

COMPORTAMIENTO ANTIGÉNICO DE CEPAS DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE AUJESZKY

M. G. Echeverría, E.O. Nosetto

Cátedra de Virología. Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional de La Plata

Investigadores del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

RESUMEN: Desde que la Enfermedad de Aujeszky fue diagnosticada por primera vez en Argentina en 1978, fueron sucediéndose numerosos brotes en diferentes lugares del país. El objetivo de este trabajo fue comparar diferentes cepas del virus de la Pseudorabia porcina. Para ello utilizamos 5 cepas argentinas (3 aisladas en nuestro laboratorio) y 4 de referencia internacional. Las mismas fueron caracterizadas mediante pruebas físico-químicas; sus proteínas comparadas por electroforesis en SDS-PAGE; su antigenicidad fue comparada al evaluar los 9 antiseros producidos en ratas mediante un sistema de virus neutralización cruzada y ELISA indirecto cruzado. Las pruebas físico-químicas permitieron observar pequeñas diferencias de comportamiento de las cepas virales frente a diferentes variables tales como pH, calor, acción de la tripsina, éter y cloroformo, las que en ningún caso aportan datos concluyentes que permitan observar diferencias significativas. El estudio de la movilidad de las proteínas estructurales de los virus en geles de poliacrilamida tampoco arrojó datos de importancia y resultó insuficiente para distinguirlos. El uso de la prueba de virus neutralización cruzada para estudiar su antigenicidad, en cambio, mostró resultados que permitieron comprobar que las cepas argentinas produjeron títulos neutralizantes más elevados que las extranjeras.

Palabras Clave: Enfermedad de Aujeszky; caracterización; antígenos

ANTIGENIC BEHAVIOUR OF SEVERAL AUJESZKY'S DISEASE VIRAL STRAINS

ABSTRACT: Since Aujeszky's Disease was first recognized in Argentina in 1978, many outbreaks occurred in different places in our country. Nine Pseudorabies virus strains, 5 Argentine -3 of them isolated in our laboratory- and 4 reference ones, were characterized by physicochemical, SDS-PAGE, virus neutralization and ELISA methods. Using trypsin, heat, ether, chloroform and pH in physicochemical analysis, only small differences were observed, as well as when the viral structural proteins were compared by SDS-PAGE. Cross virus neutralization test using 9 antisera produced in rats, showed that Argentine Pseudorabies virus strains elicited higher antibodies titres than those obtained with reference ones.

Key Words: Aujeszky's Disease; characterization; antigens

Fecha de recepción: 04/09/98

Fecha de aceptación: 02/09/99

Dirección para correspondencia:

María Gabriela Echeverría CC 296, La Plata (B1900AVW), Argentina Fax: (0221) 425-3276

E-mail: gecheverria@fcv.medvet.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Aujeszky (EA) o Pseudorrabia es una enfermedad viral, contagiosa y aguda de muchas especies animales, causada por un herpesvirus. El virus herpes suino o de la Pseudorrabia (PRV), llamado de acuerdo a la nomenclatura internacional "Suid Herpesvirus 1" (SHV-1), pertenece a la familia *Herpesviridae*, subfamilia *alphaherpesvirinae*. El huésped natural del PRV es el cerdo, especie en la cual la infección por este virus se manifiesta de diferentes maneras según se trate de individuos adultos o jóvenes. Mientras que en los primeros causa abortos e infecciones latentes, para los segundos resulta letal. Otras especies -salvajes y domésticas- también pueden ser infectadas por este virus. En estos casos, la enfermedad tiene siempre un curso agudo y termina generalmente con la muerte de los individuos afectados (1).

En 1978, Ambrogi y colaboradores (2), diagnosticaron por primera vez la EA en Argentina y lograron el aislamiento del agente causal. A partir de ese año, los brotes de EA fueron ocurriendo, primero en las zonas de mayor producción porcina del país, para luego extenderse a otras regiones de menor intensidad de producción (3).

El cerdo es el principal reservorio del virus aunque también son fuentes de infección la atmósfera, el estiércol, las aguas servidas, el suelo y fomites, así como carnes, vísceras y carcasas contaminadas, y secreciones. La susceptibilidad del cerdo se ve aumentada debido a fatigas provocadas por el transporte, cambios climáticos y otras situaciones de estrés, tales como escasez de alimentos y deficiencias inmunitarias, que pueden favorecer la manifestación clínica de la enfermedad en piaras infectadas inaparentemente, por la reactivación del virus que se encuentra en estado latente (1).

Al poseer un rango tan amplio de huéspedes, el SHV-1 puede replicar en una extensa variedad de células (4, 5, 6, 7) que pueden presentar 2 tipos distintos de efecto citopatogénico (ECP) característico: formación de sincicios y/o redondeamiento celular. De acuerdo al comportamiento y a la habilidad de formar sincicios se pueden dividir las cepas en virulentas y de reducida virulencia.

Como todos los miembros de la familia *Herpesviridae*, el PRV es sensible a los solventes orgánicos y al calor y la tripsina, siendo las cepas virulentas más sensibles al calor que las de virulencia reducida (4).

De las 11 glicoproteínas (gps) halladas, gC y gD constituyen los mayores inmunógenos del SHV-1 (8), y junto con gB y gE, juegan un rol muy importante en la inducción de anticuerpos neutralizantes (AcN) en animales infecta-

dos (9, 10). Los anticuerpos (Ac) dirigidos contra gB, gC y gD son capaces de neutralizar la infectividad del SHV-1 en ausencia de complemento (C'), inhibiendo la adsorción viral (11). gH junto con gL inducen AcN independientes del C' (12). Los AcN aparecen a los 7 días post infección y alcanzan su pico máximo en aproximadamente 2 a 3 semanas, permaneciendo luego por varios meses. Además, por su efecto inmunosupresor, el PRV aumenta la severidad de las infecciones bacterianas (especialmente pulmonares) por *Pasteurella multocida* o *Streptococcus suis*.

El objetivo de esta investigación fue comparar las gps del SHV-1 de las cepas virales aisladas en nuestro país y de referencia procedentes de otros países, aisladas en distintos períodos, mediante el análisis de sus propiedades biológicas, determinando si existen diferencias en la respuesta de AcN contra las distintas cepas, y el grado de homología que existe entre las proteínas de las diferentes cepas de acuerdo a su peso molecular (PM).

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas virales

Fueron utilizadas las siguientes: Río Cuarto 79 (RC/79); Mercedes (Mer); Chañar Ladeado 7 y 15 (CL-7 y CL-15); Trenque Lauquen 92 (TL/92); Sweden 66 (S-66); Indiana Sullivan (Ind-S); Alfort (Alf); Yamagata 81 (YS-81). El origen y la historia de las mismas se encuentra resumido en otro trabajo (3).

Características del ECP en distintos cultivos celulares de línea

Medios y soluciones de cultivo: como medio de crecimiento celular (MC) se utilizó Medio Mínimo Esencial (MEM, Laboratorios Nissui, Japón) con el agregado de 0,3 mg/ml de glutamina, 200 UI/ml de penicilina, 0,5 mg/ml de estreptomycin, 20 UI/ml de nistatina y 10% de suero fetal bovino (SFB). El medio de mantenimiento celular (MM) fue el mismo que el anterior pero con un porcentaje reducido de SFB (2%). Para determinadas experiencias se utilizó medio de cultivo sin suero (MSS). Para la disgregación de las monocapas celulares se utilizó una solución de tripsina (Laboratorios Difco, USA) al 0,25% y sal sódica del ácido etilendiaminotetracético (EDTA) al 0,2% en solución tamponada de fosfatos (PBS).

Cultivos celulares: fueron utilizadas las siguientes líneas celulares: «Porcine Kidney» -riñón de cerdo- (PK15); «Continuous Porcine Kidney» -riñón de cerdo- (CPK); «Rabbit Kidney» -riñón de conejo- (RK13); «Madin Darby Bovine Kidney» -riñón de bovino- (MDBK); «Crandell's Feline Kidney» -riñón de gato- (CRFK) y «Helen

Lane» -tumor humano- (HeLa), cedidas por la Universidad de Tokio y el Instituto Nacional de Salud Animal del Japón. Otra línea celular utilizada fue «Baby Hamster Kidney» -riñón de hamster- (BHK) cedida por el Laboratorio Med Vet, La Plata.

Replicación viral: todas las cepas fueron replicadas entre dos y tres veces sobre las células de origen porcino (CPK), desarrolladas en frascos de vidrio de diferentes capacidades. Los sobrenadantes correspondientes fueron luego centrifugados, divididos en tubos Eppendorf (0,5 ml) y congelados a -70°C hasta su uso.

ECP en células teñidas con hematoxilina y eosina (H-E): todas las líneas celulares fueron sembradas utilizando MC, en una concentración de 2×10^5 a 5×10^5 células/ml, en cajas de Petri de 60 mm de diámetro (19 cm^2) que contenían 1 cubreobjetos de $18 \times 18 \text{ mm}$ cada una. Se utilizaron 10 cajas de Petri por cada una de las células utilizadas: 9 fueron empleadas para cada una de las cepas virales y una para las células control sin inocular. Una vez que las monocapas fueron confluentes sobre los cubreobjetos, el MC fue aspirado y cada una de las cajas fue inoculada con 0,5 ml de cada una de las cepas virales (títulos entre $10^{6.5}$ y $10^{7.5}$ DICT₅₀/0,05 ml), dejándose en adsorción a 37°C durante 60 min en atmósfera con 5% de CO_2 . Posteriormente, se retiraron los inóculos, se lavaron las monocapas con PBS y finalmente se colocaron 6 ml de MM en cada placa. Fueron incubadas en las condiciones antedichas durante 14 h, a excepción de las que contenían RK13 que solo fueron incubadas durante 9 h. Luego de este período fueron lavadas 3 veces con PBS y los cubreobjetos fueron fijados con solución de Carnoy durante 15 min. Por último, cada monocapa fue teñida con el método convencional de H y E.

Pruebas de caracterización físico-química

Para este trabajo se utilizaron células CPK, solución fisiológica -ClNa 0,15 M-(SF), SFB, bicarbonato de sodio, medio 199, MM, MC, tripsina, éter y cloroformo de alta calidad. Todas las pruebas fueron realizadas en microplacas de fondo plano de 96 pocillos, las cuales fueron incubadas a 37°C en atmósfera reducida de CO_2 durante 6 días (13).

Acción del calor: se efectuaron las diluciones virales en SF en tubos por duplicado los que fueron incubados a Baño de María (BM) a 56°C durante 15 min y a 56°C durante 30 min respectivamente.

Acción de la tripsina: se efectuaron diluciones en partes iguales de tripsina al 1% (0,5 ml) e inóculo puro (0,5 ml), logrando una concentración final de tripsina de 0,5%. El mismo

procedimiento se realizó con tripsina al 0,2% (concentración final 0,1%). Se mantuvo el pH en 7,2 con bicarbonato de sodio y se incubaron los tubos a 37°C durante 60 min a BM. Posteriormente la tripsina fue inactivada con el agregado de 0,1 ml de SFB.

Acción del pH: se realizaron las diluciones virales en Medio 199 (pH 3) y se incubaron a 4°C durante 18 h.

Acción del éter: se mezclaron 0,1 ml de éter y 0,5 ml de virus (concentración final 20%), se agitaron los tubos durante 10 min y la mezcla se incubó a 4°C durante 18 h. Luego, los tubos se centrifugaron a $1200 \times g$ en rotor 3N (centrífuga Tomy Seiko) durante 10 min, el éter fue aspirado y el inóculo diluido e inoculado.

Acción del cloroformo: se mezclaron 2 ml de virus con 0,1 ml de cloroformo (concentración final 5%), y se procedió de la misma forma que con el éter.

Las diluciones virales fueron realizadas en base logarítmica 10 (10^{-1} a 10^{-8}) y cada una de ellas inoculada en 5 pocillos (0,05 ml) con 0,1 ml de células CPK. Se dejaron como controles negativos células sin inocular, y como controles positivos, una titulación paralela de cada virus sin tratamiento en cada microplaca.

Preparación de los Antígenos (Ag)

Obtención de Ag de membrana: (membrana citoplásmica celular modificada por las gps virales). Se infectaron monocapas de células MDBK con inóculos con un título entre 10^6 y 10^7 DICT₅₀/0,05 ml de cada una de las cepas virales. Luego de la adsorción a 37°C durante 60 min, se completó con MSS y se dejó en incubación en las mismas condiciones, hasta la aparición de ECP generalizado. Las células fueron recogidas junto con los medios y fueron centrifugadas a $3.200 \times g$ en rotor 5N (centrífuga Tomy Seiko) durante 15 min. El sobrenadante se conservó congelado y el «pellet» celular fue lavado con buffer TEN (20 mM Tris-ClH pH 7,4; 0,1mM EDTA; 10mM ClNa) y centrifugado nuevamente como en el paso anterior. El «pellet» obtenido fue resuspendido en una concentración entre 50 y 100 veces menor al volumen del medio de cultivo sobrenadante original, en buffer TEN-1% Nonidet P-40 y se dejó a 4°C durante 60 min. Por último, se centrifugó a $7.500 \times g$ durante 20 min en el mismo rotor y centrífuga, se descartó el «pellet» y el sobrenadante se centrifugó nuevamente a $90.000 \times g$ en rotor 80 Ti (Beckman L8-80) durante 60 min. El Ag resultante fue dividido en alícuotas y conservado a -70°C hasta su uso (14).

Obtención de virus purificado: el sobrenadante clarificado de cada uno de los cultivos inoculados con cada cepa viral fue concentrado mediante ultracentrifugación en un rotor

Beckman 50 Ti a 100.000 x g durante 3 h. El «pellet» obtenido fue resuspendido en un volumen de TE 200 veces menor al volumen de medio original y se purificó en un gradiente continuo de tartrato de potasio 10-40% en buffer TE. El «pellet» final fue resuspendido en 0,1 ml de buffer TE y titulado. Los títulos obtenidos oscilaron entre $10^{5,5}$ y $10^{6,75}$ DICT₅₀/0,05 ml. Cada uno de los virus fue utilizado en la inoculación de los animales de experimentación, por lo que posteriormente fueron inactivados con luz UV durante 15 min.

·Animales de experimentación. Esquema de inoculación

Se utilizaron ratas convencionales Long Evans machos de 2 meses de edad. Se obtuvieron muestras de suero sanguíneo para controlar que no fuesen tóxicos y fueran carentes de Ac anti-SHV-1. Estos sueros se utilizaron como controles negativos de cada uno de los animales utilizados. Las inoculaciones fueron realizadas por vía intraperitoneal con intervalos de 15 a 20 días entre cada una. La primera se realizó con 0,25 ml de virus inactivado y 0,25 ml de adyuvante completo de Freund; la segunda, con iguales volúmenes pero utilizando adyuvante incompleto; la tercera con 0,5 ml de virus sin adyuvante y la cuarta, con 0,5 ml de Ag de membrana. Previamente a cada inoculación, se sangraron los animales y se titularon los sueros. Los sueros anti-PRV fueron obtenidos de las ratas mediante punción cardíaca y sangrado a blanco. Fueron centrifugados para eliminar los elementos formes, divididos en alícuotas y congelados hasta su uso. Parte de ellos fue inactivada a 56°C durante 30 min.

·Virus neutralización (VN) cruzada

Se usaron 100 partículas infectivas / 0,025 ml de cada una de las cepas virales. Fue utilizado C' heterólogo liofilizado, diluido 1:20 en MSS, dividido en alícuotas y congelado a -80°C hasta su uso. Se enfrentó cada una de las cepas virales con los 9 antisueros producidos; 2 con sueros descomplementados y 2 con sueros descomplementados y el agregado de C' heterólogo (total 36 placas). El método utilizado fue el convencional suero variable - virus constante (15).

·ELISA indirecto cruzado

Los Ag de membrana producidos fueron diluidos 1/1000 en buffer carbonato-bicarbonato 50 mM con los que se adsorbieron placas de ELISA. Luego de la incubación a 4°C durante 24 h, las placas se vaciaron y se colocó 0,1 ml de solución de bloqueo (PBS-0,1% seroalbúmina bovina) durante 1 hora a 37°C. Luego se lavó con Tween 20 al 0,05% en PBS tres ve-

ces. Los antisueros obtenidos en ratas fueron diluidos en PBS-5% leche en polvo descremada (SD) desde 1/4 hasta 1/8192, luego de 1 h a temperatura ambiente, las placas se lavaron y se incorporó anti-gamaglobulina de rata conjugada con peroxidasa diluida 1/1000 en SD (Sigma). Luego de 60 min de incubación y posteriores lavados se colocó el sustrato específico conteniendo: ácido cítrico 0,1 M, fosfato disódico 0,2 M, peróxido de hidrógeno al 0,01% y ABTS 0,3 mg/ml. El mismo procedimiento se realizó con antígenos controles. Los valores de absorbancia fueron leídos con filtro de 405 nm a los 60 min de reacción utilizando un lector Titertek Multiskan.

·Electroforesis en SDS-PAGE.

Se trabajó en geles al 10% empleando un sistema de buffer discontinuo. Las muestras fueron procesadas para trabajar en condiciones reducidas y no reducidas. Las condiciones de corrida se estandarizaron a 36 mA durante 3,5 h en placas de 170 x 190 x 1 mm y la tinción fue realizada con azul brillante de Coomassie.

RESULTADOS

·Características del ECP en distintos cultivos celulares

Todas las cepas virales empleadas fueron replicadas en diferentes sustratos celulares: PK15, CPK, RK13, MDBK, CRFK, HeLa y BHK, células de tipo epitelial, con excepción de BHK que es de tipo fibroblástica. El tiempo de incubación de las cepas virales en las células fue de 14 h, excepto en el caso de la línea RK13 que solo resistió 9 h de incubación antes que el ECP fuera total. Tanto las células RK13 como las CRFK forman sincicios espontáneos en los controles sin inocular, de aproximadamente 4 células promedio cada uno. En la tabla 1 se resumen las características de ECP presentado por las distintas cepas virales en los diferentes sustratos celulares.

·Pruebas de caracterización fisico-química

En la tabla 2 se resumen los resultados de las pruebas de caracterización fisico-química realizadas en las 9 cepas de PRV.

·VN cruzada

Los resultados obtenidos se presentan en las tablas 3 y 4.

·ELISA Indirecto cruzado

La tabla 5 ilustra los resultados obtenidos.

Tabla 1: características de ECP de las cepas virales en los diferentes sustratos celulares
 Table 1: CPE obtained with viral strains inoculated onto different cell lines

	RC/79	Mer	CL-7	CL-15	TL/92
PK15*	A, CR, P, CI, S	A, CR, P, CI, S	A, CR, P, CI, S	A, CR, P, CI, S	A, CR, P, CI, S
CPK*	A, CR, P, CI	A, CR, CI	A, CR, P, CI	A, CR, P, CI	A, CR, P, CI
RK13**	A, P, S	A, P, S	A, P, S	A, P, S	A, P, S
MDBK** *	A, CR, P, CI, S	A, CR, P, CI, S	A, CR, P, CI, S	A, CR, P, CI, S	A, CR, P, CI, S
CRFK*** *	CR, CI, S	CR, CI, S	CR, CI, S	CR, CI, S	CR, CI, S
HeLa*	CR, CI, S	CR, CI, S	CR, CI, S	CR, CI, S	CR, CI, S
BHK****	CR, CI, S	CR, CI, S	CR, CI, S	CR, CI, S	CR, CI, S

Referencias: A=agujeros; CR=células redondas; P=puentes; CI=cuerpos de inclusión intranucleares; S=sincicios. * sincicios pequeños de 5 células promedio ** sincicios gigantes, apariencia de ser toda la monocapa un gran sincicio *** sincicios grandes (20 células promedio) y pequeños (6 células promedio) juntos **** sincicios de 10 células promedio.

Tabla 2: pruebas de caracterización físico-química realizadas en las 9 cepas de PRV
 Table 2: physicochemical characterization of 9 strains of PRV

	RC/79	Mer	CL-7	CL-15	TL/92
Título*	10 ⁷	10 ^{7,75}	10 ^{6,5}	10 ^{7,5}	10 ^{7,5}
Eter	-	-	-	-	-
Clorof.	-	-	-	-	-
Trip. 0,5	10 ^{2,25}	10 ⁴	10 ^{3,75}	10 ^{3,5}	10 ⁵
Trip. 0,1	10 ^{6,5}	10 ⁷	10 ^{6,25}	10 ⁷	10 ^{5,75}
56°C 15'	10 ^{1,5}	10 ^{2,25}	10 ^{1,5}	10 ^{0,75}	10 ^{2,5}
56°C 30'	10 ^{0,75}	-	-	10 ¹	10 ^{1,5}
pH 3	10 ^{1,5}	-	-	-	10 ^{1,5}

Los títulos se expresan en DICT₅₀/0,05 ml. (*) indica título previo al tratamiento; (-) indica ausencia de ECP.

Electroforesis en SDS-PAGE

Los Ag de membrana de las 9 cepas y el control negativo (células sin infectar) otorgaron un número elevado de bandas proteicas en la concentración utilizada (>30 bandas en el caso de Ag reducidos). Algunas de estas bandas (120, 40 y 30 kD en Ag no reducidos y 140, 110, 80, 62 y 52 kD en Ag reducidos) están presentes únicamente en todas las cepas virales y ausentes en los controles sin inocular, lo que indica que son específicas de virus.

Los patrones obtenidos con las 9 cepas de PRV fueron similares, existiendo pequeñas

diferencias: las cepas CL-7, CL-15 y TL/92 tienen prácticamente el mismo perfil proteico excepto la ausencia de una banda de aproximadamente 38 kD en CL-7 y CL-15, banda que también resulta ausente en Ind-S. Alf también tiene una banda ausente de aproximadamente 45 kD. Mer presenta un grupo de bandas de entre 33 y 35 kD. Mer, Alf y YS-81 tienen una banda ausente de aproximadamente 140 kD; RC/79 presenta una banda de 100 kD y el resto de las cepas muestran pequeñas diferencias de movilidad: Mer en 70, 40 y 30 kD.

Tabla 3: reactividad de los antisueros producidos en ratas contra las diferentes cepas virales (sueros inactivados a 56°C 30 min con el agregado de C' heterólogo)

Table 3: reactivity of 9 antisera produced in rats against different viral strains (the sera were inactivated at 56°C 30 min, and C' was added)

	RC/79	Mer	CL-7	CL-15	TL/92	S-66
RC/79	128	16	32	16	32	8
Mer	256	32	64	64	128	16
CL-7	128	4	64	32	64	4
CL-15	256	64	128	128	64	16
TL/92	64	16	64	32	64	4
S-66	64	32	32	32	32	8
Ind-S	256	128	128	64	128	16
Alf	64	8	16	32	32	4
YS-81	>256	128	64	128	256	32

En la horizontal se ubicaron los antisueros y en la vertical las distintas cepas virales. Los títulos se expresan como la inversa de la dilución que neutraliza 10^2 DICT₅₀/0,05 ml. (-) indica ausencia de AcN. (*) Suero policlonal de cerdo de referencia.

Tabla 4: reactividad de los antisueros producidos en ratas contra las diferentes cepas virales (sueros inactivados a 56°C 30 min sin C')

Table 4: reactivity of 9 antisera produced in rats against different viral strains (the sera were inactivated at 56°C 30 min without adding C')

	RC/79	Mer	CL-7	CL-15	TL/92	S-66
RC/79	64	4	16	16	32	4
Mer	32	8	32	16	32	8
CL-7	64	8	32	16	16	-
CL-15	64	4	64	32	32	4
TL/92	16	8	16	16	16	-
S-66	32	32	16	8	32	4
Ind-S	128	64	64	32	64	-
Alf	64	4	16	16	32	4
YS-81	128	4	8	8	64	8

En las finas se ubicaron los antisueros y en las columnas las distintas cepas virales. Los títulos se expresan como la inversa de la dilución que neutraliza 10^2 DICT₅₀/0,05 ml. (-) indica ausencia de AcN. (*) Suero policlonal de cerdo de referencia.

Tabla 5: resultados obtenidos en ELISA indirecto cruzado
 Table 5: results obtained by cross-indirect ELISA

	RC/79	Mer	CL-7	CL-15	TL/92	S-66
RC/79	256	16	64	32	128	16
Mer	-	256	128	64	512	128
CL-7	-	-	128	64	-	-
CL-15	2048	128	128	512	512	64
TL/92	1024	-	1024	1024	2048	128
S-66	>8192	1024	512	1024	>8192	256
Ind-S	>8192	1024	512	1024	4096	512
Alf	>8192	1024	1024	256	2048	512
YS-81	2048	1024	2048	512	1024	256

En las filas se ubicaron los antisueros y en las columnas distintas cepas virales utilizadas como antígenos.

DISCUSIÓN

En general, todas las cepas virales produjeron el mismo ECP en las distintas líneas celulares: lisis, sincicios y/o cuerpos de inclusión (CI) intranucleares eosinófilos (PK15, RK13, MDBK, CRFK, HeLa y BHK). En CPK ninguna cepa produjo sincicios con excepción de Ind-S que los produjo escasos y muy pequeños, dato que no es significativo. Los CI característicos fueron observados en todas las líneas celulares excepto en RK13, debido probablemente al menor tiempo en que el virus produjo ECP en estas células. Según lo expresado por Bitsh (5), las cepas altamente patogénicas son capaces de formar sincicio a lo que Golais y Sabó, (16) agregan que las atenuadas producen únicamente redondeamiento celular. Nosotros obtuvimos ambas manifestaciones de una misma cepa en diferentes cultivos celulares. Kaplan y Ben-Porat (17) observaron que con alta multiplicidad de infección, el virus de la EA destruye una monocapa de RK13 en menos de 18 h de incubación, lo que en nuestro caso se redujo a 9 h. Considerando entonces el corto tiempo requerido para la aparición de ECP y la producción llamativa de sincicios, es que se sugiere el uso de esta línea para el intento de aislamiento viral.

En el estudio realizado por Bodon y col. (18) las cepas virulentas resultaron sensibles a la tripsina en concentraciones de 0,5 mg/ml; para ellos, resistencia al calor y a la tripsina se acompañan de virulencia reducida. Otros au-

tores no obtuvieron relación directa entre termoresistencia y virulencia por lo que no consideran que la sensibilidad al calor sea adecuada para la caracterización de cepas. Para Bartha y col. (4) el tratamiento con calor redujo los títulos originales (4-5 log) dependiendo de la cepa viral, y mediante el tratamiento con tripsina la sensibilidad fue menor utilizándola al 0,1%. Bodon y col. (18), Bartha y col. (4) y Lloyd y Baskerville (19) sugieren que el PRV puede ser diferenciado, por su sensibilidad a la tripsina, en: atenuadas = tripsinosensibles y virulentas = tripsinoresistentes, especulando con que el marcador de sensibilidad a la tripsina puede correlacionarse con su virulencia. Por el contrario, Platt y col. (20) no encontraron esa correlación pero sí observaron relación directa entre inactivación térmica y sensibilidad a la tripsina. Los resultados de los experimentos indicados en la tabla 2 muestran pocas diferencias de sensibilidad de las 9 cepas sometidas a los diferentes agentes físico-químicos. Las 9 cepas presentaron reducciones de títulos entre 2,5 y 5 log al ser sometidas a la acción de la tripsina en concentración del 0,5%, siendo Alf la cepa más sensible. Las mismas, enfrentadas con tripsina al 0,1%, sufrieron menores reducciones de títulos (0,25 y 1,75 log) siendo la TL/92 la más sensible, lo que demuestra que es necesaria una concentración mínima de tripsina para reducir la virulencia de PRV en forma significativa.

Las cepas se comportaron altamente sen-

sibles cuando fueron sometidas a la acción del calor: disminuyeron entre 5 y 6,75 log a 56°C durante 15 min, siendo CL-15 la más sensible y prolongando el período a 30 min con la misma temperatura, la virulencia se redujo desde 6 log a la inactivación total, siendo las más sensibles Mer y Alf (7,75 log), Ind-S (7 log) y CL-15 y S-66 (6,5 log).

Con respecto a la labilidad experimental por las cepas frente al pH ácido, las variaciones oscilaron entre 5,5 log y 7,5 log siendo las más lábiles Mer, CL-15, Alf y YS-81 (7,5 log), Ind-S (7 log) y CL-7 (6,5 log).

La sensibilidad frente a diferentes agentes físico-químicos, no es de utilidad en estos casos al utilizar 9 cepas aisladas de campo, como lo demuestra también Tozzini (7) quien, trabajando con 4 cepas de campo, obtuvo las mismas variaciones de título en la resistencia al calor y no pudo correlacionar la sensibilidad de cepas con respecto a diferentes agentes, ni establecer cuál fue la más resistente ni cuál la más sensible globalmente.

De acuerdo a los resultados contradictorios obtenidos por diversos autores con respecto a la relación sensibilidad a la tripsina-calor/virulencia, es que consideramos que estos marcadores no son útiles en estos casos. En nuestra experiencia solo utilizamos cepas virulentas, las que no mostraron diferencias de sensibilidad. Por lo tanto esta metodología (sensibilidad a diferentes agentes y ECP en cultivos celulares) no permite la identificación de cepas, ni aún el agrupamiento en distintos serotipos, debido a su elevada laboriosidad y escaso poder resolutivo (21).

Para determinar si los diferentes aislamientos de PRV muestran diferencias en cuanto a su antigenicidad, se realizaron inmunizaciones periódicas a 9 ratas a fin de obtener 9 antisueros policlonales que fueron utilizados en VN cruzada y ELISA indirecto cruzado. Estas ratas resultaron de fácil maniobrabilidad para el esquema de inmunización seguido.

Es sabido que el C' favorece la acción neutralizante de muchos virus, sobre todo para la detección de Ac tempranos, mejorando de algún modo la unión Ag-Ac (22). La neutralización dependiente del C' fue conocida entre los miembros de la familia Herpesviridae, en sueros humanos o de conejos con Ac contra Virus Herpes Simplex 1 y fue utilizada también para la detección de infección temprana de Herpes Virus Bovino 1 y Rinotraqueítis Felina como método más sensible (23). Los AcN dirigidos contra gC y gD pueden ser independientes del C', mientras que los dirigidos contra gB son C' dependientes (21). Sin embargo, como fue demostrado por Ben-Porat y col. (9), existen variaciones antigénicas entre cepas de PRV, sobre todo

entre aquellas aisladas de diferentes áreas geográficas. Los aislamientos de PRV de la misma zona geográfica parecen antigénicamente similares. Estas variaciones antigénicas se presentan principalmente en gE y gC (ambas esenciales para la replicación viral *in vitro*) y no en gB. Yamada y col. (10), utilizando anticuerpos monoclonales (AcMo) observaron que Ac dirigidos contra gB muestran diferencias de reactividad entre cepas americanas y japonesas, pero no entre las japonesas entre sí. Esta diferente reactividad también fue observada en nuestro laboratorio cuando realizamos VN cruzada empleando 5 AcMo contra 7 cepas de PRV. Cuatro de ellos neutralizan en presencia de C' y la diferente reactividad permite reunir a las cepas en 2 grupos (YS-81, S-66, CL-15 y Mer por un lado e Ind-S, RC/79 y Alf por el otro), no existiendo relación entre fenotipo y genotipo como se observó en trabajos previos (14).

La tabla 3 muestra la diferente reactividad cruzada de las cepas frente al C' heterólogo: los mayores títulos neutralizantes se observaron contra las cepas argentinas. En la tabla 4 se observa que efectivamente los sueros sin el agregado de C' presentaron títulos menores. La actividad neutralizante aumentada por el C' también se demuestra por la diferencia de títulos del suero policlonal de cerdo de referencia de las tablas 3 y 4. En ELISA indirecto cruzado existió gran variabilidad. Al enfrentarse a la mayoría de los Ag, los antisueros dirigidos contra cepas argentinas brindaron títulos más elevados, con ciertas excepciones como la escasa reactividad que tuvieron frente al Ag CL-7. Con los antisueros obtenidos contra cepas de referencia no se obtuvieron títulos mayores a 1:512, mientras que los antisueros dirigidos contra las cepas Argentinas reaccionaron con títulos >1:8192 y no se halló alta correlación entre AcN y Ac totales. Probablemente esta diferencia de reactividad se debería, ya sea a características inmunológicas individuales de cada rata, ya sea por diferencias antigénicas entre cepas de diferentes áreas geográficas o bien a que la alta cantidad de pasajes por cultivo que tienen las cepas recibidas en nuestro laboratorio hayan modificado su antigenicidad.

Cabe recordar los pesos moleculares conocidos de algunas de las gps presentes en el virión PRV: gB: 155 kD (subunidad a: 110-125; subunidad b: 68-74; subunidad c: 55-58); gC: 92 kD; gD: 55-60 kD; gE: 130 kD; gI: 63 kD; gH: 95 kD; gK: 36 kD; y gM: 45 kD. Los patrones obtenidos con las 9 cepas de PRV fueron similares, existiendo pequeñas diferencias, a saber: las cepas aisladas más recientemente en nuestro país (CL-7, CL-15 y TL/92) tienen prácticamente el mismo perfil proteico excepto la ausencia de una banda de aproximadamente 38

kD en CL-7 y CL-15, banda que podría corresponderse con gK y que también resulta ausente en Ind-S. Alf también tiene una banda ausente de aproximadamente 45 kD, tamaño aproximado de gM. Mer es la cepa que muestra mayores diferencias con el resto de las cepas argentinas e incluso difiere mucho de las de referencia: en ella aparece un grupo de bandas de entre 33 y 35 kD. En general las diferencias entre las cepas se comienzan a observar en PM < 60 kD y podría tratarse de gps como gD (55-60 kD), gK (36 kD) y gM (45 kD), de las cuales la primera tendría significancia antigénica ya que tanto la gK como la gM han sido descritas recientemente y no se conoce aún su función específica. El resto de las diferencias de bandas de PM muy bajos, podrían ser precursores proteicos o restos de otras proteínas celulares, proteínas contaminantes, nuevas gps, proteínas aún no homologadas o productos parcialmente glicosilados (24).

Los resultados obtenidos para el perfil proteico de cepas de PRV coinciden con los de otros autores: Ben-Porat y col. (9) no pudieron establecer diferencias entre cepas de distintos lugares del mundo aún utilizando inmunoprecipitación con AcMo. Si pudieron establecerlas entre cepas vacunales y cepas salvajes. Ellos concluyen que además, los aislamientos de PRV

de la misma área geográfica aparecen antigénicamente similares.

En nuestro caso, solo Mer aparece diferente a las demás, sobre todo en SDS-PAGE de Ag de membrana sin reducción. Cabe destacar que esta cepa fue recibida en el laboratorio sin conocer su número anterior de pasajes en cultivos celulares.

CONCLUSIONES

·No es posible establecer diferencias marcadas en el ECP producido por varias cepas de PRV en cultivos celulares.

·Se sugiere el uso de la línea celular RK13 para aislamiento de PRV dada la rapidez de aparición de ECP y la practicidad del uso de esta línea celular en el laboratorio.

·Las pruebas fisico-químicas no aportan datos concluyentes que permitan observar diferencias significativas entre las cepas de campo de PRV.

·Con los antisueros obtenidos en ratas no se observaron diferencias entre cepas argentinas de PRV.

·El estudio de la movilidad de las proteínas estructurales de las diferentes cepas de PRV, no arrojó datos de importancia que permitieran diferenciarlas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kluge JP, Beran GW, Hill HT, Platt KB. Pseudorabies (Aujeszky's Disease). En: Leman, A. D.; Straw, B. E.; Mengeling, W. L.; D'allaire, S.; Taylor, D. J. (eds.): Diseases of swine. 7a edition, Ed. Iowa State University Press, Ames IA, (USA) 1993; 312-323.
2. Ambrogi A, Giraudo J, Busso J, Bianco B, Bagnat E, Segura de Aramburu M, Ramos B, Ceriatti S. Primer diagnóstico de la Enfermedad de Aujeszky en cerdos en la República Argentina. Gaceta Veterinaria 1981; tomo XLIII: 58-64.
3. Echeverría MG. Estudio comparativo entre cepas del virus de la Pseudorabia porcina aisladas en el país y de referencia mediante pruebas fisico-químicas, electroforesis en SDS-PAGE y patrones de restricción del ADN. Tesis Doctoral 1996, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP.
4. Bartha A, Belak S, Benyeda Y. Trypsin- and heat-resistance of some strains of the Herpesvirus group. Acta Vet Acad Sci Hung 1969; 19: 97-99.
5. Bitsch V. Correlation between the pathogenicity of field strains of Aujeszky's Disease virus and their ability to cause cell fusion -syncytia formation- in cell cultures. Acta Vet Scand 1980; 21: 708-714.
6. Onyekaba C, Bueon L, King P, Fahrman J, Goyal S. Susceptibility of various cell culture systems to Pseudorabies virus. Comp Immun Microbiol Infect Dis 1987; 10: 163-166.
7. Tozzini F. Characteristics of field and modified Aujeszky's Disease strains. En: Wittmann G.; Hall S. A. (eds): Aujeszky's disease. Curr Top Vet Med Anim Sci Vol 17. Martinus Nijhoff Publishers, Boston and The Hague, 1982; 31-36.
8. Klupp BG, Baumeister J, Dietz P, Granzow H, Mettenleiter T. Pseudorabies virus glycoprotein gK is a virion component involved in virus release but is not required for entry. J. Virol 1998; 72:1949-1958.
9. Ben-Porat T, DeMarchi J, Lomniczi B, Kaplan A. Role of glycoproteins of Pseudorabies virus in eliciting neutralizing antibodies. Virol 1986; 154: 325-334
10. Yamada S, Imada T, Nishimori T, Sekikawa K, Shimizu M. Antigenic variation of Pseudorabies virus glycoproteins gII and gIII demonstrated by neutralizing monoclonal antibodies. Arch Virol 1991; 119: 285-290.
11. Mettenleiter TC. Immunobiology of pseudorabies (Aujeszky's Disease). Vet Immunobiol Immunopath 1996; 54: 221-229.
12. Klupp B, Baumeister J, Karger A, Visser N, Mettenleiter T. Identification and characterization of a novel structural glycoprotein in Pseudorabies virus, gL. J Virol 1994; 68: 3868-3878.
13. Galosi CM, Noretto EO, Gimeno EJ, Gómez Dunn C, Etcheverrigaray ME, Ando Y. Equine Herpes virus 1 (EHV-1): characterization of a viral strain isolated from equine plasma in Argentina. Rev. Sci. Tech. Off Int Epiz 1989; 8: 117-122.
14. Noretto EO, Echeverría MG, Horimoto T, Pecoraro MR, Galosi CM, Tohya Y, Norimine J, Takahashi E, Etcheverrigaray ME, Mikami T. Characterization of several Aujeszky's Disease viral strains by virusneutralization test using monoclonal antibodies. Viral Immunol 1997; 10: 159-166.
15. Martin S, Wardley RC, Donaldson AJ. Serological response of pigs infected with Aujeszky's Disease virus. Res Vet Sci 1983; 35: 227-233.
16. Golais F, Sabo A. The effect of temperature and urea on virulent and attenuated strains of Pseudorabies virus. Acta Virol 1975; 19: 387-392
17. Kaplan AS, Ben-Porat T. The effect of Pseudorabies virus on the nucleic acid metabolism and the nucleic acid of rabbit kidney cells. Virol 1959; 8: 352-366.
18. Bodon L, Meszaros J, Papp-Vid G, Romvary J. Properties of Aujeszky's Disease virus strains isolated from swine pneumonia cases. Acta Vet Sci Hung 1968; 18: 107-109.
19. Lloyd G, Baskerville A. In vitro markers to differentiate an avirulent from a virulent strain of Aujeszky's Disease virus. Vet Microbiol 1978; 3: 65-70.
20. Platt KB, Mare CJ, Hinz PN. Differentiation of vaccine strain and field isolates of Pseudorabies (Aujeszky's Disease) virus: trypsin sensitivity and mouse virulence markers. Arch Virol 1980; 63: 107-114.
21. Christensen LS. The population biology of Suid Herpes virus 1. APMIS Supplem 1995; 48: 1-48.
22. Bitsch V, Eskildsen M. Complement dependent neutralization of Aujeszky's Disease virus by antibody. En: Wittman G., Hall, S. A. (eds.): Aujeszky's Disease. Cur. Top. Vet. Med. Anim. Sci. Vol 17, Martinus Nijhoff Publishers, Boston and The Hague, 1982; 41-49.
23. Horimoto T, Limcumpao J, Tohya Y, Takahashi E, Mikami T. Enhancement of neutralizing activity of anti-Feline Herpes virus 1 sera by complement supplementation. Jpn J Vet Sci 1989; 51: 1025-1027.
24. Lukacs N, Thiel HJ, Mettenleiter T, Rziha HJ. Demonstration of three major species of Pseudorabies virus glycoproteins and identification of a disulfide-linked glycoprotein complex. J Virol 1985; 53: 166-173.