

## Caracterización de un herpesvirus, aislado de un ternero, con signos nerviosos y sin respuesta inmune humoral específica

Alonzo, P.<sup>1</sup>; Benavides, U.<sup>1</sup>; Isnardi, F.<sup>1</sup>; Puentes, R.<sup>1</sup>; Carol, H.<sup>1</sup>; Clavijo, A.<sup>1</sup>; del Campo, R.<sup>2</sup>; Bonnevaux, J.<sup>3</sup>; Weiblen, R.<sup>4</sup>; Fondevila, N.<sup>5</sup>; Romera, S.A.<sup>5</sup>; Sadir, A.M.<sup>5</sup>; Maisonnave, J.<sup>1</sup>

### RESUMEN

Se caracteriza como Herpesvirus bovino (HVB)1.1, un aislamiento viral, realizado de un ternero de nueve meses de edad con signos neurológicos, corrimiento ocular y nasal unilateral. Muestras de hisopados nasal, ocular y prepucial, se inocularon en cultivos de la línea celular de riñón bovino, Madin Darby Bovine Kidney. Los inóculos de los tres primeros días post inicio de signos clínicos, produjeron efecto citopático característico de HVB. El aislamiento (Uy-1999) fue identificado como herpesvirus por inmunofluorescencia directa y caracterizado mediante enzimas de restricción, reacción en cadena de polimerasa e inmunohistoquímica. Aunque la cepa Uy-1999 es inmunogénica para otros bovinos, el animal del cual se aisló el HVB, nunca produjo anticuerpos específicos anti-HVB, pero sí contra otros patógenos, como el virus de diarrea viral bovina. Los resultados obtenidos hasta el momento, sugieren que la falta de respuesta inmune humoral no es debida a una variación antigénica del aislamiento. Los métodos diagnósticos en que se basan las campañas de control, deberían ser re-evaluados, si la existencia de bovinos latentemente infectados con HVB-1, y sin anticuerpos específicos detectables, no es un hecho aislado.

**Palabras clave:** herpesvirus bovino, aislamiento, caracterización

### SUMMARY

An herpesvirus, isolated from a nine month old calf, with neurological clinical signs, unilateral ocular and nasal discharge, was characterized as Bovine Herpes Virus-1.1 (BHV-1.1). Nasal, ocular and prepucial swabs, were collected and supernatants were inoculated in Madin Darby Bovine Kidney cells. Only the nasal and ocular inoculates from the first three days after clinical signs appeared, produced herpesvirus characteristic cytopathic effect. The isolate (Uy-1999) was identified as herpesvirus by direct immunofluorescence, characterized by restriction enzyme genomic profile, polymerase chain reaction and immunohistochemistry. Even though the isolate Uy-1999 is immunogenic for other bovines, the animal from which the isolation was made, never produced BHV specific antibodies, while it did to other pathogens as bovine viral diarrhoea virus. The results obtained up to now, suggest that the lack of humoral immune response, is not due to an antigenic variation of the isolate. If the existence of BHV-1 latently infected bovines, is not an isolated issue, the tests used in the control campaigns should be reviewed.

**Keywords:** bovine herpesvirus, field isolate, characterization

### INTRODUCCIÓN

El Herpesvirus bovino tipo-1 (HVB-1), pertenece a la familia *Herpesviridae* (43, 48), subfamilia *alphaherpesvirinae*, género varicellovirus (6). Puede causar Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR), Vulvovaginitis Pustular Infecciosa (IPV), Balanopostitis Pustular Infecciosa (IPB), conjuntivitis, abortos, infección generalizada en el neonato y meningoencefalitis (20, 43, 48). Es una enfermedad contagiosa de distribución mundial (43).

El análisis de HVB-1, basado en el patrón de digestión por enzimas de restricción, permite identificar 3 subtipos (HVB1.1; HVB1.2a; HVB1.2b). La enzima *HindIII*, corta el ADN y da patro-

nes de bandas que diferencian los subtipos de HVB-1 (12, 25, 28). Los anticuerpos monoclonales pueden ser utilizados también, para reconocer subtipos de HVB-1 (26).

Los subtipos HVB-1.1 y HVB-1.2a se asocian a la forma respiratoria de la enfermedad (IBR) y clínicamente pueden cursar con síntomas respiratorios, conjuntivitis, signos clínicos nerviosos, infertilidad y abortos (46). El subtipo HVB-1.1 puede causar abortos 30 a 60 días post signos respiratorios (10, 11). Si bien es una enfermedad en la cual, no se ha observado una alta mortalidad, 3% en ganado lechero, su importancia radica en las pérdidas económicas debidas a

abortos, pérdidas de neonatos, pérdida del estado general, y caída de la producción lechera, dando lugar en algunos casos a complicaciones por infecciones bacterianas secundarias (27). El HVB-1.2b, esta asociado a enfermedad genital (IPV/IPB) y no causa abortos (11, 45).

Otro HVB que se disemina rápidamente al SNC y que fue clasificada como tipo 5, ocasiona meningoencefalitis severa, fue aislada en Australia, Argentina, Brazil y USA (14).

El genoma de HVB-1 esta compuesto por 136 kilobases (Kb) y posee al menos 10 genes con potencial para codificar glicoproteínas. Por su localización en la superficie del virión, estas glicoproteínas

<sup>1</sup>Facultad de Veterinaria, Dpto.de Ciencias Microbiológicas, Area Inmunología, Lasplacas 1550, Montevideo, C.P. 11600, Uruguay. Tel: (598) (2) 6281303, Fax: (598) (2) 6280130, E-mail: jacmaiso@adinet.com.uy

<sup>2</sup>Instituto de Investigaciones Biológicas "Clemente Estable", 3Transgenes, 4Universidad Federal de Santa María, R.S. Brasil, 5INTA Castelar, Argentina.

son importantes blancos del sistema inmune del hospedador y tienen un rol fundamental en la patogenicidad, por mediar la entrada, fusión y dispersión del virus célula-célula. Las más estudiadas por la importancia en estos eventos son gB, gC y gD, pero actualmente otras glicoproteínas, enzimas y proteínas reguladoras, son incluidas en el repertorio del HVB (3, 41).

Luego de la infección primaria el HVB se hace latente en ganglios nerviosos de la puerta de entrada, (19, 30, 33) y puede ser re-activado y re-excretado cuando el portador se encuentra bajo condiciones de estrés o mediante inmunodepresión con corticoides (34, 47). La latencia se define como una infección persistente en el organismo, donde el genoma viral está presente en ausencia de virus infeccioso (20). El HVB-1 reactivado es usualmente excretado por la vía de infección primaria, dado que ésta determina el lugar de latencia. Pero hay veces en que la infección primaria intra nasal va seguida de una infección generalizada, en cuyo caso se puede instalar latencia en otros ganglios nerviosos y el virus puede ser re-excretado por semen (45). Cuando hay re-activación viral, la inmunidad humoral específica, ejerce control de la viremia, evitando la re-excreción y diseminación del virus (20). Los anticuerpos (Acs) normalmente son detectables 7 a 10 días post-infección. Los isotipos de inmunoglobulinas M (IgM) y G (IgG), llegan a su título máximo a los 14 y 35 días post-infección respectivamente (17). Sin embargo la infección con HVB-1 vía genital, puede inducir respuesta inmune humoral débil, o puede no inducir respuesta inmune detectable (45). La diseminación del HVB-1 a la mayoría de los animales de un rodeo es el resultado de una infección respiratoria, la diseminación es limitada en casos de infección genital. Durante la infección primaria aguda el virus se excreta en secreciones nasales durante un período de 4 a 17 días, los títulos más altos son 4 a 6 días post infección. Animales que excretan el virus por la mucosa nasal lo transmiten por contacto directo y por gotitas en aerosol a una distancia corta (8 metros). Animales que excretan HVB-1.2b (virus de vulvo vaginitis pustular infecciosa y balanopostitis) por vagina

o prepucio, lo transmiten menos eficientemente, y un menor número de animales se infecta. La dosis infectante necesaria para infectar un animal ha sido poco documentada y dependerá de la virulencia de la cepa (46).

El HVB ha sido detectado en Uruguay, clínica y epidemiológicamente desde 1970. Fue aislado por primera vez en 1981, de un animal seropositivo, inmunodeprimido con corticoides (16). En 1987, se describió un caso de granuloma nasal bovino en ganado Jersey, con alta morbilidad, oportunidad en que se logró el aislamiento de HVB-1 de hisopados nasales (31). Se ha descrito que en el 70% de los tumores de ojo se aísla HVB-1 (42). En Uruguay existe un 75-100% de establecimientos con presencia de anticuerpos a HVB y la prevalencia a nivel nacional es de 45% en ganado de carne y 48% en ganado de leche (38).

Con respecto al control de la enfermedad, se han descrito varios métodos, según la prevalencia de infección. En lugares de muy baja prevalencia se puede emprender la erradicación, eliminando los animales seropositivos. Donde la prevalencia es alta, esta medida es poco viable y la vacunación es la indicada para estimular la inmunidad específica e impedir la re-excreción viral. La vacunación no impide la infección pero si la sintomatología (20). En un rodeo con un alto porcentaje de animales seropositivos, las hembras adultas multiparas muy probablemente ya hayan sido infectadas y su sistema inmune evitará que aborte una segunda vez a causa de HVB-1. Por lo tanto, teniendo en cuenta el costo-beneficio de vacunar para evitar síntomas, abortos por ejemplo, sería conveniente vacunar únicamente las vaquillonas antes del primer entore (Dr. E. Dubovi, comunicación personal).

Las vacunas utilizadas en Uruguay son mayormente fabricadas con cepas de HVB de referencia. Si los aislamientos realizados en el país son caracterizados, habría posibilidad de incluir en las vacunas cepas nacionales. Así como tener un stock de cepas actuantes en el país y la región.

La inmunotolerancia no se ha descrito para el HVB, pero sí para otros virus como el de Diarrea Viral Bovina (BVDV). Embriones bovinos infectados con virus

no citopático de BVDV in útero, antes que su sistema inmune este desarrollado, reconocen como propio al virus, y no producen anticuerpos específicos, y quedan persistentemente infectados (PI). Estos terneros son la fuente de infección en un rodeo y por lo general tienen menor desarrollo corporal y pelo hirsuto (2, 9).

El propósito del presente trabajo es identificar y caracterizar una cepa de HVB aislada a partir de un ternero de 9 meses de edad, con sintomatología nerviosa y menor desarrollo corporal que los bovinos de la misma categoría. Este ternero se recuperó rápidamente a pesar de que nunca produjo anticuerpos anti-HVB y pasó a ser un toro adulto saludable y con aptitudes reproductivas normales.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Aislamiento viral

Se obtienen hisopados oculares, nasales y prepuciales durante 7 días post inicio de signos clínicos (21 muestras), de un ternero Limousin con nueve meses de edad, menor desarrollo corporal que los bovinos de su misma categoría, pelo hirsuto, corrimiento ocular y nasal seroso unilateral, y ataxia. Los hisopados, se inocularon en cultivos de células de riñón bovino, línea celular Madin Darby Bovine Kidney (MDBK), mantenidos en medio Eagle modificado (MEM), 50 g/mL de gentamicina y 10% de suero fetal bovino (GIBCO) irradiado. A los 4 días post-inoculación, el cultivo que no muestra efecto citopático (CPE), se congela, descongela y centrifuga a 400g por 15 minutos, para luego inocular el sobrenadante en una monocapa de células virgen. Este procedimiento se repite 3 veces (3 pases ciegos), para dar como negativa una muestra (7).

### 2. Identificación y caracterización viral

**a. Identificación viral con anticuerpos específicos.** Las células con CPE característico de herpesvirus, fueron fijadas con acetona e incubadas 1 hora a 37°C con anticuerpo policlonal anti-HVB conjugado con isotiocianato de fluoresceína FITC (VMRD, USA), y observadas al microscopio de luz ultravioleta (UV) (7, 24).

Para cuantificación mediante citofluorometría (40), las células infectadas que muestran CPE y los controles negativos se resuspendieron por tratamiento con tripsina y se incubaron con el mismo conjugado policlonal FICT por 2 hs. a 4°C en PBS 0.1% azida, lavadas por centrifugación dos veces y analizadas mediante un citómetro de flujo (FAC Scan, Becton Dickinson). Se definieron regiones en cuadrantes, los límites fueron fijados en 197 para el valor de luz dispersada a 180 grados (Forward Scattered Heigth=FSC-H) y 189 para el valor de intensidad de FICT (FL-1). Los eventos en la región superior derecha fueron considerados positivos y se registraron los porcentajes de células positivas en 10.000 eventos (40). Para ambas técnicas, se utilizan, como control positivo células infectadas con HVB-1 de referencia cepa Los Angeles (LA), y como control negativo células sin inocular.

**b. Inmunohistoquímica.** Células infectadas con el aislamiento (Uy-1999), se incuban 1 hora a 37°C con anticuerpos monoclonales (Mab) anti-HVB-1.1 (Mab60), y anti-HVB-5 (Mab2915). Luego de tres lavados se agrega conjugado a peroxidasa anti-inmunoglobulina de ratón, se incuba 1 hora a 37°C, se lava y se revela con sustrato Di-amino bencidina (DAB) (26).

**c. Estudios moleculares.** La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) Multiplex (1), se utilizó para diferenciar ADN de HVB-1 y HVB-5 en una sola reacción. La extracción de ADN se realizó mezclando, 250 µL de sobrenadante de células infectadas con: Uy-1999, HVB-1.1 (LA), y HVB-5 (663), con igual volumen de solución tampón de extracción (Tris 10mM, disodium EDTA 1mM, 0,5% SDS, Proteinasa K 1,6U/mL, pH 8). La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos y se adicionó 500 µL de (25 fenol): 24 Cloroformo: 1 alcohol isoamílico). Luego de centrifugar a 16.000g por 2 minutos, el sobrenadante se somete a otra extracción con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y centrifuga nuevamente. La precipitación del ADN se realiza con 1 mL de etanol absoluto, y 100 µL de NaCl 3M pH 5,2, centrifugando a 16.000g por 30 minutos. El pellet se lava con 1 mL de etanol 70%, se seca y resus-

pende en 10µL de agua bi-destilada, almacenándose a -20°C hasta su uso. En cada extracción, se utilizan como controles positivos cepas de referencia de HVB-1.1 y HVB-5 y sobrenadante de células sin inocular como control negativo.

El ADN y los primers (TK1, TK2, GD1, GD2) se incubaron a 99°C (comienzo caliente) por 10 minutos y luego a 88°C cuando los demás reactivos se adicionaron: (buffer Taq polimerasa, glicerol, Cl2Mg, dNTP, Taq polimerasa). Se realizaron 35 ciclos de 1 minuto a 95°C (desnaturalización), 1 minuto a 61°C (hibridación) y 1 minuto a 72°C (síntesis), finalmente 5 minutos a 72°C. El producto amplificado se analizó por electroforesis en gel de agarosa horizontal 1,8 % (100V, 30 minutos) en solución tampón con bromuro de etidio y visualizado en un transiluminador de UV.

Para la caracterización genómica del virus, se realizó análisis del ADN viral con enzimas de restricción (HindIII) (25, 28). Cuando células infectadas con Uy-1999 y cepas de referencia HVB1.1 y HVB-5 mostraban 50% de CPE, se lisaron con 0,2 mL de Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) al 10%. El ADN celular fue precipitado con 0,5 mL de NaCl 5M, y el pellet se descartó luego de la centrifugación. El ADN viral presente en el sobrenadante, fue incubado con proteinasa K 20µg/mL, durante 2 horas a 37°C. Las proteínas fueron removidas mediante extracción con fenol:cloroformo y eter etílico saturado en agua, y el ADN precipitado con isopropanol durante 1 hora a -70°C. El pellet de ADN viral fue resuspendido en 50µL de Tris-HCl 10mM, pH 8, EDTA 1mM (TE), y el corte con HindIII se realiza, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Biolabs). Los fragmentos obtenidos, se separan por electroforesis en geles de agarosa 0,7%, en solución tampón Tris-Acetato-EDTA (TAE), a voltaje (30V) constante durante 5 horas. Se tiñen con bromuro de etidio y las bandas se visualizan con un transiluminador de UV (25, 28).

#### **d. Identificación de la glicoproteína C (gC) en la cepa Uy-1999.**

Las proteínas virales se separan en geles de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE), y se transfieren a una membrana inmunolon P (Millipore). El bloqueo se reali-

za con una solución 5% leche e soja en PBS-tween 20, y se lava 3 veces con PBS-Tween 0,05% agitando. Se incubó durante 1 hora a 37°C con anticuerpo monoclonal anti-gC (Dr. L. Babiuk, VIDO, Saskatoon, Canada), se lava 3 veces, y se incubó en agitación durante 1 hora a 37°C con conjugado a peroxidasa anti-ratón. Luego de 3 lavados se revela con el kit Renaissance, según indicaciones del fabricante (NEN Life Science). (3, 18).

### **3. Respuesta Inmune Humoral**

**a. Serología.** Se obtienen muestras de suero del ternero Limousin, durante los primeros 7 días post inicio de signos clínicos, cada 15 días durante 5 meses y cada 6 meses hasta la actualidad. Las muestras se estudian para detectar anticuerpos (Acs) específicos anti-HVB, mediante ELISA (HIPRA-España). La presencia de anticuerpos neutralizantes se determina, mediante la técnica de seroneutralización *in vitro* (SN), en placas de 96 hoyos. Las muestras de suero se incuban 1 hora a 37°C con 100 unidades infectantes de la cepa LA título 10<sup>6.7</sup> dosis infectante de cultivo de tejido 50% (DICT<sub>50</sub>) /50 µL. Luego se agregan 20.000 células/hoyo y se incuban 72 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. El título se expresa como el logaritmo de la inversa de la última dilución que protege el desafío de 100 DICT<sub>50</sub> (29).

La presencia de anticuerpos anti-virus de Diarrea Viral Bovina (BVDV) se determina mediante SN, utilizando para desafío 100 UI de la cepa de referencia Singer (título 10<sup>5.5</sup> DICT<sub>50</sub>/50 µL) (32) y ELISA (HIPRA-España). Anticuerpos anti-virus de Leucosis Bovina (BLV) fueron evaluados mediante inmunodifusión en gel de agar (AGID).

La técnica de microaislamiento viral (39) se utiliza para detectar virus de BVDV en las muestras de suero antedichas.

Se realiza un muestreo serológico estratificado por categorías, del 10% del rodeo al cual pertenecía el ternero Limousin (n=130). Muestreándose 28 ternero/as 9 a 12 meses de edad, 15 bovinos entre 1 y 1 año y medio, 32 de 1 año y medio a 3 años y 55 bovinos adultos. Los sueros se procesan para la detección de anticuerpos neutralizantes de HVB, por la técnica de SN *in vitro* (29).

**b. Estudios de inmunogenicidad de la cepa Uy-1999.** Se formula una vacuna inactivada utilizando Uy-1999 (35, 36) con adyuvante formulado por INTA (Arlacel C, Markol 52 y Tween 80) (37). Se inmunizaron por vía intramuscular dos bovinos Holstein de 10 meses de edad (seronegativos para HVB-1 por SN y ELISA). Muestras de suero para detectar anticuerpos anti-HVB fueron obtenidas 17 y 25 días post vacunación (dpv). Los anticuerpos totales se cuantifican mediante el test de ELISA, y se expresan como el logaritmo de la inversa de la máxima dilución del suero, cuya densidad óptica (DO) es igual o mayor al 40% de la DO del control positivo (35). Los anticuerpos neutralizantes se titulan por SN (29).

## RESULTADOS

Se logró el aislamiento de un HVB a partir de hisopados nasales y oculares obtenidos en los tres primeros días post inicio de signos clínicos (Cuadro 1). Los cultivos de células MDBK inoculados con estas muestras, presentaron CPE característico de HVB (células redondeadas en racimos).

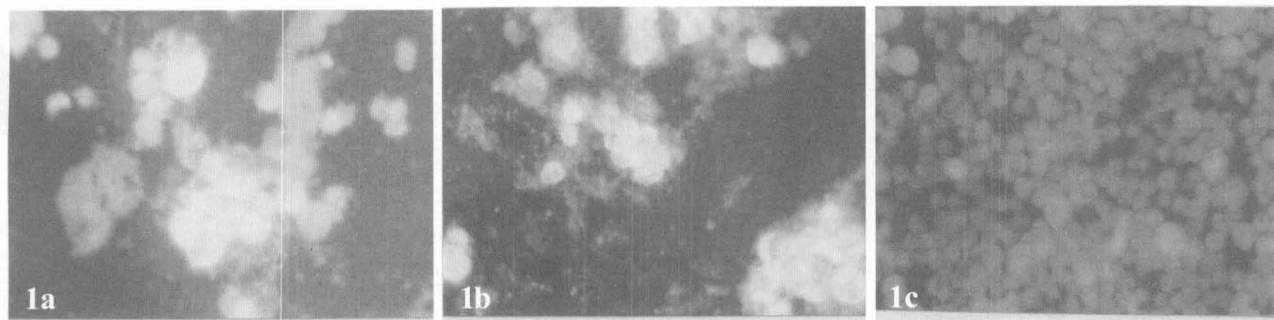
El virus fue identificado como HVB, observándose fluorescencia específica intracitoplasmática de las células inoculadas con el aislamiento Uy-1999 (Fig. 1). Los estudios de citofluorometría confirman este resultado, dado que células inoculadas con Uy-1999 y con cepa de referencia HVB-1 (LA), presentaron 26% y 29% de eventos positivos respectivamente,

mientras que células no inoculadas presentaron menos de 2,5%.

La técnica de PCR Multiplex amplifica un segmento de 183 pares de bases (pb) del ADN Uy-1999, al igual que en la cepa de referencia HVB-1.1 (LA) (Fig. 2).

Luego del corte con la enzima HindIII, el ADN Uy-1999 presenta el siguiente patrón de bandas: 6 bandas entre 23.1 y 9.4 kb, 3 bandas entre 9.4 y 6.5 kb y 2 bandas alrededor de 4.4 kb, que corresponde al patrón de HVB-1.1.

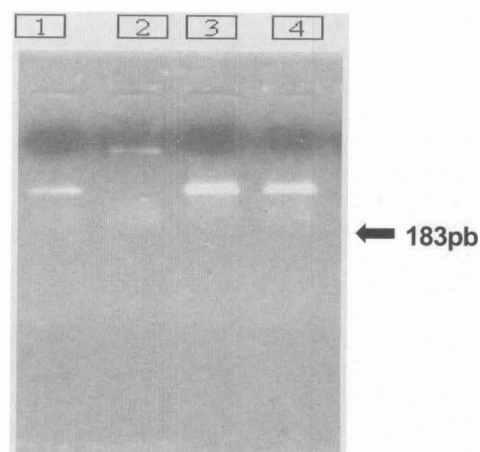
Células MDBK infectadas con Uy-1999, e incubadas con el monoclonal Mab60 anti-HVB-1.1, dan coloración positiva, comparado con la no coloración al utilizar Mab2915, específico de HVB-5 (fig. 3).



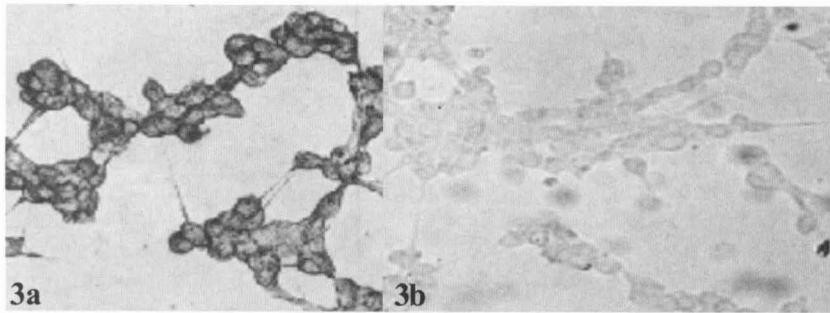
**Figura 1.** Identificación de HVB por Inmunofluorescencia directa: Células MDBK inoculadas con: aislamiento Uy-1999 (1<sub>a</sub>), cepa de referencia HVB-1 LA (control positivo) (1<sub>b</sub>), células MDBK no inoculadas (control negativo) (1<sub>c</sub>).

**Cuadro 1.** Resultados de aislamiento en cultivos celulares de la línea celular MDBK

Días (post inicio de síntomas)	Hisopos		
	Nasales	Oculares	Prepuciales
1	+	+	-
2	+	+	-
3	+	+	-
4	-	-	-
5	-	-	-
6	-	-	-
7	-	-	-



**Figura 2.** PCR Multiplex: Carril 1: control positivo = HVB-1 de referencia (LA), Carril 2: control negativo = HVB-5 de referencia (663), Carril 3 y 4: aislamiento Uy-1999.



**Figura 3.** Inmunohistoquímica en células MDBK infectadas con aislamiento Uy-1999: 3<sub>a</sub> = Anticuerpo monoclonal (Mab) anti-BHV-1.1 (Mab 60), 3<sub>b</sub> = Mab anti-BHV-5 (Mab2915), 400X.

El Western blot muestra la presencia de la glicoproteína C de envoltura, en el aislamiento Uy-1999 (Fig. 4).

Nunca se detectaron anticuerpos anti-HVB en el ternero del cuál se aisló la cepa Uy-1999, ni por la técnica de seroneutralización ni por ELISA.

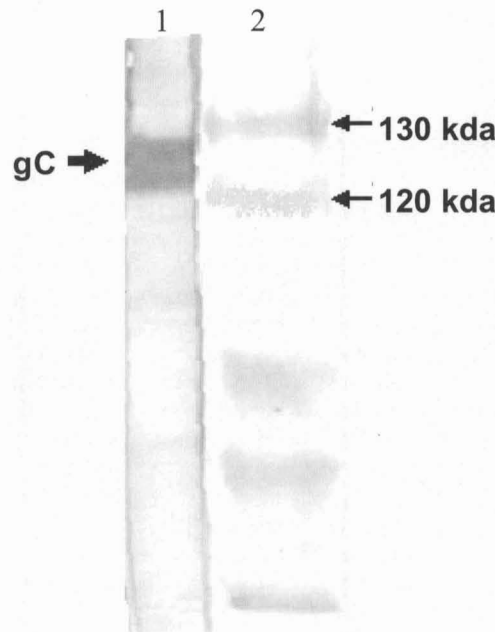
La prevalencia de anticuerpos anti-HVB, en el rodeo al que pertenece el animal del cual se aisló HVB, es de 8.5%. El cuadro 2 muestra la prevalencia de anticuerpos anti-HVB por categoría.

Las muestras resultaron negativas a BLV, sin embargo se pudo verificar la seroconversión específica a BVDV, 7 meses post inicio de signos clínicos. No se aisló BVDV en las muestras de suero post comienzo de signos clínicos.

La cepa Uy-1999 mostró ser inmunogénica, al detectarse anticuerpos totales y neutralizantes específicos anti-HVB, en los bovinos inmunizados con la vacuna inactivada. Los títulos de anticuerpos totales obtenidos a los 17 dpv fueron de 3,40, y a los 25 dpv en uno de los bovinos aumentó a 4,01, permaneciendo constante en el otro bovino vacunado (Gráfica 1). Los títulos de anticuerpos neutralizantes obtenidos a los 17 dpv fueron de 1 y 1,3, y a los 25 dpv aumentaron a 1,9 y 2,2 respectivamente (Gráfica 2).

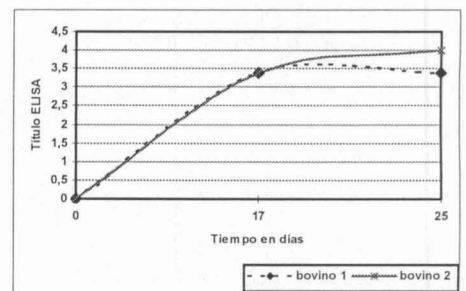
## DISCUSIÓN

Previo a la caracterización se pensó que el aislamiento era un HVB-5, dado que la meningoencefalitis por infección con herpesvirus, usualmente esta asociada a este tipo viral (8, 12, 15). Sin embargo se confirmó que el aislamiento corresponde al tipo HVB-1.1, que también puede provocar alteraciones nerviosas (4, 13, 23). Las características de menor peso corporal que los bovinos de su edad y pelo

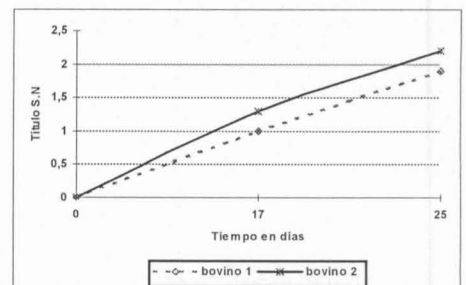


**Figura 4.** Detección de glicoproteína C por Western blot. Carril 1: Uy-1999, Carril 2: Marcador de peso molecular.

**Gráfica 1.** Evolución del título de anticuerpos totales (medido por ELISA) en bovinos vacunados con la cepa Uy-1999.



**Gráfica 2.** Evolución del título de anticuerpos seroneutralizantes en bovinos vacunados con la cepa Uy-1999.



hirsuto, del ternero Limousin, nos llevó a pensar que podría tratarse de un bovino persistentemente infectado (PI) con BVDV. La ausencia de virus en las muestras de suero post inicio de signos clínicos, y la aparición de anticuerpos específicos anti-BVDV siete meses más tarde, descartan esta hipótesis.

La presencia del HVB en el establecimiento se confirma al encontrar animales seropositivos. La prevalencia serológica encontrada en el rodeo al que pertenecía el ternero del cual se aisló HVB, es menor a la reportada en el país (38), y el hecho de que solo un animal mostró signos clínicos en el rodeo, podrían sugerir que la cepa viral Uy-1999 es de baja virulencia. Se podría plantear, en este caso, que existen diferencias antigénicas entre la cepa Uy-1999 y la de referencia. Pero los resultados obtenidos de la inmunogenicidad y la identificación de la glicoproteína C en la cepa Uy.1999, nos lleva a rechazar esta hipótesis. Sin embargo, la confirmación debe ser realizada con estudios moleculares más precisos.

La inmunogenicidad de la cepa aislada se realizó en bovinos de distinta raza, debido a que no existe literatura que especifique diferencias entre razas en sensibilidad a la infección por HVB.

Nunca se detectó respuesta inmune humoral anti-HVB en el ternero del cual se aisló Uy-1999, lo que llevaría a pensar en un animal con dificultad en la respuesta a determinados patógenos. Sin embargo, la presencia de respuesta inmune humoral específica anti-BVDV y la recuperación post infección con HVB, descartan la hipótesis de inmunodeficiencia.

La posibilidad de una infección leve o por vía venérea, que no desencadene una respuesta inmune humoral (45) en el ternero Limousin, se descarta, por la aparición de signos clínicos, y la convivencia con bovinos del mismo sexo y edad, al momento del aislamiento. Además, como

la cepa Uy-1999 se aisló de hisopados nasal y ocular, es más factible, que la infección haya sido vía aerógena y la latencia este establecida en ganglios satélites de la puerta de entrada (19). Si la viremia fue suficiente para establecer latencia en ganglios alejados de la puerta de entrada, el virus se podría llegar a excretar por semen también (45).

Se detectó, por PCR, ADN de HVB en muestras de líquido seminal del ternero Limousin post inmunodepresión con corticoides (34). Si bien no se logró re-aislar Uy-1999, se confirma latencia viral en ganglios alejados de la puerta de entrada. Estos resultados no se presentan en la sección correspondiente por no ser un objetivo del presente trabajo.

Otra hipótesis posible, es que el animal se infectó cuando aún tenía anticuerpos calostrales, neutralizando el virus y evitando signos clínicos, pero no la infección y latencia (5, 21, 22). Los signos clínicos observados en el ternero Limousin, en esta hipótesis, corresponderían a una reactivación del virus, cuando los anticuerpos calostrales ya no existen. Por lo tanto, el animal debería haber producido anticuerpos propios anti-HVB, post signos clínicos. El no haber detectado inmunidad humoral anti-HVB, y la edad del ternero al momento del aislamiento (nueve meses de edad), descartan esta hipótesis.

En estudios futuros, será evaluada la respuesta inmune celular (RIC), mediante la técnica de linfoproliferación *in vitro*. Si no existe RIC específica anti-HVB en el bovino Limousin, se podría plantear otra hipótesis, la respuesta inmune innata, fue, en este caso, suficiente para controlar la infección viral y lograr la recuperación clínica.

La posibilidad de que el animal se infectara in útero, antes de que su sistema inmune estuviese maduro, y estableciera tolerancia a HVB, no ha sido descrito.

Sin embargo, la tolerancia inducida por infección viral temprana se da en otros virus como el de BVDV. Para confirmar o descartar esta posibilidad, son necesarios estudios de infección experimental en distintas etapas de la gestación.

Las campañas de control o erradicación de la enfermedad, se basan en pruebas que detectan anticuerpos específicos anti-HVB. Por lo tanto, la existencia de bovinos latentemente infectados con HVB, y sin anticuerpos detectables, implicaría sin duda, un riesgo epidemiológico, para la diseminación del virus y la enfermedad. Por lo tanto si se confirma la existencia de estos bovinos, habría que re-evaluar las pruebas en que se basan las campañas de control y se deberían utilizar pruebas más sensibles como la PCR (44).

## CONCLUSIONES

Se caracterizó el aislamiento Uy-1999 como un HVB1.1, y se comprobó su capacidad inmunogénica, al responder bovinos inoculados con la vacuna elaborada con la cepa aislada.

Con los resultados obtenidos hasta el momento, concluimos que la falta de respuesta inmune humoral en el bovino del cual se aisló Uy-1999, no es debida a variaciones en la cepa aislada.

La cepa aislada y caracterizada se expandió y almacenó a -80°C y nitrógeno líquido, para poder ser utilizada en la elaboración de vacunas con cepas nacionales.

## Agradecimientos

Osvaldo Zabal y Teresa Moral, Laboratorio de virología, INTA Castelar, Argentina, por consejos en técnicas de cultivo celular.

Juan Cristina y Heber Espino, Centro de Investigaciones Nucleares, por trabajos de irradiación de SFB.

## Referencias Bibliográficas

- Alegre, M.; Nanni, M.; Fondevila, N.** (2001). Development of a Multiplex Polymerase Chain Reaction for the Differentiation of Bovine Herpesvirus-1 and 5. *J. Vet. Med. B* 48, 613-621
- Baker, J.C.** (1987). Bovine viral diarrhea virus: a review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 190:1449-1458.
- Baranowski, E.; Dubuisson, J.; Pastoret, P.P.; Thiry, E.** (1993). Identification of 108k, 93K and 42k glycoproteins of bovine herpesvirus-1 by monoclonal antibodies. *Arch. Virol.* 133 (1-2): 97-111.
- Barenfus, M.; Delli Quadri, C.A.; McIntyre, R.W.; Schroeder, R.J.** (1963). Isolation of infectious bovine rhinotracheitis virus from calves with meningoencephalitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 143: 725-728.
- Bradshaw, B.J.F.; Edwards, S.** (1996). Antibody isotype responses to experimental infection with bovine herpesvirus 1 in calves with colostrally derived antibody. *Vet. Microbiol.* 53 (1-2): 143-151.
- Brown, F.** (1989). The classification and nomenclature of viruses. International Committee on Taxonomy of viruses in Edmonton, Canada, 1987. *Intervirology* 30: 181-186.
- Carbey, E.A.** (1971). Recommended Standard laboratory techniques for diagnosing infectious bovine rhinotracheitis, bovine virus diarrhea, and shipping fever (Parainfluenza3) Proc. 75th Annu. Meet. U.S. Animal health Assoc., pp 629-648.
- Carrillo, B.J.; Pospischil, A.; Dahme, E.** (1983). Pathology of a bovine viral necrotizing encephalitis in Argentina. *Zentralb. Vetinarmed. (B)* 30: 161-168.
- Cutlip, R.C.; McClurkin, A.W.; Coria, M.F.** (1980). Lesions in clinically healthy cattle persistently infected with the virus of bovine viral diarrhea- glomerulonephritis and encephalitis. *J. Am. Vet. Res.*, 41: 1938-1941.
- 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.
- Edwards, S.; White, H.; Nixon, P.** (1990). A study of the predominant genotypes of bovine herpesvirus 1, found in the U. K. *Vet. Microbiol.* 22 (2-3): 213-223.
- Engels, M.; Steck, F.; Wiler, R.** (1981). Comparison of the genomes of infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis virus strains by restriction endonuclease analysis. *Arch. Virol.* 67 (2):169-174.
- Engels, M.; Guiliani, C.; Wild, P.; Beck, T.M.; Loeple, E.; Wiler, R.** (1986). The genome of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) strains, exhibiting a neuropathogenic potential compared to known BHV-1 strains by restriction site mapping and cross-hybridization. *Virus Res.* 6: 57-73.
- Flores, E.F.; Silva, A.M.; Weiblen, R.** (1998). Neuropatogenicidade do Herpesvirus Bovino Tipo 5 (HVB-5). Simposio Internacional sobre Herpesvirus Bovino (tipo 1 e 5) e Virus da Diarreia Viral Bovina (BVDV). Santa Maria, RS, Brasil. 127-137.
- French, E.L.** (1962). A specific virus encephalitis in calves: isolation and characterization of the causal agent. *Aust. Vet. J.* 38: 216-221.
- Guarino, H.; Maisonnave, J.; Capano, F.; Pereira, J.** (1982). Primer aislamiento e identificación del virus de la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)* 78: 131-134.
- Guy, J.S.; Potgieter, L.N.D.** (1985). Bovine herpesvirus-1 infection of cattle: Kinetics of antibody formation after intranasal exposure and abortion induced by the virus. *Am. J. Vet. Res.* 46 (4): 893-898.
- Herring, A.J.; Sharp, J.M.** (1984). Protein blotting: the basic method and its role in viral diagnosis. In: McNulty, M.S. & McFerran, J.B. (eds.). Recent advances in virus diagnosis. Martinus Nijhoff, The Hague, pp 115-124.
- Karhs, R.F.** (1987). Infectious Bovine Rhinotracheitis: A Review and Update. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 171: 1055-1064.
- Lemaire, M.; Pastoret, P.; Thiry, E.P.** (1994). Le controle de l'infection par le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine. *Ann. Méd. Vét.* 138: 167-180.
- Lemaire M. V.; Weynants, J.; Godfroid, F.; Chynts, G.; Meyer, J.J.; Letesson and E. Thiry.** (2000). Effects of bovine herpes virus tipo 1 infection in calves with maternal antibodies on immune response and virus latency. *J. Clin. Microbiol.* 38:1885-1894.
- Lemaire M.; G. Meyer; E. Baranowski; F. Schynts.; Wellemans G.; Kerkohfs P.; and Thiry. E.** (2000). Production of bovine herpesvirus type 1-seronegative latente carriers by administrations of a live-attenuated vaccine in passively immunized calves. *J. Clin. Microbiol.* 38 (11): 4233-4238.
- Ludwig, H.** (1983). Bovine herpesviruses. In: Roizman B, (ed.) The Herpesviruses. Vol. 2. New York Plenum Press, pp. 135-214.
- Lupton, H.W.; Barns, H.J.; Reed, D.E.** (1980). Evaluation of the rabbit as laboratory model for Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus infection. *Cornell Vet.* 70:77-95.0
- Mayfield, J.E.; Good, P.J.; van Oort, H.J.; Campbell, A.R.; Reed, D.E.** (1983). Cloning and cleavage site mapping of DNA from bovine herpesvirus 1 (Cooper strain). *J. Virol.* 47 (1): 259-264.
- Metzler, A.E.; Matilde, H.; Gassmann, U.; Engels, M.; Wyler, R.** (1985). European isolates of bovine herpesvirus-1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides, and reactivity with monoclonal antibodies. *Arch. Virol.* 85: 57-69.

27. Miller, J. 1991. Special Symposium. The multiple manifestation of IBR infection. *Vet.Med.* 84-98.
28. Misra, V.; Babiuk, L.A.; Darcel, C.L. (1983). Analysis of bovine herpes virus type 1 isolates by restriction endonuclease fingerprinting. *Arch. Virol.* 76 (4): 341-354.
29. Msolla, P.M.; Wiseman, A.; Selman, I.E. (1981)- The prevalence of serum neutralizing antibodies to infectious bovine rhinotracheitis virus in Scotland. *J. Hyg.* 86: 209-215.
30. Pastoret, P.P.; Thiry, E.; Brocher, B.; Derboven, G. (1982). Bovid Herpesvirus 1 Infection of Cattle: Pathogenesis, Latency, Consequences of Latency. *Ann. Rech. Vet.* 13: 221-235.
31. Rivero, R.; Haedo, F.; Feola, R.; Capano, F.; Guarino, H.; Saizar, J.; Bermúdez, J. (1987). Granuloma Nasal Bovino: descripción de un caso colectivo y discusión sobre su probable etiología. *Veterinaria (Montevideo)* 98:5-11.
32. Robison, D.S.; Gillespie, J.H.; Baker, J.A. (1960). The neutralization test as an indicator of immunity to Bovine viral diarrhea virus. *Cornell Vet.*, 50:503-509.
33. Rock, D.L. (1994). Latent infection with bovine herpesvirus type 1. *Seminars in Virology.* 5: 233-240.
34. Rock, D.L.; Lokensgard, J.; Lewis, T.; Kutish, G. (1992). Characterization of dexamethasone-induced reactivation of latent bovine herpesvirus 1. *J. Virol.*, 66 (4): 2484-2490.
35. Romera, S.; Zamorano, P.I.; Alcón, V.L.; Puntel, M.; Ferrari, P.N.; Borca, M.V.; Sadir, A.M. (1999). Estrategia de inmunización en bovinos: empleo de RN-205 para incrementar la respuesta humoral y celular contra herpesvirus bovino. I. *Therios* 28 (149) : 216-225.
36. Romera, S.; Hilgers, L.; Puntel, M.; Zamorano, P.; Alcón, V.; Dus Santos, M.; Blancovierra, J.; Borca, M.V.; Sadir A, M. (2000). Adjuvant effects of sulfolipocyclodextrin in a squalane-in water emulsión and water-in-mineral oil emulsions for BHV-1 vaccines in cattle. *Vaccine.* 19:132-141.
37. Sadir, M.A.; Zamorano, P.I.; Romera, A.; Wigdorovitz, A.; Smitsaart, E.; Marangunich, L.; Schiappacassi, C.; Borca, M.V. (1999). Improvement of the immune response to foot and mouth disease virus vaccine in calves by using Avidine as adjuvant. *Vet. Immunol. and Immunopathol.* 69: 11-22.
38. Saizar, J. (1997). Determinación de la prevalencia de la Rinotraqueítis Bovina Infecciosa en rodeos de leche y carne en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo).* 33.133-136.
39. Saliki, J.T.; Fulton, R.W.; Hull, S.R.; Dubovi, E.J. (1997). Microtiter Virus Isolation and Enzyme Immunoassays for Detection of Bovine Viral Diarrhea Virus in Cattle Serum. *J. Clinical Microbiology,* 35 (4) : 803-807.
40. Sharrow, S.; Segal, D. (1995). Immunofluorescence and cell sorting, in *Current Protocols in Immunology.* Coligan, J.; Kruisbeck, A.; Margulies, D.; Shevach, E. and Strober, W. Eds. John Wiley and Sons, New York, Unit 5.1-5.6.
41. Schwyzer, M.; and Ackerman, M. (1996). Molecular virology of ruminant herpesviruses. *Veterinary Microbiology* 53:17-29.
42. Spadrow, B.; Hoffmann, D. (1980). Bovine Ocular Squamous Cells Carcinoma. *Veterinary Bulletin* 50(6):449-459.
43. Tikoo, S.K.; Campos, M.; Babiuk, L.A. (1995). Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): biology, pathogenesis and control. *Ad. Virus Res.* 45: 191-223.
44. van Engelenburg, F.A.C.; van Schie, F.W.; Fijsewijk, F.A.M.; van Oirschot, J.T. (1993). Excretion of Bovine Herpesvirus 1 in semen is detected much longer by PCR than by virus isolation. *J. of Clinical Microbiology.* 33(2):308-312.
45. van Oirschot, J.T. (1995). Bovine Herpesvirus 1 in semen of bulls and risk of transmission: a brief review. *The Veterinary Quaterly.* 17(1): 29-33.
46. Wentink, G.H.; Van Oirschot J.T.; Verhoeff J. (1993). Risk of infection with Bovine Herpes virus 1 (BHV1): A review. *The Veterinary Quaterly* 15(1):30-33
47. Whetstone, C.A.; Miller, J.M.; Seal, B.S.; Bello, L.J.; Lawrence, W.C. (1992). Latency and reactivation of a thymidine kinase-negative bovine herpesvirus 1 deletion mutant. *Arch. Virol.*, 107 (1-2): 27-34.
48. Wyler, R.; Engels, M.; Schwyzer, M. (1989). Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis (BHV-1). *In:* Wittmann, G. (Ed.). *Herpesvirus Disease of Cattle, Horse and Pigs. Developments in Veterinary Virology.* Kluwer Academic Publishers, Boston, pp. 1-72.