

"LOS ANTIGENOS MAS IMPORTANTES DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE AUJESZKY"

MVZ, MC, PhD. Gerardo Iglesias

INTRODUCCION.

La respuesta inmune que se desarrolla contra el virus de la enfermedad de Aujeszky (VEA) es de gran importancia para los especialistas en salud y producción porcina desde 3 puntos de vista, a) En animales adultos la respuesta a la infección es capaz de evitar los daños severos, b) Un programa de prevención basado en el uso de vacunas requiere de un conocimiento a fondo de lo que es la respuesta del animal a la inmunización y a la posible infección, finalmente c) La detección de la infección a nivel de poblaciones comúnmente se lleva a cabo por medio de la detección de anticuerpos específicos. Las pruebas serológicas utilizadas son cada día más sensibles y precisas pero también más complicadas en su interpretación. El propósito de la presente contribución es revisar la información que existe en cuanto a la respuesta inmune hacia las glicoproteínas del virus y comentar acerca de la relevancia que pueden tener los diversos elementos de la respuesta inmune tanto en el proceso de recuperación como en el proceso de defensa de un animal vacunado.

LAS DIVERSAS PROTEINAS VIRALES.

Por medio de análisis de proteínas en cultivos celulares infectados con VEA se ha podido comprobar que este virus codifica para cuando menos 8 glicoproteínas y aproximadamente otras 30 proteínas que parecen ser no glicosiladas (Hahn & Hahn 1987). En base a la experiencia que se ha obtenido en el estudio del virus Herpes simplex 1, que es un patógeno de humanos muy similar al VEA, se sospecha que las glicoproteínas son los principales antígenos. Está claramente demostrado que la envoltura viral presenta dentro de sus elementos constitutivos gran parte de las glicoproteínas virales (Hampl et al 1984). Este mismo autor estableció la clasificación con números romanos, además reportó que algunas de estas glicoproteínas se encuentran en forma de complejos unidos por puentes disulfuro. Así pues se habla del complejo de gI que esta formado por la glicoproteína I a la cual se le unen las glicoproteínas IV y V. Los complejos de gII y gIII están formados por la unión de subfracciones (3 en cada caso) de la gII y la g III respectivamente. Otras proteínas de ADV que existe evidencia que son antigenicas son; gp50, gp63 y gX. En el caso de las 2 primeras se sabe que son glicosiladas y se denominan gp "glicoproteína" seguido de su peso molecular, la otra la gX se sabe que es antigénica y relativamente abundante en forma libre en el medio de cultivo donde se mantienen las células en las que se replica el virus (Thomsen et al 1987).

Existen 2 características importantes de las glicoproteínas de ADV que vale la pena mencionarse. Primero algunas de ellas no son esenciales para la replicación viral. Así pues es posible tener virus infectante que carece de gI, de gIII, de gp63 ó de gX. Segundo algunas de estas proteínas tienen una gran similitud con proteínas de virus Herpes simplex 1 de forma tal que aún cuando no son exactamente la misma proteína se consideran ser equivalentes. Se ha observado que ésta similitud de proteínas entre miembros de esta familia viral no sucede exclusivamente entre VEA y herpes simplex 1, sino también con otros virus de la misma familia ej.: el virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina (Tabla 1).

LA ANTIGENICIDAD DE LAS GLICOPROTEINAS DEL VEA.

Los trabajos de Hampl y col (1984) dejaron claro que las glicoproteínas codificadas por el VEA en las células infectadas son la parte mas importante del mosaico antigenico del virus. Cuando compararon la actividad de las diversas clonas para neutralizar al VEA encontraron que el virus era neutralizado en forma consistente por anticuerpos monoclonales contra gIII. También existía actividad neutralizante en los monoclonales contra gII pero esto solo ocurría cuando la prueba se hacía agregando complemento. Los anticuerpos monoclonales contra gI no mostraron actividad neutralizante ni aún en las pruebas que se agregó complemento. Posteriormente se comprobó que cerdos recuperados de la infección tenían concentraciones relativamente altas de anticuerpos específicos contra las glicoproteínas gI, gII y gIII (Platt 1984).

Utilizando cepas mutadas que eran deficientes en gI ó en gIII se pudo demostrar que gran parte de la capacidad neutralizante del suero de cerdos convalecientes estaba dirigida hacia gIII mientras que muy poca o nada de la capacidad neutralizante estaba dirigida hacia gI (Ben-Porat et al 1986). En un experimento diferente se comparó la actividad neutralizante de anticuerpos de cerdo específicos contra 3 distintas glicoproteínas. Para esto se inocularon cerdos con glicoproteínas gII, gIII ó gp50, se comprobó que en todos los cerdos había anticuerpos que reconocían al virus usando una prueba basada en la destrucción de células infectadas en presencia de suero y complemento. Cuando se evaluó la capacidad de los sueros para neutralizar al VEA se encontró que el suero de todos los animales inoculados con gp50 neutralizaban al virus. El suero de 1 de 3 de los animales inoculados con gIII también lo lograba neutralizar pero los de los cerdos inoculados con gII no lo lograron. Cuando se realizó la misma prueba pero agregando complemento, los inoculados con gp50 subieron el titulo de neutralización, los de gIII siguieron igual y los de los cerdos inoculados con gII mostraron una excelente neutralización. La misma colección de sueros se usó para evaluar su potencial en la prueba de citotoxicidad mediada por anticuerpos. En esta prueba el suero de los animales inoculados con gIII fué muy superior en actividad al de los otros grupos (Iglesias et al 1990).

La evaluación de actividades desarrolladas por anticuerpos usando pruebas in-vitro trae consigo la inevitable pregunta que relevancia tiene ese mecanismo en particular en la defensa del animal. Por ejemplo es comúnmente aceptado que la neutralización viral que se manifiesta en pruebas de laboratorio puede no tener una gran capacidad de defender en el caso de infección con VEA puesto que este como otros virus herpes se transmite de célula a célula. Las infecciones causadas por virus herpes no presentan fases definidas en las que exista virus libre en el torrente circulatorio. Por lo tanto la capacidad neutralizante que algunos anticuerpos puedan tener no tiene posibilidad de manifestarse. Cuando hablamos de algunos efectos que ocurren en células infectadas estos pueden ser mas relevantes desde el punto de vista defensa puesto que se sabe que existe expresión de antígenos virales en células infectadas tanto in-vivo como in-vitro. Así pues es posible asumir que de los resultados que se obtuvieron en la comparación de actividades de los sueros de los cerdos inoculados con diversas glicoproteínas, los mas importantes son los de la citotoxicidad mediada por anticuerpos. Existen algunos datos de experimentos diferentes que permiten llegar a la misma conclusión. En un experimento de preparación de monoclonales se obtuvieron un total de 108 clonas que reaccionaban con el virus en prueba de ELISA, de las 108 solamente 12 clonas eran capaces de neutralizar la capacidad infectante del virus, las 12 clonas "neutralizantes" resultaron ser productoras de anticuerpos contra gp50. Cuando evaluaron las clonas en base a proteger ratones usando un esquema de protección pasiva y desafío posterior fue posible constatar que los ratones quedaban protegidos cuando se inyectaban con clonas que reaccionaban o bien contra gp50 o bien contra gIII (Eloit et al 1988) la conclusión podría ser que los anticuerpos contra gIII eran no neutralizantes pero fueron capaces de proteger (Tabla 2).

Existen datos derivados de infecciones con otros herpes virus que indican que el mecanismo en el que existe destrucción de las células infectadas a través de la actividad conjunta de anticuerpos específicos y leucocitos es un mecanismo relevante en el proceso de defensa. Por ejemplo Davis y col. (1979) mostraron que la administración de suero de conejos que habían sido inmunizados con herpes simplex 1 era capaz de proteger ratones que habían sido inoculados con el mismo virus por vía intracorneal 8 horas antes. La mencionada protección conferida por el suero no se observó cuando se intentó probar en animales que habían sido sometidos a radiaciones aún cuando esto había ocurrido 24 horas antes de la inyección del suero de conejo. Estos resultados indicaron que la protección que se lograba con el suero era el producto de los anticuerpos que iban en el suero más algún elemento propio del animal que era sensible al efecto de las radiaciones. La hipótesis fue que dicho elemento eran los polimorfonucleares. Este es un fenómeno por demás interesante que se comentará con más detalle en el siguiente punto.

La proliferación de vacunas que tienen mutaciones que provocan la ausencia de una o varias proteínas virales ha permitido valorar en forma comparativa el impacto antigénico que cada una de estas glicoproteínas tiene en animales vacunados e infectados. En un estudio comparativo en el que se analizaron 313 muestras de suero de cerdos no domésticos 138 fueron positivas a VEA usando la prueba de virus neutralización. De los 138 sueros positivos 115 tenían títulos $\geq 1:4$. Estos sueros positivos se analizaron con los procedimientos de diagnóstico desarrollados para detectar anticuerpos específicos contra una proteína en particular.

En el caso de las pruebas para anticuerpos contra gI ó gIII los 115 sueros fueron positivos, pero en el caso de la prueba que detecta anticuerpos contra gpX, 100 fueron positivos, 9 negativos y 6 sospechosos. Se probaron también otros 23 sueros que tenían un título de virus neutralización de 1:2. En este caso las pruebas para gI y gIII determinaron que 22 eran positivas y 1 era negativo. La prueba de gpX detectó 9 positivos, 4 sospechosos y 10 negativos (Osorio 1991). Esto pone de manifiesto que en el caso de infección natural el animal infectado presentará una respuesta franca contra gI y gIII pero en el caso de gX no será la misma calidad de respuesta.

LA RESPUESTA INMUNE MEDIADA POR CELULAS.

Esta claramente establecido que los mecanismos de defensa contra VEA no quedan limitados a la actividad neutralizante de los anticuerpos mas bien es la suma de las actividades de los anticuerpos y células del sistema inmune. Como se mencionó anteriormente los neutrofilos participan activamente en la destrucción de células infectadas que han sido reconocidas por los anticuerpos específicos. Este método de defensa, que se sospecha que tiene gran relevancia para el animal es uno de los que involucra anticuerpos y células y por lo tanto algunos autores no lo consideran como un fenómeno que pertenece a la inmunidad celular. Los elementos de defensa en los cuales no hay participación de anticuerpos también tienen una importancia considerable en el proceso de recuperación en los casos de infección con virus herpes.

Algunos de los mecanismos de inmunidad celular que han sido evaluados en casos de infección con el VEA son, Proliferación en linfocitos, actividad citotóxica de linfocitos y producción de moduladores de respuesta. Existen algunos datos en cuanto a la participación de las glicoproteínas importantes en estas actividades. Linfocitos de cerdos que habían sido inoculados por vía intranasal respondieron más en la prueba de proliferación cuando se uso un virus que tenía gIII en comparación a la respuesta obtenida cuando se usó un virus que era gIII negativo. En otro experimento se usaron linfocitos de cerdos vacunados y para hacer mas clara la intervención de gIII se evaluó la respuesta con virus completo (con todas las glicoproteínas) y también la respuesta a otro virus diferente en el cual había expresión de gIII ó de gp50. En todos los casos se consiguió proliferación de linfocitos demostrando de esta manera que gp50 y gIII son antígenos reconocidos por linfocitos sensibilizados (Zuckerman 1991).

En conclusión podemos decir que los antígenos más importantes del VEA son el grupo de las glicoproteínas pero que en ese grupo existen algunas que son antigénicas pero no de gran valor en la defensa del animal como por ejemplo gI y gX existiendo otras que por el contrario son de gran relevancia para el proceso de protección o defensa.

AGRADECIMIENTOS:

El autor desea agradecer a la Dr. Margarita Trujano su colaboración y ayuda y a la Srita. Rocío de la Paz V. por la preparación del manuscrito.

Tabla 1 Glicoproteínas del virus de la Enfermedad de Aujeszky que son reconocidas por anticuerpos presentes en suero de animales convalecientes.

Denominación Común	Elementos que la integran	Peso Molecular	Equivalente en otros virus Herpes
gI	gI, gIV y gV	130, 98, 62	gE(HS1*) gpV(VZ†)
gII	IIa, IIb, IIc	135, 67, 58	gB(HS1) gB(1BR◊)
gIII	IIIa, IIIb, IIIc	98, 67, 58	gC(HS1)
Gp50(gVI)		50	gD(HS1)
Gp63		60	gI(HS1) gpIV(VZ)
g X		98	gG(HS1)

* HS1 = Herpes simplex 1

† V2 = Virus de Varicella Zoster

◊ 1BR = Virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina

Tabla 2 Evaluación comparativa de la actividad de anticuerpos contra glicoproteínas del Virus de la Enfermedad de Aujeszky purificadas.

Glicoproteína usada como antígeno	Cerdo N°	SUERONEUTRALIZACIÓN		CITOTOXICIDAD MEDIADA POR ANTICUERPOS
		ESTANDARD	CON COMPLEMENTO	
gII	888	< 2	1:8	8 ± 5 *
	894	< 2	1:32	
	890	< 2	1:16	
gIII	885	< 2	< 2	18 ± 3
	902	< 2	< 2	
	917	1:2	1:2	
gp50	915	1:2	1:8	10 ± 4
	922	1:2	1:4	
	919	1:2	1:8	

* El resultado se presenta como el promedio del grupo con su desviación estándar. Los valores son porcentajes de lisis de células infectadas. La lisis de células infectadas se mide en base a la liberación de cromio radioactivo.

REFERENCIAS.

- Ben-Porat T. et al (1986) Role of glycoproteins of Pseudorabies virus in eliciting neutralizing antibodies. *Virology* 154 : 325-334.
- Davis, W.B., Taylor, J.A. and Oakes, J.E. (1979). Ocular infection with Herpes simplex virus type 1: Prevention of Acute Herpetic Encephalitis by Systemic Administration of Virus-Specific antibody. *The Journal of Infectious Diseases* 140:534-540.
- Eloit, M., et al (1988). Identification of the pseudorabies virus glycoprotein gp50 as a major target of neutralizing antibodies. *Archives of Virology* 99:45-56.
- Hahn, E.C. and Hahn, P.S. (1987). Induced proteins in cells infected with Pseudorabies virus. *Archives of Virology* 94:247-257.
- Hampl, H., et al. 1984. Characterization of the envelopes proteins of Pseudorabies virus. *Journal of Virology* 52:583-590.
- Iglesias et al (1990) Antibodies to Aujeszky's disease virus in pigs immunized with purified virus glycoproteins. *Veterinary Microbiology* 24: 1-10.
- Osorio F. (1991) Comunicación personal
First International symposium The eradication of Pseudorabies (Aujeszky) virus. St. Paul MN, USA
- Platt K.B. (1984) The evaluation of a lectin-agarose based submit vaccine and complementary diagnostic antigen for Aujeszky's disease (Pseudorabies) in the pig. *Veterinary Microbiology* 9: 35-51.
- Thomsen et al (1987) Replication and virulence of pseudorabies virus mutants lacking glycoprotein gX. *Journal of Virology* 61: 229-232.
- Zuckerman F.A (1991) Evaluation of the antiviral cellular immune response of swine using vaccinia recombinants expressing cloned genes for pseudorabies virus glycoproteins. First International Symposium on the eradication of pseudorabies (Aujeszky) virus Proceedings. pag. 10