

## DIFERENCIAS EN SUSCEPTIBILIDAD A NEUTRALIZACIÓN ENTRE AISLADOS DEL VIRUS DEL PRRS

Cinta Prieto

Departamento de Sanidad Animal

Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid, España

El síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRS) es una de las enfermedades más significativas de las que afectan al ganado porcino, fundamentalmente por las pérdidas económicas tan importantes que se asocian a la infección. Está causada por un virus, el virus del PRRS (PRRSV) que pertenece a la familia *Arteriviridae* y, dentro de ésta, al género *Arterivirus* (Cavanagh, 1997), que engloba virus cuyo genoma está constituido por una molécula de ARN de cadena sencilla y polaridad positiva. A pesar de que el PRRSV y la enfermedad que produce han sido objeto de intenso estudio desde su identificación hace ya más de 20 años, todavía no se han podido desarrollar herramientas de profilaxis médica que sean totalmente eficaces y garanticen la salud de los animales en los que se apliquen. Este fallo en la obtención de vacunas adecuadas para el control de la enfermedad se debe a varias razones, entre las que merece especial mención la variabilidad del virus. Hoy en día sabemos que el virus presenta una elevada variabilidad genómica, existiendo en forma de quasispecies en las granjas y en los individuos afectados (Goldberg et al., 2003), lo cual facilita la aparición muy rápida de nuevas variantes que se van difundiendo entre la población porcina sin que desplacen necesariamente a las previamente existentes, pudiendo de hecho recombinar entre ellas para crear nuevas variantes. Estos fenómenos hacen que el virus sea muy heterogéneo desde el punto de vista genómico. Esta heterogeneidad ha conducido a la división del virus en dos genotipos distintos: 1. genotipo 1, que comprende cepas europeas del virus y 2. genotipo 2, que engloba cepas americanas (Meng, 2000). A su vez estos genotipos se subdividen en subtipos, muy claramente definidos en el caso del genotipo 1 (Forsberg et al., 2002; Stadejek et al., 2006), y en distintos grupos genómicos.

Aunque hay mucha menos información en relación con las repercusiones prácticas de este alto grado de variabilidad genómica, está generalmente aceptado que ésta se traduce en diferencias biológicas importantes, especialmente las relacionadas con la virulencia de los aislados y con su composición antigénica. De hecho, estudios realizados utilizando tanto sueros policlonales como anticuerpos monoclonales han revelado diferencias importantes en la reactividad cruzada entre cepas, indicando la existencia de esa variabilidad antigénica (Drew et al., 1995; Cancel-Tirado et al., 2004). El hecho de que las cepas del virus difieran en su composición

antigénica se ha aducido con frecuencia como una de las razones que justifican la falta de protección cruzada entre aislados y la consiguiente falta de eficacia de las vacunas (Labarque et al., 2003; Meng, 2000; Prieto et al., 2008).

Sin embargo, en los trabajos en los que se ha comprobado de forma experimental la eficacia de distintas vacunas, siempre se analiza la similitud genómica entre las cepas de inmunización y desafío pero normalmente no se comparan desde el punto de vista antigénico, posiblemente por las dificultades que ello conlleva. Estas dificultades derivan tanto del desconocimiento de los antígenos relevantes en protección como de problemas para utilizar métodos serológicos rutinarios en la determinación de las diferencias antigénicas. En este sentido, la determinación de la presencia de anticuerpos frente al virus se suele realizar mediante la utilización de técnicas de ELISA, que se basan en la detección de epítomos conservados y muy inmunógenos del virus por lo que, en la práctica, no son útiles para determinar la existencia de diferencias antigénicas entre aislados. Por otra parte, los componentes de la respuesta inmune relacionados con la protección no han sido completamente identificados y caracterizados, siendo confuso el papel que cada uno de ellos juega en el control de la infección. No obstante, hay indicios de que la respuesta de anticuerpos neutralizantes que se produce tras la infección podría ser uno de los factores clave en el control de las reinfecciones. Esta información deriva de estudios de protección realizados en animales *naïve* en los cuales la única inmunidad específica frente al virus provenía de la transferencia pasiva de cantidades conocidas de anticuerpos neutralizantes (Osorio et al., 2002; López et al., 2007). En ellos se ha determinado que la mera transferencia de anticuerpos neutralizantes específicos frente al virus es suficiente para conferir protección y que el grado de protección alcanzado se correlaciona con la cantidad de anticuerpos neutralizantes circulantes, de forma que la viremia y el fallo reproductivo se pueden prevenir con cantidades relativamente bajas de anticuerpos (títulos en torno a 1/8), mientras que para prevenir la distribución orgánica del virus en lechones son necesarias cantidades muy superiores, con títulos de, al menos, 1/64.

Sin embargo, a pesar del papel que estos anticuerpos neutralizantes podrían jugar en la protección, no hay mucha información disponible acerca de su especificidad y de su reactividad cruzada. Se sabe que la infección

por el virus da lugar al desarrollo de cantidades detectables, aunque generalmente bajas de anticuerpos neutralizantes (Scotti et al., 2006; Prieto et al., 2008; Vanhee et al., 2010) cuya especificidad no está totalmente dilucidada, aunque parece ser variada. De esta forma, se han identificado y secuenciado epítomos neutralizantes en la proteína mayoritaria de la envoltura del virus, la GP5 (Ostrowski et al., 2002; Plagemann, 2004), y, más recientemente, en tres de las glicoproteínas minoritarias, la GP2, la GP3 y la GP4 (Costers et al., 2010; Vanhee et al., 2011), existiendo indicios de la presencia de epítomos neutralizantes, posiblemente conformacionales, de cuya composición formarían parte distintas proteínas del virus, incluyendo la proteína M. En cuanto a la reactividad cruzada de los anticuerpos neutralizantes la información disponible es muy limitada. Estudios de protección han determinado que la reactividad cruzada con la cepa de desafío de los anticuerpos neutralizantes desarrollados tras la vacunación de cerdos en crecimiento es bastante limitada (Prieto et al., 2008). Este hecho parece indicar que podrían existir diferencias significativas en la composición de los epítomos neutralizantes entre las cepas del virus, lo que podría condicionar la capacidad de neutralización cruzada entre aislados y, por ende, la protección. Es más, la composición antigénica de un aislado en particular puede condicionar su sensibilidad o resistencia a neutralización y, por tanto, la protección que cabe esperar que tengan animales previamente inmunizados cuando son expuestos a ella.

No obstante, a pesar de la relevancia que la reactividad cruzada entre cepas y la sensibilidad o resistencia a neutralización puede tener en la protección, la información disponible es muy limitada. Con el objetivo de ahondar en el conocimiento de la similitud antigénica entre aislados del virus y de los perfiles de susceptibilidad a neutralización de distintos aislados del virus, en nuestro laboratorio hemos llevado a cabo un estudio diseñado para conocer la capacidad de neutralización cruzada entre aislados.

Para ello hemos producido un total de 30 sueros hiperinmunesmonoespecíficos, es decir, específicos frente a un aislado en particular del virus y, después de concentrar o diluir los sueros hasta que todos tuvieran el mismo título de anticuerpos neutralizantes frente a la cepa utilizada para inmunizar a los animales, los hemos enfrentado, en ensayos de seroneutralización cruzada, a un panel de 48 aislados distintos del virus, comparando posteriormente la reactividad de los sueros con cada uno de los aislados. El análisis de estos

datos nos indica que los sueros tienen una capacidad variable para neutralizar los virus de nuestro panel, sin que hayamos podido identificar patrones claros que permitan agrupar a los aislados en función de su perfil antigénico. Es decir, no es posible agrupar a los distintos aislados en categorías que compartan los mismos perfiles de neutralización con los distintos sueros. Sin embargo, sí hemos podido observar que los aislados difieren en su susceptibilidad a neutralización, habiendo identificado un grupo de virus que son neutralizados con relativa facilidad por la mayoría de los sueros empleados en nuestro panel, entre los que destaca un aislado que hemos calificado como altamente sensible a neutralización, mientras que hay otro grupo constituido por virus que son bastante resistentes a la neutralización, neutralizándose muy pobremente y a títulos bajos por la mayoría de los sueros utilizados. Entre ambos, queda un grupo de aislados que tienen una sensibilidad intermedia a neutralización, que hemos denominado moderadamente sensibles a neutralización, y que presentan patrones de neutralización más variables y dependientes del suero que se utilice en el ensayo. La clasificación de los aislados se ha llevado a cabo utilizando distintos sistemas informáticos de agrupamiento, demostrando los resultados que, con algunas variaciones, los aislados más sensibles a neutralización tienden a agruparse en grupos con composición similar con todos los sistemas utilizados, al igual que los más resistentes, siendo la clasificación de los aislados moderadamente sensibles a neutralización más laxo y variable.

Como segundo objetivo hemos intentado correlacionar el patrón de susceptibilidad a neutralización de los aislados con las características de algunas de las proteínas del virus que han sido identificadas como inductoras de anticuerpos neutralizantes. En concreto hemos secuenciado la ORF3, la ORF4 y la ORF5 y hemos comparado la secuencia de aminoácidos predicha para cada proteína con el patrón de susceptibilidad a neutralización obtenido para cada cepa. En particular, hemos determinado la secuencia y la variabilidad en la secuencia de los epítomos neutralizantes predichos y el patrón teórico de glicosilación de cada proteína. En lo que se refiere al patrón de glicosilación, no se han observado diferencias en el número y la localización de los sitios predichos entre los distintos aislados en la GP3 y la GP4. Por el contrario, en la GP5 el número de sitios de glicosilación predichos varió entre cepas, aunque los cambios detectados no se han podido correlacionar directamente con la susceptibilidad a neutralización, quedando

descartado que las cepas que sólo presentan dos sitios sean más susceptibles a neutralización que las que presentan tres. En lo que se refiere a la secuencia de los epítomos neutralizantes descritos, se han analizado las distintas proteínas estudiadas. En la GP5 se han detectado algunos cambios en la secuencia del epítomo neutralizante en algunos de los virus, aunque estos cambios no se han asociado a un perfil concreto de neutralización. En la GP3, aunque los teóricos epítomos no están claramente localizados, la secuencia entre las posiciones 57 y 72, que recientemente ha sido descrita como una zona inductora de anticuerpos neutralizantes, muestra algunos cambios en determinadas posiciones. Sin embargo, tampoco en este caso se ha podido asociar un cambio concreto con una mayor susceptibilidad o resistencia a neutralización. Finalmente, en el caso del epítomoneutralizantes de la GP4, nuestros estudios indican que es altamente variable, teniendo la misma secuencia en un número muy limitado de aislados, lo que hace imposible establecer asociación alguna entre su secuencia y otras características biológicas del virus como la susceptibilidad a neutralización.

Todos estos resultados, tomados en su conjunto indican que las cepas del PRRSV no parecen agruparse en grupos antigénicos claros cuando se usan sueros de distinta especificidad para su clasificación. Sin embargo, difieren claramente en su susceptibilidad a neutralización, siendo algunas neutralizadas con cierta facilidad mientras que otras no son neutralizadas por prácticamente ningún suero. Las causas últimas de la susceptibilidad o resistencia a neutralización de las cepas no han podido ser esclarecidas en este estudio. Sin embargo, nuestros resultados indican que el análisis de la secuencia de los epítomos neutralizantes conocidos no es suficiente para asignar a una cepa un perfil determinado de susceptibilidad a neutralización. Es posible que la susceptibilidad global sea un proceso complejo en el que intervengan de forma conjunta la composición de los distintos epítomos identificados y, posiblemente, otros que no han sido identificados, tanto lineales como conformacionales. Asimismo, la accesibilidad de los anticuerpos a los epítomos clave para la neutralización puede jugar un papel importante en la susceptibilidad y ser variable en función de los patrones de glicosilación y de la estructura secundaria y terciaria de las distintas proteínas.

Únicamente la variabilidad observada en el epítomo de la GP4 podría explicar la baja reactividad cruzada de la inmensa mayoría de los sueros utilizados en nuestro estudio. Si este

epítomo es bastante inmunógeno, como se ha propuesto, y bastante variable, como hemos observado en nuestro estudio, esta conjunción de factores explicaría la falta de reactividad cruzada de los sueros, que contendrían una gran cantidad de anticuerpos neutralizantes específicos para este epítomo que sólo reaccionarían con la cepa utilizada en la inmunización. Es más, aunque se trata sólo de indicios, en nuestro estudio, los pocos aislados que comparten la misma secuencia en este epítomo tienen un grado de reactividad cruzada alta, lo que apuntaría hacia una influencia alta de este epítomo en la reactividad cruzada. Por el contrario, los pocos sueros que han mostrado una alta capacidad de neutralización cruzada posiblemente presenten una respuesta mayoritaria hacia epítomos conservados, pero poco inmunógenos. Harían falta estudios adicionales para verificar esta teoría.

Por último, hay que destacar que los resultados de este estudio permiten explicar la baja protección cruzada observada entre distintos aislados del virus. La baja reactividad cruzada de los anticuerpos neutralizantes y la relativamente alta resistencia a neutralización de muchos aislados podría dificultar sobremanera la obtención de vacunas capaces de ofrecer una respuesta universal frente a la infección con el virus.

#### Bibliografía

1. Cancel-Tirado, SM., Evans, RB., Yoon, K. (2004). Monoclonal antibody analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus epitopes associated with antibody-dependent enhancement and neutralization of virus infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102, 249-262.
2. Cavanagh, D. (1997). Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Arch. Virol.* 142, 629-633.
3. Costers, S., Lefebvre, DJ., Van Doorselaere, J., Vanhee, M., Delputte, PL., Nauwynck, HJ. (2010). GP4 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus contains a neutralizing epitope that is susceptible to immunoselection in vitro. *Arch Virol.* 155, 371-378.
4. Drew, TW., Meulenber, JJ., Sands, JJ., Paton, DJ. (1995). Production, characterization and reactivity of monoclonal antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* 76, 1361-1369.
5. Forsberg, R., Storgaard, T., Nielsen, HS., Oleksiewicz, MB., Cordioli, P., Sala, G., Hein, J., Bøtner, A. (2002). The genetic diversity of european type PRRSV is similar to that of the north American type

- but is geographically skewed within Europe. *Virology*. 299, 38-47.
6. Goldberg TL, Lowe JF, Milburn SM, Firkins LD. (2003). Quasispecies variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus during natural infection. *Virology* 317, 197-207.
  7. Labarque, GG., van Gucht, S., van Reeth, K., Nauwynck, H., Pensaert, M. (2003). Respiratory tract protection upon challenge of pigs vaccinated with attenuated porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines. *Vet. Microbiol.* 95, 187-197.
  8. López, OJ., Oliveira, MF., García, EA., Kwon, BJ., Doster, A., Osorio, FA. (2007). Protection against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection through passive transfer of PRRSV-neutralizing antibodies is dose dependent. *Clin Vaccine Immunol.* 14, 269-275.
  9. Meng XJ (2000). Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future vaccine development. *Vet Microbiol.* 74,309-329
  10. Osorio, FA., Galeota, JA., Nelson, E., Brodersen, B., Doster, A., Wills, R., Zuckermann, F., Laegreid, WW. (2002). Passive transfer of virus-specific antibodies confers protection against reproductive failure induced by a virulent strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and establishes sterilizing immunity. *Virology* 302, 9-20.
  11. Ostrowski, M., Galeota, JA., Jar, AM., Platt, KB., Osorio, FA., Lopez, O. (2002). Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain. *J. Virol.* 76, 4241-50.
  12. Plegemann, PGW. (2004). GP5 ectodomain epitope of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, strain Lelystad virus. *Virus Res.* 102, 225-230.
  13. Prieto, C., Álvarez, E., Martínez-Lobo, FJ., Simarro, I., Castro, JM. (2008). Similarity of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains to vaccine strain is not necessarily predictive of the degree of protective immunity conferred. *Vet. J.* 175, 356-63.
  14. Scortti, M., Prieto, C., Simarro, I., Castro, JM. (2006). Reproductive performance of gilts following vaccination and subsequent heterologous challenge with European strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Theriogenology.* 66,1884-1893.
  15. Stadejek, T., Oleksiewicz, MB., Potapchuk, D., Podgórska, K. (2006). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains of exceptional diversity in Eastern Europe support the definition of new genetic subtypes. *J Gen Virol.* 87, 1835-1841.
  16. Vanhee, M., Costers, S., Van Breedam, W., Geldhof, MF., Van Doorselaere, J., Nauwynck, HJ. (2010). A variable region in GP4 of European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces neutralizing antibodies against homologous but not heterologous virus strains. *Viral Immunol.* 23, 403-413.
  17. Vanhee, M., Van Breedam, W., Costers, S., Geldhof, M., Noppe, Y., Nauwynck, H. (2011). Characterization of antigenic regions in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus by the use of peptide-specific serum antibodies. *Vaccine*, en prensa.