

DetECCIÓN DE HERPESVIRUS BOVINO TIPO 4 (BoHV-4) EN RODEOS LECHEROS DEL URUGUAY.

Laureana De Brun¹, Cecilia Castro, Lucía Rivero, Marcos Mionetto, Federico Rodríguez, Valeria da Silva, Rodrigo Puentes.

Departamento de Ciencias Microbiológicas, Facultad de Veterinaria, UdelaR. Montevideo - Uruguay
¹laureanadebrun@gmail.com

Resumen

La baja eficiencia reproductiva al igual que el bajo índice de procreo son los problemas primordiales en la ganadería de cría uruguaya. En cuanto a las virosis, los principales agentes son el virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina (BoHV-1) y el virus de la diarrea viral bovina (BVDV). Teniendo en cuenta que países de la región han puesto en evidencia la presencia de BoHV-4 y su relación con problemas reproductivos, el objetivo de este estudio fue detectar la presencia BoHV-4 en rodeos lecheros del Uruguay. Se utilizó ELISA comercial para determinar anticuerpos específicos contra BoHV-1, BoHV-4 y BVDV y la reacción de la cadena de polimerasa (PCR) para confirmar la presencia del agente viral, realizando posteriormente la secuenciación genética de muestras. Se utilizaron 597 muestras de suero de vacas Holando de los departamentos de Florida, Durazno y Tacuarembó. Del total, 197 (32.7%) reaccionaron positivamente para BoHV-4, 47.7% para BoHV-1 y 94.4% para BVDV. El árbol filogenético demostró un alto nivel de homología entre cepas uruguayas y de la región. Este es el primer diagnóstico en Uruguay de la presencia de BoHV-4. Estudios futuros deben evaluar la diseminación del virus en la población bovina y cuál es el impacto que tiene en la producción nacional.

Summary

The reduced reproductive efficiency and the low index of procreation are the main problems in the Uruguayan breeding cattle.

Considering what refers to viruses, the main agents are bovine infectious Rhinotracheitis virus (BoHV-1) and Bovine viral diarrhea (BVDV). Taking into account that some countries in the region have evidenced the presence of BoHV-4 and its connection with reproductive problems, the main objective of this study is to detect the presence of BoHV-4 in Uruguayan dairy farm herds of cattle. Commercial ELISA to detect BoHV-4, BoHV-1 and BVDV antibodies has been used to determine specific antibodies and PCR (Polymerase chain reaction) to confirm the presence of the viral agent, next samples were Sanger sequencing confirmed. A number of 597 samples of Holstein cattle whey from the provinces of Florida, Durazno and Tacuarembó were used. From a total number, 197 (32.7%) reacted to BoHV-4, 47.7% to BoHV-1 and 94.4% to BVDV positively. The phylogenetic analysis showed a high degree of similarity among Uruguayan regional strains. This is the first diagnosis of the presence of BoHV-4 in Uruguay. Future studies must evaluate the dissemination of the virus in the bovine population and the impact it has in the national production.

Introducción

Herpesvirus tipo 4, también llamado Gammaherpesvirus bovino 4 (BoHV-4) ha sido aislado de bovinos con infecciones respiratorias, vulvovaginitis, mastitis, abortos, endometritis e incluso en animales aparentemente sanos. Se asocia mayoritariamente a infecciones del tracto reproductivo de los bovinos, particularmente durante el periodo posparto (Chastant-Maillard, 2013). La diseminación viral mediante secreciones nasales, orales o

genitales representa una fuente de infección para otros animales. Los hospedadores latentemente infectados son fuentes potenciales de transmisión viral para el rebaño (Morán y col., 2015).

En países de la región, tanto Brasil como en Argentina el virus ha sido detectado desde hace varios años (Costa y col. 2011; Kruger y col., 2015). En Uruguay, las pérdidas reproductivas son el principal problema en la ganadería de cría a nivel nacional, se desconoce la presencia de virus en el rodeo nacional y cuál es el impacto que el mismo puede tener en la salud animal. En cuanto las principales virosis involucradas en fallas reproductivas diagnosticadas en Uruguay, podemos mencionar el virus de la Rinotraqueítis infecciosa bovina -IBR (BoHV-1) y el virus de la diarrea viral bovina (DVB), ambos ampliamente difundidos en los rodeos lecheros nacionales. Sin embargo, hasta el momento no se ha considerado el BoHV-4 como agente causal de fallas reproductivas en Uruguay y su posible impacto en la salud animal. Debido a los diferentes cuadros que causa este virus, la complejidad del diagnóstico clínico, el propósito de este estudio fue detectar BoHV-4 en rodeos lecheros en Uruguay.

Materiales y Métodos

Se utilizaron 597 muestras extraídas por venopunción de la vena coccígea (2009 y 2016) correspondientes a ganado Holando multiparo, clínicamente sanos pertenecientes a pequeños productores de los departamentos de Florida, Durazno y Tacuarembó. Para la detección de anticuerpos (Ac) específicos contra BoHV_4 y Ac contra los otros dos virus de importancia reproductiva (BoHV-1 y DVB), se utilizó un kit comercial marca *Bio X Diagnostics* (BIO-ABORTION ELISA KIT, *Belgique, Europe*).

Se realizó la técnica de nPCR para la detección de genoma viral en 17 muestras. La extracción del genoma viral se hizo de muestras de sangre por el método de Fenol-Cloroformo. El protocolo de amplificación utilizado fue descrito previamente por Wellenberg y col.

(2001) y Campos y col., (2014). Obteniendo un fragmento de 364pb del gen que codifica para la glicoproteína B (gB) del BoHV-4. Como control positivo se utilizó la cepa *Movar*. Trece productos de PCR fueron secuenciados en ambos sentidos (*Forward* y *Reverse*) (Macrogen Inc., Corea) por el método *Sanger*. Se construyó el árbol con el software MEGA 6 utilizando además cepas de referencia y de la región extraídas del *GenBank*. La relación evolutiva se estimó utilizando el algoritmo de "vecino más próximo".

Resultados y Discusión

De un total de 597 sueros de bovinos Holando en lactación clínicamente sanos, se obtuvo 195 (32.7%) animales seropositivos a BoHV-4, de los cuales 65.6% fueron clasificados como "positivos débiles". Por departamento, 34% (84/163) resultó serología positiva en Tacuarembó, 23% (57/247) en Durazno y 52.4% (54/103) en Florida, siendo estas diferencias significativas ($p=0.00$). Del total de las 597 muestras, 285 (47.7%) animales fueron seropositivos al BoHV-1, de los cuales 114 (19%) fueron seropositivos a ambos herpesvirus (BoHV-1 y BoHV-4). De este resultado, se evidenciaron que 81 muestras de 195 seropositivas a BoHV-4, no lo fueron para el BoHV-1. En cuanto al DVB la mayoría de los animales fueron seropositivos (94.4%). De estos, 170 (28.5%) fueron seropositivos a BoHV-4 (Tabla 1). De un total de 47 animales del departamento de Florida con antecedentes reproductivos, el 85% (40/47) fueron seropositivos a BoHV-4. Se eligieron 17 muestras al azar que fueron procesadas mediante nPCR para la detección del genoma viral, obteniéndose 4 negativos y 13 positivos. Posteriormente, se enviaron a secuenciar las 13 amplificaciones obtenidas. Las secuencias obtenidas fueron depositadas en el banco de datos del *GenBank* (Número de acceso: MH799307, MH799308, MH799309, MH799310, MH799311, MH799312, MH799313, MH799314, MH799315, MH799316, MH799317, MH799318, MH799319).

En Uruguay hasta el momento, se desconoce la situación de BoHV-4 en la población bovina, siendo este el primer reporte de la de-

tección serológica y molecular del virus. En el presente ensayo se detectó un 32.7% de seropositividad a BoHV-4 en el total de las muestras analizadas, habiendo uno de los establecimientos, con una seroprevalencia de 85%. Del total de muestras analizadas, más del 50% son muestras clasificadas como débilmente positivas. De la filogenia obtenida, se destaca que las cepas de BoHV-4 en Uruguay están agrupadas con otras cepas de la región (Brasil y Argentina), y otros países del mundo como Italia y Turquía.

Si bien en la actualidad, las enfermedades reproductivas y más específicamente las virosis, cada día ocupan un papel más importante, en Uruguay existen pocas evidencias claras de los agentes infecciosos involucrados a nivel reproductivo. En caso que se demuestre que BoHV-4 es un importante agente en Uruguay, se debería buscar estrategias de control distintas a la vacunación, teniendo en cuenta que no existe inmunidad cruzada frente a este y otros herpesvirus que sí están en las vacunas reproductivas, como BoHV-1. En conclusión, este trabajo demuestra por primera vez la presencia de BoHV-4 en bovinos en Uruguay. Se desconoce completamente el rol y el impacto del virus en los índices reproductivos del país, lo que deja abierta la discusión sobre la necesidad de incorporarlo dentro de los agentes diferenciales de fallas reproductivas.

Bibliografía

- Campos FS, Franco AC, Oliveira MT, Firpo R, Strelczuk G, Fontoura FE, Kulmann MIR, Maidana S, Romera SA, Spilki FR, Silva AD, Hubner SO, Roehe PM. (2014). Detection of bovine herpesvirus 2 and bovine herpesvirus 4 DNA in trigeminal ganglia of naturally infected cattle by polymerase chain reaction. *Vet Microbiol* 171(1-2): 182 – 188.
- Chastant-Maillard S. (2013) Impact of Bovine Herpesvirus 4 (BoHV-4) on Reproduction. *Transbound Emerg Dis*. 62(3): 245 - 251.
- Costa E, Vasconcelos A, Bomfim M, Amorim H, Lima G, Coelho F, Resende M., (2011). Neurological disorder in cattle associated with bovine herpesvirus 4. *Arq Bras Med Vet Zootec.*; 63:828-835.
- Krüger E, Penha, T, Eira D, Roehe P, Ribeiro M, Soccol T. (2015). Bovine herpesvirus 4 in

Parana State, Brazil: case report, viral isolation, and molecular identification. *Soc Brasileira de Microbiol* 46 (1): 279-283.

- Morán P.E, Pérez S.E, Odeón A.C, Verna A.E. (2015). Herpesvirus bovino 4 (BoHV-4): aspectos generales de su biología y situación en la República Argentina. *Rev Argent Microbiol* 47(2):155 - 166.

- Wellenberg G.J, Mars, M.H, Van Oirschot J. (2001) Antibodies against bovine herpesvirus (BHV) 5 may be differentiated from antibodies against BHV1 in a BHV1 glycoprotein E blocking ELISA. *Ve. Microbiol* 78(1):79-84.