

# Avances en la búsqueda de la vacuna frente al virus de la peste porcina africana

■ Cristina Jurado (DVM, PhD), Carolina Muñoz Pérez (DVM, estudiante PhD) y José Manuel Sánchez-Vizcaíno (DVM, PhD, DHC)

Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (Visavet),  
Universidad Complutense de Madrid  
Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA-INIA), Consejo Superior de  
Investigaciones Científicas (CSIC)



WildMedia/shutterstock.com

## ► **Resumen**

La peste porcina africana (PPA) ha sido y es desde el pasado siglo una de las amenazas constantes al sector porcino que afecta en la actualidad a los cinco continentes. Desde su llegada a la Unión Europea, en el año 2014, es una de las enfermedades que más muertes está causando en las poblaciones porcinas domésticas y silvestres. Las repercusiones sanitarias y económicas que ocasiona esta enfermedad han impulsado las investigaciones de la comunidad científica en la búsqueda de una vacuna segura y eficaz. Además, la continua expansión del virus ha propiciado el incremento de fondos para continuar con estas investigaciones, así como aumentar los esfuerzos que permitan disponer de una herramienta adicional en la lucha contra esta enfermedad.

Palabras clave: control, inmunización, protección, vacuna.

## ► **Summary**

### **Advances in the search for a vaccine against African swine fever virus**

African swine fever (ASF) has been and is a constant threat to the pig sector. Since it arrived in 2014 to the European Union, it is one of the deadliest animal diseases to domestic pigs and wild boar populations. As ASF is causing tremendous health and economic costs, vaccine research has been pushed since the early beginning of the XX century. Moreover, the continuous spread of ASF has propitiated an increase in research funding. Thus, additional efforts are being done to develop another tool to fight against ASF.

Keywords: control, immunisation, protection, vaccine.

**Contacto con los autores:** [cristina.jurado@inia.es](mailto:cristina.jurado@inia.es); [caromuno@ucm.es](mailto:caromuno@ucm.es); [jmvizcaino@ucm.es](mailto:jmvizcaino@ucm.es)

## ¿QUÉ CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA DIFICULTAN EL DESARROLLO DE VACUNAS?

La peste porcina africana (PPA) está producida por un virus ADN, único miembro de la familia *Asfarviridae*. Este virus contiene en su material genético una doble hélice de ADN de longitud variable (170-190 kbp). A su vez, el genoma viral contiene un número variable de marcos abiertos de lectura (150, ORFs) dependiendo del aislado de virus de la PPA (vPPA) del que se trate. Estas características nos aportan una idea de la variabilidad que puede existir entre aislados del vPPA. La diferenciación entre aislados frecuentemente se basa en la caracterización de la secuencia de la proteína viral vp72. Su secuenciación permite distinguir hasta 24 genotipos aunque esta clasificación no se traduce en una mayor o menor virulencia de los aislados ni en sus niveles de protección. Dado que no existen anticuerpos capaces de neutralizar por completo la infección (anticuerpos neutralizantes), no es posible establecer una clasificación de los aislados por serotipos. Además, cabe destacar la falta de test *in vitro* que permitan evaluar potenciales candidatos vacunales, lo que obliga a la comunidad científica a emplear ensayos *in vivo* con animales susceptibles.

Cuando acudimos a la literatura científica es relativamente frecuente el empleo de términos como aislados “homólogos” o “heterólogos”. Sin embargo, no existe una definición consensuada al respecto. No obstante, el término homólogo suele emplearse para aquellos aislados genética y antigénicamente similares o parentales. En el campo de la vacunología, el empleo de aislados homólogos podría dar lugar a fenómenos de protección cruzada. Una de las principales dificultades a las que se enfrenta la comunidad científica es que el vPPA aún sigue sin conocerse por completo. Prueba de ello es que en 2018 se han descubierto más de 40 proteínas nuevas del virus con funciones todavía desconocidas. En consecuencia, existen vacíos de conocimiento clave en el desarrollo de estrategias vacunales y/o moléculas antivirales. Esto nos lleva a plantearnos algunas preguntas como: ¿conocemos todos los genes implicados en la respuesta inmunitaria del hospedador?, ¿cómo podemos caracterizar la virulencia de los aislados?, ¿existe protección cruzada entre aislados?, ¿podemos desarrollar una vacuna única para todos los escenarios epidemiológicos?, ¿la inmunidad humoral y celular son necesarias para vencer la infección?

El conocimiento cosechado en relación a esta enfermedad ha permitido reconocer la

relevancia tanto de la inmunidad humoral como de la celular. Los animales que han tenido contacto con el vPPA son capaces de sintetizar anticuerpos específicos frente a partes concretas del virus. La presencia de anticuerpos específicos puede dar lugar a un inicio tardío de la sintomatología clínica y una reducción de los niveles de viremia. Este hecho podría incrementar las tasas de supervivencia entre los animales infectados. Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales estos anticuerpos serían capaces de neutralizar la infección por completo son aún inciertos.

Por tanto, las características más importantes que dificultan el desarrollo de una vacuna frente al virus de la peste porcina africana pueden resumirse en el *cuadro 1*.

### PRIMEROS PASOS EN LA BÚSQUEDA DE UNA VACUNA

Desde la primera descripción de la enfermedad en 1921, los investigadores invirtieron esfuerzos en intentar inmunizar a los animales frente a esta enfermedad. Inicialmente se recurrió al empleo de virus

#### Cuadro 1. Hándicaps en el desarrollo de una vacuna frente al virus de la peste porcina africana.

- Complejidad y gran tamaño de la partícula viral (200 nm).
- Genoma viral de gran tamaño, puede variar entre 170 y 193 kbp.
- Conocimiento incompleto del vPPA.
- Conocimiento escaso de los genes relacionados con los mecanismos de protección, aunque un mayor conocimiento de los genes relacionados con la virulencia de los aislados.
- Vacío de conocimiento con relación a las interacciones entre el virus y el hospedador.
- En aislados virulentos, alta mortalidad en hospedadores susceptibles.
- Los anticuerpos no neutralizan completamente al virus.
- Variación genética entre aislados.
- Falta de conocimiento relativa a la protección cruzada entre aislados.
- Falta de pruebas *in vitro* que permitan evaluar la protección.
- Dificultad para obtener cultivos celulares estables en los que crecer el virus.



# ASFV

atenuados, así como aislados inactivados para intentar inmunizar a las poblaciones susceptibles. No obstante, se obtuvieron resultados muy limitados.

El empleo de virus vivos atenuados dio lugar a los primeros resultados en los que cerdos inmunizados fueron capaces de resistir un desafío con virus virulento relacionado o virus homólogo. La atenuación de los aislados virales solía obtenerse mediante la realización de pases seriados en distintos cultivos celulares, como por ejemplo, leucocitos. Una de las principales dificultades encontradas por aquel entonces era la baja tasa de supervivencia de los animales en los estudios. Esto impedía el desarrollo de respuesta inmunitaria y su posterior caracterización.

Con la llegada de la peste durante los años 60 a la Península Ibérica, tanto España como Portugal también contribuyeron al desarrollo de candidatos vacunales. En Portugal, Manso-Ribeiro centró sus estudios de vacunología en un virus vivo atenuado mediante 60 pases en cultivo de médula ósea. Los animales vacunados fueron capaces de desarrollar una respuesta inmune protectora cuando fueron desafiados con virus virulentos. Sin embargo, en los animales inmunizados empezaron a observarse efectos adversos como neumonía, inflamación de las extremidades que dificultaba la movilidad de los animales y

aparición de úlceras en piel. Estos efectos adversos fueron observados en alrededor del 7 % de los animales vacunados y se produjo la muerte en el 4 %.

En España, fue Sánchez-Botija quien desarrolló experimentos similares a los de los portugueses. En este caso, los experimentos se centraron en el uso de virus vivo atenuado mediante pases en leucocitos y células renales. Estos aislados fueron empleados como candidatos vacunales y del mismo modo, los cerdos domésticos inmunizados fueron, en porcentajes variables, capaces de sobrevivir al desafío con virus virulentos. También se observaron lesiones asociadas a la infección con virus atenuados entre las que se encontraban lesiones en piel, tejido nervioso y tejido pulmonar. Además, algunos de estos animales presentaron viremia persistente y fueron identificados como portadores de la enfermedad.

En este siglo también se utilizaron otras estrategias vacunales como fue el uso de virus inactivado o la utilización de vacunas de subunidades. En los estudios de virus inactivados se recurrió al uso de extracto de órganos sometidos a diferentes sustancias químicas como cristal violeta o gliceraldehído, entre otros. Los resultados de estos estudios no fueron demasiado satisfactorios ya que, aunque algunos animales eran capaces de producir anticuer-

## Cuadro 2. Principales resultados de los experimentos del siglo XX frente al vPPA.

- Los estudios con virus vivo atenuado desarrollaron cierta protección frente a aislados homólogos.
- Se relacionó la aparición de efectos adversos y formas crónicas en animales vacunados con estos candidatos vacunales.
- Las formas crónicas incluyeron lesiones en piel, pulmonares y artritis.
- Los estudios con virus inactivados y vacunas de subunidades no indujeron una respuesta protectora satisfactoria.

pos específicos, éstos no estaban protegidos frente al virus virulento empleado en el desafío.

En los estudios con vacunas de subunidades, las proteínas víricas empleadas incluyeron las proteínas virales 30 y 54 implicadas en la adhesión del virus a la célula del hospedador y la respuesta inmunitaria humoral. Los resultados obtenidos parecían mostrar respuesta inmunitaria dosis-dependiente. Sin embargo, cuando fueron desafiados con un virus virulento no mostraron protección (*Cuadro 2*).

## AVANCES DE ESTE SIGLO

La búsqueda de una vacuna frente al vPPA se ha visto sin duda acelerada por la difusión constante de la enfermedad a lo largo de todo el globo. Este impulso se ha traducido en el análisis de varias estrategias vacunales entre las que destaca el empleo de virus vivos atenuados (> 60 %), virus inactivados, vacunas de subunidades, vacunas vectorizadas en virus vivos y vacunas de ADN.

Las vacunas basadas en virus vivos atenuados son las que han mostrado hasta la fecha mejor capacidad de inducir una respuesta protectora. Uno de los puntos críticos en este tipo de vacunas es alcanzar el equilibrio entre seguridad y eficacia. Dentro de este tipo de vacunas las más frecuentes son las que emplean virus a los que se les han delecionado uno o varios genes, seguido de las que emplean virus naturalmente atenuados. Los avances en ingeniería genética han permitido avanzar en el desarrollo de vacunas con mutantes con genes delecionados o modificados. Por ejemplo, dentro de





esta estrategia son de interés los genes relacionados con la virulencia de los aislados. Los resultados con este tipo de vacunas han dado resultados muy variables observándose tasas de protección que oscilan entre el 20 % y el 100 %.

Por otro lado, las vacunas basadas en virus vivos naturalmente atenuados han llegado a mostrar tasas de protección del 100 % en cerdos domésticos y jabalíes cuando se realizaron desafíos con virus homólogos. Algunos candidatos vacunales han mostrado incluso protección frente a virus heterólogos. Además, se han realizado estudios en los que los aislados fueron atenuados mediante pases en cultivo celular (por ejemplo, en leucocitos o macrófagos pulmonares, entre otros) obteniendo diferentes tasas de protección en los animales inmunizados. En uno de los estudios se observó persistencia del virus virulento durante semanas en sangre y órganos de los animales que sobrevivieron y en otros casos, se desarrolló posteriormente la enfermedad pese a haber resistido al desafío. Estos resultados permiten identificar puntos críticos en el empleo de estas vacunas como sería: ¿dónde se ubica el virus virulento en los animales en los que es capaz de persistir?, ¿durante cuánto tiempo es capaz de persistir el virus?, ¿es capaz de producir enfermedad en el propio animal que lo porta?, o ¿es capaz de infectar a otros animales susceptibles?

El estudio de vacunas basadas en virus inactivados ha continuado realizándose. Para ello se ha recurrido al uso de etilamina binaria con varios adyuvantes. Sin embargo, los animales inmunizados no sobrevivieron al desafío con aislados virulentos. Las vacunas de subunidades también ha sido una de las estrategias evaluadas. Esta consiste en la producción de proteínas específicas en diferentes sistemas de expresión para posteriormente inmunizar animales. En los experimentos desarrollados, los animales fueron capaces de sintetizar anticuerpos específicos frente a las proteínas diana. La capacidad de protección frente a virus virulentos fue variable y en algunos casos insuficiente. Algunas de las limitaciones de esta estrategia vacunal son el conocimiento parcial de la estructura del virus y su genoma y de las funciones de sus proteínas.

Por último, el empleo de vacunas vectorizadas y vacunas de ADN son otras de las estrategias que están siendo exploradas. Los porcentajes de protección obtenidos oscilaron entre el 20 % y el 100 % cuando se desafiaron (cuadro 3).



Fahroni/shutterstock.com

### LAS VACUNAS EN CHINA

El análisis de los aislados circulantes en China, en 2020, ha identificado nuevos aislados en los que existen mutaciones, deleciones, inserciones o incluso reemplazo de fragmentos cortos en el genoma del virus. Las autoridades competentes y varios autores han manifestado que podrían tratarse de aislados naturalmente atenuados o incluso, vacunas sin licencia que estarían siendo empleadas de forma clandestina. Es más, las variaciones genómicas observadas en los aislados circulantes de otros escenarios epidemiológicos nunca habían tenido cambios tan drásticos en el genoma del vPPA. Por ello, el estudio de estos aislados lleva a pensar que dichas modificaciones podrían haberse realizado en el laboratorio.

De hecho, el primer aislado hallado en China, denominado Pig/Heilongjiang/2018, ha sido utilizado para producir un candidato vacunal al que se le delecionaron 7 genes. Los investigadores, autores, de estos estudios manifestaron que este mutante es un aislado completamente atenuado de vPPA que es capaz de conferir protección dosis dependiente. La evaluación de la protección se evaluó mediante el empleo de un aislado homólogo virulento en cerdos de cebo y cerdas de reproducción. Además, como resultado de la delección de distintos genes no es posible que dicho aislado revertiera a un aislado virulento.

Además, la situación actual se ha visto agravada con la identificación, en dos provincias chinas, de aislados pertenecientes al genotipo I. Los análisis filoge-

#### Cuadro 3. Principales resultados de los experimentos del siglo XXI frente al vPPA.

- Los mejores resultados de protección se han obtenido en vacunas basadas en virus vivos atenuados ya sean naturalmente atenuados o basados en delección de genes específicos.
- El equilibrio entre seguridad y eficacia es el punto más importante en este tipo de vacunas.
- La mayoría mostraron protección frente a aislados homólogos y pocos frente a heterólogos.
- Se han observado efectos adversos variables en animales en los que se emplean este tipo de vacunas.
- Las vacunas inactivadas evaluadas hasta la fecha no confieren protección.
- Las vacunas de subunidades y ADN inducen respuesta humoral y celular pero la protección es menor que en las vacunas vivas atenuadas.

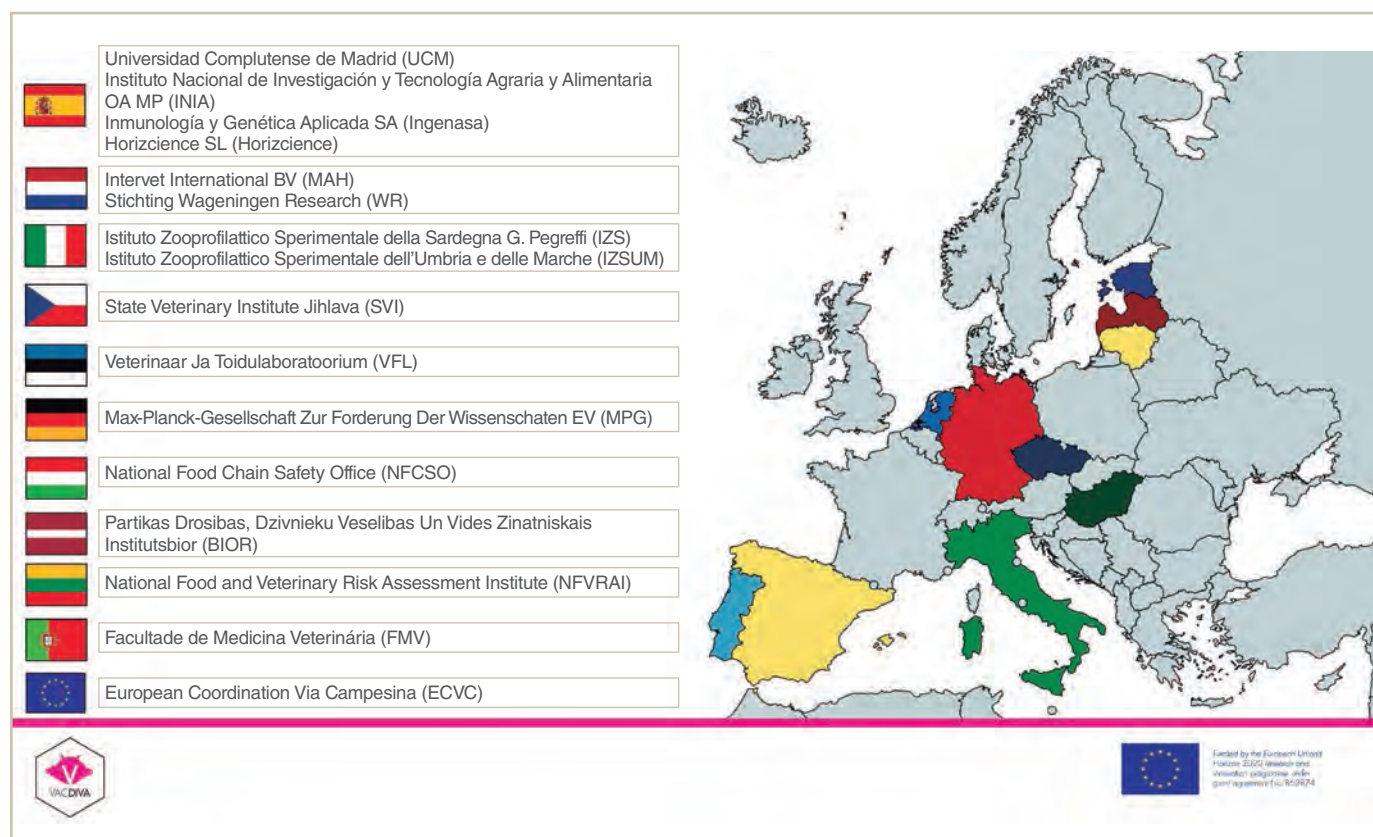


Figura 1. Miembros participantes del proyecto Vacciva.

néticos desarrollados han mostrado altas similitudes con los aislados circulantes en Portugal cuando la enfermedad estaba presente en la península. La infección con estos aislados estarían produciendo cuadros crónicos de la enfermedad con signos clínicos como artrosis o necrosis de la piel. El origen de estos aislados es incierto, pues los aislados originales dejaron de circular cuando la PPA fue erradicada en la década de los 90.

Sin lugar a dudas, la circulación de todos estos aislados naturalmente o artificialmente atenuados, están dificultando enormemente la detección temprana de la enfermedad y con ello, el desarrollo de estrategias de control efectivas.

## EL PROYECTO VACDIVA

El consorcio de este proyecto está formado por dos laboratorios internacionales de referencia para PPA (UCM y CISA-INIA-CSIC), seis laboratorios nacionales de referencia de países comunitarios (SVI, VFL, NFCSSO, IZSUM, BIOR, NFVRAI), cuatro colaboradores procedentes de países no comunitarios (ARRIAH, IAS-CAAS, CAHEC, ILRI), dos empresas relacionadas con la sanidad animal (MSD, Ingenasa), una asociación de pro-

ductores (European Coordination Via Campesina), cuatro organizaciones de investigación (IZS, FMV, MPG, WBVR) y una empresa encargada de la gestión y diseminación del proyecto (Horizcience) y coordinado por el Prof. José Manuel Sánchez-Vizcaíno (proyecto financiado por el programa H2020 de la Unión Europea, Grant Agreement número 862874; <https://vacdiva.eu/>) (figura 1).

El objetivo de este proyecto es obtener una vacuna segura, que permita distinguir entre animales vacunados e infectados (DIVA) y que induzca protección

para aislados virales tanto en cerdo doméstico como en jabalí. Amparados por este proyecto se están evaluando tres prototipos de virus vivos atenuados. Dos de ellos, Lv17/WB/Rie1 y NH/P68, son virus naturalmente atenuados y otro atenuado mediante pases en cultivo celular. Además, se están evaluando mutantes obtenidos de dichos prototipos. Es importante resaltar que el empleo de mutantes delecionados permite obtener vacunas marcadas y el desarrollo y validación de test diagnósticos que permitan distinguir entre animales infectados y va-

### Cuadro 4. Puntos críticos en el desarrollo de una vacuna frente al vPPA que deberían ser incluidos en los nuevos estudios.

- Determinar un número mínimo de animales por estudio cuando se evalúan candidatos vacunales.
- Establecer marcos temporales entre vacunación y desafío que permitan evaluar la duración de la protección.
- Que esas ventanas temporales permitan también evaluar posibles efectos adversos.
- Analizar la presencia de virus vacunal así como virus desafío en los tejidos de los animales inmunizados, así como determinar posibles patrones de excreción de los mismos.
- Evaluar la protección frente a aislados homólogos y heterólogos.

cunados. Además, se están desarrollando estrategias de vacunación y vigilancia en cerdo doméstico y jabalí.

Hasta la fecha los experimentos desarrollados han mostrado protección sólida ante el desafío tanto en cerdo doméstico como en jabalí. Estos estudios han contemplado diferentes vías de administración en función del hospedador diana (administración intramuscular, intradérmica, y oral). No obstante, aún queda un arduo trayecto en el que es necesario evaluar la seguridad de la vacuna tras la administración de dosis repetidas, sobredosificación, estudios de estabilidad y la caracterización de posibles patrones de excreción del prototipo vacunal a largo plazo. Parte de estos estudios ya han sido realizados y con resultados prometedores hasta la fecha.

### PUNTOS CRÍTICOS, FORTALEZAS Y DEBILIDADES

En la actualidad, la búsqueda de una vacuna para la PPA es una prioridad. Países como Bélgica y la República Checa han conseguido recuperar su estatus de país libre de la enfermedad a través de las herramientas de control clásicas. Sin embargo, el resto de países afectados no han sido capaces de mantener a raya esta enfermedad. Por ello, disponer de una herramienta adicional como sería la vacuna podría contribuir al control y erradicación de la enfermedad en regiones afectadas.

Los investigadores que han participado en la búsqueda de una vacuna han iden-

Cuadro 5. Fortalezas y debilidades de los estudios realizados.	
Fortalezas	Atenuación completa de la virulencia de ciertos candidatos vacunales.
	Alto nivel de protección frente a aislados homólogos.
	Protección frente a aislados heterólogos en algunos candidatos vacunales.
	En un estudio se indujo inmunidad estéril.
	Se ha conseguido adaptar ciertos candidatos vacunales a líneas celulares estables.
Debilidades	Se han incluido enfoques DIVA.
	Reducido número de animales en algunos estudios.
	La delección de genes puede dar lugar a procesos de sobreatenuación sin protección.
	La mayoría de estudios solo evaluaron la protección con aislados homólogos.
	Falta de estandarización en el número de días entre vacunación y desafío, efectividad de la vacuna y seguridad de la misma.
Debilidades	Algunos estudios no evaluaron la persistencia de virus vacunal y desafío en los tejidos de los animales inmunizados.
	Falta de adaptación a cultivos celulares estables.

tificado puntos críticos entre los que se encuentran la aparición de animales portadores, patogenicidad residual de candidatos vacunales o la aparición de posibles fallos vacunales (*cuadro 4*).

Además, se han identificado una serie de fortalezas y debilidades en los estudios desarrollados (*cuadro 5*).

### CONCLUSIÓN

Las experiencias desarrolladas hasta la fecha han sido diversas y muchos de los resultados obtenidos son prometedores. Se han evaluado diferentes tipos de va-

cunas, hospedadores, número de animales vacunados y vías de administración. Este alto número de variables dificulta en cierto modo la comparación entre experimentos y la extrapolación de resultados. Por ello, sería beneficioso armonizar las condiciones experimentales. De esta forma se podría obtener el máximo rendimiento de los resultados y conclusiones obtenidas. Pese a los vacíos de conocimiento aún presentes, se han conseguido grandes avances en las últimas décadas lo que arroja esperanza en la obtención final de una vacuna frente al virus de la peste porcina africana.

### BIBLIOGRAFÍA

- Arias, M., Jurado, C., Gallardo, C., Fernández-Pinero, J. and Sánchez-Vizcaíno, J.M. 2017. Gaps in African swine fever: analysis and priorities. *Transbound Emerg Dis.* 65: 235-247. <http://doi.org/10.1111/tbed.12695>.
- Arias, M., de la Torre, A., Dixon, L., Gallardo, C., Jori, F., Laddomada, A., Martins, C., Parkhouse, R. M., Revilla, Y., Rodriguez, F. and Sanchez-Vizcaino, J.M. 2017. Approaches and perspectives for development of African swine fever virus vaccines. *Vaccines.* 5(4): 35. <http://doi.org/10.3390/vaccines5040035>.
- Barasona, J.A., Gallardo, C., Cadenas-Fernández, E., Jurado, C., Rivera, B., Rodríguez-Bertos, A., Arias, M. and Sánchez-Vizcaíno, J.M. 2019. First oral vaccination of Eurasian wild boar against African swine fever virus genotype II. *Frontiers in Veterinary Science.* 6: 137. <http://doi.org/10.3389/fvets.2019.00137>.
- Barasona, J.A., Cadenas-Fernández, E., Kosowska, A., Barroso-Arévalo, S., Rivera B., Sánchez R., Porras, N., Gallardo, C. and Sánchez-Vizcaíno, J.M. 2021. Safety of African swine fever vaccine candidate Lv17/WB/Rie1 in wild boar: overdose and repeated doses. *Frontiers in Veterinary Science.* <http://doi.org/10.3389/fimmu.2021.761753>.
- Munoz-Perez C., Jurado, C. and Sanchez-Vizcaino J.M. 2021. African swine fever vaccine: Turning a dream into reality. *Transbound Emerg Dis.* 68(5): 2657-2668. <http://doi.org/10.1111/tbed.14191>.
- Revilla, Y., Pérez-Núñez, D. and Richt, J.A. 2018. African swine fever virus biology and vaccine approaches. *Adv Virus Res.* 100: 41-74. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2017.10.002>.