Caracterización molecular de una nueva cepa de torovirus porcino (PToV). Parte 1

Jaime Pignatelli, Miriam Jiménez, Juan Luque, Mª Teresa Rejas, Antonio Lavazza y Dolores Rodríguez
Centro Nacional de Biotecnología (CNB - CSIC). Universidad Autónoma de Madrid.

RESUMEN

Los torovirus son virus emergentes, pertenecientes al orden *Nidovirales*, que permanecen prácticamente ignorados a pesar de que infectan diferentes especies de animales domésticos y al hombre, causando enfermedades gastrointestinales y diarrea. En este trabajo se describe la identificación y caracterización parcial de una nueva cepa de torovirus porcino (PToV-BRES) que fue detectada en una muestra de heces recogida en una granja de Brescia (Italia). Se amplificaron los genes que codifican las proteínas de la nucleocápsida (N), la hemaglutinina-esterasa(HE) y la proteína de membrana (M) y se secuenciaron. El análisis de estas secuencias puso de manifiesto que PToV-BRES es una nueva cepa, que está relacionada filogenéticamente con la cepa P4, que hasta el momento era la única representante de un linaje diferenciado de PToV. La proteína N de PToV-BRES fue expresada en células de insecto fusionada a una cola de histidinas, purificada por cromatografía de afinidad y utilizada para desarrollar un método de ELISA para detectar anticuerpos frente a PToV. El ensayo fue evaluado mediante la utilización de 45 muestras de suero provenientes de tres granjas españolas. Se observó una alta prevalencia de anticuerpos frente a PToV en las tres granjas, tanto en animales adultos como en lechones, lo que sugiere que PToV es endémico en la cabaña porcina española. El ELISA desarrollado en este trabajo es el primer ensayo específico desarrollado para la detección de anticuerpos frente a PToV, y por tanto será de gran utilidad para realizar estudios epidemiológicos.

INTRODUCCIÓN

Los torovirus son agentes causantes de gastroenteritis en caballos, vacas, cerdos y humanos. Están clasificados como una subfamilia dentro del orden *Nidovirales* (Comité Internacional de Taxonomía de Virus, ICTV: 2009 y 2011). El genoma de torovirus consiste en una sola molécula de RNA de aproximadamente 25-30 kb. La organización del genoma es similar a la de los coronavirus: los primeros dos tercios contienen dos grandes marcos de lectura abiertos superpuestos, ORF1a y ORF1b, que codifican los componentes de la maquinaria de replicación. El último tercio del genoma contiene cuatro marcos de lectura abiertos, ORF 2-5, que codifican respectivamente las proteínas estructurales: la proteína de la espícula (S), la proteína de membrana (M), la proteína hemaglutinina-esterasa (HE) y la nucleocápsida (N). Las partículas de torovirus tienen una nucleocápsida característica en forma de toroide formada por la proteína N que interacciona con el RNA viral. La nucleocápsida está rodeada por una envuelta que contiene la proteína M, y las proteínas S y HE que conforman las espículas grandes y pequeñas, respectivamente.

El primer torovirus conocido se identificó en 1972 tras examinar una muestra fecal de un caballo que presentaba diarrea en Berna (Suiza), y que se denominó virus de Berna o BEV (*Weiss et al, 1983*). Posteriormente, se encontró un virus morfológicamente relacionado con BEV en una granja de ganado de Breda (Iowa, EEUU) y se lo denominó BRV (*Woode et al., 1982*). A lo largo de los años, ha habido algunos trabajos en los que se describe la presencia de partículas de torovirus en muestras fecales de humanos (HToV) (*Beards et al., 1986; Duckmanton et al., 1997; Koopmans et al., 1997; Krishnan y Naik, 1997, Jamieson et al., 1998; Uziel et al., 1999; Lodha et al., 2005*) y cerdos (PToV) (*Scott et al., 1987; Woode, 1987; Durham et al., 1989; Penrith y Gerdes , 1992; Lavazza, 1996*). El PToV ha sido detectado más tarde por RT-PCR en muestras de heces porcinas de granjas en los Países Bajos, Bélgica, Hungría, Italia y China (*Kroneman et al., 1998; Matiz et al., 2002; Zhou et al., 2013; Zhou et al., 2014*). Además, se ha descrito una caracterización genómica parcial de cinco aislados europeos de PToV (*Smits et al., 2003*).

Las encuestas epidemiológicas sobre los torovirus se han concentrado principalmente en BToV, y mostraron que este virus se distribuye en todo el mundo, habiéndose detectado en Estados Unidos, Japón, Corea del Sur, India y en diferentes países europeos como Reino Unido, Alemania, Bélgica, Francia y Suiza (*Liebler et al., 1992; Koopmans et al., 1991; Ito et al., 2007; Park et al., 2007; Van Kruiningen y otros, 1992; Krishnan y Naik, 1997; Koopmans et al., 1989). Weiss et al., 1984*). Además, se han notificado elevadas seroprevalencias frente a BToV en ganado procedente de Reino Unido (*Brown et al., 1987*), Paí-

ses Bajos y Alemania (*Koopmans et al., 1989*). Aunque hay pocos trabajos sobre la epidemiología del PToV, también se han notificado elevadas seroprevalencias, similares a las del BToV, en poblaciones porcinas de Suiza (*Weiss et al., 1984*) y en los Países Bajos (*Kroneman et al., 1998*). A pesar de esta extensa distribución geográfica y el amplio rango de hospedadores, estos virus han atraído poca atención. Es probable que esto se deba en parte al hecho de que la infección por torovirus no se ha asociado con enfermedades que causan pérdidas importantes en el ganado, pero también a la falta de un sistema "in vitro" para trabajar con la mayoría de estos virus, que ha impedido el desarrollo de herramientas específicas para su diagnóstico. Durante mucho tiempo, el aislado equino BEV era el único torovirus que podía infectar cultivos celulares (*Weiss et al., 1983*), pero actualmente hay algunas variantes de BToV aisladas en Japón que son capaces de infectar células derivadas de un adenocarcinoma rectal humano (*Kuwabara et al, 2007*). Además, BToV puede propagarse en terneros gnobióticos infectados experimentalmente (*Woode et al., 1982*). Esto permitió desarrollar un ELISA indirecto utilizando partículas de BToV o BEV parcialmente purificadas para el serodiagnóstico de torovirus, no obstante, el procedimiento de purificación no es asequible para todos los laboratorios, y además, este ensayo también proporcionaría una baja sensibilidad para la detección de anticuerpos frente a torovirus humanos y porcinos (*Brown et al., 1987*). El serodiagnóstico de los torovirus también se ha realizado mediante el análisis de la capacidad de las muestras clínicas de suero para neutralizar la infectividad BEV (*Weiss et al., 1984*). La prueba de neutralización del virus es, "a priori", un ensayo muy sensible que también proporciona información sobre la existencia de una respuesta inmune humoral protectora en el animal en estudio, sin embargo, dado que para buscar anticuerpos frente a torovirus en sueros bovinos, humanos o porcinos se usaría BEV, un virus no homólogo, la sensibilidad del ensayo se reduciría. Además, la prueba de seroneutralización es un ensayo largo y difícil que no se puede utilizar para realizar estudios extensos.

Por lo tanto, se deben realizar estrategias alternativas para generar antígenos específicos de torovirus para la detección serológica. Una alternativa utilizada con frecuencia es la expresión de proteínas víricas inmunológicamente relevantes en sistemas de expresión recombinantes (*Chirnside et al., 1995; Denac y col., 1997; Pelosi y col., 1999; Farkas et al., 2005; Bogdanova et al., 2007; Hou et al., 2007*). Para este propósito, las proteínas de la nucleocápsida de muchos virus han demostrado ser muy útiles. Específicamente, las proteínas N de diferentes coronavirus, entre los que se incluye el coronavirus del síndrome respiratorio agudo (SARS-CoV) se han expresado en bacterias o a través del sistema de expresión de baculovirus, y se han usado para el serodiagnóstico (*Timani et al., 2004; Woo et al., 2004; Wang et al., 2005*). Además, la proteína N es la proteína más abundante en las partículas de torovirus (*Horzinek et al., 1985*), y se ha descrito que en terneros gnobióticos infectados experimentalmente con BToV se produce una fuerte respuesta de anticuerpos contra ella (*Duckmanton et al., 1998*). Por lo tanto, la proteína N del PToV parece ser un antígeno viral interesante para desarrollar métodos de diagnóstico. Además, dado que las proteínas de la nucleocápsida suelen estar muy conservadas, las pruebas de serodiagnóstico basadas en el uso de la proteína N de PToV pueden resultar útiles para la detección de anticuerpos contra otros torovirus.

Los objetivos de este trabajo fueron la caracterización de una nueva cepa de PToV, detectada en una muestra fecal de Italia mediante el diagnóstico por microscopía electrónica, y el

desarrollo de un sistema de diagnóstico mediante ELISA para detectar anticuerpos contra torovirus. El ELISA se evaluó analizando muestras de suero de cerdo de diferentes granjas españolas. Nuestros resultados, aunque se obtuvieron con un número reducido de animales, indican una alta seroprevalencia de PToV, lo que sugiere que PToV podría ser endémico en las granjas españolas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Células y virus

Las células dérmicas equinas (*E. Derm*) (ATCC® CCL-57™) fueron amablemente proporcionadas por el Dr. de Groot (Universidad de Utrecht, Utrecht, Países Bajos). Se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 15% de suero fetal de ternera (FCS), 100 unidades por ml de penicilina y 100 mg por ml de estreptomicina. Se cultivaron células de insecto *High Five*™ (*HighFive*) a 27º C en medio TC100 suplementado con antibióticos y FCS al 10%. La cepa de torovirus equino Berna (P138 / 72) (BEV) se propagó en células *E. Derm* como se describió previamente (*Weiss y Horzinek, 1986*), y las partículas de BEV se purificaron mediante centrifugación en gradiente de sacarosa. El virus respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV) y el virus de la gastroenteritis transmisible (TGEV), ambos proporcionados por el Dr. Enjuanes (CNB-CSIC, España), se propagaron en células de mono MA104 (ATCC® CRL-2378.1™) y en fibroblastos de testículo porcino (ST), respectivamente. Ambos virus se purificaron parcialmente por centrifugación sobre un colchón de sacarosa al 50%.

Muestras fecales

Se obtuvieron tres especímenes fecales porcinos (513/02, 970/02, 1318/02), recogidos en Brescia (Italia) en 2002, y una muestra fecal bovina (1812/03) tomada en el mismo lugar en 2003, en las que se había detectado la presencia de partículas similares a torovirus mediante microscopía electrónica, pero, en las que con la excepción de 1318/02, también se observó que contenían otras partículas virales que podrían corresponder a coronavirus, enterovirus y circovirus.

Muestras de suero

Se tomaron muestras de sangre de cerdos de tres granjas comerciales situadas en diferentes regiones del norte de España. Se recogieron 10 muestras de sangre de cerdas en una granja localizada en Navarra, donde anteriormente se habían reportado síntomas de diarrea y gastroenteritis en lechones, aunque en el momento de la recolección del suero no se observó esta sintomatología. Se recogieron 20 muestras de sangre de una granja situada en Aragón, donde la mayoría de los lechones recién nacidos padecían diarrea en el momento de la recolección. Se recogieron quince muestras de sangre de lechones sanos de 6 a 8 semanas de una granja con altas condiciones sanitarias localizadas en Galicia. Las muestras de sangre se centrifugaron a 1.500 g durante 10 minutos a 4º C,

y los sueros obtenidos se almacenaron a -80º C hasta su uso. Se compró un suero porcino comercial obtenido de cerdos sanos (AbD Serotec), que ha sido nombrado como CPS en todo el documento. Se utilizó una muestra de suero de un lechón infectado en condiciones de campo con PToV, previamente descrito (*antisuero 233/90; Lavazza et al., 1996*) como control de suero positivo para PToV, y se denominó αBRES. En nuestro laboratorio se generó un suero policlonal hiperinmune anti-BEV (α-BEV) (*Garzon et al., Resultados no publicados*). El Dr. Van Gucht (Universidad de Gent, Bélgica) nos proporcionó tres muestras de suero de cerdos extraídos por cesárea y privados calostro (CD/CD) mantenidos en condiciones libres de patógenos (SPF), que se usaron como control negativo, y sueros de otros dos cerdos que se criaron en estas mismas condiciones, pero que posteriormente se inocularon con el coronavirus respiratorio porcino (PRCV) o el virus del síndrome respiratorio y reproductivo del cerdo (PRRSV), y que se usaron como controles de reactividad cruzada. Además, también se usaron como control negativo 69 muestras de suero de lechones CD/CD tomadas a los 0-36 días de edad, que fueron proporcionadas por el Dr. Segales (CReSA, Barcelona, España).

Se generó un suero hiperinmune de conejo contra la proteína N de PToV-BRES inmunizando un conejo *White New Zealand* con la proteína quimérica N fusionada a una cola de histidina, que se expresó en células de insecto mediante un recombinante de baculovirus (descrito a continuación), y que se purificó por cromatografía.

Inmunomicroscopía electrónica

Las muestras fecales que contenían partículas de torovirus se diluyeron 1: 5 en solución salina tamponada (PBS) estéril, se homogeneizaron y se centrifugaron a 3.000 g durante 10 minutos

a 4º C. Para facilitar la detección de las partículas virales los sobrenadantes se mezclaron (v: v) con una muestra de suero convaleciente de un cerdo infectado con torovirus (αBRES), previamente diluido 1:40 en PBS. Después de un período de incubación de 30 minutos a 37º C, las partículas virales se adsorbieron en rejillas de cobre recubiertas con carbón mediante una ultacentrifugación en una airfuge Beckman, a 21 PSI durante 15 minutos siguiendo el protocolo descrito previamente (*Lavazza et al., 1996*). Para la detección de los anticuerpos unidos, las partículas adsorbidas en la superficie de las rejillas se incubaron con proteína A conjugada con partículas de oro coloidal de 10 nm como se describió previamente (*Rodríguez et al., 1997*). Después de varios lavados en agua destilada, las muestras se tiñeron negativamente con ácido fosfotúngstico al 2% (PTA) en agua durante 1 minuto, se dejaron secar y se observaron en un microscopio electrónico JEM1010 (Jeol, Japón). Las fotos fueron tomadas con una cámara digital Bioscan (Gatan).

Extracción de RNA

Las muestras fecales se diluyeron 1: 1 en PBS, se homogeneizaron mediante agitación en *vortex* y se centrifugaron a 3.000 g durante 10 minutos a 4º C. El sobrenadante se alicuotó y se mantuvo a -80º C. Se usaron 200 µl de cada sobrenadante para la extracción del ARN viral usando un kit comercial (kit de aislamiento de RNA High Pure, Roche Applied Science) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El RNA se recuperó en 50 µl de agua libre de DNasas y RNasas, se alicuotó y se mantuvo a -80º C. Todas las muestras se extrajeron en una campana de flujo laminar utilizando pipetas dedicadas solo para este uso y puntas resistentes a aerosoles.

Transcripción inversa

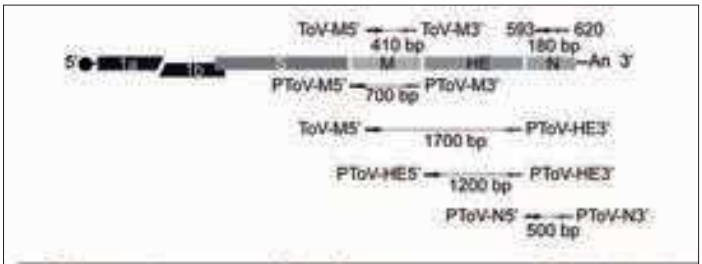
La reacción de transcripción inversa (RT) se realizó usando la transcriptasa inversa *Superscript II* (Invitrogen, Corp.) siguiendo las instrucciones del fabricante con pequeñas modificaciones. Brevemente, se mezclaron 8 µl de la muestra de RNA con una mezcla dNTPs 1 mM (Roche Applied Science) y como cebador hexámeros aleatorios 1 mM (Roche Applied Science), y se incubaron durante 10 minutos a 65º C y 1 minuto sobre hielo. La reacción de transcripción inversa se completó añadiendo 9 µl de mezcla de reacción que contenía 1X tampón RT, DTT 10 mM, MgCl2 8 mM, inhibidor de ribonucleasa 40 U (Fermentas) y 200 U de transcriptasa inversa *Superscript II* e incubando durante 10 minutos a 25º C, seguido de 45 minutos a 45º C y finalmente 15 minutos a 65º C. Para minimizar la posible contaminación cruzada, la reacción de transcripción inversa se llevó a cabo en una habitación independiente utilizando pipetas dedicadas para este uso, con puntas de pipeta resistentes a aerosoles. La preparación de cDNA se alicuotó y se conservó a -80º C hasta su uso.

Diseño de los cebadores

Las secuencias de EToV, cepa de la Berna (BEV), BToV, cepas BRV-1, BRV-2, B145, B150, B155, B6 y PToV, cepas Markelo, P4, P10, P9 y P78 se obtuvieron de la base de datos Genbank (*http:/www.ncbi.nlm.nih.gov*) y se alinearon utilizando el programa *MegAlign* (DNAstar, Inc.). Los cebadores ToVM5´y ToVM3´ se diseñaron basándose en una región conservada del gen M (*Tabla 1*). Además, los cebadores 593 y 620 previamente descritos (*Kroneman et al., 1998*) se usaron para amplificar un fragmento específico del gen N de PToV.

Tabla 1

Oligonucleótidos cebadores: localización en el genoma y secuencias.



Primers	Primer Sequence	Polarity	Location
ToVM 5'	AGTATGACCT TTACTGGCTA	Forward	ORF-M
ToVM 3'	TAATCTGCAA CACCTTG	Reverse	ORF-M
593	GTCAGAATAGATCACGCATT	Forward	ORF-N
620	AACTCTGCAACTCAGGTGGA	Reverse	ORF-N
PToVN5'	GGATCCATGAATTCTATGCTTA	Forward	ORF-N
PToVN3'	TCTAGATTAATTCAAAGCCACTT	Reverse	ORF-N
PToVM 3'	TCTAGACTACTCAAACTTTACACTTG	Forward	ORF-M
PToVM 5'	GGATCCTGTTTGATACA AA	Reverse	ORF-M
PToVBRES2 HE5	GGATCCATGTTGAGGATGAT	Forward	ORF-HE
PToVHE3'	CGTCTAGA GCCTAATAACTACTTAAACA	Reverse	ORF-HE

Para amplificar las secuencias completas de los genes de las proteínas estructurales M, N y HE de PToV, se diseñaron una serie de cebadores usando secuencias conservadas de PToV en ambas regiones 5´y 3´de cada gen (*Tabla 1*). Las secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción BamHI y XbaI se añadieron a cada cebador directo e inverso, respectivamente. Como se describe a continuación, para amplificar todo el gen HE se tuvo que diseñar un nuevo cebador, PToV-BRES-HE5.

PCR

Las reacciones para diagnóstico por PCR se llevaron a cabo usando 2 µl de cDNA y una mezcla de reacción que contenía 1X tampón de reacción de PCR, 0,2 mM de cada dNTP, 2,5 mM de MgCl2, 0,2 µM de cada cebador, ToV-M5´y ToV-M3 o 593 y 620 y 1.25 U de *Taq Platinum* (Invitrogen, Corp) en un volumen final de 25 µl. La mezcla se sometió a un paso de desnaturalización inicial de 2 minutos a 92º C, seguido de 30 ciclos de 45 segundos a 92º C, 40 segundos a 45º C y 1 minuto a 62º C. Se agregó un paso de extensión final de 5 minutos a 62º C al final.

Para amplificar las secuencias de los genes M y N usando las parejas de cebadores PToV-M5´-M3´y PToV-N5´-N3´, respectivamente, utilizamos el mismo ciclo térmico que el descrito anteriormente.

En el caso del gen HE no pudimos obtener la amplificación del cDNA usando el par de cebadores diseñado, PToV-HE5´-HE3´. Sin embargo, usando los cebadores ToV-M5´y PToV-HE3´ se obtuvo un fragmento de 1.700 pb del genoma de PToV que comprende el extremo 3´ del gen M y el gen HE completo. Este fragmento se amplificó usando una polimerasa de alta fidelidad (*TripleMaster* de Eppendorf), y se secuenció para determinar la región del extremo 5´del gen HE de PToV-BRES, y a partir de esta secuencia se diseñó el cebador PToV-BRES-HE5´. Para amplificar solo el gen HE completo, se realizó una segunda reacción de amplificación usando los cebadores PToV-BRES-HE5´y PToV-HE3´y el cDNA como molde. Brevemente, se añadieron 2 µl de cDNA de PToV-BRES a una mezcla de reacción que contenía 1X tampón de alta fidelidad, 200 µM de cada dNTP, 200 nM de cada cebador y 0,71U / µl de la polimerasa *TripleMaster*. Las condiciones de ciclo térmico para ambas reacciones fueron las siguientes: 1 ciclo de 94º C; 30 ciclos de desnaturalización a 94 ºC durante 20 segundos, recocido a 50º C durante 20 segundos y elongación a 72º C durante 2 minutos.

Todas las reacciones de PCR se realizaron en salas separadas físicamente y se usaron pipetas y puntas de filtro dedicadas para este uso. En cada ensayo se incluyeron varios controles negativos de agua destilada para cada paso del procedimiento, aislamiento de RNA, transcripción inversa y PCR.

Los productos de la reacción de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 0,8-1% y se extrajeron de la agarosa usando el kit de extracción de gel comercial (Qiagen) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

Análisis de las secuencias

Para el análisis por secuenciación, todos los productos de RT-PCR correspondientes a los genes N, M y HE se clonaron en el vector comercial pGem-T-Easy (Promega) y los plásmidos resultantes, pGT-PToV-M, pGT-PToV-N y pGT-PToV-HE, respectivamente, se usaron para transformar bacterias competentes de *E. coli* DH5α. Se utilizaron al menos 5 clones independientes para la secuenciación en el servicio de secuenciación del Centro Nacional de Biotecnología (Madrid, España). Las secuencias obtenidas se analizaron usando el programa *SeqMan* (DNAstar, Inc.) y se alinearon usando el método *ClustalX* con secuencias de torovirus disponibles de la base de datos NCBI usando el *software MegAlign* (DNAstar, Inc.).

Los productos amplificados por RT-PCR y las secuencias correspondientes de *GenBank* se compararon usando el programa *MegAling* (DNAstar, Inc.) empleando el método *ClustalW*. Este programa se usó para llevar a cabo los análisis filogenéticos a partir de las secuencias de los genes. Los análisis filogenéticos se realizaron utilizando el método "neighbour-joining", y los parámetros estadísticos de los árboles filogenéticos se determinaron mediante análisis "bootstrap". Las secuencias de nucleótidos descritas en este trabajo se depositaron en la base de datos de *GenBank*. Los números de acceso para los genes completos N, M y HE de PToV-BRES son FJ232068, FJ232069 y FJ232070, respectivamente.

Generación de un baculovirus recombinante que expresa la proteína PToV-N

Se generó un baculovirus recombinante que contiene el gen que codifica la proteína PToV N fusionado en su extremo 5´ a una secuencia que codifica una cola de 6 histidinas, utilizando el sistema Bac-to-Bac (Invitrogen, Corp.). Para ello, se usó el vector pGT-PToV-N que contiene la secuencia consenso para el gen N del aislado PToV-BRES para subclonar este gen en el vector de transferencia de baculovirus *pFastBac*™ b (Invitrogen, Corp.). El gen N se extrajo de pGT-PToV-N mediante restricción enzimática con *Bam*HI y *Xba*I y se clonó en el plásmido *pFastBac*™ b, previamente digerido con las mismas enzimas de restricción, dando lugar al vector pFB-PToV-N. Se usaron células competentes de *E. coli* DH10BAC, que contenían un bácmido (plásmido de vector lanzadera de baculovirus) y un plásmido auxiliar, para generar bácmidos recombinantes de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El bácmido recombinante obtenido, BAC-PToV-N,

se transfectó en monocapas de células de insecto *HighFive* usando Lipofectin (Invitrogen, Corp.). A las 72 h después de la transfección se recogió medio de cultivo que contenía el baculovirus recombinante rBac-PToV-N, se clarificó por centrifugación y se almacenó a 4º C como stock de virus. Se recogieron las células transfectadas y se analizó la expresión de la proteína recombinante PToV-N mediante *Western-blot* usando un anticuerpo policlonal comercial que reconoce la cola de histidina (αHis. Clontech) y el suero αBRES.

Expresión y purificación de la proteína PToV-N

La proteína N recombinante fusionada a una cola de histidinas en su extremo N se purificó usando resina *BD Talon™ IMAC* (BD Biosciences Clontech). Las células *HighFive* se infectaron con rBac-PToV-N a una multiplicidad de infección (MOI) de 5 unidades formadoras de placa por célula (ufp/célula). A las 48 horas posinfección a las células infectadas se recogieron, se sedimentaron por centrifugación a 1.000 g durante 10 minutos y se resuspendieron en tampón de lisis (50 mM H_2NaPO_4, pH 8,0, 300 mM NaCl, 0,1% NP-40) que contenían inhibidores de proteasa (Complete Mini. Roche Applied Science). Las suspensiones celulares se incubaron en hielo durante 30 minutos y se sometieron a ultrasonidos. La fracción insoluble, que contiene la proteína N, se recuperó mediante centrifugación a 3.000 g durante 5 minutos y se solubilizó con tampón desnaturalizante que contenía H_2NaPO_4 50 mM, pH 8,0, NaCl 300 mM y cloruro de guanidina 6M. Después de una segunda centrifugación a 3.000 g durante 5 minutos, se tomó el sobrenadante y se mezcló con la resina *Talon™* equilibrada con tampón desnaturalizante, y se incubó durante 1 hora a 4º C en un agitador rotatorio. Las proteínas no unidas se eliminaron por centrifugación a 500 g durante 5 minutos y la resina se lavó con 10 volúmenes de tampón desnaturalizante tres veces y dos veces con un tampón que contenía H_2NaPO_4 50 mM, pH 8,0, NaCl 300 mM, urea 8M. La proteína N se extrajo de la resina con sucesivas etapas de elución con tampón de elución (50 mM de H_2NaPO_4, pH 8.0, 300 mM de NaCl, 8M de urea y 1M de imidazol). La pureza de la proteína PToV-N se analizó mediante SDS-PAGE y *Western-blot*. La concentración de la proteína se determinó según el ensayo de BCA (Pierce) usando una dilución 1: 5 de la proteína eluida en agua destilada, y albúmina de suero bovino (Sigma) como estándar preparado de manera similar.

Métodos serológicos

Western-blot

Para analizar la reactividad de diferentes sueros frente a la proteína N recombinante purificada esta se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) (400 ng/carril) y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa que se cortó en tiras correspondientes a cada línea del gel. Para evitar reacciones inespecíficas las membranas se incubaron durante la noche a 4º C en PBS que contenía *Tween* 20 al 0,05% (PBST) y leche desnatada al 5%. Posteriormente, las membranas se incubaron con las muestras de suero porcino diluidas 1:100 en PBST con 5% de leche desnatada. Después de extensos lavados, las membranas se incubaron con anticuerpos secundarios anti-IgG porcina acoplados a peroxidasa. Los *Western-blots* se desarrollaron incubando las membranas de nitrocelulosa con una solución que contiene 0.5 mg / ml de 4-cloro-1-naftol (Sigma) en PBS y 0.015% de H_2O_2, durante 20 minutos a temperatura ambiente, y luego durante la noche a 4º C, en agua destilada.

Ensayo de neutralización del suero

La presencia de anticuerpos neutralizantes contra torovirus en sueros de cerdo se analizó mediante el análisis de la reducción del número de placas utilizando el virus BEV. Este método, que es un procedimiento convencional para determinar títulos de anticuerpos neutralizantes para muchos virus, no se ha usado previamente para BEV. La razón es que los títulos de virus BEV siempre se han determinado estableciendo la dosis infecciosa de cultivo de tejido al 50% (TCID50) y los ensayos de neutralización se realizaron en consecuencia. En cambio, en este trabajo cuantificamos el virus determinando el número de pfu/ml. Por lo tanto, el ensayo de neutralización de BEV se realizó de la siguiente manera: se incubaron 25 µl de suero diluido inactivado por calor (diluciones seriadas 1:2 en DMEM, desde 1:4 a 1:4.096) con un volumen igual de una suspensión viral que contenía 100 pfu de BEV durante 1 hora a 37º C. Se añadieron mezclas de virus y suero a monocapas confluentes de células de *E. Derm* cultivadas en placas de 12 pocillos. Después de 1 hora de adsorción de virus a 37º C, se eliminó el medio de infección y se añadieron 2 ml por pocillo de medio DMEM 2X mezclado (V/V) con agar al 1,9% y conteniendo 0,05 mg/ml de DEAE-dextrano y 2% de FCS, y las células se mantuvieron a 37º C durante 3 días. Después de eliminar la capa de agar, las células se tiñeron con cristal violeta y se contaron las placas de lisis. El título de neutralización de virus (ND_{50}) de cada muestra de suero corresponde al recíproco de la dilución más alta de suero que produce una reducción del 50% en el número de placas con respecto al obtenido con el virus sin suero. Las muestras de suero se analizaron por duplicado y se incluyeron sueros de control negativo (SPF) y positivo (CPS) en cada prueba. Los títulos de neutralización se calcularon usando la fórmula de Spearman-Kärber. Las muestras de suero con títulos de anticuerpos neutralizantes iguales o superiores a 4 (o 0,6 que es el valor equivalente en escala logarítmica) se consideraron positivas.

ELISA

En nuestro laboratorio se estableció un ELISA indirecto para evaluar la presencia de anticuerpos contra el torovirus porcino en muestras de suero de cerdo utilizando la proteína PToV-N como antígeno. La concentración óptima de reactivos se estableció mediante titulación. Se recubrieron los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc) con 400 ng/pocillo de proteína N purificada diluida en tampón carbonato-bicarbonato 50 mM (pH 9,6) mediante incubación durante la noche a 4º C. Después del recubrimiento y en cada etapa de lavado, las placas se enjuagaron 3 veces con 150 µl/pocillo de PBST. Posteriormente, las placas se bloquearon durante 2 horas a 37 ºC con 150 µl/pocillo de PBST con 3% de BSA (PBST-3%). Luego se añadieron 50 µl de cada muestra de suero diluida 1:100 en PBST con 1% de BSA (PBST-1%) por duplicado y las placas se incubaron durante 1 hora a 37º C. A continuación, se añadieron los anticuerpos secundarios anti-IgG porcina acoplados a peroxidasa (Sigma) diluidos en PBST-1% y las placas se incubaron 1 hora a 37º C. La reacción enzimática se desarrolló usando dihidrocloruro de o-fenilendiamina (OPD FAST™, Sigma). Después de 10 minutos a temperatura ambiente, la reacción se detuvo mediante la adición de 50 µl/pocillo de ácido sulfúrico 2N, y se midió la absorbancia a 492 nm con un espectrofotómetro multicanal (Titertek Multiscan MCC / 340).

RESULTADOS

Identificación de torovirus porcino

En el transcurso de un examen de diagnóstico por microscopía electrónica de animales que presentaban diarrea en una granja de Brescia (Italia) se observaron partículas similares a torovirus en tres muestras fecales porcinas (513/02, 970/02, 1318/02) y en una bovina (1812/03). En algunas de estas muestras (513/02, 970/02 y 1812/03) también se observaron otras partículas virales que podrían corresponder a coronavirus, circovirus y enterovirus (datos no mostrados). Además, en dos de las muestras porcinas (513/02 y 970/02), las partículas de tipo torovirus no estaban bien conservadas y eran difíciles de detectar. Para mejorar la eficacia y especificidad del método de microscopía electrónica para la detección de partículas de torovirus, las suspensiones fecales se incubaron con suero de un cerdo infectado con torovirus (α-BRES) facilitando la agregación de partículas, como se describió previamente (*Lavazza et al., 1996*). Las muestras se ultracentrifugaron a continuación sobre una rejilla, y las partículas virales adsorbidas se incubaron con proteína A unida a partículas de oro coloidal para la detección de anticuerpos, y se tiñeron negativamente con 2% de PTA. La *Figura 1* muestra partículas de torovirus marcadas con inmunoglobulinas en una de las muestras fecales porcinas (1318/02), que posteriormente se identificarán como PToV-BRES. Los resultados obtenidos con las otras tres muestras no fueron concluyentes.

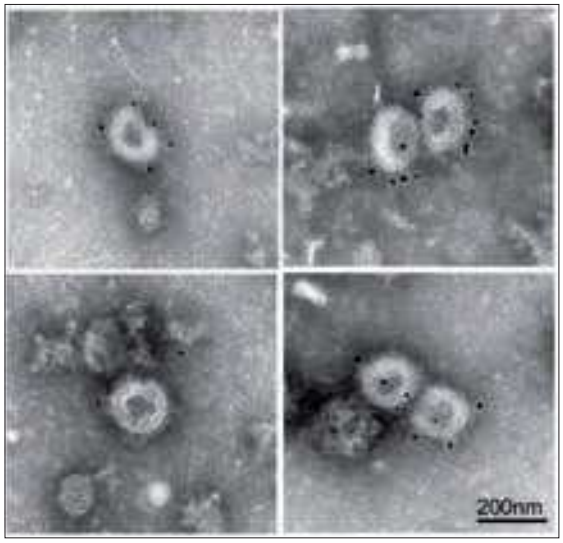


Figura 1 *...le PToV inmunomarcadas visualizadas por tinción negativa. Las partículas de torovirus presentes en las muestras fecales de cerdo se aglutinaron incubando las suspensiones fecales clarificadas con suero convaleciente de un cerdo infectado (αBRES). Las partículas agregadas se cargaron en una rejilla mediante ultracentrifugación en una Airfuga Beckman, y se trataron con proteína A conjugada con oro de 10 nm, y se tiñeron negativamente con PTA al 2%. Las micrografías electrónicas corresponden a la muestra fecal porcina 1318/02.*

Para detectar el RNA genómico de torovirus en estas muestras, diseñamos un nuevo conjunto de cebadores basado en una región del gen M que se conserva en todas las secuencias de torovirus disponibles (ToVM5´y ToVM3´ descritos en la *Tabla 1*). Las condiciones óptimas de RT-PCR se establecieron usando diluciones seriadas de un stock de BEV titulado y utilizando los cebadores ToVM5´y ToVM3´, y se pudieron detectar hasta 10^3 pfu/ml (datos no mostrados). Estos cebadores se usaron posteriormente para la detección por RT-PCR de PToV y BToV en las muestras fecales de tres cerdos y un ternero descritos anteriormente. El fragmento esperado de 410 pb se amplificó a partir de una de las muestras porcinas (1318/02) (*Figura 2A, carril 1*) y también de la muestra de heces bovinas (*Figura 2B, carril 1*). La secuencia del fragmento de PToV mostró una similitud del 95% con respecto a otras secuencias de PToV disponibles y un 80% con respecto a las secuencias de BToV. Por el contrario, el fragmento amplificado de BToV mostró un 98% de similitud con respecto a otros aislados de BToV, pero solo una identidad del 80% con respecto a los aislados de PToV. Ambos fragmentos mostraron una similitud de 79-80% con respecto a BEV. Se llevó a cabo una segunda PCR de diagnóstico para amplificar específicamente un fragmento del gen N de PToV, usando cebadores específicos de PToV, 593 y 620 (*Tabla 1*). Se obtuvo un fragmento de 180 pb solo

a partir de la muestra 1318/02 (*Figura 2A, carril 2*), pero no de las otras dos muestras porcinas (no mostradas), ni de la bovina. El fragmento amplificado era del tamaño esperado y la secuencia de este segundo fragmento mostró una homología de 87-89% con respecto a las cepas de PToV, 85% con respecto a las cepas de BToV y solo 57% con BEV. Los controles negativos de agua se analizaron en paralelo con cada conjunto de cebadores para descartar la contaminación cruzada de la muestra (*Figura 2A y B, carriles 3 y 4*).
Por lo tanto, se identificó una nueva cepa de PToV a la que se denomina PToV-BRES a lo largo de este trabajo.

Caracterización filogenética del aislado PToV-BRES
Para establecer la relación filogenética de PToV-BRES con otras cepas de PToV, amplificamos las secuencias correspondientes a los genes que codifican las proteínas M, HE y N a partir del cDNA de PToV-BRES. Los amplicones se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa, se purificaron del gel y se clonaron en el vector pGemT-Easy y se secuenciaron al menos 5 clones independientes, en ambas direcciones, para cada gen.

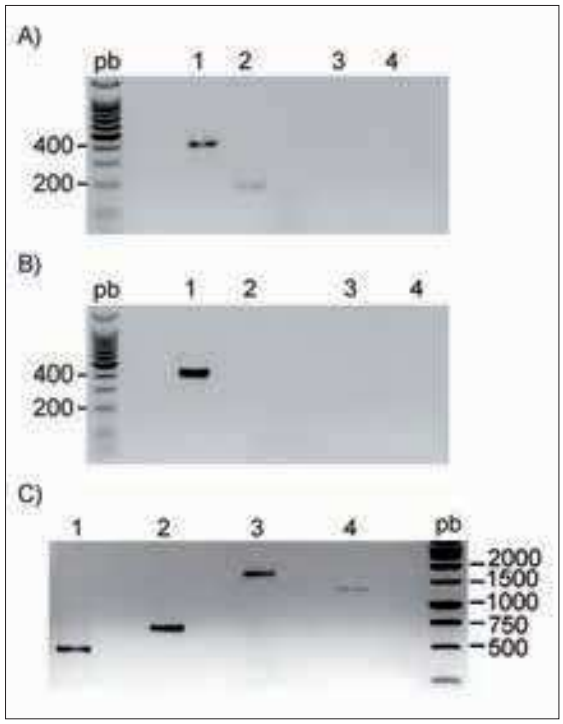


Figura 2

Detección de PToV y BToV en muestras fecales de campo mediante RT-PCR. Los genomas de torovirus porcino (A) y bovino (B) se detectaron mediante RT-PCR utilizando los cebadores ToV-M5´-ToV-M3´ (carriles 1 en los paneles A y B) en las muestras fecales 1318/02 y 1812/03 respectivamente, en las que se habían observado partículas similares a torovirus por microscopía electrónica. Los cebadores 593-620 se usaron como control positivo para la amplificación específica de PToV (carriles 2 en los paneles A y B). Los controles negativos de agua destilada se procesaron en paralelo en cada paso (RT, carriles 3 y PCR, carriles 4, en los paneles A y B). (C) Productos de PCR amplificados a partir del cDNA de PToV-BRES correspondientes a las ORF-N (carril 1), ORF-M (carril 2), ORF-HE completo mas el extremo 3´de la ORF-M (carril 3), y ORF-HE (carril 4). Los marcadores de tamaño molecular se analizaron en paralelo, y se indica el tamaño de los mismos en pb.

El gen N de PToV-BRES se amplificó como un fragmento de 505 pb (*Figura 2C, carril 1*) que mostró 91.7-93.1% de homología con respecto a otras cepas de PToV, 91.3-92.1% con respecto a BToV y 70% con BEV (*Figura 3.A*). El fragmento de DNA de 700 pb correspondiente al gen M (*Figura 2C, carril 2*) mostró una homología del 94,4-95,6% con otras cepas de PToV, del 80,6-81,1% con respecto a las cepas de BToV y del 81,2% con respecto a BEV (*Figura 3C*).

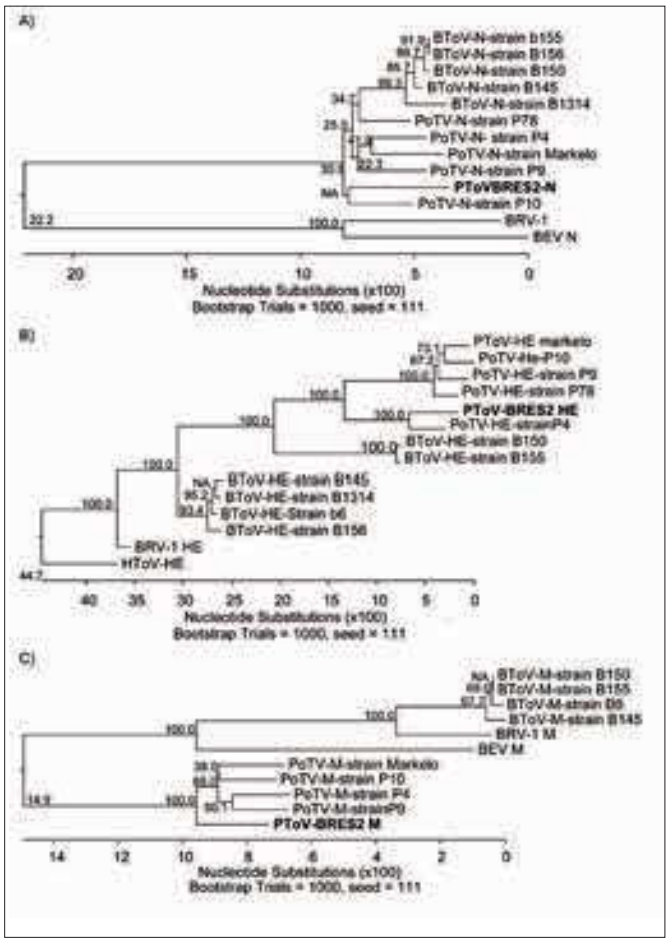


Figura 3

Análisis filogenético de ORF-M (A), -HE (B) y- N (C) de PToV-BRES. Las secuencias de ORF-M, -HE y -N se alinearon con las secuencias de torovirus disponibles en GenBank. Las comparaciones se realizaron mediante el método de "neighbour-joining". Los números representan la distancia al nodo más cercano y la barra indica el número de sustituciones de nucleótidos (x100).

El gen HE de PToV-BRES se amplificó usando una estrategia de dos pasos. Primero, amplificamos un fragmento de 1.700 bp (*Figura 2C, carril 3*). Este fragmento se secuenció y mostró contener el extremo 3´del gen M, la región intergénica que contiene la secuencia reguladora de traducción canónica (TRS) y el gen HE completo. Se diseñó un nuevo cebador, PToV-BRESHE5´, para amplificar solo el gen HE completo sin secuencias adicionales (fragmento de 1,2 kb) usando el cDNA como molde (*Figura 2C, carril 4*). La secuencia consenso para el gen PToV-BRES HE muestra un 92% de homología con la cepa P4 de PToV descrita previamente, y una homología del 75-78% con las otras cepas de PToV. Con respecto a las cepas de BToV, se obtuvo una identidad del 67-70%. Solo se observó un 52% de homología con respecto a la secuencia del gen HToV-HE y un 63% con respecto al fragmento del gen HE conservado en BEV (*Figura 3.B*). Estos resultados sugieren fuertemente que PToV-BRES es una nueva cepa de PToV no detectada previamente.

Expresión y purificación de la proteína de nucleocápsida de PToV-BRES en células de insecto

Generamos un baculovirus recombinante que expresa la proteína de la nucleocápsida de PToV-BRES fusionada en su extremo N-terminal a una cola de histidinas (rBac-PToV-N). Para analizar la expresión de esta proteína las células de insecto HighFive infectadas con rBac-PToV-N se recogieron a 48 y 72 hpi y se analizaron mediante SDS-PAGE y tinción con azul brillante de Coomassie, observándose una banda de 20 kDa (datos no mostrados), que además fue reconocida específicamente por los anticuerpos frente a histidinas (αHis) (*Figura 4A*) y el suero frente a PToV (αBRES) (*Figura 4B*) en Western-blot. El tamaño estimado de este producto se corresponde con el tamaño predicho para la proteína de fusión recombinante. También se observaron otras bandas de proteína de menor peso molecular, que probablemente corresponden a productos de degradación.

La proteína N recombinante se solubilizó mediante el tratamiento de las células infectadas con cloruro de guanidina 6 M, y se purificó mediante cromatografía de afinidad usando una resina recubierta con cobalto. La proteína se recuperó mediante tres rondas de elución con imidazol en presencia de urea 8M. La pureza de la proteína se analizó mediante SDS-PAGE y tinción con azul brillante de Coomassie. La *Figura 4C* muestra el análisis por SDS-PAGE de los diferentes pasos del procedimiento de purificación. Después de la elución, solo se observaron las bandas correspondientes a la proteína N recombinante (*Figura 4C, carriles 5-7*), lo que indica que la proteína estaba altamente purificada. La proteína se almacenó en urea 8 M para mantenerla soluble.

Para generar un suero policlonal frente a la proteína N (RαPToV-N), la proteína purificada se dializó frente a agua destilada, se liofilizó y se resuspendió en PBS antes de inocularse en un conejo (Servicio de animalario. Facultad de Farmacia. Universidad Autónoma de Barcelona). La especificidad de los anticuerpos se analizó mediante Western-blot utilizando extractos de células de insectos HighFive infectadas y no infectadas con rBac-PToV-N (datos no mostrados).

Desarrollo de un ELISA para detectar anticuerpos contra la proteína N de PToV

Se utilizó la proteína N recombinante purificada para desarrollar un ELISA para detectar anticuerpos contra PToV en muestras de suero porcino. Las concentraciones óptimas de reactivos se determinaron mediante titulación utilizando el suero policlonal descrito anteriormente, RαPToV-N, dos muestras de suero porcino, αBRES y CPS, como controles positivos, y cinco muestras de suero de animales SPF que se usaron como

controles negativos. La concentración óptima de proteína que proporcionó una mayor discriminación entre los sueros negativos y positivos fue de 400 ng/pocillo, y la dilución de suero porcino óptima fue de 1:100 (datos no mostrados).
Dado que no hay sueros de referencia disponibles para el torovirus porcino, el valor de corte de ELISA se estableció utilizando 5 muestras de suero de animales SPF y 69 muestras de suero de animales CD/CD que se habían recogido entre los 0 y 36 días después del nacimiento. Todas estas muestras de

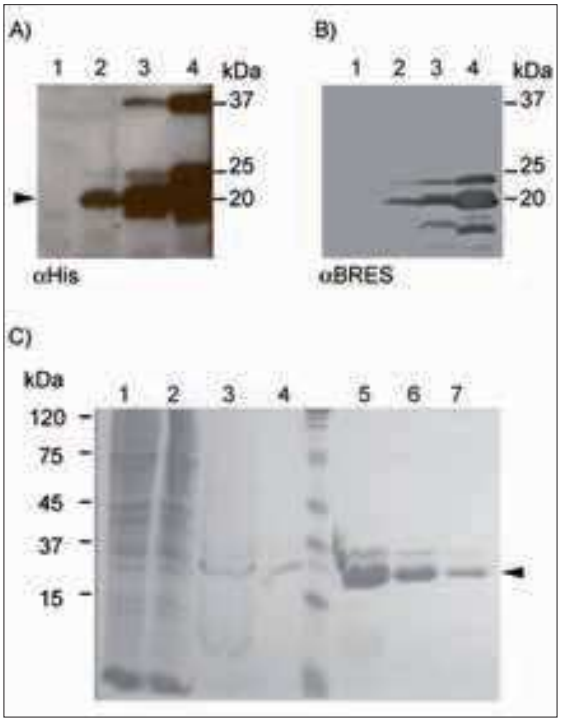


Figura 4

Expresión y purificación de la proteína N de PToV-BRES. Se utilizó un baculovirus recombinante que portaba el gen N de PToV-BRES (rBac-PToV-N) para infectar células HighFive. Las células infectadas se recogieron a 24, 48 y 72 hpi (carriles 2, 3 y 4, respectivamente). Las células no infectadas (carril 1) sirvieron como control negativo. La expresión de proteína se analizó mediante SDS-PAGE y Western-blot usando (A) un anticuerpo comercial αHis y (B) suero de un cerdo infectado naturalmente con torovirus (αBRES). (C) La proteína PToV-N se purificó a partir de células HighFive infectadas con rBac-PToV-N mediante cromatografía de afinidad. Las etapas de purificación se analizaron mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. El extracto celular (carril 1) se preparó por lisis con NP40 y la fracción insoluble (carril 2) se trató con cloruro de guanidina 6M. Después de la centrifugación, la fracción soluble se incubó con resina Talon ™ 1 hora a 4 ºC. Después de 3 etapas de lavado, la proteína unida (carril 3) se eluyó de la resina mediante tres etapas de elución (carriles 5, 6 y 7) con imidazol 1M. Una pequeña cantidad de proteína permaneció unida a la resina después de la elución (carril 4). La flecha indica la posición de la proteína recombinante. Los tamaños de los marcadores de peso molecular en kDa están indicados en los márgenes izquierdo o derecho.

suero se analizaron en cinco ensayos individuales realizados en días diferentes. Estas muestras de suero control mostraron una reactividad ELISA media de 0.175 ± 0.03. Por lo tanto, los valores de corte de ELISA se establecieron como el valor medio obtenido con los sueros de los animales control más tres veces la desviación estándar (D.O. 492nm = 0,270). Ninguna de estas muestras de suero control mostró valores de D.O. por encima del límite.
La falta de reactividad cruzada entre PToV y anticuerpos contra otros virus relacionados que infectan cerdos se confirmó mediante ELISA, *Western-blot* y pruebas de neutralización de virus utilizando muestras de suero αPRRSV, αPRCV y αBRES, proteína N purificada de PToV o partículas de BEV como antígenos de tororvirus, y viriones purificados de PRRSV y TGEV como virus relacionados (datos no mostrados).

Evaluación del ELISA

Para evaluar el uso potencial de la proteína PToV-N como antígeno para un ELISA de diagnóstico para detectar anticuerpos frente a torovirus porcino, se recolectaron 45 muestras de suero de tres granjas españolas situadas en Galicia, Navarra y Aragón y se analizaron mediante ELISA, ensayo de neutralización del virus y/o *Western-blot*.
Las 45 muestras de suero analizadas por ELISA fueron positivas frente a torovirus y estos resultados se confirmaron mediante Western-blot y /o mediante el ensayo de neutralización en 44 casos (93%). La mayoría de las muestras de suero de la granja en Navarra mostraron valores moderados de ELISA (entre 0.5 y 1.5) y bajos títulos de anticuerpos neutralizantes (log ND_{50} <1.5) (*Figura 5A*). Una muestra mostró un valor de ELISA positivo ($O.D._{492nm}$ 1.30) y un título neutralizante cerca del punto

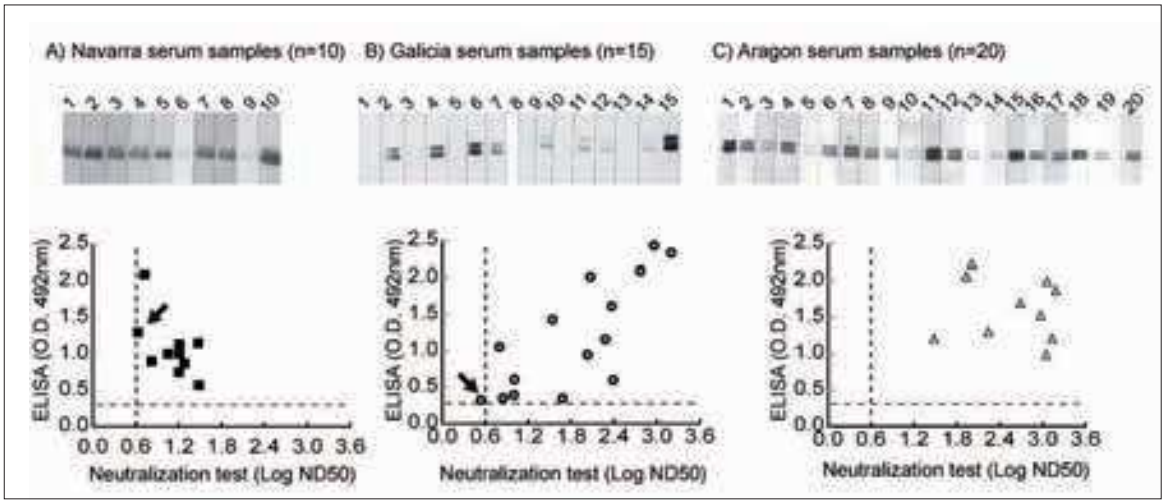


Figura 5

Evaluación del ELISA. 45 muestras de suero porcino recolectadas en granjas situadas en A) Navarra (n = 10), B) Galicia (n = 15) y C) Aragón (n = 20), se analizaron mediante ELISA y Western-blot utilizando proteína N de PToV (400ng) como antígeno y los sueros diluidos 1:100. Además, los sueros se analizaron mediante el ensayo de neutralización de virus, utilizando BEV, y diluciones seriadas 1:2 de los sueros. Los títulos de neutralización se expresan como ND50. Las bandas de Western-blot se muestran en la parte superior de la figura y los valores de ELISA y neutralización están representados en los ejes Y y X, respectivamente, para cada muestra de suero. Se indica el corte de ELISA (D.O. 492nm = 0.270) (- - -) y el límite de neutralización del virus (Log ND50 0.6) (|). La flecha indica muestras de suero con valores controvertidos de ELISA y neutralización, de las granjas de Navarra (A) y Galicia (B).

de corte (log ND_{50} 0.63) (*Figura 5A, flecha*), sin embargo, fue positivo por Western-blot (*Figura 5A, tira 1*). Con los sueros de la granja de Galicia se obtuvieron resultados más dispersos mediante ELISA ($O.D._{492nm}$ entre 0.3 y 2.3), prueba de neutralización (log ND_{50} entre 0.5 y 3.2) y Western-blot (*Figura 5B*). Las 15 muestras de suero fueron positivas por ELISA, y ese resultado fue confirmado por Western-blot en 9 muestras y por el ensayo de neutralización en 14 muestras. La única muestra que fue positiva mediante ELISA ($O.D._{492nm}$ 0.325) pero negativa en las otras dos pruebas (*Figura 5B, tira 13 y flecha*) tenía un título neutralizante que estaba cerca del valor de corte (Log ND_{50} 0.54). Las muestras de suero de Aragón mostraron altos títulos de anticuerpos contra PToV-N ($O.D._{492nm}$ entre 1.0 y 2.3), y en consecuencia, fueron altamente neutralizantes (log ND_{50} entre 1.5 y> 3.2), y para algunos de ellos no pudimos determinar el título de neutralización dado que la dilución de suero más alta usada, 1: 4 096, todavía reduce el número de placas virales a más del 50%, y todas fueron positivas mediante Western-blot (*Figura 5C*).

Los resultados obtenidos mediante ELISA utilizando la proteína N de PToV como antígeno concuerdan con los obtenidos mediante el ensayo de neutralización, lo que indica que el ELISA podría utilizarse para la detección de anticuerpos contra el torovirus, proporcionando un sistema de diagnóstico más simple y factible.

Nota

En el próximo número de Anaporc publicaremos la segunda parte de este artículo científico, en donde se referirá la discusión y la bibliografía empleada.