

Libros de **Cátedra**

Patogenicidad microbiana en Medicina Veterinaria

Volumen: Virología

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

n
naturales

FACULTAD DE
CIENCIAS VETERINARIAS



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

PATOGENICIDAD MICROBIANA EN MEDICINA VETERINARIA

VOLUMEN: VIROLOGÍA

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

Facultad de Ciencias Veterinarias



A nuestras familias

Agradecimientos

Nuestro agradecimiento a todos los colegas docentes de la Facultad de Ciencias Veterinarias y en especial a la Universidad Nacional de La Plata por darnos esta oportunidad.

Índice

VOLUMEN 2

Virología

Capítulo 1

Características generales de los virus

Cecilia M. Galosi, Nadia A. Fuentealba _____ 6

Capítulo 2

Arterivirus

Germán E. Metz y María M. Abeyá _____ 28

Capítulo 3

Herpesvirus

Cecilia M. Galosi, María E. Bravi, Mariela R. Scrochi _____ 37

Capítulo 4

Orthomixovirus

Guillermo H. Sguazza y María E. Bravi _____ 49

Capítulo 5

Paramixovirus

Marco A. Tizzano _____ 61

Capítulo 6

Parvovirus

Nadia A Fuentealba, María S. Serena _____ 71

Capítulo 7

Retrovirus

Carlos J. Panei, Viviana Cid de la Paz _____ 81

Capítulo 8

Rhabdovirus

Marcelo R. Pecoraro, Leandro Picotto _____ 92

Capítulo 9

Togavirus

María G. Echeverría, María Laura Susevich _____ 104

Capítulo 10

Virus que afectan a las abejas (*Apis mellifera*)

Francisco J. Reynaldi, Alejandra E. Larsen, Guillermo H. Sguazza _____ 113

CAPÍTULO 1

Características generales de los virus

Cecilia M. Galosi, Nadia A. Fuentealba

Los virus pueden considerarse como un conjunto complejo de macromoléculas orgánicas (ácido nucleico y proteínas), ordenadas tridimensionalmente, que no pueden replicarse fuera de células vivas. Son considerados organizaciones biológicas que habitan la “entrevida”, un espacio incierto entre lo vivo y lo inerte.

Las primeras características diferenciales de los virus con otros agentes fueron: el tamaño estimado por su capacidad de atravesar filtros con un tamaño de poro que retienen a las bacterias y su incapacidad para reproducirse en medios biológicos inertes (como lo son los medios para cultivos de bacterias), requiriendo de células para su propagación. Hoy en día, se sabe que estas características no alcanzan para diferenciar a los virus de otros agentes biológicos, ya que existen bacterias cuyo tamaño puede ser similar al de los virus más grandes como *Chlamydia* y *Rickettsia*, que también son parásitos intracelulares obligados. La organización y composición de las partículas virales ofrecen por sí características diferenciales importantes:

- Poseen un solo tipo de ácido nucleico: ADN o ARN.
- Tienen una estructura simple y estática.
- Su tamaño es relativamente pequeño con respecto al de otros agentes biológicos y oscila entre 20 y 400 nm (1 nanómetro = 10^{-9} m).
- No tienen sistema metabólico propio.
- Para su replicación dependen de la maquinaria enzimática de la célula hospedadora por lo que se los considera parásitos intracelulares estrictos.

Además de su estructura tan simple y particular, el modo de replicación de los virus, tal vez, sea la característica que justifica que tengan un lugar propio en la escala biológica. A diferencia de lo que sucede con las células, en el momento de su multiplicación, los virus no aumentan de tamaño para su posterior división binaria, por el contrario, la partícula viral es

desintegrada y luego se generan copias decada uno de sus componentes (proteínas y ácido nucleico) para finalmente, dar lugar a múltiples copias de partículas (progenie) similares a la original (Tabla 1).

Los virus (del latín: veneno) están ampliamente distribuidos en la naturaleza, afectando a los organismos de los reinos animal y vegetal, protistas y hongos. Pueden infectar a células eucariotas (virus animales y vegetales) como así también a células procariotas (bacteriófagos).

Tabla 1: Algunas diferencias entre virus, eubacterias, micoplasmas, clamidias y rickettsias.¹

Característica	Virus	Eubacterias	Micoplasmas	Clamidias	Rickettsias
Tamaño	20-400 nm	0,7 a 10 µm	250 nm	300 nm	1 µm
Ácido. Nucleico	ADN o ARN	Ambos	Ambos	Ambos	ambos
Fisión binaria	no	Si	Si	Si	si
Enzimas del metabolismo energético	no	Si	Si	No	si
Presencia de ribosomas	No	Si	Si	Si	si
Replicación en medios inertes	no	Si	Si	No	no

Estructura viral

El genoma está constituido por ácido nucleico, el cual varía entre las diferentes familias virales. Puede ser ADN o ARN, de cadena simple o doble, lineal o circular y de sentido positivo (+) o negativo (-).

El material genético está rodeado por una capa proteica denominada cápside, constituida por copias de un número determinado de proteínas codificadas por el genoma viral, que se ordenan en unidades llamadas capsómeros. El ordenamiento final de las proteínas de la cápside, define la pertenencia a alguna de las siguientes simetrías: icosaédrica, helicoidal o compleja. Algunas proteínas se asocian tan estrechamente al ácido nucleico que se denominan nucleoproteínas y constituyen la nucleocápside. Algunos virus (ej: adenovirus) pueden tener proyecciones (fibras) en la cápside, generalmente en los vértices del icosaedro.

Rodeando a la cápside, en algunas familias virales, existe una membrana que proviene de la membrana modificada de la célula donde se replicó el virus y que se denomina envoltura (*envelope*). Esta membrana se puede originar tanto de la membrana plasmática (ej.: Virus de la influenza) como de la nuclear (ej.: herpesvirus), está formada por una bicapa lipídica y

¹Modificado de Carballal G, Oubiña JR. -Eds-. Virología médica. Ciudad Autónoma de Bs As, Argentina. 4ta Ed. 2015 Corpus Editorial.

posee glicoproteínas (proteínas + hidratos de carbono) con características antigénicas propias del virus y, en muchos casos, forman parte de ciertas proyecciones denominadas espículas (Figura 1).

Los virus envueltos son más sensibles a las condiciones ambientales, pH extremos y a los solventes orgánicos debido a la estructura lipo-glico-proteica de la envoltura.

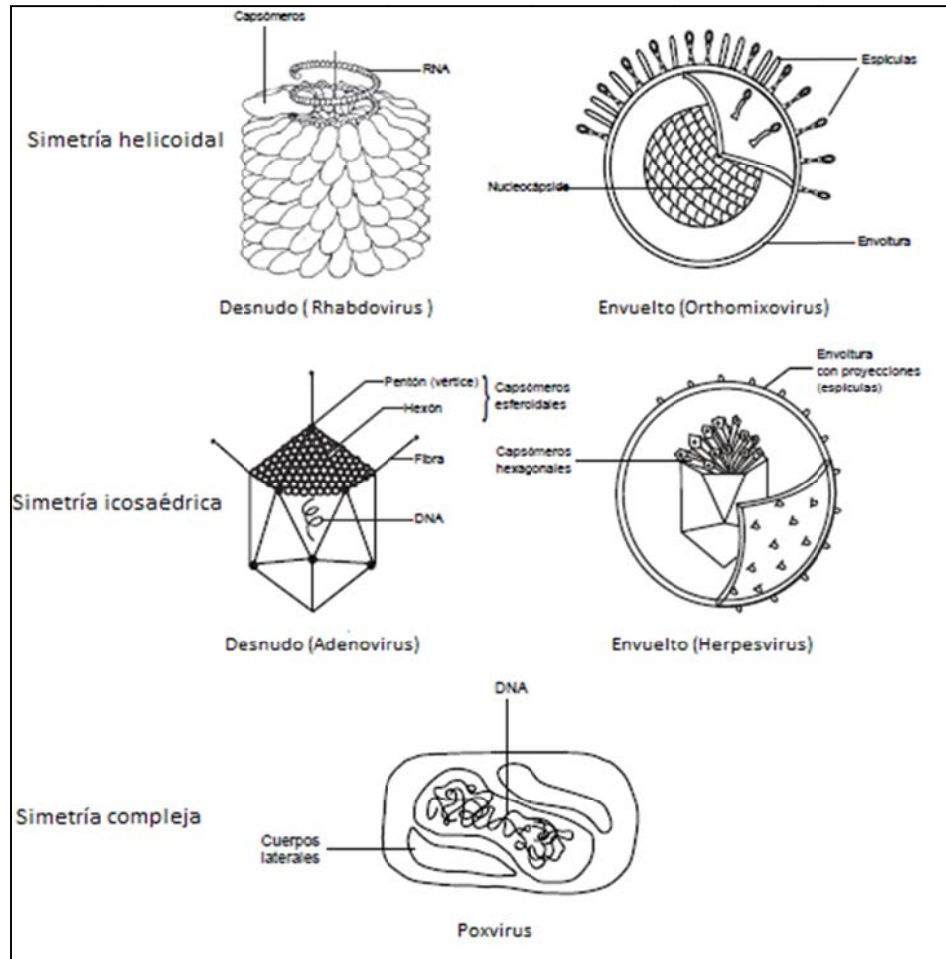


Figura 1. Esquemas representativos de las estructuras de los virus²

Nomenclatura y taxonomía

El nombre de los virus obedece a diferentes consideraciones. En algunos casos está relacionado a la enfermedad que producen (ej.: el **poliovirus** que se llama así porque produce la poliomielitis), a palabras compuestas (ej.: **Papovavirus** que corresponde a la contracción de los nombres **papiloma**, **polioma** y **vacuolizante**), al nombre de los descubridores (virus de Epstein-Barr) o hacen referencia al tejido de donde fueron aislados (ej.: **adenovirus** debido a que fue aislado de adenoides humanas). También puede deberse a las características

² Modificado de Carballal G, Oubiña JR. Virología médica. Ciudad Autónoma de Bs As, Argentina. 4ta Ed. 2015 Corpus Editorial.

estructurales (ej.: coronavirus pues parte de su estructura se asemeja a una corona), al tamaño (ej.: parvovirus ya que parvo: pequeño), o a una derivación del lugar donde se detectaron por primera vez (ej.: virus Sendai o el hantavirus -del Río Hantan-).

Debido a estos diferentes criterios para nombrar a los virus y ante la necesidad de utilizar reglas significativas, la taxonomía viral es “quien puso orden” para su identificación, clasificación y agrupamiento sistemático, en categorías que revelan vinculación entre ellos. En 1973, se creó el Comité Internacional de Taxonomía Viral (ICTV) que clasificó a los virus agrupándolos de acuerdo a los siguientes criterios:

- La naturaleza del genoma viral (ADN, ARN).
- Número de cadenas del genoma viral (una cadena o dos cadenas).
- Propiedad de realizar transcripción inversa.
- Polaridad del genoma viral (si son de una cadena que pueden ser positiva (+) o negativa (-).

De esta forma, se crean diferentes clases de virus, diversas familias y numerosos géneros (<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>). El sistema utiliza una serie de taxones (como se indica en negrita) seguido de un sufijo específico (subrayado):

Orden (-virales)

Familia (-viridae)

Subfamilia (-virinae)

Género (-virus)

Especie

Ejemplo:

Orden: *Herpesvirales*

Familia: *Herpesviridae*

Subfamilia: *Alphaherpesvirinae*

Género: *Simplexvirus*

Especie: *Humanalphaherpesvirus 1*

Otro tipo de clasificación es la denominada Clasificación de Baltimore, basada en el modo de replicación de los genes y su expresión. Nos referiremos a ella en la próxima sección.

Replicación viral

Los virus son parásitos intracelulares obligados ya que carecen de organelas que les permitan una vida autótrofa. La cinética de replicación viral varía dependiendo del tipo de genoma que posea el virión. Para multiplicarse, deben recorrer en la célula dos caminos metabólicos: el camino de las proteínas y el camino del genoma y, para ello, se requiere de la interacción entre los distintos compartimentos celulares y las macromoléculas virales. Dependiendo de la adaptación realizada entre los virus y las células que los hospedan, algunos tienen replicación estrictamente citoplásmica, mientras que otros alcanzan el núcleo celular.

La producción de partículas virales requiere que la célula sintetice ARNm y, para ello, se utiliza la maquinaria biosintética celular. La célula eucariota sólo posee las enzimas que producen ARNm a partir de ADN de doble cadena, por esta razón, en caso de que el virus posea un genoma diferente, debe aportar las enzimas necesarias para el proceso mencionado.

Las proteínas virales son sintetizadas en los ribosomas libres en el citosol o en los asociados al retículo endoplásmico rugoso y luego son transportadas por sistemas de vesículas hacia los distintos componentes del aparato de Golgi, en donde son modificadas por el sistema enzimático mediante un proceso de “maduración”. La proteína madura tendrá la función de proteína estructural (aquellas que van a formar parte de la cápside viral, proteínas de la envoltura internas y externas) o no estructural (enzimas).

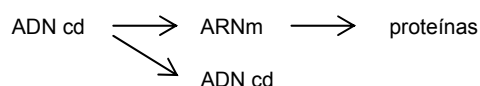
Por convención, se denominan cadenas genómicas (+) a aquellas que se escriben en dirección 5'-3' o en el caso de los ARN aquellos que se reconocen como ARNm.

Las familias virales se organizan de acuerdo a la composición genómica en 7 grupos arbitrarios. Esto se conoce como la “Clasificación de Baltimore” y consiste en agrupar a los virus teniendo en cuenta el modo de replicación de los genes y su expresión. En esta clasificación, el ARNm juega un papel central, de modo que los virus de cada grupo siguen el mismo camino para la síntesis del ARNm.

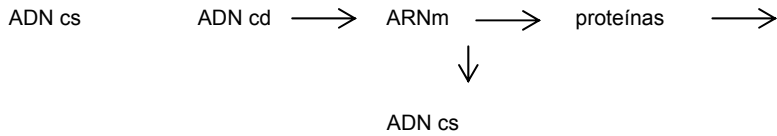
Todos los virus, independientemente de cuál sea su genoma y el mecanismo de transcripción, confluyen en la producción a nivel intracelular de ARNm para la síntesis final de proteínas virales.

Según la clasificación de Baltimore cada grupo viral se asigna en números romanos:

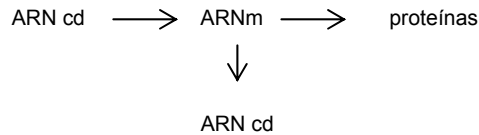
Grupo I: virus con genoma de **ADN de cadena doble** (familias *Adenoviridae*, *Herpesviridae*, *Papovaviridae*, *Poxviridae*). Las familias *Adenoviridae* y *Herpesviridae* replican en el núcleo celular, mientras que la familia *Poxviridae* replica en el citoplasma y posee sus propias enzimas para la replicación genómica.



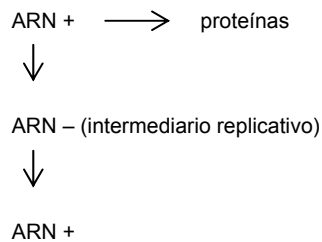
Grupo II: virus con genoma de **ADN de cadena simple** (familia *Parvoviridae*). La replicación de esta familia viral se realiza en el núcleo. En primer lugar se sintetiza la cadena complementaria de ADN que a su vez sirve de molde para la síntesis de genoma viral y para la síntesis de cadenas de ARNm.



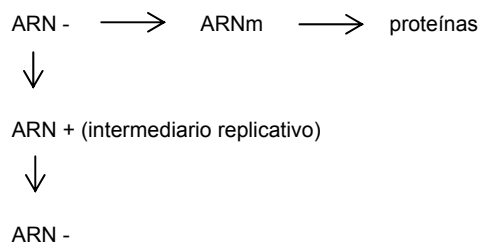
Grupo III: virus con genoma de **ARN de cadena doble** (familia *Reoviridae*). El genoma de los miembros de esta familia viral es **segmentado**. Cada segmento se transcribe en forma independiente, para producir un ARNm.



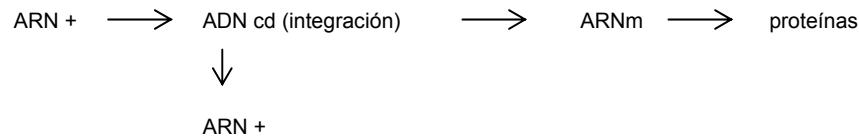
Grupo IV: virus con genoma de ARN de cadena simple y sentido positivo (+) (familias *Astroviridae*, *Caliciviridae*, *Coronaviridae*, *Flaviviridae*, *Picornaviridae*, *Togaviridae*).



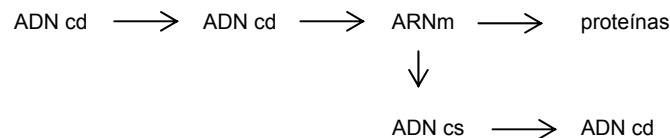
Grupo V: virus con genoma de ARN de cadena simple y sentido negativo (-) (Familias *Arenaviridae*, *Bunyaviridae*, *Filoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Rhabdoviridae*). Estos virus requieren de una ARN polimerasa ARN dependiente.



Grupo VI: virus con genoma de **ARN de sentido (+) y ADN intermediario** (familia *Retroviridae*). Son los únicos virus diploides en los que el ARN no se expresa como mensajero sino que sirve de molde para la **transcripción inversa**.



Grupo VII: virus con genoma de **ADN con ARN intermediario** (familia *Hepadnaviridae*). Como los retrovirus también hacen **retrotranscripción** pero se lleva a cabo durante el proceso de maduración viral.



Etapas de la replicación viral

Para poder comprender la patogenia de la infección viral es importante conocer como es la secuencia de acontecimientos en el interior de la célula hospedadora. Si bien las etapas que se enumeran a continuación no constituyen un esquema rígido y único, sirven como organigrama general:

Unión, anclaje o adsorción de los viriones a la célula

Depende de la interacción física entre el virión y la superficie de la célula hospedadora. El virus aporta las proteínas de unión y las células los receptores y co-receptores de membrana. Este paso involucra el concepto de afinidad entre virión y célula, lo que nos explica la causa por la que los virus pueden ser selectivos de órgano o tejido (tropismo) y porque hay agentes que causan infecciones localizadas o generalizadas. Los virus evolucionaron para aprovechar una variedad de glicoproteínas de membrana como sus receptores. Existe suficiente evidencia que indica que algunos virus emplean más de un receptor celular y si están situados en diferentes tipos celulares explicaría el mayor tropismo del virus. Además, hay receptores secuenciales en el mismo tipo de célula, es decir: un receptor de “rango amplio” con el cual el virus establece el primer contacto y receptores de “rango estrecho” que están más íntimamente ligados a la membrana celular facilitando la entrada del virus por fusión.

Penetración

Se refiere a la internalización de la partícula viral en la célula. Depende del suministro de energía y ocurre inmediatamente después de la adsorción. Involucra uno de los siguientes mecanismos: a) endocitosis de la partícula viral y b) fusión de la envoltura viral con la membrana celular. Los virus desnudos utilizan en general la endocitosis y los virus envueltos en su mayoría lo hacen por fusión. Existe un tercer mecanismo que sucede generalmente en las plantas, que consiste en el paso directo del virus completo a través de la membrana plasmática celular, se cree que aprovechando aberturas causadas por daño mecánico.

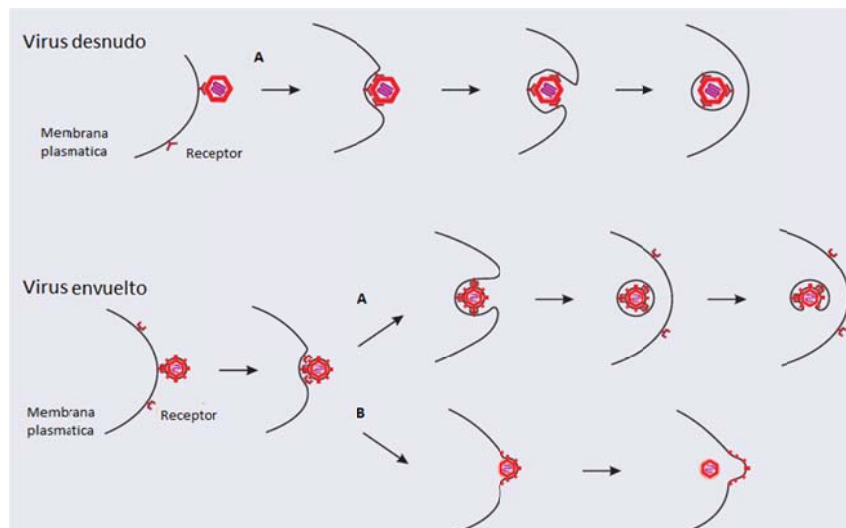


Figura 2. Esquemas representativos de las etapas de adsorción y penetración de los virus desnudos y envueltos a la célula hospedadora. A: mecanismo de endocitosis; B: mecanismo de fusión³

Decapsidación o desnudamiento

El ácido nucleico se libera de la nucleocápside como así también lo hacen las transcriptasas en aquellos virus que las poseen. En general, participan enzimas de la célula hospedadora y es un prerequisite para la expresión del genoma viral. Es una etapa crítica para el virus debido a la existencia de nucleasas en el citoplasma celular que pueden destruir la información genética viral.

Transcripción

Se define transcripción al proceso por el cual se transfiere la información genética contenida en una secuencia de ácido nucleico a la secuencia de una proteína. Este paso requiere la formación de un ARNm a partir de una molécula de ADN; en los virus que poseen ARN (+), el genoma se comporta como un ARNm, por lo tanto puede ser usado directamente para la síntesis de proteínas. En los virus con ARN (-) el material genético posee la secuencia de

³ Modificado de Carter JB y Saunders VA. Virology: Principles and Applications, 2007. West Sussex, England John Wiley & Sons Ltd.

nucleótidos necesaria para la síntesis del ARN complementario, el cual funcionará como mensajero. Este ARN (-) requiere de una ARN polimerasa ARN dependiente (transcriptasa) que es codificada por el virus. Estas enzimas cumplen con funciones de replicación cuando la función es la de copiar el ARN viral para formar nuevos genomas. Cuando las enzimas producen ARNm se designa que tienen una función de transcripción. La mayoría de los virus ADN se multiplican en el núcleo y utilizan la enzima celular ARN polimerasa ADN dependiente.

Traducción

El ARNm, tanto de virus ARN como ADN, es traducido dando lugar a la síntesis de proteínas. La biosíntesis de las proteínas virales se lleva a cabo en el citoplasma y lo hacen los ribosomas celulares. En general, las primeras proteínas traducidas son las requeridas para la replicación del ácido nucleico viral y son las denominadas proteínas no estructurales; otras son las inhibidoras de la síntesis de los componentes celulares. En algunos virus se producen oncoproteínas que llevan a la transformación celular y también pueden producirse viroquinas que aumentan la virulencia, inducen el tropismo celular y bloquean el sistema inmune del hospedador. Las proteínas sintetizadas más tardíamente son en general, las denominadas proteínas estructurales. En la figura 3 se resumen las etapas de transcripción y traducción de virus ADN y ARN.

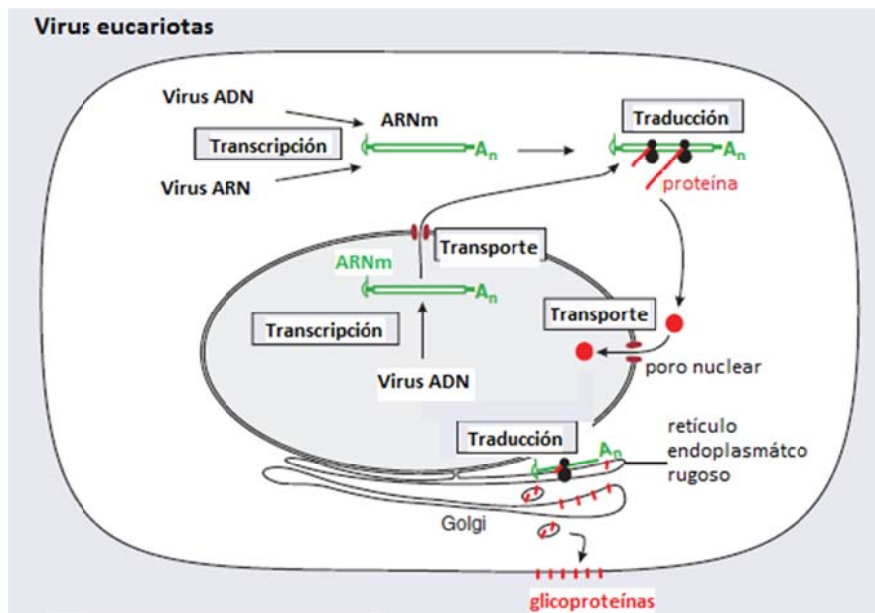


Figura 3. Esquema representativo de las etapas de transcripción y traducción de los ADN y ARN⁴

Replicación

Durante esta fase tiene lugar la síntesis de ARN o ADN viral que sigue el modelo de Watson y Crick de bases complementarias. En el caso de virus con genoma ADN pueden utilizar la

⁴Modificado de Carter JB y Saunders VA. *Virology: Principles and Applications*, 2007. West Sussex, England John Wiley & Sons Ltd

ADN polimerasa de la célula o poseer su propia ADN polimerasa. En el caso de virus cuyo genoma es ARN, se utilizan replicasas que tienen como función la formación de ARN a partir de cadenas complementarias o intermediarios replicativos que sirven de molde. Las estrategias utilizadas por los virus de diferentes grupos fueron descritas en la Clasificación de Baltimore.

Ensamblaje

Durante esta fase se organizan las macromoléculas virales (proteínas y ácidos nucleicos) tendientes a la formación de viriones maduros. Los pasos durante el ensamble viral deben ser estrictamente respetados ya que de esto depende la continuidad del virus en la naturaleza. La nueva partícula es construida de modo tal que le permita una interacción fácilmente reversible para llevar adelante todo el proceso replicativo que se desarrollará en otro hospedador susceptible. El ensamblaje significa diferentes desafíos de acuerdo a cada familia viral y aquellos virus que no lo logren, no serán capaces de infectar a nuevos hospedadores, denominándose genéricamente a los mismos como partículas defectivas. En el caso de partículas virales con envoltura, la nucleocápside se organiza y ensambla por debajo de la membrana celular, donde están localizadas las glicoproteínas virales. En el caso de virus desnudos, la cápside se ensambla alrededor del genoma viral.

Liberación

Durante esta fase ocurre la salida de los viriones infectantes mediante dos procesos posibles: citólisis o brotación. Este último, es una endocitosis inversa (exocitosis) que si no produce daño a la membrana celular puede conllevar a infecciones latentes (Figura 4).

La replicación viral es un proceso complejo y variado, que depende fundamentalmente del tipo de ácido nucleico y de la organización genética de cada virus en particular.

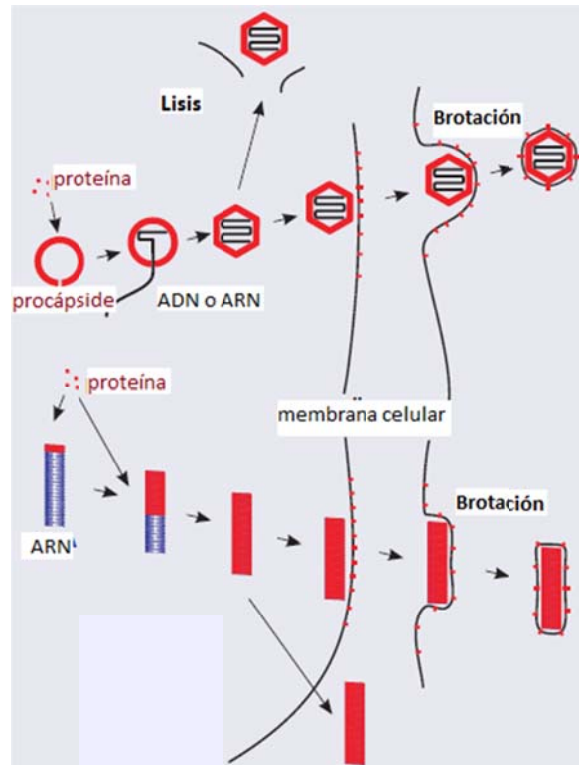


Figura 4. Esquema representativo de las etapas de transcripción y traducción de los ADN y ARN⁵

Patogenia de las infecciones virales

Conociendo el vocabulario

Con el objetivo de que esta sección sea comprendida claramente definiremos algunos términos de uso corriente.

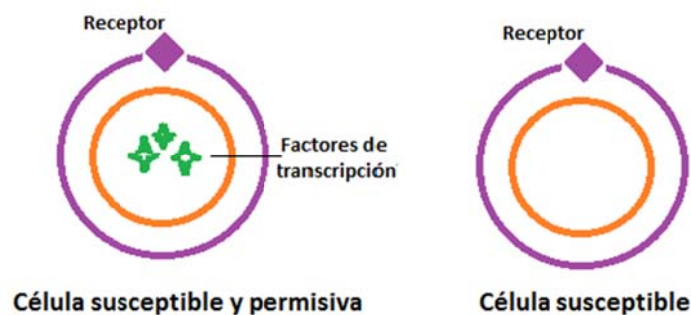
El término **patogenicidad** deriva del griego *Pathos* y *gene* que significan enfermedad y génesis, o "dar origen a". En otras palabras, implica la capacidad de un agente (en este caso un virus) para producir enfermedad. Por ejemplo el virus del sarampión es un agente altamente patógeno, ya que sobre un número determinado de individuos infectados y no inmunizados previamente, la gran mayoría de ellos desarrollará el cuadro clínico característico. Por el contrario, a modo de ejemplo, el virus de la poliomielitis, cuando infecta a lactantes menores de un año produce infecciones subclínicas o inaparentes, siendo –por ende– su patogenicidad prácticamente nula en este grupo etario. Muchos autores utilizan como sinónimo los términos patogenicidad y virulencia, sin embargo se debe diferenciar uno del otro. El término **virulencia** es la cuantificación de dicha capacidad del virus.

El término **patogenia** se refiere a los mecanismos de generación del daño o enfermedad, en este caso, producidos por una infección viral. La patogenia estudia las rutas que recorre el virus para llegar a las poblaciones celulares y los mecanismos que utiliza para dañarlas. El daño puede ser diferente en cada uno de los sitios o niveles donde llega y puede traducirse en signos que

⁵ Modificado de Carter JB y Saunders VA. Virology: Principles and Applications, 2007. West Sussex, England John Wiley & Sons Ltd

caracterizan a una determinada enfermedad. En cada uno de los niveles patogénicos, el virus debe ir superando distintos obstáculos que antepone el sistema inmune del hospedador, tales como la barrera cutáneo-mucosa, células, sistemas y distintos efectores del sistema inmune innato como adaptativo y la biología de la célula susceptible para poder avanzar al siguiente nivel. Cuando todos los niveles patogénicos son completados se puede producir la enfermedad o muerte del hospedador, mientras que la falla para superar alguna barrera puede significar la imposibilidad de infectar, una infección abortiva o una infección no productiva.

Se denominan **células susceptibles** aquellas que poseen el o los receptores y co-receptores para que el virus pueda adsorberse y penetrar en ellas. Aquellas células que además poseen los factores de transcripción que permiten la expresión de los genes virales se denominan **permisivas**. Toda célula permisiva es susceptible pero no todas las células susceptibles son permisivas (ver imagen representativa).



La infección viral debe alcanzar los órganos blanco que tienen receptores para los virus infectantes y así poder replicar en sus células. De esta manera, se originan las manifestaciones propias de la enfermedad. La capacidad de un virus de invadir y replicar en un tipo celular particular se denomina tropismo celular o tisular. Este tropismo de los virus por ciertos tejidos fue utilizado años anteriores para clasificarlos, por ejemplo, virus neurotrópicos (ej. virus de la poliomielitis), virus dermatotrópicos (ej. virus del sarampión), virus respiratorios (ej. adenovirus), virus entéricos (ej. enterovirus), etc. Posteriormente, se demostró que este tropismo no era exclusivo y que muchas veces la manifestación más importante no correspondía a su clasificación. Así, por ejemplo, la muerte por sarampión (denominado dermatotrópico) se debe generalmente a bronconeumonía, ya que el aparato respiratorio es uno de sus órganos blanco. La forma más habitual de presentación de una infección por virus polio (denominado neurotrópico) es la asintomática, en que el virus sólo se replica en el aparato digestivo, sin alcanzar el sistema nervioso central. Las infecciones por adenovirus (virus respiratorio) pueden provocar muerte por compromiso generalizado de hígado, pulmón, encéfalo, etc.

La **patogenia** de un virus puede estudiarse a distintos niveles según se considere como hospedadora a la célula, al individuo o a la población, es decir que puede ser analizada desde una visión microscópica o desde una visión macroscópica.

Patogenia a nivel celular (microscópica)

El daño en las células infectadas afecta a los tejidos y órganos y constituye uno de los elementos esenciales y determinantes en la patogenia. Los mecanismos de daño pueden ser directos, es decir por la acción de los virus, o indirectos, o sea debidos a otros factores, especialmente los relacionados al sistema inmune.

En el daño indirecto, el reconocimiento de alteraciones celulares como son la expresión de antígenos en la superficie celular, disminución o alteración de proteínas propias, permite a las células del sistema inmune innato (células NK, polimorfonucleares, macrófagos) y del sistema inmune adaptativo (LT CD4 y/o CD8 citotóxicos), destruir a las células infectadas por virus. Los anticuerpos específicos, una vez que reconocen células infectadas, son reconocidos por distintos efectores inmunes (NK, LT CD8 citotóxicos y sistema del complemento) responsables de la eliminación de la célula infectada. Otro mecanismo indirecto muy importante está relacionado a la activación de genes que controlan la muerte celular programada o apoptosis, inducido externamente por las células del sistema inmune (NK y LT CD8 citotóxicos) o internamente por receptores específicos.

Cuando algunos virus infectan a las células producen diversas alteraciones que se conocen con el nombre de efecto citopático o citopatogénico (ECP) o actividad citopática (ACP). Estos cambios se suceden tanto en las células de los organismos vivos como en cultivos celulares in vitro. A menudo este ECP es tan característico que permite tener una idea aproximada del virus que lo produce, por lo tanto esta propiedad es importante en el diagnóstico de laboratorio. Las alteraciones que producen los virus en las células infectadas van desde aquellas que no conducen en forma inmediata a la muerte celular, a las que destruyen la célula y se denominan efectos citolíticos o lisis.

Los principales efectos citopáticos son:

- **Lisis celular.** La destrucción celular se debe fundamentalmente a la detención de la síntesis de macromoléculas celulares, por algunas proteínas virales. Con posterioridad, durante la fase tardía del ciclo replicativo de ciertos virus, la acumulación de grandes cantidades de proteínas puede producir la inhibición general de los procesos de biosíntesis de macromoléculas, tanto virales como celulares, ocasionando la lisis y liberación de gran cantidad de viriones (Figura 5).

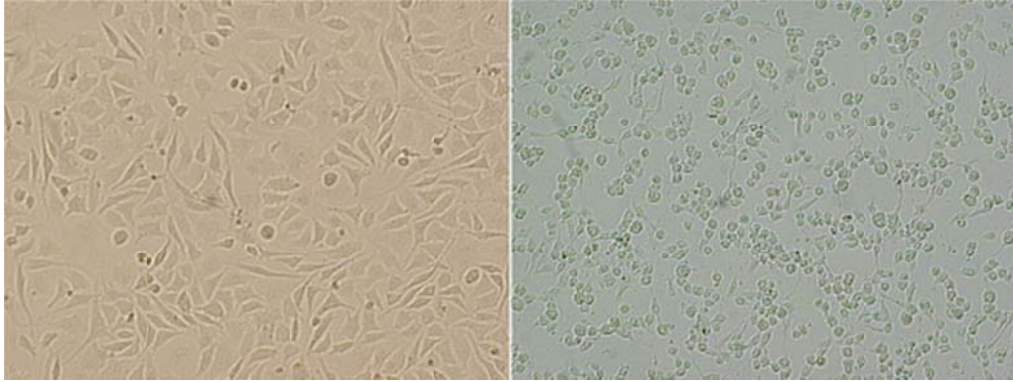


Figura 5. Monocapa de células de línea L929 (fibroblastos de ratón) normales (izquierda) y monocapa de idénticas células infectadas con el Virus diminuto del ratón (parvovirus) productor de efecto citopático lítico (derecha).

- **Fusión celular.** Ciertos virus codifican y poseen en su estructura, proteínas que tienen la propiedad de fusionar membranas celulares. La presencia de estas proteínas en la superficie de las células infectadas o la presencia de partículas virales entre dos células vecinas permitirá la fusión celular, dando origen a células multinucleadas que reciben el nombre de células gigantes, policariocitos o sincicios. Los virus como el del sarampión, el sincicial respiratorio, la mayoría de los herpesvirus y algunos retrovirus, poseen este tipo de proteínas y son capaces de pasar por contigüidad de una célula a otra (Figura 6).

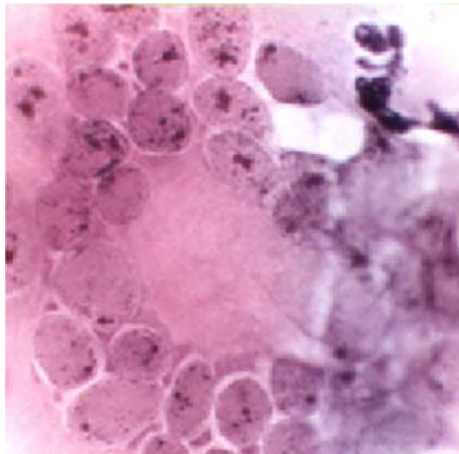


Figura 6. Sinciciode células de línea RK13 (riñón de conejo) infectadas con alphaherpesvirus. Se observa en el centro de la imagen los citoplasmas confluentes rodeados por varios núcleos celulares.

- **Expresión de proteínas y antígenos.** Durante la infección viral, en la célula aparecen y desaparecen proteínas, tanto celulares como virales. En la infección por virus envueltos aparecen en la superficie de la célula infectada las proteínas de la envoltura viral. Por ejemplo, en la infección por virus influenza aparecen en la superficie de la célula infectada las hemaglutininas virales que puede unir glóbulos rojos produciendo un fenómeno de hemadsorción.

Es posible detectar antígenos virales dentro de la célula infectada (en el citoplasma o en el núcleo) mediante el uso de anticuerpos específicos marcados con fluoresceína (Figura 7).

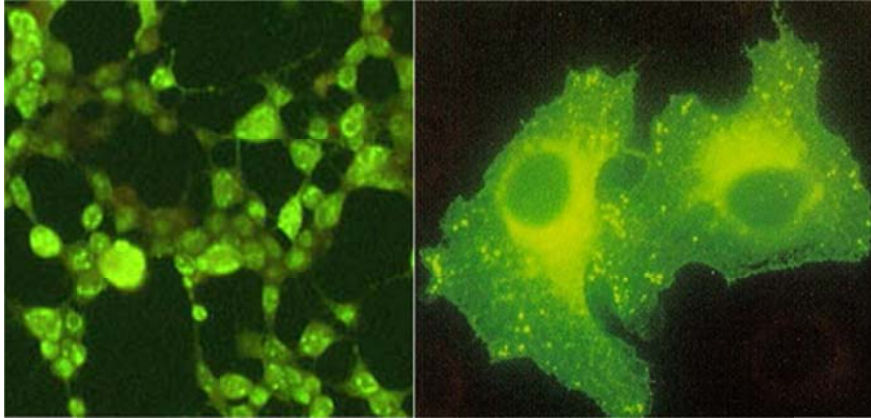


Figura 7. Células infectadas con virus ADN(de replicación nuclear), donde se observa la fluorescencia en los núcleos celulares (izquierda). Células infectadas con virus ARN (replicación citoplasmática) en las que se observa la fluorescencia en el citoplasma (derecha).

- **Cambios morfológicos.** Algunas proteínas virales y otras celulares, inducidas durante la infección, pueden actuar sobre el sistema del citoesqueleto celular. Su alteración origina que la célula se redondee, como ocurre con aquéllas infectadas por los herpesvirus y los adenovirus. Las células que poseen cilios, como las del tracto respiratorio, pierden su funcionalidad ciliar durante la infección por virus respiratorios (Figura 8).

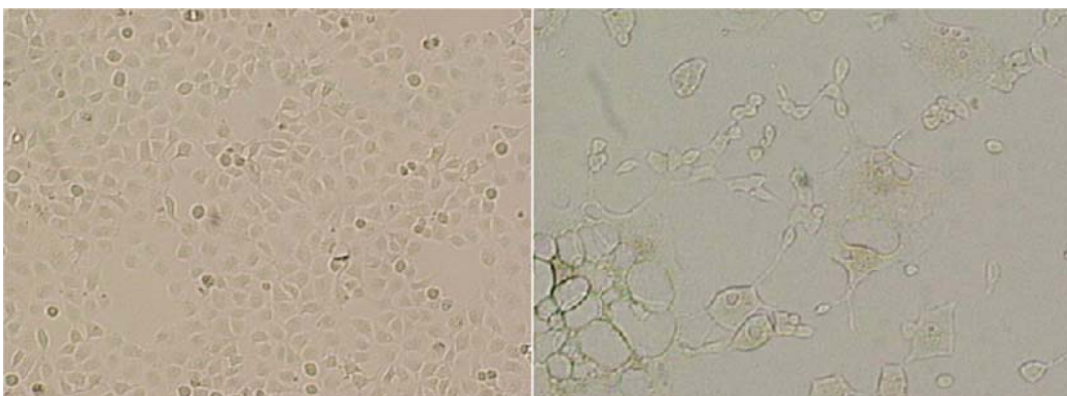


Figura 8. Células RK13 (riñón de conejo) normales (izquierda) e infectadas con un gammaherpesvirus (derecha). Se observan los cambios morfológicos celulares típicos como consecuencia de la infección viral.

- **Cuerpos de inclusión.** Son estructuras que aparecen durante la infección por determinados virus. Podrían corresponder a sitios de agregación de proteínas virales (herpesvirus) o viriones (poxvirus), localizados en el citoplasma o en el

núcleo. También poseen la propiedad de teñirse con colorantes ácidos o básicos (Figura 9).

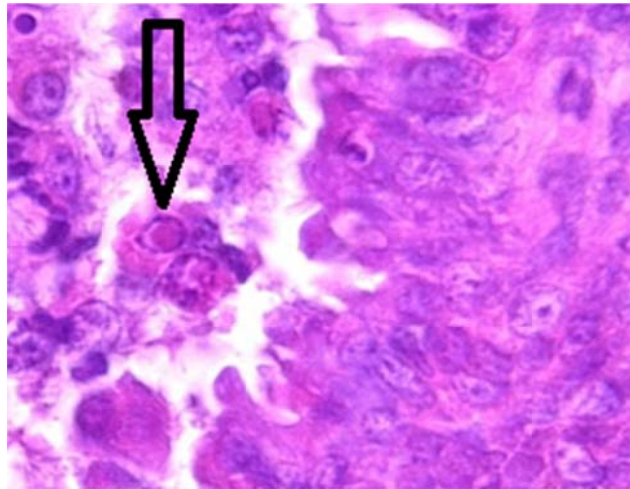


Figura 9. Corte histológico de pulmón de ratón BALB/c infectado experimentalmente con un alphaherpesvirus. La flecha señala un núcleo celular que presenta un cuerpo de inclusión en su interior y como consecuencia de ello, la cromatina nuclear se encuentra desplazada hacia la periferia. (Tinción con hematoxilina y eosina)

- **Proliferación celular.** Ciertos virus inducen la síntesis de ADN celular y determinan que las células infectadas proliferen antes de provocar su destrucción. Este hecho es fácilmente observable en las infecciones por virus papiloma, responsables de las verrugas.
- **Alteraciones cromosómicas.** Los virus pueden provocar cambios a nivel nuclear que conducen a la desintegración de la cromatina de las células infectadas, como ocurre en las infecciones por virus herpes simplex. En otros casos, las alteraciones nucleares pueden ser tan sutiles que no se detectan sino por metodologías moleculares.
- **Transformación celular.** Ciertos virus ADN y los retrovirus pueden integrar el ADN viral sintetizado durante la replicación en el genoma celular, generando células transformadas que se comportan *in vitro* en forma semejante a las células cancerosas (Figura 10).



Figura 10. Bovino infectado con el virus de la Leucosis enzoótica bovina (Retrovirus). La flecha señala tumores producidos por la actividad transformante del virus al integrarse al genoma celular⁶

Patogenia a nivel del individuo

Cuando se estudia a nivel del organismo completo, se analiza la vía que utiliza el virus para entrar al hospedador, dónde inicia su ciclo de replicación, cómo se disemina, que órganos y tejidos infectará y cómo será transmitido. En esta visión macroscópica, los virus infectan hospedadores para perpetuarse en la naturaleza y los factores que interactúan entre sí son:

- **Factores dependientes del virus.** Son los inherentes a la estructura viral. Se conoce que sólo cierto tipo de virus pueden infectar células específicas, por ejemplo del aparato respiratorio y por lo tanto originar enfermedades como bronconeumonía; o del sistema nervioso central y producir encefalitis. Incluso, dentro de ellos, algunas cepas resultan más virulentas (ej. adenovirus 3 y 7 causantes de enfermedades respiratorias).
- **Factores dependientes del ambiente.** Condiciones medioambientales como temperatura, humedad, salinidad, pH, ventilación, etc., pueden influir en la viabilidad del virus antes de llegar a la célula hospedadora y afectar su capacidad de infectar. La presencia de envoltura lipoproteica le confiere mayor labilidad a la partícula viral, en contraposición, los virus desnudos resisten mejor las condiciones ambientales adversas.
- **Factores dependientes del hospedador.** Factores innatos como raza, sexo, estado inmune, estado nutricional y otros, definen la resistencia o susceptibilidad ante los virus a través de receptores celulares específicos y la capacidad de desencadenar una respuesta inmune.

Más allá de la gran variedad de virus y hospedadores, en las rutas patogénicas existen puntos y estrategias comunes que se describen a continuación:

Fuentes de contagio. El origen de las enfermedades virales que afectan al hombre y los animales son generalmente otros humanos o animales infectados.

⁶ Imagen tomada de la Tesis doctoral del Dr. Carlos J Panei, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP.

Mecanismos de transmisión. Se clasifican en directos o indirectos según la forma de transmitirse desde la fuente de contagio al individuo susceptible de infectarse:

Directos: pueden ser **con o sin contacto físico**. Aquellos que necesitan contacto físico entre los individuos para propagarse, se favorecen por la presencia de lesiones en las barreras muco-cutáneas y, en general, requieren de contacto físico relativamente estrecho (ej.: verrugas causadas por virus papiloma). Las enfermedades virales que no requieren contacto físico se contagian a través de las secreciones eliminadas por los individuos infectados, cuyo ejemplo más ilustrativo es el aerosol de partículas que se emiten al hablar, estornudar, etc. y que contienen virus. Este mecanismo es muy efectivo para la propagación y es usado por la mayoría de los virus exantemáticos, respiratorios y otros.

Indirectos: el mecanismo indirecto implica la acción intermediaria de un elemento inerte (**vehículo**) o vivo (**vector**) en el contagio. El rol del agua y los alimentos como vehículo de transmisión de infecciones virales entéricas será eficiente en aquellos virus que estructuralmente estén condicionados para permanecer viables en el medio ambiente, como sucede con los enterovirus, rotavirus y otros. Los **vectores** pueden ser **mecánicos** cuando el virus es transmitido en forma pasiva (ej.: tabánidos transmisores del virus de la anemia infecciosa equina), o **biológicos**, si el virus se multiplica y desarrolla su ciclo reproductivo en ellos (ej: virus de la Encefalitis del Oeste del Nilo).

Puerta de entrada. Es el inicio de la ruta patogénica. Es el lugar por donde los virus pueden ingresar al organismo a través de la infección de uno o varios tejidos. El hecho fundamental para que un órgano constituya una puerta de entrada es que las células de éstos tengan **receptores** y **co-receptores** para permitir la adsorción y penetración de determinados virus. La vía respiratoria es una de las principales puerta de entrada de agentes virales, aunque también representa una barrera defensiva como las cilias, las secreciones que contienen proteínas de fase aguda y/o inmunoglobulinas y enzimas que dificultan la adsorción viral. El pH gástrico es una barrera para los virus que ingresan por vía digestiva.

Para actuar como sitio de ingreso del virus estas barreras tienen que estar alteradas, por ejemplo en el caso de la piel se requiere habitualmente de una solución de continuidad.

Vías de diseminación. Dependiendo del modelo de infección viral, el virus puede permanecer en la puerta de entrada (**infección local**), o bien diseminarse a órganos distantes (**infección sistémica**) por diferentes vías. Las principales formas de diseminación son:

- Vía hematógena (ej. virus de la viruela).
- Vía neural (por las terminaciones nerviosas) (ej. virus de la rabia).
- Vía vertical (de madre a hijo) (ej. virus de la diarrea viral bovina).

En este último caso puede ocurrir por varios mecanismos:

- vía transplacentaria: como el virus de la diarrea viral bovina y en humanos, virus de la Rubéola, VIH, virus de hepatitis B.
- por contigüidad a través del canal genital durante el parto: como el

virus Herpes simplex, VIH, virus papiloma.

- a través de la leche materna (ej. citomegalovirus, VIH).

Modelos de infección viral

El destino final del contacto de un virus con un organismo hospedador, estará determinado por la interacción entre los factores mencionados en el punto anterior, pudiendo evolucionar de distintas formas.

Algunos modelos pueden identificarse, dependiendo si el ciclo viral conduce o no a la producción de partículas virales, en **infecciones productivas** (ocurre en células permisivas y se generan partículas virales completas) o **infecciones no productivas** (se expresan sólo algunas proteínas y mantienen su persistencia en el hospedador, como por ejemplo los virus oncogénicos). Ambos modelos no se excluyen y muchas veces se complementan.

La evolución del parasitismo celular puede ser limitada o prolongarse durante un período de tiempo definiendo de esta manera una infección aguda o persistente, respectivamente.

Infección aguda. Infección limitada en el tiempo, donde el virus establece un parasitismo breve, es eliminado del organismo y el hospedador se recupera. Ésta puede presentarse con o sin signos clínicos (subclínica) (Figura 11) Ejemplo son: resfrío común por rinovirus, laringitis por virus parainfluenza, diarrea por rotavirus. En determinadas ocasiones, puede seguir una evolución grave y producir la muerte.

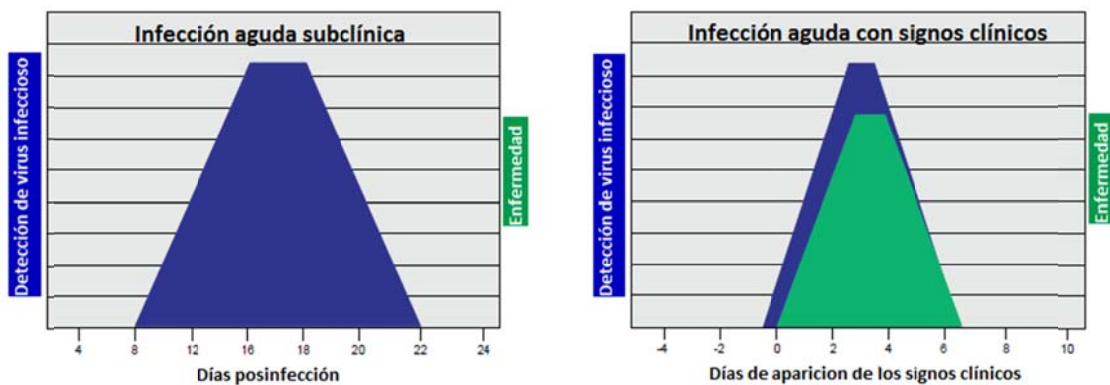


Figura 11. Esquemas representativos de infección aguda subclínica y clínica⁷

Infección persistente. Después de la infección inicial sintomática o no, el virus completo o su genoma se mantienen en el organismo por tiempo prolongado, pudiendo ser meses, años o de por vida (con o sin manifestaciones clínicas). El motivo por el cual el virus permanece en el hospedador a pesar de la respuesta de defensa específica e inespecífica del mismo, está determinado según la condición o estado replicativo del virus.

Es así que la infección persistente puede ser entonces:

⁷Modificado de Carballal G, Oubiña JR. -Eds-. Virología médica. Ciudad Autónoma de Bs As, Argentina. 4ta Ed. 2015 Corpus Editorial.

- **Latente.** Luego de la infección inicial el virus permanece silente en el organismo por tiempos variables, con el genoma listo para expresar todo su potencial en determinadas ocasiones y tiene episodios agudos de reactivación una o más veces. Tanto la primo-infección como las reactivaciones pueden ser con o sin manifestaciones clínicas. Durante la latencia, puede detectarse el ácido nucleico viral, pero el virus infeccioso no es demostrable (Figura 12).
- **Crónica.** El virus infecta en forma clínica o inaparente y permanece en multiplicación continua, con o sin integración al genoma celular y no produce la lisis celular. La replicación viral puede demorar años en producir manifestaciones clínicas. La presencia de partículas virales es constante y demostrables (Figura 13). Ejemplos: hepatitis crónica por el virus de la hepatitis B y el VIH.

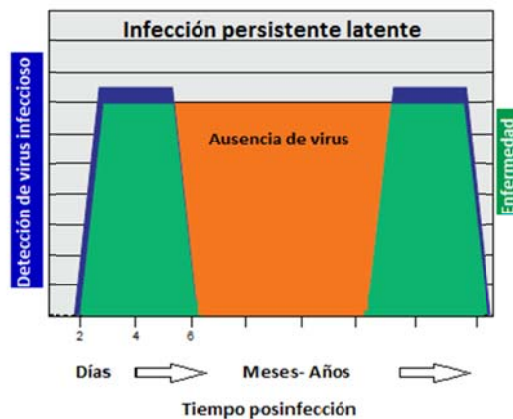


Figura 12. Esquema representativo de infección persistente latente⁸

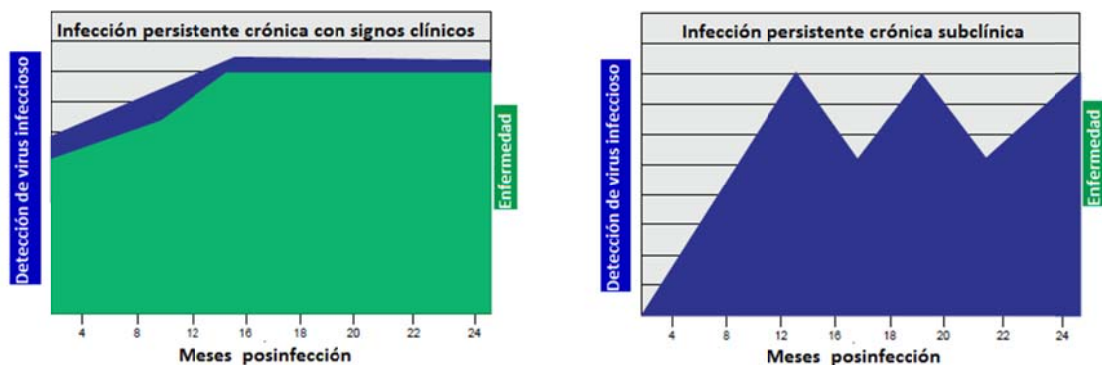


Figura 13. Esquema representativo de infección persistente crónica con y sin signos clínicos

- **Lenta.** La primo-infección generalmente es asintomática y el virus no es detectable. Años después, se manifiesta con un cuadro severo, progresivo, que en meses lleva a la muerte. Los ejemplos son las infecciones virales **convencionales**, como la panencefalitis esclerosante subaguda por el virus del sarampión y otros denominados **agentes no convencionales** como los priones (Figura 14).

⁸Modificado de Carballal G, Oubiña JR. -Eds-. Virología médica. Ciudad Autónoma de Bs As, Argentina. 4ta Ed. 2015 Corpus Editorial.

- **Infección transformante.** En este tipo de infección, el virus es capaz de infectar las células, pero no puede producir partículas virales en forma significativa que implique destrucción celular. Generalmente, el genoma viral está presente en la célula (integrado) y sólo parte de sus genes se traducen en proteínas virales. Estas originan cambios en las propiedades celulares o transformación celular, a través de la interacción con genes y proteínas celulares, originando tumores benignos o malignos (Figura 14). Ejemplos: verruga por virus papiloma 2, carcinoma cérvicouterino por virus papiloma 16-18.

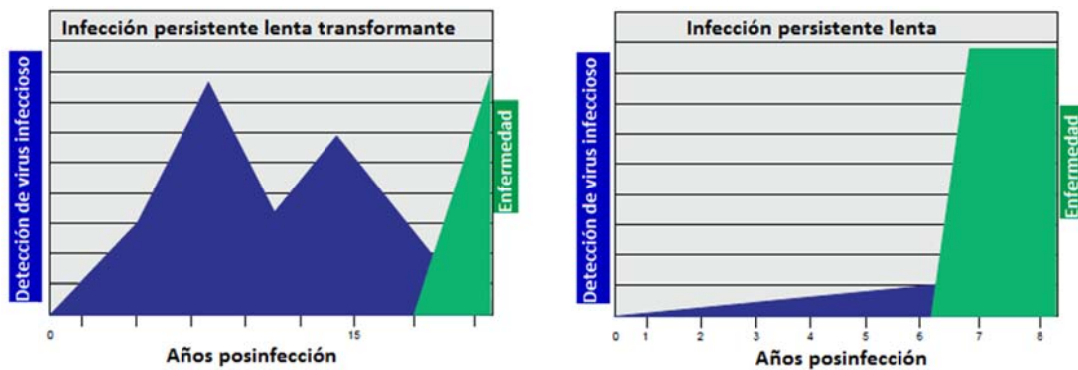


Figura 14. Esquema representativo de infección persistente lenta transformante y persistente lenta⁹

Con el desarrollo y perfeccionamiento de las nuevas técnicas de biología molecular se podrán profundizar los conocimientos que relacionan la estructura con la funcionalidad de biomoléculas y se obtendrán bases para el desarrollo de métodos de profilaxis y terapéutica en las diversas infecciones virales.

⁹Modificado de Carballal G, Oubiña JR. -Eds-. Virología médica. Ciudad Autónoma de Bs As, Argentina. 4ta Ed. 2015 Corpus Editorial.

Referencias

- Carballal G, Oubiña JR. Virología médica. 4ta ed., 2015. Ciudad Autónoma de Bs As, Argentina, Corpus Editorial.
- Carter JB y Saunders VA. Virology: Principles and Applications. 2007. West Sussex, England John Wiley & Sons Ltd.
- Flint S, Enquist L, Racaniello V, Skalka A. Principles of Virology. 2nd ed., 2004. Washington, USA, ASM Press.
- MacLachlan NJ y Dubovi EJ. Fenner's Veterinary Virology, 4th ed., 2011. New York, USA, Elsevier.
- Pavan JV, Nates SV. Los virus, biología de la enfermedad. 2003. Córdoba, Argentina. SIMA Editora.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de La Plata, a la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires y al CONICET por la formación brindada y el apoyo recibido.

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).

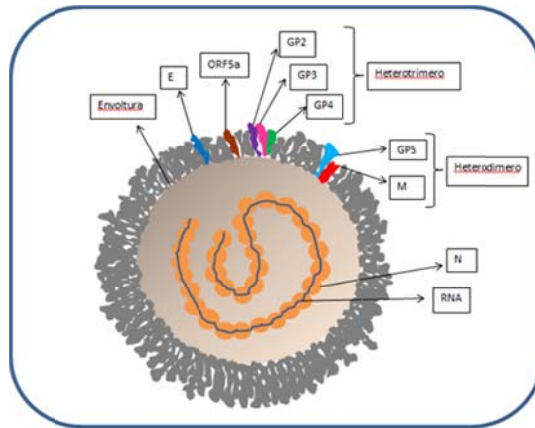


Figura 1. Esquema del arterivirus equino (VAE)

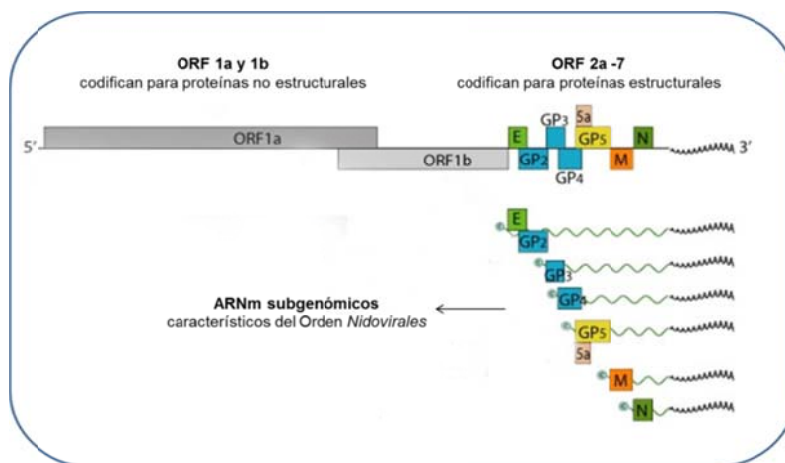


Figura 2. Organización genómica de los arterivirus (modelo VAE)

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 epítopos 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 epítopos 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 Patógenos (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, Nosetto 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.

CAPÍTULO 3

Herpesvirus

Cecilia M. Galosi, María E. Bravi, Mariela R. Scrochi

Los herpesvirus, pertenecen a la familia *Herpesviridae* dentro del orden *Herpesvirales*, se encuentran muy difundidos en el reino animal y adaptados a sus hospedadores naturales como consecuencia de la prolongada co-evolución. Existen herpesvirus que infectan insectos, peces, reptiles, anfibios y moluscos y a casi todas las especies de aves y mamíferos.

Estos virus son capaces de producir infecciones latentes, es decir que el agente viral permanece toda la vida en el organismo hospedador, no puede detectarse por los métodos virológicos clásicos como el aislamiento viral y pueden reactivarse y producir signos clínicos luego de meses o años de una infección primaria o de re-infecciones. La reactivación de virus latente generalmente es intermitente y se encuentra asociada a condiciones de estrés e inmunodepresión. Existen diferencias entre los herpesvirus referidas a la localización de latencia y, esta particularidad, junto con el tropismo celular, la velocidad de multiplicación en cultivos celulares y el tipo de efecto citopático que producen (lisis, cuerpos de inclusión, sincicios, etc.), hace que los mismos se clasifiquen en subfamilias y géneros que incluyen a las diferentes especies. A continuación se citan los herpesvirus más comunes en las especies domésticas y se los denomina de acuerdo a las reglas taxonómicas actuales que incluyen en el nombre de la especie, un sufijo que indica la subfamilia a la que pertenecen (<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>) (Tabla 1).

Tabla 1: Algunos herpesvirus de importancia en medicina veterinaria

Especie animal afectada	Especie viral	Signos clínicos
Bovinos	<i>Bovinealphaherpesvirus 1</i>	Rinotraqueítis, aborto, vulvovaginitis pustular infecciosa, balanopostitis
	<i>Bovinealphaherpesvirus 2</i>	Virus de la mamilitis infecciosa bovina
	<i>Bovinegammaherpesvirus 4</i>	Trastornos reproductivos, endometritis
	<i>Bovinealphaherpesvirus 5</i>	Encefalitis
Equinos	<i>Equidalphaherpesvirus 1</i>	Aborto, enfermedad respiratoria, trastornos neurológicos
	<i>Equidalphaherpesvirus 4</i>	Rinoneumonitis
	<i>Equidalphaherpesvirus 3</i>	Exantema coital equino
	<i>Equidgammaherpesvirus 2</i>	Conjuntivitis, enfermedad respiratoria
Porcinos	<i>Suidalphaherpesvirus 1</i>	Enfermedad de Aujeszky
	<i>Suidbetaherpesvirus 2</i>	Rinitis a cuerpos de inclusión
Aves	<i>Gallidalphaherpesvirus 1</i>	Laringotraqueítis aviar
	<i>Gallidalphaherpesvirus 2</i>	Enfermedad de Marek
Caprinos	<i>Caprinealphaherpesvirus1</i>	Conjuntivitis, enfermedad respiratoria, aborto, vulvovaginitis
Caninos	<i>Canidalphaherpesvirus 1</i>	Rinotraqueítis, abortos, muertes neonatales
Felinos	<i>Felidalphaherpesvirus 1</i>	Rinotraqueítis, conjuntivitis, queratitis

Estructura y propiedades fisicoquímicas

Son virus grandes, de hasta 250 nm de diámetro y pleomórficos. El genoma es ADN lineal de doble cadena, constituido por aproximadamente 125-290 Kb y se encuentra protegido por una cápside proteica de simetría icosaédrica. Rodeando a la cápside se encuentra el tegumento, rico en contenido enzimático y, finalmente, más externamente se encuentra la envoltura viral derivada de la célula hospedadora, de contenido lipoproteico y que además presenta proyecciones o

espículas de naturaleza glicoproteica (Figura 1). La envoltura hace que estos virus sean sensibles a la temperatura ambiente, pH extremos y solventes orgánicos.

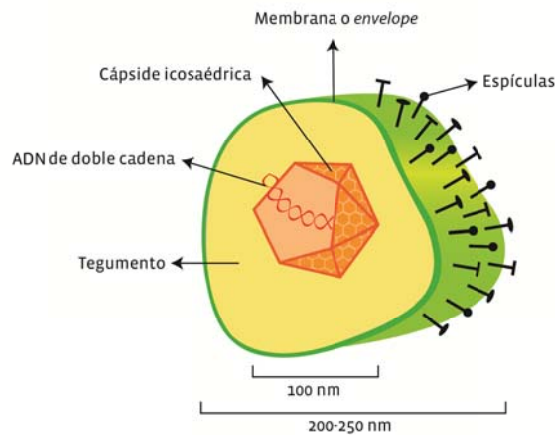


Figura 1. Representación esquemática de un herpesvirus¹⁰

El genoma presenta secuencias de ADN reiteradas o repetitivas, ubicadas generalmente en los extremos y en algunas especies también internamente, lo que hace que el mismo se divida en dos secciones únicas denominadas UL (grande) y US (pequeña). Las secuencias repetitivas que rodean a UL o a US se invierten en el proceso de replicación y esto lleva a que se produzcan isómeros diferentes al genoma original, con alto grado de variación en su composición y organización, ya sea en orden u orientación de los genes. Los genes de los herpesvirus pueden clasificarse en tres categorías generales: a) los que codifican proteínas con funciones reguladoras en la replicación, b) los que codifican proteínas estructurales y c) genes opcionales que no se encuentran en todos los herpesvirus y no son esenciales para la replicación en cultivos celulares.

Poseen más de 30 proteínas estructurales, entre las cuales seis están presentes en la nucleocápside, dos se asocian al ADN y aproximadamente 12 son las glicoproteínas de la membrana. Algunas, como por ejemplo la glicoproteína E, poseen actividad de receptor para Fc y se une a la IgG, otras intervienen en la regulación del crecimiento en cultivos celulares y en la modulación de la respuesta inmune.

Mecanismo de replicación viral

Debido a la diversidad de especies que integran la familia *Herpesviridae* existen algunas diferencias en la estrategia de replicación de las mismas, sin embargo y, sintéticamente, se expondrán en esta sección las características generales y comunes del ciclo de replicación.

¹⁰ (DCV Melisa Franceschini, 2016)

La primera etapa o **adsorción** se produce cuando las glicoproteínas de la envoltura viral localizan al receptor específico en la membrana de la célula hospedadora. En la mayoría de los alphaherpesvirus esta etapa ocurre en tres fases: 1) se produce la unión lábil entre las glicoproteínas virales y los glicosaminos de las membranas celulares, 2) algunas glicoproteínas de la envoltura viral se unen al heparán sulfato de la matriz extracelular, 3) se produce la unión al receptor propiamente dicho y, en muchos casos, estos receptores son nectinas de la membrana plasmática de la célula infectada. Seguidamente, ocurre la **penetración** mediante la fusión de las membranas viral y celular y, una vez dentro del citoplasma celular, se produce la **decapsidación** al liberarse el complejo ADN-proteína. De esta manera, el ADN llega y penetra al núcleo de la célula deteniéndose inmediatamente la síntesis de macromoléculas de la misma. La **transcripción** del ADN viral se realiza por la acción de la ARN polimerasa II de la célula y se producen tres clases de ARNm de manera secuencial. Estos ARNm se **traducen** en tres tipos de proteínas: las primeras (inmediatamente tempranas) y las segundas (tempranas) son reguladoras y desencadenan la síntesis del tercer tipo de proteínas (tardías) que son las estructurales. Conjuntamente con la transcripción de los ARNm tardíos, la ADN polimerasa específica, codificada por el virus, comienza la **replicación** del ácido nucleico viral cuyas copias se **ensamblan** con las cápsides neoformadas iniciándose el proceso de **maduración**. Este último proceso consiste en que las nucleocápsides se asocian a la membrana nuclear alterada por la acción del virus y salgan por gemación a través de la misma adquiriendo así el tegumento y la envoltura. La maduración finaliza en el aparato de Golgi y retículo endoplásmico donde principalmente se glicosilan las espículas de la membrana. La última etapa es la **liberación** de los nuevos viriones que salen por exocitosis o al producirse la lisis celular (Figura 2).

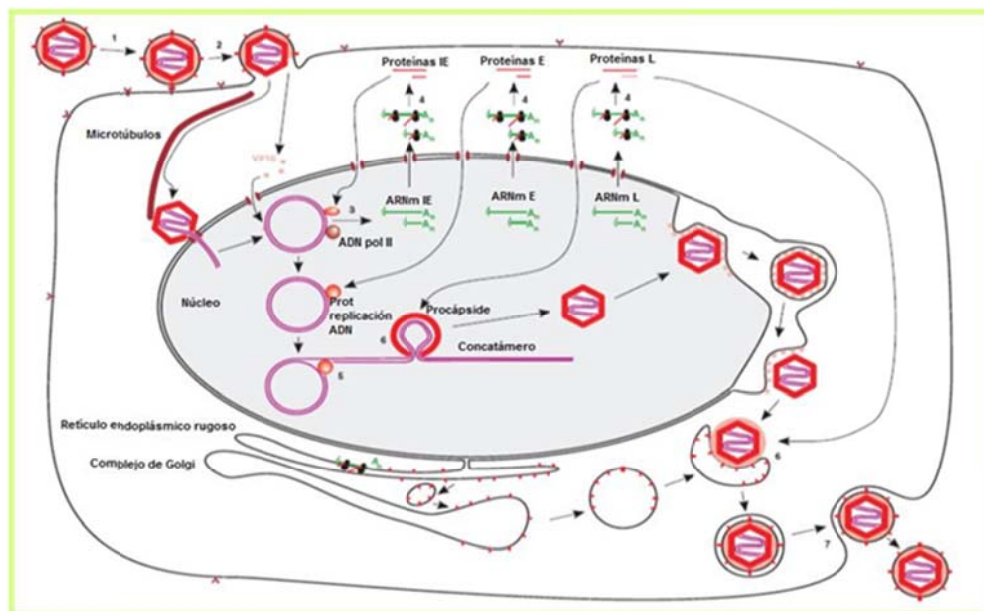


Figura 2. Ciclo de replicación de un herpesvirus: (1) Adsorción (2) Penetración (3) Transcripción (4) Traducción de proteínas inmediatamente tempranas – IE-, tempranas – E- y tardías – L- (5) Replicación (6) Ensamblaje y maduración (7) Liberación¹¹.

¹¹ Modificado de Virology Principles and Applications, Carter J, Saunders V. 2007

Patogénesis viral

La transmisión de los herpesvirus entre los animales está asociada, en general, a aerosoles y contacto de mucosas, principalmente del tracto respiratorio superior, orofacial o genital, aunque también se puede producir, o bien penetrar, a través de la piel. La mayoría de los virus pertenecientes a la subfamilia *Alphaherpesvirinae* producen lesiones localizadas, principalmente en la piel o en la mucosa de las vías respiratorias y genitales; sin embargo, pueden producir focos de necrosis en órganos o tejidos, hecho que sucede más comúnmente en animales con su sistema inmune comprometido. En caso de hembras gestantes, en algunos casos y, debido a la capacidad de estos virus de producir viremia, pueden atravesar la barrera útero-placentaria llegando a producir aborto y observándose zonas necróticas en órganos fetales.

A modo de ejemplo se describen los eventos que suceden en la infección de equinos por *Equidalphaherpesvirus 1* (EHV 1) y de cerdos por *Suidaphaherpesvirus 1* (SuHV 1).

El mecanismo y demás factores involucrados en el ingreso de EHV-1 a la célula, aún no se conocen en su totalidad; sin embargo, se considera a las moléculas del CMH-1 e integrinas como receptores para el mismo. Desde las 12 horas posinfección, el virus se detecta por inmunohistoquímica y por aislamiento viral, en células epiteliales de nasofaringe, tráquea y bronquios. Rápidamente, atraviesa el epitelio respiratorio y se propaga por las células de Langerhans, presentadoras de antígeno de la lámina propia y dentro de las 24 horas posinfección, pueden detectarse células blancas mononucleares infectadas en los nódulos linfáticos del tracto respiratorio. Dentro de este tejido se produce una nueva multiplicación viral y la liberación de leucocitos infectados a la circulación, iniciándose así la viremia asociada a células. Por este mecanismo el virus llega a los sitios de replicación terciaria, como son los endotelios vasculares del útero y del sistema nervioso central (Figura 3). El virus es generalmente eliminado del tracto respiratorio dentro de las tres semanas de la infección primaria y entre 1 a 2 semanas cuando se trata de reinfecciones. El daño local de la mucosa respiratoria predispone a nuevas infecciones producidas por otros agentes infecciosos.

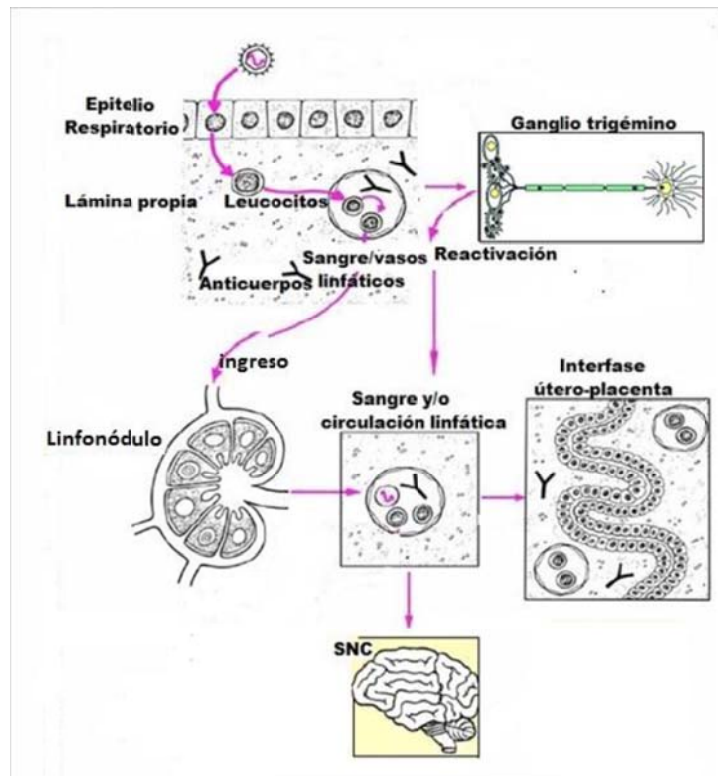


Figura 3. Esquema que ilustra la ruta patogénica del *Equid alphaherpesvirus 1* desde el epitelio respiratorio, su llegada al útero preñado y/o al sistema nervioso central y a su sitio de latencia (ganglio trigémino).

Un aspecto importante de la infección por un alphaherpesvirus, es su capacidad de establecer latencia en las neuronas del hospedador, además de evadir la respuesta inmune. Como la mayoría de los alphaherpesvirus, en el estadio inicial de la infección nasal el virus accede a través de las terminaciones nerviosas y llega a las neuronas del ganglio trigémino, aproximadamente a las 48 horas posinfección. En el estado de latencia, el genoma viral permanece en forma episomal, es decir que no se integra en el genoma de la célula hospedadora. En latencia se produce una represión de la transcripción de los genes virales, excepto del gen LAT (*latency associated transcript*) que regula la transcripción de los genes inmediatamente tempranos inhibiéndose de esta manera la cascada del mecanismo replicativo. El estado de latencia se caracteriza por una expresión prácticamente nula de proteínas virales, evitando que los antígenos virales sean presentados o reconocidos por el sistema inmune del hospedador y, de esta manera, el virus impide el desarrollo de una respuesta antiviral contra neuronas infectadas. En estados de inmunodepresión, asociados generalmente con el estrés causado por infecciones intercurrentes, el transporte, el frío, el hacinamiento, o la administración de fármacos corticoides, se producen reactivaciones periódicas con posibilidades de recurrencias clínicas o sub-clínicas. De esta manera, la eliminación viral por secreciones nasales, orales o genitales proporciona la fuente de infección para otros animales, incluida su descendencia. Si bien no se conocen los eventos moleculares íntimos que conducen a la reactivación viral, algunos desencadenantes de la misma modularían negativamente la expresión del gen LAT y por consiguiente promoverían la transcripción y traducción de genes virales inmediatamente

tempranos, tempranos y tardíos, que conducen a la reactivación del virus y síntesis de viriones capaces de colonizar nuevas células y producir diseminación viral.

La puerta natural de entrada del SuHV-1 es la mucosa respiratoria. Durante las primeras horas del período de incubación, puede ser aislado de faringe, tráquea y posteriormente de pulmón. La replicación primaria ocurre en las células de la mucosa nasofaríngea, para luego acceder a las células del bulbo olfatorio en donde sucede la segunda replicación. La diseminación se realiza luego por los nervios trigémino y glossofaríngeo, a través del axoplasma, hacia la médula y protuberancia. En este período no existe viremia. Al mismo tiempo, las terminaciones nerviosas del trigémino en la cavidad oral y nasal lo transportan al ganglio de Gasser, situado en la protuberancia, provocando una intensa ganglioneuritis. En forma similar y paralela, el virus migra a través de las terminaciones nerviosas de las papilas linguales hacia el núcleo solitario de la médula. Una vez alcanzado el sistema nervioso central, se disemina rápidamente pudiendo encontrarse hasta en los segmentos lumbares y sacrales de la médula espinal. Finalmente, el virus desaparece del cerebro, coincidiendo con la aparición de anticuerpos en la sangre.

Las infecciones producidas por los virus de las subfamilias *Betaherpesvirinae* y *Gammapherpesvirinae* en general, son clínicamente silentes aunque en algunos casos pueden presentar signos clínicos variados.

Respuesta inmune

En infecciones herpéticas se encuentran comprometidos factores innatos y adaptativos de la respuesta inmune. La respuesta innata celular, está mediada por células dendríticas, PMN neutrófilos, macrófagos, NK, así como células más inespecíficas como las de los endotelios y, en este caso particular, células del tracto respiratorio. En estas últimas, recientemente se demostró *in vitro*, que la infección por EHV1 induce la expresión de los PRR de señal, TLR3 y TLR9, involucrados en el reconocimiento de ácidos nucleicos virales. Otros efectores del sistema inmune innato son los interferones, proteínas del sistema del complemento, entre otros, que conjuntamente con los efectores celulares tiene la función de limitar la acción del virus sobre las células en el sitio de replicación primario. También se demostró que la infección por EHV1 modula la respuesta inmune innata en su provecho, induce la disminución de la expresión de CMHI en células del epitelio respiratorio, esencial para el reconocimiento por parte de los LT CD8 citotóxicos. Además modula la expresión de citoquinas pro-inflamatorias como la IL8, fuerte quimiotáctico para células efectoras innatas, neutrófilos y monocitos como los linfocitos de la inmunidad adaptativa. En este sentido se demostró que en células endoteliales inhibe la expresión de INF tipo I. Estudios recientes en la respuesta inmune innata a este virus demostraron que modulan la respuesta según el tipo de célula que infecte. En este sentido se comprobó que en células mononucleares de sangre periférica aumentan la expresión de INF gamma como la expresión de CMHII en contraste con la disminución de los mismos en células del epitelio respiratorio. Estos hechos fortalecen la premisa de la existencia de diferencias célula-específica con respecto al ingreso y replicación viral y expresión de marcadores de superficie.

La inmunidad adaptativa es específica contra el virus, mediada por los LB o LT e incluye una respuesta humoral que previene la infección y una respuesta celular que desencadena mecanismos efectores específicos. Dentro de los mecanismos de la respuesta inmune adaptativa que se produce, se encuentran la actividad proliferativa de LT CD4, LT CD8 citotóxicos virus específicos y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos en circulación sistémica. A nivel local, en la mucosa nasofaríngea, la IgA, de alta eficiencia, cumple su función neutralizante no inflamatoria. Pese a los mecanismos inmunológicos mencionados, la respuesta inmune que se genera es de corta duración, el título de los anticuerpos se encuentra elevado pero no por mucho tiempo y están dirigidos, principalmente, contra las glicoproteínas de la envoltura viral.

Los herpesvirus, desarrollaron además sofisticados mecanismos para evitar ser eliminados mediante la respuesta inmune del hospedador, como por ejemplo disminuir la expresión de proteínas del CMH I, evitar la lisis mediada por células NK, permanecer quiescentes dentro de neuronas y linfocitos mediante el desarrollo de latencia y evitar que las células infectadas mueran por apoptosis.

Profilaxis y control

Durante el curso de la infección por herpesvirus los diferentes antígenos virales actúan como inmunógenos capaces de inducir una respuesta inmune que habitualmente debería proteger de futuras reinfecciones por el mismo virus. Sin embargo y debido a la característica patogénica de los herpesvirus, para controlar la infección o reinfección con una vacuna totalmente efectiva se debería lograr también que la misma sea capaz de prevenir el establecimiento de la latencia y la posterior reactivación. En general, para la prevención y control de infecciones herpéticas en veterinaria, las vacunas que se utilizan son inactivadas, aunque existen algunas atenuadas. Las vacunas inactivadas si bien son seguras porque carecen de virus activo, presentan el inconveniente de inducir una respuesta inmune de corta duración, lo que exige la repetición de dosis. Las vacunas atenuadas se suelen utilizar en algunos países para erradicación de la enfermedad en un área endémica específica. Sin embargo, se considera que las vacunas atenuadas deben ser utilizadas con precaución ya que muchas veces la cepa viral contenida en la misma puede revertir su patogenicidad, sumado a la posibilidad de que se produzca interacción génica del virus vacunal con cepas de campo. Para algunas enfermedades producidas por herpesvirus se desarrollaron vacunas usando tecnología basada en biología molecular, algunas de ellas se encuentran en el mercado y otras están en fase experimental.

Se citan a modo de ejemplo las vacunas más comunes utilizadas en medicina veterinaria.

Rinoneumonitis y aborto equino

El objetivo de la vacunación es el de proteger a los equinos de la enfermedad respiratoria y del aborto. La vacunación no evita la infección pero disminuye la severidad de los signos clínicos y la convalecencia. La vacunación en Argentina es voluntaria y sólo están permitidas las vacunas inactivadas que se aplican, según los protocolos comerciales, a potrillos recién

destetados y a hembras gestantes y, de acuerdo al estatus sanitario de cada establecimiento en particular, se refuerza al resto de los animales supeditado al movimiento o ingreso de animales o a la presencia de condiciones estresantes. La vacuna inactivada cumple con el propósito de evitar o disminuir la enfermedad, por lo tanto reduce la incidencia y la duración de los signos clínicos y el periodo de eliminación viral. La protección humoral que logran las vacunas inactivadas protege contra los virus libres en sangre, no así durante la viremia asociada a glóbulos blancos, como se da en este tipo de virus. Es por eso que algunas partículas virales pueden llegar al feto, produciéndose el aborto, o al sistema nervioso central y afectar los endotelios vasculares y producir signos nerviosos por hipoxia o anoxia del tejido afectado. La vacuna ideal no sólo debería estimular la producción de anticuerpos sistémicos sino también en la mucosa respiratoria, puerta de entrada del virus, para evitar la infección, así como también promover una respuesta inmune celular protectora. Actualmente, se encuentran en fase de experimentación vacunas elaboradas con proteínas recombinantes y vacunas a ADN.

Rinotraquítis infecciosa bovina, aborto bovino y meningoencefalitis

La profilaxis y el control se realizan por vacunas inactivadas, atenuadas y producidas por ingeniería genética. Como *Bovine alphaherpesvirus 1* y 5 (BoHV 1 y 5) comparten el 85 % de homología de ADN genómico, la vacunación realizada en zonas endémicas confiere protección cruzada contra ambos virus. Por este motivo es complicado realizar programas específicos de control para cada uno de estos agentes virales. En Argentina, sólo se permite el uso de vacunas inactivadas que son formuladas en distintas presentaciones: vacunas bivalentes (combinada con el virus de la diarrea viral bovina) y vacunas polivalentes (combinadas con los virus de la diarrea viral bovina y Parainfluenza 3, *Moraxella*, *Pasteurella* u otros). Estos inmunógenos estimulan una respuesta humoral efectiva pero con bajos títulos de anticuerpos y de corto plazo. En Argentina, las vacunas elaboradas con cepas virales con genes específicos suprimidos por ingeniería genética (vacunas deleteadas¹²), que permiten la diferenciación entre la infección por BoHV 1 y 5, aún se encuentran en fase experimental.

Pseudorrabia porcina (Enfermedad de Aujeszky)

La profilaxis a nivel mundial se realiza con la utilización de vacunas inactivadas, atenuadas y deleteadas (gI o gE negativas). Numerosas experiencias demostraron que la vacunación reduce los signos clínicos de la enfermedad, por lo tanto letalidad y eliminación viral, aunque no previene la replicación viral. La protección inducida depende de varios factores como lo son la cepa viral utilizada, la vía de administración, adyuvantes utilizados, el programa de vacunación empleado y

¹² Vacunas deleteadas: vacunas elaboradas con cepas virales a las que mediante ingeniería genética se les suprimió un gen específico que no modifica su capacidad de replicación pero permite diferenciar animales vacunados de aquellos infectados naturalmente

el nivel de anticuerpos maternos que presentan los lechones en el momento de la vacunación. Actualmente se encuentra en estudio por el SENASA, dentro del marco de la campaña de erradicación de la enfermedad, el uso de vacunas gE negativa inactivada. La nueva normativa en estudio indica que los cerdos que ingresen a establecimientos nacionales deben contar con la certificación correspondiente que acredite libre de la enfermedad con o sin vacunación. La utilización de este tipo de vacunas, combinada con las pruebas serológicas para la detección de anticuerpos contra un gen suprimido, permite diferenciar animales naturalmente infectados de aquellos que fueron vacunados. La diferenciación se basa en la ausencia de anticuerpos en los animales vacunados a una glicoproteína específica del virus de campo, que no se encuentra en la vacuna.

Rinotraqueítis y aborto canino. Rinotraqueítis y queratoconjuntivitis felina

Las vacunas de uso en canino se desarrollaron principalmente para la prevención de los trastornos reproductivos. Existen vacunas inactivadas, atenuadas y a subunidades que se utilizan mayormente en países europeos. En Argentina, no están disponibles comercialmente y algunos criaderos utilizan vacunas importadas.

La vacunación de felinos también reduce la severidad de los signos clínicos pero no previene la infección. En Argentina, la vacunación es voluntaria y se utiliza una vacuna combinada con calicivirus y virus de la panleucopenia felina.

Pruebas diagnósticas

El diagnóstico de infección producido por herpesvirus se realiza utilizando la técnica de oro (aislamiento viral), técnicas complementarias y técnicas serológicas para detección de anticuerpos. El aislamiento viral se realiza de acuerdo a la metodología convencional utilizada en virología, a partir de muestras representativas de los signos clínicos observados y enviadas por el médico veterinario al laboratorio: hisopados nasofaríngeos, hisopados conjuntivales, órganos de fetos abortados, sangre recolectada con anticoagulante, etc. Las muestras deben ser extraídas en forma estéril y transportadas, refrigeradas, en el menor tiempo posible para que lleguen al laboratorio en condiciones de ser procesadas. El diagnóstico positivo luego de la preparación e inoculación de las mismas sobre líneas celulares específicas, se logra al producirse la observación de efecto citopatogénico característico (Figura 4). La identificación del agente viral se realiza utilizando pruebas directas como virusneutralización o inmunofluorescencia. Como técnica complementaria puede realizarse la técnica de PCR que permite amplificar una porción genómica viral determinada.

El diagnóstico indirecto o serológico se realiza por la técnica de seroneutralización que permite detectar anticuerpos contra las glicoproteínas de la envoltura viral. Teniendo en cuenta que los herpesvirus producen infecciones latentes y pueden reactivarse en determinados momentos estimulando la respuesta inmune, deben analizarse muestras pareadas, es decir tomadas con 15-20 días de intervalo entre la primera y la segunda para interpretar correctamente

el diagnóstico. La detección de un incremento de cuatro veces o más del título de anticuerpos entre la primera y segunda muestra, es una confirmación serológica de infección reciente. Los resultados de las pruebas realizadas con sueros de una toma individual no pueden ser interpretados con seguridad, es por eso que para la mayoría de las infecciones herpéticas la detección de anticuerpos no siempre confirma una infección aguda. Es necesario contar con una buena anamnesis y, en algunas oportunidades, utilizar otras técnicas complementarias como los estudios histológicos o la técnica de PCR a partir de muestras de tejidos.

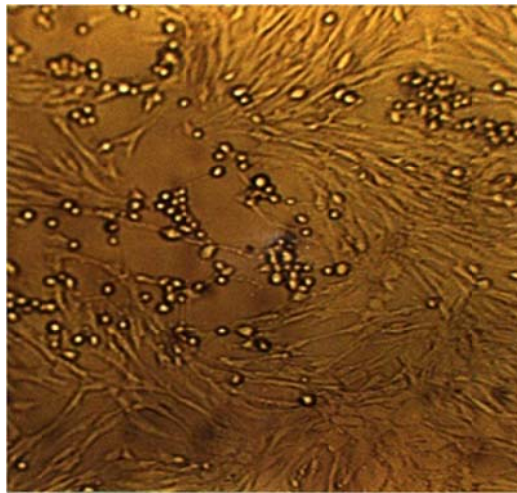


Figura 4. Monocapa de células de cultivo primario de riñón de feto equino, infectada con un alphaherpesvirus. Se observa el efecto citopático característico: aumento de la refringencia celular y lisis.

Referencias

- Allen GP, Slater JD, Smith KC. Equid herpesvirus-1 (EHV-1) and -4 (EHV-4) infections. En: Coetzer JAW, Tustin RC. 2004. Infectious diseases of Livestock. Cape Town; Oxford Press, pp. 829-59
- Carter JB, Saunders VA. Herpesviruses (and other dsDNA viruses). En: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, 2007. Virology: Principles and Applications, 5th edition. West Sussex, England; John Wiley & Sons Ltd, pp. 121-36
- Dunowska M. A review of Equid herpesvirus 1 for the veterinary practitioner. Part A: clinical presentation, diagnosis and treatment. Part B: pathogenesis and epidemiology. New Zealand Vet J. 2014; 62(4):171-88.
- Evermann JF, Ledbetter EC, Maes RK. Canine reproductive, respiratory, and ocular diseases due to canine herpesvirus. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2011; 41(6):1097-120.
- MacLachlan J, Duvovi E. 2011. Herpesvirales. En: Fenner's Veterinary Virology, 4th edition. New York; Academic Press, pp. 179-201
- Pomeranz LE, Reynolds AE, Hengartner CJ. Molecular biology of pseudorabies virus: impact on neurovirology and veterinary medicine. Microbiol Mol Biol Rev. 2005; 69(3):462-500.
- Raaperi K, Orro T, Viltrop A. Epidemiology and control of bovine herpesvirus 1 infection in Europe. Vet J. 2014; 201(3):249-56.
- Soboll Hussey G, Ashton LV, Quintana AM, Van de Walle GR, Osterrieder N, Lunn DP. Equine herpesvirus type 1 pUL56 modulates innate responses of air way epithelial cells. Virology. 2014; 464:76-86.
- Thomasy SM, Maggs DJ. A review of antiviral drugs and other compounds with activity against feline herpesvirus type 1. Vet Ophthalmol. 2016; 19 Suppl 1:119-30.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de La Plata, a la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires y al CONICET por la formación brindada y el apoyo recibido.

CAPÍTULO 4

Orthomyxovirus

Guillermo H. Sguazza, María E. Bravi

El agente causal de la Influenza también conocida como Gripe, es un virus perteneciente al género *Influenzavirus* tipo A, que se clasifica taxonómicamente dentro de la familia *Orthomyxoviridae*, antiguamente denominada mixovirus, que englobaba tanto a los orthomyxovirus como a los paramyxovirus en alusión al tropismo respiratorio de estos virus (*myxos* del griego, mucosas). En la actualidad, según el Comité Internacional de Taxonomía Viral (ICTV) los orthomyxovirus constituyen una familia independiente compuesta por 6 géneros: *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B*, *Influenzavirus C*, *Influenzavirus D*, *Quaranjavirus*, *Thogotovirus* e *Isavirus*. Esta familia se caracteriza por tener un genoma segmentado formado por ARN de simple cadena con polaridad negativa y un complejo de ARN polimerasas encargadas de sintetizar los ARNm, sin mediar ningún estadio de su ciclo viral en el que el ARN sea copiado a ADN, lo que coloca a estos virus dentro del Grupo V de la clasificación Baltimore.

Los virus de los géneros *Quaranjavirus* y *Thogotovirus* pueden infectar tanto artrópodos como vertebrados, incluyendo al hombre; producen estados febriles y encefalitis y se aislaron en África, sur de Europa, Rusia, Egipto y la India. Se caracterizan por ser los únicos miembros de esta familia capaces de ser transmitidos a través de vectores (garrapatas), los restantes se transmiten por vía aérea.

El género *Isavirus*, posee una única especie que causa la Anemia Infecciosa del Salmón, una enfermedad que afecta severamente centros de cultivo de estos peces principalmente en Canadá, Noruega, Escocia y Chile provocando importantes pérdidas económicas.

Los integrantes del género *Influenzavirus*, poseen componentes antigénicos cuya identidad química y funcional los caracteriza. Uno de ellos es la nucleoproteína (NP), cuyas diferencias antigénicas permiten clasificarlos en los cuatro géneros ya citados (A, B, C y D). Los virus de los géneros *Influenzavirus B* y *C* son patógenos predominantemente para los humanos, aunque también se aislaron de focas y cerdos respectivamente. Los virus del género *C* y *D* son genéticamente muy diferentes a los de los géneros *A* y *B*, sólo ocasionan infecciones respiratorias muy leves o incluso sin signos, no causan epidemias y no tienen gran impacto en la salud pública. Los virus del género *A* presentan un espectro de hospedadores más amplio y

se aislaron de diversas especies que incluyen: humanos, equinos, porcinos, mamíferos marinos y aves domésticas y salvajes. Los Influenzavirus del tipo A pueden ser divididos en diferentes subtipos de acuerdo a la composición de sus antígenos de superficie: hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). Hasta la fecha, se identificaron 18 subtipos de HA (denominados H1, H2, ..., H18) y 11 subtipos de NA (N1, N2, ..., N11). La mayoría de las combinaciones posibles de estos subtipos se aislaron a partir de diferentes especies de aves, por lo tanto, se considera que las aves silvestres especialmente los patos, gansos y gaviotas, componen el reservorio natural de estos virus y aunque por lo general no suelen ser patógenicos para sus hospedadores naturales, presentan alta morbilidad y mortalidad al ser transmitidos a otras especies.

Teniendo en cuenta el gran número de subtipos y cepas posibles, el sistema de nomenclatura para los virus Influenza debe incluir: género, hospedador, origen geográfico, número de cepa (si realizó más de un aislamiento en el mismo laboratorio) y año, por último, se descripción antigénica de HA y NA entre paréntesis. Algunos ejemplos son: Influenza A/Chicken/Hong Kong/220/97 (H5N1), Influenza A/Duck/Hokkaido/67/96 (H5N4), Influenza A/Swine/Indiana/12439/00 (H1N2).

Morfología y propiedades fisicoquímicas

Los *Influenzavirus* son pleomórficos. Cuando se observan con microscopio electrónico tienen forma esférica con tamaño entre 80-120 nm; en algunos casos presentan forma filamentosa de 300 nm de longitud aproximadamente. Son virus envueltos y en su superficie presentan proyecciones con una longitud de longitud de 10-14 nm y 4-6 nm de diámetro. El virión posee un peso molecular aproximado de 250×10^6 Da, densidad de flotación en gradientes de sacarosa de $1,2 \text{ g.cm}^{-3}$ y su coeficiente de sedimentación es de aproximadamente 700-800 S (para las formas no filamentosas).

La partícula viral es muy sensible a solventes orgánicos capaces de degradar su envoltura (especialmente éteres y alcoholes), también lo es al tratamiento con detergentes no iónicos, formaldehído, agentes oxidantes, ácidos diluidos, dodecil sulfato sódico (SDS), sales derivadas de amonio cuaternario, etc. Su capacidad infectiva se reduce luego de la exposición al calor, radiaciones ionizantes, condiciones de pH extremo, medios no isotónicos y deshidratación. En condiciones de campo, el virus está protegido por las secreciones nasales y en algunos casos las heces, lo resguardan de la desecación y otros factores ambientales pudiendo mantener su capacidad infectiva por períodos de hasta 10 días.

Estructura y composición del virión

La partícula viral está constituida por la nucleocápside de naturaleza proteica, dentro de la que se encuentra el genoma viral, constituido por ocho segmentos de ARN de cadena simple y

polaridad negativa, los cuales se enumeran de acuerdo con su tamaño. Los segmentos 1 y 2 son los que poseen mayor longitud (ambos de 2431 nucleótidos) mientras que el segmento 8 (890 nucleótidos) es el más pequeño. El tamaño aproximado del genoma es de 13.600 nucleótidos.

Cada uno de los segmentos está recubierto por nucleoproteínas (NP), codificadas en el segmento 5, formando una combinación compleja de ribonucleoproteínas (RNPs) con estructura helicoidal que estabilizan y protegen al ARN genómico. Dentro de las RNPs se encuentran tres enzimas (PB2, PB1 y PA), codificadas por los segmentos 1, 2 y 3 respectivamente, que actúan en forma conjunta y tiene actividad de ARN polimerasa. La envoltura del virus está constituida por dos capas, una externa de naturaleza lipídica, derivada de la membrana citoplasmática de la célula hospedadora, que le confiere al virus su aspecto pleomórfico y una capa interna, formada por una proteína de origen viral codificada en el segmento 7, denominada proteína de matriz (M1) que provee estabilidad estructural y es el componente mayoritario de la estructura del virión (llegando a representar el 35 % del total de las proteínas virales). En la superficie externa del virus, se encuentran dos tipos de peplómeros o espículas de glicoproteína, denominadas hemaglutinina (HA) y neuranimidasa (NA), ambas codificadas en los segmentos 4 y 6 respectivamente.

La mayoría de los segmentos del genoma viral codifican una única proteína con excepción de los 7 y 8 que pueden codificar dos proteínas, por *splicing* alternativo de los ARNm correspondientes. El segmento 7, codifica la M1 y una proteína integral de membrana denominada M2 presente en la superficie externa del virus, que actúa como canal iónico y es esencial para la replicación del virus *in vivo*.

El segmento 8 codifica dos proteínas no estructurales NS1 y NS2; ambas se encuentran abundantemente en las células infectadas (NS1 en el núcleo y NS2 en el citoplasma). Si bien NS1 no es incorporada dentro del virión durante el ensamblaje, NS2 puede aparecer en el virus en pequeñas cantidades. NS1 actúa principalmente como reguladora de la replicación y tiene la capacidad de bloquear la respuesta inmune mediada por el sistema del INF dentro de las células infectadas. La proteína NS2 (al igual que NS1) actúa como una señal de regulación de la transcripción y también está involucrada en la exportación del complejo de RNPs desde el núcleo al citoplasma mediante su interacción con la proteína M1 durante la fase tardía del ciclo viral. En algunas cepas del virus, el segmento 2 contiene un marco de lectura alternativo capaz de producir una pequeña proteína de 87 aminoácidos denominada PB1-F2, y si bien su rol en el ciclo viral aún no está bien comprendido, se sabe que está involucrada con la virulencia, alterando la membrana mitocondrial ocasionando la muerte celular.

HA es una glicoproteína que permite la unión de los viriones a receptores específicos presentes en la superficie de los glóbulos rojos, en los que produce un efecto de aglutinación (por el cual recibe su nombre). También es responsable de la adhesión del virus a la célula hospedadora en el comienzo del ciclo viral; la composición de aminoácidos y glúcidos de la molécula de HA determina el tropismo y el rango de hospedadores del virus. Una vez sintetizada esta proteína, una señal de direccionamiento la exporta hacia la membrana de la célula infectada donde sufre una serie de modificaciones post-traduccionales hasta alcanzar la constitución de la proteína madura.

NA es una glicoproteína con actividad enzimática que actúa como una sialidasa capaz de hidrolizar las moléculas de ácido siálico o N-acetilneuramínico, componente esencial de los receptores celulares. Su principal función es facilitar tanto la entrada como la liberación del virus, escindiendo la unión que se establece entre el ácido siálico del receptor de la célula hospedadora y un azúcar adyacente de la HA del virus, lo que permite que la progenie viral escape de la célula una vez concluido el ciclo viral y se disemine a otras células.

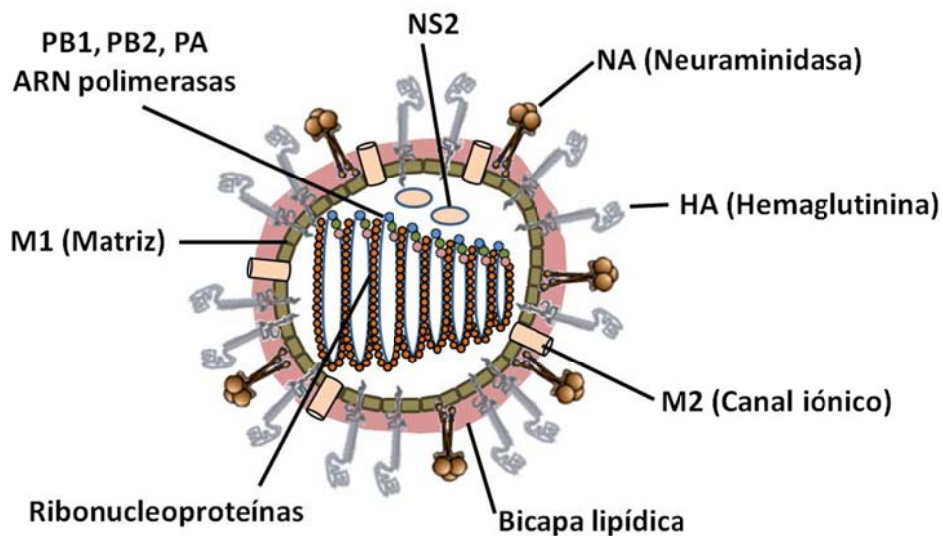


Figura 1. Representación esquemática del virus de influenza

Replicación

HA cumple un rol esencial al comienzo del ciclo viral participando en la adhesión del virus, al ácido siálico de los receptores superficiales de las células epiteliales hospedadoras, facilitando la entrada de la partícula viral por endocitosis. Una vez dentro del endosoma, la HA sufre un cambio conformacional debido a las condiciones de pH bajo, que induce la fusión de la membrana viral y endosomal. Por la acción transportadora de iones de la proteína M2, un flujo de protones ingresan en la partícula viral ocasionando un cambio en la estructura de la proteína M1 provocando la disociación de la nucleocápside y la liberación de los complejos de RNPs en el citoplasma, que posteriormente son direccionados al interior del núcleo por secuencias específicas presentes en la proteína NP. Una vez en el núcleo, utilizando como molde el ARN viral (ARNv) de polaridad negativa, el complejo de polimerasas (en especial la proteína PB1) inicia la síntesis de dos tipos diferentes de ARNs de polaridad positiva: el ARN complementario (ARNc) que luego será utilizado como molde para la replicación del genoma y los ARNm destinados a la expresión de las distintas proteínas virales.

La proteína PB2 es la responsable de un proceso denominado *CAP-Snatching* por medio del cual el CAP (una corta secuencia de nucleótidos modificados ubicada en el extremo 5' de los mensajeros eucariotas, esencial para el inicio de la traducción) es quitado de los ARNm celulares y luego colocado en los ARNm virales; al mismo tiempo la proteína NS1 se une a los mensajeros celulares poliadenilados e impide su exportación al citoplasma, de esta manera la acción conjunta de PB2 y NS1 inhabilitan a los mensajeros celulares a utilizar la maquinaria traduccional de la célula hospedadora, favoreciendo la producción de las proteínas virales. Luego de ser sintetizados, los distintos ARNm virales son exportados al citoplasma para su traducción. Las proteínas HA, NA y M2 que poseen señales de direccionamiento al retículo endoplasmático pasan a través del sistema de Golgi donde sufren una serie de modificaciones post-traduccionales y finalmente se depositan en la membrana celular. Las demás proteínas virales después de ser formadas en el citoplasma regresan al núcleo donde actúan como moduladoras del ciclo viral, en una serie de pasos sucesivos: en primer lugar la acumulación de la proteína NP en el núcleo estimula la actividad de la polimerasa PA (involucrada en la replicación del genoma), a medida que se producen nuevas copias de ARNv se unen a PB1, PB2, PA y NP para formar complejos de RNPs.

El aumento de la concentración de NS1 en el núcleo inhibe el *splicing* de los segmentos 7 y 8 lo que favorece la producción de mayores cantidades de M1 y de la propia NS1. Cuando la concentración de M1 en el núcleo alcanza valor crítico, se une a las RNPs formando la nucleocápside del virus; por otro lado, la unión de NS2 a la nucleocápside activa un mecanismo de exportación hacia la membrana apical por donde el virus recientemente formado sale por gemación, quedando envuelto por una bicapa lipídica en la que se hallan las proteínas de membrana (HA, NA y M2).

Finalmente, la actividad sialidasa de la NA desprende la partícula viral evitando la formación de posibles agregados del virus que se pueden ocasionar en la membrana celular debido a la afinidad de la HA por los receptores de ácido siálico, permitiendo que la progenie viral sea liberada y se pueda dispersar.

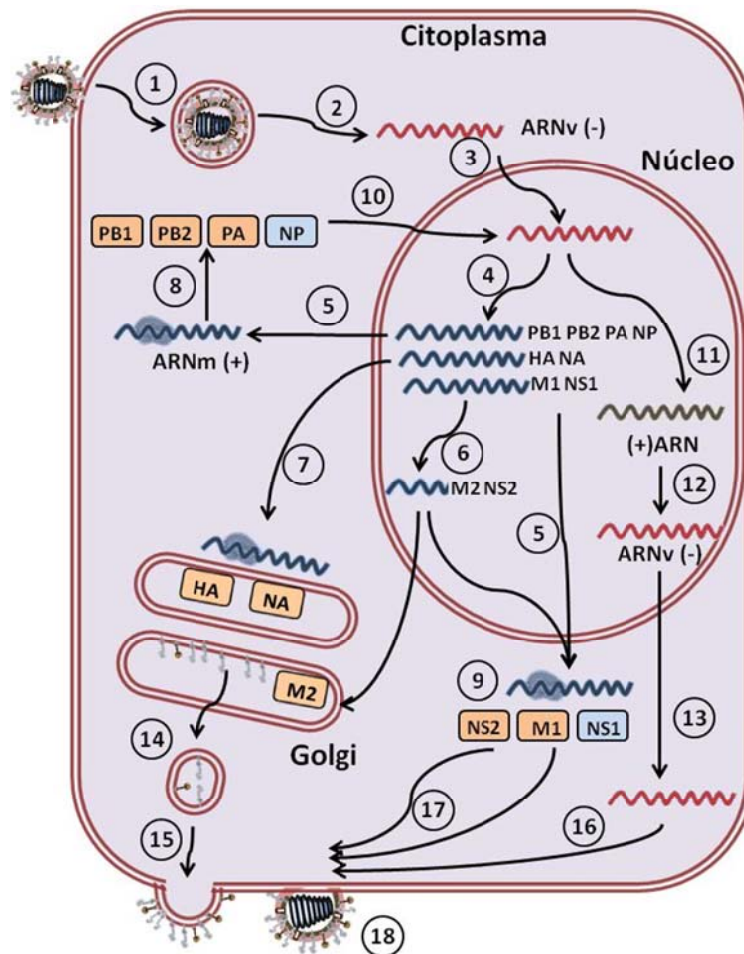


Figura 2: Esquema del ciclo viral. El virus entra por endocitosis (1), las nucleocápsides virales se liberan en el citoplasma (2) y son transportadas al núcleo (3). El ARNv (-) es copiado a ARNm (+) por las polimerasas virales (4). Los ARNm son transportados al citoplasma (5) se produce el *splicingen* en el caso de los ARNm de NS2 y M2 (6). Los ARNm de las proteínas de membrana (HA, NA y M2) son traducidos en el retículo endoplasmático (7) y los demás en el citoplasma (8 y 9). PA, PB1, PB2 y NP se importan al núcleo (10) y allí catalizan la síntesis de más moléculas de (+) ARN (11) y (-)ARNv (12). La acumulación de NS2 induce la exportación de las nucleocápsides al citoplasma (13). Las proteínas HA y NA son exportadas a la superficie celular (14) y se incorporan en la membrana plasmática (15). Las nucleocápsides asociadas a M1 (16) y NS2 (17) se transportan a la superficie celular donde se ensamblan los viriones (18).

Variación antigénica

La diversidad genética de los virus del tipo A está favorecida principalmente por la estructura segmentada de su genoma y la capacidad de multiplicarse en muchas especies animales. Por otro lado, la mayoría de los virus con genoma de ARN tienen elevadas tasas de mutación lo que provoca la acumulación de mutaciones puntuales en cada ciclo replicativo que se reflejan como pequeños cambios en las proteínas virales. Si estos cambios afectan los antígenos de superficie del virus (*drift* antigénico) la cepa resultante puede adquirir la capacidad de propagarse aun en una población vacunada, pero como estos cambios son poco pronunciados (dos o tres sustituciones de

aminoácidos por año) estas cepas tienden a causar brotes localizados pero no suelen provocar grandes epidemias o epizootias ya que sigue existiendo un grado de protección vacunal o de contacto previo.

Las variaciones antigénicas de mayor importancia, se producen por reordenamientos del genoma viral durante el proceso denominado *shift* antigénico. Cuando una misma célula es infectada simultáneamente por dos virus diferentes, los viriones resultantes pueden contener mezclas de los genes de los virus parentales, añadiéndole a esta propiedad la habilidad del virus influenza para infectar diferentes tipos de hospedadores, se puede originar un gran número de nuevas cepas con composiciones genéticas muy diferentes. Si estos cambios se dan en los genes que codifican la HA, la NA o ambas a la vez, la cepa resultante del reordenamiento tendrá una ventaja selectiva frente al sistema inmune de la población, ya que la inmunidad previa mediada por anticuerpos dirigidos hacia esos antígenos, será relativamente ineficaz. De esta manera, el *shift* antigénico puede causar grandes epidemias o epizootias de Influenza A caracterizadas por una aparición repentina y que pueden ser ampliamente extendidas por todo el mundo aun en individuos previamente vacunados.

Patogénesis viral

La patogenicidad y la virulencia del virus están determinados por factores dependientes del hospedador como puede ser la presencia de receptores adecuados en la célula hospedadora, la presencia de enzimas celulares que permitan la entrada y replicación viral, el estado de inmunocompetencia y la habilidad del sistema inmune para controlar la replicación viral con escasos daños colaterales que puedan estar asociados a la respuesta inflamatoria. También existen factores dependientes del virus, que incluyen la habilidad que poseen para unirse a la célula hospedadora, la restricción del efecto citopatogénico y la evasión a la respuesta inmune mediante la variación genética inducida por la presión selectiva ejercida por la respuesta inmune. Los genes codificantes de las proteínas HA, NA, PB1 y NS están asociados con la patogenicidad del virus; los genes codificantes de las proteínas HA, NA y PB1 también determinan la transmisibilidad de las cepas de influenza.

Respuesta inmune

La primera barrera de defensa ante la infección por el virus influenza es la capa mucosa que cubre el tracto respiratorio. Si el virus logra superarla con éxito, comienza a replicar en las células del epitelio respiratorio. Al comienzo de la infección por el virus de influenza, se origina rápidamente una respuesta inmune innata. Durante este proceso las células infectadas liberan citoquinas y quimiocinas que movilizan distintas células del sistema inmune innato (macrófagos residentes,

células dendríticas, leucocitos, monocitos y células NK). Estas células cuentan con diversos tipos de receptores que permiten la detección tanto de moléculas propias ausentes, disminuidas o alteradas así como PAMPs reconocidos por medio de PRRs. En el caso del virus de la gripe, los principales PRRs son TLR-7, TLR-8 y RIG-1 que reconocen las moléculas de ARN de simple cadena del virus y TLR-3 que reconoce ARN de doble cadena que se forma durante la replicación del virus. La estimulación de estos TLRs induce la producción de INFs tipo I y una de sus funciones es incrementar la expresión de moléculas del CMH I y II en células dendríticas y solo CMH I en las células infectadas. Si bien la respuesta innata (tanto celular como humoral) no es capaz de detener por completo la infección viral, puede retardar la replicación viral dándole tiempo a la activación de la respuesta adaptativa.

En los órganos linfáticos secundarios, los LT CD8 citotóxicos reconocen péptidos antigénicos producto del procesamiento de proteínas internas del virus (especialmente NP y M1) en el contexto del CMH I y se activan.

Conjuntamente los LTh1 CD4 secretan IL-2 e IFN γ que completan la activación e inducen la proliferación de los LT CD8 citotóxicos. Así activados, reconocen los mismos péptidos antigénicos que los activaron, pero ahora sobre las células infectadas y las eliminan induciendo muerte por apoptosis. Esta representa la principal defensa del sistema inmune contra el virus de la gripe ya que tienen la capacidad de proporcionar protección contra nuevas cepas de influenza.

Los LB activados por el reconocimiento de epítopes específicos del virus son estimulados por IL-4 e IL-5 liberadas por LT CD4 folicular. Las células plasmáticas derivadas de estos LB son capaces de producir anticuerpos específicos contra las proteínas externas del virus (especialmente HA y NA). Aunque los anticuerpos no cumplen un papel preponderante durante las infecciones primarias con nuevas cepas del virus, la presencia de anticuerpos con algún grado de reactividad cruzada contra el virus, también pueden contribuir, en parte, a detener la infección más rápidamente.

Por su parte el virus de la influenza tiene la capacidad de evadir al sistema inmune del hospedador a través de diversas estrategias. En primer lugar el virus de la gripe es capaz de producir partículas virales defectivas, que conservan los determinantes antigénicos de superficie que pueden neutralizar algunos anticuerpos circulantes. También se demostró que la proteína NS1 tiene la capacidad de bloquear la respuesta inmune mediada por INF dentro de las células infectadas. Sin embargo, la mejor estrategia que utiliza el virus para eludir al sistema inmune es mediante la producción de cambios antigénicos menores (*drift*) o mayores (*shift*) en sus proteínas de superficie. Las cepas resultantes de estos cambios antigénicos tendrá una ventaja selectiva frente al sistema inmune de la población, ya que la inmunidad previa mediada por anticuerpos dirigidos hacia esos antígenos, será relativamente ineficaz.

Epidemiología

Las aves migratorias son el reservorio principal de la Influenza A. El virus replica en el epitelio intestinal de las aves sin producir una enfermedad manifiesta y es excretado en altas

concentraciones en las heces. Por lo tanto, el virus se transmite por vía fecal-oral. Las aves acuáticas migratorias tienen la capacidad de transportar el virus, propagándolo incluso entre continentes. Las infecciones cruzadas ocurren esporádicamente, entre aves y mamíferos, incluidos entre estos los cerdos, equinos, visones, mamíferos marinos y humanos. En cambio, la llegada de influenza A de las aves silvestres a las de corral, ocurre de manera mucho más frecuente. Los cerdos domésticos son considerados como un importante hospedador intermediario en aquellas partes del mundo donde es frecuente el contacto entre las aves y estos animales.

La implementación de cambios en las prácticas de agricultura que mantengan separados a los cerdos y aves de corral de aves silvestres pueden ayudar para impedir la transmisión y con ello la evolución progresiva de algunas variantes del virus de influenza, pero estos enfoques muchas veces son difíciles de aplicar y se convierte en una amenaza de epidemias de influenza humana que surgen de los reservorios de aves o mamíferos.

Influenza equina

La influenza equina es una enfermedad clínica que afecta a caballos, asnos y mulas y hoy en día es el principal agente causal de enfermedades respiratorias en équidos en todo el mundo. De todos los subtipos posibles, sólo se identificaron dos que son capaces de infectar equinos. El subtipo 1, denominado H7N7, cuyo prototipo es la cepa europea que fue aislada inicialmente en Checoslovaquia en el año 1956 y posteriormente en muchos países de Europa y América, pero no se volvió a aislar desde la década del 80 y en la actualidad sólo presenta casos subclínicos. Por este motivo, el comité de vigilancia epidemiológica de la OIE recomendó no incluir este subtipo en la formulación de nuevas vacunas.

El subtipo 2 del virus de la influenza equina (H3N8) es de origen americano y se aisló por primera vez en el año 1963, durante una gran epizootia de esta enfermedad ocurrida en la ciudad de Miami. La cepa causante denominada influenza A/equine/Miami/63(H3N8) fue introducida a los Estados Unidos a través de caballos importados desde Argentina. Luego la infección se diseminó por toda Europa y a partir de entonces la población equina de todas partes del mundo sufrió varias epizootias de influenza. En nuestro país hubo una gran epizootia en el año 1985 provocada por el subtipo 2 y actualmente existe una ley que establece la vacunación obligatoria de caballos de competición, que seguramente contribuyó en la prevención de nuevas epizootias.

Con el transcurso del tiempo el subtipo H3N8, se dividió en dos linajes uno de origen europeo y otro americano que aparentemente evolucionaron independientemente uno del otro y que hoy en día co-circulan en todo el mundo. Actualmente, se recomienda incluir al menos un representante de cada uno de estos linajes en la formulación de la vacuna contra el virus. Aunque los virus de origen equino no son zoonóticos, recientemente se demostró que pueden transmitirse entre equinos y caninos.

Influenza porcina

Existen varios subtipos del virus de influenza que son capaces de infectar a los cerdos, siendo los más importantes: el H1N1, H1N2, H3N2, H4N6 y H5N1. Los subtipos H1N1, H3N2 y H5N1 son considerados zoonóticos. Algunas cepas del subtipo H5N1 incluso pueden presentarse en forma altamente patógena, siendo capaces de causar la muerte tanto en cerdos y humanos como en aves.

Desde el punto de vista epidemiológico, los cerdos son considerados como una “coctelera” debido a la capacidad de poder co-infectarse tanto con cepas de origen aviar como humanas (los cerdos poseen receptores para ambos tipos de virus de influenza) lo que favorece el *shift* antigénico.

En su forma clásica, la enfermedad en cerdos tiene un periodo de incubación de 24-72 horas, la aparición de signos clínicos es abrupta, a menudo comienza en muchos animales de una piara, al mismo tiempo. Los animales afectados presentan fiebre, con apatía, inapetencia, se encuentran amontonados y con resistencia a moverse y signos de dificultad respiratoria: tos paroxística, estornudos, rinitis con secreción nasal. Aunque la mayoría de los cerdos se recuperan rápidamente y sin complicaciones, las consecuencias económicas de la gripe porcina son considerables, por la pérdida de peso que ocasiona.

La gripe porcina es controlada por medidas de vacunación y de bioseguridad. Debido a la cantidad de virus de influenza que actualmente circulan en la población porcina comercial, las vacunas están formuladas con un mínimo de dos antígenos virales diferentes y algunas con tres.

Influenza aviar

Como se mencionó, todos los subtipos conocidos del virus de la influenza A se encontraron en aves (exceptuando a los subtipos H17N10 y H18N11, que hasta el momento solamente fueron hallados en murciélagos).

La mayoría de las cepas aviares suelen ser de baja patogenicidad y no presentan signos clínicos en sus hospedadores. Sin embargo, en los últimos años aparecieron cepas de alta patogenicidad, con nivel de mortalidad que en algunos casos llegan al 100 %. Existen diversas cepas que potencialmente pueden presentar esta característica: los subtipos H5 (en especial el H5N1), los subtipos H7 (en especial el H7N7) y los subtipos H9 (en especial el H9N2). Estos subtipos pueden ser transmitidos por las aves al humano conservando sus características de alta patogenicidad. También existen casos documentados en los que el subtipo H5N1 se transmitió entre aves de corral a cerdos y de estos al hombre con consecuencias fatales.

El aumento de la patogenicidad de estas cepas ocurre por pequeños cambios en la HA (*drift*) que hacen que clivada por proteasas menos específicas (como las furinas) presentes en diversos tipos de órganos o tejidos. Esto aumenta el tropismo del virus, dejando de ser netamente respiratorio para convertirse en sistémico.

Las cepas altamente virulentas de la gripe aviar causan la muerte súbita sin síntomas prodrómicos. Las aves presentan signos respiratorios como tos, estornudos y rales. Por otro lado

también pueden mostrar diarrea, edema de la cabeza y cianosis en la piel sin plumas, además de signos nerviosos tales como temblores de la cabeza y tortícolis.

Debido al gran número de cepas posibles, la vacunación contra la influenza aviar resulta ineficiente o poco práctica. Por lo tanto el control de las infecciones por virus de influenza aviar depende principalmente de medidas de bioseguridad, vigilancia y la despoblación cada vez que se detectan los virus de influenza aviar altamente patógenos. Es fundamental contar con instalaciones que permitan que las aves domésticas no tengan contacto con aves silvestres o cerdos.

Diagnóstico

El diagnóstico clínico de esta enfermedad, en primera medida, se puede establecer en base a la diseminación rápida característica y a los signos clínicos presentes, como son tos seca y fiebre. El diagnóstico de laboratorio desempeña un rol de importancia tanto en el manejo del animal como en el control de brotes. Durante la fase aguda de la enfermedad se puede realizar aislamiento viral a partir de las secreciones respiratorias e identificación empleando la prueba de hemoaglutinación.

Otras pruebas de diagnóstico directo para la detección de antígenos, incluyen inmunofluorescencia o enzimoimmunoensayo. Por otro lado, la reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcripción inversa (RT-PCR), es ampliamente usada en el diagnóstico, tipificación y subtipificación del virus.

Para el diagnóstico serológico o diagnóstico indirecto, se realiza la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación (IHA), para comparar sueros de la fase aguda (al comienzo de la enfermedad) y convaleciente (2 o 3 semanas después de los signos) es necesario tomar muestras pareadas obtenidas con un intervalo de 15 a 20 días entre sí. El diagnóstico de infección se confirma cuando existe seroconversión, con un aumento de tres o cuatro veces del título de anticuerpos entre la 1.^a y la 2.^a muestra.

Referencias

- Alexander DJ. A review of avian influenza in different bird species. *Vet Microbiol.* 2000; 74(1-2):3-13.
- Betts RF, Treanor JJ. Approaches to improved influenza vaccination. *Vaccine.* 2000; 18(16):1690-5.
- Bouvier NM, Palese P. The biology of influenza viruses. *Vaccine.* 2008; 26(4):D49–53.
- Cox NJ, Subbarao K. Global epidemiology of influenza: past and present. *Annu Rev Med.* 2000; 51:407–21
- Flint S, Enquist L, Racaniello V, Skalka A. 2004. *Principles of virology.* 2nd Ed. Washington DC; ASM Press.
- Fouchier RA, Osterhaus AD, Brown IH. Animal influenza virus surveillance. *Vaccine.* 2003; 21(16):1754-7.
- Hale BG, Albrecht RA, Garcia-Sastre A. Innate immune evasion strategies of influenza viruses. *Future Microbiol.* 2010; 5(1):23-41.
- Neumann G, Kawaoka Y. Transmission of influenza A viruses. *Virology.* 2015; 479-480:234-46.
- Tamura S, Kurata T. Defense mechanisms against influenza virus infection in the respiratory tract mucosa. *Jpn J Infect Dis.* 2004; 57(6):236-47.
- Van Reeth K. Avian and swine influenza viruses: our current understanding of the zoonotic risk. *Vet Res.* 2007; 38(2):243-60.
- Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev.* 1992; 56(1):152-79.
- Zambon MC. Epidemiology and pathogenesis of influenza. *J Antimicrob Chemother.* 1999; 44 (suppl B):3-9.

CAPÍTULO 5

Paramixovirus

Marco A. Tizzano

Los paramixovirus se encuentran clasificados taxonómicamente dentro de la familia *Paramixoviridae* la cual pertenece al orden de los Mononegavirales. Según el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (*International Comitee on Taxonomy of Viruses*, ICTV, 2018), la familia *Paramixoviridae* está integrada por cuatro subfamilias: *Avulavirinae*, que incluye (incluye a los paramixovirus aviáres 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y al virus de la enfermedad de Newcastle), *Orthoparamyxovirinae* que incluye ocho géneros: *Aquaparamyxovirus* (incluye al paramixovirus del salmón del Atlántico); *Ferlavirus* (incluye al virus Fer-de-Lance); *Henipavirus* (incluye a los virus Hendra, Nipah, los henipavirus Cedar, de los quirópteros de Ghana y al henipavirus Mojiang); *Morbillivirus* (incluye al virus del distemper canino y de los fócidos, a los *morbillivirus* de los cetáceos, de los felinos, al virus de la peste de los pequeños rumiantes y al virus de la peste bovina); *Respirovirus* (incluye a los virus parainfluenza bovino 1, 3 y al virus Sendai) y los géneros *Jeilongvirus*; *Narmovirus*; *Salemvirus* los cuales representan a algunos virus emergentes. Por su parte la subfamilia *Rubulavirinae* incluye a rubulavirus porcino, virus de parainfluenza 5, virus Mapuera y virus de simio 41 y la subfamilia *Metaparamyxovirinae* incluye al *Synodus paramyxovirus*.

Los paramixovirus son capaces de causar enfermedades en un amplio rango de especies, incluyendo mamíferos, aves y reptiles. En algunos casos, estas enfermedades pueden ser multisistémicas y altamente mortales (Distemper canino), otras tienen la particularidad de ser zoonóticas. Los de mayor relevancia desde el punto de vista veterinario se enumeran en la Tabla 1.

Estructura y propiedades fisicoquímicas

Los paramixovirus son pleomórficos; al ser observados con microscopio electrónico presentan forma esferoide con diámetro que oscila entre los 150 y los 300 nm (Figura 1). Son envueltos y en su superficie presentan proyecciones. La partícula viral está formada por una nucleocápside de naturaleza proteica, dentro de la cual se encuentra el genoma viral ARN de cadena simple y polaridad negativa cuyo tamaño varía entre 15,2 y 15,9 kb dependiendo del

género y codifica seis proteínas estructurales: proteína de nucleocápside (N), fosfoproteína (P), proteína de gran tamaño (L), proteína de matriz (M), hemaglutinina (H) y proteína de fusión (F). También, codifica dos proteínas no estructurales llamadas (C) y (V). Para la obtención de las proteínas virales, el ARN genómico debe ser transcrito, por la ARN polimerasa presente en el virión, en seis ARNm que se traducirán en uno de los polipéptidos antes mencionados.

Tabla 1: Paramixovirus de importancia en medicina veterinaria

Especie animal afectada	Especie viral	Signos clínicos
Caninos	Distemper canino (CDV)	Fiebre (bifásica), decaimiento, deshidratación, secreciones mucosas o muco-purulentas, tos intensa, nariz y almohadillas plantares agrietadas, ticks nerviosos, embotamiento, hiperexcitación, vómitos y diarrea mucosa o sanguinolenta fétida.
	Parainfluenza canina 2	Fiebre, tos severa que termina con arcadas, bronconeumonía, conjuntivitis.
Bovinos	Parainfluenza bovina 1, 3	Disnea, lagrimeo, secreción nasal, taquipnea, tos intensa, neumonía.
Cerdos	Rubulavirus porcino	Fiebre, lomo arqueado y postración, depresión, encefalitis, neumonía y opacidad corneal. Trastornos reproductivos.
Aves	Newcastle (NDV)	Jadeo, tos, depresión, inapetencia, decaimiento, parálisis, hinchazón de los ojos y el cuello, diarrea, desfiguración, producción de huevos reducida y con cáscara áspera y fina.
Cabras	Peste de los pequeños rumiantes (PPR)	Fiebre, diarrea, neumonía y úlceras en la boca.
Equinos	Parainfluenza 3	Infecciones respiratorias agudas, iridociclitis recurrente.
Felinos	<i>Morbillivirus felino (FmoPV)</i>	Trastornos urinarios, compatibles con una nefritis túbulo intersticial.

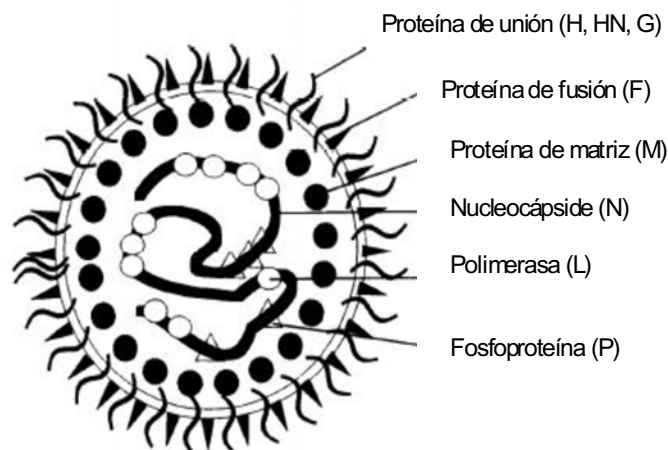


Figura 1: Estructura de los paramixovirus, donde pueden observarse las proteínas que lo conforman.

En cada extremo del ARN genómico se encuentran pequeñas regiones conocidas como *leader*. Se especula que dichas regiones contienen promotores para la unión de la ARN polimerasa con el ARN en la nucleocápside y secuencias de nucleación para la encapsidación del genoma por la nucleoproteína. El genoma viral se encuentra protegido por la nucleoproteína N. Dicha proteína es la más abundante en el virión y es muy sensible a la proteólisis intracelular. La porción carboxilo terminal de la proteína N también interactúa con proteínas reguladoras celulares como el factor de regulación de interferón IRF-3, interacción vital para la eficiente replicación del virus.

La proteína fosforilada P es esencial para la replicación del virus y está involucrada con todos los aspectos del ciclo viral. Unida a la proteína L, integran el complejo de polimerasa (ARN polimerasa dependiente de ARN) encargado de la síntesis de ARN. La proteína L se asocia al ARN encapsidado (N-ARN) a través de su interacción con la proteína P, quien actúa como enlace o adaptador, para formar el complejo de transcripción. Las funciones de la fosfoproteína P durante la infección viral son: actuar como un trans-activador transcripcional al reclutar proteína L sobre el templado formado por la proteína N y el ARN viral, unirse al N-ARN interactuando con regiones no codificantes del ARN genómico y prevenir la asociación espuria de la proteína N con ARN inespecífico, actuando como una chaperona, formando un complejo P-N soluble, que es además el precursor para la encapsidación del ARN viral recién sintetizado.

A partir de la secuenciación del gen codificante para la proteína P se hallaron dos marcos abiertos de lectura, uno para P y el otro para la proteína no estructural C. La proteína V es producto de la modificación post-transcripcional del ARNm, la cual consiste en la adición de una guanidina en un sitio específico (sitio de edición), de modo que el nuevo ARNm traduce una proteína cuyo extremo N-terminal es similar al de la proteína P, pero con un C-terminal propio de la proteína V y caracterizado por ser rico en cisteína.

Se postuló que la proteína C participa en el proceso de iniciación, extensión y terminación de la transcripción del RNAm viral. Por otra parte, la proteína V interfiere con la respuesta de interferón (IFN), particularmente IFN tipo I (IFN- α/β). Se sugirió que la proteína V actúa como

una chaperona en el ensamblado de la nucleocápside y/o regula el cambio de la transcripción del RNAm hacia la síntesis del ARN anti-genómico.

La proteína L se encuentra en asociación con las proteínas N, P y el ARN genómico formando la nucleocápside. Cumple la función de ARN polimerasa dependiente de ARN.

La proteína de matriz juega un papel esencial en el ensamblado de los paramixovirus dado que sirve como unión entre la nucleocápside y las glicoproteínas de envoltura. Media la interacción del complejo ribonucleoproteína viral con regiones específicas de la membrana plasmática donde se encuentran las glicoproteínas de envoltura virales.

En el género *Rubulavirus* existe una proteína de transmembrana (SH), la cual no cumple ningún rol en la unión al receptor celular, ni en la fusión de membranas. Sin embargo, contribuye con la supervivencia de las células hospedadoras infectadas, inhibiendo la apoptosis mediada por TNF- α . Además, incrementa la permeabilidad de la membrana celular mediante la formación de estructuras similares a poros hexaméricos.

La envoltura viral está constituida por una doble capa lipídica derivada de la célula hospedadora. En la cara interna se encuentra la proteína de matriz y en su parte externa posee proyecciones o espículas formadas por dos glicoproteínas, la proteína de unión (ya sea hemaglutinina H, hemaglutinina-neuraminidasa HN o bien glicoproteína G) y la proteína de fusión F.

Las proteínas de unión de los paramixovirus se dividen en tres grupos: hemaglutinina H, expresada sólo en el género *Morbillivirus*, hemaglutinina-neuraminidasa, expresada por los *Respirovirus*, *Avulavirus* y los *Rubulavirus* y la glicoproteína, G expresada por los *Henipavirus*.

Cabe destacar que H no posee actividad de neuraminidasa y la glicoproteína G carece de actividad de hemaglutinina y neuraminidasa. Así mismo, tanto H como G son incapaces de unirse a ácido siálico. La proteína de unión es una glicoproteína de tipo II de aproximadamente 600 aminoácidos dependiendo del género. Su peso molecular varía entre 78 a 85 KDa en la forma glicosilada. Se sintetiza como un monómero en el retículo endoplásmico. Luego de la síntesis se producen tetrámeros de la misma mediante la unión por puentes disulfuro. La función de la proteína de unión es la de producir la unión del virus con un receptor celular. Esta unión desencadena una serie de cambios conformacionales en la proteína de fusión, de tal modo que la porción hidrofóbica de dicha proteína se inserta en la membrana plasmática, provocando la fusión de las membranas y permitiendo que el virus ingrese a la célula.

La proteína de fusión F es una glicoproteína de tipo I, esencial para el ingreso y la diseminación del virus. Se sintetiza como una pre-proteína de 662 aminoácidos (F_0). Este precursor F_0 se transloca dentro del lumen del retículo endoplasmático y allí se produce su oligomerización dando lugar a la formación de trímeros. Luego el homotrímero es glicosilado y clivado en subunidades (F_1 - F_2) unidas por puentes disulfuro, por una furina (serina proteasa del Golgi) y continuación la proteína madura se inserta en la membrana plasmática de la célula infectada.

La masa molecular de los viriones es de 500×10^6 Da. El coeficiente de sedimentación es de 1000 S_{20w}. La partícula viral es muy sensible al calor y a la luz ultravioleta y se inactiva por el tratamiento a temperaturas entre 50 y 60 °C durante 30 minutos. En tejidos extraídos de

perros infectados, el virus sobrevive por lo menos una hora a 37 °C y tres horas a 20 °C o 24 °C (temperatura ambiente). La supervivencia del virus es mucho mayor a temperaturas frías, conservando la infectividad en el ambiente durante semanas a temperaturas entre 0 °C y 4 °C. En condiciones de laboratorio se mantiene infectivo durante varios años entre temperaturas de - 70° C o - 192 °C (nitrógeno líquido). El virus es estable a pH entre 4,5 y 9,0. Al ser un virus envuelto es sensible al éter y cloroformo, soluciones de formalina diluida (0,5 %), fenol (0,75 %) y desinfectantes de amonio cuaternario (0,3 %).

Mecanismo de replicación viral

Las partículas virales reconocen las células hospedadoras mediante la interacción de la proteína de anclaje viral (H, HN o G), con distintos receptores celulares que varían dentro de la familia y de cada género. Los representantes del género *Morbillivirus* se unen principalmente a dos receptores presentes en dos linajes celulares: la CD46, una proteína cofactor de unión de complemento que inhibe la activación de complemento y la CD150 o SLAM (*signal lymphocyte-activating molecule*) un receptor de los linfocitos y células dendríticas, la cual participa en la activación de estas células. Sin embargo, también pueden unirse alternativamente a los receptores nectin-4 y glicosaminoglicanos (GAGs).

Los *Rubulavirus*, *Respirovirus* y *Avulavirus* se unen a receptores celulares que contienen ácido siálico. En cambio los *Henipavirus* se unen a receptores ephrin B2 y ephrin B3 presentes en la membrana plasmática celular.

Luego del reconocimiento del receptor en la membrana celular, la proteína de anclaje dispara una serie de cambios conformacionales sobre la proteína F en la cual la región hidrofóbica del péptido de fusión queda expuesta y se inserta en la membrana plasmática de la célula hospedadora induciendo la fusión de las membranas, permitiendo el ingreso del virus a la célula. Luego del ingreso, la polimerasa se asocia a la nucleocápside para la replicación y transcripción. A partir del ARN genómico se lleva a cabo la transcripción de los diversos genes virales. Una vez que existen componentes proteicos suficientes para formar viriones comienza la replicación, la cual consiste en la generación de copias de polaridad positiva a partir del ARN genómico, las cuales son denominadas antígenómicas y se utilizan como molde para la síntesis del ARN genómico. La partícula viral no necesita formarse para que se infecten otras células, ya que con la expresión de las glicoproteínas de envoltura se induce la fusión de la membrana de la célula hospedadora con células vecinas y de esta manera se transfiere la nucleocápside de una célula a otra sin exponerse al exterior de la célula (Figura 2). Esta fusión de membranas ocasiona el efecto citopático de los paramixovirus, el cual es representado por la formación de células gigantes multinucleadas llamadas sincicios.

Patogénesis viral

En general, los paramixovirus se transmiten de un animal a otro por vía aerógena, aspiración de microgotas contaminadas con el virus. Al contacto del virus con las células de las mucosas del tracto respiratorio superior, se produce la multiplicación inicial del virus y en el tejido linfático asociados. Luego se traslada por vía aérea a los bronquios y pulmones donde se replica abundantemente. A partir de allí puede diseminarse por vía sanguínea a todo el organismo. A modo de ejemplo, se describen los eventos que suceden en la infección del virus del Distemper Canino (CDV).

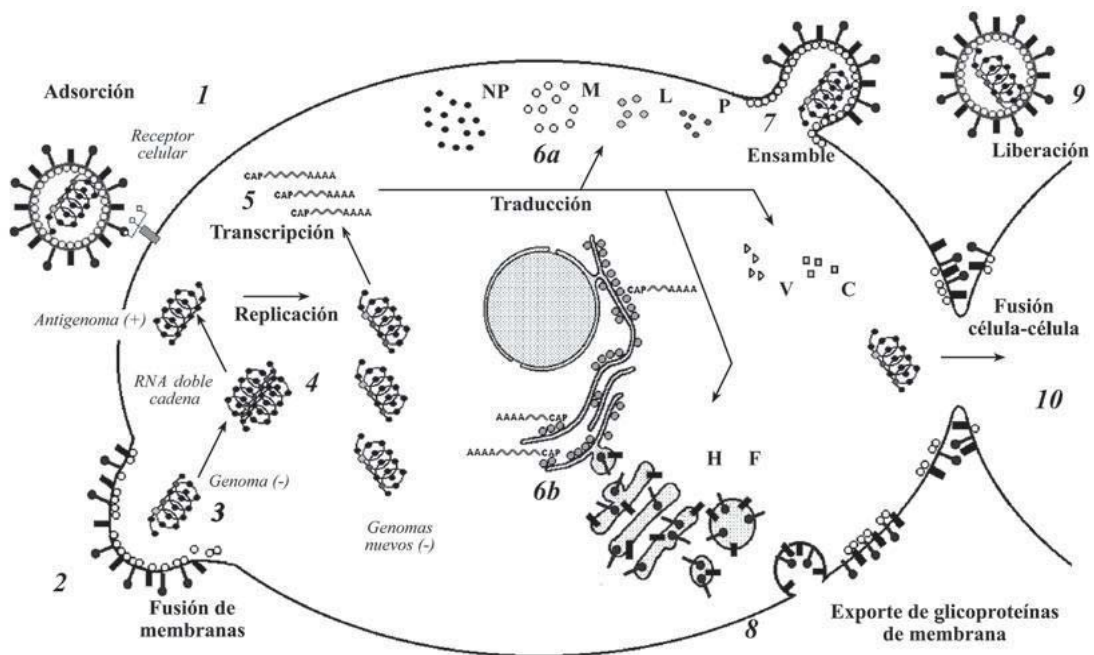


Figura 2: Ciclo de replicación de Paramixovirus: 1) Adsorción de la partícula viral a la membrana de la célula hospedera; 2) Fusión de las membranas celular y viral; 3) Liberación de la nucleocápside al citoplasma; 4) Síntesis de RNA de cadena positiva (antigenoma) y replicación de genoma; 5) Producción de RNA mensajero; 6a) Síntesis de proteínas virales; 6b) Las proteínas F y H son sintetizadas en el retículo endoplásmico rugoso y glicosiladas en el aparato de Golgi; 7) Las proteínas N, P y L son acopladas al RNA recién sintetizado y la proteína M se ubica en la parte interna de la membrana celular; 8) Las proteínas F y H son exportadas a la membrana citoplásmica en contacto íntimo con la proteína M; 9) La afinidad de las proteínas N, P y L con la M y ésta con la F y H es determinante para el ensamblaje del virión, el cual es liberado por exocitosis; 10) los viriones pueden infectar las células inmediatamente vecinas a través de la fusión membranal célula-célula, debido a la expresión de las proteínas virales en la membrana de la célula hospedera. (Modificado de Santos-Lopez y col., 1994).

El virus del Distemper Canino (CDV) principalmente infecta a los miembros de la familia *Canidae*. La transmisión del virus se da principalmente por la vía aérea. Sin embargo, la orina y los excrementos o la ingestión de carne infectada representan otra vía de infección, que se produce principalmente en los carnívoros silvestres. Luego de la infección, el virus replica en los tejidos linfoides de las vías respiratorias y se encuentra predominantemente en macrófagos

tisulares locales, que migran a las amígdalas y ganglios linfáticos bronquiales. Posteriormente, la viremia primaria se extiende a tejidos linfoides y hematopoyéticos distantes, tales como bazo, timo, ganglios linfáticos y médula ósea, lo que resulta en la marcada linfopenia y la inmunosupresión. Esto último puede servir de base para las infecciones bacterianas secundarias.

Por otra parte, los tejidos linfáticos asociados a la mucosa (MALT) y macrófagos en la lámina propia del tracto gastrointestinal pueden ser infectados. El destino posterior de la infección depende principalmente de la virulencia de la cepa respectiva CDV, la edad del animal infectado y de su estado inmune.

Una respuesta humoral insuficiente durante este período de infección puede promover la viremia secundaria, mientras que la presencia de una respuesta inmune antiviral robusta puede permitir que el individuo infectado elimine al virus, lo que resulta en la recuperación. La viremia secundaria permite que el virus se propague a diversos tejidos epiteliales y mesenquimales, así como al sistema nervioso central. En esta etapa, el CDV principalmente infecta células epiteliales, tales como, la mucosa bronquial y la gastrointestinal. Además, se pueden encontrar en queratinocitos, fibroblastos, trombocitos, diferentes subconjuntos de células linfoides y células endoteliales de varios parénquimas.

La infección del SNC puede producirse paralelamente a la de los otros órganos o posteriormente. Varias cepas de CDV tienen un neurotropismo considerable. Un ejemplo es la cepa Snyder Hill que causa principalmente polioencefalitis aguda, mientras que las cepas A75 / 17 y R252 están asociadas predominantemente a Leucoencefalitis desmielinizante.

El CDV puede entrar en el cerebro por distintas vías de infección. La principal es a través de las células mononucleares infectadas debido al tráfico a través de la barrera hemato-encefálica. Otras cepas infectan neuronas receptoras cercanas a la mucosa respiratoria y de forma anterógrada a través de las sinapsis neuronales alcanzan al nervio y bulbo olfatorio desde donde se disemina al resto del SNC. Posteriormente, el virus se disemina por líquido cefalorraquídeo, alcanza las células de la glía y las neuronas. Esto último explica la gran cantidad de focos de desmielinización ubicados bajo la piamadre en las capas subyacentes del cuarto ventrículo, en la corteza cerebral y cerebelar.

Respuesta inmune

Durante las infecciones mediadas por paramixovirus se ponen en juego diversos mecanismos asociados a la respuesta inmune innata y adaptativa.

En la inmunidad innata el reconocimiento de los virus se realiza a partir de Receptores de Reconocimiento de Patrones (por su sigla en inglés, PPR) de señal, los paramixovirus son reconocidos por RIG-1, MDA-5 a través de ARN virales de estructuras que no se encuentran en los vertebrados superiores. Conjuntamente con la estimulación del TLR7 se promueve la síntesis de INF tipo I.

Los paramixovirus desarrollaron un conjunto diverso de mecanismos para prevenir la activación del sistema del IFN. Los más sobresalientes son: 1-controlan la síntesis de ARN viral aberrante; 2- inhiben sensores celulares de ARN, la proteína V que se une al sitio de reconocimiento de ARNdc del PRR de señal citoplasmático MDA-5. 3- En algunas células Inhiben la vía de señalización JAK/STAT (por su sigla en inglés *Janus kinase/ Signal transducer and Activator for Transcription*) relacionadas al TLR7, inhibiendo la síntesis de INF tipo I. Afortunadamente este mecanismo no sería tan exitoso en las células dendríticas plasmacitoides, principales productoras de INF tipo I; 4-También suprimen en forma directa al promotor involucrado en la síntesis de IFNs. La inhibición de la vía de señalización JAK/STAT con este mecanismo también se inhibe la traducción de diversas proteínas antivirales, citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α e IL-6), citoquinas Th1 y Th2 específicas (IL-2 e IL-4).

Los mecanismos de la respuesta inmune celular adaptativa involucran la actividad proliferativa de LT CD4 colaboradores y subpoblaciones Th1 y Th2, LT CD8 citotóxicos. La respuesta humoral adaptativa se caracteriza por la síntesis de los isotipos IgG2a e IgG2c.

Cabe destacar que los paramixovirus, son capaces evadir la respuesta inmune del hospedador, explotando la capacidad que tienen de infectar a células del sistema inmune (LT CD4 colaboradores Th1), generando en estas la activación del proceso de apoptosis.

Los derivados del gen P (V) actúan inhibiendo las vías de señalización TLR y JAK/STAT, induciendo bajos niveles de expresión de proteínas antivirales, citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α e IL6), citoquinas Th1 y Th2 específicas IL2 e IL4) e interferones tipo I.

Pruebas diagnósticas

Para el diagnóstico de las infecciones producidas por paramixovirus se puede utilizar métodos directos como el aislamiento viral (la técnica de oro) o técnicas moleculares (PCR); para estas pruebas las muestras deben ser obtenidas de animales con signología clínica. Estas incluyen: hisopados nasofaríngeos y/o conjuntivales, sangre recolectada con anticoagulante y muestras de tejidos provenientes de la necropsias

Para el diagnóstico serológico se cuentan con las pruebas de ELISA, virusneutralización, inmunofluorescencia indirecta.

Profilaxis y control

Durante la infección por paramixovirus, los diferentes antígenos virales actúan como inmunógenos capaces de inducir una respuesta inmune que le confiere al animal protección de por vida contra futuras reinfecciones por el mismo virus. Sin embargo para ciertas enfermedades causadas por paramixovirus con alta tasa de morbilidad y mortalidad se deben utilizar vacunas para la prevención y control de las mismas.

Inicialmente, las vacunas utilizadas eran inactivadas y presentaban el inconveniente de inducir una respuesta inmune de corta duración. En la actualidad, las vacunas a virus atenuados se utilizan en muchos países para el control de las enfermedades. Existen vacunas convencionales y de nueva generación. A continuación se enumeran las vacunas más comunes utilizadas en medicina veterinaria.

Distemper canino

La vacuna contra el distemper canino se considera una vacuna central y su aplicación tiene la finalidad de proteger a los caninos de la enfermedad multisistémica de alta mortalidad. Todas las vacunas disponibles son de aplicación parenteral por lo tanto no protege contra la infección pero son muy eficaces en la reducción de la severidad de la enfermedad, disminución de signos, así como la disminución de la eliminación del agente al medio ambiente. En Argentina se encuentran disponibles vacunas convencionales activas e inactivadas así como también de nueva generación.

Enfermedad de Newcastle

Para la inmunoprolifaxis de la enfermedad de Newcastle existen vacunas convencionales y de nueva generación. Las cepas víricas empleadas en las vacunas comerciales de virus activos se encuadran en dos grupos: vacunas lentogénicas tales como Hitchner-B1, La Sota, V4, NDW, I2 y F y vacunas mesogénicas, como Roakin, Mukteswar y Komarov. La vacuna más ampliamente utilizada en el mundo es a virus activo atenuado cepa lentogénica La Sota. En Argentina, es una enfermedad de declaración obligatoria y el SENASA tiene la potestad de incluir un plan de vacunación de emergencia frente a un brote de la misma.

Parainfluenza bovina 3

Existen vacunas activas atenuadas e inactivadas de aplicación parenteral. En Argentina solo está permitido el uso de vacuna inactivada y normalmente se encuentra combinada con otros agentes del síndrome respiratorio bovino. Genera una respuesta humoral protectora de corta duración y de dudosa eficacia.

Referencias

- Barrett T. Morbillivirus Infections, with Special Emphasis on Morbillivirus of Carnivores. *Vet Microbiol.* 1999; 69(1-2):3-13.
- Cruz CD, Palossari H, Parisien JP, Devaux P, Cattaneo R, Ouchi T, Horvath CM. Measles virus V protein inhibits p53 family member p73. *J Virol.* 2006; 80:5644-50.
- Gardner AE, Dutch R. A Conserved Region in the F2 Subunit of Paramyxovirus Fusion Proteins Is Involved In Fusion Regulation. *J Virol.* 2007; 81(15):8303-14.
- Iorio RM, Mahon PJ. Paramyxoviruses: Different Receptor-Different Mechanism of Fusion. *Trends Microbiol.* 2008; 16:135-7.
- Nielsen L, Søgaard M, Jensen TH, Andersen MK, Aasted B, Blixenkron-Møller M. Lymphotropism and Host Response During Acute Wild-type Canine Distemper Virus Infections in a Highly Susceptible Natural Host. *J Gen Virol.* 2009; 90:2157-65.
- OIE. 2008. Manual de la OIE sobre animales terrestres Disponible en el URL: <http://www.oie.int/esp/normes/mmanual>
- Pomeroy LW, Bjornstad ON, Holmes EC. The Evolutionary and Epidemiological Dynamics of the Paramyxoviridae. *J Mol Evol* 2008; 66(2):98-106.
- Santos-López G, Hernandez J, Borraz-Argüello MT, Ramirez-Mendoza H, Vallejo V, Reyes-Leyva J. Proteins of Porcine Rubulavirus: Structure, Function and Pathological implications. *Arch Med Vet* 2004; 36(2):119-36.
- Tatsuo H, Ono N, Yanagi Y. Morbilliviruses Use Signaling Lymphocyte Activation Molecules (CD150) as Cellular Receptors. *J Virology.* 2001; 75(13):5842-50.

CAPÍTULO 6

Parvovirus

Nadia A. Fuentealba, María S. Serena

Los miembros de la familia *Parvoviridae* infectan a una gran variedad de especies animales y son agentes causales de enfermedades de suma importancia en veterinaria. Afectan tanto a vertebrados como a invertebrados y todos sus miembros están filogenéticamente relacionados, ya que poseen propiedades biológicas en común como la resistencia a la desecación en el ambiente y el requerimiento, para poder replicarse, de células en fase S del ciclo celular.

La familia *Parvoviridae* se divide en dos subfamilias según la especificidad ligada al hospedador: *Parvovirinae* y *Densovirinae*, que afectan a vertebrados e invertebrados respectivamente. La subfamilia *Parvovirinae* se divide de acuerdo al rango de hospedador, patogénesis, signos clínicos y propiedades moleculares, en 8 géneros diferentes: *Amdoparvovirus*, *Aveparvovirus*, *Bocaparvovirus*, *Copiparvovirus*, *Dependoparvovirus*, *Erythroparvovirus*, *Protoparvovirus* y *Tetraparvovirus*. La subfamilia *Densovirinae* se divide en 5 géneros denominados: *Ambidensovirus*, *Iteradensovirus*, *Hepandensovirus*, *Penstyldensovirus* y *Brevidensovirus*. Este capítulo se referirá a aquellos géneros que afectan a vertebrados y que causan enfermedades de interés veterinario. En la Tabla 1 se citan los principales parvovirus que afectan a las especies domésticas, denominados según las reglas taxonómicas actuales (<http://ictvonline.org>).

Tabla 1. Algunos parvovirus de importancia en medicina veterinaria

Género	Especie	Virus	Signos Clínicos
<i>Protoparvovirus</i>	<i>Protoparvovirus carnívoro 1</i>	Parvovirus felino	Panleucopenia, enteritis e hipoplasia cerebelar.
		Parvovirus canino	Enteritis, miocarditis y linfopenia.
		Virus de la enteritis del Visón	Leucopenia y enteritis
		Parvovirus del pato	Hepatitis, miocarditis y miositis.
<i>Protoparvovirus Ungulado 1</i>		Parvovirus porcino Kresse Parvovirus porcino NADL-2	Nacidos muertos, momias, abortos, muerte neonatal, infertilidad.

Características estructurales

Los parvovirus son los virus más pequeños que se describieron, con un tamaño que ronda entre 18 y 25 nm. El genoma viral es de ADN monocatenario lineal, de aproximadamente 4,5-5,5 kb y generalmente de polaridad negativa. Contiene dos marcos abiertos de lectura (ORFs) que codifican para dos proteínas de la cápside denominadas VP1 y VP2, y para dos proteínas no estructurales denominadas NS1 y NS2. La cápside es de simetría icosaédrica, presenta protuberancias superficiales con un poro central en cada uno de los vértices del icosaedro (Figura 1) y está compuesta por aproximadamente 90 % de VP2 y sólo 10 % de VP1. En algunos parvovirus, se encuentra una tercera proteína estructural denominada VP3. Esta estructura de la cápside y la ausencia de envoltura hacen que los parvovirus sean altamente resistentes a las condiciones del medio ambiente, cambios de temperatura, pH y desinfectantes. Algunos miembros de esta familia son capaces de aglutinar eritrocitos de diferentes especies de mamíferos y aves, propiedad que es aprovechada para el diagnóstico.

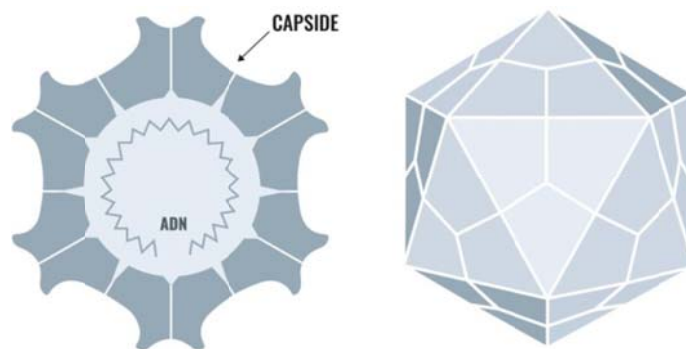


Figura 1. Representación esquemática de un parvovirus (G. Fuentealba 2016)

Replicación viral

La infección viral se inicia con la unión del virus a los receptores celulares ubicados en la superficie de las células del hospedador y penetran por el mecanismo de endocitosis mediado por receptores. Las partículas virales se mantienen dentro de endosomas en distintos estadios (endosoma temprano y endosoma tardío) y posteriormente se transforman en lisosoma. La proteína VP1 posee actividad de fosfolipasa en su extremo N-terminal, la cual modifica la membrana del lisosoma facilitando la salida de las partículas virales al citosol. En algunos casos, puede ocurrir que las cápsides libres en el citoplasma sean conjugadas con ubiquitina y degradadas por el proteosoma de la célula hospedadora. Si esto no ocurre, la partícula viral se asocia a los microtúbulos y es transportada hacia el poro nuclear, por donde ingresa al núcleo y se produce la replicación propiamente dicha. Debido a que los parvovirus poseen un genoma pequeño y una limitada capacidad de codificación, requieren células en fase S del ciclo celular, que le aporten las enzimas necesarias para la replicación de su propio ADN.

El mecanismo de replicación es bastante complejo y se lo describe como “circulo rodante” (*rolling-hairpin replication*). El genoma viral posee secuencias palindrómicas terminales, lo que permite que se formen estructuras de doble hebra en los extremos y a partir de uno de ellos la ADN polimerasa celular genera un ADN de doble cadena. Dicho ADN, se utiliza como molde para la transcripción de los ARNm y para la replicación del ADN. Posteriormente, el ARNm sufre el mecanismo de *splicing* y se traduce en cuatro proteínas principales y en pequeñas proteínas adicionales. Dentro de las proteínas principales se encuentran las no estructurales, como NS1, que juega un rol importante en la regulación de la replicación, y NS2 que participa en el ensamblaje del virus en la célula hospedadora y en el transporte nuclear. Las proteínas estructurales forman las procápsides que se ensamblan con una copia del genoma del virus, constituyéndose así las partículas virales maduras.

Patogenia

La característica patogénica de los parvovirus relacionada con el requerimiento de células en fase S del ciclo celular para llevar a cabo su replicación, hace que, los fetos sean potencialmente susceptibles a la infección por estos virus ya que las células se encuentran en división activa. La patogenia de la enfermedad depende de la cepa del virus, de la edad del animal y de la constitución genética del hospedador. Cuando se ven afectados fetos en desarrollo, donde normalmente ocurre la organogénesis con división celular, el virus produce un daño tisular generalizado que se caracteriza por diferentes defectos en el desarrollo posterior. En animales recién nacidos, la replicación del virus está restringida a las células que se encuentran en constante división tales como precursores hematopoyéticos, linfocitos y células progenitoras de la mucosa intestinal. La replicación es generalmente lítica y la enfermedad se manifiesta de acuerdo al daño de los tejidos afectados.

La ruta natural de infección puede variar dependiendo del virus, pero en general se produce por vía aérea, venérea, transplacentaria y fecal-oral. En especies en las cuales la enteritis es una consecuencia común de la infección por parvovirus, son excretadas grandes cantidades de partículas virales en las heces, lo que resulta una manera muy eficiente de transmisión. Un ejemplo de ello es el Parvovirus canino, el cual es altamente contagioso, muy estable en el medio ambiente y la mayoría de las infecciones se deben a la exposición de perros susceptibles a heces contaminadas. El virus reconoce como tejidos blanco para su replicación a las criptas intestinales y los órganos linfoides, pero puede propagarse a todos los tejidos, incluso al cerebro. Luego de la penetración a través de la ruta oro-nasal, el virus replica en el tejido linfóideo gastrointestinal y es diseminado por los leucocitos infectados al epitelio germinal de las criptas del intestino delgado, causando diarrea sanguinolenta por la destrucción de la mucosa. Los signos clínicos se presentan luego de un periodo de incubación de 3-7 días.

En el caso del parvovirus felino, el contagio se produce por contacto directo con gatos infectados o a través de fómites, complementariamente, pulgas y humanos pueden actuar como vectores mecánicos. El virus se elimina por heces, vómito, orina y saliva.

Otro virus de importancia es el parvovirus porcino, endémico en la mayoría de los países. Replica fácilmente en cerdos susceptibles y sólo se observan signos clínicos asociados a fallas reproductivas en hembras preñadas. El virus se mantiene viable en heces y en otras secreciones de animales infectados, como así también en corrales, ropa o instrumentos de los operadores, siendo esto una nueva fuente de infección para otros animales. Asimismo, se reportó la transmisión por vía venérea pudiéndose identificar el virus en el semen de cerdos infectados. El virus es capaz de replicar aún en animales vacunados y tiene la capacidad de llegar a los fetos a través de células del sistema inmune como macrófagos o linfocitos. Debido a la composición histológica de la placenta epitelio-corial de la cerda no es posible el pasaje de anticuerpos maternos que puedan proteger al feto. Asimismo, ya que las células de la placenta no son susceptibles al virus, se descarta la posibilidad de que atraviese la misma mediante una replicación progresiva.

Luego de la infección materna, el virus demora aproximadamente 15 días para llegar al feto y la gravedad de los síntomas producidos depende del momento de gestación en el que se produce la infección.

Respuesta inmune

El sistema inmune innato proporciona el mecanismo de defensa inmediato e inespecífico contra la infección viral. Se produce el reconocimiento de los antígenos a través de los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) presentes en las células ubicadas en la puerta de entrada del virus y se induce la transcripción de genes relacionados con la respuesta antiviral. Uno de los mecanismos más importantes es el sistema del interferón tipo I (IFN), donde los IFN- α e IFN- β juegan un papel crítico en la modulación de la respuesta inmune

adaptativa. Por otro lado, las células "*natural killer*" (NK) participan en la activación de la respuesta humoral antiviral, mediada principalmente por la síntesis de INF gamma.

Los virus desarrollaron una amplia variedad de mecanismos para superar la inmunidad innata del hospedador y así evitar o retardar la activación completa de la inmunidad adaptativa.

La inmunidad innata no es totalmente suprimida por los mecanismos de evasión del virus por lo tanto se desencadena una respuesta adaptativa tanto humoral como celular. Los anticuerpos se detectan a partir de la 2-3 semanas luego de la infección, aunque en algunos casos pueden detectarse rápidamente a los 3-5 días. Las inmunoglobulinas detectadas son de isotipos IgM, IgA e IgG. La VP2 es la proteína predominante de la cápside y contiene la región inmunodominante involucrada en el reconocimiento por anticuerpos neutralizantes.

Algunos parvovirus causan infecciones que sólo duran unos pocos días, mientras otros pueden persistir por períodos prolongados frente a una robusta respuesta inmune del hospedador. Aún no se sabe con precisión cuáles son los mecanismos exactos que permite dicha situación, debido a que la mayoría de los virus parecen ser susceptibles al mecanismo de neutralización mediada por anticuerpo. Por ejemplo, en el caso del Virus de la enfermedad Aleutiana del visón, se determinó que replica persistentemente en algunos animales debido a que los fosfolípidos asociados a la cápside reducen la unión de los anticuerpos o la neutralización por parte de los anticuerpos neutralizante. La enfermedad se desarrolla como resultado de un alto nivel de complejos antígeno-anticuerpo circulando, que luego se depositan en los tejidos generando una reacción de hipersensibilidad de tipo III que desencadena la destrucción del tejido afectado.

Aún hay pocos estudios referidos a cómo actúa la inmunidad celular pero se ha demostrado en trabajos experimentales con parvovirus de ratas, la inducción de una respuesta inmune específica contra el virus, caracterizada por un alto nivel de IgG a los 14 días post-infección como así también la inducción de una respuesta específica proliferativa de VP2 que incluye una alta producción de IFN- γ . Estudios similares se obtuvieron cuando se analizó la respuesta inmune durante la infección con parvovirus humano B19, donde se determinó una respuesta proliferativa Th1 con alta producción de IFN- γ dirigida contra las proteínas VP1 y VP2.

En general, la presencia de un alto título de anticuerpos luego de la infección natural o de la vacunación con vacunas vivas modificadas se correlaciona con la protección contra la re-infección y la inmunidad adquirida.

Tanto para el Parvovirus canino, como para el felino, se utilizan vacunas a virus atenuado que proporciona una protección completa y de larga duración en animales seronegativos. La principal causa de fracaso de la vacunación es la interferencia por neutralización de los anticuerpos maternos, que se transmiten de las madres al cachorro a través del calostro. Dichos anticuerpos disminuyen a un ritmo regular y cuando caen por debajo de un determinado nivel, que generalmente se da entre las semanas 7 y 12 de edad, los animales se vuelven susceptibles a la infección con el virus y en ese momento deberían ser administradas las vacunas. La duración de la inmunidad pasiva está relacionada con el nivel de inmunidad de la madre, como también de la eficiencia de la transferencia a las crías. El grupo de guía de

vacunación de la Asociación Mundial Veterinaria de Pequeños Animales recomienda retrasar el primer ciclo de vacunación a las 14-16 semanas de edad para asegurar la protección de los cachorros. En el caso del parvovirus canino hay preocupación con respecto a la completa eficacia de las vacunas contra las variantes antigénicas del virus.

En el caso del Parvovirus porcino la inmunidad pasiva se da por el pasaje de anticuerpos maternos a través del calostro consumido en las primeras horas de vida y van disminuyendo hasta no ser detectados a las 20 semanas de vida. En algunos casos, pueden durar hasta 9 meses e interferir con la respuesta ante la vacunación. La inmunidad activa, ya sea por infección natural o por vacunación induce la producción de anticuerpos detectables a partir de los 6 días post-infección mediante pruebas inmunoserológicas convencionales y permanecen entre 4 meses y 4 años. Los anticuerpos son capaces de prevenir la enfermedad clínica pero no así la infección viral. En relación a la respuesta inmune celular, se describió la generación y proliferación de LT CD4 y CD8 citotóxicos específicos contra el virus. Las vacunas disponibles son a virus inactivado, las cuales deben ser aplicadas cada 4-6 meses en las hembras para mantener una buena inmunidad protectora. También existen vacunas a virus vivo modificado y recombinantes, que están compuestas por la proteína VP2 expresada en el sistema baculoviral.

Parvovirus felino o Virus de la Panleucopenia Felina

El Parvovirus felino se encuentra mundialmente distribuido y probablemente todos los miembros de la familia *Felidae* son susceptibles a la infección. Algunos miembros de otras familias como el mapache, el visón y el coatí también son susceptibles. Es más frecuente en gatos infectados al momento del destete, cuando disminuye la concentración de los anticuerpos maternos, aunque puede afectar a animales de todas las edades. El período de incubación es de aproximadamente 5 días (rango 2-10 días) y en el inicio de los signos clínicos existe una profunda leucopenia. El pronóstico es grave si el recuento de glóbulos blancos es inferior a 1000 células por ml de sangre. Los signos clínicos incluyen fiebre (mayor de 40 °C), que puede persistir durante 24 horas o más, lasitud, inapetencia, pelaje áspero, vómitos y diarrea abundante, persistente y con frecuencia sanguinolenta. La enfermedad es de alta mortalidad.

Los gatos infectados entre las dos semanas antes del parto y las dos semanas después del nacimiento pueden tener un desarrollo anormal del cerebelo (síndrome hipoplasia/atrofia cerebelosa) manifestando ataxia cuando se convierten en ambulatorios (síndrome del gato tambaleante).

Parvovirus Canino

La parvovirus canina fue descrita por primera vez como una nueva enfermedad en 1978 y actualmente es endémica en todo el mundo. Todos los miembros de la familia *Canidae* (perros, lobos, zorros, coyotes) son susceptibles a la infección. Las características epidemiológicas son similares a las del parvovirus felino. Dependiendo de la edad del cachorro al ser infectado, se pueden observar dos cuadros clínicos de la enfermedad causada por este virus. La severa es la más frecuente en los cachorros de entre 6 semanas y 6 meses de edad y generalmente es mortal, sobre todo en aquellos animales que carecen de anticuerpos transmitidos por la madre. Los signos clínicos se presentan luego de un periodo de incubación de 3-7 días y consisten en anorexia, letargo, linfopenia aguda, vómitos y hemorragia intestinal con diarrea severa. La infección de animales seronegativos en la primera semana de vida, también puede causar el síndrome de miocarditis, que se manifiesta como insuficiencia cardíaca aguda y muerte súbita. Los cachorros que sobreviven pueden desarrollar cardiomiopatía a las 4-8 semanas de edad. Este síndrome era relativamente común, pero actualmente es poco frecuente ya que la inmunización generalizada en las hembras reproductoras protege a la mayoría de los cachorros durante el período de mayor susceptibilidad.

Parvovirus Porcino

La infección ocasionada por el Parvovirus porcino (PPV por su sigla en inglés) causa pérdidas reproductivas en cerdas caracterizada por muerte fetal intrauterina, momificación, muerte embrionaria e infertilidad. Las cerdas afectadas no suelen mostrar signos clínicos y la transmisión del virus a los fetos se produce sólo si son seronegativas. El PPV es probablemente la causa más importante de trastornos reproductivos en cerdos en todo el mundo. Recientemente, se identificaron nuevos parvovirus que afectan a cerdos como son el Parvovirus porcino 2, el Hokovirus porcino y el Parvovirus porcino 4. El análisis de secuencia de los nuevos aislamientos sugiere una activa evolución del PPV, con cambios específicamente a nivel de la proteína de la cápside VP1 que influye en las propiedades antigénicas del virión.

Si bien las fallas reproductivas son el principal signo clínico causado por el PPV, también se reportaron diarreas y lesiones vesiculares en piel de animales adultos. Cuando el virus llega al feto, alrededor del día 35 de gestación, se produce la muerte embrionaria y reabsorción fetal. Luego de esta etapa, donde el feto completó su organogénesis, la infección con PPV resulta en muerte fetal manifestada como momificación. Alrededor del día 70, el feto ya es capaz de responder mediante su sistema inmune eliminando el virus, mientras que luego de este periodo, la infección fetal se hace subclínica y los animales nacen con anticuerpos contra PPV.

La prevención y control de la enfermedad se centra en mantener las hembras de la granja con una elevada inmunidad frente al PPV. Lo ideal es lograr un buen estado inmunitario de los animales mediante la utilización de vacunas contra el virus.

Diagnóstico

El diagnóstico generalmente es clínico, teniendo en cuenta los signos característicos y los valores hematológicos, pero la confirmación de la etiología se realiza por medio de pruebas confirmatorias. Las pruebas habituales incluyen:

- para detección de antígenos en tejido y/o líquidos corporales: aislamiento viral, inmunofluorescencia (IF), ensayo de hemaglutinación (HA) y ELISA de captura.
- para detección de ADN viral en materia fecal y/o tejidos: reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- para diagnóstico serológico: inhibición de la hemaglutinación (HI), ELISA o inmunofluorescencia indirecta (IFI).

El aislamiento viral para parvovirus canino se realiza en células de líneas caninas y felinas. A las 12-24 horas post-infección se detecta alta concentración de antígenos virales en el núcleo celular por IFI o pruebas inmunoenzimáticas sobre células infectadas. El virus produce cuerpos de inclusión intranucleares y se libera de la célula produciendo un efecto citopático lítico.

El aislamiento viral del parvovirus porcino se realiza a partir de muestras de tejido fetal, en células de línea de origen porcino o en cultivos primarios de células de cerdo. El efecto citopático que se observa es la forma redondeada que adopta la célula, picnosis y lisis, generando cuerpos de inclusión.

Referencias

- Astell CR. Parvoviruses (Parvoviridae), General Features and Molecular Biology. En: Granoff A, Webster RG, 1999. Encyclopedia of Virology, 2nd edition. California, Academic Press, pp. 1151-59.
- Ball-Goodrich LJ, Paturzo FX, Johnson EA, Steger K, Jacoby RO. Immune Responses to the Major Capsid Protein during Parvovirus Infection of Rats. *J Virol.* 2002; 76(19):10044-9.
- Carballal G, Oubiña JR. Parvovirus. En: *Virología Médica*, 3^{ra} edición, 1998. El Ateneo, Buenos Aires (Argentina), pp. 439-44.
- Carter JB, Saunders VA. Parvoviruses (and other ssDNA viruses). En: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, 2007. *Virology: Principles and Applications*, 5th edition. West Sussex, England; John Wiley & Sons Ltd, pp. 137-46.
- Cotmore SF, Agbandje-McKenna M, Chiorini JA, Mukha DV, Pintel DJ, Qiu J, Soderlund-Venermo M, Tattersall P, Tijssen P, Gatherer D, Davison AJ. The family Parvoviridae. *ArchVirol.* 2014; 159(5):1239-47.
- MacLachlan NJ, Dubovi EJ. Parvoviridae. En: Fenner's *Veterinary Virology*, 4th ed., 2011. New York, USA, Elsevier, pp.225-35.
- Decaro N, Buonavoglia C. Canine parvovirus - A review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Vet Microbiol.* 2012; 155: 1-12.
- Parrish CR. Parvoviruses (Parvoviridae), Cats, Dogs and Mink. En: Granoff A, Webster RG, 1999. Encyclopedia of Virology, 2nd edition, California; Academic Press, pp. 1159-67.
- Streck A, Wageck Canal C, Truyen U. Molecular epidemiology and evolution of porcine parvoviruses. *Infect Genet Evol.* 2015; 36:300-6.
- Stuetzer B, Hartmann K. Feline parvovirus infection and associated diseases. *Vet J.* 2014; 201(2):150-5.
- Truyen U, Streck AF. Porcine Parvovirus. En: Zimmerman J, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, 2012. *Diseases of swine*, 10th edition. Iowa; Wiley-Blackwell, pp.447-55
- Tu M, Liu F, Chen S, Wang M, Cheng A. Role of capsid proteins in parvoviruses infection. *Virology.* 2015; 12:114.
- Uwe Truyen, Colin R. Parrish. Feline panleukopenia virus: Its interesting evolution and current problems in immunoprophylaxis against a serious pathogen. *Vet Microbiol.* 2013; 165(1-2):29-32.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de La Plata, al CONICET por la formación brindada y el apoyo recibido. Al Sr. Gustavo Fuentealba por el diseño de la imagen.

CAPÍTULO 7

Retrovirus

Carlos Javier Panei, Viviana Cid de la Paz

En medicina veterinaria, las enfermedades causadas por retrovirus se detectaron hace poco más de cien años. Los retrovirus forman parte de una familia de agentes infecciosos similares en cuanto a organización genómica y estructura del virión. Poseen una estrategia de replicación típica, de donde proviene su nombre. La palabra retro deriva de la transcripción reversa realizada por una enzima característica de esta familia denominada transcriptasa reversa, que permite la síntesis de ADN complementario viral.

Los retrovirus son envueltos, presentan simetría icosaédrica y un diámetro aproximado de 60 a 125 nm. El genoma está formado por dos moléculas idénticas de ARN monocatenario de sentido positivo, asociado con la proteína de la nucleocápside (NC) y varias copias de las enzimas transcriptasa reversa, proteasas e integrasas. Este complejo está rodeado por una cápside viral (CA); la matriz viral (MA) está ubicada entre la cápside (CA) y la envoltura. Finalmente, la envoltura que rodea al virus, de origen celular, es adquirida durante el proceso de exocitosis. El complejo de proteínas de membrana se inserta en la bicapa de fosfolípidos, siendo determinantes para la adsorción del virus a la célula blanco (Figura 1).

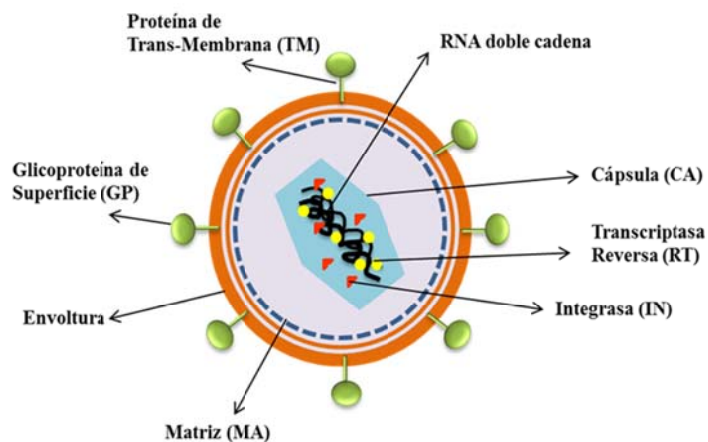


Figura 1: Partícula viral característica de los retrovirus

Organización genómica

El genoma de los retrovirus está formado por genes estructurales clásicos compartido por todos los virus de este género denominados *gag*, *pol* y *env*. Además, se encuentran los genes que codifican la síntesis de las proteínas regulatorias virales y que varían dependiendo de cada género en particular; así, para mencionar algunos ejemplos, en los lentivirus de pequeños rumiantes (virus de maedi visna-VMV y el virus de la artritis encefalitis caprina-CAEV) son *vif*, *tat* (*vpr*), *rev*. En el virus de la leucosis enzoótica bovina, los genes regulatorios son *G4*, *R3*, *rex* y *tax*; mientras que en el virus de la anemia infecciosa equina los genes son *vif*, *tat* (*vpr*), *rev* y *nef*. Para completar el genoma, los provirus se encuentran flanqueados por secuencias nucleotídicas repetidas llamadas: repeticiones terminales largas (*Long Terminal Repeat-LTR*). Estos LTR consisten en 3 regiones denominadas U3, R y U5.

Clasificación

Debido a sus características genéticas, a esta familia viral se la incluye dentro del grupo VI de la clasificación de Baltimore, consta de tres subfamilias: Oncovirinae, Lentivirinae y Espumavirinae; está formada por siete géneros y 51 especies que afectan tanto a animales como humanos (Tablas 1 y 2). En la Tabla 3 se clasifican los retrovirus según su morfología al microscopio electrónico.

Tabla 1: Clasificación de la subfamilia de los retrovirus

Subfamilia	Características particulares
Oncovirinae	Virus oncogénicos. Producen leucemias, linfomas, tumores mamarios y neuronales.
Lentivirinae	Similares a los anteriores en cuanto a morfología, naturaleza del genoma y posesión de una transcriptasa reversa. No transforman células. El nombre refiere al largo período de incubación que transcurre entre la infección y la manifestación clínica de la enfermedad.
Espumavirinae	Comprenden los virus espumantes presentes en cultivos de células de riñón que degeneran en forma espontánea provocando la formación de células vacuoladas multinucleadas, de aspecto característico.

Tabla 2: Clasificación según géneros de virus de interés en medicina veterinaria

Género	Virus
<i>Alfaretrovirus</i>	Virus de la leucosis aviar
<i>Betaretrovirus</i>	Virus del tumor mamario del ratón
<i>Gamaretrovirus</i>	Virus de la leucemia felina, Virus de la leucemia murina
<i>Deltaretrovirus</i>	Virus de la leucemia bovina
<i>Epsilonretrovirus</i>	<i>Walleye dermal sarcoma virus</i>
<i>Spumavirus</i>	Virus espumoso de los monos
<i>Lentivirus</i>	Virus de la anemia infecciosa equina, Virus de la inmunodeficiencia felina, Virus de la inmunodeficiencia bovina, Virus de la inmunodeficiencia en simios, Virus de la artritis encefalitis en cabras y el Virus de maedi visna en ovejas

Tabla 3: Clasificación morfológica de los retrovirus

Tipo A	Tipo B	Tipo C	Tipo D
Partículas inmaduras carentes de envoltura e intracelulares	Partículas con envoltura, extracelulares, con core condensado y excéntrico. Envoltura con espículas prominentes	Partículas con core central y con espículas apenas visibles en su envoltura	Partículas ligeramente más grandes y con espículas poco prominentes

Ciclo de replicación viral

Cada ciclo de replicación en los retrovirus está acompañado por altas tasas de mutación viral estimadas en un rango de 10^{-4} y 10^{-5} . Esta característica se debe a los frecuentes errores de la transcripción reversa, incluso, se reportó la existencia de una alta frecuencia de recombinación entre retrovirus que se encuentran infectando a dos células diferentes. Una vez infectado el animal, se produce el reconocimiento de las glicoproteínas de superficie por el receptor de su célula blanco, con la consiguiente liberación de la nucleocápside en el citoplasma de la célula infectada. Después de la pérdida de la envoltura, el ARN viral se transcribe a través de la transcriptasa reversa a ADN de doble cadena complementario y se integra al genoma del hospedador por la acción de la enzima integrasa. El virus así integrado se denomina provirus y se caracteriza por ser estable, pudiendo ser transcrito por la maquinaria replicativa celular. La transcripción del provirus conduce tanto a la producción, de ARN genómico necesario para la formación de nuevos virus, así como de los ARNm necesarios para la síntesis de proteínas estructurales y regulatorias. La traducción tiene lugar en los ribosomas seguida de una etapa de maduración en el retículo endoplásmico rugoso, algunas proteínas son glicosiladas en las vesículas del aparato de Golgi. Este complejo proteico se inserta en la membrana celular. Durante la etapa de ensamble las proteínas estructurales rodean dos copias del ARN genómico para formar la nucleocápside. A continuación, durante el proceso de gemación el virión adquiere su envoltura y las proteínas virales de membrana, se libera y accede al espacio extracelular diseminándose e infectando nuevas células. La replicación viral, vía producción de viriones que infectan nuevas células blanco, parece ocurrir casi exclusivamente durante el corto período que le sigue a la primo-infección. Para explicar la ausencia de viremia del VLB se propuso otra vía de replicación denominada mitótica, donde el virus integrado se multiplica durante la expansión clonal de su célula blanco.

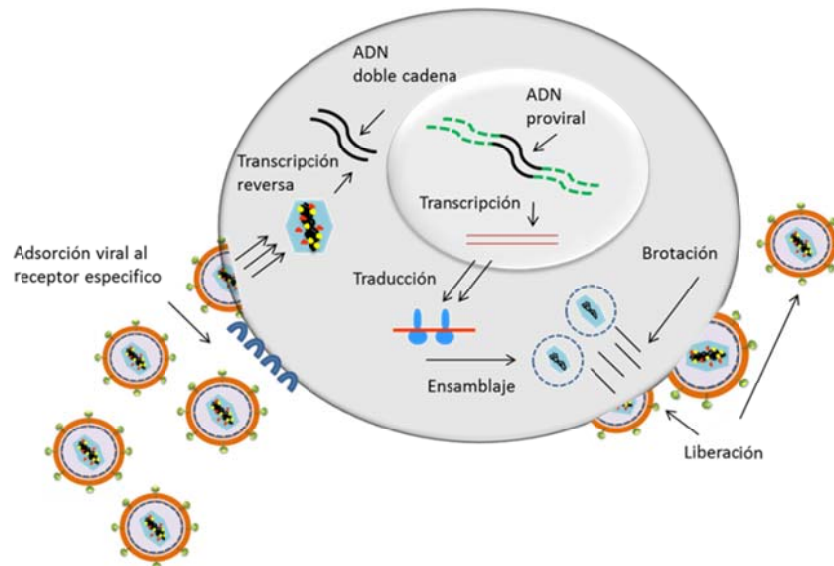


Figura 2: Ciclo de replicación de los retrovirus

Patogénesis

Los retrovirus afectan a un amplio espectro de hospedadores asociados a una amplia variedad de enfermedades incluyendo tumores malignos, inmunodeficiencias, trastornos neurológicos, artritis, osteoporosis y anemia entre otras. Algunos representantes de este género presentan un largo periodo de incubación, persistiendo la infección durante toda la vida del animal, actuando como reservorio del virus. Estos virus proporcionaron un instrumento fundamental para la biología molecular y permitieron el análisis del crecimiento y la diferenciación de la oncogénesis a través del estudio de los oncogenes víricos. Éstos desempeñan diferentes funciones fisiológicas, algunas no definidas aún y otras asociadas al crecimiento celular. La interacción con los retrovirus que se produce en los diferentes estadios de la replicación y maduración viral, pueden activarlos, llevando a la sobreexpresión, mutación o delección genética, induciendo de esta forma a la transformación celular. Algunos otros virus producen inmunosupresión, esto lleva a una depresión del sistema inmune que por diferentes circunstancias lleva al animal invariablemente a la muerte.

Respuesta inmunológica

Para el estudio de la respuesta inmunológica de esta familia, se tomará como modelo al género *Lentivirus*. Esto se debe al hecho que ocasionan importantes enfermedades de declaración obligatoria (anemia infecciosa equina, artritis encefalitis caprina y maedi visna), en especial a los lentivirus que afectan a los pequeños rumiantes (LVPR).

Como se describe en el capítulo de generalidades de la respuesta inmune, existe una secuencia lógica de eventos que se desencadenan una vez que el microorganismo toma contacto con el sistema inmune del hospedador. El primer evento es el reconocimiento, llevado a cabo por la interacción de los PAMPs (por su sigla en inglés, patrones moleculares asociados a patógenos) que en el caso de los virus están representados por proteínas y ácidos nucleicos presentes en el virión así como los intermediarios de la replicación viral. Estos PAMPs son reconocidos por los PRRs (por su sigla en inglés, receptores de reconocimiento de patrones) presentes en las células del sistema inmune así como en otras células de la economía animal, situadas en la puerta de entrada del virus.

La unión de estos receptores (PRRs) con sus ligandos (PAMPs) induce la activación de vías de señalización, responsables de la activación, del factor de transcripción como el NF κ B, entre otros. Este factor una vez translocado al núcleo estimula la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias, una de sus funciones es reclutar células innatas efectoras al foco de infección, como neutrófilos y macrófagos con el objetivo de eliminar al patógeno.

En ovejas y cabras, el papel de los TLR y la activación de las cascadas de señalización no están estudiados en profundidad. De todos modos, se demostró que en infecciones con LVPR la activación de los TLR 8 y 9 que reconocen ARNsc y ADN con CpG no metilados respectivamente, inducen la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias como IFN- α , IL-6, TNF- α y la consecuente expresión de proteínas con actividad antiviral. Se desconoce el tipo de relación que tienen con la replicación viral, las vías de señalización o el sitio de inserción del provirus vinculado con el sitio de unión transcripcional del NF- κ B. Sin embargo, dada la importancia de los macrófagos como células efectoras de la inmunidad innata, su maduración y activación podría inducir la replicación viral del provirus, en forma similar a lo postulado como vía mitótica de replicación viral en la LEB.

Aunque no se investigó en profundidad el papel que desempeñan los factores de restricción intrínseca o proteínas de acción antiviral en pequeños rumiantes, se demostró la presencia de TRIM5 α , A3G y tetherina. Estas proteínas, como parte de la respuesta humoral innata más compleja, son resultado de la estimulación celular por los INF tipo I en la infección por LVPR.

La proteína TRIM5 α es un factor antiviral, que en presencia de viriones completos en el citoplasma, se les une específicamente formando complejos denominados cuerpos citoplasmáticos inhibiendo la llegada del virus al núcleo. En HIV se demostró que esta unión entre TRIM5 α y la cápside viral desencadena el des-ensamblaje de la partícula viral probablemente mediada por la acción del proteasoma que se encuentra asociado al TRIM5 α .

También se identificó en las ovejas, una proteína similar a la A3G en HIV, es otra proteína antiviral expresada por linfocitos, macrófagos y células dendríticas tras la estimulación por IFN- α e IL-2. Presenta 2 mecanismos de acción:

- a. su función es incorporarse a la cápside viral durante el ensamble y al estar en relación directa con el genoma, induce mutaciones durante el proceso de transcripción reversa. Estas mutaciones desencadenan dos tipos de eventos:

- a. genera inestabilidad en la molécula evitando su incorporación en el genoma del hospedador y se degrada.
- b. a veces la mutación no es suficiente para evitar la integración pero sí altera el marco abierto de lectura o incorpora codones de stop formando proteínas virales mal plegadas o truncadas respectivamente, generando un pool de péptidos antigénicos virales susceptibles de ser presentados en el contexto del CMH tipo I y promover la activación y proliferación de LT C8 citotóxico;
- c. interfiere con la actividad de la TR, posiblemente por interacción directa con la misma.

Desafortunadamente, como ocurre en VIH, en infecciones por LVPR el producto del gen accesorio *vif* es esencial para la replicación viral pero también promueve la degradación del A3G, al que se une directamente induciendo su poliubiquitinización haciéndolo blanco de la acción del proteosoma.

La proteína con función antiviral denominada tetherina, inducida por INF tipo I previene la liberación de la partícula viral de la superficie celular, se ubica en la membrana celular y al ser incorporada a la partícula viral no sólo evita su liberación de la célula sino que los viriones pueden ser endocitados y digeridos en el compartimento lisosomal. Afortunadamente para el hospedador, los LVPR carecen del gen *vpu* presente en el VIH cuya función es unirse a esta proteína antiviral y así evitar su función.

La respuesta innata también cuenta con efectores celulares que conforman la respuesta celular frente a infecciones contra microorganismos de vida intracelular. En la inmunidad innata, las células citotóxicas por excelencia son las células NK. Lamentablemente y hasta el momento no se investigaron en la respuesta frente a infecciones por LVPR. Dada la importancia de estas células en la infección por VIH se puede suponer el rol en las infecciones por lentivirus y especular que las NK se activan, no sólo por el estímulo mediado por INF tipo I, sino también reconociendo proteínas virales mediante receptores de activación, activación del complemento, citotoxicidad mediada por anticuerpos y la producción de INF- γ responsable de la activación de macrófagos y la eliminación del microorganismo así como la modulación de la respuesta adaptativa para la respuesta antiviral específica. Muchas veces en la necesidad de desarrollar la vacuna más efectiva se toma nota de la respuesta inmune a estos inmunógenos que dan un panorama probable de los mecanismos que pudieran desencadenarse en la infección natural. Las ovejas vacunadas con proteínas recombinantes de la envoltura demostraron una alta concentración sérica de la IgG2 a la que se le atribuyó la actividad de citotoxicidad mediada por anticuerpos en infecciones tempranas.

Otros linfocitos de la inmunidad innata son los LT- $\gamma\delta$ que cumplen un rol fundamental en la respuesta inmune gracias a su capacidad de producir IFN- γ , su intervención en la regulación negativa de la respuesta inmune luego de la eliminación del patógeno y su intervención en la reparación del tejido dañado así como su respuesta de memoria. Esta célula representa el

70 % en animales jóvenes, en pequeños rumiantes y en bovinos esta proporción se mantiene alta en los animales adultos. En cabras infectadas con CAEV presentan altas proporciones de LT $\gamma\delta$ comparado con animales sanos lo que indicaría su importante rol en el control de este patógeno en la puerta de entrada. También hay LT $\gamma\delta$ en suero que por su capacidad de reconocer anticuerpos y virus circulante, cumplirían un rol importante durante las viremias.

Durante la infección con lentivirus, se genera una respuesta inmune adaptativa tanto humoral como celular. En el caso de infecciones por LVPR todavía no queda claro el tipo de relación existente entre la protección y la progresión de la enfermedad. Los individuos infectados sufren una fase aguda de replicación vírica durante las primeras semanas post-infección. Ésta se continúa con una potente respuesta inmune que la restringe hasta niveles muy bajos, aunque no llega a producir la eliminación completa de los virus, los cuales permanecen en estado de provirus integrados al genoma escapando de la respuesta inmune adaptativa. En un estudio experimental llevado a cabo en ovejas infectadas con el VMV se observó comparativamente la actividad celular y la seroconversión humoral. Se determinó un pico de concentración celular entre las dos y ocho semanas post-infección, la actividad fue disminuyendo gradualmente hasta llegar a la semana 16. La seroconversión ocurrió entre las dos y ocho semanas siguientes a la inoculación, atribuyendo esta coincidencia entre la aparición de la seroconversión y la disminución de células asociadas al virus, al control inmune.

Respuesta Inmune humoral

La respuesta humoral adaptativa es mediada por anticuerpos dirigida contra epítopes inmunodominantes de glicoproteínas de la cápside. Los anticuerpos son detectables a partir de la 2.^a o 4.^a semana post-infección con una perdurabilidad variable según el virus. A pesar que los anticuerpos neutralizantes son de aparición tardía, hasta años pos infección, los anticuerpos de aparición temprana tiene una participación importante en la citotoxicidad mediada por anticuerpos, proceso por el cual células y mecanismos citotóxicos tanto innato (sistema del complemento, fagocitos y células NK) como adaptativos (linfocitos CD8 citotóxicos) se activan para eliminar la célula infectada.

Es interesante considerar que los anticuerpos neutralizante se producen en forma lenta, tienen baja afinidad y son de títulos bajos. Sumado a la capacidad de los retrovirus de integrarse al genoma de la célula hospedadora y su diseminación por contacto célula-célula, la respuesta humoral puede no afectar a la propagación y diseminación vírica. No obstante algunos autores demostraron que limita la propagación del virus.

Respuesta inmune celular

La respuesta inmune adaptativa celular se produce generalmente entre la 1.^a y 4.^a semanas post-infección, volviendo a niveles basales entre las semanas 4 y 12 posteriores. Estudios en infecciones por lentivirus en pequeños rumiantes determinaron que a pesar de no regular

negativamente la expresión de CMH tipo I, los macrófagos infectados expresan menos CMH tipo II y moléculas de co-estimulo lo que se traduce en una menor activación de linfocitos CD4 colaboradores. Igualmente se demostró que se produce un aumento en el número de linfocitos TCD8 citotóxicos, facilitando el control de la carga viral en células infectadas y produciendo diferentes citoquinas inhibitorias. Esta linfocitosis observada en realidad se produce porque disminuye el número de linfocitos TCD4⁺ por lo que se invierte la relación en la formula TCD4⁺/TCD8⁺. Además, de estas alteraciones en el número de linfocitos, se puede observar alteraciones en la expresión de diferentes citoquinas como las IL-2, IL8 y la IL 16 que modulan la quimiotaxis de células de la inmunidad innata y adaptativa que dependiendo de su localización producirán signos clínica acorde al tejido afectado. También se observó un aumento del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) que regula la expresión de la interleuquina IL-1 e IL-6, regulación de la actividad de los macrófagos y la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales.

Profilaxis y Control

Los primeros estudios sobre la posible utilización de vacunas para el control de los retrovirus fueron elaborados a partir de virus inactivados provenientes de células infectadas con diferentes antígenos virales purificados. Avances significativos en el campo de la vacunación surgieron gracias al uso de tecnologías recombinantes, permitiendo la expresión de una gran variedad de proteínas virales en sistemas eucariotas y procariotas desarrollando más tarde vacunas sintéticas. Pese a los numerosos intentos llevados a cabo, no existen todavía vacunas comerciales para el control de las diferentes enfermedades. Otras estrategias utilizadas se consideraron, incluyendo aislamiento de animales infectados, inmunización pasiva con calostro, como así también vacunación con proteínas virales sintéticas y cepas atenuadas recombinantes. Hasta el momento, ninguno de estos métodos presenta óptima combinación de eficiencia, economía y seguridad. Por lo tanto, y debido a que los retrovirus pueden diseminarse por contacto directo entre animales enfermos y sanos, estrictos controles de manejo y sanitario podrían ser de gran ayuda para el control de las diferentes enfermedades. Estas medidas incluyen:

- Introducción de animales sanos a los rebaños o establecimiento.
- Necesidad imperiosa del uso de materiales descartables y/o estéril en toda maniobra veterinaria.
- Control de artrópodos hematófagos.
- No utilizar calostro en animales infectados por estos virus, sobre todo en las especies donde la transmisión de los anticuerpos se da vía mamaria. El calostro se caracteriza

por presentar gran cantidad de células blancas que pueden tener en su genoma al provirus integrado y así infectar a los lactantes.

- Eliminación de animales positivos para aquellas enfermedades que son de denuncia obligatoria en nuestro país, como la anemia infecciosa equina, donde los animales positivos deben ser sacrificados.

Referencias

- Agnarsdottir G, Thorsteinsdottir H, Oskarsson T, Matthiasdottir St, Hafliadottir B, Andresson OS., Andresdottir, V. The long terminal repeat is a determinant of cell tropism of maedi-visna virus. *J Gen Virol.* 2000; 81:1901-05.
- Bondzio A, Abraham-Podgornik A, Blankenstein P, Risse S. Involvement of intracellular Ca²⁺ in the regulation of bovine leukemia virus expression. *Biol Chem.* 2001; 382(3):407-16.
- Coffin JM. Molecular mechanisms of nucleic acid integration. *J Med Virol.* 1990; 31(1):43-9.
- Cordeiro N, Taroco R. En: *Retrovirus y HIV, 2006. Temas de Bacteriología y Virología Médica* (2da edición). Montevideo Uruguay: Oficina del libro FEFMUR, Universidad de La República, Facultad de Medicina, pp 449-76.
- Florins A, Gillet N, Asquith B, Boxus M, Burteau C, Twizere JC, Urbain P, Vandermeers F, Debacq C, Sanchez-Alcaraz MT, Schwartz-Cornil I, Kerkhofs P, Jean G, Théwis A, Hay J, Mortreux F, Wattel E, Reichert M, Burny A, Kettmann R, Bangham C, Willems L. Cell dynamics and immune response to BLV infection: a unifying model. *Front Biosci.* 2007; 12:1520-31.
- Florins A, Boxus M, Vandermeers F, Verlaeten O, Bouzar AB, Defoiche J, Hubaux R, Burny A, Kettmann R, Willems L. Emphasis on cell turnover in two hosts infected by bovine leukemia virus: a rationale for host susceptibility to disease. *Vet Immunol Immunopathol.* 2008; 125(1-2):1-7.
- Gómez Carrillo M. *Virus de la Inmunodeficiencia Humana.* 2015. *Virología Médica* 4^{ta} edición. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Corpus, pp. 360-61.
- Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MC, Studdert MJ. En: *Retroviridae, 1999. Veterinary Virology.* 3rd edición. San Diego, California, Academic Press, pp. 363-89.
- Stonos N, Wootton SK, Karrow N. Immunogenetics of Small Ruminant Lentiviral Infections. *Viruses.* 2014; 6(8):3311-33. doi: 10.3390/v6083311.

CAPÍTULO 8

Rhabdoviridae

Marcelo R. Pecoraro, Leandro Picotto

La familia *Rhabdoviridae* se encuentra clasificada taxonómicamente dentro del orden *Mononegavirales* y comprende una gran variedad de virus envueltos con genoma ARN de cadena simple y polaridad negativa, cuya morfología es en forma de barra o bala. En la actualidad, según el *International Committee on Taxonomy of Viruses* (<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>) la familia viral se encuentra dividida en veinte géneros: *Almendravirus*, *Alphanemrhavirus*, *Caligrhavirus*, *Curiovirus*, *Cytorhabdovirus*, *Dichorhavirus*, *Ephemerovirus*, *Hapavirus*, *Ledantevirus*, *Lyssavirus*, *Novirhabdovirus*, *Nucleorhabdovirus*, *Perhabdovirus*, *Sigmavirus*, *Sprivivirus*, *Sripuvirus*, *Tibrovirus*, *Tupavirus*, *Varicosavirus*, *Vesiculovirus*. La familia incluye patógenos de muchos animales y plantas que tiene gran impacto en la salud pública, veterinaria y agricultura.

Los rhabdovirus pueden ser transmitidos por distintas vías: mediante artrópodos hacia otros hospedadores (animales, plantas) o directamente entre artrópodos, mediante mordeduras entre mamíferos, por el agua hacia los peces o mecánicamente como sucede por contacto directo con algunos rhabdovirus de plantas.

Los virus de esta familia de mayor impacto en salud animal pertenecen a los géneros *Lyssavirus*, *Vesiculovirus*, *Ephemerovirus* y *Novirhabdovirus*. El género *Lyssavirus* está formado por dieciséis especies virales que infectan el sistema nervioso de los animales y salvo el *virus de murciélago de Lagos*, producen encefalomiелitis en humanos. La especie tipo del género es el *virus de la rabia*. El género *Vesiculovirus* está compuesto por dieciséis especies virales que infectan mamíferos, insectos y peces. La especie tipo del género es el *Vesiculovirus Indiana* que provoca estomatitis vesicular en caballos, cerdos y bovinos. El género *Ephemerovirus* está integrado por ocho especies de virus que infectan animales. La especie tipo del género es *Ephemerovirus de la fiebre efímera bovina*. El género *Novirhabdovirus* está compuesto por cuatro especies que afectan a peces. La especie tipo es el *novirhabdovirus de la necrosis hematopoyética infecciosa*.

Estructura y propiedades físico-químicas

Los rhabdovirus presentan una estructura en forma característica de bala o cónica (en vertebrados e invertebrados) o baciloforme (en plantas). Los viriones tienen una longitud de 100 a 430 nm y diámetro de 45 a 100 nm (las partículas defectivas presentan tamaño menor). El genoma viral consiste en una única molécula de ARN de cadena simple y polaridad negativa (con la excepción de *Dichorhavirus*, que presentan ARN bipartito) con un tamaño que oscila entre 11 y 15 kb. El genoma se asocia específicamente a proteínas formando un complejo ribonucleoproteico (RNP) de simetría helicoidal que lo protege del ataque de nucleasas.

El RNP se encuentra rodeado por la envoltura viral que es derivada de la membrana plasmática de la célula hospedadora. Esta tiene contenido lipoproteico y presenta proyecciones en forma de espículas glicoproteicas (figura 1).

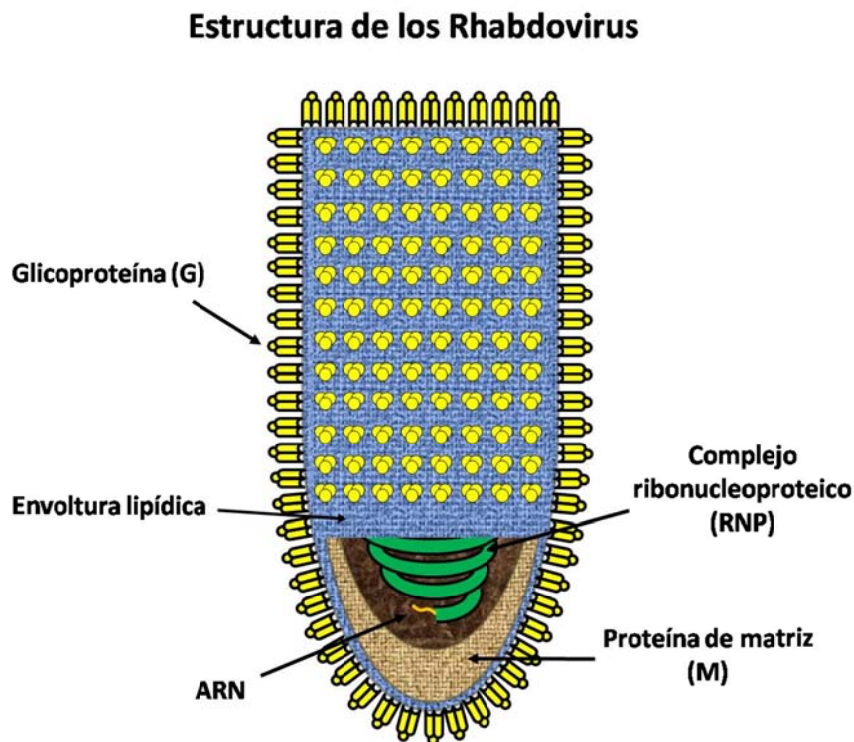


Figura 1. Representación esquemática de un rhabdovirus

Los rhabdovirus tienen su genoma que consiste en una cadena simple de ARN de polaridad negativa. Este codifica 5 proteínas comunes a todos los virus de la familia en el siguiente orden: 3'-N-P-M-G-L-5'. Sin embargo, algunos géneros de la familia pueden incluir proteínas adicionales (Figura 2).

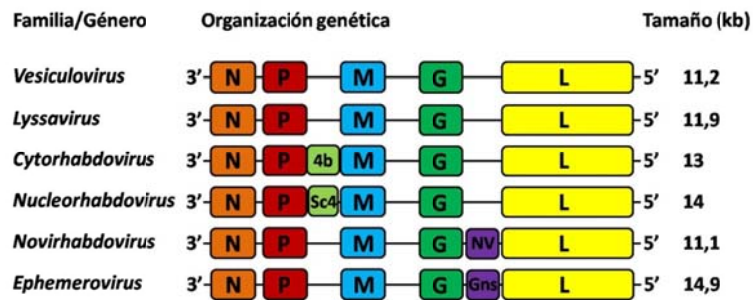


Figura 2. Organización genética de los *Rhabdovirus*.

Los rhabdovirus son relativamente estables en el ambiente, sobre todo si el pH es ligeramente alcalino (el virus de la estomatitis vesicular puede contaminar bebederos durante varios días). Son virus termolábiles y sensibles a la irradiación ultravioleta de la luz solar. Son inactivados fácilmente por desinfectantes a base de detergentes y de preparados que contienen yodo (se aplican comúnmente como desinfectantes para reducir o eliminar los rhabdovirus de peces que se depositan en la superficie de los huevos).

Mecanismo de replicación viral

La replicación viral puede dividirse en tres etapas. Una primera destinada a la fijación del virus a las células susceptibles del hospedador. La segunda etapa incluye la transcripción y replicación del genoma viral y la síntesis de las proteínas virales. La tercera, involucra el ensamblaje del virus y salida de la célula infectada.

El ciclo viral (Figura 3) comienza con la fijación del virus a la superficie de la célula blanco. Hay estudios que muestran que el receptor de la acetilcolina funciona como principal sitio de anclaje. Sin embargo, con el fin de iniciar el ciclo viral en el animal infectado, parece que el virus no se limita a la elección de un solo tipo de receptor. Una vez adsorbido a la célula, es internalizado por endocitosis (a menudo puede ingresar por pinocitosis). Luego, en el entorno ácido del endosoma (pH entre 6,3 y 6,5) la glicoproteína sufre cambios conformacionales que dan lugar a la fusión entre la membrana viral y la membrana endosomal, que ocasiona la liberación del RNP en el citoplasma celular.

En la segunda fase del ciclo viral, se produce la descondensación del RNP dando lugar al inicio de la transcripción del genoma viral en el citoplasma de la célula infectada. Producto de los cambios conformacionales, la proteína de matriz se disocia del RNP provocando la relajación del mismo, permitiendo el inicio de la transcripción y replicación viral. En una primera instancia, ocurre la transcripción temprana, donde se producen secuencialmente transcritos monocistrónicos de ARN mensajeros (ARNm) con un capuchón en el extremo 5' y poliadenilados en el extremo 3' para evitar su degradación. En esta etapa se genera un gradiente de transcripción, donde los genes más próximos al extremo 3' se transcriben en

mayor medida que aquellos cercanos al extremo 5'. Las proteínas virales se sintetizan a partir de los ARNm virales utilizando la maquinaria de síntesis proteica de la célula hospedadora. El ARNm-G (que da lugar a la glicoproteína) se traduce en polirribosomas unidos a la membrana (polisomas) y luego de su paso por el lumen del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi se producen las modificaciones post-traduccionales (puentes de sulfuro y N-glicosilaciones) necesarias para obtener la glicoproteína en su forma madura. En cambio, los otros cuatro ARNm virales (ARN-N, ARN-P, ARN-M, y ARN-L) se traducen en polisomas "libres" en el citoplasma. La acumulación de las proteínas virales N y P da lugar al inicio de replicación de ARN viral, debido a que es dependiente de la encapsidación del antígenoma que sirve como molde para la replicación del genoma.

En la tercera etapa de la replicación viral se lleva a cabo el montaje del virus, que comienza en la segunda fase con la encapsidación del ARN viral y la formación del RNP. El ensamblaje del RNP continúa en la tercera fase siempre y cuando las células infectadas se mantengan metabólicamente activas. En la fase tardía toma protagonismo la proteína multifuncional M. Se une al RNP recién formado y modifica el equilibrio entre transcripción viral y replicación, inhibiendo la transcripción y estimulando la replicación. Por otro lado, interactúa con la glicoproteína G que se encuentra en la membrana celular y altera la estructura del RNP que es enrollado. Por último, se produce el montaje y salida de las partículas virales de la célula. En esta etapa, los viriones maduros adquieren su envoltura luego de la brotación a través de la membrana plasmática celular arrastrando las espículas virales formadas por trímeros de glicoproteína.

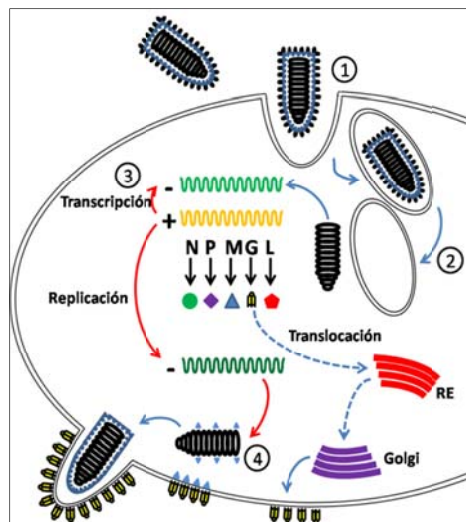


Figura 3. Ciclo de replicación de un Rhabdovirus: (1) Adsorción (2) Penetración (3) Transcripción-Replicación (4) Ensamblaje-Maduración-Liberación.

Rabia

La rabia es una enfermedad zoonótica causada por virus del género *Lyssavirus* que produce encefalomielitis aguda y se transmite principalmente por mordedura de animales enfermos. Si bien existen medidas eficaces para controlarla, todavía es considerada por la Organización

Mundial de la Salud (OMS) como una zoonosis de alta prioridad, desatendida en gran parte del mundo, especialmente en África y Asia, que produce más de 55.000 muertes anuales.

Epidemiológicamente la rabia puede ser clasificada en dos ciclos: terrestre y aéreo (Figura 4).

El ciclo terrestre se encuentra dividido en rabia urbana y silvestre. En la urbana, sucede en las ciudades, las principales especies animales afectadas son perros y gatos (en menor medida) y es el tipo epidemiológico más riesgoso debido a las constantes exposiciones de las personas con estos animales. La rabia silvestre es aquella que ocurre en zonas rurales y producto de esto la exposición humana es muy baja. Los animales más afectados son principalmente zorros, lobos, coatíes, mapaches, etc.

El ciclo aéreo de la rabia involucra a murciélagos enfermos. Dependiendo de la alimentación podemos distinguirlos en murciélagos hematófagos y no hematófagos (insectívoros, frugívoros). Se demostró que en Argentina la prevalencia del virus rábico en poblaciones de murciélagos se encuentra entre 1 y 3 %. Los murciélagos no hematófagos están distribuidos en ambientes salvajes y ciudades, por lo que la presencia de un murciélago caído conlleva un alto riesgo de contagio hacia animales domésticos y personas. Los murciélagos hematófagos, *Desmodus rotundus*, *Diphylla ecaudata* y *Diaemus youngi*, se encuentran solamente en el continente americano. Éstos funcionan como transmisores de virus rábico hacia otros animales produciendo rabia pasesiante en bovinos, equinos y ovinos y esporádicamente en personas. La rabia pasesiante se halla difundida desde México hacia la zona central de Argentina, principalmente en zonas tropicales o subtropicales. En Argentina, ocasiona grandes pérdidas económicas a productores y requiere de millones de dosis anuales de vacunas.

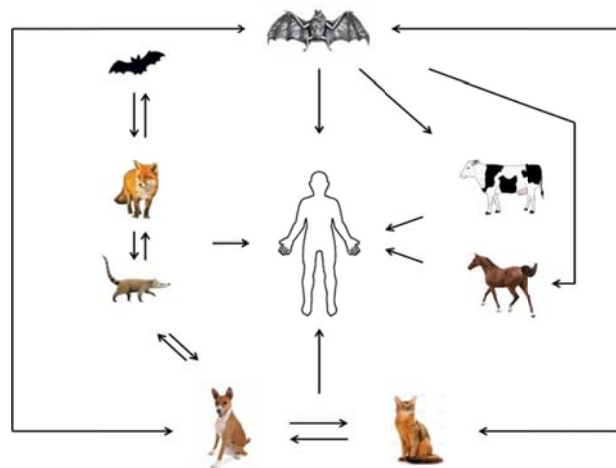


Figura 4. Ciclos de la rabia. La imagen detalla cómo ocurre la circulación del virus de la rabia, ya sea aérea o terrestre, entre las distintas especies afectadas

Patogénesis viral

Los virus de ARN de la familia *Rhabdoviridae* comprenden microorganismos que infectan artrópodos, plantas, peces y mamíferos. Si bien los *vesiculovirus* a menudo se utilizaron como modelo para estudiar los mecanismos de replicación y transcripción de rhabdovirus, nos

centraremos en los *lyssavirus*, que incluyen al virus de la rabia que es el más representativo de la familia (Figura 5).

La transmisión viral generalmente ocurre luego de que la saliva infectada de un animal hospedador pasa a un animal no infectado, como consecuencia de una mordedura o una lamida sobre piel dañada. Sin embargo, también existen otras formas poco probables de transmisión como son a través de las mucosas (ojos, nariz, boca), por aerosoles y trasplantes de córnea y órganos (en humanos).

Luego de la inoculación, el período de incubación puede durar días, semanas, meses o años. Los eventos precisos en esta etapa son desconocidos hasta el momento, sin embargo se cree que el virus se aloja en las cercanías del sitio de mordedura y desde allí invade las fibras musculares. La glicoproteína G es el único componente viral que media la entrada del virus a la célula hospedadora uniéndose a receptores celulares en las uniones neuromusculares, como es el receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR), la glicoproteína de adhesión celular (NCAM) y el receptor neurotrofina de baja afinidad p75 (p75^{NTR}). El virus viaja a través del sistema nervioso central de forma centrípeta, a través de axones motores y sensoriales por transporte retrógrado axonal rápido. Evidencia reciente, indica que la fosfoproteína del virus de la rabia interactúa con una proteína, la dineína LC8, la cual es importante en el transporte neuronal de actina y microtúbulos.

Las neuronas son infectadas en la médula espinal y subsecuentemente, hay una diseminación de neurona a neurona por transporte axonal rápido a lo largo de las conexiones neuroanatómicas. Esto ocasiona cambios de comportamiento, ya que afecta el área límbica, lo que torna más agresivos a los animales infectados predisponiéndolos a morder a otros individuos. Una vez avanzado el cuadro, se compromete al sistema nervioso parasimpático, infectando las glándulas salivares, piel, corazón y otros órganos. El virus rábico se elimina por la saliva, lo que es crucial para la transmisión a otros animales.

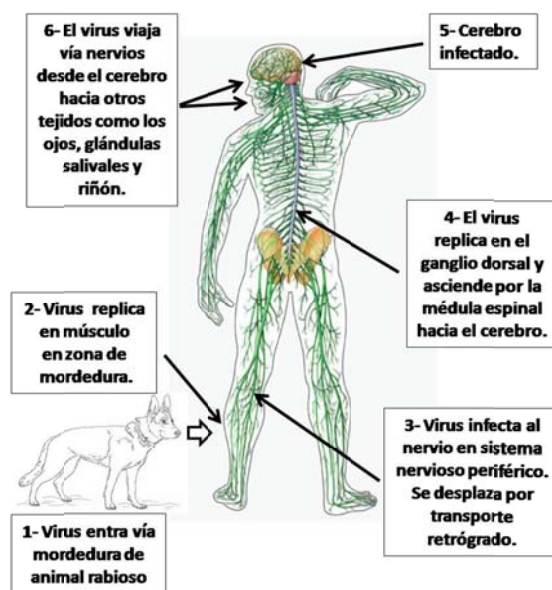


Figura 5. Patogénesis del virus de la rabia

Respuesta inmune

Durante el período de incubación, el virus de la rabia es segregado del sistema inmune, ya que no se observa respuesta de anticuerpos. Sólo después de que los síntomas neurológicos se desarrollan aparecen anticuerpos en el suero y más tarde en el líquido cefalorraquídeo (LCR).

Los anticuerpos en el LCR reflejan la producción local en el sistema nervioso central, así como la transferencia pasiva y están ausentes después de la vacunación. Su demostración sólo es útil para el diagnóstico en fases tardías de la enfermedad. Títulos vacunales en un paciente con rabia podrían generar confusión, pero en la enfermedad, los títulos aumentan a niveles que no observados en individuos vacunados.

Los anticuerpos neutralizantes son un componente esencial de la respuesta protectora. Sin embargo, una respuesta de IFN mediada por células T juega un papel de importancia en la protección.

Resumidamente, en la infección por el virus de la rabia, al igual que en otros rhabdovirus, están involucradas la respuesta inmune innata y adaptativa en conjunto. Durante la diseminación del virus desde el sitio de la mordedura hasta el cerebro, éste se enfrenta a los mecanismos de defensa del hospedador en diferentes pasos. En primer lugar las partículas virales depositadas en la piel o en el músculo debido a la mordedura son detectadas rápidamente por la primera línea de defensa (respuesta inmune innata). El sistema inmunitario innato puede detectar la presencia de microorganismos patógenos a través de "receptores de reconocimiento de patrones" (PRRS) que reconocen "patrones moleculares asociados a patógenos" (PAMPs) expresados por los microorganismos. Una vez detectado el virus de la rabia, estos receptores estimulan mediante cascadas de transducción de señales, la producción de quimiocinas, citoquinas inflamatorias y moléculas antivirales como interferones (IFN). Además, se produce la activación del complemento y la atracción de macrófagos, neutrófilos y células NK (*natural killers*) al sitio de infección. Esta respuesta inmune innata se desencadena en las primeras horas tras la entrada de patógenos y no es específica.

Las neuronas son capaces de desarrollar respuesta innata (liberación de INF, quimiocinas, citoquinas inflamatorias). Sin embargo y al igual que sucede con muchos otros virus, el virus de la rabia evolucionó y desarrolló sofisticadas estrategias para evadir la respuesta inmune innata. Las proteínas N y P interfieren en la defensa celular innata, disminuyendo notablemente la liberación de INF. Además, el virus de la rabia limita la respuesta inflamatoria en el sistema nervioso. Por lo tanto, la evasión de la respuesta inmune puede ser crítica para la progresión del virus en el sistema nervioso a través de la red neuronal que le permite alcanzar el tronco cerebral y las glándulas salivales.

La respuesta inmune adaptativa contra un virus neurotrópico que entra rápidamente en el sistema nervioso, se produce siempre en la periferia ya que el sistema nervioso está desprovisto de órganos linfoides. La activación de la respuesta inmune adaptativa se lleva a cabo en los órganos linfoides tales como los ganglios linfáticos o el bazo. La inmunidad adaptativa es específica contra el virus de la rabia. Su actividad está mediada por LB o LT e incluye una

respuesta humoral y una respuesta celular, que desencadenan mecanismos efectores específicos contra el virus. Los mecanismos de respuesta inmune adaptativa involucran la producción de LT CD4+, LT citotóxicos CD8+ virus específicos y la producción de anticuerpos específicos contra el virus.

Profilaxis y control

El principal punto a tener en cuenta en rabia es prevenir la infección. Para lograrlo deben tomarse una serie de medidas en conjunto: programas de vacunación anual de perros y gatos, control estricto de la población canina y felina callejera, control de la población de murciélagos y control de paso de animales en fronteras.

Los animales domésticos (especialmente perros y gatos) deben ser vacunados anualmente para prevenir que se infecten y puedan transmitir la rabia a las personas u otros animales. Los animales callejeros (perros en particular) también deben ser controlados ya que actúan como reservorios del virus de la rabia. Los animales salvajes son potencialmente portadores de rabia, por lo que no deben ser manipulados o alimentados. Los murciélagos deben mantenerse fuera de las casas o edificios y no deben manipularse. En algunos países se vacuna oralmente a animales salvajes para disminuir la presencia del virus en poblaciones animales salvajes.

En caso de animales potencialmente rabiosos, solo los veterinarios deberán manejarlos, con extrema precaución y equipamiento e indumentaria de seguridad apropiada. Al practicar la necropsia o en otras circunstancias en las que la exposición a los tejidos infecciosos podría ocurrir, la indumentaria necesaria incluye guantes gruesos de goma, gafas protectoras y delantal de goma.

Las mordeduras deben ser reportadas inmediatamente. En caso de accidente por mordedura o arañazo de un animal hacia una persona que conlleve un potencial riesgo de transmisión de virus de la rabia, los detalles sobre la especie del animal, el estado clínico del animal y la epidemiología local son importantes en esta evaluación. En tal caso, el animal debe ser observado por un periodo de diez días post exposición y evaluar su comportamiento. Si no muestra signos de rabia, no es necesario iniciar el tratamiento post exposición; caso contrario, se inicia tratamiento en la persona agredida (vacunación contra la rabia y la administración de inmunoglobulina antirrábica humana), se practica la eutanasia del animal y se realiza el diagnóstico. En caso de ocurrir un accidente en la zona de la cabeza, se inicia el tratamiento post exposición debido a la proximidad de la potencial zona de inoculación con el cerebro del agredido.

Para aquellas personas que tienen un alto riesgo de exposición al virus rábico, como ser veterinarios, cuidadores de animales, funcionarios de medio ambiente, trabajadores de laboratorio existe la vacuna inactivada. Los viajeros internacionales también pueden ser vacunados en algunos casos. Las personas vacunadas todavía deben recibir profilaxis posterior a la exposición, pero la vacunación elimina el requisito de inmunoglobulina antirrábica y disminuye el número de vacunaciones después de la exposición.

Pruebas diagnósticas

El diagnóstico de la rabia en seres humanos y animales es esencial para el tratamiento posterior a la exposición. Dependiendo del estado del paciente, se puede llevar a cabo un diagnóstico ante o post mortem (Tabla 1). Existen diferentes métodos de diagnóstico.

A) Diagnóstico *ante mortem*

Utilizando una muestra de biopsia de piel (nuca) puede realizarse una inmunofluorescencia directa (IFD). Para ella se utiliza un anticuerpo marcado con un fluorocromo que reacciona específicamente con el antígeno de la nucleocápside del virus. Un resultado positivo es indicativo de rabia pero el resultado negativo no descarta la posibilidad de infección. Si se emplea un panel de anticuerpos monoclonales anti nucleocápside del virus rábico, con la IFD puede realizarse tipificación antigénica.

Para diagnosticar rabia también pueden utilizarse muestras obtenidas de tejidos o de secreciones y fluidos biológicos tales como saliva, LCR o lágrimas. Se realizan inoculaciones intracraneales en ratones o cultivos celular de neuroblastos y detecciones de ARN viral, mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR).

El ensayo biológico es el método más sensible para detectar rabia y consta de inocular ratones intra-cerebralmente con las muestras obtenidas. En caso de una muestra positiva entre los días 7 y 15 post-inoculación los ratones se enferman. Una vez que se observan signos de enfermedad se puede detectar el antígeno rábico. En caso de ocurrir muertes el período de incubación para rabia, deben confirmarse por otras técnicas diagnósticas.

La RT-PCR es una técnica muy sensible que se basa en la detección del ARN viral. Sin embargo, pueden producirse resultados falsos positivos o falsos negativos, por lo que sólo se debe utilizar en combinación con otras técnicas convencionales. La RT-PCR se utiliza para clasificación viral.

Existen técnicas de diagnóstico que se basan en la detección de anticuerpos específicos al virus. Dentro de ellas se encuentran el ensayo de neutralización, el método rápido de inhibición de focos fluorescentes (RIFFT) y método enzimático ELISA.

El ensayo de neutralización en ratones para la determinación de anticuerpos presenta un alto grado de especificidad. Se realizan diluciones del suero a estudiar, se les añade una cantidad fija de virus estándar y se inoculan en ratones. Es un ensayo de serología básica, donde la falta de anticuerpos neutralizantes se manifiesta por la muerte o enfermedad del hospedador. Presenta las desventajas de la demora en el resultado y el empleo de animales.

En el RIFFT se incuban diluciones del suero a titular y un suero de referencia de título conocido, con una dosis fija de virus. Se añade una suspensión de células sensibles y luego de la incubación se observa con microscopio de fluorescencia. Teniendo en cuenta la disminución del título infeccioso, se puede calcular el título del suero desconocido por comparación con el suero de referencia. Es una técnica que tiene una sensibilidad equivalente al test de la seroneutralización con la ventaja de que en un día ya se tiene el resultado.

El ELISA (del inglés Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) es una técnica que permite la detección de anticuerpos anti virus rábico en suero o plasma del hombre y animales. Este ensayo permite en sólo 4 horas, calcular la concentración de anticuerpos de cada muestra desconocida.

B) *Post mortem*

Las muestras preferidas en el diagnóstico post mortem son las provenientes de tejido cerebral.

El ensayo más utilizado es la prueba de inmunofluorescencia en improntas de tejido cerebral que es el estándar de oro para el diagnóstico de la rabia. Puede ser necesario realizar un aislamiento del virus. Para ello es conveniente la inoculación en ratones de manera intracraneal o en cultivos celular de neuroblastos. Alternativamente, puede realizarse un ensayo molecular por RT-PCR aunque no se recomienda en la actualidad para el diagnóstico postmortem.

Tabla 1: Ensayos diagnóstico para rabia.

Muestra	Ensayo	Detección
<p>Ante mortem</p> <p>Biopsia de piel; repetir hasta obtener un diagnóstico</p> <p>Saliva, lágrimas, LCR; repetir hasta que se obtiene un diagnóstico</p> <p>LCR</p> <p>Suero</p>	<p>IFD RT-PCR</p> <p>Cultivo en tejido Inoculación en ratones RT-PCR</p> <p>No vacunados: ensayo inmediato* Vacunados: guardar y comparar unos días más tarde</p> <p>Neutralización ELISA RIFFT</p>	<p>Antígeno viral (N) ARN viral Aislamiento viral</p> <p>Aislamiento viral ARN viral Detección anticuerpos</p> <p>Detección anticuerpos</p> <p>Detección anticuerpos</p>
<p>Post mortem</p> <p>Cerebro Necropsia de dos o más muestras (tronco cerebral y cerebelo)</p>	<p>IFD sobre improntas de tejido cerebral Inoculación en ratones RT-PCR</p>	<p>Antígeno viral (N) ARN viral Aislamiento viral Detección de antígeno en el tejido fijado con formalina</p>
<p><i>IFD: Inmunofluorescencia directa. RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa. LCR: Líquido cefalorraquídeo. ELISA: del inglés Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay, es un método inmunoenzimático.* En pacientes no vacunados, los anticuerpos específicos de rabia aparecen en la segunda semana de la enfermedad. Se han detectado anticuerpos IgM específicos de rabia en suero y en algunos casos en LCF en bajas concentraciones, pero no antes que los anticuerpos IgG. Elevadas concentraciones de anticuerpos en el LCF han sido consideradas diagnósticas a pesar de la vacunación.</i></p>		

Referencias

- Albertini AA, Baquero E, Ferlin A, Gaudin Y. Molecular and cellular aspects of rhabdovirus entry. *Viruses*. 2012; 4(1):117–39.
- Bourhy H, Kissi B, Tordo N. Molecular diversity of the Lyssavirus genus. *Virology*. 1993; 194(1): 70-81.
- Dietzschold B, Cox JH, Schneider G. Structure and function of rabies virus glycoprotein. *Developments in biological standardization*. 1978; 40:45-55.
- Fuenzalida E. Laboratory techniques in rabies: suckling mouse brain vaccine. *Monograph Series*. 1973; 23:216-20.
- Gaudin Y, Raux H, Flamand A, Ruigrok RW. Identification of amino acids controlling the low-pH-induced conformational change of rabies virus glycoprotein. *J Virol*. 1996; 70(11):7371–78.
- Hampson K, Coudeville L, Lembo T, Sambo M, Kieffer A, Attlan M. Estimating the Global Burden of Endemic Canine Rabies. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015; 9(5):e0003786.
- Kouznetzoff A, Buckle M, Tordo N. Identification of a region of the rabies virus N protein involved in direct binding to the viral RNA. *J Gen Virol*. 1998; 79(5):1005–13.
- Lafon M. Rabies virus receptors. *J Neurovirol*. 2015; 11(1):82–7
- Lafon M, Lafage M, Martinez-Arends A, Ramirez R, Vuillier F, Charron D, Scott- Algara D. Evidence for a viral superantigen in humans. *Nature*. 1992; 358(6386):507–10.
- Macfarlan RI, Dietzschold B, Koprowski H. Stimulation of cytotoxic T-lymphocyte responses by rabies virus glycoprotein and identification of an immunodominant domain. *Mol Immunol*. 1986; 23(7): 733-41.
- Martinez L. Global infectious disease surveillance. *Int J Infect Dis*. 2000; 4(4):222-8.
- Mebatsion T, Weiland F, Conzelmann KK. Matrix protein of rabies virus is responsible for the assembly and budding of bullet-shaped particles and interacts with the transmembrane spike glycoprotein G. *J Virol*. 1999; 73(1):242–50.
- Shakin-Eshleman SH, Remaley AT, Eshleman JR, Wunner WH, Spitalnik SL. N-Linked glycosylation of rabies virus glycoprotein - individual sequons differ in their glycosylation efficiencies and influence on cell-surface expression. *J Biol Chem*. 1992; 267(15):10690–8.
- Superti F, Derer M, Tsiang H. Mechanism of rabies virus entry into cells. *J Gen Virol*. 1984; 65:781–9.
- Wiktor TJ, György E, Schlumberger D, Sokol F, Koprowski H. Antigenic properties of rabies virus components. *J Immunol*. 1973; 110(1):269-76.

CAPÍTULO 9

Togavirus

María Gabriela Echeverría, María Laura Susevich

La familia *Togaviridae* comprende virus de importancia en salud humana y animal y está formada por los géneros *Alfavirus* y el *Rubivirus*. En este capítulo haremos referencia a los *Alfavirus*, responsables de encefalitis en equinos principalmente y en el hombre y que son transmitidos por vectores, agrupándose por lo tanto dentro de los Arbovirus. El término Arbovirus (del inglés = *arthropod borne virus*) abarca un agrupamiento ecológico basado en su transmisión vectorial por artrópodos. Las familias pertenecientes a este grupo son *Asfarviridae*, *Bunyaviridae*, *Flaviviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Reoviridae* y *Togaviridae*. Una amplia gama de artrópodos hematófagos, entre ellos: jejenes (*Ceratopogonidae*), chinches de cama (*Cimicidae*), mosquitos (*Culicidae*), flebótomos (*Psychodidae*, *Phlebotominae*) y garrapatas (*Ixodidae*, *Argasidae*) son vectores de este grupo viral. Los vectores adquieren el virus por vía oral mientras se alimentan del vertebrado virémico quien contiene una carga viral suficientemente alta para generar infección. Así, en el intestino del artrópodo, el virus infecta el epitelio intestinal y replica en células epiteliales. Superada la barrera física de la lámina basal se dirige vía hemolinfa a las glándulas salivales donde se replica y acumula, transmitiendo el virus a un nuevo hospedador por inoculación de saliva infectada. También existen vías de transmisión alternativas como la transmisión venérea (entre mosquitos en la reproducción) y transovárica (de la hembra a su progenie). Pueden actuar como amplificadores aves y mamíferos como: roedores, primates y equinos, entre otros. En estos hospedadores puede provocar fiebre, encefalitis, fiebres hemorrágicas, etc. Provocan enfermedad neurológica moderada a severa con una mortalidad del 90% en algunos casos y en la naturaleza ocurren ciclos alternados de replicación en mosquitos y en otros vertebrados. Los togavirus, son arbovirus asociados principalmente a mosquitos, aunque algunos han sido aislados ocasionalmente de ácaros.

Los *Alfavirus* además de producir encefalitis conocidas como del nuevo Mundo (Encefalitis equina del Este, Oeste y Venezuela), producen artralgias en el hombre conocidas como Chikungunya, O'nyong-nyong, Mayaro, Ross River, Sindbis y Selva de Semliki, entre otros.

Estructura y propiedades fisicoquímicas

Las partículas virales son esféricas con un diámetro aproximado de 70-80 nm. La cápside de simetría icosaédrica, mide aproximadamente 40 nm y contiene 240 copias de proteína C (30-33 kDa) y espículas externas organizadas en 80 trímeros compuestos por las glicoproteínas de transmembrana (E1-45 kDa- y E2-58 kDa-) y la proteína perisférica E (E3-10kDa-). Cada espícula está constituida por tres pares de E1-E2 y se proyecta aproximadamente 80 nm por sobre la envoltura y se conectan unas a otras de manera compacta, formando así una capa proteica continua alrededor del virión, brindándole un aspecto de virus no envuelto. La bicapa lipídica característica de los togavirus deriva de la membrana plasmática de la célula hospedadora y está fuertemente unida a la cápside, lo que le da aspecto de toga o manto, de donde recibe su nombre. Debido a la composición lipoproteica de la envoltura, los togavirus son sensibles a solventes orgánicos y detergentes. Los viriones son estables a temperaturas de 4°C pero pierden infectividad a 56 °C, mientras que son sensibles a pH ácidos. La densidad de flotación en sucrosa de los togavirus oscila entre 1,18-1,22 g/cm³ mientras que el coeficiente de sedimentación es de aproximadamente 280 S.

El genoma está compuesto por ARN de cadena simple no segmentado y de polaridad positiva, formado por aproximadamente 11700 nucleótidos que codifica para 4 proteínas no estructurales (NSP1 -NSP4) y entre 4 a 5 proteínas estructurales (proteína de la nucleocápside C, proteínas de espícula E1 y E2 y en algunos géneros E3 y una proteína pequeña de transmembrana 6K). El extremo 5' del genoma posee un Cap y en el 3' una región poliA. Las proteínas C, E1, E2 y E3 son las responsables de la especificidad viral.

Mecanismo de replicación viral

La proteína E2 o la E1 son las responsables de la adsorción y penetración viral en el ciclo infeccioso. Luego de la adsorción viral al receptor celular (identificado hasta el momento como glicolípidos o heparán sulfato, lectinas, integrinas y lamininas) y en un evento mediado por la región más externa de la E2, se forma un poro y la envoltura viral se fusiona con la membrana del endosoma (evento mediado por E1) permitiendo a la nucleocápside liberarse al citoplasma a consecuencia de la disminución del pH que provoca un cambio conformacional irreversible en las proteínas E1-E2 debilitando su unión. Una vez que se libera el ARN en el citoplasma, se produce la replicación del genoma y la síntesis de proteínas. El genoma contiene 2 ORFs (del inglés= *open reading frame*), el primero de los cuales es traducido directamente del ARN genómico y codifica para las proteínas no estructurales requeridas para la síntesis de ARN viral (evento temprano). Estas proteínas no estructurales actúan como helicasas, trifosfatasa, proteasas, y adicionan Cap al 5' del ARN genómico y subgenómico. El segundo ORF se transcribe a través de un ARNm subgenómico formado de la cadena de ARN negativo que actúa como intermediario replicativo y codifica para las proteínas estructurales. Esta cadena subgenómica de ARN positivo se traduce a una poliproteína que luego será clivada en las

proteínas de la cápside y precursores: C, Pe2, 6K y E1 para finalmente clivarse en E1 y E2 (evento tardío) (Figura 1). Posteriormente las proteínas E1 y E2 clivadas son transportadas al retículo endoplásmico, glicosiladas y procesadas a través del aparato de Golgi y subsecuentemente migran a la membrana celular. La cápside se forma por asociación de proteína C y la incorporación del ARN genómico formando la nucleocápside que se alinea a las regiones de la membrana plasmática que contienen los heterodímeros E1-E2, liberando finalmente las partículas virales por gemación.

Los togavirus replican *in vitro* en cultivos primarios o en diversas líneas celulares provenientes de mosquito (C6/36), aves, peces, reptiles y mamíferos (BHK-21, Vero). Las infecciones producen un extenso efecto citolítico en líneas celulares derivadas de vertebrados y un efecto poco evidente en líneas derivadas de invertebrados caracterizado por persistencia viral. *In vivo* se utilizan ratón lactante, pollitos, o huevos embrionados. Este amplio rango de hospedadores refleja el mantenimiento de los alfavirus en la naturaleza por alternar ciclos de replicación en mosquitos y vertebrados.

Patogénesis viral

El modo primario de transmisión de los alfavirus a aves y mamíferos es mediante los mosquitos, los cuales se infectan al picar un hospedador infectado en estado de viremia. Así, el virus replica primariamente en el intestino medio, se transporta luego por hemolinfa hacia las glándulas salivares donde replica nuevamente (entre 4 a 10 días después de su ingestión) y genera el estado de persistencia en el mosquito pudiendo transmitirse a aves y otros mamíferos (Figura 1). Posteriormente a la picadura, el virus se introduce en los capilares y replica en el endotelio vascular, células dendríticas y en los monocitos, para luego diseminarse por vía sanguínea (viremia) circulando libre en plasma y replicar en músculos, articulaciones, piel o cerebro. La neuroinvasividad es una propiedad de ciertas cepas virales resultando en necrosis neuronal con neuronofagia e infiltración mononuclear. El virus puede migrar hacia el sistema nervioso central (SNC) por distintos medios: difusión a través el endotelio vascular; replicación en endotelio vascular; invasión viral de líquido cefalorraquídeo; transporte mediante células inflamatorias que migran al parénquima; replicación en epitelio respiratorio y vía axonal migra al bulbo olfatorio y a cerebro, y una vez que el virus alcanza el SNC no vuelve a sangre.

El ciclo replicativo es dependiente del hospedador, evidenciado por el hecho que los alfavirus provocan enfermedad aguda en los vertebrados y en los invertebrados infección persistente.

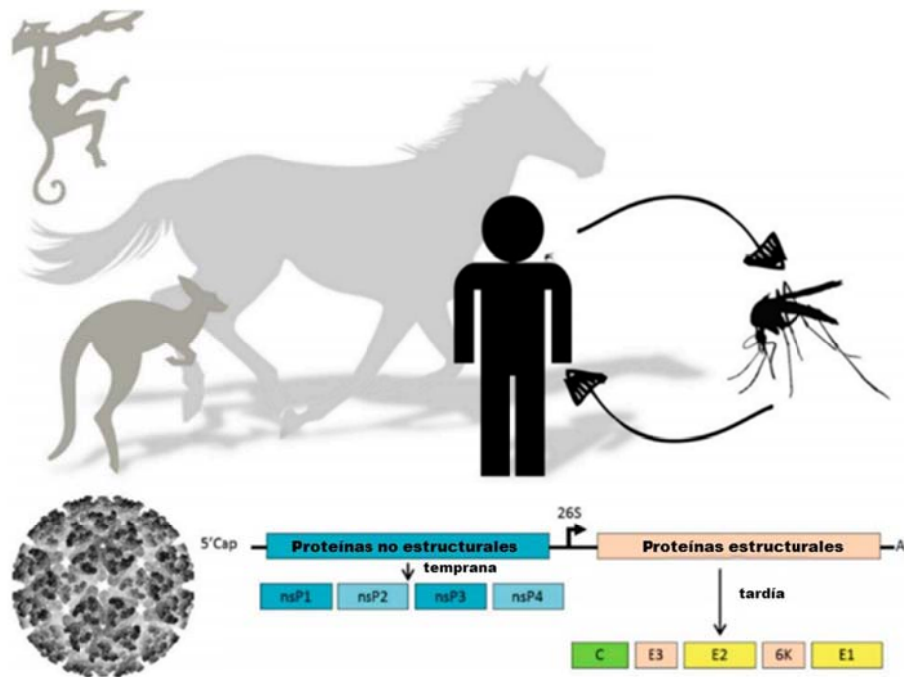


Figura 1: (arriba) representación esquemática del ciclo de transmisión de los alfavirus; (abajo) partícula viral y esquema de la organización genómica. La traducción de las proteínas no estructurales ocurre inmediatamente desde el genoma viral mientras que la traducción de las proteínas estructurales ocurre más tarde a través de un RNA mensajero subgenómico (Adaptada de Fros y Pijlman, Viruses 2016)

Signos clínicos

La enfermedad puede ser clínica o subclínica dependiendo de la sensibilidad del hospedador, serotipo viral, dosis infectante, vía de infección, competencia y eficacia del vector. El período de incubación es de 3-12 días y se presenta clínicamente con fiebre, disfagia, anorexia, trastornos neurológicos como excitación, hiperestesia, movimientos en círculos, depresión, parálisis de labios y miembros. La respuesta febril durante la viremia es de menor magnitud con Oeste y de magnitud mediana en Este y Venezuela. La muerte puede ocurrir entre 12 horas y 10 días pos-infección. En la observación histopatológica aparece degeneración neuronal, meningoencefalitis con destrucción neuronal, neuronofagia, gliosis con infiltración de linfocitos y neutrófilos e inflamación en el endotelio vascular. Todas las áreas del cerebro están afectadas en distintos grados. En el hombre, se acompaña de fiebre, dolor occipital y retroorbital, anorexia, mialgia, artralgia. En pocos casos se presentan síntomas nerviosos (fotofobia, rigidez de nuca, convulsiones y parálisis). El hombre puede infectarse con los virus Este, Oeste y Venezuela tanto selvático como enzoótico.

Los ciclos epidémicos de Este y Oeste son mantenidos en la naturaleza en ciclos selváticos o enzoóticos entre mosquitos ornitofílicos y aves paseriformes quienes actúan como reservorios naturales y huéspedes amplificadores del virus. Cuando el ciclo endémico es interrumpido se transmiten a equinos y hombre por los mosquitos causando epidemias, aunque estos mamíferos se consideran hospedadores terminales ya que no desarrollan una elevada

viremia. Esa diferencia hace que los casos en humanos de Este y Oeste en América latina sean esporádicos, no así los casos de Venezuela. En aves se pueden producir los mismos signos nerviosos.

Respuesta inmune

La infección por alfavirus resulta en la inducción de una robusta respuesta inflamatoria tanto en humanos como animales. El heterodímero E1-E2 es altamente inmunogénico e induce la producción de anticuerpos neutralizantes protectores. Se desarrollan tanto la respuesta inmune del tipo humoral y celular. En la inmunidad humoral, los anticuerpos IgM específicos son detectados de manera temprana en la infección mediante las técnicas de ELISA o virusneutralización (VN), mientras que los anticuerpos neutralizantes y hemaglutinantes de tipo IgG se desarrollan entre los 10 y 14 días pos-infección y persisten meses luego de la infección. Respecto a la respuesta inmune celular, los linfocitos T citotóxicos intervinientes secretan perforinas para aumentar la permeabilidad de las células infectadas lo que conlleva a la muerte de las mismas. Del mismo modo, las células NK intervienen en la lisis celular de las células infectadas. La exposición natural conlleva a una inmunidad prolongada. Si bien la vacunación en Argentina está autorizada en equinos y personal de laboratorio involucrado, únicamente con vacuna inactivada conteniendo virus del Este y Oeste, en el año 2016, el SENASA autorizó la vacunación voluntaria frente a estas enfermedades. La inmunidad pasiva mediante calostro de yeguas madres recobradas o recién vacunadas es recomendable en casos de enfermedad clínica. En estudios realizados en alfavirus productores de artralgias se observó que la fase aguda de la infección se caracteriza por las concentraciones elevadas de factores proinflamatorios de la inmunidad innata como IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-15, IP-10 y MCP-1 que regula la migración e infiltración de monocitos/macrófagos, mientras que la IL-2 e IL-9 implicadas en la estimulación de la proliferación celular, están significativamente elevadas en la etapa convaleciente y permanecen en esos niveles hasta los 3 meses pos-infección. Durante el año pos-infección la respuesta inmune se caracteriza por concentraciones elevadas de IL-1 β , IL-5, IL-10, IL-12p70, IL-17, IFN γ y TNF α .

Profilaxis y control

La prevención de los alfavirus debe ser acompañada principalmente de la eliminación de los vectores mediante campañas masivas de eliminación por insecticidas o larvicidas químicos. En Argentina la vacunación voluntaria es bivalente (Oeste y Este), producida en cultivos celulares e inactivada con formalina. En adultos se recomienda administrar 2 dosis anuales y en hembras preñadas se recomienda vacunar a los 9 meses de gestación. A los potrillos de madres vacunadas es recomendable administrar 2 dosis y realizar la revacunación anual. La vacuna contra el virus Venezuela es a virus activo y en Argentina está prohibida.

Algunos alfavirus productores de artralgias en el hombre, fiebre y eritema, están relacionados serológicamente con las encefalomiELITIS Este, Oeste y Venezuela, y tienen distinta distribución geográfica son los siguientes: Chikungunya (África y Asia), O'nyong-nyong (África), Mayaro (América del Sur y Central), Ross River (Australia), Sindbis (Europa-África y Asia-Australia) y Selva de Semliki (África-Asia). También involucran animales salvajes, aves, primates y mosquitos.

Diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico presuntivo puede realizarse en base a los signos clínicos neurológicos coincidiendo con épocas calurosas. Las técnicas serológicas recomendadas son la seroprotección en ratones o huevos embrionados o la virusneutralización en cultivos celulares (VN), la inhibición de la hemaglutinación (IHA), la inmunofluorescencia y la neutralización de placa. La confirmación serológica requiere del incremento o disminución de 4 diluciones del título de anticuerpos en muestras pareadas tomadas con 15 días de diferencia preferentemente. Para el aislamiento viral, se recomienda utilizar tejidos del sistema nervioso central o plasma de animales con pico febril, los cuales deben ser obtenidos en forma estéril y ser enviados refrigerados si van a recibirse dentro de las 48 horas de extraídas. Se pueden inocular por vía intracerebral ratones adultos y lactantes, pollitos y cobayos, o en cavidad alantoidea o saco vitelino de embriones de pollo. En cualquiera de los casos, se produce la muerte. También, las muestras procesadas se inoculan sobre monocapas de cultivos primarios de embriones de pollo o pato o de riñón de hámster o en células de línea como Vero, BHK-21, RK13 o HeLa. Las líneas celulares de mosquito también pueden utilizarse pero en ellas no se produce un efecto citopático (ECP) marcado, sino que se establece por lo general persistencia viral. Además, puede utilizarse la hemadsorción para determinar células infectadas. Para el relevamiento de mosquitos puede utilizarse ELISA de captura o RT-PCR, al igual que para confirmar la sospecha o aislamiento positivo. Debido a la importancia de las encefalomiELITIS como zoonosis, el diagnóstico de laboratorio se realiza únicamente en laboratorios con cabina de seguridad 3 y con personal inmunizado. Es muy importante realizar además un diagnóstico diferencial con otras encefalomiELITIS producidas por intoxicación, leucoencefalomalacia, botulismo, rabia o encefalitis producidas por protozoos.

EncefalomiELITIS equina

La enfermedad está producida por tres virus antigénicamente distintos: el virus del Oeste, el del Este y Venezuela los cuales formaron parte del grupo A de la clasificación original de los arbovirus. Las tres especies virales pueden diferenciarse y subtipificarse a su vez por la reactividad en distintas pruebas de IHA, VN o mediante el uso de anticuerpos monoclonales

como así también mediante secuenciación. Sin embargo, a modo de facilitar la comprensión es que se describen como un complejo viral que se diferencia principalmente por su localización geográfica. Son enfermedades de presentación estacional en climas templados o tropicales, que se desarrollan en condiciones ideales para la replicación viral y donde la población de mosquitos es elevada. El ciclo endémico (enzoótico) de las encefalomieltis involucra la replicación en vectores (mosquitos) y reservorios como aves (Este y Oeste) y mamíferos roedores (Venezuela). En períodos epidémicos (epizoóticos) pueden infectarse los hospedadores naturales equino y hombre. Estos alfavirus existen en hábitat geográficos definidos mediante ciclos de transmisión entre hospedadores artrópodos y vertebrados que contribuyen a la persistencia viral, distribución geográfica y amplificación.

Encefalomieltis del Este: esta enfermedad es producida por un virus altamente patógeno para humanos y equinos que se distribuye en la costa este de América, desde Canadá hasta Argentina. En América del Sur fue aislado por primera vez de equinos en Argentina durante un brote ocurrido en 1936. Por otro lado, en el año 1988 se registró el último brote en nuestro país.

Puede producir encefalitis en hombre, equino, paloma y faisán. Muchas otras aves son susceptibles a la infección que permanece en forma asintomática a pesar de la viremia prolongada. Se han descrito otros mamíferos reservorios como roedores, marsupiales y aves migratorias y en menor frecuencia reptiles y anfibios. Principalmente el ciclo primario está mantenido en pantanos donde habitan los vectores y reservorio. En América Central y del Sur, los mosquitos implicados en este ciclo son del género *Culex* subgénero *Melanoconion*.

Las epizootias pueden ocurrir aproximadamente cada 5 o 10 años coincidiendo con temporadas de lluvias. La mayoría de las infecciones en el hombre son subclínicas o producen solo un leve aumento de la temperatura. Aun siendo el más virulento de los alfavirus, en pocos casos suelen producirse síntomas de encefalitis en el hombre, que en caso de manifestarse solo el 20 % de estos pueden ser mortal. Sin embargo, en equinos con signología la mortalidad alcanza aproximadamente al 90 %. Dentro de los virus Este, existen también dos variables antigénicas diferenciables por pruebas de IHA que tienen una distribución geográfica particular, tipo norteamericano (más patogénicas para el hombre y equino) y tipo sudamericano.

Encefalomieltis del Oeste: integra un complejo antigénico constituido por seis especies virales. Circula desde el Ártico hasta Argentina; es la más frecuente en centro y oeste de EE.UU. y la de predominio en Argentina. También puede producir encefalitis en hombre y equino aunque en menor frecuencia respecto a los virus Este y con una mortalidad en equinos de hasta el 50 %. En algunas regiones de América del Sur, la mayoría de los mosquitos de los que se aisló este virus, se alimentan principalmente de pequeños mamíferos, existiendo evidencia serológica que la infección natural puede producirse en ratas y conejos; además en pollos y faisanes. Existen 3 variantes distribuidas en Sudamérica que tienen reducida patogenicidad con respecto a las que actúan en América del Norte. En Argentina podemos mencionar dos tipos de ciclos; uno que se podría denominar primario de mantenimiento del

cual se desconocen sus componentes y que se correspondería al demostrado en Estados Unidos entre *Culex tarsalis* y gorriones (*Passer domesticus*). El otro sería el ciclo amplificador entre *Aedes albifasciatus* y mamíferos de las familias *Cavidae* y *Leporidae* u otros mamíferos.

Encefalomiелitis Venezuela: se distribuye en toda América desde EE.UU. hasta Perú y Brasil y las epizootias ocurren cada 10 años aproximadamente. También se infecta al hombre y el equino pero las cepas enzoóticas producen solo en estos últimos una infección de tipo asintomática que inmuniza y protege ante la infección de cepas epizoóticas y no producen un alto porcentaje de encefalitis. El hombre y los equinos actúan como amplificadores ya que desarrollan elevada viremia por lo tanto, se puede transmitir la enfermedad vía picadura de mosquitos a otros equinos y hombres (ciclo mosquito-equino-mosquito). También están involucrados roedores y aves como reservorios. El ciclo selvático que involucra a mosquitos y roedores, no causa enfermedad clínica en equinos. Sin embargo estimulan la producción de anticuerpos y pueden proveer inmunidad cruzada protectora ante una infección subsecuente con virus epizoótico. La incidencia de encefalitis en humanos infectados es de hasta el 5 %, con una mortalidad menor a 1 %. En equinos, la mortalidad puede alcanzar hasta el 80 %. Los virus Venezuela poseen 6 subtipos principales (I a VI) que varían en su patogenicidad para equinos debido principalmente a diferencias antigénicas. Además, varían de acuerdo al tamaño de las placas líticas en células Vero y a su capacidad hemaglutinante a pH de 6 o 6,5.

Referencias

- Aréchiga-Ceballos N, Aguilar-Setién A. Alphaviral equine encephalomyelitis (Eastern, Western and Venezuelan). *Revue Scientific Technical Office International Epizooties* 2015, 34: 491-501.
- Berón CM. Investigaciones sobre mosquitos de Argentina / Corina M. Berón ... [et al.] ; compilado - 1a ed. - Mar del Plata: Universidad Nacional de Mar del Plata, 2016. Archivo Digital: descarga y online. ISBN 978-987-544-721-9
- Flaviviridae. En Fenner's Veterinary Virology 4th edition, MacLachlan J and Duvovi E eds, Academic Press 2011, 476-481
- Fros JJ, Pijlman GP. Alphavirus Infection: Host Cell Shut-Off and Inhibition of Antiviral Responses. *Viruses* 2016, 8, 166; doi:10.3390/v8060166
- Griffin D. Alphaviruses. En: Knipe DM, Howley PM (Eds.). *Fields Virology* 5ta.Edición. 31 New York, 2007 pp 1024-1067.
- International Committee on Taxonomy of Viruses. 2014. Disponible en: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>.
- OIE Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals. Chapters 2.5.3 y 2.5.12. 2004
- Rupp JC, Sokoloski KJ, Gebhart NN, Hardy RW. Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. *Journal of General Virology* 2015, 96: 2483-2500
- Samuel M, Diamond M. Pathogenesis of West Nile Virus Infection: a Balance between Virulence, Innate and Adaptive Immunity, and Viral Evasion. *Journal of Virology* 2006 80: 9349–9360
- Santiago FW, Halsey ES, Siles C, Vilcarromero S, Guevara C, Silvas JA, Ramal C, Ampuero JS, Aguilar PV. Long-Term Arthralgia after Mayaro Virus Infection Correlates with Sustained Proinflammatory Cytokine Response. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2015, 1-14
- Togaviridae. En Fenner's Veterinary Virology 4th edition, MacLachlan J and Duvovi E eds, Academic Press 2011, 455-465.

CAPÍTULO 10

Virus que afectan a las abejas (*Apis mellifera*)

Francisco J. Reynaldi, Alejandra E. Larsen, Guillermo H. Sguazza

La apicultura resulta importante para el hombre, fundamentalmente por el rol que cumple la abeja melífera como polinizador de cultivos representando el 35 % de la polinización necesaria de los cultivos del mundo que producen alimentos básicos para el hombre. A escala mundial, se estima que de las 115 especies de importancia económica que se cultivan, 87 (correspondiente al 75 % que necesita polinización biótica) incrementan en mayor o menor medida su producción cuando sus flores son visitadas por polinizadores. La polinización no solo asegura la sustentabilidad productiva de los cultivos, sino también la reproducción sexual de un gran número de plantas con flores que en forma indirecta preserva el mantenimiento de la biodiversidad de la mayoría de los ecosistemas terrestres.

En el año 2014, Argentina llegó a ocupar el 2.º lugar como exportador mundial pero actualmente se encuentra en el 5.º, debido a la disminución en la producción de miel y al número de colmenas. Esta merma en la producción es reflejo de una situación que se viene observando en los últimos años en distintos países productores de miel.

Por su importancia en la sustentabilidad de los cultivos necesarios para alimentar un mundo con sobrepoblación y escasez alimenticia, es prioritario el estudio de los virus que afectan a los distintos polinizadores bióticos, en especial a la abeja. En este capítulo se desarrollarán las dos familias virales a la cual pertenecen los virus de mayor importancia en abejas ya sea por su impacto económico como por importancia biológica para la vida en el planeta.

Las abejas (*Apis mellifera*) son afectadas por una gran cantidad de enfermedades infecciosas incluyendo virus, bacterias, hongos, protozoos y nematodos. En general, las enfermedades de origen viral no producen signos clínicos en las colonias, por lo que eran poco detectadas. Sin embargo, algunos autores consideran que la inmunosupresión debida a parásitos como el ácaro *Varroa destructor* induce la replicación viral. Más aún, otros autores relacionaron algunos virus que afectan a las abejas con el devastador Síndrome de Despoblamiento de las Colmenas (SDC). Desde entonces, el papel de los virus en las enfermedades de las abejas es una preocupación creciente, sobre todo teniendo en cuenta su relación con el SDC que diezmoó cerca del 25 % de las colmenas en EE.UU. en la temporada

2006-2007 y fue, en parte, responsable de la disminución del 2 % de la producción mundial de miel esa temporada. En la actualidad, el SDC sigue siendo un problema particularmente en América del Norte y Europa y si bien en Argentina no existen denuncias formales ante SENASA, ya se detectaron casos de mortandad de colmenas en diversos lugares del país.

Características de los virus que afectan a las abejas

Estructura y composición

En la actualidad, hay 24 virus identificados que afectan a las abejas melíferas. Una particularidad de los virus ARN es que muchos de ellos están muy relacionados entre sí, incluso en muchos casos se los considera cuasi-especies y hasta una misma especie viral, lo que reduciría la cantidad a 16-18 verdaderamente únicos. En general los virus ARN, de ubicación taxonómica conocida, pertenecen al Orden Picornavirales y las familias representadas son *Iflaviridae* y *Dicistroviridae*, excepto por el virus Filamentoso de las abejas y el Apis iridescent virus, el resto de los virus que ataca a las abejas son esféricos u ovals (20-30 nm de diámetro), con simetría icosaédrica, desnudos, con coeficiente de densidad en CsCl entre 1,33 a 1,42 g/ml y coeficiente de sedimentación de 100-190 S (Figura 1). Debido a las características similares que presentan estos virus, resulta muy difícil distinguirlos morfológicamente por microscopía electrónica. Los virus que afectan a las abejas son, en general ARN simple cadena y de polaridad positiva y pertenecen al grupo de los “Picorna-like” virus. El genoma viral está compuesto por una simple hebra de ARN cubierta por una cápside proteica. El genoma (ARN) está unido de manera covalente en el extremo 5' a una proteína viral (VPg), mientras que en el extremo 3' presenta una cola de poliA. Al final del extremo 5' existe una Región Larga no Traducible (UTR por su sigla en inglés). La replicación de los virus ocurre en el citoplasma de las células hospedadoras. La partícula viral se adhiere a la superficie de la célula blanco, interactúa con sus receptores de membrana e inyecta el genoma viral en el interior de la célula. De acuerdo con el orden en que se encuentran las proteínas en el genoma, los virus de las abejas se dividen en dos grupos: bicistrónicos (Figura 2) y monocistrónicos (Figura 3). Luego, el genoma se traduce en una única poli-proteína (monocistrónicas) o dos poli-proteínas (bicistrónicas). Ambos tipos de genoma codifican proteínas estructurales (VP1, VP2, VP3 y VP4) y no estructurales (helicasa, proteasa y RdRp RNA polimerasa dependiente de ARN que es la encargada de realizar la copia del genoma viral). La poliproteína estructural se sintetiza a partir de una pre-proteína (VP0) que luego es escindida por una proteasa para dar lugar a las 4 proteínas estructurales. Con la ayuda de la ARN polimerasa dependiente de ARN, la hebra de ARN positiva del genoma viral se copia a una hebra de polaridad negativa intermedia, que servirá como molde para la replicación de nuevas hebras genómicas que serán incluidas en las partículas virales de la progenie. Todos estos virus ARN de simple cadena con polaridad positiva tienen aproximadamente 9 a 10 kb de

longitud y las partículas virales tiene un tamaño aproximado de unos 30 nm de diámetro y simetría icosaédrica.

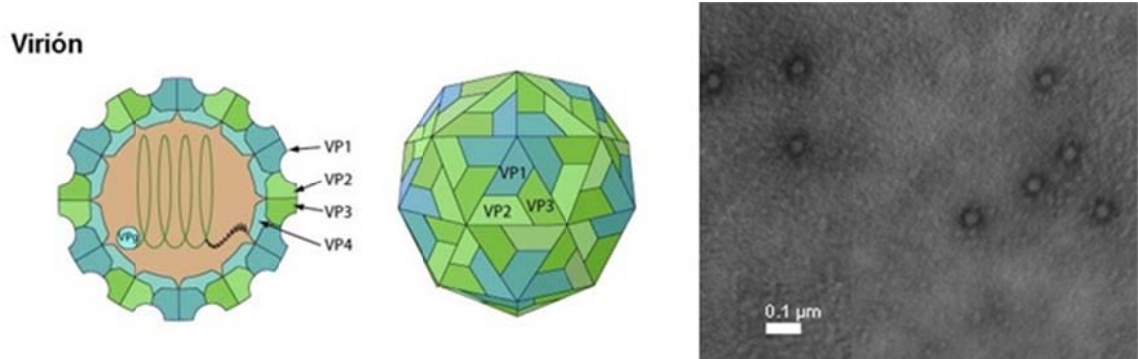


Figura 1. Esquema del virus flavivirus (Modificado de http://viralzone.expasy.org/all_by_species/278.html).
Microscopía electrónica del Virus de las alas deformadas (DWV)

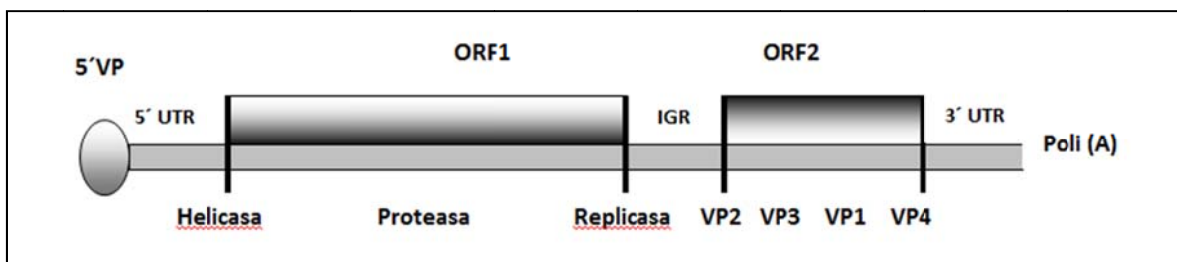


Figura 2. Genoma Monopartito bicistrónico, que presentan genes no estructurales en el extremo '5 y genes estructurales en el '3. Por ejemplo ABPV, BQCV, KBV y IAPV.

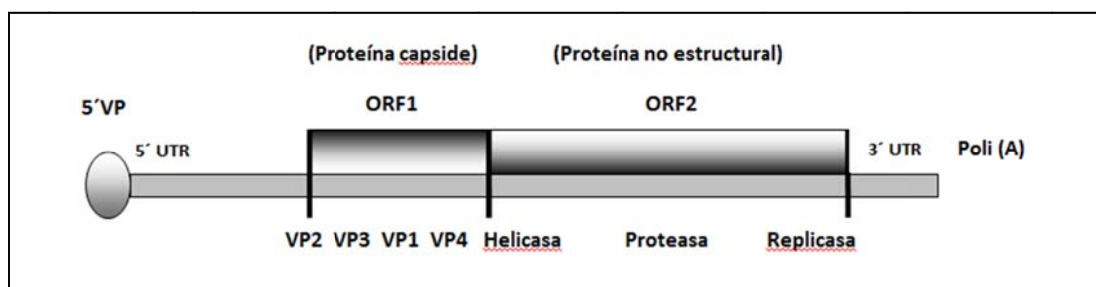


Figura 3. Genoma Monopartito monocistrónico, que presentan genes estructurales en el extremo '5 y genes no estructurales en el '3. Por ejemplo SBV y DWV.

Epidemiología

La epidemiología de estas infecciones virales resulta muy compleja de estudiar, debido al entramado ambiental en el que se insertan las abejas. Sin embargo, se sabe que un ácaro (*Varroa destructor*) juega un rol fundamental en la diseminación de la mayoría de estas virosis e

incluso algunos virus como el de las alas deformadas (DWV) o *Varroa-destroyer-Virus* pueden replicar dentro de él, transformando a este ácaro en un vector biológico (Figura 4). Además, la detección de algunas virosis en otros ápidos (no abejas) que comparten el mismo ambiente, genera nuevas preguntas para la comprensión de estas infecciones, llevando a las flores a un lugar central en este escenario ya que son visitadas por todos ellos. Este hecho hace muy complejo su estudio y el diseño de medidas de control.



Figura 4: Abeja melífera con ácaros (*Varroa destructor*) y alas en muñón debido a DWV

Diagnóstico

Si bien el diagnóstico de algunas infecciones virales como DWV, virus de la cría ensacada (SBV), virus de las celdas reales negras (BQCV) puede realizarse en base a los signos clínicos, existen otras enfermedades que comparten signos clínicos como la incapacidad de volar, arrastrar el abdomen o poseer poca coordinación al caminar, temblores corporales, etc. Por tal motivo, el diagnóstico de laboratorio resulta fundamental. Identificar los virus por microscopía electrónica es muy complejo ya que presentan características morfológicamente similares. Por ello, se desarrollaron métodos más sencillos como inmunodifusión, western blot y ELISA. Hasta hace poco tiempo, la inmunodifusión de Outcherlony era la técnica más utilizada debido a su rapidez, relativa especificidad y bajo costo, aunque la gran desventaja que tenía era la baja sensibilidad, lo que imposibilitaba el diagnóstico de infecciones latentes, pudiendo dar reacciones cruzadas entre virus relacionados como el virus israelí de la parálisis aguda de la abejas (IAPV), el virus de la parálisis aguda de la abejas (ABPV) y virus Kashmir de las abejas (KBV). Teniendo en cuenta las posibles co-infecciones virales que ocurren en abejas y sabiendo que las técnicas inmunoserológicas son poco específicas y no permiten detectar infecciones latentes, en la actualidad se prefiere la RT-PCR (retro-transcripción-PCR) como la

prueba más adecuada para la detección de virus ARN en muestras de abejas ya que los resultados obtenidos son más sensibles y específicos.

Tratamiento y control

Israel y EE.UU. son los únicos países que tienen aprobados tratamientos terapéuticos para control de DWV e IAPV, el cual se basa en el uso de ARNi (ARN de interferencia). Esta técnica se basa en el uso de un ácido nucleico que, administrado con el alimento (jarabe de azúcar), introduce pequeñas secuencias de ARN complementarias al virus a tratar. De esta manera, el virus comienza su replicación pero no puede completarla debido a que la ARN polimerasa viral queda "trabada" en el lugar donde se pegó esta secuencia viral interferente.

Respecto al monitoreo de estas virosis, existen dos factores que tiene un papel fundamental:

- a. El control del ácaro vector (*Varroa destructor*) con la finalidad de que disminuya la circulación viral entre colmenas y entre colmenares.
- b. El manejo productivo y sanitario de la colonia. Si la infección viral ya está presente, se puede evitar y/o minimizar la aparición de los signos de la enfermedad, optimizando otros factores que garanticen el equilibrio de la colonia de abejas, como la alimentación adecuada según el momento productivo, manejo de los espacios dentro de la colonia y control de otras enfermedades.

Respuesta inmune

Los insectos entre ellos las abejas, a diferencia de los vertebrados superiores, carecen de inmunidad adaptativa y en compensación desarrollaron un sistema inmune innato muy adaptado que les permite responder a los patógenos específicos con los que co-evolucionaron. El estudio del sistema inmune de las abejas, se basa en el sistema inmune de vertebrados superiores así como de aquellos insectos utilizados como la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster* y el mosquito *Anopheles gambiae*).

El estudio de la composición, estructura y función del genoma de *Apis mellifera*, permitieron conocer y predecir los componentes del sistema inmune, receptores de reconocimiento, efectores y vías implicadas en la defensa frente a infecciones.

Una peculiaridad del genoma de las abejas es que muestra mayor similitud con el genoma de vertebrados que con los de *Drosophila* y *Anopheles*. Ejemplo son los genes implicados con el ritmo circadiano, las vías de ARN de interferencia y la metilación del ADN, entre otros. Tiene menos genes relacionados con el sistema inmune, con proteínas de la cutícula y receptores de la degustación que los dípteros, en contraste con una mayor cantidad de genes que codifican receptores del olor y otros propios para la utilización de polen y néctar. Estas características

tienen relación directa con su comportamiento y organización social. En comparación con *Anopheles* o *Drosophila*, *A. mellifera* presenta un tercio de sus genes relacionados con el reconocimiento y señalización de los efectores inmunes. Esta disminución de genes estaría compensada por la inmunidad social, la cual se caracteriza por diversos mecanismos de defensa propios de las abejas que determina el comportamiento cooperativo de la colonia. Algunos de los mecanismos más comunes son la fiebre social, el acicalamiento, el comportamiento higiénico, la recolección de propóleo y el canibalismo de la cría, entre otros. Estas particularidades postulan a la inmunidad social como una estrategia de defensa que en gran medida disminuye la presión sobre el sistema inmune del individuo, dando como resultado un menor número de genes destinados para la defensa contra la infección.

Por las características de estos insectos (vida media corta, tamaño pequeño) y la falta de disponibilidad de líneas celulares para su cultivo *in vitro*, el estudio del sistema inmune de las abejas se basa en la búsqueda de genes homólogos a componentes del sistema inmune innato de otros organismos vertebrados e invertebrados. En base a esto, si un gen está presente en vertebrados e invertebrados, es muy probable que exista en las abejas. De este modo, se está completando el rompecabezas de su sistema inmune, aunque todavía faltan muchas piezas por descubrir.

El sistema inmune de las abejas tiene la misma secuencia de eventos que el sistema inmune innato de los vertebrados, activación de las vías de señalización y síntesis o activación de efectores solubles o celulares respectivamente. Para el proceso de reconocimiento, las abejas cuentan con receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) de señal y endocíticos, capaces de reconocer Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs).

En los insectos, los PRRs de señal son los receptores Toll (que en vertebrados superiores son receptores similares a Toll, TLR por sus siglas en inglés *Toll like receptors*) que cumplen una función crítica tanto en el desarrollo ontogénico como en el sistema inmune. Se identificaron 5 genes relacionados con Toll en abejas, Toll-1,-6, -2/7, -8, -10. Algunos receptores Toll no contactan directamente con su PAMP específico, sino que reconocen una proteína (denominada Späetzle) adaptadora entre el PAMP y el receptores Toll, similar a lo que ocurre entre el LPS, CD14 y el TLR4 en vertebrados superiores. También presentan receptores para el reconocimiento del péptidoglicano (PGRP por sus siglas en inglés) de las bacterias grampositivas. Los receptores Toll representan el primer paso para el inicio de la respuesta inmune, activando distintas vías la señalización que, pasando por procesos de reclutamiento de proteínas adaptadoras y activación de proteinquinasas, inducen la activación de factores de transcripción homólogos de FNkB, con la consiguiente desregulación de genes que codifican efectores del sistema inmune.

Se demostró que la vitelogenina¹³ reconoce Patrones Moleculares Asociados a Microorganismos (MAMPs), como péptidoglicano y lipopolisacáridos bacterianos y zymosan de hongos. También se comprobó que esta proteína actuaría como transportadora de fragmentos

¹³Vitelogenina: es una proteína con función protectora contra ciertas infecciones

bacterianos, que por transmisión vertical son adquiridos por la descendencia, lo que produciría una especie de “sensibilización” o *priming* del sistema inmune innato.

Las vías de señalización Tolle Imd¹⁴, presentes en las abejas, están relacionadas con la desregulación de los genes para péptidos antimicrobianos, que aunque su principal función es desestabilizar la pared de las bacterias también se encuentran en infecciones virales. Estos efectores humorales juegan un papel fundamental en el sistema de defensas de los insectos. En abejas se determinó la presencia de apidaecina, abaecina, himenoptaecina y defensinas, así como lisozimas. Otro efector humoral de abejas, relacionado con estas vías, es la transferrina. En vertebrados superiores, esta proteína, forma parte del grupo de las proteínas de fase aguda cuya función inmune es secuestrar hierro y limitar la infección bacteriana. La vía de señalización Imd se relaciona con la vía JNK (por su sigla en inglés, *c-Jun N-terminal kinase*) que también está involucrada con la síntesis de péptidos antimicrobianos.

En ciertos polinizadores se comprobó que los péptidos antimicrobianos actúan en sinergia (mayores efectos aditivos antimicrobianos) y potenciación (un péptido antimicrobiano puede permitir mejorar la actividad del otro). La combinación de estos permite aumentar el espectro de las respuestas, su especificidad, eficacia y robustez, permitiendo de esta forma reducir los recursos asignados al sistema inmune mediante el aumento de la actividad antimicrobiana de estos efectores a bajas concentraciones.

También se determinó la presencia de los componentes principales de la vía de señalización JAK/STAT (tirosin-quinazas de la familia de Janus /proteínas activadoras de la transcripción, por sus siglas en inglés) responsable del control de la expresión de proteínas portadoras de tio-éster y se supone, como sucede en *Drosophila*, codificarían para efectores humorales dependientes del estrés severo. Las proteínas portadoras de enlace tio-éster tienen este enlace característico de su homólogo en vertebrados superiores, la fracción C3 del complemento que les permite la unión de forma covalente a la superficie de los microorganismos para activar la respuesta inmune. En otros insectos, estas proteínas son sintetizadas por hemocitos y/o cuerpo graso.

La vía ARNi presente en abejas, es un mecanismo de defensa contra infecciones virales mediante el silenciamiento de su ciclo replicativo. Presentan un sensor de ARNdc producto del gen *dicer-like*, relacionado con la familia de PRRs o sensores citosólicos RIG-1 en mamíferos. Otro mecanismo epigenético¹⁵ con función antiviral presente en las abejas es la metilación del ADN.

También se demostró la presencia de serin-proteasas y serpinas, proteínas presentes en la hemolinfa, con función inmune relacionada con la cascada de coagulación y sistema del complemento y el mantenimiento de la hemostasis respectivamente.

La profenoloxidasa también está presente en abejas y es una proteína humoral que puede inducir la melanización de patógenos y también está involucrada con la curación de heridas.

¹⁴Toll e IMD: vías de señalización relacionadas con la regulación de la traducción de péptidos antimicrobianos

¹⁵ Epigenética: el estudio de cambios heredables en la función génica que se producen debido a influencias ambientales, pero sin un cambio en la secuencia del ADN.

Referencias

- Brutscher LM, Daughenbaugh KF, Flenniken ML. Antiviral defense mechanisms in honey bees. *Curr Opin Insect Sci.* 2015; 10:71-82.
- De Miranda JR, Bailey L, Ball BV, Blanchard P, Budge G, Chejanovsky N, Chen Y-P, Gauthier L, Genersch E, De Graaf D, Ribière M, Ryabov E, De Smet L, Van Der Steen JJM. 2013 Standard methods for virus research in *Apis mellifera*. In V Dietemann; J D Ellis; P Neumann (Eds) *The COLOSS BEEBOOK, Volume II: standard methods for *Apis mellifera* pest and pathogen research.* *J Apicultural Res.* 2013; 52(4): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.22>
- Merkling SH, van Rij RP. Beyond RNAi: antiviral defense strategies in *Drosophila* and mosquito. *J Insect Physiol.* 2013; 59: 159-70. doi:10.1016/j.jinsphys.2012.07.004
- Rivière M, Ball BV, Aubert MFA. 2008. Natural history and geographic distribution of honey bee viruses. En: Aubert MFA, Ball BV, Fries I, Morritz RFA, Milani N, Bernardinelli I. *Virology and the honey bee.* Brussels, Belgium, EEC Publications, pp: 15-84.
- van Engelsdorp D, Underwood R, Caron D., Hayes J (Jr). An estimated of managed colony losses in the winter of 2006-2007: a report commissioned by the apiary inspectors of America. *Am Bee J.* 2007; 147:599-603.
- Wang PH, Weng SP, He JG. Nucleic acid-induced antiviral immunity in invertebrates: An evolutionary perspective. *Dev Comp Immunol.* 2015; 48:291-6.
- Yue C, Genersch E. RT-PCR análisis of deformed wing virus in honetbees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). *J Gen Virol.* 2005; 86: 3419-24.

Coordinadores

Fabiana A. Moredo

Alejandra E. Larsen

Nestor O. Stanchi

Autores Volumen Bacteriología

Alvarado Pinedo Fiorella

Bautista Emilia

Carriquiriborde Martín

Cerdá Raúl O.

Del Curto Beatriz

Gatti Eleatrice M

Gómez María F.

Larsen Alejandra E.

Moredo Fabiana A.

Mórtola Eduardo C.

Rambeaud Magdalena

Stanchi Nestor O.

Travería Gabriel

Uriarte Javier

Autores Volumen Virología

Abeyá María M.

Bravi María E.

Cid de la Paz Viviana

Echeverría María G.

Fuentealba Nadia A.

Galosi Cecilia M.

Larsen Alejandra E.

Metz Germán E.

Panei, Carlos J.

Pecoraro Marcelo R.

Picotto Leandro

Reynaldi Francisco J.

Scrochi Mariela R.

Serena María S.

Sguazza Guillermo H

Susevich María Laura

Tizzano Marco A.

Patogenicidad microbiana en medicina veterinaria / Fabiana A. Moredo ... [et al.];
coordinación general de Fabiana A. Moredo; Alejandra E. Larsen; Néstor Oscar Stanchi.
- 1a ed. - La Plata: Universidad Nacional de La Plata; La Plata: EDULP, 2018.
Libro digital, PDF - (Libros de cátedra)

Archivo Digital: descarga y online
ISBN 978-950-34-1725-6

1. Veterinaria. 2. Bacterias. 3. Virus. I. Moredo, Fabiana A. II. Moredo, Fabiana A., coord.
III. Larsen, Alejandra E., coord. IV. Stanchi, Néstor Oscar, coord.
CDD 636.089

Diseño de tapa: Dirección de Comunicación Visual de la UNLP

Universidad Nacional de La Plata – Editorial de la Universidad de La Plata
47 N.º 380 / La Plata B1900AJP / Buenos Aires, Argentina
+54 221 427 3992 / 427 4898
edulp.editorial@gmail.com
www.editorial.unlp.edu.ar

Edulp integra la Red de Editoriales Universitarias Nacionales (REUN)

Primera edición, 2019
ISBN 978-950-34-1725-6
© 2019 - Edulp

n
naturales



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA