

AISLAMIENTOS DE HERPES BOVINO DE CASOS CLÍNICOS DEL HOSPITAL DE SALUD ANIMAL DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

**GOLLAN, A.¹; SILVANO, D.¹; OCCHI, H.¹; FONDEVILLA, N.²;
JUAREZ, S.¹; PASSEGGI, C.¹; RODRIGUEZ ARMESTO, R.¹ & PICCONE, M. E.²**

RESUMEN

Durante el período comprendido entre el 6-12-02 y el 25-03-04 ingresaron al Hospital de Salud Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral, 63 casos clínicos de bovinos con sintomatología compatible con enfermedades herpéticas. Muestras de órganos de esos casos se procesaron en el laboratorio de Virología del Dpto. de Patología obteniéndose 20 aislamientos virales que fueron identificados como BoHV-1 y BoHV- 5. A partir de órganos de animales de entre 6 y 12 meses de vida con sintomatología nerviosa, se identificaron dos cepas como BoHV-1 y tres como BoHV-5; perteneciendo las restantes 15 cepas recuperadas desde órganos fetales y de bovinos al BoHV-1. Se concluye en la necesidad de contar con sistemas de diagnóstico en fluido funcionamiento para mejorar los conocimientos epidemiológicos de las patologías herpéticas regionales.

Palabras clave: herpes bovino, aislamiento, tipo 1 y 5, abortos.

SUMMARY

Bovine herpes isolations from clinical cases of the Health Animal Hospital of the Faculty of Veterinary Sciences UNL

During the period from the 12-06-02 to 03-25-04 there were admitted to the Animal Health Hospital of the Faculty of Veterinary Sciences - Litoral National University - 63 bovine clinical cases with compatible symptoms of diseases caused by herpesvirus. Organs samples of those cases were processed at the Virology Laboratory of the Pathology Department. From them 20 isolations were obtained and were identified as BoHV-1 and 5. From samples of animals among 6 and 12 months with nervous symptomatology, were identified two as BoHV-1 and three as BoHV-5, while from 15 strains recovered from foetal and bovine organs the BoHV- 1 type was identified. We concluded in the need to set a fluid diagnosis system to improve the epidemiological knowledge of the regional herpetic pathologies.

Key words: bovine herpes, isolation, type 1 and 5, abortus.

1.- Cátedra de Virología e Inmunología. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral. Kreder 2805. Esperanza, provincia de Santa Fe. Subsidio Proyecto 175 Programa 25 CAI+D 2002. UNL.

2.- Instituto de Virología, Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).

Manuscrito recibido el 31 de agosto de 2009 y aceptado para su publicación el 24 de octubre de 2009.

INTRODUCCIÓN

Los Herpesvirus que afectan bovinos, pertenecen a la familia Herpesviridae, subfamilia Alphaherpesvirinae. Son virus ADN lineal, de doble cadena, envueltos, con cápside icosaédrica de 162 capsómeros (Beer, 1987; Mohanty & Dutta, 1983; Büchen-Osmond, 1998). El virión contiene 18 proteínas estructurales con pesos moleculares que fluctúan entre 250.000 y 290.000 (Mohanty & Dutta, 1983). Pierde infectividad en 15 minutos a 37°C, es sensible a solventes lipídicos como el éter etílico, acetona, hidróxido de sodio al 0.5%, amonios cuaternarios al 1%, soluciones iodadas al 10% e hipoclorito de sodio al 0.5%.(Beer, 1987; Mohanty & Dutta, 1983).

El Herpes virus bovino tipo 1 (BoHV-1) ha sido aislado de cuadros de rinotraqueítis, vulvovaginitis pustular, balanopostitis, conjuntivitis y meningoencefalitis (Muylkens, B. *et al* 2007); el Herpes virus bovino tipo 2 (BoHV-2) se ha aislado a partir de infecciones de piel y mucosas; el tipo 4 (BoHV-4) tiene una patogenicidad controvertida y el Herpes virus bovino tipo 5 (BoHV-5) está asociado a cuadros de meningoencefalitis no supurativa en terneros (Roizman 1992).

La distribución del BoHV-1 es mundial. La prevalencia de anticuerpos varía en cada país: Brasil 34%, EEUU 32% Francia 12%, y en Argentina fluctúa de acuerdo a las regiones e independientemente del tipo de explotación: área pampeana 66%, mesopotámica 46%, Santa Fe 37% (Gibbs & Rwyemamu, 1977; Gonzalez Pondal 1988; Odeón *et al.* 2001).

Distintos estudios han confirmado al ganglio de Gasser y al nervio trigémino como los lugares en donde permanece latente pudiendo reactivarse después de un largo tiempo y producir enfermedad. La eliminación viral

se produce en forma intermitente hasta los 17 meses post-infección (Blood *et al.*, 1988; Omán & Easterday, 1986). Para el BoHV-1 la morbilidad se encuentra entre el 15 y 100% y la mortalidad es muy baja o no supera el 5%(Schudel *et al.* 1986).

La inducción de abortos y la mortalidad embrionaria son las secuelas más importantes de la infección, ocurriendo el aborto luego de un período de incubación de 3 a 6 semanas post contagio y entre el 4to y 8vo mes de gestación, sin producción de metritis. (Mohanty & Dutta 1983; Betz 1988)

La enfermedad causada por el BoHV-5 usualmente afecta a terneros menores de 8 meses con baja morbilidad y alta mortalidad (Bulach & Studdert 1990). Se han descrito epizootias de meningoencefalitis causadas por este agente en Australia, EE.UU, Canadá y otros países (d'Offay *et al.*, 1993). En nuestro país se notificaron los primeros casos clínicos en 1980 (Carrillo *et al.*, 1983; Schudel *et al.*, 1986, 1987). El virus replica en mucosa nasal y ocular; a los tres días posteriores a la infección llega al cerebro a través del nervio trigémino (Omán *et al.*, 1986) y provoca necrosis cerebrocortical, observándose el reblandecimiento de la corteza de los lóbulos frontales del cerebro (Belknap, E.B. *et al.*, 1994). Microscópicamente se observa meningitis no supurativa, con presencia de manguitos perivasculares mononucleares. Los terneros afectados desarrollan los signos de encefalitis dentro de uno o dos días de comenzados los signos clínicos y mueren en cinco días. Los casos fatales producto de esta forma nerviosa alcanzan el 100%. (Enquist, L.W *et al.* 1998).

El diagnóstico de laboratorio se realiza por aislamiento viral, las técnicas serológicas que permiten la detección de anticuerpos neutralizantes contra las glicoproteínas de la partícula viral y técnicas para detección de antígenos virales y reacción en cadena de la

polimerasa. (Stanchi *et al.* Galosi, M. 2006; Kramps, J. *et al.* 2004).

A nivel genómico BoHV-1 y BoHV-5 presentan 85% de homología. Analizados con enzimas de restricción, o bien por hibridización de su ADN con sondas tipo específico, se los ha podido diferenciar en BoHV-1 y BoHV- 5 (Engels *et al.*, 1986).

A partir del conocimiento del genoma viral (ADN de doble cadena lineal con 135.000 - 140.000 pares de bases) y de la introducción de métodos de biología molecular ha sido posible diferenciar este agente de otros herpesvirus e identificarlo en forma rápida y eficiente (Ros *et al.*, 1999; Alegre *et al.*, 2001).

Asimismo existen estudios de mapeo del genoma viral realizados mediante enzimas de restricción sobre distintos sectores del ADN de BoHV-1 y BoHV-5 (gC, timidina kinasa, gen IE1) tendientes a caracterizar y diferenciar ambos virus, estudiar la expresión génica en estado de latencia y el tropismo particular de cada uno de ellos (Bagust TJ, Clark L . 1972; Metzler *et al.*, 1986; Chowdhury, 1995 ; Bratanich *et al.*, 1996).

El objetivo del presente trabajo fue contribuir al conocimiento clínico epidemiológico de las patologías producidas por BoHV, confirmando con técnicas laboratorio la presencia de los mismos a partir de animales ingresados al Hospital de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNL, para lograr su posterior distinción en BoHV- 1 y 5.

MATERIALES Y METODOS

1) Aislamiento viral. Se intentaron los aislamientos en 63 casos clínicos provenientes del Hospital de Salud Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias a partir

de muestras (órganos fetales y cerebros) utilizando la línea celular establecida Madin Derby Bovine Kidney (MDBK) proveniente de la Asociación Banco Argentino de Células (ABAC).

Trozos de estos órganos de aproximadamente 2 centímetros cúbicos se procesaron en mortero con arena estéril con el agregado de Minimun Essential Medium (MEM) con un 1% de antibiótico-antimicótico (Sigma-Aldrich). Luego de una centrifugación por 30 minutos a 3000 rpm, los sobrenadantes se filtraron por membrana de 0,2 micras de poro (Millipore).

Con 0,5 ml de los filtrados se inocularon monocapas celulares de 20 cm² y tras un período de adsorción de 30 minutos a 37 °C se agregaron 5 ml de medio de mantenimiento (MEM + 2% de suero fetal bovino P.A.A y 1% de antibiótico-antimicótico Gibco). Las monocapas inoculadas se observaron diariamente, hasta la aparición del efecto citopatogénico característico.

2) Caracterización de los aislamientos mediante Inmunofluorescencia Directa (IFD) y Seroneutralización (SNT). La IFD, se llevó a cabo según técnicas descriptas (Manual de técnicas para diagnóstico virológico. FAO-INTA) confeccionando improntas de los órganos e improntas de células de cultivos infectados con los materiales problema que presentaron efecto citopatogénico característico. Se fijaron con acetona fría durante 10 minutos para ser teñidas luego con un antisuero policlonal marcado con isotiocianato de fluoresceína de origen comercial (VMRD No catálogo 210-69- IBR). Como controles negativos se utilizaron improntas de células de la misma línea y pasaje sin infectar y como control positivo células infectadas con la cepa Los Ángeles (LA) de BoHV- 1.

La SNT viral, tendiente a valorar la pérdida de la capacidad infectante del virus por la

acción de su anticuerpo específico, se llevó a cabo por el método suero variable-virus fijo utilizando un antisuero de referencia frente a la cepa L.A, previamente elaborado por nuestro equipo de trabajo y con la finalidad de aumentar el grado de certeza de la identificación viral del BoHV.

3) Diferenciación de los aislamientos en tipos 1 y 5. En cinco de los aislamientos provenientes de cerebros, la extracción de ADN a partir de tejido cerebral se llevó a cabo utilizando kits comerciales (Promega) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello realizó un homogeneizado de 10-20 mgr de cerebro en 600 ul de solución de lisis nuclear provista en el mismo kit. Partiendo de las muestras de ADN purificados se realizó una Multiplex -Reacción en Cadena de la Polimerasa (M-PCR) descrita anteriormente (Alegre *et al.*, 2001) utilizando un par de primers que amplifican un sector de 183 bp de la región de la timidina kinasa del BoHV -1, y otro par de primers que amplifican un sector de 564 bp de la región de la glicoproteína D del BoHV-5. Como controles positivos se usaron la cepa LA (BoHV -1) y la cepa denominada FCV (BoHV-5), previamente identificada como tal en el Instituto de Virología, Centro de

Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA, Comunicación personal). Como control negativo se utilizaron células sin infectar.

Los productos finales de la M-PCR se analizaron mediante corrida electroforética en gel horizontal de agarosa al 0,8% en buffer TBE con 0,01 % de bromuro de etidio, visualizándose las bandas mediante un transiluminador UV y comparando la posición de las mismas con un patrón de pesos moleculares de un rango de 100 a 1000 bp (Cien Marker- Biodynamics).

RESULTADOS

Se obtuvieron veinte (20) aislamientos de Herpes bovino, identificados por IFD y en SNT. Quince (15) aislamientos provinieron de órganos fetales de animales de raza Holando Argentino de 3 a 8 meses de gestación. En estos fetos hubo una alta frecuencia de aparición de nódulos linfoides agrandados de manera universal (foto 1) y focos de neumonía (foto 2).

Los restantes cinco (5) aislamientos correspondieron a animales de entre 6 y 12

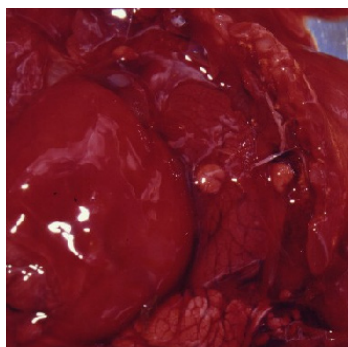


Foto 1: Nódulos linfoides

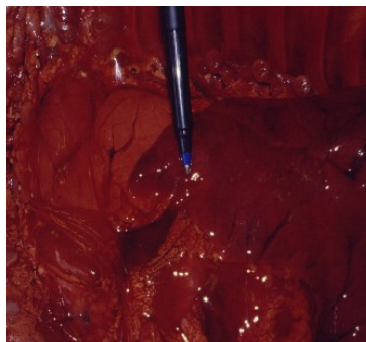


Foto 2: Focos de neumonía

En estos cinco aislamientos se realizó la técnica de M-PCR identificándose a tres (3) de ellos como BoHV-5 (identificados como N° 475/485, N° 542/43 y N° 575) y dos (2) como BoHV-1, identificados como N° 426 y N° 490) (Foto 4).

El aislamiento identificado N° 475/485 provino de un animal cruce Bos indicus de

6 meses de edad con signología nerviosa proveniente de un rodeo de 120 animales en el que se habían producido 4 muertes con similar presentación clínica.

El aislamiento denominado N° 542/43 correspondió a un grupo de 56 animales Holando Argentino de seis meses de edad en el que se produjeron 6 muertes con signolo-

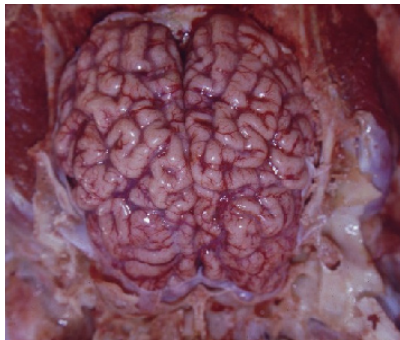
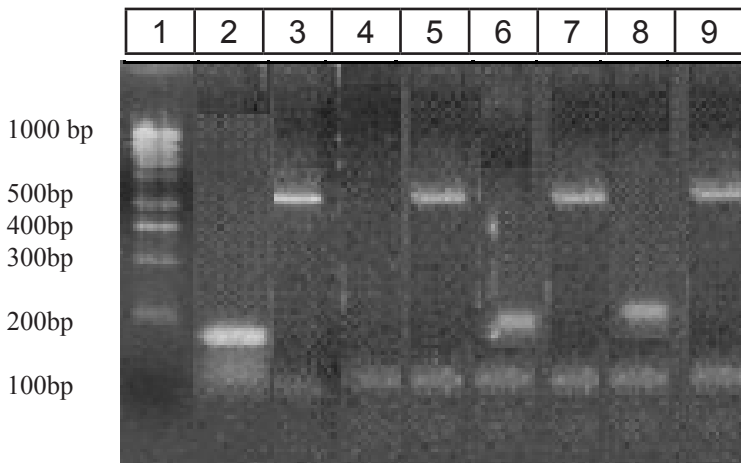


Foto 3: Hiperemia cerebral



Calle 1: Control de P.M ; Calle 2: Control HBV -1 (L.A);
 Calle 3: Control HBV-5 (FCV) ;Calle 4: Control (-) ; Calle 5: 475/85
 Calle 6: 436; Calle 7: 542/43; Calle 8: 490; Calle 9: 575

Foto 4: Diferenciación entre HVB-1 y HVB-5 mediante M-PCR

gía nerviosa. El N° 575 correspondió a una ternera de 1 año perteneciente a un rodeo de 30 animales de la misma raza sin signología clínica nerviosa. Los aislamientos identificados como N° 426 y N° 460 correspondieron a BoHV-1.

Los estudios histopatológicos confirman la presencia de Herpesvirus tipo 5 traducido en meningoencefalitis mononuclear con inicial formación de manguitos perivasculares, proliferación del endotelio de los capilares cerebrales y marcadas lesiones neuronales con núcleos de gliosis en los materiales de cerebro 475/85; 542/43 y 575.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La metodología utilizada para el aislamiento y caracterización de herpesvirus bovino en el ámbito de la FCV-UNL ha resultado adecuada para la recuperación de cepas salvajes y posterior diferenciación entre BoHV-1 y BoHV-5, especialmente en los casos de cerebros con sintomatología nerviosa. Tal diferenciación presenta dificultades cuando el diagnóstico está basado solo en los síntomas clínicos.

Nuestros estudios arrojan como tipo 1 dos casos aislados de cerebro y aún cuando estudios genéticos y bioquímicos han caracterizado y reclasificado al BoHV- 5 como diferente del tipo 1, esta clasificación de las cepas no refleja un determinado organotropismo o grado de virulencia. El cerebro de bovinos posee también receptores para las variantes del BoHV-1 y no solo para cepas nerviosas. Esto explicaría que 2 de nuestros aislamientos de cerebro pertenezcan al tipo 1. Diferencias a nivel genético entre el 1 y 5 podrían explicar el tropismo diferencial entre cepas. No obstante de acuerdo a repor-

tes recientes (Muylkens *et al*, 2007) cepas de BoHV 1 se aislan esporádicamente de ganado con desórdenes en el SNC, habiéndose demostrado que el mismo es responsable de meningoencefalitis agudas que ocurren probablemente, cuando se reflejan susceptibilidades individuales del hospedador en su SNC, más que debido a modificaciones de las Cepas de BoHV1 que puedan incrementar su poder de neuroinvasión o virulencia.

Los restantes 15 aislamientos obtenidos a partir de órganos fetales se diagnosticaron como BoHV-1 basándonos en nuestros estudios que incluyeron: aislamientos virales e identificación por IFD y SNT, evaluación de la sintomatología clínica compatible, ausencia de signología nerviosa y estudios histopatológicos compatibles.

Por otro lado, estos resultados confirman la circulación conjunta de BoHV-1 y BoHV-5 en la zona centro- norte de la provincia. Este hallazgo, unido a la conocida estrategia de perpetuación de los Herpesvirus, capaz de producir fenómenos de latencia y recurrencia, inducen a considerar el riesgo y el impacto epidemiológico que podrían producir en la esfera reproductiva y económica la presencia de los Herpesvirus bovinos.

Dado que en la búsqueda del BoHV- 5 en cerebros provenientes de animales con síntomas nerviosos, la tipificación de 2 de los casos en los que estuvo presente dicha signología fueron de BoHV -1, se aspira a que estas diferenciaciones entre tipos de una misma Familia viral se implementen y realicen en forma permanente como complemento del diagnóstico clínico que se lleva a cabo en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNL. Ello se verá finalmente traducido en un mayor conocimiento epidemiológico de las patologías producidas por los Herpesvirus bovinos ampliamente distribuidos en la región.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Virología, Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) por la identificación de la cepa local FCV de HBV-5.

Al Laboratorio Central de la provincia de Santa Fe que facilitó la infraestructura y equipamiento para la realización de la M-PCR.

BIBLIOGRAFIA

- ALEGRE, M.; NANNI, M. & FONDEVILLA, N.** 2001. Development of a Multiplex Polymerase Chain Reaction for the differentiation of Bovine Herpesvirus -1 and -5. *J. Vet. Med. B.*, 48 (8) 613-21.
- BAGUST, T. J. & CLARK, L.** 1972. Pathogenesis of meningoencephalitis produced in calves by infectious bovine rhinotracheitis herpesvirus. *J. Comp. Pathol.* 82, 375-383.
- BEER, J.** 1987. Enfermedades Infecciosas de los animales domésticos. Rinotraqueítis infecciosa bovina/ Vulvovaginitis pustular infecciosa. Tomo 1 Pág 285-292. Ed. Acribia Zaragoza - España.
- BELKNAP, E. B.; COLLINS, J. K.; AYERS, V. K. & SCHULTHEISS, P. C.** 1994. Experimental infection of neonatal calves with neurovirulent bovine herpesvirus type-5 (BHV-5). *Vet. Pathol.* 31, 358-365.
- BETZ, R.** 1988. Tesis de doctorado. Experimentación de una prueba intracutánea para el diagnóstico de infecciones con BHV1 bajo condiciones de ejercicio profesional. Adaptado por Ostrowski. *Therios* 14 (68) 190- 196.
- BLOOD, D. C.; HENDERSON, J. A. & RO-DOSTITIS, O.M.** 1988. Medicina Veterinaria 6ta Edición. Nueva Editorial Interamericana. México. Pág.873-878.
- BRATANICH, A. C.; WEBER, E. L.; GIGLIO, C. & LAGER, I. A.** 1996 Caracterización de genes de HVB que regulan su patogenicidad. *Rev. Med. Vet;* 77, 4:277.
- BÜCHEN-OSMOND, C.** Alphabetical List of ICTV approved Virus Families and Genera. April, 1995. Ultima actualización: 8 de abril de 1998. 1295-1302.
- BULACH, D. M. & STUDDERT, M. J.** 1990. Comparative genome mapping of bovine encephalitis herpesvirus, bovine herpesvirus 1, and buffalo herpesvirus. *Arch. Virol.* 113, 17-34.
- CARRILLO, B. J.; POSPISCHIL, A.; DAHME, E.** 1983. Pathology of a bovine viral necrotizing encephalitis in Argentina. *Zbl. Vet. Med. B.* 30, 161-168.
- CHOWDHURY, S.** 1995. Molecular basis of antigenic variation between the glycoprotein C of Respiratory Bovine Herpesvirus 1 (BHV-1) and neurovirulent BHV-5. *Virology* 213: 558-568.
- D'OFFAY, J. M.; MOCK R. E. & FULTON R. W.** 1993. Isolation and characterization of encephalitic bovine herpesvirus type 1 isolates from cattle in North America. *Am J. Vet Res;* 54, 4: 534-539.
- ENGELS, M.; GIULANI, C.; WILD, P.; BECK, T. M.; LOEPFE, E. & WYLER, R.** 1986. The genome of bovine herpesvirus 1 (BHV1) strains exhibiting a neuropathogenic potential compared to known BHV1 strains by restriction site mapping and cross-hybridization. *Virus Res.* 6, 57-73.
- ENQUIST, L. W.; HUSAK, P. J.; BANFIELD, B. W. & SMITH, G. A.** 1998. Infection and spread of alpha herpesviruses in the nervous system. *Adv. Virus Res.* 51:237-347.
- GIBBS, E. P. J. & RWYEMAMU, M. M.** 1977. Bovine Herpes virus 2 y 3. *Vet. Bull.* 47 (6): 411-425.
- GONZALEZ PONDAL, D.** 1988. RIB (IBR) Su distribución y control en la Argentina. *Rev.*

- Nelore 8 (3): 720-722.
- KRAMPS, J. A.; BANKS, M.; BEER, M.; KERKHOF, P.; PERRI, M.; WELLENBERG, G. J. & van OIRSCHOT, J. T.** 2004. Evaluation of tests for antibodies against bovine herpesvirus 1 performed in national laboratories in Europe. *Vet. Microbiol.* 102:169-181.
- MANUAL DE TÉCNICAS PARA DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO.** 1987. FAO-INTA-Centro de investigaciones en ciencias veterinarias.- Argentina.
- METZLER, A. E.; SCHUDEL, A. A. & ENGELS, M.** 1986. Bovine Herpesvirus 1: Molecular and Antigenic Characteristics of Variants Viruses Isolated from Calves with Neurological Disease. *Arch. Virol.* 87: 205-217.
- MOHANTY, S. B. & DUTTA, S. K.** 1983. *Virología Veterinaria.* Nueva Editorial Interamericana. México, 412 pp.
- MUYLKENS, B.; THIRY, J.; KIRTEN, P.; SCHYNTS, F. & THIRY, E.** 2007. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Vet. Res.* 38:181-209.
- ODEÓN, A.; SPATH, E.; PALOMA, E.; LEUDA, M.; FERNANDEZ SAINZ, I.; PEREZ, S.; KAISER, G.; DRAGHI, M.; CETRA, B. & CANO, A.** 2001. Seroprevalencia de Diarrea Viral Bovina, Herpesvirus bovino y Virus respiratorio sincicial en Argentina. *Rev. Ved. Veterinaria* Vol.82 - N°4: 216-220.
- OMÁN, E. J. & STERDAY, B.** 1986. Isolation of bovine herpesvirus-1 From trigeminal ganglia of clinically normal cattle. *Am. J. Vet. Res.* 41 (8): 1212-1213.
- ROIZMAN, B.** 1992. The family Herpesviridae an update. *Arch. Virol.* 123, 432-445.
- ROS, C.; RIQUELME, M.; ÖHMAN FORSLUND, K. & BELÁK, S.** 1999. Improved detection of five closely related ruminant alphaherpesviruses by specific amplification of viral genomic sequences. *J. Virol. Met.* 83: 55-65.
- SCHUDEL, A. A.; RODRÍGUEZ, M. & CARRILLO, B. J.** 1987. Biotecnología en el diagnóstico, caracterización y prevención de la encefalitis bovina a BHV-1. CICV - INTA Castelar.
- SCHUDEL, A. A.; CARRILLO, B. J.; WYLER, R. & METZLER, A. E.** 1986. Infection of calves with antigenic variants of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurological disease. *Zbl. Vet. Med. B.* 33, 303-310.
- STANCHI, N. O. & GALOSI, M.** 2006. *Microbiología Veterinaria.* Capítulo 58-Edit. Intermédica.