AISLAMIENTO DE HERPES BOVINO TIPO 5 A PARTIR DE CUADRO CLINICO NEUROLÓGICO

Silvano,D.[1]; Juárez, S.; Gollan, A.[1]; Occhi, H [1].; Lucca, E.[1]; Fondevilla, N [2]; Piccone,M.E [2].; Passeggi, C.[1]; Rodriguez Armesto,R [1]

[1]Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad Nacional del Litoral Padre Kreder 2805 Esperanza CP 3080 Santa Fe .Argentina

[2] Instituto de Virología, Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Buenos Aires . Argentina.

RESUMEN

El herpes virus bovino tipo 5 (HVB-5) pertenece a la Familia Herpesviridae y produce en animales jóvenes una meningoencefalitis fatal. Este agente presenta una elevada homología con el herpes virus bovino tipo 1, del cual es difícil diferenciarlo. Este trabajo describe el aislamiento y la identificación de una cepa de HVB-5 en un rodeo de bos indicus en la provincia de Santa Fe, Argentina. El rodeo estaba compuesto por 120 animales de los cuales 5 presentaron signología nerviosa de curso fatal.

SUMMARY

The bovine herpesvirus 5 (HVB-5) belongs from Herpesviridae Family and causes meningoencephalitis and dead in young animals. This agent presents a high homology with bovine herpesvirus 1, from which it is difficult to be differentiated. This work describes the isolation and the identification of a strain of HVB-5 from a bos indicus herd in the province of Santa Fe, Argentina. The herd was formed up by 120 animals and 5 of then presented neurological signs and dead.

INTRODUCCION

El Herpes virus bovino tipo 5 (HVB5) pertenece a la familia *Herpesviridae* subfamilia *Alphaherpesvirus*, son virus envueltos,ADN de doble cadena con cápside icosahédrica, asociados a casos de terneros con meningoencefalitis no supurativa. (9). En forma natural y experimental la infección por HVB5 en animales jóvenes, se da luego de una invasión viral y una intensa replicación en el sistema nervioso central, que provoca una severa y fatal meningoencefalitis (2)(4)(6)(7). La enfermedad causada por HVB5 usualmente afecta a terneros menores de 8 meses con baja morbilidad y alta mortalidad (3) En nuestro país se notificaron los primeros casos clínicos en 1980(6) (8).No existen al presente en nuestra región datos sobre la acción de este virus en los rodeos bovino.

OBJETIVO

Descripción de un caso clínico con sintomatología compatible, con la etiología de herpes bovino tipo 5 . Identificación y confirmación por diferentes técnicas virológicas de la presencia herpes bovino tipo 5 en el caso clínico.

MATERIALES Y METODOS

1)Se intentó el aislamiento a partir de un caso clínico arribado al Hospital de Salud Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias U.N.L Esperanza, este animal de 6 meses de edad presentaba alteraciones nerviosas evidentes y provenía de un rodeo de 120 animales de la misma edad, cruza *Bos indicus*, que tenía antecedentes de 5 muertes con la misma signología .

El animal, presentaba síndrome febril (410C) obnubilación del sensorio, ptosis palpebral bilateral, dromomanía, hiperestesia generalizada, síndrome de presión cefálica; al adoptar de cúbito lateral realizaba movimientos de pedaleo y natatorio. Además tenía coprostacia y oliguria. El cerebro presentaba macroscopicamente a la necropsia hiperemia marcada de lóbulos parietales con malasia (reblandecimiento).

Se obtuvieron muestras de cerebro y cerebelo, conservadas en medio de cultivo más antibióticos: MEM (Minimun Essential Médium) con 1% de penicilina-estreptomicina. Se trituraron con el agregado de MEM con un 1% de antibiótico, centrífugaron y filtraron por membrana de 0,2 micras de poro y realizaron controles bacteriológicos de los mismos.

Se intentaron los aislamientos del virus de interés en cultivos celulares susceptibles: primarios de pulmón y testículo bovino, y en línea establecida Madyn Derby Bovine Kidney (MDBK). Se inocularon monocapas celulares con 0,5 ml del triturado filtrado, con 5 ml de medio de mantenimiento (MEM + 2% de suero fetal bovino y 1% de antibiótico) y se llevaron a estufa. Las capas inoculadas se observaron diariamente. Una vez adaptados los aislamientos se trabajó con línea celular MDBK.

2)Caracterización de los aislamientos :La inmunofluorescencia directa (IFD) se llevó a cabo por la técnica Coons y col.(5) y consistió en la preparación de improntas de los órganos en directo y de las células, con efecto citopatogénico. Las mismas se tiñeron con reactivos VMRD (antisuero policlonal anti- IBR conjugado con isotiocianato de fluoresceína) para ser observadas en microscopio de IF, usando como controles negativos improntas de células sin infectar.

La seroneutralización (SNT) viral tendiente a valorar la pérdida de la capacidad infectante del virus por la acción de su anticuerpo específico, se llevó a cabo por el método suero variable-virus fijo, obteniéndose un título seroneutralizante de 1:32.

3) Diferenciación de los aislamientos en tipos 1 y 5 mediante la Multiplex Reación en cadena de la polimerasa

(M-PCR)(1), mediante la extracción del ADN con Chelex 100 (Bio-Rad 143-2832 Chelex 100) Proteinasa K 10mg/ml (Promega V320)y DTT 1.0M. (Promega V 3151) y la utilización de dos pares de primers , para HVB1 TK1:5´AGA CCC CAG TTG TGA TGA ATG C3´, TK2:5´ACA CGT CCA GCA CGA ACA CC 3´ que amplifica la región de Timidina Kinasa, obteniendo un producto de 183 pb y para HVB5 GD1:5´GCC CGC AGT TTC CCC TAC C3´ , GD2: 5´CGC ACC CGC TCT CAA TCT T3´. y la región genómica que codifica para la glicoproteína D (564pb) del HVB-5.

Se realizaron 35 ciclos y los productos de la PCR se analizaron mediante corrida electroforética en gel horizontal de agarosa al 0,8% en buffer TBE con10-4 mg/ml de bromuro de etidio, visualizándose las bandas mediante un transiluminador UV y comparando la posición de las mismas con un patrón de pesos moleculares (de 100 a 1000 bp).

RESULTADOS

A las 72 horas del primer pasaje se evidenció el efecto citopatogénico propio de los herpes (redondeamiento celular, células gigantes multinucleadas, formación de sincicios, lisis y desprendimiento). El segundo pasaje presentó dicho efecto después de las 48 horas post inoculación y el tercer pasaje lo mostró antes de las 24 horas . Se observó una clara inmunofluorescencia en todos los pasajes realizados . Se realizó la titulación viral obteniéndose de el material denominado 475/485 un título de 10 -5.5 DICT 50% (dosis infecciosa cultivo de tejidos 50%) .

La M-PCR evidenció un producto de bandas electroforéticas claras de medidas características para el BHV5.

Sobre el material estudiado, se obtuvo 1 aislamiento de Herpesvirus bovino Tipo 5, caracterizado por IFD, SNT con un título de 1/64 y M- PCR. Coincidente con el hallazgo clínico; esto evidencia la circulación de este agente neuropatogénico en rodeos locales.

CONCLUSIONES

Esta comunicación confirma por primera vez la circulación de HVB5 en rodeos de la zona central de la provincia de Santa Fe en la que se presentan casos clínicos nerviosos sin confirmación diagnóstica.

Se han descripto clínicamente casos neurológicos con anterioridad, pero el presente recupera y caracteriza al agente que exhibe la propiedad de inducir un cuadro neurológico al presentarse en individuos susceptibles; sindicando a esta cepa (475/485) como de marcado tropismo para el sistema nervioso de animales jóvenes.

Se confirmó un aislamiento de HVB 5 denominado 475/485 mediante la diferenciación por la técnica de M-PCR de un animal de 6 meses de edad con sintomatología nerviosa cruza Bos indicus que presentaba alteraciones nerviosas en un rodeo de 120 animales y que por anamnesis se conoce se habían producido 5 muertes con similar presentación.

El sistema desarrollado en la Facultad de aislamiento y caracterización de virus animales es eficiente y es complementado con la colaboración del ICV INTA Castelar que realiza el estudio genómico.

Consideramos que esto se verá traducido en conocimientos de tipo epidemiológicos más certeros en la región, dado que clínicamente se observan numerosos casos que de otra manera no son confirmados con certeza como producidos por el HVB-5, transferibles a los alumnos de grado, posgrado y a los profesionales veterinarios de la región y la Provincia.

REFERENCIAS

(1) Alegre ,M; Nanni,M ; Fondevilla ,N .2001 Development of a Multiplex Polymerase Chain Reaction for the differentiation of Bovine Herpesvirus -1 and -5 J.Vet.Med.B ., 48 (8) 613-21

(2) Bagust, T.J., Clark, L., 1972. Pathogenesis of meningoencephalitis produced in calves by infectious bovine rhinotracheitis herpesvirus. J. Comp. Pathol. 82, 375-383.

(3) Bulach,D.M., Studdert,M.J.,1990.Comparative genome mapping of bovine encephalitis herpesvirus, bovine, bovine herpesvirus 1, and buffalo herpesvirus. Arch Virol. 113, 17-34.

(4) Carrillo, B.J., Pospischil, A., Dahme, E., 1983. Pathology of a bovine viral necrotizing encephalitis in Argentina.Zbl. Vet. Med. B. 30, 161-168.

(5) Manual de Técnicas de Diagnóstico Virológico. Inmunofluorescencia procedimiento directo de Coons y col.- Red de Cooperación Técnica ONU para la agricultura y la Alimentación. Oficina para Latinoamérica y el Caribe CICV INTA 1988.

(6)Schudel,A.A., Carrillo, B.J., Wyler, R., Metzler, A.E., 1986. Infection of calves with antigenic variants of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurological disease. Zbl. Vet. Med. B. 33, 303-310.

(7)Schudel AA, Rodríguez M y Carrillo BJ. 1987 Biotecnología en el diagnóstico, caracterización y prevención de la encefalitis bovina a BHV-1. CICV - INTA - Castelar

(8) Schudel, A.A., Carrillo, B.J., Wyler, R., Metzler, A.E., 1986. Infection of calves with antigenic variants of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurological disease. Zbl. Vet. Med. B. 33, 303-310.

(9) Roizman, B., 1992. The family Herpesviridae: an update. Arch. Virol. 123, 432-445