Caracterización molecular de una nueva cepa de torovirus porcino (PToV). Parte 2

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

DISCUSIÓN

Los torovirus son agentes causantes de gastroenteritis que parecen infectar a distintas especies animales, incluidos los humanos. La mayoría de la información epidemiológica sobre los torovirus proviene de estudios sobre BToV realizados en diferentes países, e indican que los torovirus están ampliamente dispersos en todo el mundo, con altas prevalencias en poblaciones animales. Sin embargo, se han publicado pocos estudios sobre el PToV, pero estos igualmente sugieren una prevalencia importante del PToV, al menos en los países europeos. La falta de un sistema "in vitro" de propagación para PToV ha obstaculizado su estudio y el desarrollo de herramientas de diagnóstico. Este trabajo describe la identificación y caracterización parcial de una nueva cepa de PToV, y el desarrollo de un ensayo ELISA para detectar anticuerpos contra PToV en muestras de suero porcino.

En primer lugar, describimos un nuevo par de cebadores, ToVM5´ y ToVM3´, cuyas secuencias están altamente conservadas entre especies de torovirus. Usando este conjunto de cebadores pudimos detectar esta nueva cepa, PToV-BRES. Además, la pareja de cebadores ToVM5´ y ToVM3´, fue capaz de amplificar los genomas BEV y BToV del medio de un cultivo celular infectado y de una muestra de heces, respectivamente. Además, estos cebadores también podrían amplificar HToV ya que se diseñaron en regiones conservadas de todas las secuencias disponibles del gen M de torovirus. Por lo tanto, proponemos que este nuevo conjunto de cebadores pueda utilizarse para estudios epidemiológicos sobre diferentes torovirus.

En general, se dispone de poca información sobre la secuencia del genoma de PToV, ya que solo se han descrito cinco cepas de PToV (*Kroneman et al., 1998; Matiz et al., 2002; Smits et al., 2003*). Se necesita información genómica sobre otras variantes de PToV para comprender

la evolución de los torovirus y desarrollar nuevas herramientas de diagnóstico. En este trabajo describimos la amplificación y secuenciación de los genes M, HE y N de PToV-BRES. Curiosamente, el análisis filogenético del gen HE mostró una alta homología de secuencia (92%) con el gen HE de la cepa P4, pero solo 73-78% con otras cepas de PToV. En base a las secuencias del gen HE se habían identificado previamente dos linajes de PToV, que están representados por las cepas P4 y Markelo. Se ha sugerido que estos dos linajes de PToV se generaron mediante eventos de recombinación en el gen HE entre un PToV parental y un donante desconocido (*Smits et al., 2003*). La cepa PToV-P4 se detectó en Italia en 1990, durante un brote de enteritis (*Lavazza et al., 1006*), y desde entonces ninguna otra cepa ha mostrado una relación filogenética con ella. Por lo tanto, P4 se consideró como la posible cepa parental de PToV, y cepas similares a Markelo (*Markelo, P78, P9 y P10*) podrían considerarse como progenie recombinante originada a partir de ella. Nuestro hallazgo de una nueva cepa de PToV filogenéticamente relacionada con P4 en una muestra recogida en 2002 sugiere que al menos estos dos linajes de PToV podrían estar circulando actualmente en determinadas poblaciones porcinas.

En este trabajo, también describimos la expresión de la proteína N de PToV-BRES y su uso para el desarrollo de un método ELISA para detectar anticuerpos contra torovirus en muestras de suero de cerdo. Hasta donde sabemos, hasta la fecha no se ha desarrollado ningún ensayo serodiagnóstico específico para PToV. Los anticuerpos contra PToV se analizaron previamente mediante el ensayo de neutralización de BEV (*Weiss et al., 1984; Liebermann, 1990; Kroneman et al., 1998*), sin embargo, este método es laborioso y su sensibilidad podría verse comprometida por el hecho de que está basado en la reactividad cruzada entre especies de torovirus. Anteriormente, se habían descrito dos ensayos ELISA para detectar anticuerpos contra BToV y BEV. Ambos métodos se desarrollaron usando virus purificado en gradiente de sacarosa, obtenidos a partir de heces de terneros gnobióticos infectados con BToV (*Brown et al., 1987; Van Kruiningen et al., 1992*) o de medio de cultivo de células infectadas con BEV (*Weiss et al. 1984*). Sin embargo, estas estrategias no pueden aplicarse al torovirus porcino, ya que por el momento este no puede ser propagado en cultivos celulares, y no se ha establecido ningún protocolo de infección experimental. Por lo tanto, se necesitan estrategias alternativas para obtener antígenos de PToV específicos.

La expresión de proteínas víricas en células de insecto para desarrollar ensayos de diagnóstico se ha utilizado ampliamente para otros virus (*Pelosi et al., 1999; Sestak et al., 1999; Guo et al., 2001; Deng et al., 2003; Timani et al. , 2004; Farkas et al., 2005; Shin et al., 2007*). La proteína de la nucleocápsida de torovirus es la proteína más abundante en los viriones, y es altamente antigénica, como lo demuestra la fuerte respuesta de anticuerpos desarrollada contra ella en terneros gnobióticos infectados experimentalmente con BToV. Las proteínas N y HE de la cepa BToV BRV-1 se expresaron previamente en *E. coli* (*Duckmanton et al., 1998*) y en células de insecto (*Duckmanton et al., 1999*), respectivamente, y ambas proteínas mostraron reactividad con antisueros específicos y con muestras de suero de campo por Western-blot. Sin embargo, estas proteínas no se usaron para desarrollar ningún ensayo de diagnóstico. Por lo

tanto, decidimos usar la proteína N de PToV como antígeno para desarrollar métodos de diagnóstico. Para ello, la proteína de nucleocápsida del aislado de PToV-BRES se expresó en células de insecto y se purificó mediante cromatografía de afinidad. Usando este sistema, se lograron grandes cantidades de proteína altamente purificada. La proteína recombinante PToV-BRES-N se usó para desarrollar un ensayo ELISA para detectar anticuerpos contra torovirus en muestras de suero de cerdo. Además, dado el alto grado de conservación de la proteína N, el ensayo desarrollado también puede ser útil para estudiar la seroprevalencia de torovirus bovinos e incluso humanos.

La optimización del ELISA se llevó a cabo utilizando una muestra de suero de un cerdo infectado naturalmente por PToV (αBRES), una mezcla de suero comercial de cerdos sanos (CPS) y muestras de suero de cerdos SPF inoculados o no con PRRSV o PRCV. El ensayo demostró ser muy reproducible ya que se observó muy poca variación en los valores el O.D. con los sueros utilizados como control positivo y negativo entre ensayos realizados en días diferentes. La reactividad cruzada del PToV con otros virus relacionados que infectan cerdos se descartó en los tres ensayos analizados (ELISA, Western-blot y neutralización del virus). Por lo tanto, estos resultados confirman que estos virus no están relacionados serológicamente, y están de acuerdo con los resultados previos descritos por otros autores (*Woode et al., 1982; Woode et al., 1985; Lamouliatte et al., 1987*). Sin embargo, los anticuerpos CPS reconocieron las proteínas PToV-N y BEV-N (no mostradas), lo que indica que los animales utilizados para obtener el suero se habían infectado o estaban expuestos a PToV. Ya había descripciones anteriores similares de reactividad de diferentes lotes de suero comercial de ternero recién nacido con BEV (*Vanopdenbosch et al., 1992b*).

Debido a la falta de sueros de referencia para PToV, el valor de corte de ELISA se determinó empíricamente usando muestras de suero de animales SPF y CD/CD. En general, los resultados de ELISA de animales adultos de diferentes granjas españolas situadas en Aragón (n = 20) y Navarra (n = 10) sugieren una alta prevalencia de anticuerpos en la población porcina española, ya que los 30 cerdos adultos analizados en estas granjas fueron positivos mediante ELISA , y estos resultados fueron confirmados por el ensayo de neutralización y por Western-blot. Por otro lado, la alta prevalencia de anticuerpos en muestras de suero de lechones de la granja de Galicia sugiere que la infección por PToV ocurre temprano en los lechones. Esta tasa de prevalencia es más alta que las reportadas previamente para PToV en los Países Bajos (81%) usando el ensayo de neutralización (*Kroneman et al., 1998*) y para BToV (*Brown et al., 1987; Koopmans et al., 1989*). Sin embargo, estos datos de tasa de prevalencia de PToV solo pueden considerarse preliminares, ya que tanto este estudio como el realizado en los Países Bajos se llevaron a cabo con un número reducido de animales. Se necesitan más estudios epidemiológicos para obtener información definitiva sobre las prevalencias de PToV en España y en otros países.

El potencial patogénico del PToV como agente causante de la diarrea sigue sin estar claro. En este sentido, los

cerdos de la granja de Aragón, donde se notificó un brote de gastroenteritis aguda sin un agente causal identificado, muestran altos niveles de anticuerpos contra torovirus. Se necesitan más estudios para comprender la potencial patogénesis del PToV.

En conclusión, en este trabajo desarrollamos un ELISA para el diagnóstico de torovirus que podría ser muy útil para futuros estudios epidemiológicos, para determinar la seroprevalencia del torovirus porcino, pero también para los torovirus bovinos e incluso humanos. Además, la proteína de nucleocápsida expresada por el sistema de expresión de baculovirus también podría evaluarse en protocolos de inmunización para estudiar su posible aplicación con fines de vacunación contra torovirus. A este respecto, se han descrito la obtención de respuestas protectoras contra diferentes coronavirus mediante inmunización con la proteína de la nucleocápsida (*Wasmoen et al., 1995; Seo et al., 1997; Cavanagh et al., 2003*). Además, describimos una nueva cepa de PToV. Los genes que codifican las proteínas estructurales de esta cepa se han secuenciado por completo proporcionando información sobre la evolución de los torovirus. Este trabajo contribuye a aumentar nuestro conocimiento sobre este grupo de virus poco estudiado pero altamente prevalente, proporciona herramientas importantes para futuros estudios, y presenta, por primera vez, evidencias preliminares sobre la presencia de anticuerpos contra el torovirus en el ganado porcino español.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Raquel Blanco y Juan Ramón Rodríguez por la lectura crítica del manuscrito. También queremos agradecer a R.J. de Groot (Universidad de Utrecht, Utrecht, Países Bajos) por proporcionarnos las células *E. Derm* y el virus BEV, S. Van Gucht (Universidad de Gante, Bélgica) por proporcionarnos muestras de suero de lechones SPF. A J. Segales por proporcionarnos las muestras de suero de animales CD / CD y a L. Enjuanes para el suministro de virus TGEV y PRRSV.

Este trabajo fue financiado por los proyectos CICYT-BIO2006-10988 y CONSOLIDER-PORCIVIR CSD2006-00007 a D.R. J.P. fue beneficiario de una beca FPI del Ministerio de Educación y Ciencia de España.

Referencias bibliográficas

1. Beards GM, Brown DW, Green J, Flewett TH,1986. "Preliminary characterisation of torovirus-like particles of humans: comparison with Berne virus of horses and Breda virus of calves." *J Med Virol* 20(1): 67-78.
2. Bogdanova, V. S., V. V. Tsibezov, V. V. Grabovetskii, O. V. Eliseeva, T. V. Grebennikova, O. A. Verkhovskii, A. D. Zabereshchnyi and T. I. Aliper (2007). "[Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome virus, by using recombinant nucleocapsid protein N]." *Vopr Virusol* 52(2): 45-9.
3. Brown, D. W., G. M. Beards and T. H. Flewett (1987). "Detection of Breda virus antigen and antibody in humans and animals by enzyme immunoassay." *J Clin Microbiol* 25(4): 637-40.
4. Cavanagh, D. (2003). "Severe acute respiratory syndrome vaccine development: experiences of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus." *Avian Pathol* 32(6): 567-82.
5. Chirnside, E. D., P. M. Francis, A. A. de Vries, R. Sinclair and J. A. Mumford (1995). "Development and evaluation of an ELISA using recombinant fusion protein to detect the presence of host antibody to equine arteritis virus." *J Virol Methods* 54(1): 1-13.
6. Denac, H., C. Moser, J. D. Tratschin and M. A. Hofmann (1997). "An indirect ELISA for the detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus using recombinant nucleocapsid protein as antigen." *J Virol Methods* 65(2): 169-81.
7. Deng, Y., C. A. Batten, B. L. Liu, P. R. Lambden, M. Elschner, H. Gunther, P. Otto, P. Schnurch, W. Eichhorn, W. Herbst and I. N. Clarke (2003). "Studies of epidemiology and seroprevalence of bovine noroviruses in Germany." *J Clin Microbiol* 41(6): 2300-5.
8. Duckmanton, L., B. Luan, J. Devenish, R. Tellier and M. Petric (1997). "Characterization of torovirus from human fecal specimens." *Virology* 239(1): 158-68.
9. Duckmanton, L., R. Tellier, C. Richardson and M. Petric (1999). "The novel hemagglutinin-esterase genes of human torovirus and Breda virus." *Virus Res* 64(2): 137-49.
10. Duckmanton LM, R Tellier, P Liu, M. Petric, 1998. "Bovine torovirus: sequencing of the structural genes and expression of the nucleocapsid protein of Breda virus." *Virus Res* 58(1-2): 83-96.
11. Durham, P. J., L. E. Hassard, K. R. Armstrong and J. M. Naylor (1989). "Coronavirus-associated diarrhea (winter dysentery) in adult cattle." *Can Vet J* 30(10): 825-827.
12. Farkas, T., S. Nakajima, M. Sugieda, X. Deng, W. Zhong andX. Jiang (2005). "Seroprevalence of noroviruses in swine." *J Clin Microbiol* 43(2): 657-61.
13. González, J. M., P. Gómez-Puertas, D. Cavanagh, A. E. Gorbalenya and L. Enjuanes (2003). "A comparative sequence analysis to revise the current taxonomy of the family Coronaviridae." *Arch Virol* 148(11): 2207-35.
14. Guo, M., J. F. Evermann and L. J. Saif (2001). "Detection and molecular characterization of cultivable caliciviruses from clinically normal mink and enteric caliciviruses associated with diarrhea in mink." *Arch Virol* 146(3): 479-93.
15. Horzinek, M. C., J. Ederveen and M. Weiss (1985). "The nucleocapsid of Berne virus." *J Gen Virol* 66 (Pt 6): 1287-96.
16. Hou, X. L., L. Y. Yu and J. Liu (2007). "Development and evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant nucleocapsid protein for detection of porcine epidemic diarrhea (PEDV) antibodies." *Vet Microbiol* 123 (1-3): 86-92.
17. Ito, T., N. Okada and S. I. Fukuyama (2007). "Epidemiological analysis of bovine torovirus in Japan." *Virus Res*.
18. Jamieson, F. B., E. E. Wang, C. Bain, J. Good, L. Duckmanton and M. Petric (1998). "Human torovirus: a new nosocomial gastrointestinal pathogen." *J Infect Dis* 178(5): 1263-9.
19. Koopmans, M., U. van den Boom, G. Woode and M. C. Horzinek (1989). "Seroepidemiology of Breda virus in cattle using ELISA." *Vet Microbiol* 19(3): 233-43.
20. Koopmans, M., L. van Wuijckhuise-Sjouke, Y. H. Schukken, H. Cremers and M. C. Horzinek (1991). "Association of diarrhea in cattle with torovirus infections on farms." *Am J Vet Res* 52 (11): 1769-73.
21. Koopmans, M. P., E. S. Goosen, A. A. Lima, I. T. McAuliffe, J. P. Nataro, L. J. Barrett, R. I. Glass and R. L. Guerrant (1997).

Referencias bibliográficas

"Association of torovirus with acute and persistent diarrhea in children." *Pediatr Infect Dis* J 16(5): 504-7.

22. Krishnan, T. and T. N. Naik (1997). "Electronmicroscopic evidence of torovirus like particles in children with diarrhoea." *Indian J Med Res* 105: 108-10.
23. Kroneman, A., L. A. Cornelissen, M. C. Horzinek, R. J. de Groot and H. F. Egberink (1998). "Identification and characterization of a porcine torovirus." *J Virol* 72(5): 3507-11.
24. Kuwabara, M., K. Wada, Y. Maeda, A. Miyazaki and H. Tsunemitsu (2007). "First isolation of cytopathogenic bovine torovirus in cell culture from a calf with diarrhea." *Clin Vaccine Immunol* 14(8): 998-1004.
25. Lamouliatte, F., P. du Pasquier, F. Rossi, J. Laporte and J. P. Loze (1987). "Studies on bovine Breda virus." *Vet Microbiol* 15(4): 261-78.
26. Lavazza, A., P. Candotti, S. Perini, and L. Vezzali. (1996). "Electron microscopic identification of torovirus-like particles in post-weaned piglets with enteritis." 14th IPVS Congress, Bologna, Italy.
27. Liebermann, H. (1990). "[New types of virus infections of domestic animals in the German Democratic Republic. 1. Serologic survey studies of the distribution of equine torovirus infections in the GDR]." *Arch Exp Veterinar med* 44(2): 251-3.
28. Liebler, E. M., S. Kluver, J. Pohlenz andM. Koopmans (1992). "[The significance of bredavirus as a diarrhea agent in calf herds in Lower Saxony]." *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 99(5): 195-200.
29. Lodha, A., N. de Silva, M. Petric and A. M. Moore (2005). "Human torovirus: a new virus associated with neonatal necrotizing enterocolitis." *Acta Paediatr* 94(8): 1085-8.
30. Matiz, K., S. Kecskemeti, I. Kiss, Z. Adam, J. Tanyi and B. Nagy (2002). "Torovirus detection in faecal specimens of calves and pigs in Hungary: short communication." *Acta Vet Hung* 50(3): 293-6.
31. Park, S. J., E. H. Oh, S. I. Park, H. H. Kim, Y. J. Jeong, G. K. Lim, B. H. Hyun and K. O. Cho (2007). "Molecular epidemiology of bovine toroviruses circulating in South Korea." *Vet Microbiol.*
32. Pelosi, E., P. R. Lambden, E. O. Caul, B. Liu, K. Dingle, Y. Deng and I. N. Clarke (1999). "The seroepidemiology of genogroup 1 and genogroup 2 Norwalk-like viruses in Italy." *J Med Virol* 58(1): 93-9.
33. Penrith, M. L. and G. H. Gerdes (1992). "Breda virus-like particles in pigs in South Africa." *J S Afr Vet Assoc* 63(3): 102.
34. Rodríguez, D., C. Risco, J. R. Rodríguez, J. L. Carrascosa and M. Esteban (1996). "Inducible expression of the vaccinia virus A17L gene provides a synchronized system to monitor sorting of viral proteins during morphogenesis." *J Virol* 70(11): 7641-53.
35. Scott, A. C., M. J. Chaplin, M. J. Stack andL. J. Lund (1987). "Porcine torovirus?" *Vet Rec* **120**(24): 583.
36. Seo, S. H., L. Wang, R. Smith and E. W. Collisson (1997). "The carboxyl-terminal 120-residue polypeptide of infectious bronchitis virus nucleocapsid induces cytotoxic T lymphocytes and protects chickens from acute infection." *J Virol* 71(10): 7889-94.
37. Sestak, K., Z. Zhou, D. I. Shoup and L. J. Saif (1999). "Evaluation of the baculovirus-expressed S glycoprotein of transmissible gastroenteritis virus (TGEV) as antigen in a competition ELISA to differentiate porcine respiratory coronavirus from TGEV antibodies in pigs." *J Vet Diagn Invest* 11(3): 205-14.
38. Shin, G. C., Y. S. Chung, I. S. Kim, H. W. Cho and C. Kang (2007). "Antigenic characterization of severe acute respiratory syndrome-coronavirus nucleocapsid protein expressed in insect cells: The effect of phosphorylation on immunoreactivity and specificity." *Virus Res* 127(1): 71-80.
39. Smits, S. L., G. J. Gerwig, A. L. van Vliet, A. Lissenberg, P. Briza, J. P. Kamerling, R. Vlasak and R. J. de Groot (2005). "Nidovirus sialate-O-acetylesterases: evolution and substrate specificity of coronaviral and toroviral receptor-destroying enzymes." *J Biol Chem* 280(8): 6933-41.
40. Smits, S. L., A. Lavazza, K. Matiz, M. C. Horzinek, M. P. Koopmans and R. J. de Groot (2003). "Phylogenetic and evolutionary relationships among torovirus field variants: evidence for multiple intertypic recombination events." *J Virol* 77(17): 9567-77.
41. Timani, K. A., L. Ye, L. Ye, Y. Zhu, Z. Wu and Z. Gong (2004). "Cloning, sequencing, expression, and purification of SARS-associated coronavirus nucleocapsid protein for serodiagnosis of SARS." *J Clin Virol* 30(4): 309-12.
42. Uziel, Y., R. M. Laxer and M. Petric (1999). "Torovirus gastroenteritis presenting as acute abdomen." *Clin Infect Dis* 28(4): 925-6.
43. Van Kruiningen, H. J., V. P. Castellano, M. Koopmans and L. L. Harris (1992). "A serologic investigation for coronavirus and Breda virus antibody in winter dysentery of dairy cattle in the northeastern United States." *J Vet Diagn Invest* 4(4): 450-2.
44. Vanopdenbosch, E., G. Wellemans, G. Charlier and K. Petroff (1992b). "Bovine torovirus: cell culture propagation of a respiratory isolate and some epidemiological data." *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 61: 45-49.
45. Wang, Y., Z. Chang, J. Ouyang, H. Wei, R. Yang, Y. Chao, J. Qu, J. Wang and T. Hung (2005). "Profiles of IgG antibodies to nucleocapsid and spike proteins of the SARS-associated coronavirus in SARS patients." *DNA Cell Biol* 24(8): 521-7.
46. Wasmoen, T. L., N. P. Kadakia, R. C. Unfer, B. L. Fickbohm, C. P. Cook, H. J. Chu and W. M. Acree (1995). "Protection of cats from infectious peritonitis by vaccination with a recombinant raccoon poxvirus expressing the nucleocapsid gene of feline infectious peritonitis virus." *Adv Exp Med Biol* 380: 221-8.
47. Weiss, M., F. Steck and M. C. Horzinek (1983). "Purification and partial characterization of a new enveloped RNA virus (Berne virus)." *J Gen Virol* 64 (Pt 9): 1849-58.
48. Weiss, M., F. Steck, R. Kaderli and M. C. Horzinek (1984). "Antibodies to Berne virus in horses and other animals." *Vet Microbiol* 9(6): 523-31.
49. Woo, P. C., S. K. Lau, B. H. Wong, K. H. Chan, C. M. Chu, H. W. Tsoi, Y. Huang, J. S. Peiris and K. Y. Yuen (2004). "Longitudinal profile of immunoglobulin G (IgG), IgM, and IgA antibodies against the severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus nucleocapsid protein in patients with pneumonia due to the SARS coronavirus." *Clin Diagn Lab Immunol* 11(4): 665-8.
50. Woode, G. N. (1987). "Breda and Breda-like viruses: diagnosis, pathology and epidemiology." Ciba Found Symp 128: 175-91.
51. Woode, G. N., D. E. Reed, P. L. Runnels, M. A. Herrig and H. T. Hill (1982). "Studies with an unclassified virus isolated from diarrheic calves." *Vet Microbiol* 7(3): 221-40.
52. Woode, G. N., L. J. Saif, M. Quesada, N. J. Winand, J. F. Pohlenz and N. K. Gourley (1985). "Comparative studies on three isolates of Breda virus of calves." *Am J Vet Res* 46(5): 1003-10.
53. Zhou,Y., Chen, L. Zhu, L. and Xu, Z. (2013). Molecular Detection of Porcine Torovirus in Piglets with Diarrhea in Southwest China. *The Scientific World Journal.* Article ID 984282.
54. Zhou, L. Wei1, H., Zhou, Y., Xu, Z., Zhu, L. and Horne, J. (2014). Molecular epidemiology of Porcine torovirus (PToV) in Sichuan Province, China: 2011–2013 *Virology Journal,* 11:106