

LA ENFERMEDAD VESICULAR DEL CERDO: BASES MOLECULARES E INMUNOLÓGICAS Y DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD (Revisión)

M.A. JIMÉNEZ-CLAVERO, E. ESCRIBANO ROMERO, V. LEY

INIA. Ctra. Coruña Km 7,5. 28140 Madrid, España
majimene@inia.es

RESUMEN

La enfermedad vesicular del cerdo es una enfermedad altamente contagiosa que afecta al ganado porcino, causada por un enterovirus de la familia *Picornaviridae*. El virus es un derivado relativamente reciente del virus humano coxsackie-B5, con el que tiene gran homología molecular y antigénica. La enfermedad no es grave y los animales se suelen recuperar en pocos días. Sin embargo, suelen aparecer vesículas en el hocico y en los espacios interdigitales de las pezuñas. El hecho de que estos síntomas sean indistinguibles de los causados por el virus de la fiebre aftosa, hace que este virus esté incluido dentro de la lista A de la Oficina Internacional de Epizootias. Actualmente la enfermedad está erradicada en los países de la Unión Europea excepto en Italia, donde se considera endémica. Sin embargo, en Europa se mantiene el estado de alarma por la posible aparición de brotes, ya que esporádicamente aparecen en algunos países y han de ser erradicados inmediatamente. Para ello se ha invertido un considerable esfuerzo en investigación de métodos de diagnóstico eficaces y en el estudio del virus y la patología de la enfermedad, información que resumimos en esta revisión.

PALABRAS CLAVE: Enfermedad vesicular
EVC
Virus
Enterovirus
Cerdo
Diagnóstico
Patología
Respuesta inmune

LA ENFERMEDAD VESICULAR DEL CERDO

La enfermedad vesicular del cerdo (EVC) es una patología infecciosa que afecta al ganado porcino. El agente etiológico es un virus perteneciente a la familia *Picornaviridae*, gé-

Recibido: 12-5-00
Aceptado para su publicación: 4-8-00

nero Enterovirus, conocido como virus de la enfermedad vesicular del cerdo (VEVC). No es una enfermedad grave, normalmente se reduce a un moderado decaimiento general con ligera disminución de peso que se recupera en pocos días, y a la aparición de lesiones vesiculares en la mucosa bucal y nasal y en la piel de los espacios interdigitales de la almohadilla plantar y del hocico (Fig. 1). Sin embargo, el hecho de que estas lesiones sean indistinguibles de las causadas por el virus de la fiebre aftosa (VFA), hace que la EVC esté incluida en la lista A de la Organización Internacional de Epizootías. Por otra parte, otras dos enfermedades, el exantema vesicular del cerdo y la estomatitis vesicular porcina, pueden originar síntomas clínicos muy parecidos a los de la EVC, lo que hay que tener en cuenta al realizar el diagnóstico, que ha de diferenciar entre todas estas enfermedades.

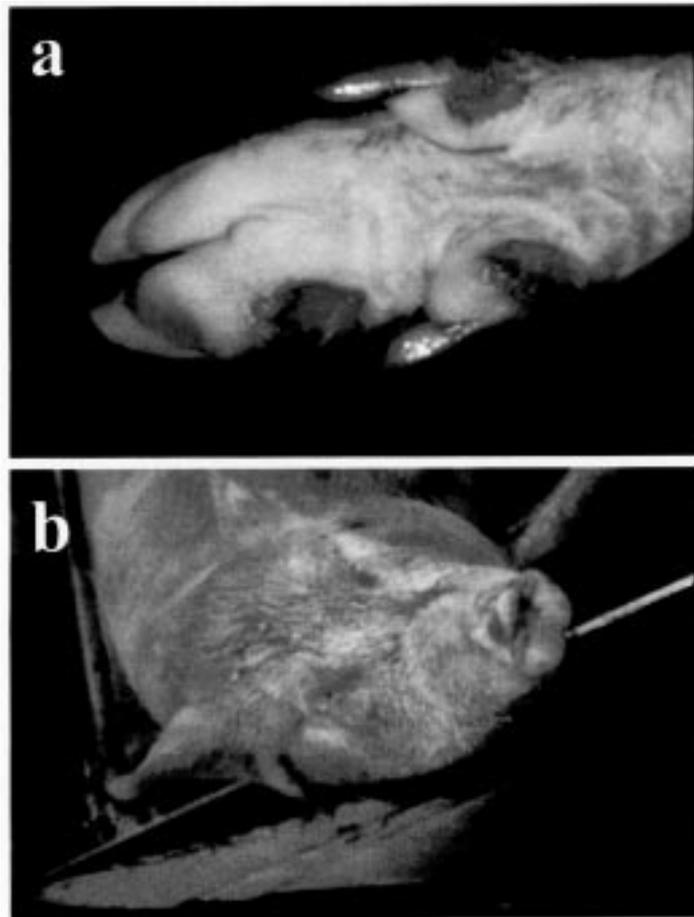


Fig. 1.—Lesiones vesiculares típicas producidas por el virus de la enfermedad vesicular del cerdo. (a) en una pezuña. (b) en el morro
Typical vesicular lesions produced by swine vesicular disease virus. (a) In the hoof. (b) In the snout

La EVC es muy contagiosa y se extiende rápidamente por contacto directo con cerdos infectados y por contaminación ambiental. España se encuentra desde 1993 libre de EVC, pero no es así en otros países europeos y asiáticos. Actualmente la enfermedad se considera endémica en el sur de Italia, donde se lleva a cabo un plan de erradicación desde hace varios años que todavía no ha resuelto el problema. Por otra parte, esporádicamente siguen apareciendo brotes ocasionales en otros países como Holanda, Portugal y Dinamarca. Esto hace que España se encuentre en situación de alarma dado el riesgo que supone la entrada del mismo, lo que significaría la adopción de medidas restrictivas en la exportación de animales y sus productos, con las consecuentes pérdidas económicas para el país. Esta situación hace que tanto el diagnóstico como el conocimiento de la patología de la enfermedad sean temas prioritarios para prevenir posibles entradas del virus y erradicar inmediatamente los brotes.

SINTOMATOLOGÍA Y PATOGENICIDAD

Las lesiones provocadas por el VEVC aparecen entre 3 y 11 días después de la introducción del virus mediante ingesta de alimentación contaminada (Dekker *et al.*, 1995a; McKercher *et al.*, 1974) o por contaminación directa con animales infectados. Este tiempo se reduce a 2-3 días en el caso de inoculación experimental (Burrows *et al.*, 1973; Lai *et al.*, 1979). Como en el caso de la FA, las primeras lesiones aparecen en el rodete coronario y comienzan como pequeñas áreas pálidas que van aumentando ligeramente y expandiéndose con el proceso de vesiculación. El epitelio se puede separar del estrato basal dejando una lesión enrojecida de epitelio desgarrado (Seibold y Sharp, 1960). El estrato basal permanece intacto y, si no ocurre una infección bacteriana secundaria, el epitelio se regenera en 1-2 semanas. La aparición de fiebre coincide con el desarrollo de viremia (presencia de virus en circulación). El pico de viremia ocurre 2-4 días después de la exposición al virus y tiene una duración aproximada de seis días (Dekker *et al.*, 1995a), sin embargo, el VEVC puede persistir durante más de 10 días en los tejidos del hocico, lengua, rodete coronario, músculo cardíaco y sistema nervioso central (House y House, 1992). Es frecuente la aparición de meningoencefalitis no supurativa en el cerebro, tálamo y lóbulos olfatorios. En el endocardio y miocardio se da una reacción inflamatoria seguida de necrosis. (Lai *et al.*, 1979). Existe una gran variedad en la gravedad de las lesiones, dependiendo fundamentalmente del peso de los animales y del tipo suelo que pisen. En muchos casos la EVC se puede presentar de forma subclínica, detectándose virus en heces de animales asintomáticos (Kodama *et al.*, 1980a). Por último, como ocurre con la FA, se ha descrito la presencia de virus en animales hasta cuatro meses después de la infección inicial (Lin *et al.*, 1998). Estos animales suelen ser asintomáticos, pero al estar infectados persistentemente, constituyen un riesgo potencial para la transmisión del virus a otros animales.

EPIDEMIOLOGÍA

La EVC se registró por primera vez en Italia en 1966 y fue diagnosticada como fiebre aftosa (FA). Ante la imposibilidad de confirmar en el laboratorio dicho diagnóstico, se llevó a cabo un estudio en el que se identificó el virus causante de esta nueva enfermedad. (Nardelli *et al.*, 1968). El siguiente brote se detectó en 1971 en Hong Kong, donde han seguido apareciendo casi anualmente. Entre 1972 y 1983 se detectaron brotes de EVC en Italia, Austria, Reino Unido, Francia y Polonia, Alemania, Suiza, Bélgica, Malta, y Japón. (Dawe *et al.*, 1973; Brocchi *et al.*, 1997). Desde entonces hasta 1990, y con la excepción de Italia, la EVC se consiguió eliminar de Europa mediante campañas de erradicación en aquellos países donde surgían brotes. Durante los primeros años de la década de los noventa, reapareció la incidencia de la EVC en varios países europeos pero, con excepción de Italia, se ha conseguido erradicar de los países de la Unión Europea. Por otra parte, aunque difícil de documentar, es probable que haya actualmente brotes ocasionales en China, Hong Kong y otros países de Asia (Kanno *et al.*, 1999).

En España, el primer brote de EVC se detectó en febrero de 1993 en la provincia de Lérida y todos los cerdos de la granja afectada fueron sacrificados. Dos meses más tarde, se diagnosticó EVC en Huesca y se sacrificaron más de tres mil cerdos. Desde entonces, todas las granjas se analizan rutinariamente para la detección del virus (Espuña *et al.*, 1993; Kaman, 1993), así como los animales importados y sus derivados. Estos controles han prevenido una reintroducción de EVC en España.

Como ya se ha comentado, la EVC se contagia principalmente por contacto directo con cerdos infectados, por sus excrementos, o por alimentos contaminados con el virus. El cerdo expulsa VEVC en sus heces hasta 23 días después de la infección experimental (Burrows *et al.*, 1973). Los productos alimenticios derivados de animales infectados representan otra fuente de infección, aunque se ha comprobado la inactivación del VEVC durante los procesos de curación de jamones de al menos 200 días (McKercher *et al.*, 1985).

Los procedimientos de desinfección deben ser muy rigurosos debido a la estabilidad y ácido-resistencia del virus. De hecho se ha encontrado VEVC en el tracto intestinal y en la superficie de lombrices de tierra bajo la cual se habían enterrado cerdos infectados, indicando la persistencia del VEVC en el ambiente (Combs, 1973). También se ha encontrado VEVC en el tracto nasal de personas que trabajaban con cerdos infectados o cerca de éstos (Sellers y Herniman, 1974), y en las ruedas u otros componentes de los vehículos utilizados para el transporte de animales contaminados.

EL VIRUS DE LA ENFERMEDAD VESICULAR DEL CERDO: RASGOS GENERALES

El virus de la enfermedad vesicular del cerdo (VEVC) es un enterovirus de la familia *Picornaviridae*. El virión está constituido por una cápsida proteica sin envuelta, compuesta por cuatro proteínas estructurales: VP1, VP2, VP3 y VP4 (ver apartado 4). La cápsida es de forma esférica, con simetría icosaédrica y con un diámetro entre 25µm y 30µm, en cuyo interior se encuentra una molécula de ARN (+) de cadena simple de 7.400 nucleóti-

dos (Inoue *et al.*, 1989). El VEVK es un virus muy relacionado con el virus humano coxsackie B5 (CV-B5), con el que tiene un 75-85 % de homología en la secuencia de nucleótidos (Knowles y McCauley, 1997). En 1973 se propuso por primera vez la introducción del VEVK en cerdos a través del CV-B5 humano (Graves, 1973; Brown *et al.*, 1973). Más recientemente, los análisis de la secuencia nucleotídica del CV-B5 (Zhang *et al.*, 1993) y del VEVK (Inoue *et al.*, 1989, 1993; Seechurn *et al.*, 1990), han corroborado su relación filogenética. La confirmación de que el VEVK es un derivado del CB5 se describe en un estudio publicado en 1999 (Zhang *et al.*, 1999), en el que se analizaron 45 aislados de brotes de VEVK surgidos en Europa y Asia entre 1966 y 1993 y se determinó un «reloj molecular», con el que se pudo estimar el momento de divergencia del grupo del VEVK entre los años 1945 y 1965.

ESTRUCTURA DEL GENOMA DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD VESICULAR DEL CERDO

El genoma del VEVK consiste en una única molécula de ARN monocatenaria de 7.400 nucleótidos (Inoue *et al.*, 1989, 1993; Seechurn *et al.*, 1990), de polaridad positiva, es decir, actúa en la célula infectada como ARN mensajero. Posee una única fase de lectura abierta que codifica una única poliproteína. Ésta se procesa en el citoplasma de las células infectadas por proteasas específicas, para dar los distintos polipéptidos virales. Una primera escisión de este precursor produce tres polipéptidos, P1, P2 y P3. P1 dará lugar a las cuatro proteínas de la cápsida. VP1, VP2, VP3 y VP4 (ver apartado 4), mientras que P2 y P3 darán lugar a las distintas proteínas no estructurales (Fig. 2). Entre éstas, hay dos proteínas (2A y 3C) con actividad proteolítica, que participan en el proceso de maduración de los polipéptidos virales. La proteína 2C presenta similitudes en su secuencia con helicasas y ATPasas, y es capaz de interactuar con membranas celulares, aunque su función exacta se desconoce, al igual que las funciones de 2B y 3A. El polipéptido 3B, o VPg, se une covalentemente al extremo 5' no codificante del ARN viral, participando en la replicación del mismo. Por último, la proteína 3D es la ARN polimerasa viral. La región codificante del ARN está flanqueada por dos regiones que no se traducen. En el extremo 5' no codificante existe una región altamente estructurada, conocida como IRES (por las iniciales, en inglés, de «sitio interno de entrada del ribosoma») que, en ausencia de CAP (complejo de unión al ribosoma en los ARN mensajeros celulares), del que carecen estos ARNs virales, es la región a la que se une el ribosoma celular para iniciar la traducción. En la región 3' no codificante también hay un segmento muy estructurado, posiblemente implicado en la replicación del ARN viral, seguido de una cadena de poliadeninas de longitud variable, similar a la que poseen los ARN mensajeros celulares.

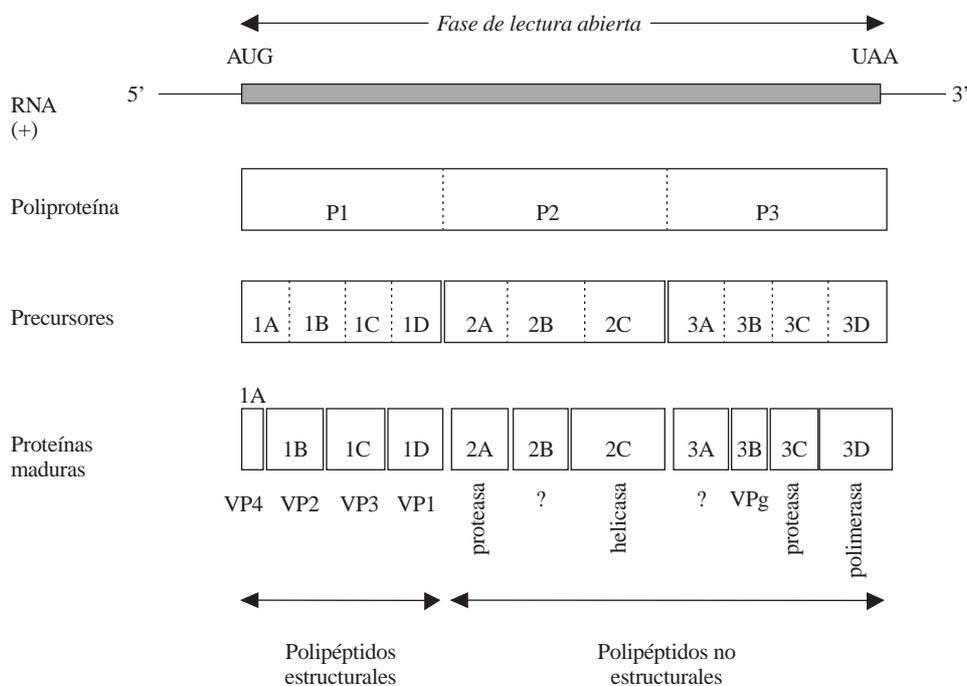


Fig. 2.—Esquema de la organización del genoma del VECV y de los productos del procesamiento de la poliproteína viral

Las líneas verticales discontinuas corresponden a los sitios de procesamiento proteolítico

Genomic organization of SVDV and products of the processing of the viral polyprotein
Discontinuous vertical lines correspond to proteolytic sites

ESTRUCTURA DE LA CÁPSIDA VIRAL: MORFOGÉNESIS, CAMBIOS CONFORMACIONALES Y CARACTERIZACIÓN ANTIGÉNICA

La cápsida del VECV presenta una estructura típica de picornavirus: consta de 60 subunidades, o protómeros, cada uno de ellos formado por cuatro cadenas polipeptídicas distintas, VP1, VP2, VP3 y VP4, que resultan del procesamiento proteolítico del precursor P1. Las subunidades se autoensamblan para formar una cápsida icosaédrica con simetría T=1 que envuelve y protege al ARN viral. En una primera fase, el precursor P1 es procesado por una proteasa viral para dar tres polipéptidos, VP0, VP3 y VP1 que se ensamblan dando lugar al protómero. Cinco de estas subunidades o protómeros se asocian para formar intermediarios pentaméricos. Doce pentámeros pueden formar una «cápsida vacía», o provirión, que carece de ARN y es considerado un intermediario tardío en la morfogénesis de estos virus. Posteriormente, se introduce la molécula de ARN por un me-

canismo que no está bien caracterizado. La última etapa de este ensamblaje, una vez el ARN está ya encapsidado, consiste en la proteólisis, que se considera autocatalítica, del precursor VP0 para dar lugar a VP2 y VP4. Esta proteólisis es necesaria para producir virus infectivo.

En el virión maduro, las proteínas VP1, VP2 y VP3 (33, 32 y 29 kDa, respectivamente (Tsuda *et al.*, 1987), se encuentran expuestas hacia la superficie, formando una «coraza» proteica muy compacta, mientras que VP4 (unos 7,5 kDa) se encuentra situada hacia el interior de la cápsida, interaccionando con el ARN viral. Las proteínas VP1, VP2 y VP3 presentan una estructura terciaria muy conservada entre picornavirus, y en gran medida común a las tres cadenas polipeptídicas, consistente en un núcleo central hidrofóbico formado por ocho láminas β antiparalelas («barril β ») conectadas por bucles, o *loops* de extensión variable. Por convención, las láminas β se denominan alfabéticamente B-I por su orden de aparición en la cadena polipeptídica. Los *loops* toman el nombre de las láminas β que los flanquean; así, el *loop* BC de VP3 es la región de la cadena polipeptídica VP3 que queda entre las láminas β B y C. Existen, además, dos hélices α internas, denominadas α A y α B, precediendo en la secuencia a las láminas β D y F, respectivamente. Muchos de los *loops* quedan expuestos hacia la superficie del virión. También se encuentran orientadas hacia la superficie las extensiones carboxi-terminales de las proteínas VP1, VP2 y VP3, mientras que los extremos amino-terminales se encuentran orientados hacia el interior.

La caracterización antigénica del VEEC se ha llevado a cabo mediante dos tipos de análisis: 1) secuenciación de variantes virales de escape a la neutralización por anticuerpos monoclonales (AcM), (mutantes MAR) (Kanno *et al.*, 1995; Nijhar *et al.*, 1999b), y 2) análisis serológico del reconocimiento de péptidos solapantes que contienen secuencias de aminoácidos correspondientes a las proteínas estructurales del virión (ELISA «pepscan») (Jiménez-Clavero *et al.*, 2000). Estos sitios antigénicos se han localizado en la cápsida del VEEC con la ayuda de modelos tridimensionales (Kanno *et al.*, 1995) (Jiménez-Clavero *et al.*, 2000). Dichos modelos están construidos mediante modelización por homología (Peitsch, 1996) a partir de datos estructurales de la cápsida de diferentes especies de picornavirus relacionados cuya estructura atómica ha sido ya resuelta, entre ellos coxsackievirus B3 (Muckelbauer *et al.*, 1995), poliovirus 1,2 y 3 (Hogle *et al.*, 1985), y rinovirus 3 (Zhao *et al.*, 1996) y 14 (Rossmann *et al.*, 1985). Mediante el análisis de mutantes MAR, se han identificado siete sitios de neutralización en la cápsida del VEEC (Tabla 1). Cinco de ellos se han identificado utilizando el aislado clásico no patogénico H3/76 (Kodama *et al.*, 1980b), y han sido designados como sitios 1, 2A, 2B, 3A y 3B (Kanno *et al.*, 1995). Estos cinco sitios son análogos a los sitios de neutralización 1, 2, 3A, 3B y 3C de poliovirus (Minor *et al.*, 1986), la especie tipo del género enterovirus. Los otros dos sitios se han identificado utilizando el aislado europeo patogénico ITL/9/93. Uno de ellos se encuentra situado en la región carboxi-terminal de VP1 (residuo 261) y el otro en la región carboxi-terminal de VP3 (residuo 234) (Nijhar *et al.*, 1999a). La proximidad del residuo 261 de la VP1 con los residuos implicados en el sitio 1 (87 y 88 de la VP1) en la estructura tridimensional de la cápsida del VEEC sugiere que ambos podrían formar parte de un mismo sitio antigénico.

Todos los sitios de neutralización definidos por análisis de mutantes MAR están bien expuestos en la superficie de la cápsida, tal y como puede verse en el modelo tridimensional del virus (Fig. 3a). Por otro lado, el análisis de la estructura antigénica del VEEC por ELISA pepsan ha permitido definir al menos otras siete regiones antigénicas en las pro-

TABLA 1
PRINCIPALES SITIOS ANTIGÉNICOS IDENTIFICADOS EN LA CÁPSIDA DEL VEVC

Major antigenic sites identified on the SVDV capsid

Técnica empleada	Nombre	Proteína	Residuos implicados	Localización estructural
Mutantes MAR	Sitio 1	VP1	87, 88	Loop β B- β C
“	Sitio 2A	VP2	163	Puff β E- β F
“	Sitio 2B	VP2	154	Puff β E- β F
“	Sitio 3A	VP1	272, 275	C-terminal
“		VP3	60	«knob» β B
“		VP2	70	Loop β B- β C
“	Sitio 3B	VP2	233	Loop β H- β I
“		VP3	73, 76	Loop β B- β C
“	SD	VP1	261	C-terminal
“	SD	VP3	234	C-terminal
Pepscan	Región 1	VP2	42-61	N-terminal
“	Región 2	”	82-121	α A- β D y parte β D- β E
“	Región 3	VP3	1-40	N-terminal
“	Región 4	”	51-70	«knob» β B
“	Región 5	”	91-120	α A- β D
“	Región 6	VP1	1-40	N-terminal
“	Región 7	”	201-220	Loop β G ₂ - β H

teínas de la cápsida (Jiménez-Clavero *et al.*, 2000) (Tabla 1 y Fig. 3b). Entre ellas, solamente dos (regiones 4 y 7) presentan residuos expuestos hacia la superficie de la cápsida, y sólo la región 4 (la más expuesta) solapa con uno de los sitios de neutralización (sitio 3A) definidos por análisis de mutantes MAR. Estos resultados demuestran que durante la infección con el VEVC no sólo la cápsida, tal y como la vemos en los modelos tridimensionales, sino también sus precursores, incluyendo protómeros y pentámeros, son capaces de inducir anticuerpos, aunque éstos probablemente no intervienen en la neutralización del virus.

La cápsida de los picornavirus está lejos de ser estática y rígida, tal como la vemos en los cristales empleados para determinar su estructura. En el análisis por difracción de rayos X se resuelve una estructura «promedio» que corresponde con la cápsida en su conformación más estable posible, en las condiciones en que ocurre la cristalización. Pero durante su ciclo vital, la cápsida de los picornavirus puede adoptar varias conformaciones. Por ejemplo, existe evidencia de que, al menos en poliovirus, los viriones en condiciones fisiológicas y en solución alternan (o «respiran») en un equilibrio termodinámico entre dos conformaciones, una más estable, en la que la región amino-terminal de la VP1 está internalizada y otra, menos estable, en la que ésta emerge a la superficie (Li *et al.*, 1994; Roivainen *et al.*, 1993). Estas conformaciones alternativas al virión «nativo» pueden también jugar un papel en la inducción de anticuerpos. De acuerdo con un modelo ampliamente aceptado, los picornavirus, especialmente poliovirus (Fricks y Hogle, 1990), cox-

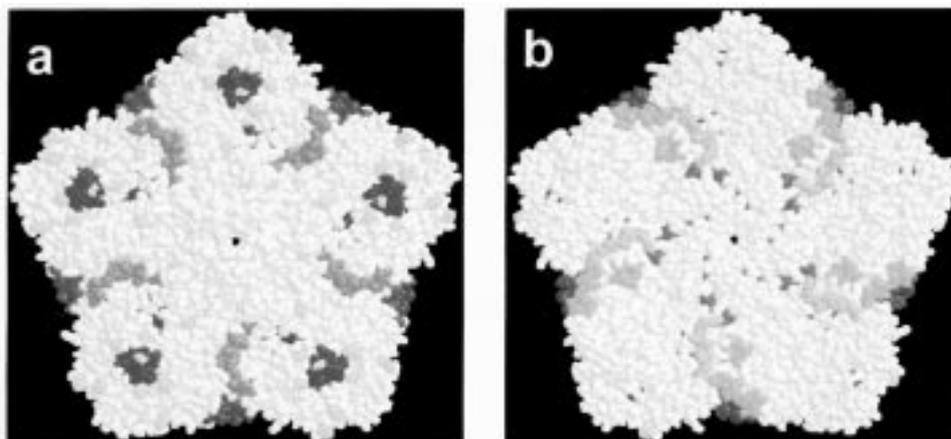


Fig. 3.—Modelo tridimensional de la estructura de la subunidad pentamérica de la cápsida del VEVC vista desde el exterior (A) y vista desde el interior (B). Los puntos de color azul claro representan los sitios antigénicos definidos por mutantes MAR, localizados en la cara externa. Las zonas coloreadas representan las regiones antigénicas definidas por PEPSCAN, según el código siguiente: región 1: verde, región 2: azul, región 3: fucsia, región 4: rojo, región 5: marrón, región 6: amarillo y región 7: naranja

Three-dimensional model of the pentamer subunit of the capsid of SVDV, seen from the external (A) or from the internal (B) side of the capsid. The light blue points represent the antigenic sites defined by MAR mutants. Coloured regions represent the antigenic regions identified by PEPSCAN analysis. Code colour; region 1: green, region 2: blue, region 3: fuchsia, region 4: red, region 5: brown, region 6: yellow and region 7: orange

sackievirus (Crowell y Philipson, 1971) y rhinovirus (Lonberg-Holm y Korant, 1972), sufren cambios conformacionales profundos e irreversibles al interactuar con su receptor celular, transformándose en partículas estructural y antigénicamente alteradas (formas «A»), caracterizadas por un coeficiente de sedimentación más bajo que las partículas virales nativas (o formas «N»), una mayor sensibilidad a proteasas y a ribonucleasas y una mayor hidrofobicidad. En este proceso ocurren dos cambios importantes: la externalización del extremo amino-terminal de la VP1 y la pérdida de la VP4. Las partículas «A» se consideran intermediarios necesarios para la entrada del virus en la célula, y representan la principal forma viral intracelular en las etapas tempranas de la infección. Precisamente, el extremo amino-terminal de la VP1 del VEVC contiene una región muy antigénica según el análisis por ELISA pepscan (región 6, Tabla 1 y Fig. 3b). Diversos datos experimentales sugieren que esta región de la VP1 juega un importante papel en la infección por un amplio rango de enterovirus. Por un lado, sueros de animales inmunizados con péptidos sintéticos derivados de esa región son capaces de neutralizar la infección por poliovirus «in vitro» (Chow *et al.*, 1985; Li *et al.*, 1994). Por otro lado, se han encontrado anticuerpos frente a esa región tanto en conejos inmunizados con coxsackievirus A9 (Pulli *et al.*, 1998) como en humanos vacunados con poliovirus atenuados (vacuna de Sabin) (Roi-vainen *et al.*, 1991). Por último, datos obtenidos recientemente en nuestro laboratorio, demuestran que un péptido sintético correspondiente a la región amino-terminal de la VP1 del VEVC induce anticuerpos capaces de neutralizar la infección del virus «in vitro». Además, dichos anticuerpos reconocen al virus una vez que éste ha entrado en contacto

con la célula, pero antes de su internalización (Jiménez-Clavero *et al.*, manuscrito en preparación). Por lo tanto, en el VEVC, y posiblemente en otros picornavirus, existen determinantes antigénicos de neutralización no sólo en la superficie de la cápsida «nativa» (la estructura representada en los modelos basados en datos de cristalografía), sino también en regiones internas que «emergen» a la superficie en determinados momentos del ciclo viral. Está por determinar la relevancia biológica de estos hallazgos en la infección natural por el VEVC.

RECEPTORES VIRALES

Los receptores virales son las moléculas de la superficie celular que utilizan los virus para anclarse a la superficie de la célula que van a infectar. Los receptores virales pueden determinar el tropismo de tejido, es decir, los factores por los cuales un virus infecta un tejido u otro (Evans y Almond, 1998). Actualmente se dispone de considerable información relativa a los receptores utilizados por los virus pertenecientes al género *Enterovirus*, identificados y caracterizados mediante diversas técnicas bioquímicas y de biología molecular. Por ejemplo, se ha visto que el tratamiento de un cultivo celular con tripsina inhibe la unión de los poliovirus, sin embargo, la unión de los virus coxsackie B se inhibe por tratamiento con la quimotripsina. Esto indica que la región funcional del receptor de poliovirus debe contener arginina o lisina, mientras que la del coxsackie B5 debe contener tirosina, fenilalanina, triptófano, leucina, metionina, asparagina o glutamina. Por otra parte, otros estudios bioquímicos han revelado que los receptores suelen ser glicoproteínas integradas en la membrana celular (Crowell *et al.*, 1983; Krahn y Crowell, 1985). Los anticuerpos monoclonales constituyen otra herramienta que ha sido extraordinariamente útil para la identificación y caracterización de muchos receptores virales.

En algunos casos se puede hacer una correlación entre los grupos taxonómicos virales y el receptor que utilizan. Por ejemplo, los tres serotipos de poliovirus (PV1-3) emplean el receptor de polio (PVR). Los aftovirus emplean el receptor de vitronectina (la integrina $\alpha_v\beta_3$) y los rinovirus utilizan tanto la molécula de adhesión intracelular de tipo 1 (ICAM-1) como el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR). Sin embargo, el resto de picornavirus cuyos receptores se han identificado, no parecen presentar correlación entre semejanza filogenética y el receptor empleado. El grupo de los enterovirus es el que presenta una mayor diversidad en cuanto a la elección del receptor, con representantes que utilizan, al menos, tres proteínas diferentes. Tanto los enterovirus como los coxsackievirus y echovirus parecen utilizar un amplio rango de receptores (Evans y Almond, 1998). El virus coxsackie A9 utiliza la secuencia de aminoácidos «motivo» RGD (arginina-glicina-ác. aspártico) en la VP1, como sitio de unión (ligando) a la integrina $\alpha_v\beta_3$, en la superficie celular. Sin embargo, la inactivación de dicho RGD con tripsina o la adición de péptidos homólogos, no bloquea la infección, lo que indica que este virus puede utilizar un receptor alternativo, que sería resistente a las proteasas presentes en el intestino humano (Roivainen *et al.*, 1994). El VFA es otro ejemplo de virus que puede utilizar más de un receptor. Algunos serotipos, como el A, C y O, utilizan la integrina $\alpha_v\beta_3$ como receptor, al que se unen mediante el sitio RGD de la proteína VP1. Sin embargo, se han identificado aislados del VFA que carecen del sitio RGD y son infectivos, indicando la utilización de otros receptores. Uno de estos receptores alternativos es el glicosaminoglicano de la su-

perficie celular heparán sulfato, utilizado principalmente por virus provenientes de cultivos celulares (Fry *et al.*, 1999; Baranowski *et al.*, 2000). Por otra parte, algunos mutantes del VFA que utilizan receptores independientes del sitio RGD, mantienen su capacidad para interactuar con los receptores de integrinas. Estas observaciones sugieren que el VFA puede utilizar múltiples receptores alternativos dependiendo de las diferentes condiciones de su entorno. En el caso del VEVC, no se han identificado los receptores que utiliza este virus. Sin embargo, estudios preliminares indican que se une con alta afinidad al heparán sulfato, y que no utilizan el receptor de otros virus coxsackie B (DAF) (E. Escribano-Romero. Manuscrito en preparación).

DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la EVC se debe llevar a cabo en laboratorios de alta seguridad biológica, debido a su similitud con otras enfermedades vesiculares como la FA y a que España se encuentra actualmente libre de la EVC. En la Unión Europea se examinan unos dos millones de muestras al año dentro de los programas de control de la enfermedad, por lo que se ha realizado un gran esfuerzo para la optimización de los métodos de diagnóstico. El diagnóstico de la EVC se realiza mediante ensayos serológicos para la detección de anticuerpos específicos contra el virus, y mediante técnicas basadas en la amplificación del ARN viral por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de hibridación *in situ*, o con AcM específicos, para detectar partículas virales.

Actualmente se utilizan dos tipos de ensayos serológicos para el diagnóstico de animales que han sido infectados por el VEVC: un ELISA de competición y el test de neutralización viral (VNT). El ELISA ha sido aceptado como método estándar para el diagnóstico en la UE. Consiste en un ensayo de competición basado en la capacidad del suero que se prueba para inhibir la unión de un AcM al virus (Chénard *et al.*, 1998; Brocchi *et al.*, 1995; Dekker *et al.*, 1995b). El VNT se basa en la capacidad del suero problema para neutralizar la infección de cultivos de células *in vitro* por el VEVC. Ambos ensayos detectan anticuerpos en los sueros problema con resultados relativamente buenos, aunque problemas inherentes como la necesidad de producción de virus, consumo de tiempo y la obtención de los reactivos, hacen que el desarrollo de un método alternativo siga siendo un objetivo de muchos laboratorios de investigación. Además, estos métodos presentan a menudo problemas de interpretación, siendo el más importante la aparición de «singleton reactors»: animales que dan positivo en estos ensayos serológicos aunque nunca han tenido contacto con el virus (De Clercq, 1998). Una posible solución a estos problemas sería el uso de antígenos virales recombinantes. Sin embargo, los resultados de los trabajos en los que se han utilizado (Jiménez-Clavero *et al.*, 1998), indican que estos polipéptidos no son adecuados para un correcto diagnóstico. La razón principal es que la mayoría de anticuerpos inducidos por la infección natural por el VEVC van dirigidos contra epítomos conformacionales. Sin embargo, las proteínas recombinantes presentan epítomos continuos (no conformacionales) de la cápsida, por lo que no son reconocidas eficazmente por anticuerpos inducidos en animales infectados.

Finalmente, se ha puesto a punto un ELISA para la detección diferencial de IgM o IgG específicos del VEVC. La determinación de los isotipos de los anticuerpos inducidos es de gran interés cuando se quiere conocer el tiempo que ha pasado desde la infección.

De esta forma, la presencia de IgM indica una infección reciente. Este tipo de anticuerpos aparece unos tres días después de la infección. Posteriormente aparecen los anticuerpos del isotipo IgG. Por tanto, el aumento de la relación de IgG frente a IgM indica un período más largo desde el inicio de la infección.

La detección precoz del virus se puede llevar también a cabo examinando muestras de determinados tejidos (amígdalas y pezuñas) y muestras de heces de animales, ya que el virus se secreta por vía fecal. De este modo, se puede detectar la infección a los pocos días de la introducción del virus, especialmente durante la fase de viremia. Es importante también la detección de virus en los animales portadores, en los que se han encontrado partículas virales en pezuñas y otros tejidos varios meses después de la infección. Para ello se pueden utilizar técnicas basadas en AcM para la detección directa del virus en muestras biológicas por inmunohistoquímica (Mulder *et al.*, 1997), inmunofluorescencia o por hibridación *in situ* (Mulder *et al.*, 1997), o técnicas basadas en el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Respecto a las técnicas basadas en el uso de la PCR, se han desarrollado varios protocolos para la detección de ARN viral en muestras de animales. Uno de los más útiles, validado y utilizado frecuentemente es la RT-PCR diferencial, que consiste en la detección diferencial de ARN de varios virus vesiculares (VEVC, virus de la estomatitis vesicular (VSV) y VFA), en un mismo ensayo, utilizando «cebadores» (primers) específicos para cada virus, correspondientes a regiones que no reaccionan de forma cruzada (Núñez *et al.*, 1998; Vangrysperre y De Clercq, 1996). También se han desarrollado otras variedades de PCR para aumentar la sensibilidad en algunas aplicaciones, como la «nested» PCR, con una combinación de dos parejas de «cebadores» (Lin *et al.*, 1997), inmuno-PCR, utilizando AcM para fijar el virus y eliminar contaminantes inhibidores, ELISA PCR, en la que se puede detectar la amplificación específica por métodos colorimétricos, y PCR «*in situ*», para detectar virus en tejidos.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a J. A. García-Ranea por su ayuda en la realización del modelo tridimensional de la cápsida viral. M.A.J.C. es contratado del INIA y E.E.R tiene una beca predoctoral INIA, ambos financiados por el proyecto UE-FAIR CT96-1545. El trabajo ha sido financiado por los proyectos CICYT-BIO 0400-C02 y UE-FAIR CT96-1545.

SUMMARY

Swine vesicular disease: molecular and immunological bases, and diagnostic of the disease

Swine vesicular disease is a highly contagious disease of pigs, caused by an *Enterovirus* of the *Picornaviridae* family. The virus is a relatively recent derivative of the human coxsackievirus B5, with which has high molecular and antigenic homology. The disease is not severe, usually presents a moderated general weakening and slight weight of loss that is recovered in few days, as well as vesicular lesions in mouth and nose mucoses and in the interdigital spaces of feet. However the similarity of these lesions with those caused by the foot and mouth disease virus, lead to the inclusion of this virus in the list A of the International Epizooties Organization. Nowadays, the disease is eradicated in the European Union except in Italy, where it is considered endemic in the South. However, since occasional outbreaks still appear and have to be rapidly eliminated, European countries

are in alert situation and farms are routinely controlled for the presence of the virus. This circumstance has lead to make a remarkable effort to study the pathology of the disease, the biology of the virus and to develop optimised methods for the diagnosis of the infection. In this review we have described the current information on the molecular and antigenic characterisation of the virion, as well as some aspects of the pathology of the disease and the recent approaches to improve the methods of diagnostic.

KEY WORDS: Vesicular disease
SVD
Virus
Enterovirus
Swine
Diagnostic
Pathology
Immune response

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARANOWSKI E., RUIZ-JARABO C.M., SEVILLA N., ANDREU D., BECK E., DOMINGO E., 2000. Cell recognition by foot-and-mouth disease virus that lacks the RGD integrin-binding motif: flexibility in aphthovirus receptor usage. *J Virol.*, 74, 1641-1647.
- BROCCHI E., BERLINZANI A., GAMBA D., DE SIMONE F., 1995. Development of two novel monoclonal antibody-based ELISAs for the detection of antibodies and the identification of swine isotypes against swine vesicular disease virus. *J. Virol. Meth.*, 52, 155-167.
- BROCCHI E., ZHANG G., KNOWLES N.J., WILSDEN G., MCCAULEY J.W., MARQUARDT O., OHLINGER V.F., DE SIMONE F., 1997. Molecular epidemiology of recent outbreaks of swine vesicular disease: two genetically and antigenically distinct variants in Europe, 1987-94. *Epidemiology And Infection*, 118, 51-61.
- BROWN F., TALBOT P., BURROWS R., 1973. Antigenic differences between isolates of swine vesicular disease virus and their relationship to Coxsackie B5 virus. *Nature*, 245, 315-316.
- BURROWS R., GREIG A., GOODRIDGE D., 1973. Swine vesicular disease. *Research In Veterinary Science*, 15, 141-144.
- CHÉNARD G., BLOEMRAAD M., KRAMPS J.A., TERPSTRA C., DEKKER A., 1998. Validation of a monoclonal antibody-based ELISA to detect antibodies directed against swine vesicular disease virus. *J. Virol. Meth.*, 75, 105-112.
- CHOW M., YABROV R., BITTLE J., HOGLE J., BALTIMORE D., 1985. Synthetic peptides from four separate regions of the poliovirus type 1 capsid protein VP1 induce neutralizing antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 82, 910-914.
- COMBS G.P., 1973 A study of swine vesicular disease in England. *Proceedings, Annual Meeting Of The United States Animal Health Association*, 332-335.
- CROWELL R.L., KRAH D.L., MAPOLES J., LANDAU B.J., 1983. Methods for assay of cellular receptors for picornaviruses. *Methods In Enzymology*, 96, 443-452.
- CROWELL R.L., PHILIPSON L., 1971. Specific alterations of coxsackievirus B3 eluted from HeLa cells. *J Virol.*, 8, 509-515.
- DAWE P.S., FORMAN A.J., SMALE C.J., 1973. A preliminary investigation of the swine vesicular disease epidemic in Britain. *Nature*, 241, 540-542.
- DE CLERCQ K., 1998. Reduction of singleton reactors against swine vesicular disease virus by a combination of virus neutralisation test, monoclonal antibody-based competitive ELISA and isotype specific ELISA. *J. Virol. Meth.*, 70, 7-18.
- DEKKER A., MOONEN P., DE BOER-LUIJTZE E.A., TERPSTRA C., 1995a. Pathogenesis of swine vesicular disease after exposure of pigs to an infected environment. *Veterinary Microbiology*, 45, 243-250.
- DEKKER A., MOONEN P.L., TERPSTRA C., 1995b. Validation of a screening liquid phase blocking ELISA for swine vesicular disease. *J. Virol. Meth.* 51, 343-348.
- ESPUÑA E., ALEMANY R., RIERA P., ARTIGAS C., ROSELL R., PUJOLS J., SANMARTÍN J., SAN GABRIEL A., 1993 Aislamiento del virus de la enfermedad vesicular porcina en España. *Med. Vet.*, 10, 657-662.

- EVANS D.J., ALMOND J.W., 1998. Cell receptors for picornaviruses as determinants of cell tropism and pathogenesis. *Trends In Microbiology*, 6, 198-202.
- FRICKS C.E., HOGLE J.M., 1990. Cell-induced conformational change in poliovirus: externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding. *J. Virol.*, 64, 1934-1945.
- FRY E.E., LEA S.M., JACKSON T., NEWMAN J.W., ELLARD F.M., BLAKEMORE W.E., ABU-GHAZALEH R., SAMUEL A., KING A.M., STUART D.I., 1999. The structure and function of a foot-and-mouth disease virus-oligosaccharide receptor complex. *Embo Journal*, 18, 543-554.
- GRAVES J.H., 1973. Serological relationship of swine vesicular disease virus and Coxsackie B5 virus. *Nature*, 245, 314-315.
- HOGLE J.M., CHOW M., FILMAN D.J., 1985. Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science*, 229, 1358-1365.
- HOUSE J.A., HOUSE C.A., 1992. *Vesicular Diseases*. Ames. Iowa State University Press. Iowa. pp. 387-398.
- INOUE T., SUZUKI T., SEKIGUCHI K., 1989. The complete nucleotide sequence of swine vesicular disease virus. *J. Gen. Virol.*, 70, 919-934.
- INOUE T., YAMAGUCHI S., KANNO T., SUGITA S., SAEKI T., 1993. The complete nucleotide sequence of a pathogenic swine vesicular disease virus isolated in Japan (J1'73) and phylogenetic analysis. *Nucleic Acids Research*, 21, 3896.
- JIMÉNEZ-CLAVERO M.A., DOUGLAS A., LAVERY T., GARCÍA-RANEA J.A., LEY V., 2000. Immune recognition of swine vesicular disease virus structural proteins: novel antigenic regions that are not exposed in the capsid. *Virology*, 270, 76-83.
- JIMÉNEZ-CLAVERO M.A., ESCRIBANO-ROMERO E., SÁNCHEZ-VIZCAÍNO J.M., LEY V., 1998. Molecular cloning, expression and immunological analysis of the capsid precursor polypeptide (P1) from swine vesicular disease virus. *Virus Research*, 57, 163-170.
- KAMAN S., 1993. Swine vesicular disease (SVD) in Spain. *USDA Foreign Animal Disease Report* 21, pp. 12.
- KANNO T., INOUE T., WANG Y., SARAI A., YAMAGUCHI S., 1995. Identification of the location of antigenic sites of swine vesicular disease virus with neutralization-resistant mutants. *J. Gen. Virol.*, 76, 3099-3106.
- KANNO T., MACKAY D., INOUE T., WILSDEN G., YAMAKAWA M., YAMAZOE R., YAMAGUCHI S., SHIRAI J., KITCHING P., MURAKAMI Y., 1999. Mapping the genetic determinants of pathogenicity and plaque phenotype in swine vesicular disease virus. *J. Virol.*, 73, 2710-2716.
- KNOWLES N.J., MCCAULEY J.W., 1997. Coxsackievirus B5 and the relationship to swine vesicular disease virus. *Current Topics In Microbiology and Immunology*, 223, 153-167.
- KODAMA M., OGAWA T., SAITO T., TOKUDA G., SASAHARA J., 1980a. Swine vesicular disease viruses isolated from healthy pigs in non-epizootic period. I. Isolation and identification. *National Institute Of Animal Health Quarterly*, 20, 1-10.
- KODAMA M., SAITO T., OGAWA T., TOKUDA G., SASAHARA J., KUMAGAI T., 1980b. Swine vesicular disease viruses isolated from healthy pigs in non-epizootic period. II. Vesicular formation and virus multiplication in experimentally inoculated pigs. *National Institute Of Animal Health Quarterly*, 20, 123-130.
- KRAH D.L., CROWELL R.L., 1985. Properties of the deoxycholate-solubilized HeLa cell plasma membrane receptor for binding group B coxsackieviruses. *J. Virol.*, 53, 867-870.
- LAI S.S., MCKERCHER P.D., MOORE D.M., GILLESPIE J.H., 1979. Pathogenesis of swine vesicular disease in pigs. *American Journal Of Veterinary Research*, 40, 463-468.
- LI Q., YAFAL A.G., LEE Y.M., HOGLE J., CHOW M., 1994. Poliovirus neutralization by antibodies to internal epitopes of VP4 and VP1 results from reversible exposure of these sequences at physiological temperature. *J. Virol.*, 68, 3965-3970.
- LIN F., MACKAY D.K., KNOWLES N.J., 1997. Detection of swine vesicular disease virus RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Virol. Meth.*, 65, 111-121.
- LIN F., MACKAY D.K., KNOWLES N.J., 1998. The persistence of swine vesicular disease virus infection in pigs. *Epidemiology And Infection*, 121, 459-472.
- LONBERG-HOLM K., KORANT B.D., 1972. Early interaction of rhinovirus with host cells. *J. Virol.*, 9, 29-40.
- MCKERCHER P.D., BLACKWELL J.H., MURPHY R., 1985. Survival of SVDV in «Prosciutto di Parma» (Parma Ham). *Can. Instit. Food Sc. Tech. J.*, 18, 163-167.
- MCKERCHER P.D., GRAVES J.H., CALLIS J.J., CARMICHAEL F., 1974. Swine vesicular disease: virus survival in pork products. *Proceedings, Annual Meeting Of The United States Animal Health Association*, 213a-213g.
- MINOR P.D., FERGUSON M., EVANS D.M., ALMOND J.W., ICENOGLE J.P., 1986. Antigenic structure of polioviruses of serotypes 1, 2 and 3. *J. Gen. Virol.*, 67, 1283-1291.
- MUCKELBAUER J.K., KREMER M., MINOR I., DIANA G., DUTKO F.J., GROARKE J., PEVEAR D.C., ROSSMANN M.G., 1995. The structure of coxsackievirus B3 at 3.5 Å resolution. *Structure*, 3, 653-667.

- MULDER W.A., VAN POELWIJK F., MOORMANN R.J., REUS B., KOK G.L., POL J.M., DEKKER A., 1997. Detection of early infection of swine vesicular disease virus in porcine cells and skin sections. A comparison of immunohistochemistry and in-situ hybridization. *J. Virol. Meth.*, 68, 169-175.
- NARDELLI L., LODETTI E., GUALANDI G.L., BURROWS R., GOODRIDGE D., BROWN F., CARTWRIGHT B., 1968. A foot and mouth disease syndrome in pigs caused by an enterovirus. *Nature*, 219, 1275-1276.
- NIJHAR S.K., MACKAY D.K., BROCCCHI E., FERRIS N.P., KITCHING R.P., KNOWLES N.J., 1999a. Identification of neutralizing epitopes on a European strain of swine vesicular disease virus. *J. Gen. Virol.*, 80, 277-282.
- NIJHAR S.K., MACKAY D.K.J., BROCCCHI E., FERRIS N.P., KITCHING R.P., KNOWLES N.J., 1999b. Identification of neutralizing epitopes on a European strain of swine vesicular disease virus. *J. Gen. Virol.*, 80, 277-282.
- NUÑEZ J.I., BLANCO E., HERNÁNDEZ T., GÓMEZ-TEJEDOR C., MARTÍN M.J., DOPAZO J., SOBRINO F., 1998. A RT-PCR assay for the differential diagnosis of vesicular viral diseases of swine. *J. Virol. Meth.*, 72, 227-235.
- PEITSCH M.C., 1996. ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling. *Biochemical Society Transactions*, 24, 274-279.
- PULLI T., ROIVAINEN M., HOVI T., YHYPIA T., 1998. Induction of neutralizing antibodies by synthetic peptides representing the C terminus of coxsackievirus A9 capsid protein VP1. *J. Gen. Virol.*, 79, 2249-2253.
- ROIVAINEN M., NARVANEN A., KORKOLAINEN M., HUHTALA M.L., HOVI T., 1991. Antigenic regions of poliovirus type 3/Sabin capsid proteins recognized by human sera in the peptide scanning technique. *Virology*, 180, 99-107.
- ROIVAINEN M., PIIRAINEN L., HOVI T., VIRTANEN I., RIIKONEN T., HEINO J., HYYPÄÄ T., 1994. Entry of coxsackievirus A9 into host cells: specific interactions with alpha v beta 3 integrin, the vitronectin receptor. *Virology*, 203, 357-365.
- ROIVAINEN M., PIIRAINEN L., RYSA T., NARVANEN A., HOVI T., 1993. An immunodominant N-terminal region of VP1 protein of poliovirus that is buried in crystal structure can be exposed in solution. *Virology*, 195, 762-765.
- ROSSMANN M.G., ARNOLD E., ERICKSON J.W., FRANKENBERGER E.A., GRIFFITH J.P., HECHT H.J., JOHNSON J.E., KAMER G., LUO M., MOSSER A.G., 1985. Structure of a human common cold virus and functional relationship to other picornaviruses. *Nature*, 317, 145-153.
- SEECHURN P., KNOWLES N.J., MCCAULEY J.W., 1990. The complete nucleotide sequence of a pathogenic swine vesicular disease virus. *Virus Research*, 16, 255-274.
- SEIBOLD H.R., SHARP J.B., 1960. A revised concept of the pathological changes of the tongue in cattle with vesicular stomatitis. *Am J Vet Res.*, 21, 35-51.
- SELLERS R.F., HERNIMAN K.A., 1974. The airborne excretion by pigs of swine vesicular disease virus. *Journal Of Hygiene*, 72, 61-65.
- TSUDA T., TOKUI T., ONODERA T., 1987. Induction of neutralizing antibodies by structural proteins VP1 and VP2 of swine vesicular disease virus. *Nippon Juigaku Zasshi. Japanese Journal Of Veterinary Science*, 49, 129-132.
- VANGRYSPERRE W., DE CLERCQ K., 1996. Rapid and sensitive polymerase chain reaction based detection and typing of foot-and-mouth disease virus in clinical samples and cell culture isolates, combined with a simultaneous differentiation with other genomically and/or symptomatically related viruses. *Arch. Virol.*, 141, 331-344.
- ZHANG G., HAYDON D.T., KNOWLES N.J., MCCAULEY J.W., 1999. Molecular evolution of swine vesicular disease virus. *J. Gen. Virol.*, 80, 639-651.
- ZHANG G., WILSDEN G., KNOWLES N.J., MCCAULEY J.W., 1993. Complete nucleotide sequence of a coxsackie B5 virus and its relationship to swine vesicular disease virus. *J. Gen. Virol.*, 74, 845-853.
- ZHAO R., PEVEAR D., KREMER M., GIRANDA V., KOFRON J., KUHN R., YROSSMANN M.G., 1996. Human rhinovirus 3 at 3.0 Å resolution. *Structure*, 4, 1205-1220.

