

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE UNA CEPA DE HERPESVIRUS BOVINO TIPO 2 EN VENEZUELA

Molecular Identification of a Bovine Herpes Virus Type 2 Strain in Venezuela

César Obando¹, Mayra Hidalgo¹, Yennyfer Montoya¹, Luzmir Boyer¹, Magaly Bracamonte¹,
Florangel Conde² y Domingo Garzaro³

¹Laboratorio de Virología, Sanidad Animal – Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP) – Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). ²Laboratorio de Enfermedades Vesiculares, Sanidad Animal – CENIAP – INIA.

³Laboratorio de Virología Molecular. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. E-mail: cobando@inia.gob.ve

RESUMEN

El herpesvirus bovino tipo 2 (HVB-2) es el agente responsable de la mamilitis bovina, enfermedad que puede ser confundida con la fiebre aftosa por las lesiones que ocasiona en la ubre y pezones de las vacas infectadas. Para investigar su presencia en el país, se procesaron con fines de diagnóstico virológico muestras de tejidos epiteliales de ubre, recolectadas de ocho vacas con sospecha clínica de fiebre aftosa. Todas las muestras resultaron negativas a fiebre aftosa y estomatitis vesicular, pero de una de ellas se aisló una cepa viral en cultivo primario de riñón fetal bovino, la cual ocasionó un efecto citopático característico al observado por la acción del virus HVB-2. Mediante la prueba de PCR se amplificó una banda de 422 pb, la cual se correspondió al producto esperado de acuerdo al protocolo empleado para el diagnóstico molecular de *herpesvirus bovino* tipo 2. El análisis por BLAST y la alineación de las secuencias del amplicon obtenido permitió confirmar la presencia de este virus en el país.

Palabras clave: Mamilitis bovina, herpesvirus bovino tipo 2, detección molecular.

ABSTRACT

Bovine mamillitis is a viral disease which is caused by Bovine Herpes Virus type 2 (BHV – 2). This disease is difficult to differentiate of Food and Mouth Disease (FMD) because infected cows show vesicles and ulcerating lesions on teats and udder. In order to investigate if BHV-2 is present in Venezuelan cattle udder samples of eight cows undergoing clinical symptoms similar to FMD were taken and tested for viral diagnostic. All samples were negative to FMD and vesicular stomatitis, but a viral strain with

cytopathic effect typical to BHV-2 was isolated from one of them when a primary cells culture of bovine kidney fetus was inoculated. The presence of BHV-2 was confirmed in Venezuela according with the cytopathic effect, the PCR product of 422 bp obtained by specific test and the significant alignments by BLAST.

Key words: Bovine mamillitis, bovine herpes virus type 2, molecular detection.

INTRODUCCIÓN

Los virus que integran la familia *Herpesviridae* son virus con envoltura, de 200 a 300 nm de diámetro y el genoma consiste en una doble cadena de ADN que varía entre 120 a 250 Kbp. La familia está conformada por tres subfamilias: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* y *Gammaherpesvirinae*. Los herpesvirus reconocidos en el bovino pertenecen a la *Alpha* o *Gamma-herpesvirinae*. El *herpesvirus bovino tipo 2* (HVB-2) pertenece a la subfamilia *Alphaherpesvirinae* y ha sido asociado con dos síndromes clínicos: pseudodermatosis nodular contagiosa y mamilitis bovina, caracterizados por ocasionar lesiones ulcerativas en la ubre y pezones de las vacas, y zonas alopecicas generalizadas de tamaño pequeño en la piel de los bovinos infectados, que en algunos casos pueden hacerse confluentes [10, 15]. Estos síndromes también son referidos como enfermedad del herpes dermopático bovino [9].

En Venezuela, se sospecha de la existencia de ambos síndromes por las características clínicas observadas en el ganado, a pesar de no existir un diagnóstico de laboratorio que haya confirmado la presencia del agente etiológico. La mamilitis bovina reviste especial importancia porque pudiera estar confundiendo con alguna enfermedad vesicular, particularmente con fiebre aftosa, la cual se encuentra bajo un programa de erradicación. En consecuencia, se realizó el siguiente trabajo a fin de investigar la presencia de este agente viral en Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

La muestra objeto de estudio consistió en trozos de tejidos de epitelio de ubre o pezón, recolectados de 8 vacas de diferentes edades, con lesiones similares a las ocasionadas por el virus de la fiebre aftosa, los cuales fueron conservados en glicerina buferada (40%) y transportados en cavas con hielo al laboratorio de Enfermedades Vesiculares de Sanidad Animal, Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias- Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (CENIAP-INIA) para diagnóstico de fiebre aftosa. Las muestras procedían de rebaños ubicados en los estados Zulia (3), Trujillo (1), Lara (1), Cojedes (2) y Barinas (1).

Procesamiento de las muestras Identificación de antígenos virales

Para investigar la presencia de agentes virales se prepararon suspensiones de los tejidos en solución salina 1/5 (p/v), y se corrieron para identificación de virus de fiebre aftosa y estomatitis vesicular, mediante la técnica de fijación de complemento (FC) 50%, descrita en el Manual de Diagnóstico de Laboratorio de las Enfermedades Vesiculares [1]. Simultáneamente, alícuotas de las suspensiones se probaron mediante la técnica de ELISA Sándwich Indirecta [4].

Aislamiento viral

Con fines de aislamiento viral, se utilizaron monocapas preformadas de 72 horas de cultivos primarios de riñón fetal bovino (RFB), crecidas en medio Eagle MEM (GIBCO BRL), suplementado con 10% de suero fetal bovino (GIBCO BRL), penicilina (100 UI/mL) y streptomicina (100 µg/mL) [11]. Brevemente, las suspensiones fueron tratadas con antibióticos (penicilina 500 UI/mL y estreptomicina 500 µg/mL) por una hora a 4°C y se inoculó 0,5 mL de ellas en frascos de cultivo plásticos de 25 cm², con las monocapas de RFB, las cuales fueron previamente lavadas con medio de mantenimiento (el mismo medio pero sin suero fetal bovino). El inóculo se dejó adsorber por 1 hora a 37°C, se descartó y se agregó medio de mantenimiento, suplementado con 3% de suero fetal bovino. Seguidamente, los frascos se incubaron a 37°C, realizándose observaciones diarias con microscopio invertido con aumento 100 X. Cada muestra fue objeto de cuatro pases en RFB, antes de ser considerada libre de virus citopatogénicos.

Prueba de PCR para herpesvirus bovino tipo 2 (HVB-2)

Extracción del ácido nucleico. La extracción del ácido nucleico (ADN) se realizó mezclando 25 µL de las suspensiones virales resultantes de las muestras inoculadas en cultivo celulares con una solución de 133 µL de Chelex 100 Bio RAD (7,5%), Proteinasa K (10 mg/mL) y DTT (1M), la cual se incubó a 56°C por 45 minutos, en un baño maría marca P/S, elaborado por Precision Scientific CO, EUA. Seguidamente se agitó vigorosa-

mente y se centrifugó a 13.000g por 10 segundos en una centrifuga Universal 32 R, marca Hettich de fabricación alemana, se incubó en baño de agua hirviendo por 8 minutos, repitiendo los pasos de agitación y centrifugación, la cual se realizó por 3 minutos. La muestra se almacenó a -20°C hasta su uso, en un congelador marca Whirlpool, Modelo EV190NXWN01, elaborado por Whirlpool Corporation Benton Harbor, EUA.

Amplificación por PCR. Para ello se siguió un protocolo utilizando los primers 4109 (5' GCGGCGGCGGAGTC TGGCTTTGAG 3') y 4110 (5'TCGCTGATGTTGTTCCGGA GGGAGGTTGA 3') [7], que amplifican un segmento de 422 pares de bases del gen UL 29, que codifica para la principal proteína de unión al ADN del HVB-2 [8]. Como control positivo se utilizó la cepa de herpesvirus bovino tipo 1 (HVB-1) de referencia del laboratorio de Virología del CENIAP – INIA, por no disponer de una cepa de HVB-2, y los primers TK1 (5' AGA CCC CAG TTG TGA TGA ATG C 3') y TK2 (5' ACA CGT CCA GCA CGA ACA CC 3'), ambos descritos para la detección de genoma de HVB-1 [2]. La mezcla de reacción para el PCR tenía un volumen final de 50 µL y contenía 10mM Tris hidrocloreuro (pH 8,3), 1,5mM MgCl₂, 100 µM dNTPs, 1 U de Taq polimerasa, 1 µM de cada primer y 5 µL del producto extraído de cada muestra. Se incluyó un control negativo de PCR (agua) en todas las corridas. Las mezclas para cada muestra y los controles se sometieron a un proceso de amplificación en un termociclador Modelo PTC 200, M J Research, fabricado en EUA, de la siguiente manera: predesnaturalización a 94°C por 3 minutos, seguida por 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, 68°C por 1 minuto y 72°C por 30 segundos, y una extensión final a 72°C por 7 minutos.

El resultado de la amplificación fue observado en un gel de agarosa 1,8% en buffer TBE (TRIS 89mM, ácido bórico 89mM, pH 8), teñido con bromuro de etidio, utilizando un transiluminador UV – modelo M -20 Upland, fabricado en EUA. El producto se comparó con un marcador de peso molecular de 100 a 1.500 pb, elaborado por Invitrogen en EUA.

Caracterización molecular

Para la caracterización molecular de la cepa aislada, el amplicón de tamaño correspondiente al esperado (422 pb), obtenido por PCR fue secuenciado en un equipo automático (ABI Prism 377, Macrogen, Korea) utilizando los mismos primers que se utilizaron para las reacciones de PCR. Las secuencias obtenidas fueron editadas, alineadas y comparadas por BLAST, con secuencias de la cepa de referencia (M21628.1 | HSBGLYB) herpesvirus bovino tipo 2 - gen de la glicoproteína b.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de antígenos de fiebre aftosa y estomatitis vesicular por FC y ELISA

Las suspensiones de las muestras de tejidos recolectados de las 8 vacas resultaron negativas a los virus de fie-

bre aftosa (FA) y estomatitis vesicular (EV), tanto por la técnica de FC 50% [1] como por la técnica de ELISA, indicando que ninguno de estos virus era responsable de las lesiones observadas en las ubres de los animales muestreados. Este resultado no es de extrañar ya que usualmente, alrededor del 50% de las muestras recolectadas de bovinos con lesiones sospechosas de enfermedad vesicular, resultan negativas a estos virus [13]. Además, el análisis filogenético de cepas aisladas durante el año 2003 [12] y la caracterización antigénica de los aislados de FA y EV, evidencia que los tipos de virus que circulan actualmente en el campo están restringidos a los subtipos O1 y A24, para FA y a los tipos New Jersey e Indiana, para EV [5], lo que minimiza la posibilidad de que otros subtipos de virus de fiebre aftosa no sean detectados por diferencias antigénicas.

Aislamiento viral

En 7 de los 8 cultivos celulares inoculados con las muestras problemas no se observó efecto citopático, lo que corroboró en éstas últimas la ausencia de virus de fiebre aftosa y estomatitis vesicular, tal como lo mostró el resultado de las pruebas serológicas específicas para el diagnóstico de dichos virus. A pesar que es frecuente obtener resultados negativos a enfermedades vesiculares, de muestras de bovinos con lesiones compatibles con ellas, estos resultados son indicativos de la adecuada especificidad de las técnicas empleadas para su diagnóstico. Se debe tener presente que el éxito de un diagnóstico viral por aislamiento, depende en gran parte de la calidad de las muestras [6], siendo fundamental el momento de la recolección y de la conservación de las mismas, además considerar que los animales no hayan sido tratados, aspectos que pudieran haber influido en la ausencia de aislamiento viral, conocida la elevada sensibilidad de los cultivos primarios de riñón fetal bovino.

De la muestra de tejidos de pezón recolectados de un bovino del estado Falcón, después del segundo pase, fue posible observar un efecto citopático caracterizado por redondeamiento de las células, formación de sincicios entre ellas y desprendimiento (FIG. 1). A pesar de las características del efecto citopático observado, muy similar al ocasionado por el HVB-2, alícuotas de la suspensión vírica obtenida se remitieron nuevamente al laboratorio de Enfermedades Vesiculares para confirmar que no se trataba de fiebre aftosa ni de estomatitis vesicular, siendo los resultados acordes con las expectativas.

Prueba de PCR para herpesvirus bovino tipo 2 (HVB-2)

Mediante la prueba de PCR se pudo amplificar un producto de 422 pb, tamaño esperado para los HVB-2 (FIG. 2), con base al protocolo descrito por d'Offay y col. [7], el cual se siguió sin ninguna modificación. Los primers diseñados para amplificar un segmento del genoma del HVB-1, para un producto de 183 pb, los cuales se utilizaron como control positivo con la cepa homóloga de referencia del laboratorio, no amplificaron ningún segmento en la muestra problema, pero si lo hi-



FIGURA 1. CÉLULAS DE RIÑÓN FETAL BOVINO INFECTADAS CON HVB-2. SE OBSERVA EL EFECTO CITOPÁTICO VIRAL. 100X / VIRAL CYTOPHATIC EFFECT OF BHV -2 IN PRIMARY CELLS CULTURE OF BOVINE KIDNEY FETUS. 100X.

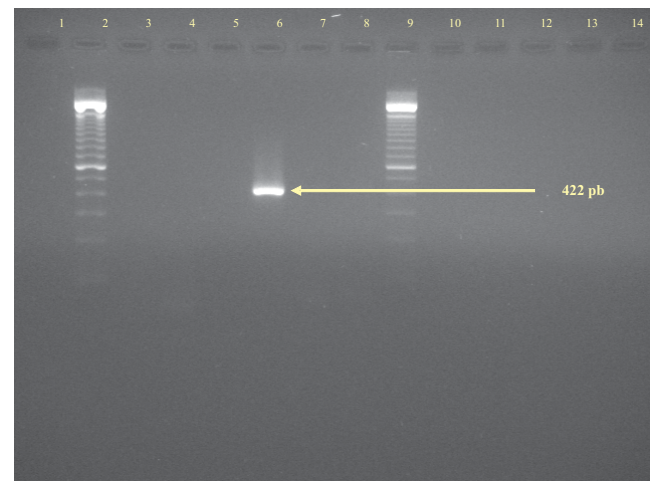


FIGURA 2. CORRIDA ELECTROFORETICA DEL PRODUCTO DEL PCR ESPECÍFICO DE HVB – 2 AMPLICON DE 422 PB EN EL CARRIL 6. CARRILES 3, 5 Y 7 MUESTRAS NEGATIVAS. CARRILES 4 Y 8: CONTROLES NEGATIVOS. CARRIL 2Y 9 MARCADOR DE PM 100 PB/ PCR ELECTROPHORETIC PRODUCT OF BHV -2. TRACKS 3, 5 AND 7 NEGATIVE SAMPLES. 4 AND 8 NEGATIVE CONTROLS. 2 AND 9 100 BP MARKER. TRACK 6: 422 BP BHV – 2 DNA PRODUCT.

cieron frente al herpes virus homólogo (HVB-1), a pesar que se siguió el mismo protocolo para HVB-2. Este resultado indicó una buena especificidad del protocolo de PCR utilizado para HVB-2, en comparación con la cepa HVB-1 de referencia, lo cual era de esperarse ya que molecularmente el HVB-2 está más estrechamente relacionado con el HVS-1 (humano) que con los herpesvirus de los rumiantes [14]. Sin embargo, es conocido que existe una alta homología genómica entre los herpesvirus de los rumiantes [3]. La alineación de las secuencias y el análisis por BLAST indicó claramente que, el producto de amplificación del genoma se correspondió al producto de amplificación del genoma de HVB-2 de referencia, con una identidad de nucleótidos de 99%.

```

Aislado 1 ATCTGGGGTT-CCCAAGGAGATCCGCGTAAAGAGCCGCGTGCTGTTACCGGTGCTGGAC 59
|||||
M21628.1 2459 ATCTGGGGTTCCCAAGGAGATCCGCGTAAAGAGCCGCGTGCTGTTCCGCGGTGCTGGAC 2518
|||||
Aislado 60 CGGCCGCCTCGGAGGCAGCCAGGGCCCGTATCGCGGGCCTCCAGTCCGCGTACCAGAAGT 119
|||||
M21628.1 2519 CGGCCGCCTCGGAGGCAGCCAGGGCCCGTATCGCGGGCCTCCAGTCCGCGTACCAGAAGT 2578
|||||
Aislado 120 CCGACAAGCGCGTGGACATTCTCCTCGGCCCGCTGGGTTTCATGTTGAAGCAGTTTCACG 179
|||||
M21628.1 2579 CCGACAAGCGCGTGGACATTCTCCTCGGCCCGCTGGGTTTCATGTTGAAGCAGTTTCACG 2638
|||||
Aislado 180 CCACGCTCTTTCCTAACGGTAAGCCGCCCGGTTTCAGACAACCCCAATCCGCAGTGGTTCT 239
|||||
M21628.1 2639 CCACGCTCTTTCCTAACGGTAAGCCGCCCGGTTTCAGACAACCCCAATCCGCAGTGGTTCT 2698
|||||
Aislado 240 GGACCGCCCTGCAGCGCAACCAACTGCCCGCGCGGCTCCTCTCCGAGAGGACATAAGCC 299
|||||
M21628.1 2699 GGACCGCCCTGCAGCGCAACCAACTGCCCGCGCGGCTCCTCTCCGAGAGGACATAAGCC 2758
|||||
Aislado 300 TGATCGCGTTCGTGAAGCGCTTCTCCGTGGAGTACGGCGCAGGCAACTTTGTCAACCTCC 359
|||||
M21628.1 2759 TGATCGCGTTCGTGAAGCGCTTCTCCGTGGAGTACGGCGCAGGCAACTTTGTCAACCTCC 2818
|||||
Aislado 360 CTCCGAA 366
|||||
M21628.1 2819 CTCCGAA 2825
    
```

FIGURA 3. ALINEACIÓN DE LA SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DEL AISLADO CON LA SECUENCIA DE LA CEPA DE REFERENCIA (M21628.1 | HSBGLYB) HERPESVIRUS BOVINO TIPO 2 - GEN DE LA GLICOPROTEINA B (gB). 99% DE IDENTIDAD/ ALIGNMENT OF NUCLEOTIDE SEQUENCES OF THE ISOLATED VIRUS WITH THE REFERENCE STRAIN (M21628.1 | HSBGLYB) BOVINE HERPESVIRUS TYPE 2 – GEN OF GLYCOPROTEIN B (gB). IDENTITIES 99%.

CONCLUSIONES

A pesar de que no se incorporó en la prueba de PCR un control positivo, por no existir en ningún laboratorio del país una cepa de HVB-2 de referencia, la caracterización molecular fue determinante en que la cepa viral aislada se ubica dentro del HVB-2, responsable de la mamilitis herpética bovina, al obtenerse una estrecha relación genética del amplicon (99% de identidad de nucleótidos) con la cepa de referencia de herpesvirus bovino tipo 2 - gen de la glicoproteína b (gB) (M21628.1 | HSBGLYB).

En consecuencia, este virus está circulando en bovinos de Venezuela y es posible que las lesiones que ocasiona puedan estar confundiendo con las producidas por el virus de la fiebre aftosa, contribuyendo en algún grado, con el elevado número de diagnósticos negativos que resultan de muestras sospechosas de enfermedad vesicular. Por lo tanto, este hallazgo debe tenerse muy en cuenta por los profesionales y técnicos que adelantan el programa de erradicación de la fiebre aftosa en el país.

RECOMENDACIONES

Se recomienda incrementar las actividades de aislamiento viral a partir de muestras recolectadas de vacas con lesiones vesiculares o ulcerativas en ubre y realizar estudios de caracterización molecular de las cepas aisladas, negativas a fiebre aftosa y estomatitis vesicular, mediante protocolos espe-

cíficos para HVB – 2. Esto con la finalidad de mejorar el diagnóstico diferencial de la fiebre aftosa y de conocer el grado de implicación de este virus en dichas lesiones.

AGRADECIMIENTO

Esta investigación fue financiada en parte por el convenio FONACIT-PNUD, Proyecto 2005000010.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALONSO, A. Manual de Diagnóstico de Laboratorio de las Enfermedades Vesiculares. **Serie de Manuales didácticos**. N° 15. OPS – OMS. 50 pp. 1986.
- [2] ALEGRE, M.; NANNI, M.; FONDEVILA, N. Development of a multiplex polymerase chain reaction for the differentiation of Bovine Herpesvirus-1 and -5. **J. Vet. Med.** 48: 613-621. 2001.
- [3] BASCUÑANA, C.; BELÁK, S. Studies of Genetic Relationships between Bovine, Caprine, Cervine, and Rangiferine Alphaherpesviruses and Improved Molecular Methods for Virus Detection and Identification. **J. Clin. Microbiol.** 37 (5): 1-7. 1999.
- [4] CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA. ELISA Sándwich indirecta. Protocolo de trabajo. Versión 1. Río de Janeiro. Pp 16. 1999.

- [5] CONDE, F.; OBREGON, J.; NOVELL, M. Diagnóstico de la fiebre aftosa en Venezuela: Estudio Retrospectivo. **XXII Cursillo sobre Bovinos de Carne**, Maracay- FCV-UCV. 18-19 de Octubre. 245-261 pp. 2007.
- [6] CRESPO, M. El diagnóstico viral por el laboratorio. **Colomb. Méd.** 31: 135-150. 2000.
- [7] D'OFFAY, J.; FLOYD, J.; EBERLE, R.; SALIKI, J.; BROCK, K.; D'ANDREA, G.; MCMILLAN, K. Plenum Press, Use of a polymerase chain reaction assay to detect bovine herpesvirus type 2 DNA in skin lesions from cattle suspected to have pseudo-lumpy skin disease. **J.A.V.M.A.** 222: 1404-1407. 2003.
- [8] HAMMERSCHMIDT, W.; CONRATHS, F.; MANKERTZ, J.; PAULI, G.; LUDWIG, H.; BUHK, H.J. Conservation of a gene cluster including glycoprotein B in bovine herpesvirus type 2 (BHV-2) and herpes simplex virus type 1 (HSV-1). **Virology**. 165: 388-405. 1988.
- [9] LUDWING, H. Bovine herpesviruses. In: **The herpesviruses**. Roizman B (Ed). Plenum Press, New York. Vol. 2. 135-214 pp. 1983.
- [10] MAY, J.T. Comparison of six Australian isolates of bovine herpesvirus 2 based on UL24 gene after a passage in MDBK cells. **Acta Virol.** 46: 175-178. 2002.
- [11] OBANDO, C.; HIDALGO, M.; AVILA, J.; CANDELO, N. Aislamiento de poxvirus durante el brote de una zoonosis en el estado Zulia, Venezuela. **Rev. Científ. FCV-LUZ.** IX (6): 17-22. 1999.
- [12] PLAZA, N.; BRACAMONTE, M.; MORALES, G.; OBANDO, C. Estudio epidemiológico de la fiebre aftosa en Venezuela. **Vet. Trop.** 28 (2): 135-153. 2003.
- [13] PLAZA, N.; MOLINA, M.; RIVAS, R. Informe Epidemiológico. Unidad de Epidemiología - CENIAP - INIA. 1-15 pp. 2006.
- [14] SCHWYZER, M.; ACKERMANN, M. Molecular virology of ruminant herpesviruses. **Vet. Microbiol.** 53: 17-29. 1996.
- [15] SMEE, D.F.; LEONHARDT, J.A. Vaccination against bovine herpes mammillitis virus infections in guinea pigs. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.** 14:133-150. 1994.