

DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN POR MÉTODOS MOLECULARES DE AISLAMIENTOS COLOMBIANOS DE *HERPESVIRUS BOVINO* TIPO 1

Piedrahita D¹, Ramírez G² y Vera V³

Grupo de Microbiología y Epidemiología
Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia
Universidad Nacional de Colombia

RESUMEN

La Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (RIB) es una enfermedad, altamente contagiosa, de distribución mundial, de origen viral, causada por el *Herpesvirus Bovino-1* (BoHV-1). Produce alteraciones en el sistema respiratorio y reproductivo, lo que la convierte en una enfermedad con un gran impacto económico para los sistemas de producción ganadera. Este trabajo tuvo como objetivo caracterizar, mediante técnicas de biología molecular, tres aislamientos colombianos del BoHV-1 (dos de la sabana de Bogotá y uno de los Llanos Orientales). Los aislamientos fueron analizados con las enzimas de restricción Bam HI, Bst EII, Eco RI Pst I y Hind III. En este estudio también se implementó una rápida, sensitiva y específica prueba de PCR para la detección de tres glicoproteínas de superficie del *Herpesvirus Bovino-1* (BoHV-1), cuyos fragmentos fueron secuenciados, lo que permitió encontrar homologías del 100% comparadas con los reportes del Gene Bank. Por medio del análisis con la enzima de restricción Hind III se clasificaron los aislamientos de la sabana de Bogotá como subtipo BoHV-1.2a y el de los Llanos Orientales como subtipo BoHV-1.1.

Palabras claves: BoHV-1, RIB, PCR, enzima de restricción

DETECTION AND CHARACTERIZATION BY MOLECULAR METHODS OF COLOMBIAN ISOLATIONS OF *BOVINE HERPESVIRUS* TYPE 1

ABSTRACT

Infectious Bovine Rinotraqueítis (IBR), is a highly contagious disease of world distribution and viral origin caused by the *Bovine Herpesvirus-1* (BoHV-1). It causes alterations in the respiratory and reproductive system and is a disease of great economic impact for the cattle production systems. The study characterized three Colombian isolations of the BoHV-1, two of the Sabana of Bogotá and another of the Eastern plains using technical of molecular biology. The isolations were analyzed with the restriction enzymes *Bam* HI, *Bst* EII, *Eco* RI, *Hind* III and *Pst* I. In this study a quick, sensitive and specific test of PCR was also implemented for the detection of three surface glycoproteins of the *Herpesvirus Bovine-1* (BoHV-1) whose fragments were sequenced, having homologies of 100% compared with the reports of the Gene Bank. By means of the analysis with the restriction enzyme Hind III, the isolations of

¹ dpiedrahita@unal.edu.co

² gcamirez@unal.edu.co

³ vjveraa@unal.edu.co

the Sabana of Bogotá was classified as subtype BoHV-1.2a and the strain of Eastern plains corresponds to the subtype BoHV-1.1.

Key words: BoHV-1, IBR, PCR, restriction endonucleases.

INTRODUCCIÓN

La Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (RIB) es una enfermedad de distribución mundial que clínicamente afecta al ganado vacuno y ocasionalmente al caprino. Produce alteraciones en el sistema respiratorio y reproductivo, relacionadas con rinotraqueítis, conjuntivitis, vulvovaginitis, enteritis, mastitis, abortos, encefalitis, infecciones generalizadas en animales jóvenes y fallas reproductivas, lo que la convierte en una entidad que representa potencialmente un gran impacto negativo en el ámbito económico para los sistemas de producción ganadera. (Alvarado *et al.*, 1993; Suárez *et al.*, 1995; Rodas *et al.*, 1996).

El agente etiológico de la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina es el BoHV-1, que pertenece a la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alfaherpesvirinae*, género *Varicellovirus* (Fenner, 1992). Como todos los miembros de los alfavirus, el BoHV-1 provoca una infección latente o persistente en las neuronas de los ganglios sensoriales del huésped infectado después de una infección primaria, uno de los mayores problemas en el control de su infección (Ashbaugh *et al.*, 1997; Whetstone *et al.*, 1989; Miller *et al.*, 1991; Gunther *et al.*, 1996). En diferentes países se ha establecido que el impacto económico del RIB se fundamenta en las pérdidas provocadas por los abortos, la disminución de peso vivo y de producción láctea, los costos de los tratamientos de recuperación y control del virus y la pérdida de los animales (Wiseman *et al.*, 1979; Wyler, 1989; Straub *et al.*, 1990; Murray, 1990; Denis, 1994; Bosch *et al.*, 1997; Cook, 1998; Biuk *et al.*, 1999; Bennett *et al.*, 1999).

Teniendo en cuenta que la genotipificación de las cepas virales de campo es un punto clave para la solución de problemas relacionados con el diagnóstico, la situación epidemiológica, el control y la prevención de la enfermedad, este trabajo de investigación tuvo como objetivo primordial establecer las principales características moleculares de las tres cepas aisladas en Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo viral y concentración viral

Las cepas virales fueron cultivadas en la línea celular Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK). Se inocularon 10⁶ DITC 50% del virus, en frascos de 150 cm² de cultivo celular MDBK, mantenidos en medio mínimo esencial MEM, suplementado con suero fetal bovino al 5%, L-Glutamina al 2%, penicilina-estreptomomicina al 1% y anfotericina al 0,5%, incubados a 37°C, por aproximadamente 18 horas, hasta observar un efecto citopático del 80 al 100%. Para llevar a cabo el análisis con las enzimas de restricción se concentró el virus tomando aproximadamente 850 cm² de cultivo celular infectado y centrifugado a 100.000xg por 1 hora.

Extracción del ADN viral

La suspensión viral fue tratada con 0,5% de Dodecyl Sulfato de Sodio (SDS) y 0,1 mg/ml de proteinasa K, por una hora, a 37°C. Después de la digestión, el ADN viral fue extraído con volúmenes iguales de fenol:cloroformo (1:1), cloroformo:alcohol

Isoamílico (24:1) y precipitado con etanol. El pellet obtenido fue resuspendido en agua grado biología molecular y almacenado a -70°C.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se evaluaron tres glicoproteínas de superficie, gpB, gpD y gpE. La amplificación del fragmento del gen que codifica para la gpB se realizó con un juego de primers reportados por Vilcek *et al.* (1993) y Kataria *et al.* (1997). Para la amplificación de un fragmento del gen de la gpD se utilizó un par de primers, basados en la secuencia reportada por Tikoo *et al.* (1990). Un fragmento del gen de la gpE se amplificó utilizando los primers descritos por Schynts *et al.* (1999) y Fuchs *et al.* (1999). Las condiciones óptimas de PCR fueron 100 ng de cada primer, 12 mM MgCl₂, 1,25 mM dNTPs 8% de dimetilsulfoxido (DMSO), 1,25 unidades de Taq DNA polimerasa para un volumen final de 50 microlitros. Las condiciones de amplificación para las glicoproteínas B y D fueron 95°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 56°C, 1 minuto a 72°C, con una etapa de extensión final de 10 minutos a 72°C. Las condiciones de amplificación para la glicoproteína E fueron 95°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 45 segundos a 60°C, 45 segundos a 72°C, con una etapa de extensión final de 10 minutos a 72°C.

Secuenciación

Los fragmentos obtenidos por PCR purificados y precipitados fueron secuenciados en el Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia en forma automatizada con el equipo ABI prims 310 APPLIED BIOSYSTEM, que utiliza el kit Big Day Terminador®.

Análisis del genoma viral con endonucleasas de restricción

Teniendo en cuenta estudios previos (D'Arce, 2002; Screenivasa, 1996; Smith 1995; Bulach, 1990; Whetstone, 1989; Mayfield, 1983) se seleccionaron las enzimas Bam HI, Hind III, Eco RI, Bst EII y Pst I. Entre uno y dos µg de ADN fue cortado con 20U de la respectiva enzima de restricción, siguiendo las especificaciones de la casa productora.

RESULTADOS

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En las figuras 1, 2 y 3 se muestran las bandas de los amplificados por PCR que fueron visualizadas en geles de agarosa al 2% en buffer TBE y teñidas con bromuro de etidio (1µg/ml). Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb. Las bandas encontradas corresponden a los tamaños esperados de amplificados, 468 pb para la glicoproteína B (figura 1), 527 pb para la glicoproteína D (figura 2) y 281 pb para la glicoproteína E (figura 3).

Análisis con enzimas de restricción

En la figura 4 se muestran los resultados de la digestión del ADN viral con la enzima de restricción Hind III, que fue visualizada en gel de agarosa al 0,6% en buffer TBE y teñida con bromuro de etidio (1µg/ml). Como marcador de peso molecular fue utilizado el fago lambda digerido con Hind III.

DISCUSIÓN

En la última década, en Colombia se han aislado tres cepas provenientes de animales con actividad serológica, induciendo reactivación viral por inmunosupresión con corticoides (Góngora *et al.*, 1996; Navarrete *et al.*,

Figura 1. Amplificación por PCR para la gpB del BoHV-1

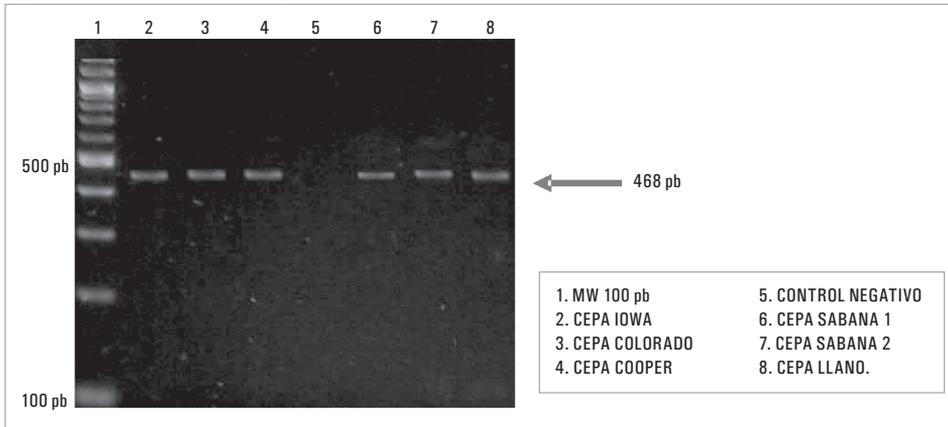


Figura 2. Amplificación por PCR para la gpD del BoHV-1

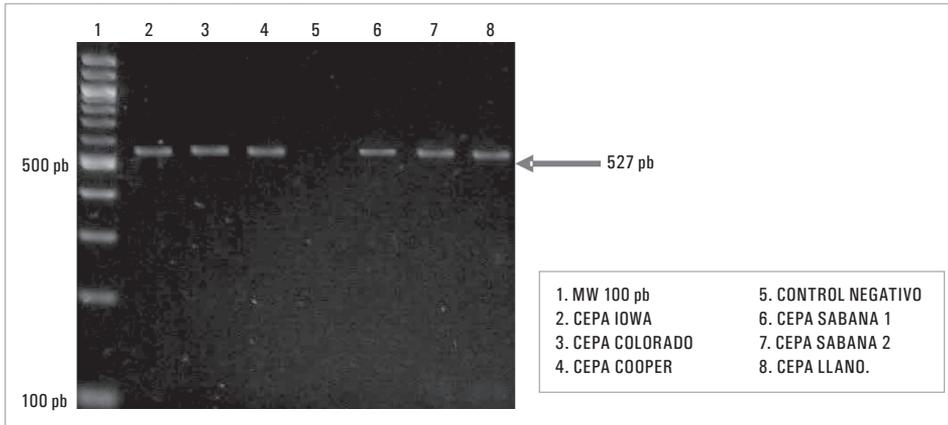


Figura 3. Amplificación por PCR para la gpE del BoHV-1

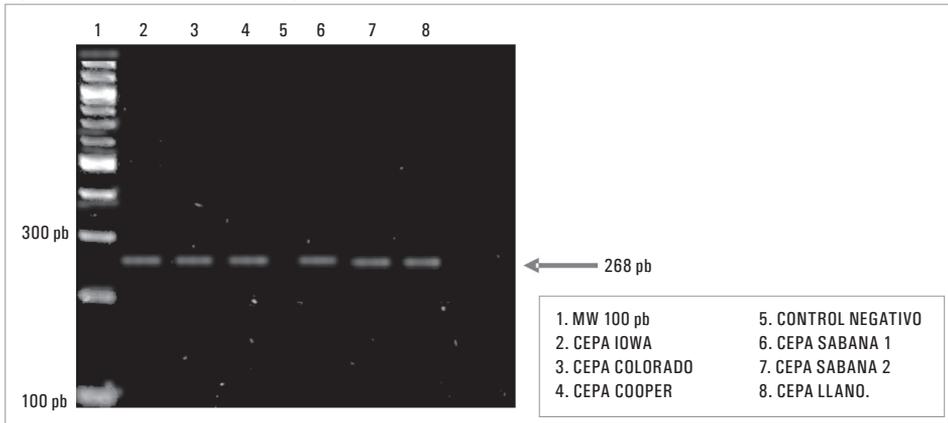
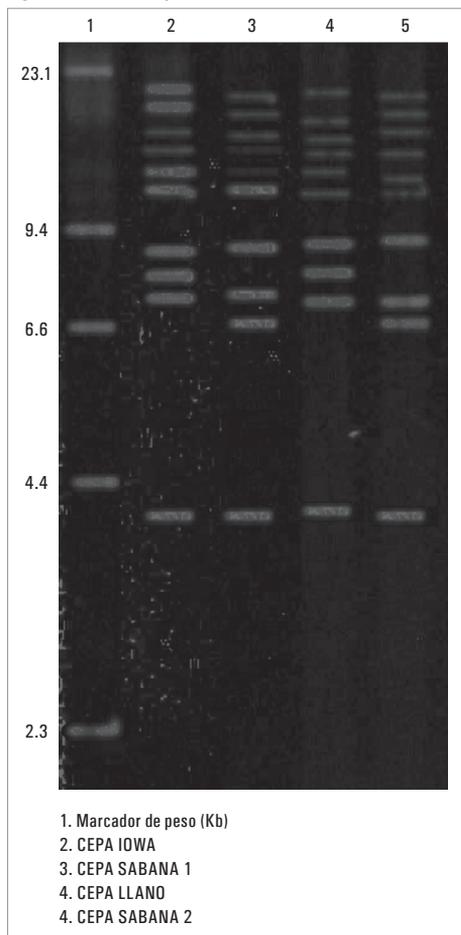
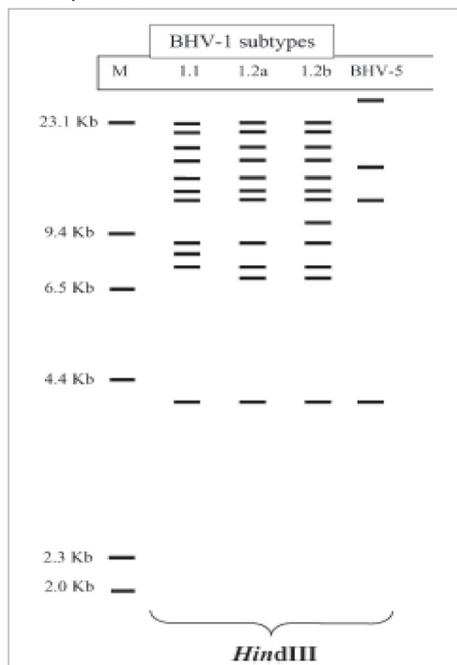


Figura 4. ADN Viral digerido con la enzima de restricción Hind III



2002; Chaparro *et al.*, 2002). Sin embargo, de estas cepas se desconocían muchas de las características moleculares. Es por eso que este es un importante aporte al conocimiento de la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina, ya que por primera vez se lleva a cabo en el país una completa caracterización molecular de cepas de campo que pudo establecer que los aislamientos colombianos corresponden al BoHV-1, considerando que los juegos de primers utilizados en la PCR fueron seleccionados de acuerdo a su capacidad para diferenciar BoHV-1 de otros *Herpesvirus* y a su alta especificidad en la amplificación de

Figura 5. Patrones de restricción de BoHV-1 Digeridos con HINDIII (D'Arce y col, 2002)



las glicoproteínas gpB, gpD, gpE, para los subtipos 1.1 y 1-2a. Lo anterior se sustenta adicionalmente por la amplificación de los fragmentos correspondientes a las cepas de referencia Iowa (BoHV-1-2a), Colorado (BoHV-1.1) y Cooper (BoHV-1.1).

Adicionalmente, en este trabajo, por medio del análisis con la enzima de restricción Hind III, se logró la clasificación de los aislamientos colombianos en los subtipos correspondientes de acuerdo a lo reportado por D'Arce en el 2002 (figura 5). La cepa de campo Sabana 1 y Sabana 2 corresponden al subtipo BoHV-1.2a, resultado lógico, pues fueron aislamientos realizados en la misma explotación, pero en diferente tiempo. Por su parte, la cepa de campo Llano corresponde al subtipo BoHV-1.1.

La PCR que amplifica glicoproteínas específicas del virus representa una excelente herramienta para la detección rápida y sensible del genoma viral, cuyo potencial

en muestras clínicas y biológicas cobra mayor relevancia (sangre completa, semen, nódulos linfoides, tonsilas y ganglios nerviosos) (Wiedmann *et al.*, 1993; Kataria *et al.*, 1997; Rocha *et al.*, 1998; Candido *et al.*, 1999). Por lo anterior se recomienda evaluar estos protocolos con muestras clínicas y de semen, ya que es de mucha importancia desde el punto de vista del diagnóstico epidemiológico y de control.

Se tienen evidencias serológicas de infección por el BoHV-1. Sin embargo, las evidencias clínicas y virológicas de la RIB son escasas. La alta incidencia de manifestaciones genitales junto con las pocas presentaciones respiratorias sugieren que esto se debe a la circulación de cepas de baja virulencia, lo que parece ser corroborado por los intensos intentos de aislamiento mediante los métodos convencionales que han resultado infructuosos. Es por eso que sería importante determinar molecularmente si las cepas colombianas presentan en su genoma evidencia de patogenicidad, como lo describe Moore, que estandarizó una PCR para detectar el gen de la timidina quinasa, enzima que se encuentra presente en todas las cepas patógenas del BoHV-1.1. y BoHV-1.2. (Moore *et al.*, 2000).

Un primer acercamiento a este tipo de estudio molecular en el país fue el reportado por Zapata *et al.* en 2002, quienes evaluaron la cepa de campo Sabana 1 aislada en 1995 por Góngora, suministrada por el posgrado de Salud y Producción Animal de la Universidad Nacional de Colombia (sede Bogotá), cepa que también fue analizada en este estudio, donde encontramos algunas inconsistencias en los resultados presentados, pues, a pesar de que los perfiles de restricción obtenidos por Hind III corresponden a un BoHV-1-2a, clasifican esta cepa en el subtipo 2b.

Sin duda alguna, desde el punto de vista de epidemiología molecular, es necesario que

se lleven a cabo más aislamientos y estudios de este tipo que contribuyan de una manera completa y consistente al entendimiento del BoHV-1 como causante de la Rinotraqueítis infecciosa Bovina.

CONCLUSIONES

1. De acuerdo a las características encontradas por PCR se estableció que las cepas aisladas en Colombia corresponden al BoHV-1.
2. Por medio del análisis de restricción con la enzima Hind III se clasificaron los aislamientos colombianos en el subtipo BoHV-1.2a, para las cepas de campo Sabana 1 y Sabana 2, y en el subtipo BoHV-1.1, para la cepa de campo aislada en los Llanos Orientales.
3. No se encontraron diferencias importantes en cuanto al análisis de la secuenciación de los fragmentos amplificados para las glicoproteínas gpB, gpD y gpE, encontrándose homologías del 100% comparadas con los reportes del Gene Bank.

AGRADECIMIENTOS

Al posgrado de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, línea de Microbiología y Epidemiología, de la Universidad Nacional de Colombia (sede Bogotá). A la University of Veterinary Medicine of Kosice Slovak Republic. Al Instituto de Genética. Al Instituto de Inmunología de la Universidad de Antioquia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alvarado A, Aguilar A, Mejía P, De Paz O y Vilchis C. Aislamiento y tipificación de una cepa de *Herpesvirus bovino* 1 del tipo vulvovaginitis pustular infecciosa. Técnica Pecuaria de México. 31:73-83, 1993.

2. Ashbaugh E, Karin E, Ellen B, Cshafiquel C and James K. Specific detection of shedding and latency of bovine herpesvirus 1 and 5 using a Nested Polymerase Chain Reaction. *J. Vet Diagn Invest.* 9: pp. 387-394, 1997.
3. Bennett T. Preliminar estimates of direct cost in cattle with endemic diseases of livestock in Great Britain. *Preventive Veterinary Medicine*, 39: 155-171, 1999.
4. Biuk N, Cvetnie S, Madie J and Rudan D. Prevalence of antibodies to IBR and DVB viruses in dairy cows with reproductive disorders. *Theriogenology.* 51: 875-881, 1999.
5. Bosch J, Frankena K and Oischoth T. Effect on milk production of vaccination with a Bovine Herpesvirus 1 gene-deleted vaccine. *Veterinary Record.* 140; 196-199, 1997.
6. Candido D. Detection of different brazilian strains of the *Bovine Herpesvirus-1* (BHV-1) by polimerase Chain reaction. *Arq Bras Med Vet Zootec.* pp. 58-53, 1999.
7. Chaparro J. Evaluación de la capacidad infectiva de una cepa de campo del virus de la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina en terneros. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Abril de 2003.
8. Chaparro J, Ramírez G, Vera V y Villamil C. Aislamiento de una cepa de campo del virus de la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina en una explotación comercial del departamento del Meta. *Revista Orinoquía*, 2002.
9. Cook N. Combined outbreak of the genital and conjuntival forms of *Bovine Herpesvirus-1* infection in a UK dairy herd. *Veterinary Record.* 143: 561-562, 1998.
10. D'Arce R, Almeida S, Silva T, Franco A, Spilki F, Roehle P and Arns C. Restriction endonuclease and monoclonal antibody análisis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5. *Veterinary Microbiology.* 88: 315-324, 2002.
11. Denis M, Splitter G, Thiry E, Pastoret P and Babiuk A. Cell-mediated immunity in ruminants. CRC. Press, 1994.
12. Fenner F. *Virología veterinaria.* Madrid. Acribia. pp. 349-370, 1992.
13. George L. Understanding the encephalitic form of Infectious Bovine Rhinotracheitis. *Veterinary Medicine.* pp. 335-337, 1991.
14. Góngora A, Villamil L, Vera V, Ramírez G y Parra J. Diagnóstico de las principales enfermedades reproductivas en toros de la sabana de Bogotá, énfasis en Rinotraqueitis infecciosa bovina (RIB). *Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad Nacional de Colombia.* pp. 37-42, 1993.
15. Gunther M, Thyl E, Axel E and Martina E. *Bovine Herpesvirus 1* Us open reading frame 4 encodes a glycoproteoglycan. *Journal of virology.* 70: 3032-3038, 1996.
16. Kaashoek M, Straver P, Van RooouE, Quak J and Orischoth J. Virulence, immunogenicity and reactivation of seven Bovine Herpesvirus 1.1 strains: clinical and virological aspects. *Veterinary Record.* 139: 416-421, 1996.
17. Kataria R, Tiwari A, Gupta P, Mehrotra M, Rai A and Bandtopadhyay. Detection of *Bovine Herpesvirus 1* (BHV-1) genomic sequences in bovine semen inoculated with BHV-1 by polimerase chain reaction. *Acta virológica.* 41, 1997.
18. Miller J, Whetstone C and Van Der Maaten M. The effects of IBR virus infection on reproductive function of cattle. *Veterinary Medicine.* pp. 95-98, 1991.
19. Moore A, Gunn M and Walls D. A rapid and sensitive PCR-based diagnostic assay to detect *Bovine Herpesvirus 1* in routine diagnostic submissions. *Veterinary Microbiology.* 75: 145-153, 2000.
20. Murray R. A field investigation of causes of abortion in dairy cattle. *Veterinary Record.* 127: 543-547, 1990.
21. Navarrete J. Obtención de anticuerpos monoclonales contra proteínas de una cepa de campo del virus de la Rinotraqueitis Bovina Infecciosa (IBR) y evaluación de su utilidad diagnóstica a través de la prueba de ELISA. Tesis de Magíster. Facultad de Medicina vete-

- rinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia, 2002.
22. Rocha M, Barbosa E, Guimaraes S, Dias E and Gouveia A. A high sensitivity-nested PCR assay for BHV-1 detection in semen of naturally infected bulls. *Vet microbial.* 63, 1998.
 23. Rodas J. Estandarización de una prueba de ELISA para la detección de anticuerpos contra el *Herpesvirus Bovino-1* en suero lácteo. *Revista Colombiana de ciencias pecuarias*, 1996.
 24. Roizman B, Desrosiers R, Fleckenstein B, Lopea C, Minson A and Studder M. The family herpesviridae: an update. *Archives of Virology.* 123: 425-449, 1992.
 25. Ros C and Belak S. Studies of genetic relationships between bovine, caprine, cervine and rangiferine alphaherpesvirus and improved molecular methods for virus detection and identification. *Journal of Clinical Microbiology.* 37: 1247-1253, 1999.
 26. Straub O. Infectious Bovine Rhinotracheitis virus. *Virus Inf. Ruminant* (3): 71-108, 1990
 27. Suárez P, Da Silva N, Prieto C y Castro JM. Aspectos epizootiológicos y patogenia de la infección por *Herpesvirus Bovino* tipo 1. *Bovis*, 64: 29-40, 1995
 28. Whetstone C, Miller J, Bortner M and Van Der Maaten M. Changes in the *Bovine Herpesvirus 1* genome during acute infection, after reactivation from latency, and after superinfection in the host animal. *Arch. Virol.*, 106: 261-279, 1989.
 29. Wiedmann M. Detection of Bovine Herpesvirus-1 in bovine semen by a nested PCR assay. *Journal of virological Methods.* 44, 1993.
 30. Wiseman A, Msolla P and Selman E. The financial burden of infectious bovine rhinotracheitis. *Veterinary Record.* 105: 469, 1979.
 31. Wyler R, Engels M and Schwyzer M. Infectious Bovine Rhinotracheitis/ Vulvovaginitis (BoHV1). *Institute of Virology. University of Zurich.* pp. 1-55, 1995.