

Libros de **Cátedra**

# Patogenicidad microbiana en Medicina Veterinaria

Volumen: Virología

Fabiana A. Moredo, Alejandra E. Larsen,  
Nestor O. Stanchi (Coordinadores)

n

FACULTAD DE  
CIENCIAS VETERINARIAS



UNIVERSIDAD  
NACIONAL

# **PATOGENICIDAD MICROBIANA EN MEDICINA VETERINARIA**

**VOLUMEN: VIROLOGÍA**

Fabiana A. Moredo  
Alejandra E. Larsen  
Nestor O. Stanchi  
(Coordinadores)

Facultad de Ciencias Veterinarias



## CAPÍTULO 2

### Arterivirus

*Germán E. Metz, María M. Abeyá*

Dentro del orden *Nidovirales*, familia *Arteriviridae* se agrupan varias especies virales siendo las más representativas en medicina veterinaria el virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRSV, de sus siglas en inglés) y el virus de la Arteritis Equina (VAE), siendo este último la especie representativa del género. Una característica importante que presentan todas las especies dentro de esta familia viral es que presentan patogenicidad especie específica.

Los virus incluidos en la familia *Arteriviridae* poseen envoltura, la que los hace sensible a solventes lipídicos y detergentes y una nucleocápside de simetría icosaédrica. Su genoma está constituido por ARN simple cadena policistrónico de polaridad positiva (ARNsc +) con un tamaño de entre 12-17 Kb dependiendo la especie viral.

#### Virus de Arteritis Equina

El virus de la arteritis equina (VAE) (Figura 1) posee un genoma de 12,7 Kb conteniendo 10 marcos abiertos de lectura (ORFs) denominados: 1a, 1b, 2a, 2b, 3, 4, 5a, 5, 6 y 7. En la región 5' se agrupan los ORFs que codifican las replicasas y proteínas no estructurales (ORF 1a y ORF 1b), mientras que en la región 3' se agrupan los que codifican las proteínas estructurales (ORF 2a -7) mediante la transcripción de ARNm subgenómicos característicos del orden *Nidovirales* (Figura 2).

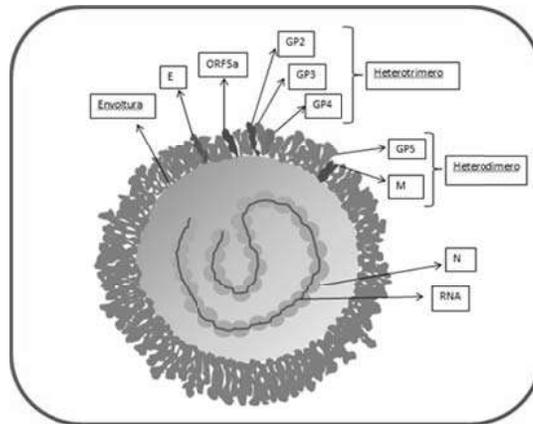


Figura 1. Esquema del arterivirus equino (VAE)

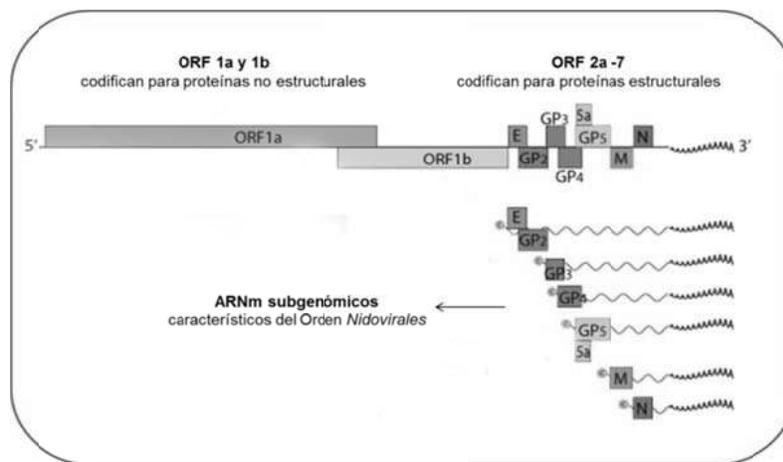


Figura 2. Organización genómica de los arterivirus (modelo VAE)

La cápside viral está formada por una única proteína denominada proteína N (nucleocápside), fosforilada y altamente inmunogénica. Por otro lado, la envoltura contiene 5 proteínas menores denominadas E, gP2, gP3, gp4 y gP5a, así como 2 proteínas principales M y gP5. Estas últimas, se asocian mediante puente disulfuro conformando un dímero de vital importancia en el ensamblaje viral del VAE y en la respuesta inmune. Diversos autores demostraron que el patrón neutralizante del VAE es alterado con los cambios de los aminoácidos producidos en esta glicoproteína gP5, proteína en la cual se encontraron los epítopes inmunodominantes posibles de ser neutralizados por anticuerpos específicos. Los análisis de secuencias del gen *gP5* permitieron establecer la existencia de dos orígenes filogenéticos de las cepas del VAE: cepas de origen americano (cepa Bucyrus de referencia) y cepas de origen europeo.

La proteína gP5 presenta una región variable V1 que contienen epítopes que inducen anticuerpos neutralizantes. Estas regiones inmunodominantes tienen participación específica en la neutralización viral.

Por otro lado, la proteína M presenta una región N-terminal que contiene tres potenciales regiones transmembrana lo que explicaría la escasa inmunogenicidad de esta región. En este sentido presenta una pequeña región de 18 aminoácidos expuesta en la superficie de la partícula viral no fue reconocida por un panel de sueros positivos. Sin embargo, en la región C-terminal (aminoácidos 88 - 162) se identificaron epítopes lineales que son reconocidos frente a un panel de sueros específicos contra VAE. Mediante la producción de distintas proteínas de fusión realizadas en esta zona, se definió a la región comprendida entre los aminoácidos 108 y 155 como la región de mayor reactividad con los sueros estudiados, aunque se hallaron epítopes neutralizantes a lo largo de toda la región C-terminal de esta proteína.

## **Replicación y patogénesis viral**

Las puertas de entrada del VAE son la vía respiratoria y tracto genital y su diseminación se produce principalmente a través de las células blancas sanguíneas. En general, no se evidencian signos clínicos pero de presentarse manifestación clínica la misma puede ser muy variada. La consecuencia más grave de la patogenia de este virus es posibilidad de persistencia del mismo en los padrillos infectados.

La replicación del VAE ocurre inicialmente en células endoteliales y macrófagos, habiendo luego una segunda replicación en nódulos linfáticos regionales para finalmente producirse la diseminación a través de macrófagos (viremia). Se infectan posteriormente células endoteliales de todos los componentes del sistema circulatorio y músculo liso de arterias, miometrio, epitelio tubular renal, adrenal y en menor medida, parénquima hepático, células de las criptas intestinales y epitelio bronquial. Las manifestaciones clínicas de la infección viral son consecuencia del daño endotelial y aumento de la permeabilidad vascular aunque no se conoce el rol preponderante de estos procesos en la patogenicidad del VAE.

La replicación del virus se produce en el citoplasma celular, sintetizándose ARNm subgenómicos mediante un proceso de transcripción discontinua, los cuales expresan los genes contenidos en su región 3' y poseen en su región 5' una secuencia líder derivada del extremo 5' del ARN genómico.

En general, el proceso de entrada viral a las células está mediado por distintas moléculas adaptadoras y receptores que favorecen su ingreso y posterior replicación en las mismas. El único receptor encontrado para el VAE hasta el momento es una proteína de 247 aminoácidos de la familia de las quimioquinas denominada EqCXCL16 presente en monocitos CD14+. A pesar de su vital importancia, el EqCXCL16 no es el único receptor utilizado ya que el VAE es capaz de infectar distintas líneas celulares como RK13, BHK21, Vero y algunas líneas celulares humanas como EEC por lo que habría otros receptores involucrados en estas líneas celulares. De hecho, en otros virus dentro de esta familia como el virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino se reportaron varios receptores involucrados en la infección, como la sialidhesinas, heparan sulfato, CD151, CD163, DC-SIGN o CD 209 y vimentina, aunque los dos primeros serían factores de anclaje más que receptores específicos del virus.

## Respuesta inmune

Los componentes de la respuesta inmune innata de las mucosas del tracto respiratorio y genital representan la primera línea de defensa contra las infecciones por VAE; sin embargo poco se conoce sobre su acción en la eliminación del VAE en equinos. El sistema de interferones es el componente clave en la respuesta antiviral. Su síntesis es inducida como producto de la activación de la cascada de señalización que se inicia en el momento del reconocimiento de los Patrones Moleculares Asociados a Patogenos (PAMPs por su sigla en inglés) virales (proteínas y ácidos nucleicos) por parte de los Receptores de Reconocimiento de Patrones (por su sigla en inglés PRRs) presentes en diferentes tipos de células en la puerta de entrada del virus. En el caso de VAE, no se ha determinado cuáles son sus proteínas involucradas en el reconocimiento pero el sistema de TLR implicado en el reconocimiento de su ARNsc por regla general es el TLR7, así como RIG-I y MDA-5 detectan estructuras de ARNdc que se conforman durante la replicación viral. La activación de estos PRRs desencadena la activación de factores de transcripción que promueven la desregulación de genes que codifican para diferentes efectores de la respuesta inmune innata, principalmente interferones y citoquinas proinflamatorias, entre otras moléculas.

En estudios sobre evasión viral por parte del VAE se ha propuesto a las proteínas no estructurales nsp1, nsp2, and nsp11 como antagonistas de la actividad de los interferones responsables de la regulación de la respuesta inmune innata.

*In vivo*, el VAE infecta a los macrófagos alveolares luego de la infección respiratoria, sin embargo, *in vitro* se demostró que los mismos son susceptibles a la infección pero no a la replicación viral. A pesar de ello, luego de la infección viral tanto macrófagos alveolares como sanguíneos resultan activados y aumenta la transcripción de mediadores proinflamatorios. La magnitud de dicha activación es dependiente de la cepa viral actuante, siendo distinta para cepas virulentas y no virulentas.

## Inmunidad Adaptativa

La inmunidad humoral adaptativa en las infecciones por el VAE se caracteriza por la inducción de la síntesis de anticuerpos fijadores de complemento y neutralizantes que brindan protección frente a reinfecciones tanto de cepas virulentas como no virulentas. La técnica de oro para la determinación de anticuerpos neutralizantes es la neutralización viral la cual detecta principalmente anticuerpos dirigidos hacia la proteína gP5. Por otro lado, la técnica de *immunoblotting* presenta resultados variables al utilizar las proteínas gP5 y N, mientras que el empleo de la región C terminal de la proteína M brinda buenos resultados de detección de anticuerpos. La proteína N es reconocida en mayor medida mediante la técnica de *immunoblotting* de sueros provenientes de padrillos portadores de la enfermedad.

Generalmente, el VAE es eliminado de circulación a los 28 días post-infección por los anticuerpos neutralizantes, con excepción de los padrillos portadores. La importancia de estos anticuerpos neutralizantes en la prevención de la reinfección viral, se demostró en la protección

que reciben los potrillos debido a la transferencia pasiva de estos anticuerpos mediante el calostro. Si bien no es conocido con exactitud el proceso de neutralización viral por acción de los anticuerpos, muchos estudios *in vitro* demuestran que este es un proceso dependiente del complemento. A pesar que las distintas cepas difieren en el perfil de neutralización y virulencia, existe un único serotipo del VAE.

### **Inmunidad celular**

La remoción de las células infectadas con VAE es mediada específicamente por los linfocitos T CD8 citotóxico que persisten por 1 año luego de la infección. No se conoce hasta el momento las proteínas hacia las cuales está dirigida esta citotoxicidad de la respuesta celular. Tanto la respuesta inmune celular de linfocitos T CD8 citotóxicos como la producción de anticuerpos neutralizantes serían necesarias para la eliminación de células infectadas como neutralizar al virus durante la viremia, en los animales infectados tomando como modelo al virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino.

### **Profilaxis y control**

Existen dos tipos de stock vacunas comerciales desarrolladas contra el VAE: a virus activo modificado que se utiliza en EE.UU. y a virus inactivado mayormente utilizado en Europa y Japón. Las primeras protegen de la enfermedad clínica y otorgan mayor duración de la protección. Si bien hoy en día se discuten y comparan las ventajas y desventajas de ambos tipos de vacunas, en la Argentina, sólo se utilizó la vacunación luego del brote del 2010, en este caso el número de dosis disponible fue insuficiente para inmunizar a toda la población. La desventaja de ambas vacunas es la imposibilidad de diferenciar animales vacunados de aquellos infectados naturalmente al momento del diagnóstico serológico.

Las infecciones de animales por el VAE suelen ser asintomáticas. De desarrollar signos clínicos los más frecuentes son: fiebre, epifora, edema palpebral, conjuntivitis, flujo nasal seroso, congestión y hemorragias petequiales y/o equimóticas de la mucosa nasal, inflamación catarral de las mucosas del tracto respiratorio y edema abdominal y de los miembros. Una de las mayores consecuencias de la enfermedad es el aborto de yeguas preñadas.

La detección de anticuerpos específicos se realiza por la técnica de neutralización viral como técnica oficial aprobada por la OIE. Mediante resolución de SENASA se estableció un control de padrillos enteros una vez al año para determinar la presencia de anticuerpos en la población equina. Para comprobar el estado de portador-transmisor de un padrillo seropositivo, primero se realiza la detección de anticuerpos por la técnica mencionada. Si el padrillo es positivo (título mayor o igual a 1:4) debe realizarse consecutivamente la prueba de aislamiento viral y la reacción en cadena de la polimerasa a partir de una muestra de semen para determinar el estado portador del mismo. En el caso de resultados no concluyentes con estas pruebas, se deberá realizar una prueba de servicio, que consiste en servir a dos yeguas

seronegativas y comprobar si existe seroconversión en el período comprendido entre el servicio y los treinta días posteriores al mismo (*test mating*).

En el caso de un brote confirmado de la enfermedad como el ocurrido en el 2010, deben remitirse muestras pareadas de sangre para determinar la seroconversión de los animales.

Para el caso de yeguas preñadas que hayan abortado, es importante enviar muestras de placenta y tejidos fetales para intentar el aislamiento viral mediante cultivos celulares y confirmar la presencia del virus.

## **Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino**

### **Generalidades**

El virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRSV, en inglés), es semejante al VAE, envuelto y con nucleocápside de simetría icosaédrica, posee un genoma de aproximadamente 15 Kb conteniendo entre 10 y 15 ORFs conocidos, ubicados en la región 5' los que codifican para las proteínas no estructurales, mientras que los que codifican para las proteínas estructurales lo hacen en el extremo 3' del mismo.

El PRSSV emergió hace casi 30 años causando epidemias de, hasta entonces, una desconocida enfermedad reproductiva y respiratoria de los cerdos. Al igual que con el VAE, los orígenes filogenéticos de las cepas, en base a la secuencia génica de la proteína gP5, se agrupan en cepas de origen americano (VR-2332 o genotipo II) y cepas de origen europeo (cepa de referencia Lelystad o genotipo I). La caracterización genética de las cepas de VSRRP de ambos continentes reveló la existencia de diferencias genéticas considerables, sugiriendo que los dos genotipos habrían evolucionado separadamente y se encontraban distantes del ancestro común. Fue detectado por primera vez en EE.UU. en 1987 y el primer brote europeo se detectó en Alemania en el año 1990. Si bien se encuentra en las principales áreas de producción porcina del mundo, como América del Norte y del Sur, Europa y Asia, afortunadamente en Argentina continúa siendo una enfermedad exótica.

Las principales vías de transmisión del PRRSV son la respiratoria y la reproductiva mediante semen infectado dado que el virus replica en espermatozoides y espermátidas. La transmisión vertical es una ruta secundaria de infección viral, como así también mediante jeringas contaminadas, fómites e insectos como la mosca doméstica. La morbilidad varía entre el 50 y 100 %, siendo una enfermedad altamente contagiosa, que luego del último brote ocurrido en China en 2006 con una cepa muy virulenta, alcanzó el 60 % de los animales de ese país causando grandes pérdidas económicas. Por otro lado, la mortalidad varía entre 20 y 100 %, dependiendo de la cepa viral, de la edad y salud general de los animales. Además de los signos respiratorios y reproductivos, se observa persistencia viral del PRRSV por más de 150 días en cerdos adultos y por hasta 210 días en lechones infectados congénitamente. Luego de 12-14 horas de la exposición al PRRSV, los animales se encuentran en etapa de viremia. Las manifestaciones clínicas incluyen un patrón alterno de manchas en la piel

principalmente a nivel orejas (por eso también se conoce como “la enfermedad de la oreja azul”), vulva y a veces en el tronco. Otros signos son: fiebre, anorexia, disnea, linfadenopatía y fallas reproductivas que se evidencian por el nacimiento de crías débiles o fetos autolizados.

La cepa viral actuante en el último brote de la enfermedad ocurrido en el año 2006, tenía la característica de ocasionar fiebre muy alta (hasta 42 °C), además de lesiones atípicas hasta el momento como la afección gastrointestinal y cerebral.

Diversos trabajos con el PRRSV han determinado la supresión de la síntesis de INF tipo I al interferir con la vía de señalización de RIG-I.

Respecto al VAE usado como modelo, cabe mencionar las siguientes particularidades para el caso del PRRSV:

- La proteína GP2 es codificada por ORF2a (en lugar de ORF2b, como en otros arterivirus).
- Como estrategia de supervivencia, PRRSV se caracteriza por inhibir las vías apoptóticas en la infección temprana, mientras que finalmente las células mueren por apoptosis dependiente de caspasas.
- Se reportó la participación de TLR3 durante la infección de PRRSV en macrófagos y tejido linfoide.
- Los cerdos infectados con PRRSV produjeron anticuerpos contra la mayoría de las proteínas estructurales, reaccionando estos en mayor medida contra la proteína viral N. También se observaron títulos altos de anticuerpos contra las proteínas no estructurales nsp1 y nsp2, siendo mayores hacia esta última.
- Varios estudios asociaron al PRRSV con la producción de IL-8.
- Muchos reportes sugieren que el PRRSV induce la producción de IL-10 en cerdos en las primeras 2 semanas post-infección. Esta citoquina inmunosupresiva interactúa con un amplio rango de células inmunes, incluyendo las células blanco de PRRSV del linaje monocito/macrófago afectando así la inmunidad mediada por células.
- La nsp2 parece inducir la respuesta inmune innata.
- Es importante destacar que la nsp1 es parcialmente transportada al núcleo, desde donde realiza sus actividades evasivas inmunes. Mutaciones inducidas en la proteína nsp1 atenúan la supresión inmune inducida por el PRRSV.

## **Profilaxis y control**

Para el diagnóstico de la enfermedad, las muestras de elección son suero, semen y el cordón umbilical, las técnicas empleadas pueden ser inmunofluorescencia, ELISA o RT-PCR. Estudios recientes, motivados por la búsqueda de vías menos invasivas, corroboraron la posibilidad de la toma de muestra de fluidos orales con resultados muy similares a los demás procedimientos. Las muestras orales se tomaron con cuerdas de algodón impregnadas con jugo de manzana, para que los animales las masticaran por unos 20 minutos y poder extraer

los fluidos mecánicamente y utilizarlos como muestras para determinar la presencia de ARN del PRRSV o anticuerpos específicos.

Se encuentran disponibles vacunas a virus inactivo y a virus atenuado. Las vacunas atenuadas inducen protección inmune de larga duración, pero al derivar de una sola cepa del PRRSV, no protegen correctamente cuando hay una infección heteróloga. Además, con estas vacunas, ha habido casos de reversión y transmisión del virus desde animales vacunados a no vacunados principalmente a partir de semen. Mientras tanto, las vacunas a virus inactivo solo protegen a un porcentaje de los animales, por poco tiempo y no son elegidas por el productor. Las expectativas están puestas en las secuencias consenso que representen simultáneamente una determinada porción del genoma viral con capacidad inmunogénica (ejemplo: glicoproteína gP5) de todas las cepas conocidas hasta el momento y que sirva de base para la producción de vacunas de nueva generación.

# Referencias

- Balasuriya UBR, MacLachlan NJ. The immune response to equine arteritis virus: potential lessons for other arteriviruses. *Vet Immunol Immunopathol.* 2004; 102:107-29.
- Castillo-Olivares J, Tearle JP, Montesso F, Westcott D, Kydd JH, Davis-Poynter NJ, Hannant D. Detection of equine arteritis virus (EAV)-specific cytotoxic CD8+ T lymphocyte precursors from EAV-infected ponies. *J. Gen. Virol.* 2003; (84):2745-53.
- Christianson WT, Choi CS, Collins JE, Molitor TW, Morrison RB, Joo HS. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in mid-gestation sows and fetuses. *Can J Vet Res.* 1993; 4:262-8.
- Darwich L, Díaz I, Mateu E. Certainties, doubts and hypotheses in porcine reproductive and respiratory syndrome virus immunobiology. *Virus Res.* 2010; 1-2:123-32.
- den Boon JA, Spaan WJM, Snijder EJ. Equine arteritis virus subgenomic RNA transcription: UV inactivation and translation inhibition studies. *Virology.* 1995; 213:364-72.
- Echeverría MG, Díaz S, Metz GE, Serena MS, Panei CJ, Noretto E. Evaluation of neutralization patterns of the five reported unique Argentine equine arteritis virus field strains. *Rev Arg Microbiol.* 2010; 1:11-7.
- Jeronimo C, Archambault, D. Importance of M-protein C terminus as substrate antigen for serodetection of equine arteritis virus infection. *Clin Diag Lab Immun.* 2002; 9:698-703.
- Metz GE. Estudio de la expresión antigénica y de la respuesta inmune humoral inducida por regiones inmunogénicas de las proteínas M y gP5 del virus de la Arteritis Equina. Tesis Doctoral. La Plata, Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata; 2010.
- Prieto C, Castro JM. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in the boar: a review. *Theriogenology.* 2005; 63(1):1-16.
- Snijder EJ, Kikkert M, Fang Y. Arterivirus molecular biology and pathogenesis. *J Gen Virol.* 2013; 10:2141-63.
- Snijder EJ, Meulenberg JM. The molecular biology of arteriviruses. *J Gen Virol.* 1998; 79:961-79.
- Veit M, Matczuk AK, Sinhadri BC, Krause E, Thaa B. Membrane proteins of arterivirus particles: Structure, topology, processing and function. *Virus Res.* 2014; 194:16–36.
- Zhang Q, Yoo D. PRRS virus receptors and their role for pathogenesis. *Vet Microbiol.* 2015; 177 (3-4):229-41.