized sheep after RVFV challenge compared to vaccinated animals. The increase in AST, GGT, and LDH after infection with RVFV was most probably due to the hepatic lesions, as has previously been described^{21,51,52}. Consistent with an absence of liver damage, the levels of AST, GGT, and LDH did not significantly change in vaccinated sheep after challenge with RVFV. These results confirm that MVA-GnGc-NS1 immunization protects animals from liver damage caused by RVFV. Finally, when postmortem studies were performed, non-vaccinated and RVFV-challenged sheep showed mild to moderate multifocal necrotic hepatitis and the viral antigen was detected in relation to those lesions. These findings are similar to those lesions found in natural cases of RVFV infection sheep, where necrotizing hepatitis is the hallmark lesion^{53,54}. On the other hand, the vaccinated sheep showed no necrosis or aggregation of inflammatory cells in the hepatic parenchyma, where virus was mostly absent in two out of three sheep.

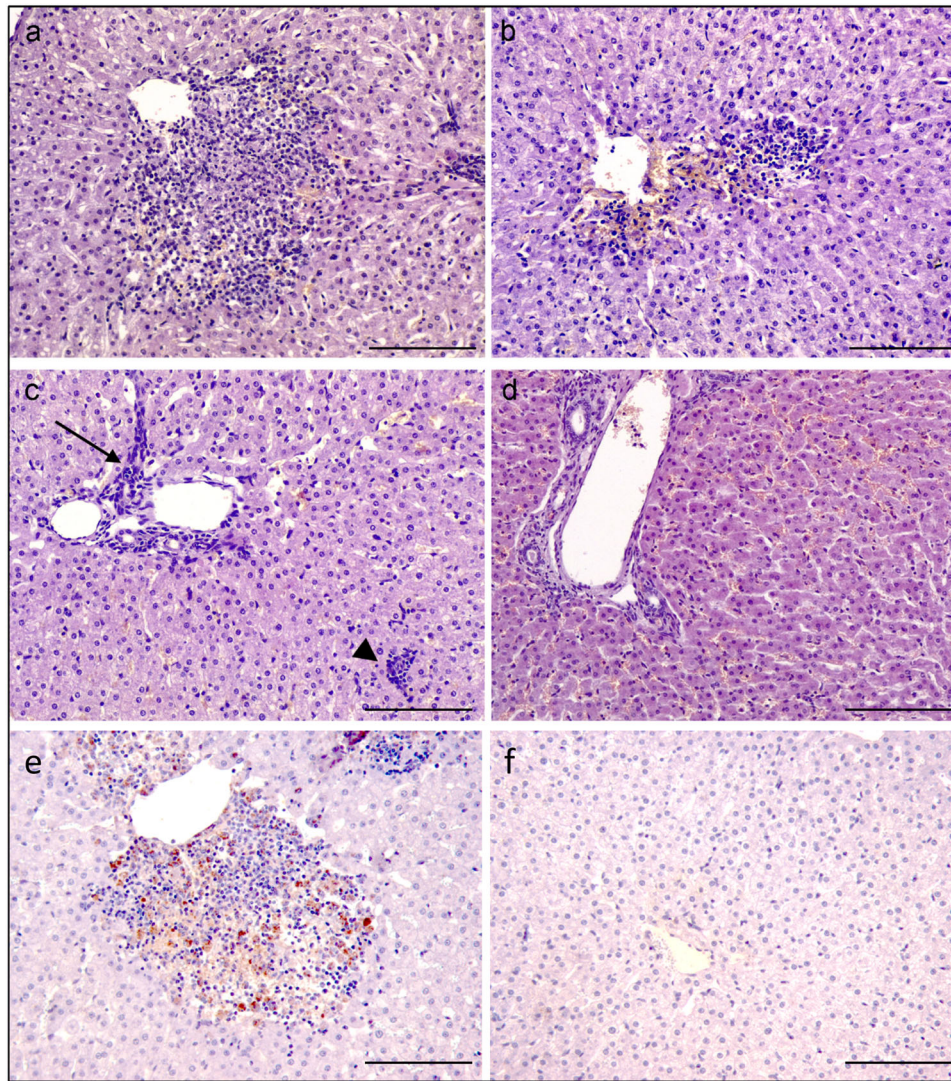


Fig. 9 Histological appearance of the liver from non-vaccinated and vaccinated ewes after RVFV challenge. **a** Non-vaccinated sheep at 4 d. p.i. Necrotic hepatitis characterized by a focus of central necrosis, surrounded by a mixed infiltrate of lymphocytes, macrophages, and plasma cells, adjacent to centrolobular vein. **b** Non-vaccinated sheep at 7 d.p.i. Similar, but milder, lesion to the previous sheep. In this case, there is not an evident central area of necrosis and the inflammatory infiltrate is mostly formed by mononuclear cells. **c** Non-vaccinated sheep at 8 d.p. i. Mild non-purulent hepatitis. Increase number of mononuclear cells in the portal area (arrow), and a small aggregate of lymphocytes and macrophages (arrowhead). **d** Vaccinated sheep at 7 d.p.i. No significant hepatic lesions were found in vaccinated animals. **e** Non-vaccinated sheep at 4 d.p.i. Intracellular labeling of RVFV antigen (brown-golden color) within a focus of necrosis and inflammation adjacent to a centrolobular vein. RVFV antigen IHC. **f** Vaccinated sheep at 4 d.p.i. Hepatic lobule with no significant lesions or labeling of viral antigen; RVFV antigen. Magnification 200x. Scale bars 200 μ m.

Despite the availability of live-attenuated and inactivated vaccines against RVFV and BTV, both are known to have a number of limitations and safety concerns^{55,56}. Several new experimental BTV vaccines are under development and show improvements over classical vaccines as safety, and DIVA (differentiate infected from vaccinated animals) capability, especially those based on poxvirus vectors^{19,20,57,58} and BTV reverse genetic as the Disabled Infectious Single Cycle⁵⁹ or the Disabled Infectious Single Animal vaccines^{60,61}. In addition to the demonstrated efficacy of MVA as a vaccine vector for BTV and RVFV individually, we take advantage of its ability to allow the cloning of several genes in its genome to develop a bivalent vaccine against these two viruses. Severe outbreaks of RVFV usually takes place after long inter-epizootic periods with no detectable virus circulation⁶², thus there is a need for safer and efficacious veterinary RVFV vaccines. A bivalent vaccine able to protect against BTV and RVFV, would be useful in Africa and outside,

promoting vaccination of ruminants in countries where sporadic RVF disease outbreaks occur. Regarding temperature stability of MVA as a candidate vaccine against BTV and RVFV to be used in Africa, it has been demonstrated that MVA was stable at 37–45 °C for a month. This viral vector could be dried without using membranes and still retains its infectivity when reconstituted. Furthermore, the dried MVA viral vector could be stored for up to 12 months at 37 °C (ref. ⁶³).

In conclusion, MVA-based vaccines generated in the present work provide an opportunity to potentially deliver protection against both ruminant infections BTV and RVFV. In addition, the antigenic variability of BTV, with at least 27 different serotypes, is a major concern to control the spread of this virus through vaccination campaigns and the inclusion of NS1 in the vaccine composition can overcome this problem, representing a huge advance over existing vaccines in tackling all serotypes of BTV.

METHODS

Ethics statement

Animal experimental protocols were approved by the Ethical Review Committee at the INIA-CISA and Comunidad de Madrid (Permit number: PROEX 037/15) in strict accordance with EU guidelines 2010/63/UE about protection of animals used for experimentation, and other scientific purposes and Spanish Animal Welfare Act 32/2007.

Viruses and cells

Vero cells (ATCC; catalog no. CCL-81), BHK-21 cells (ATCC; catalog no. CCL-10), and chicken embryo fibroblasts (DF-1; ATCC; catalog no. CRL-12203) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 2 mM glutamine, 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), and antibiotics. Virus stocks were generated by infection of 80% confluent cells using a multiplicity of infection (MOI) of 0.1. RVFV 56/74 and RVFV MP12 viral stocks were performed on BHK-21 cells as previously described²¹. TCID₅₀ titers of this stock were determined on Vero cells by the method of Reed and Muench⁶⁴. BTV serotype 4 (SPA2004/02; BTV-4) and BTV serotype 4 strain Morocco (MOR2009/09; BTV-4M) were grown on Vero cells and titrations were performed by plaque assays on Vero cells. Modified vaccinia virus Ankara (MVAΔF13L)⁶⁵ was grown and titered on DF-1 cells.

Construction of recombinant MVA-GnGc

RVFV MP12 glycoprotein GnGc sequence was amplified by PCR. Plasmid pCMV-M4 (ref. ²²) was used as a template for PCR amplification using the forward primer 5'-CGGAATTCATGGCAGGGATTGCAATGACAGTCC-3' (EcoRI underlined), and the reverse primer 5'-CGGGATCCACTGATCTATGAGGCTTCTAGTG-3' (BamHI underlined) and inserted in plasmid pMVA-βGus⁶⁵ previously digested with EcoRI and BamHI enzymes, to generate pMVA-GnGc plasmid. The pMVA-GnGc transfer plasmid contained the F13L gene of MVA and the GnGc gene under the control of a vaccinia virus (VV) early/late promoter. Recombinant MVA-GnGc were generated by infecting DF-1 cells with MVAΔF13L at a MOI of 1 (MOI = 1), and transfecting them with the transfer plasmid pMVA-GnGc. Cell cultures were harvested at 48 h.p.i., and MVA-GnGc was selected and cloned four times by plaque isolation assay.

Construction of MVA-GnGc-NS1, MVA-GnGc-NS1-Nt, and MVA-GnGc-VP2

The MVA transfer plasmids pSC11-NS1, pSC11-NS1-Nt, and pSC11-VP2 containing the NS1, NS1-Nt (N-terminal region of NS1 (1–270 amino acids)), and VP2 BTV-4 genes inserted into the thymidine kinase site of MVA, and under the control of the VV early/late promoter p7.5 were previously generated^{19,20}. Recombinant MVA-GnGc-NS1, MVA-GnGc-NS1-Nt and MVA-GnGc-VP2 were prepared by infecting DF-1 cells with MVA-GnGc at a MOI of 0.5 (MOI = 0.5), and transfecting them with the transfer plasmids pSC11-NS1, pSC11-NS1-Nt, or pSC11-VP2, respectively. Cell cultures were harvested at 48 h.p.i., and the dual recombinant MVAs were selected after plaque assay by the addition of X-Gal to the agar overlay. Dual MVAs were cloned four times by plaque isolation assay.

Confocal microscopy

DF-1 cells were grown on coverslips in M24 plates and infected with the different recombinant MVA viruses. After 48 h.p.i., cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min. The cells were permeabilized by using 0.1% Triton X-100 in PBS for 5 min. Nonspecific reactivity was blocked after incubation of cells with 20% FBS–PBS for an hour. Sheep and mouse antisera raised against BTV-4 (dilution 1:500) and RVFV (dilution 1:500) were incubated overnight at 4 °C. Specific secondary antibodies conjugated to Alexa fluor 488 (cat. number A11015, ThermoFisher) and Alexa fluor 596 (cat. number A11032, ThermoFisher) were used at 1:1000 dilution for the assays. Nuclei were visualized by using DAPI. Laser scanning confocal microscopy images were acquired with an inverted Zeiss Axiovert LSM 880 microscope. Images were analyzed with Zen 2.0 (Carl Zeiss) and Fiji (NIH) software packages.

Mice

Type I interferon receptor defective mice (IFNAR^(-/-)) on a 129 Sv/Ev background, and BALB/c mice were used for the studies. Mice were housed

under pathogen-free conditions and allowed to acclimatize to the biosafety level 3 (BSL3) animal facilities at for the Animal Health Research Center (INIA-CISA), Madrid, before use.

Immunization of mice and challenge

Groups of IFNAR^(-/-) mice ($n = 9$) were vaccinated intraperitoneally at 0 and 21 days with 10^7 PFU of MVA-GnGc-NS1, MVA-GnGc-NS1-Nt, MVA-GnGc-VP2, or MVAΔF13L (MVA-wt). Ten days after second immunization, four animals of each group sacrificed in order to analyze specific cellular immune responses. Two weeks after second immunization, five animals of each group were bled to determine antibodies against BTV and RVFV, and were challenged subcutaneously with 5×10^2 PFU of BTV-4.

BALB/c mice ($n = 5$) were vaccinated intraperitoneally with two doses (3 weeks apart) of 10^7 PFU of MVA-GnGc-NS1. Two weeks after second immunization, animals were bled to determine antibodies and were challenged intraperitoneally with 5×10^2 PFU of RVFV.

After infection, animals were evaluated and scored for individual clinical signs. Rough hair (absent = 0, slightly = 1, markedly = 2), activity (normal = 0, slightly reduced = 1, reduced = 2, severely reduced = 3), eye swelling (absent = 0, slightly = 1, moderate = 2, severe = 3), and temperature (normal = 0, hypothermia = 3). The final score was the addition of each individual score. The minimum score was 0 for healthy and 1–11 depending upon the severity. Animals that reached 8 points of score were euthanized. Each score represents the value of a single animal.

Plaque reduction neutralization test

Twofold dilutions (from 1:5) of heat-inactivated sera (56 °C for 30 min) were incubated with 100 PFU of BTV-4 or RVFV MP12 strain for 1 h at 37 °C. Then, samples were inoculated into 12-well plates containing semi-confluent monolayers of Vero cells. Following incubation for 1 h, an agar overlay (DMEM, 10% FBS, 2% carboxymethylcellulose) was added and plates incubated for 5 (BTV) or 3 (RVFV) days at 37 °C in 5% CO₂. Plaques were fixed with 10% formaldehyde and visualized with 2% crystal violet PBS. PRNT₅₀ titer was calculated as the reciprocal (log 10) of the highest dilution of serum that neutralized 50% of the control virus input. The cutoff is 0.69, log of the reciprocal of the first dilution 1:5.

Enzyme-linked immunosorbent assays

Indirect enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) were used to determine specific VP2 and NS1 antibody levels before infection^{66,67}. MaxiSorp plates (Nunc, USA) were coated with 300 ng/well of purified recombinant VP2 or NS1 protein expressed in Bac-To-Bac Baculovirus expression System (Invitrogen)^{20,66}. Mice sera collected before challenge were diluted and analyzed in duplicates. Plates were incubated with an anti-mouse IgG-HRP secondary antibody (cat. number P0447, Dako) at a 1:2000 dilution and the reaction was developed with substrate solution TMB (Sigma) and stopped by adding 50 ml of 3 N H₂SO₄. Results were expressed as ODs measured at 450 nm.

Flow cytometric analysis

For the intracellular cytokine staining assay, 10^6 splenocytes were stimulated with 10 μg/ml of NS1-152 peptide, 4 μg/ml of concanavalin A as a nonspecific stimulus, 10 μg/ml of peptide 14 as an irrelevant peptide, or left untreated in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS. Six hours before the assay, CD107a/LAMP-1-FITC antibody at 1:10 dilution (Clone H4A3 mouse, cat. number 130-102-191, Miltenyi) and brefeldin A (5 μg/ml) were added. After 18 h of stimulation, cells were washed, stained for the surface marker with anti-mouse CD8 PerCP-Vio700 (Clone 53-6.7 mouse, cat. number 130-120-756, Miltenyi) at 1:10 dilution, fixed and permeabilized with PBS 1% FBS, 4% formaldehyde, 1% saponin buffer. Then cells were stained intracellularly using IFN-γ-PE antibody (Clone AN.18.17.24, cat. number 130-102-388, Miltenyi) at 1:10 dilution. Data were acquired by fluorescence-activated cell sorter (FACS) analysis on a FACSCalibur (Becton Dickinson). Gating strategies used to identify CD8+ T-cell populations are showed in the Supplementary Fig. 1. Analyses of the data were performed using FlowJo™ v10.0.8 (Tree Star, Ashland, OR).

Immunization of sheep and challenge

Six naive healthy sheep (Spanish Churra sheep breed), aged 2 years were acclimated for 7 days at the BSL3 animal facility of the Animal Health Research Center (INIA-CISA) before starting the experiment. All sheep were

negative to BTV-4 and RVFV. Animals were subcutaneously inoculated with 10^8 PFU of MVA-GnGc-NS1 (sheep number 938, 964 and 982) or MVA-wt (sheep number 9, 12, and 69) at days 0 and 28 of the experiment. At 22 days post booster (d.p.b.), prechallenge blood samples were collected from all animals. At 31 d.p.b., sheep were challenged subcutaneously with 10^6 PFU of BTV-4M. After challenge, all sheep were monitored daily for clinical signs and rectal temperature. Blood samples for virological analyses were collected from days 0 to 7 postinfection (d.p.i.). Animals were allowed to recover for 3 weeks before starting the next experiment. At 52 d.p.b., all sheep were infected subcutaneously with 10^7 PFU of RVFV. Post challenge, all sheep were monitored daily for clinical signs and rectal temperature. The fever threshold was set to ≥ 39.73 °C based on the mean plus three standard deviations of the rectal temperatures recorded in six sheep for 1 week before challenge. Blood samples for virological and blood chemistry analyses were collected from days 0 to 7 d.p.i. At different time points, animals were euthanized, necropsies were performed, and liver samples were collected for histological studies. Sheep 12 and 982 were euthanized at 4 d.p.i., sheep 69 and 964 at 7 d.p.i., and sheep 9 and 938 at 8 d.p.i.

Viremia analyses

Whole blood samples in EDTA were collected at different times postinfection from challenged mice. For determination of viral titers, 100 μ l of blood was washed with PBS, centrifuged, and lysed with 900 μ l of distilled sterile water. After 2 min, 100 μ l of PBS 10 \times was added to samples. The amount of infectious virus was measured by standard plaque assay⁶⁸ or TCID₅₀ (ref. ²¹) on Vero cells. The real-time RT-qPCR specific for BTV segment 5 was performed as described by Toussaint et al.⁶⁹, and sheep blood containing different concentrations of virus were titrated and used as internal standards of the experiment¹⁹.

Biochemistry assays

Whole blood samples were collected in BD Vacutainer tubes and centrifuged at 1267 $\times g$ for 10 min for serum separation. The serum samples were stored at -80 °C until use and then analyzed for alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase, total protein, and albumin levels using specific reagents according to the manufacturer's instructions (SpinReact, Vall D'En Bas, Spain). Parameters were selected based on their potential role in liver disease and infection and were measured in a Saturno 100 analyzer (Crony Instruments, Rome, Italy).

Histopathological and immunohistochemical analyses

Samples from sheep livers were fixed in 10% buffered formalin (pH 7.2). After fixation, samples were dehydrated through a graded series of alcohol to xylol and embedded in paraffin wax. Sections of 3 μ m thick from paraffin wax blocks were cut, and stained with hematoxylin and eosin for histopathological analyses.

For immunohistochemical procedures, tissue sections were subjected to microwave treatment (30 min) in citrate buffer (pH 9.0) for antigen retrieval. The endogenous peroxidase activity was inhibited by incubating sections with peroxidase blocking reagent (Dako) for 1 h. After incubation with mouse polyclonal serum against RVFV, sections were incubated for 30 min with the secondary antibody anti-mouse-HRP (cat. number P0447, Dako) at a 1:200 dilution. Peroxidase reaction was developed using 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride as chromogen diluted 1:50 in a specific buffer (Dako). Finally, sections were counterstained with hematoxylin, dehydrated, and coverslipped with DePex mounting medium.

Statistical analyses

Statistical analyses were carried out using GraphPad PRISM version 6.00 (GraphPad Software, San Diego, CA). Differences in antibody levels, T-cell responses, serum biochemical parameters, and viremia between groups were calculated by Mann-Whitney nonparametric or multiple *t*-test analysis. Survival data were analyzed using a log-rank test with mice grouped by immunization strategy. A significance level of $p < 0.05$ was used in all analyses.

Reporting summary

Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

DATA AVAILABILITY

All data generated or analyzed during this study are included in the main text and Supplementary Information. All relevant data are also available upon request from the corresponding authors.

Received: 2 April 2020; Accepted: 6 July 2020;

Published online: 30 July 2020

REFERENCES

- Maclachlan, N. J., Drew, C. P., Darpel, K. E. & Worwa, G. The pathology and pathogenesis of bluetongue. *J. Comp. Pathol.* **141**, 1–16 (2009).
- Balkhy, H. H. & Memish, Z. A. Rift Valley fever: an uninvited zoonosis in the Arabian peninsula. *Int. J. Antimicrob. Agents* **21**, 153–157 (2003).
- Lumley, S. et al. Rift Valley fever virus: strategies for maintenance, survival and vertical transmission in mosquitoes. *J. Gen. Virol.* **98**, 875–887 (2017).
- Mellor, P. S., Boorman, J. & Baylis, M. Culicoides biting midges: their role as arbovirus vectors. *Annu. Rev. Entomol.* **45**, 307–340 (2000).
- Dungu, B., Potgieter, C., Von Teichman, B. & Smit, T. Vaccination in the control of bluetongue in endemic regions: the South African experience. *Dev. Biol. (Basel)* **119**, 463–472 (2004).
- Suzich, J. A., Kakach, L. T. & Collett, M. S. Expression strategy of a phlebovirus: biogenesis of proteins from the Rift Valley fever virus M segment. *J. Virol.* **64**, 1549–1555 (1990).
- Besselaar, T. G. & Blackburn, N. K. The synergistic neutralization of Rift Valley fever virus by monoclonal antibodies to the envelope glycoproteins. *Arch. Virol.* **125**, 239–250 (1992).
- Lorenzo, G., Martin-Folgar, R., Rodriguez, F. & Brun, A. Priming with DNA plasmids encoding the nucleocapsid protein and glycoprotein precursors from Rift Valley fever virus accelerates the immune responses induced by an attenuated vaccine in sheep. *Vaccine* **26**, 5255–5262 (2008).
- Warimwe, G. M. et al. Immunogenicity and efficacy of a chimpanzee adenovirus-vectored Rift Valley fever vaccine in mice. *Viol. J.* **10**, 349 (2013).
- Lopez-Gil, E. et al. A single immunization with MVA expressing GnGc glycoproteins promotes epitope-specific CD8+ T cell activation and protects immune-competent mice against a lethal RVFV infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **7**, e2309 (2013).
- Mertens, P. P. et al. Analysis of the roles of bluetongue virus outer capsid proteins VP2 and VP5 in determination of virus serotype. *Virology* **170**, 561–565 (1989).
- Zientara, S. et al. Novel bluetongue virus in goats, Corsica, France, 2014. *Emerg. Infect. Dis.* **20**, 2123–2125 (2014).
- Mertens, P. P., Brown, F. & Sangar, D. V. Assignment of the genome segments of bluetongue virus type 1 to the proteins which they encode. *Virology* **135**, 207–217 (1984).
- Huismans, H., van der Walt, N. T., Cloete, M. & Erasmus, B. J. Isolation of a capsid protein of bluetongue virus that induces a protective immune response in sheep. *Virology* **157**, 172–179 (1987).
- Boyce, M., Celma, C. C. & Roy, P. Bluetongue virus non-structural protein 1 is a positive regulator of viral protein synthesis. *Viol. J.* **9**, 178 (2012).
- Anderson, J. et al. Strong protection induced by an experimental DIVA subunit vaccine against bluetongue virus serotype 8 in cattle. *Vaccine* **32**, 6614–6621 (2014).
- Rojas, J. M., Pena, L., Martin, V. & Sevilla, N. Ovine and murine T cell epitopes from the non-structural protein 1 (NS1) of bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) are shared among viral serotypes. *Vet. Res.* **45**, 30 (2014).
- Marin-Lopez, A. et al. Microspheres-prime/rMVA-boost vaccination enhances humoral and cellular immune response in IFNAR^{-/-} mice conferring protection against serotypes 1 and 4 of bluetongue virus. *Antivir. Res.* **142**, 55–62 (2017).
- Marin-Lopez, A. et al. CD8 T Cell Responses to an immunodominant epitope within the nonstructural protein NS1 provide wide immunoprotection against bluetongue virus in IFNAR^{-/-} Mice. *J. Virol.* **92**, e00938–18 (2018).
- Calvo-Pinilla, E., Navasa, N., Anguita, J. & Ortego, J. Multiserotype protection elicited by a combinatorial prime-boost vaccination strategy against bluetongue virus. *PLoS ONE* **7**, e34735 (2012).
- Lorenzo, G., Lopez-Gil, E., Ortego, J. & Brun, A. Efficacy of different DNA and MVA prime-boost vaccination regimens against a Rift Valley fever virus (RVFV) challenge in sheep 12 weeks following vaccination. *Vet. Res.* **49**, 21 (2018).
- Lorenzo, G., Martin-Folgar, R., Hevia, E., Boshra, H. & Brun, A. Protection against lethal Rift Valley fever virus (RVFV) infection in transgenic IFNAR^{-/-} mice induced by different DNA vaccination regimens. *Vaccine* **28**, 2937–2944 (2010).
- Boshra, H., Lorenzo, G., Rodriguez, F. & Brun, A. A DNA vaccine encoding ubiquitinated Rift Valley fever virus nucleoprotein provides consistent immunity and

- protects IFNAR^(-/-) mice upon lethal virus challenge. *Vaccine* **29**, 4469–4475 (2011).
24. 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 (2009).
 25. Marin-Lopez, A. et al. Pathological characterization Of IFNAR^(-/-) mice infected with bluetongue virus serotype 4. *Int. J. Biol. Sci.* **12**, 1448–1460 (2016).
 26. Legisa, D. M. et al. An experimental subunit vaccine based on Bluetongue virus 4 VP2 protein fused to an antigen-presenting cells single chain antibody elicits cellular and humoral immune responses in cattle, guinea pigs and IFNAR^(-/-) mice. *Vaccine* **33**, 2614–2619 (2015).
 27. Marin-Lopez, A. et al. VP2, VP7, and NS1 proteins of bluetongue virus targeted in avian reovirus muNS-Mi microspheres elicit a protective immune response in IFNAR^(-/-) mice. *Antivir. Res.* **110**, 42–51 (2014).
 28. van Zyl, A. R., Meyers, A. E. & Rybicki, E. P. Development of plant-produced protein body vaccine candidates for bluetongue virus. *BMC Biotechnol.* **17**, 47 (2017).
 29. Marin-Lopez, A. et al. Modeling arboviral infection in mice lacking the interferon alpha/beta receptor. *Viruses* **11**, 35 (2019).
 30. Betts, M. R. et al. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8⁺ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J. Immunol. Methods* **281**, 65–78 (2003).
 31. Maharjan, A., Jha, B. & Singh, A. Liver function test on HBsAg positive blood donors. *Tribhuvan Univ. J. Microbiol.* **4**, 9–10 (2018).
 32. Shivaji, M. P. M. & Ramesh, M. J. V. To assess some special plasma proteins in HIV positive patients. *Int. J. Biotechnol. Biochem.* **14**, 65–70 (2018).
 33. Ikegami, T. & Makino, S. The pathogenesis of Rift Valley fever. *Viruses* **3**, 493–519 (2011).
 34. Rao, P. P. et al. In *Emerging and Re-emerging Infectious Diseases of Livestock* (ed Jagadeesh Bayry) (Springer International Publishing, 2017).
 35. Moutailler, S., Krida, G., Schaffner, F., Vazeille, M. & Failloux, A. B. Potential vectors of Rift Valley fever virus in the Mediterranean region. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **8**, 749–753 (2008).
 36. Gilbert, S. C. Clinical development of Modified Vaccinia virus Ankara vaccines. *Vaccine* **31**, 4241–4246 (2013).
 37. Drexler, I., Staib, C. & Sutter, G. Modified vaccinia virus Ankara as antigen delivery system: how can we best use its potential? *Curr. Opin. Biotechnol.* **15**, 506–512 (2004).
 38. Perez, P. et al. A Vaccine based on a modified vaccinia virus ankara vector expressing Zika virus structural proteins controls Zika virus replication in mice. *Sci. Rep.* **8**, 17385 (2018).
 39. Garcia-Arriaza, J. et al. A novel poxvirus-based vaccine, MVA-CHIKV, is highly immunogenic and protects mice against chikungunya infection. *J. Virol.* **88**, 3527–3547 (2014).
 40. Jabbar, T. K. et al. Protection of IFNAR^(-/-) mice against bluetongue virus serotype 8, by heterologous (DNA/rMVA) and homologous (rMVA/rMVA) vaccination, expressing outer-capsid protein VP2. *PLoS ONE* **8**, e60574 (2013).
 41. Feenstra, F. & van Rijn, P. A. Current and next-generation bluetongue vaccines: requirements, strategies, and prospects for different field situations. *Crit. Rev. Microbiol.* **43**, 142–155 (2017).
 42. van Rijn, P. A. Prospects of next-generation vaccines for bluetongue. *Front. Vet. Sci.* **6**, 407 (2019).
 43. van Gennip, R. G. P. et al. Vector competence is strongly affected by a small deletion or point mutations in bluetongue virus. *Parasit. Vectors* **12**, 470 (2019).
 44. Feenstra, F., Drolet, B. S., Boonstra, J. & van Rijn, P. A. Non-structural protein NS3/NS3a is required for propagation of bluetongue virus in *Culicoides sonorensis*. *Parasit. Vectors* **8**, 476 (2015).
 45. Wong, Y. C. et al. Modified vaccinia virus Ankara can induce optimal CD8⁽⁺⁾ T cell responses to directly primed antigens depending on vaccine design. *J. Virol.* **93**, e01154–19 (2019).
 46. Chakrabarti, S., Sisler, J. R. & Moss, B. Compact, synthetic, vaccinia virus early/late promoter for protein expression. *Biotechniques* **23**, 1094–1097 (1997).
 47. Sanchez-Puig, J. M., Lorenzo, M. M. & Blasco, R. Isolation of recombinant MVA using F13L selection. *Methods Mol. Biol.* **890**, 93–111 (2012).
 48. Meyer, D. J. & Harvey, J. W. In *Veterinary Laboratory Medicine: Interpretation and Diagnosis* (eds Meyer, D. J. & Harvey, J. W.) 157–187 (Saunders company, Philadelphia, 1998).
 49. Chaudhary, A. & Chauhan, V. Lactate dehydrogenase as an indicator of liver diseases. *J. Adv. Med. Dent. Sci. Res.* **3**, 20–22 (2015).
 50. Kramer, J. W. a. H., W. E. In *Clinical Enzymology* (eds Kaneko, J. J., Harvey, J. W. & Bruss, M. L.) 303–325 (Elsevier, 1997).
 51. Faburay, B. et al. Development of a sheep challenge model for Rift Valley fever. *Virology* **489**, 128–140 (2016).
 52. Madani, T. A. et al. Rift Valley fever epidemic in Saudi Arabia: epidemiological, clinical, and laboratory characteristics. *Clin. Infect. Dis.* **37**, 1084–1092 (2003).
 53. Odendaal, L., Clift, S. J., Fosgate, G. T. & Davis, A. S. Lesions and cellular tropism of natural Rift Valley Fever virus infection in adult sheep. *Vet. Pathol.* **56**, 61–77 (2019).
 54. Flick, R. & Bouloy, M. Rift Valley fever virus. *Curr. Mol. Med.* **5**, 827–834 (2005).
 55. Savini, G., Maclachlan, N. J., Sanchez-Vizcaino, J. M. & Zientara, S. Vaccines against bluetongue in Europe. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **31**, 101–120 (2008).
 56. Mansfield, K. L. et al. Rift Valley fever virus: a review of diagnosis and vaccination, and implications for emergence in Europe. *Vaccine* **33**, 5520–5531 (2015).
 57. 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 (2007).
 58. Perrin, A. et al. Recombinant capripoxviruses expressing proteins of bluetongue virus: evaluation of immune responses and protection in small ruminants. *Vaccine* **25**, 6774–6783 (2007).
 59. Matsuo, E. et al. Generation of replication-defective virus-based vaccines that confer full protection in sheep against virulent bluetongue virus challenge. *J. Virol.* **85**, 10213–10221 (2011).
 60. Feenstra, F., van Gennip, R. G. P., Maris-Veldhuis, M., Verheij, E. & van Rijn, P. A. Bluetongue virus without NS3/NS3a expression is not virulent and protects against virulent bluetongue virus challenge. *J. Gen. Virol.* **95**, 2019–2029 (2014).
 61. Feenstra, F., Pap, J. S. & van Rijn, P. A. Application of bluetongue Disabled Infectious Single Animal (DISA) vaccine for different serotypes by VP2 exchange or incorporation of chimeric VP2. *Vaccine* **33**, 812–818 (2015).
 62. Hartman, A. Rift Valley fever. *Clin. Lab. Med.* **37**, 285–301 (2017).
 63. Alcock, R. et al. Long-term thermostabilization of live poxviral and adenoviral vaccine vectors at supraphysiological temperatures in carbohydrate glass. *Sci. Transl. Med.* **2**, 19ra12 (2010).
 64. Reed, L. J. M. & H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.* **27**, 493–497 (1938).
 65. Sanchez-Puig, J. M. & Blasco, R. Isolation of vaccinia MVA recombinants using the viral F13L gene as the selective marker. *Biotechniques* **39**, 665–666 (2005).
 66. 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 (2009).
 67. Marin-Lopez, A. et al. Cross-protective immune responses against African horse sickness virus after vaccination with protein NS1 delivered by avian reovirus muNS microspheres and modified vaccinia virus Ankara. *Vaccine* **38**, 882–889 (2020).
 68. Franceschi, V. et al. Immunization of knock-out alpha/beta interferon receptor mice against lethal bluetongue infection with a BoHV-4-based vector expressing BTv-8 VP2 antigen. *Vaccine* **29**, 3074–3082 (2011).
 69. Toussaint, J. F., Sailleau, C., Breard, E., Zientara, S. & De Clercq, K. Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments. *J. Virol. Methods* **140**, 115–123 (2007).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants AGL-2014-57430R, AGL2017-83226R, and AGL2017-82570-R from the Spanish Ministry of Science and EU Horizon 2020 Program (European Comission Grant Agreement No. 727393-PALE-Blu). SUT was a recipient of a predoctoral fellowship from the Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Centro de Investigación en Sanidad Animal (program FPI-SGIT-2018)

AUTHOR CONTRIBUTIONS

J.O. and A.B. conceived the study. E.C.-P. wrote the manuscript with contributions from J.O. and inputs from all other authors. E.C.-P. and A.M.-L. designed and developed all the vaccines used in this work. E.C.-P., A.M.-L., S.M., and S.U.-T. conducted mice experiments and cytometric analysis. J.B. conducted sheep immunizations and histopathological analysis. G.L. and E.C.-P. analyzed antibodies, viremias, and biochemistry parameters. A.N. and L.J.-C. helped revising the manuscript and figures. R.B. provided pMVA-βGus plasmid and MVAΔF13L virus, and assisted in the isolation of recombinant MVA.

COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing interests.

ADDITIONAL INFORMATION

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41541-020-00218-y>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to A.B. or J.O.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020