

Caracterización bioquímica del herpes bovino vivos 1 (HVB-1) en Colombia *Proyecto de Investigación*

JUAN CARLOS ZAPATA J, BACT., FABIO NELSON ZULUAGA T., MV, MS.,
GABRIEL BEDOYA B, BIOL, MS., JUAN DAVID RODAS G, MV, MS.,
JOHN JAIRO ARBOLEDA C, MV, MS., JORGE E. OSSA L, MV, MS, PhD.

Introducción

La infección con HVB-1 es importante por las grandes pérdidas económicas ocasionadas a la ganadería mundial, y aunque existen varias vacunas comerciales que reducen la severidad de la enfermedad, éstas no previenen la infección, el establecimiento de la latencia, ni la reactivación. Además, a nivel de laboratorio, no se puede hacer diferencia entre animales vacunados y no vacunados que han sufrido infección natural, lo cual crea dificultades para implementar programas de control y erradicación.

Este virus presenta una distribución mundial, solo están libres Noruega, Finlandia, Suecia, Suiza y Dinamarca, que realizaron una campaña de erradicación, restringiendo el movimiento de animales y sacrificando aquellos que estaban infectados con el virus.

En Colombia a pesar de que se han realizado 13 aislamientos, 11 en los llanos en 1972-1974^{1,2} y 2 en Bogotá 1974 y 1995³, no se ha caracterizado esta entidad ni virológica, ni patogénicamente, sin embargo se han realizado estudios de prevalencia, que indican un porcentaje de positividad que va desde 0.7% en el departamento del valle (entre los años 1974 y 1975) hasta un 67.6% en el Urabá antioqueño (año 1977). Estos datos, constituyen una evidencia serológica de prevalencia de infección relativamente alta, sin embargo las evidencias clínicas y virológicas de la enfermedad son muy pocas.

Por lo tanto, en Colombia, existe la necesidad de realizar estudios virológicos, con miras a aclarar, la existencia o no de diferencias bioquímicas y patogénicas de las cepas de HVB-1 que circulan en el medio, al

compararlas con las cepas de referencia aisladas en otros lugares del mundo.

Los miembros del grupo BHV fueron originalmente clasificados en 5 tipos por medio de criterios clínicos e inmunológicos, de los cuales, el tipo 1 es el de interés en este trabajo (tabla 1)⁴.

Pastoret et al en 1980, realizaron un corrido electroforético de las proteínas del virión, con el objetivo de diferenciar los virus de origen respiratorio de los de origen genital, y encontraron que tres de éstas presentaron un patrón de migración específico⁵.

Engels et al en 1981, indicaron que, el DNA del HVB-1 asociado con RIB, presentaba diferentes patrones de restricción al compararlo con el patrón del DNA del virus asociado a VPI⁶.

Mayfield et al en 1983, publicaron el mapa físico de las cepas denominadas tipo "Cooper" o similares a RIB y tipo "K22" ó similares a VPI, según su patrón de restricción. Posteriormente las cepas similares a RIB se denominaron cepas I y las similares a VPI cepas II o III⁷.

Misra et al en 1983, reportaron que los HVB-1, podrían dividirse en tres grupos diferentes, basados en su patrón de restricción (1.1, 1.2 y 1.3) y plantea la posibilidad de que la diferencia en manifestaciones respiratorias y genitales pueda ser debida a virus relacionados parcialmente, que aparecen serológicamente similares, pero al analizar su DNA representen tipos de virus diferentes. En otro informe, este grupo de investigadores denominaron los aislamientos semejantes a RIB como tipo 1 y los semejantes a VIP como tipo 2, donde las cepas tipo 2a y 2b se relacionaron con las cepas II y III respectivamente⁸.

En 1985 Metzler y colaboradores, caracterizaron varios virus tipo 1 aislados en Europa, mediante análisis del DNA digerido con enzimas de restricción y de acuerdo a su patrón polipeptídico. El DNA viral fue tratado con la endonucleasa de restricción HindIII y sometido a electroforesis. Se encontraron diferencias en los pesos moleculares en dos de los fragmentos denominados K y L, los cuales permitieron clasificar el HVB-1 en subtipo 1 y subtipo 2; a su vez se hallaron diferencias dentro de los virus del subtipo 2 en un fragmento llamado I, lo que permitió diferenciar los subtipos 2a y 2b (demostrado por otros autores previamente). Al comparar los perfiles polipeptídicos de cada cepa, encontraron que las proteínas virales Vp9 y Vp22 mostraron una migración específica de subtipo. La vp9 de la cepa subtipo 1, migró más rápidamente que la Vp9 del subtipo 2 y con la Vp22 ocurrió todo lo contrario. Las proteínas Vp23 y Vp25 mostraron una diferencia en la migración menor pero constante, que fue también específica de subtipo. La Vp23 del subtipo 2a mostró un peso molecular más alto que el subtipo 2b y la Vp25 del subtipo 2b migró un poco más rápido al compararlo con las otras cepas. No se halló correlación entre el patrón de restricción y el perfil polipeptídico⁴.

Los hallazgos anteriores han permitido clasificar las cepas de HVB-1 en 5 subtipos 1, 2a, 2b, 3a y 3b. Aunque no se ha demostrado una fuerte correlación entre el origen clínico de el aislamiento y el subtipo molecular, se plantea la posible existencia de una correlación parcial, así: Subtipo 1 contiene las cepas RIB, subtipo 2 contiene las cepas VPI y el subtipo 3 contiene las cepas neurotrópicas. Sin embargo, estudios recientes hallaron en las cepas neurotrópicas características únicas de su genoma y la han denominado encefalitis bovina subtipo 5 (HVEB-1)¹⁰.

Materiales y Métodos

1 Aislamiento y muestreo

Para el aislamiento del agente, se necesitan muestras de hisopados nasales y vaginales o prepuciales, según corresponda.

Se propone hacer una intensificación de muestreos por medio de dos métodos:

- ♦ Realizar un muestreo en diferentes regiones del país, implementando para ello una campaña educativa a nivel nacional, con el objeto de vincular el mayor número de universidades interesadas en la problemática, que se encarguen de efectuar la toma de muestras y las remitan al laboratorio de virología de la Universidad de Antioquia, donde serán procesadas. Los materiales necesarios para realizar estos procedimientos, así como también el transporte de muestras serán suministrados por la Universidad de Antioquia.
- ♦ La otra metodología que se propone es la inmunosupresión de animales seropositivos con dexametasona, para inducir la reactivación viral, aumentando de esta manera las posibilidades de aislamiento.

Ninguna de las dos metodologías propuestas son excluyentes, ambas se pueden realizar a la vez.

Las muestras serán inoculadas en células Madin-Darby Bovine Kidney (células MDBK donadas por la universidad de Wisconsin) cultivadas en MEM al 10% de SBF y mantenidas en MEM al 2% de SBF, las cuales se observarán durante 5 ó 6 días, para ver si se presenta o no efecto citopático (ECP). Las muestras que sean sospechosas o que presenten EFC, se reinocularán con el fin de confirmar el aislamiento y obtener una mayor cantidad de virus para la identificación y estudios posteriores.

2. Caracterización patogénica in vitro

Los trabajos preliminares se realizarán con dos cepas virales existentes en laboratorio de virología de la universidad de Antioquia, una de ellas (la cepa de referencia) fue obtenida de la universidad de Wisconsin, la otra es una cepa aislada en Bogotá el año pasado por Agustín Góngora y colaboradores, la cual nos fue donada por el posgrado en medicina veterinaria de la universidad Nacional de Bogotá.

Se hará comparación entre diferentes cepas de virus de su:

- Características del ECP: Forma y tamaño de las placas, presencia de efecto citotóxico.

Se sembrarán en platos de 24 pozos, 100.000 células MDBK por ml, se incubarán durante 24 horas y luego se infectan con 10 moi de TCID₅₀, se les agrega MEM al 2% de SBF y al 1.5% de agarosa e incubadas a 37°C por 72 horas para posteriormente ser coloreadas con cristal violeta realizar la evaluación de las placas.

- Rango de células susceptibles. 10 moi de TCID₅₀ de los aislados se sembrarán en células permisivas como MDBK (células de riñón bovino), VERO (células de mono verde africano), fibroblastos de oreja de bovino y células no permisivas como Hep-2 (células de carcinoma de laringe humano) y se observará la presencia o ausencia de ECP.
- Se medirá también la eficiencia de replicación: Se inocularán células MDBK con 10 moi de TCID₅₀ de cada virus, se incuban durante 72 horas y se mide el título viral.

3. Análisis bioquímicos

3.1 Perfil polipéptico

3.2 Marcaje de proteínas. Las células MDBK serán infectadas con 10 moi de TCID₅₀, incubadas a 37°C durante 1 hora (adsorción viral), luego lavadas con PBS y se les adiciona MEM al 2% de suero bovino fetal (con metionina 1/10), incubar 6 horas. Después agregar 20 uCi de ³⁵S-Metionina, incubar nuevamente a 37°C y recolectar virus extracelular y células de 22 a 24 horas posinfección.

3.3 Preparación de muestras para la electroforesis.

Las células serán lavadas 2 veces con PBS, desprendidas, transferidas a tubos cónicos y

centrifugadas. El sedimento se resuspende en 1 ml de buffer de solubilización (50 mM de Tris - HCl, pH 6.8, SDS al 3%, 5% de mercapto-etanol, 3% de glicerol y azul de bromofenol) calentado a 100°C por 3 minutos y guardados a -70°C hasta su uso.

Los virus extracelulares se obtendrán por medio de varios pasos de centrifugación, de la siguiente manera: 15 min a 800xg, 15 min a 4800xg y 120 min a 100000xg. El sedimento obtenido en el último paso de centrifugación, se resuspenderá en 0,2 ml de buffer de solubilización, se calentará y será guardado a -70°C hasta su utilización. Las muestras serán corridas en gel SDS-PAGE preparado a partir de una solución madre al w/v 29.2% de acrilamida y 0.8% de N,N-Metilbisacrilamida, corridas a 20 mA y posteriormente tratadas con En 3 Hance (NEN), se secará el gel y se hará la autoradiografía. El peso molecular de las bandas radioactivas se determinará corriendo en paralelo proteínas marcadas con ¹⁴C (NEN).

3.4 Purificación viral y extracción de DNA. Las células se congelarán y descongelarán para obtener la mayor cantidad de virus. Para obtener virus en alta concentración se proponen 2 métodos:

Por centrifugación 15 min a 800xg, 15 min a 4800xg y 120 min a 100000xg. El virus sedimentado se resuspenderá en 1 ml de buffer TEN (10 mM de Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM de EDTA y 150 mM de NaCl). Luego se tratará con DNAasa I, RNAasa A y con proteínasasa K (250 ug/ml).

Por centrifugación isopícnica en gradientes de sucrosa o Cloruro de cesio (CsCl) y posteriormente tratado con proteínasasa K.

La mezcla se extraerá varias veces con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). El DNA precipitado con etanol y disuelto en buffer TE (10 mM de Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM de EDTA).

4. Análisis con endonucleasas de restricción

1 ug de DNA extraído será digerido durante toda la noche con 10 U de cada una de las endonucleasas de

restricción (HindIII, BamHI y EcoRI). La reacción se parará con 0.2 de glicerol al 25%, 25 mM de EDTA, SDS al 1% y 0.1% de azul de bromofenol. Se tomarán 0.5 ug del DNA fraccionado y se separará en un gel de agarosa 0.4% en buffer TBE (90 mM de Tris-Hcl, 90 mM de ácido bórico, 2.4 mM EDTA, pH 8.3). El tiempo de corrido es alrededor de 16 horas a 14 V en presencia de bromuro de etidio (0.5 ug/ml) y luego se visualiza bajo luz ultravioleta.

Bibliografía

1. CIAT, Inf. Anuales Salud Animal, 1972, 1973, 1974, 1975.
2. Zúñiga I, Ossa J, Hincapie O., Rev. Col. Cienc. Pe. 1 :135-148. 1978.
3. Góngora A., Villamil L.C., Vera V. I., Parra J.L., Ramírez G.C., López G., Rev. Med. Vet. Y Zoo. Unal. Vol : XLIII, No 1, Jun. 1995.
4. Arboleda J.J., Bedoya D.A., Rodas J.D., Acebedo L., Ossa J.E., Técnica científica pp : 34-35 Feb/Mar 1993.
5. Simard C., LaBoissière S., Séguin Cécile., Trudel M., Intervirology 32: 117-126. 1991.
6. Webster R.G; Granoff A., Enciclopedia of Virology. Vol 1:155. 1994
7. Whetstone C.A., Seal B.S., Miller M.J., Veterinary Microbiology 38: 181-189. 1993.
8. Goddeeris M.B., Moorrison W.I., Cell-Mediated Immunity in Ruminants pp: 157-171. 1994.
9. Byrne K.M., Horohov D.W., Kousoulas K.G., Virology 209: 230-235. 1995.
10. Tikoo S.K., Camppos M., Babiuk A.L., Advances in Virus Research Vol: 45: 191-223. 1995.
11. Pastoret P.P., Burtonboy G., Aguilar S.A., Gordart M., Lamy M.E., Schoenaers F., Vet Microb 5 : 187-194. 1980.
12. Engel M., Steck F., Wiler R., Arch Virol 67 : 169-174. 1981.
13. Mayfield J.E., Good P.J., Van Oort H.J., Campell A.A., Reed D.C., J Virol 47 : 259-264. 1983. Metzler A.E., Matile H., Gassmann U. et al. Archives of Virology. 85: 57-69. 1985.