

## Primer aislamiento de herpesvirus bovino 1 subtipo 2 (BoHV-1.2) en Uruguay

Puentes, R.<sup>1</sup>; Alonzo, P.<sup>1</sup>; Benavídes, U.<sup>1</sup>; Silva, A.D.<sup>2</sup>; Esteves, P.A.<sup>3</sup>; Roehe, P.M.<sup>2,4</sup>; Maisonnave, J.<sup>1\*</sup>



### RESUMEN

El herpesvirus bovino 1 (BoHV-1) fue aislado por primera vez en el Uruguay en 1981 y en el año 1999 otro aislamiento fue caracterizado como BoHV-1.1. El objetivo de este trabajo fue la caracterización antigénica y molecular de dos nuevos aislamientos en el país (Uy2002 y Uy2004). La caracterización de estos aislamientos fue realizada por la técnica de inmunoperoxidasa con un panel de anticuerpos monoclonales y por herramientas moleculares como la reacción en cadena de polimerasa (PCR) y "restriction fragment length polymorphism" (RFLP). Los resultados revelaron que Uy2004 pertenece al subtipo BoHV-1.2<sub>a</sub>, mientras que Uy2002 pertenece a BoHV-1.2, no pudiéndose determinar si pertenece al subtipo "a" o "b" al compararlo con los patrones moleculares de las cepas de referencia. Esta es la primera notificación de un aislamiento y caracterización de BoHV-1.2 en el Uruguay. Se discute la posibilidad de que Uy2002 sea un aislamiento con características genómicas propias o un nuevo subtipo de BoHV-1.2.

**Palabras clave:** aislamiento, caracterización, herpesvirus bovino, BoHV-1.2

### SUMMARY

In Uruguay Bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) was first isolated in 1981 and another isolate was characterized as BoHV-1.1 in the year 1999. The aim of this work was to perform antigenic and molecular analysis of two new Uruguayan BoHV isolates (Uy2002 and Uy2004). Characterization of isolates was performed by immunoperoxidase with a panel of anti-BoHV monoclonal antibodies as well as by polymerase chain reaction (PCR) followed by a restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. Results revealed that isolate Uy2004 belongs to subtype 1.2<sub>a</sub>, whereas Uy2002 characterized as BoHV-1.2, could not be classified within any of the existing subtypes "a" or "b". This is the first report of the isolation and characterization of BoHV-1.2 subtype in Uruguay. The possibility of isolate Uy2002 having unique genomic characteristics or being a new BoHV-1.2 subtype is raised.

**Key words:** Isolation, characterization, Bovine herpesvirus, BoHV-1.2 subtype.

### INTRODUCCIÓN

Herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1), es el agente etiológico de la Rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR) y de la Vulvovaginitis/Balanopostitis pustular infecciosa (IPV/IPB). BoHV-1 es miembro de la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alphaherpesvirinae*, genero *Varicellovirus*. BoHV-1 es un virus envuelto, con genoma formado por una doble cadena de ADN de aproximadamente 136 kbp que codifica para aproximadamente 70 proteínas (4). Luego de la infección primaria, BoHV establece latencia en tejidos nerviosos, pudiendo ser reactivado y re-excretado posteriormente bajo condiciones de estrés tal como transporte, parto o tratamientos con corticoides (2). Basado en el análisis con enzimas de res-

tricción, BoHV-1 ha sido subdividido en tres subtipos: 1.1, 1.2<sub>a</sub> y 1.2<sub>b</sub> (4, 9, 11). Los subtipos BoHV-1.1 y BoHV-1.2<sub>a</sub> se han asociado a cuadros respiratorios, conjuntivitis, signos clínicos nerviosos, infertilidad y abortos. BoHV-1.2<sub>a</sub> también está asociado con enfermedad genital (IPV/IPB). Por otro lado, BoHV-1.2<sub>b</sub> además de estar relacionado con IPV/IPB puede también ocasionar abortos (4).

BoHV-1 tiene distribución mundial (1, 4), incluyendo países de la región como Argentina y Brasil (4, 9). En Uruguay, la seroprevalencia de BoHV-1 es de 36.6%, siendo positivos el 99.1% de los establecimientos ganaderos estudiados (10). Herpesvirus bovino fue aislado por primera vez en Uruguay en el año 1981 (13),

pero el aislamiento nunca fue caracterizado. Recién en el año 1999 se realizó otro aislamiento (Uy1999) que fue caracterizado como BoHV subtipo 1.1 (2). Los subtipos 1.2<sub>a</sub> y 1.2<sub>b</sub>, no habían sido descritos hasta ahora en el Uruguay. El objetivo de este trabajo fue caracterizar desde el punto de vista antigénico y molecular a los dos nuevos aislamientos uruguayos (Uy2002 y Uy2004).

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### Cultivos celulares y virus

La línea celular Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) fue usada para el aislamiento, multiplicación y titulación de los virus. Las mismas fueron mantenidas en Eagle's minimal essential medium

<sup>1</sup>Área de Inmunología. Facultad de Veterinaria – Universidad de la República – URUGUAY

<sup>2</sup>Instituto de Pesquisas Veterinarias Desidério Finamor (FEPAGRO) – Rio Grande do Sul – BRASIL.

<sup>3</sup>Embrapa Suínos e Aves – CNPSA, Brasil.

<sup>4</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias – BRASIL.

\* Autor de contacto: Facultad de Veterinaria, Lasplacas 1550, Montevideo, CP 11600, Uruguay. Tel: 598-2-6281303, Fax: 598-2-6280130, e-mail: jacmaiso2004@yahoo.com (J.Maisonnave).

Recibido: 10/3/07 Aprobado: 8/9/07

(MEM), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FCS, Nutricell), siguiendo los procedimientos estándares (12).

Las cepas de referencia usadas en el presente estudio fueron: Uy1999 (BoHV-1.1) aislada en Uruguay (2); EVI 123 (BoHV-1.1) y EVI 88 (BoHV-5), aisladas en Brasil (4).

Los nuevos aislamientos a caracterizar fueron: Uy2002, aislado en el año 2002 a partir de líquido seminal a los 9 días pos inmunodepresión experimental de un toro Hereford seropositivo para BoHV-1 y Uy2004, aislado en el año 2004 a partir de líquido seminal e hisopados prepuciales a los días 8-11 pos inmunodepresión experimental de un toro Limousin seropositivo para BoHV-1. Los cultivos con efecto citopático (ECP) característico de BoHV fueron confirmados por inmunofluorescencia utilizando un conjugado policlonal específico para BoHV-1 (VMRD, USA).

Los virus en estudio, de título  $\geq 10^{6.0}$  Dosis Infecciosa Cultivo Tisular (DICT) DICT<sub>50%</sub>/50 $\mu$ l (7) se propagaron en botellas tipo "roller" 850 cm<sup>2</sup> (Costar®) y se concentraron por centrifugación en un colchón de sacarosa al 25 % a 100.000 x g durante 2 horas. El "pellet" viral fue resuspendido en buffer TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA; pH 7.6) y almacenado a -80°C.

#### Extracción de ADN viral y Reacción en cadena de polimerasa (PCR)

Para la extracción de ADN, el pellet viral resuspendido en buffer TE fue tratado con 100  $\mu$ g de proteinasa K por 1h a 37 °C. Posteriormente se adicionaron 26  $\mu$ L de

NaCl 5M + 440  $\mu$ l de fenol durante 30 minutos a temperatura ambiente. La precipitación del ADN fue realizada con la adición de etanol absoluto a -20 °C. El pellet fue resuspendido en 50  $\mu$ l de buffer TE (pH 7.6) y almacenado a -20 °C.

Para confirmar que los aislamientos pertenecían a BoHV, se utilizó la técnica de PCR amplificando una región conservada de la glicoproteína C (gC) (3). Los "primers" utilizados fueron: 5'-CGCCGCCGAGTACTACCC-3' ("Forward") y 5'CGGC-CACGACGCTGACGA3' ("Reverse") que corresponden a un fragmento de 574/ 571 pb codificante para BoHV-1 y BoHV-5 respectivamente. Los productos de la PCR fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 1.5% durante dos horas a 40 V y teñidos posteriormente con bromuro de etidio.

#### RFLP de ADN viral

Para la técnica de RFLP, se utilizó la enzima *HindIII* para diferenciar los subtipos de BoHV-1 previamente descritos (4). El análisis de restricción fue realizado incubando a 37° C por 1 hora 80 – 100 ng de ADN viral con 1.5  $\mu$ l de la enzima *HindIII* (GIBCO®). Los fragmentos de ADN generados, fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 0.7%, durante 14 horas a 25 V y teñidos posteriormente con bromuro de etidio. Se utilizó *HindIII* como control marcador de corrida (New England Biolabs).

#### Ensayo de Inmunoperoxidasa con anticuerpos monoclonales (IPMA)

La IPMA fue utilizada para diferenciar entre los subtipos de BoHV-1.1,

BoHV-1.2 y BoHV-5 (6). Se usaron cinco anticuerpos monoclonales (Mabs) contra BoHV-1: anti-gD (Mab 40), anti-gE (Mab 51) y anti-gC (Mab 71 y Mab 77) fueron gentilmente cedidos por el Animal Health Institute (Lelystad, The Netherlands). El quinto Mab (Mab 2F9) utilizado (anti-BoHV-5) fue gentilmente cedido por el Dr. E. Flores, UFSM, RS-Brasil (8). El anticuerpo secundario utilizado fue un anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (DAKO®).

#### RESULTADOS

Las células infectadas con cada uno de los aislamientos mostraron ECP característico de herpesvirus, lo cual fue confirmado por inmunofluorescencia con un conjugado policlonal específico para BoHV-1.

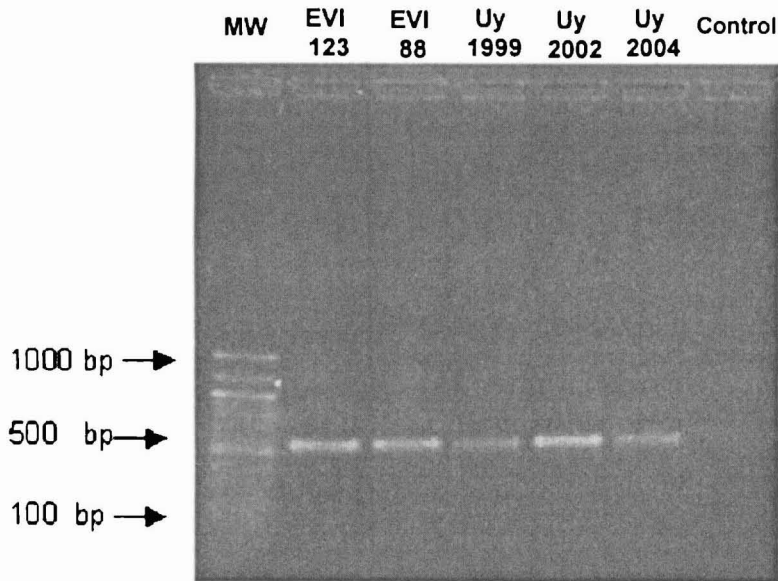
El patrón de reconocimiento obtenido con la utilización del panel de anticuerpos monoclonales se resume en el cuadro 1. Los Mabs 40 y 51 (anti-BoHV-1) reaccionaron con ambos aislamientos y las cepas de referencia BoHV-1.1. El Mab 71 (específico para BoHV-1.1), reaccionó con las cepas de referencia BoHV-1.1, pero no reaccionó con ninguno de los dos aislamientos en caracterización. El Mab 77 reconoció el aislamiento Uy2002, pero no reconoció el aislamiento Uy2004. Finalmente el Mab 2F9 (anti-BoHV-5) reaccionó solamente con la cepa de referencia BoHV-5 (EVI 88).

La técnica de PCR logró la amplificación de un fragmento de aproximadamente 500bp en ambos aislamientos (Uy2002 y Uy2004) y cepas de referencia (EVI 123 y EVI 88) (Fig. 1).

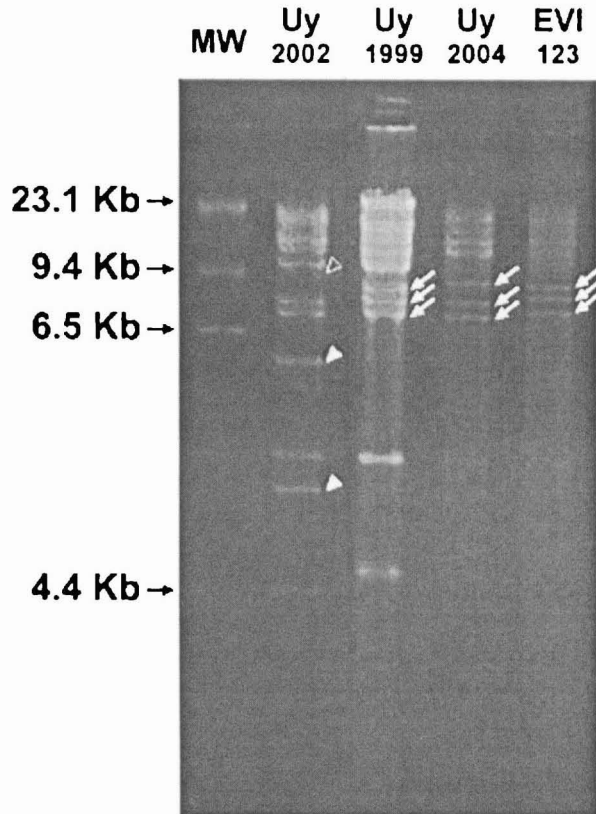
**Cuadro 1.** Reactividad de los anticuerpos monoclonales frente a los aislamientos y las cepas de referencia.

Mabs	Cepa de referencia			Aislamiento	
	Uy1999	EVI 123	EVI 88	Uy2002	Uy2004
40(anti-gD)*	+	+	+	+	+
51 (anti-gE) *	+	+	+	+	+
71 (anti-gC) *	+	+	-	-	-
77 (anti-gC) *	+	+	-	+	-
2F9 (anti-BoHV-5)	-	-	+	-	-
<b>Subtipo de BoHV</b>	<b>1.1</b>	<b>1.1</b>	<b>5.a</b>	<b>1.2</b>	<b>1.2</b>

\*Anti- BoHV-1 Mab; (+) Reacción positiva; (-) Reacción negativa.



**Figura 1.** PCR: Amplificación de una porción de la glicoproteína C de BoHV (574/571pb para BoHV-1 y para BoHV-5 respectivamente). MW: marcador de peso molecular 100 bp, EVI 123: Cepa de referencia BoHV-1.1 aislada en Brasil, EVI 88: Cepa de referencia BoHV-5 aislada en Brasil, Uy1999: Cepa de referencia BoHV-1.1 aislada en Uruguay, Uy2002: aislamiento año 2002, Uy2004: aislamiento año 2004 y control: negativo



**Figura 2.** RFLP de los aislamientos y cepas de referencia de BoHV-1 utilizando la enzima *HindIII*: Gel de agarosa al 0.7% teñido con bromuro de etidio. MW: Marcador de peso molecular  $\lambda$  *HindIII*, Uy2002: aislamiento año 2002, Uy1999: Cepa de referencia BoHV-1.1 aislada en Uruguay, Uy2004: aislamiento año 2004 y EVI 123: Cepa de referencia BoHV-1.1 aislada en Brasil. Las cabezas de flechas llenas indican las dos bandas extras y la cabeza de flecha hueca indica la banda faltante existente en los patrones de banda de las cepas de referencia BoHV-1.2. Las flechas blancas indican las bandas características de BoHV-1.1 y BoHV-1.2.

El análisis con enzima de restricción (RFLP) mostró para Uy 2004 un patrón similar a los encontrados en cepas de referencia BoHV-1.2<sub>a</sub> (4). El aislamiento Uy2002 mostró un patrón diferente a cualquiera de los subtipos de BoHV-1 conocidos descriptos (1.1, 1.2<sub>a</sub> y 1.2<sub>b</sub>) (Fig. 2).

## DISCUSIÓN

Los resultados con el panel de anticuerpos monoclonales, nos permitió diferenciar entre BoHV-1.1 y BoHV-1.2 (4, 11). En el presente estudio, el Mab 40 (anti gD) y Mab 51 (anti-gE) fueron incluidos ya que estas glicoproteínas son proteínas de envoltura altamente conservadas en BoHV, lo que permitiría reaccionar con todos los tipos de BoHV descriptos (11). El Mab 71 (específico para BoHV-1.1) no reconoció ninguno de los aislamientos, lo que sugiere que ambos pertenecen al subtipo 1.2 de BoHV (BoHV-1.2). Esta capacidad del Mab 71<sub>a</sub> de distinción entre BoHV-1.1 y BoHV-1.2, se debe a una pequeña variación entre la secuencia de 75-80 de aminoácidos de la gC entre ambos subtipos (11). El Mab 77, reconoció al aislamiento Uy2002 siendo negativo para Uy2004. Por lo tanto este monoclonal reconoció de manera diferente a los dos aislamientos (ambos BoHV-1.2). Esto coincide con lo expuesto por Rijsewijk y col. (1999) (11), quienes mencionan que el Mab 77 no reconoce algunas cepas de BoHV-1.2. Aunque hasta el momento BoHV-5 no ha sido aislado en Uruguay, pero si en países de la región (4 y 9), nosotros incluimos el Mab 2F9 para detectar este tipo de BoHV. La posibilidad que Uy2002 o Uy2004 fuera BoHV-5, fue descartada

con la utilización de este monoclonal, que reconoció una región específica de la gC de BoHV-5 (8) solo en la cepa de referencia BoHV-5 (EVI 88) y no reaccionó con ningún de los aislamientos o cepas BoHV-1 de referencia utilizadas en el presente estudio. Los resultados utilizando anticuerpos monoclonales, fueron corroborados con la utilización de ensayos con enzima de restricción.

El patrón de digestión del ADN del aislamiento Uy2004 con *HindIII*, correspondió con el de cepas de BoHV-1.2.

El patrón de restricción del aislamiento Uy2002 no fue definido, sin embargo la migración de las bandas es similar a BoHV-1.2, por lo cual se realizarán otros ensayos para esclarecer la clasificación. De hecho otros trabajos con BoHV, han descrito aislamientos con un patrón de digestión con enzimas diferentes a los de las cepas de referencia (BoHV-5<sub>a</sub> o BoHV-5<sub>b</sub>) (4). Aunque los herpesvirus son virus de ADN caracterizados por un bajo rango de sustituciones nucleotídicas (3 x 10<sup>-8</sup> por sitio por año), otros mecanismos como recombinaciones moleculares (intramolecular, intraespecífica e interespecífica) pueden

ocurrir con estos virus, produciendo importantes cambios moleculares y variación en su virulencia. También la posibilidad de que ocurran superinfecciones tanto *in vivo* como *in vitro* entre diferentes BoHV-1, pueden generar nuevos subtipos (14). Nosotros pudimos detectar en Uruguay este fenómeno de superinfección natural en un toro con dos subtipos diferentes de BoHV (BoHV-1.1 y BoHV-1.2) (datos no publicados). Este tipo de acontecimientos, podría ser una de las explicaciones de que el aislamiento Uy2002 fuera una nueva estirpe originada a partir de una recombinación en un animal superinfectado. Para poder esclarecer este hallazgo, es necesario realizar más estudios utilizando otras enzimas de restricción, así como otras herramientas moleculares. En base a esto, en otro experimento, nosotros realizamos análisis filogenético de los mismos fragmentos amplificados por PCR obtenidos en este trabajo, tanto del genoma de Uy2004 (Genbank accession number DQ173732) como de Uy2002 (Genbank accession number DQ173731), que sugiere que Uy2002 podría no pertenecer a ningún de los subtipos de BoHV-1.2

existentes (5). Por lo tanto, podría ser que este aislamiento (Uy2002) sea un virus con características genómicas propias como por ejemplo un nuevo subtipo de BoHV-1.2 aún no descrito en la literatura.

## CONCLUSIONES

Se describe por primera vez en Uruguay la presencia de herpesvirus 1.2 (BoHV-1.2).

El aislamiento Uy2004 fue caracterizado como BoHV-1.2, por anticuerpos monoclonales y ensayo con enzima de restricción.

El aislamiento Uy2002 fue caracterizado como BoHV-1.2, pero no pudo ser clasificado dentro del subtipo en "a" o "b" con la enzima de restricción utilizada.

Se plantea el posible hallazgo de un aislamiento de herpesvirus bovino con características genómicas propias.

## Agradecimientos

Esta investigación fue parcialmente financiada por el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), proyecto LIA 014.

## Referencias Bibliográficas

1. Ackermann, M.; Engels, M. (2006). Pro and contra IBR-eradication. *Vet Microbiol* 113, 293-302.
2. Alonzo, P.; Benavides, U.; Isnardi, F.; Puentes, R.; Carol, H.; Clavijo, A.; del Campo, R.; Bonnevaux, J.; Weiblen, R.; Fondevila, N.; Romera, S.; Sadir, A.; Maisonnave, J. (2002). Caracterización de un herpesvirus 1.1 (HVB-1.1), aislado de un bovino con signos nerviosos y sin respuesta inmune humoral específica. *Veterinaria (Montevideo)* 37, 15-22.
3. Claus, M.P.; Alfieri, A.F.; Folgueras-Flatschart, A.V.; Wosiacki, S.R.; Medici, K.C.; Alfieri, A.A. (2005). Rapid detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 glycoprotein C gene in clinical specimens by multiplex-PCR. *J Virol Methods* 128, 183-188.
4. D'Arce, R.C.; Almeida, R.S.; Silva, T.C.; Franco, A.C.; Spilki, F.; Roehle, P.M.; Arns, C.W. (2002). Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesviruses types 1 and 5. *Vet Microbiol* 88, 315-324.
5. Esteves, P.A.; Dellagostin, O.A.; Pinto, L.S.; Silva, A.D.; Spilki, F.R.; Ciacci-Zanella, J.R.; Hübner, O.; Puentes, R.; Maisonnave, J.; Franco, A.C.; Rijsewijk, F.A.M.; Batista, H.B.C.R.; Teixeira, T.F.; Dezen, D.; Oliveira, A.P.; David, C.; Arns, C.W.; Roehle, P.M. (2007). Phylogenetic comparison of the carboxy-terminal region of glycoprotein C (gC) of bovine herpesviruses (BoHV) 1.1, 1.2 and 5 from South America. (SA). *Virus Res.* 2007 Sep 22; [Epub ahead of print].
6. Kramps, J.A.; Perrin, B.; Edwards, S.; van Oirschot, J.T. (1996). A European inter-laboratory trial to evaluate the reliability of serological diagnosis of bovine herpesvirus 1 infections. *Vet Microbiol* 53, 153-161.
7. Lorenz, R.; Bogel, K. (1973). Laboratory techniques in rabies: methods of calculation. *Monogr Ser World Health Organ.* (23): 321-35.
8. Oldoni, I.; Weiblen, R.; Inkelmann, M.A.; Flores, E.F. (2004). Production and characterization of monoclonal antibodies to a Brazilian bovine herpesvirus type 5. *Braz J Med Biol Res* 37, 213-221.
9. Pidone, C.L.; Galosi, C.M.; Echeverría, M.G.; Nosetto, E.O.; Etcheverría, M.E. (1999). Restriction endonuclease analysis of BHV-1 and BHV-5 strains isolated in Argentina. *Zentralbl Veterinarmed B* 46, 453-456.

- 
10. Repiso, M.V.; Gil, A.; Bañales, P.; D' Anatro, N.; Fernandez, L.; Guarino, H.; Herrera, B.; Núñez, A.; Olivera, M.; Osawa, T.; Silva, M. (2005). Prevalencia de las principales enfermedades infecciosas que afectan el comportamiento reproductivo en la ganadería de carne y caracterización de los establecimientos de cría del Uruguay. *Veterinaria* (Montevideo) 40, 5-28.
11. Rijsewijk, F.A.M.; Kaashoek, M.J.; Langeveld, J.P.M.; Meloen, R.; Judek, J.; Bienkowska-Szewczyk, K.; Maris-Veldhuis, M.A.; van Oirschot, J.T. (1999). Epitopes on glycoprotein C of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) that allow differentiation between BHV-1.1 and BHV-1.2 strains. *J. Gen. Virol.* 80, 1477-1483.
12. Roehle, P.; Silva, T.; Nardi, N.; Oliveira, D.; Rosa, J. (1997). Diferenciação entre o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (BHV-1) e o herpesvirus da encefalite bovina (BHV-5). *Pesquisa Veterinária Brasileira* 17, 41-44.
13. Saizar, J. (1997). Determinación de la prevalencia de la Rinotraqueítis Bovina Infecciosa - IBR en rodeos de leche y carne en Uruguay. *Veterinaria* (Montevideo) 133, 4-7.
14. Thiry, E.; Muylkens, B.; Meurens, F.; Gogev, S.; Thiry, J.; Vanderplasschen, A.; Schynts, F. (2006). Recombination in the alphaherpesvirus bovine herpesvirus 1. *Vet Microbiol* 113, 171-177.