

Correlaciones moleculares, clínicas y serológicas de los *alfaherpesvirus* de Rumiantes, con especial referencia al HVB-1

Juan C Zapata, Bact; Gabriel B Bedoya, Biol. MS; Jorge E Ossa, MV, MS, PhD; Fabio N Zuluaga, MV, MS

Grupo de Immunovirología - BIOGENESIS
Facultad de Medicina
Universidad de Antioquia
A.A. 1226, Medellín, Colombia

(Recibido: 21 julio; aceptado: 31 agosto, 99)

Resumen

A pesar de que se tiene la secuencia genómica completa del HVB-1 (prototipo de estudio de los *Alfaherpesvirus* de rumiantes), hasta el momento, las relaciones entre los *Alfaherpesvirus* han sido pobremente caracterizadas. En este artículo, queremos revisar algunos trabajos que han comparado desde el punto de vista estructural y de secuencia, los ácidos nucleicos de este grupo de virus. También analizamos, algunos estudios sobre patogénesis, haciendo referencia especial al HVB-1, con énfasis en la descripción de variantes de este agente con diferentes grados de virulencia. Finalmente, se discute la posibilidad de que en Colombia, donde no hemos demostrado una lata evidencia clínica ni virológica, pero si una alta seroprevalencia, circulen cepas relativamente apatógenas, como se ha propuesto desde hace varios años.

Introducción

De acuerdo con las propiedades biológicas, los miembros de la familia *Herpesviridae*, se han clasificado en tres subfamilias, *Alfa-*, *Beta-* y *Gammaherpesvirinae*. Los herpesvirus de rumiantes que se conocen hasta la fecha, pertenecen a las subfamilias *Alfa-* o *Gama-herpesvirinae*. Los miembros de la subfamilia *Alfa-herpesvirinae* se caracterizan por su ciclo de replicación rápido que conduce a la lisis de la célula infectada; presentan un rango de hospedero variable, el cual en algunos casos, es bastante amplio y establecen latencia principalmente en neuronas de ganglios sensoriales. A su vez, esta subfamilia de acuerdo a la homología entre virus, a las similitudes en la organización genómica y a la relación de las más importantes proteínas virales, demostradas por métodos inmunológicos, se divide en dos géneros: *Simplexvirus* y *Varicellovirus* (1).

Los miembros de la subfamilia *Gammaherpesvirinae* presentan un estrecho rango de hospederos y tropismo por células linfoblásticas, en las que se replican y establecen latencia. Además, pueden ser adaptados bajo condiciones experimentales para que infecten linfocitos T o B y son potencialmente oncogénicos (2).

En esta ocasión haremos énfasis en el HVB-1, que pertenece a la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alfaherpesvirinae* y al género *Varicellovirus*.

Este virus se encuentra distribuido en todos los continentes, su rango de hospedero es limitado. Se acepta que el reservorio natural es el bovino y se plantea la posibilidad de que este virus pueda ser transmitido por garrapatas, ya que recientemente fue aislado de *Ornithodoros coriaceus* (3).

Existen técnicas inmunológicas modernas para el diagnóstico de rutina de infección por este agente, sin

embargo, la eficiencia de estas técnicas se ve afectada por la estrecha relación que existe entre los *Alfaherpesvirus* de rumiantes los cuales comparten epítopes proteicos que hacen que se presente reactividad serológica cruzada. Se han hallado muchas especies silvestres seropositivas al HVB-1, pero los diferentes signos clínicos característicos de la infección, sólo se observan en el ganado; por ejemplo, se han encontrado ciervos rojos y renos seropositivos al HVB-1, sin embargo, cuando estos animales son infectados experimentalmente con este virus, no desarrollan síntomas ni seroconversión.

De ciervos, se han aislado dos tipos de herpesvirus llamados CerHV-1 y CerHV-2, que muestran relación serológica con el HVB-1 por la prueba de neutralización. Lo que podría explicar la presencia de anticuerpos contra el HVB-1 en ciervos (4). Esta reactividad cruzada, podría en algunos casos (en los que los bovinos compartan territorio con cérvidos), interferir con los programas de control o erradicación de RIB.

Por otro lado, se ha hallado una relación serológica entre el HVB-1 y el virus de la enfermedad de Aujeszky (pseudorabia-PrV), lo cual puede ser demostrado por

pruebas de hipersensibilidad retardada en el ganado (5). A pesar de ello, no hay protección cruzada. El análisis de los genomas de estos dos virus por cinética de reasociación, muestra que la homología es sólo del 8% (3) aunque presentan la misma organización genómica.

Debido a las reacciones cruzadas que se pueden presentar entre los herpes de rumiantes, el grupo de estudio de los Herpesvirus del ICTV (Comité Internacional de Taxonomía Viral) ha propuesto que los virus de esta familia que se relacionen serológicamente pueden ser clasificados como especies diferentes si: (a) sus genomas difieren de una manera realmente demostrable a través de análisis con enzimas de restricción, en más de un sitio y, (b) muestran características epidemiológicas y biológicas diferentes (4).

A pesar de que se tiene la secuencia completa del HVB-1 (Figura 1), hasta el momento, la relación entre los *Alfaherpesvirus* ha sido pobremente caracterizada, lo que se convierte en un obstáculo para el diagnóstico diferencial de estos agentes y para definir las relaciones filogenéticas entre ellos. A continuación se presentan algunos trabajos que se han realizado al respecto.

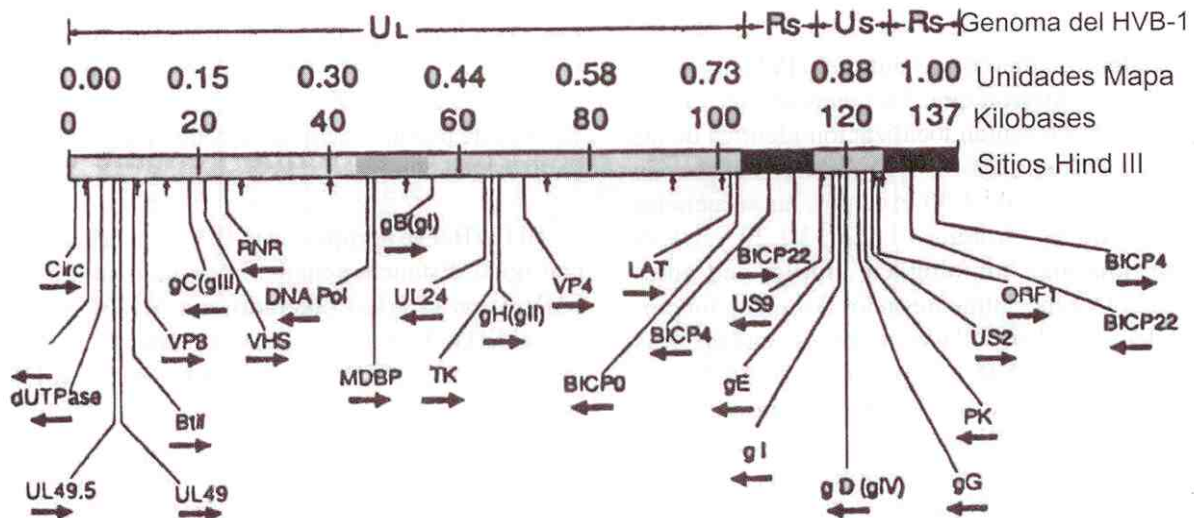


Figura 1. Adaptado de Tikoo (3). Mapa del HVB-1 (cepa cooper), en el cual se observa:

- a) La organización genómica característica de este agente, con un segmento único largo (UL), un segmento único corto (US) y dos secuencias invertidas repetidas (RS).
- b) La localización de algunos genes y la dirección en que se transcriben.
- c) La región en gris corresponde a los genes del UL30 al UL28 localizados exactamente entre 0.332 y 0.410 unidades mapa. Esta región incluye los genes que codifican para DNAPol (UL30), MDBP (UL29) e ICP18.5 (UL28).
- d) Los sitios de corte de la enzima Hind III (indicados con flechas).

El HVB-1, el HVB-5, el CapHV-1(Caprino), el BuHV-1(Búfalo), CerHV-1(Ciervo) y el RanHV-1(Rangíferos-renos) forman un grupo de virus que, además de estar antigénicamente relacionados, poseen genomas colineares, esto es que presentan organización genómica similar. El HVB-1 se usa como modelo para los trabajos de comparación genética en el estudio de los herpes que afectan a los rumiantes (6). Los seis virus mencionados, aunque presentan especificidad de especie, algunos de ellos pueden traspasar la barrera interespecie por lo menos en condiciones experimentales (4).

A pesar de la semejanza genómica entre estos *Alfaherpesvirus*, se presentan diferencias considerables en cuanto a su patogenicidad; el HVB-5 es de distribución mundial y produce meningoencefalitis en terneros; el Cap-HV-1 esta distribuido mundialmente e infecta el tracto digestivo de animales jóvenes, en los cuales puede ocasionar enfermedad generalizada; mientras que en cabras adultas puede producir infecciones subclínicas o ser causa de aborto, Vulvovaginitis o balanopostitis. El CerHV-1 se aisló de una enfermedad ocular en renos rojos (red deer) de Escosia y al igual que los anteriores, está distribuido mundialmente; el RanHV-1 se aisló de reindeer en Finlandia y se ha reportado evidencia serológica de infección en Caribús.

Un análisis comparativos entre el HVB-1 y otros herpesvirus, mostraron que: los genes situados entre UL30 y UL28, presentan localización idéntica de las señales de poliadenilación y organización colinear de los ORFs del UL28 al UL30. Además, las secuencias predichas para las proteínas UL28, UL29 y UL30 muestran una alta homología y similaridad entre ellos(Tabla 1), especialmente en los dominios funcionales. Además, se han hallado similitudes en los ORFs de otros genes del HVB-1 como UL18, UL19, UL15, UL5, UL39, y el UL40 con otros alfaherpesvirus. Es de resaltar que la alta homología, se presenta principalmente en proteínas que son requeridas para la síntesis de DNA viral (UL5, UL29, UL30, UL39 y UL40) y el empaquetamiento (UL15). Sin embargo, a pesar de la alta homología en esta región, se presentan diferencias en el contenido de C-G entre los siguientes virus, VZV (44.4%), EHV-1 (62%), HSV-1 (66%) a HVB-1(71.5%) (Tabla 1)(7).

En otros trabajos se han realizado análisis de secuencia del gen UL27(gB) y del gen UL**(gD), en

los cuales se ha encontrado que la secuencia central del UL27 es altamente conservada entre el CerHV-1, el RanHV-1, el HVB-1, HVB-5 y el CapHV-1. En cambio, la región secuenciada del gen D es más divergente (6).

Comparando las secuencias de aa para las proteínas: DNApol, MDBP y ICP18.5 de los alfaherpesvirus: HSV-1, HSV-2, VZV, EHV-1, PrV y HVB-1; de betaherpesvirus : HHV-1, MCMV y HCMV y de gammaherpesvirus : HVS y EBV, se construyeron árboles filogenéticos utilizando el método de UGPMA (Figura 2) (7).

Los árboles obtenidos para las tres proteínas separan de una manera clara las tres subfamilias: sin embargo, con la DNApol los alfa y los gamma revelan un origen común, diferente a los beta. Con la MDBP y la ICP18.5 los beta y los gamma se agrupan con un origen común y se separan claramente de los alfa.

Con respecto a la subfamilia alfa, los árboles obtenidos con las proteínas DNApol y MDBP separan claramente los géneros: *Simplexvirus* y *Varicellovirus*, lo cual esta de acuerdo con, algunos árboles obtenidos previamente utilizando el gen UL27(gB) de 14 alfaherpesvirus, que permitió dividir la subfamilia en estos dos linages (8); esta clasificación fue aprobada por el ICTV, a pesar de que en los árboles obtenidos con la ICP18.5, el VZV (prototipo del *Varicellovirus*) diverge de los otros virus alfa; todo este grupo presenta un origen común.

El HVB-1 se agrupó con el PrV en el árbol DNApol con igual distancia genética y en la misma rama del EHV-1; en el árbol obtenido con MDBP se agrupa con el EHV-1 (igual distancia genética) y la ICP18.5 agrupa HVB-1, EHV-1 y PrV pero coloca al HVB-1 separado.

En resumen, en los tres árboles se ve la coincidencia de la relación filogenética estrecha del HVB-1 con EHV-1 y PrV y con un margen de confianza mínima de 73%.

En otro trabajo, de análisis filogenético, utilizaron los genes gB y la gD de los virus HVB-1.1, HVB-1.2, HVB-5, RanHV-1, CapHV-1 y CerHV-1 (6) para, mediante la comparación de secuencias, construir dos árboles por los métodos de Neighbor-joining (NJ) y

Tabla 1. Contenido genético del *HSV-1* en el segmento de 10.5kb que va desde el *UL30* al *UL28* hacia el extremo derecho *UL*

HVB-1/UL ORF	TATA	ATG	Stop	AATAAA	Aminoácidos	MW (kDa)	Homólogos entre los Herpesvirus	Identidad (%)	% de homología Similaridad (%)	
UL30	3991-3997	3902	164	146-141 Consenso Extremo 3' 98-90	1246	134.2	PrV DNApol	68.8	81.2	
							EHV-1 DNApol	1220	62.5	77.2
							VZV DNApol	1194	59.5	74.1
							HSV-1DNApol	1235	58.9	73.7
							EBV DNApol	1015	39.6	59.3
							HCMV DNApol	1242	38.0	57.7
UL29	No hallado	4157	7766	7872-7877 Consenso Extremo 3' 7902-7909	1203	127.4	EHV-1 MDBP	62.1	79.0	
							VZV MDBP	1204	54.3	72.9
							HSV-1 MDBP	1196	54.0	72.8
							BHV-2 MDBP	1286	52.8	71.4
							EBV MDBP	1028	26.3	49.9
							HCMV MDBP	1235	24.9	48.9
UL28	7847-7853	7982	10460	No hallado	826	86.9	PrV DNApol	58.1	72.2	
							EHV-1 DNApol	766	55.6	70.4
							HSV-1 DNApol	785	53.3	70.2
							BHV-2 MDBP	664	53.5	70.2
							VZV DNApol	770	46.5	64.9
							EBV DNApol	789	28.6	50.8
HCMV DNApol	850	25.3	48.4							

Análisis de comparativos de las secuencias de los: ORF, caja T:AT:ATG, señal de parada, señal de poliadenilación en el extremo 3', número de aminoácidos y peso molecular (MW) entre el *HSV-1* y algunos alfa herpesvirus (*HSV-1*, *EHV-1*, *VZV*, *PrV* y *BHV-2*) y gamma herpesvirus (*EBV*, *HCMV*). Tomado de G. Meyer (7).

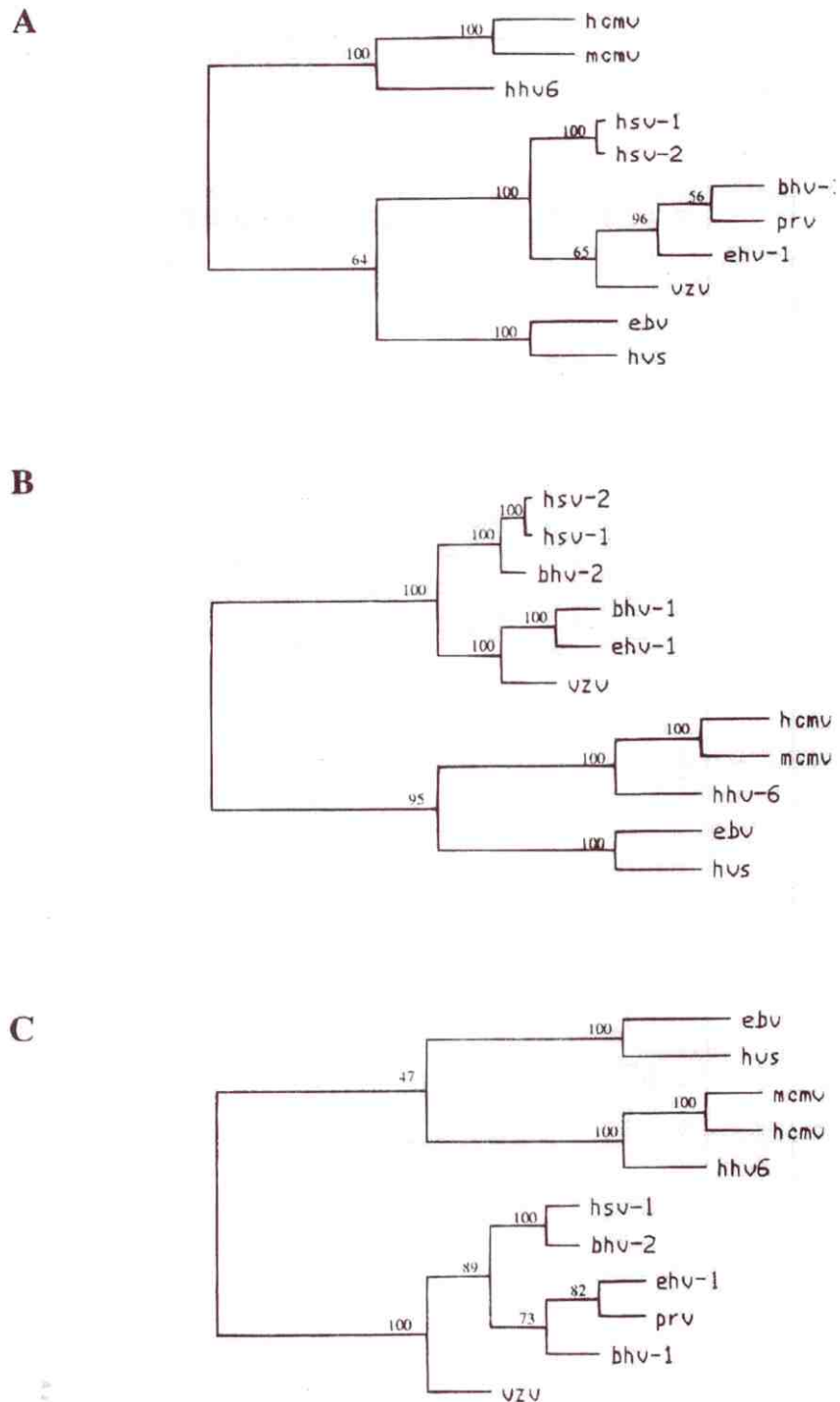


Figura 2. Arboles filogenéticos construidos por comparación de secuencias aminoacídicas putativas, obtenidas a partir de los genes (A) DNAPol, (B) Proteína de unión al DNA MBDP y (C) ICP18.5 de alfa herpesvirus (HSV-1, HSV-2, VZV, EHV-1, PrV y BHV-1), beta herpesvirus (Herpesvirus Humano 6-HHV-6, Citomegalivirus Murino-MCMV y Citomegalovirus Humano HCMV) y gamma herpesvirus (Herpesvirus saimiri y Virus de Eibstenbarr-EBV). Tomado del Artículo de Meyer G (7).

Parsimonia (Figura 3). En el árbol obtenido con Neighbor-joining, se muestra un grupo con igual origen filogenético conformado por, HVB-1.1, HVB-1.2, HVB-5 y separa los otro virus de los herpes bovinos. Además, localiza a los virus CapHV-1 y PrV como los más primitivos.

Con el método de Parsimonia, se obtiene un árbol consistente con el anterior en cuanto a que los HVB-1.1 y HVB1.2 presenta la misma distancia genética y se separan como en el anterior de HVB-5, considerándose este último como el más primitivo. La mayor distancia genética se presenta con respecto a PrV como en el caso de NJ.

Con respecto a los otros virus; de este análisis puede decirse lo siguiente: el RanHV-1 está más relacionado con el virus de CerHV-1 que con los de CapHV-1; por su parte, CerHv-1 está más relacionado a bovinos que a rangiferinos y caprinos. Estos datos están acuerdo con los obtenidos por Lyaku y colaboradores, quienes en análisis serológicos, encontraron que los virus de cervidos, caprinos y rangiferinos, poseen una relación más estrecha con el HVB-1 que entre ellos mismos. (6).

En este trabajo a pesar que se usaron varias cepas de HVB-1 no se hallaron diferencias suficientes en estos genes, que permitan clasificarlos en subtipos. La separación de PrV y HVB-1 de este trabajo, contrasta con el trabajo anterior, en el cual el análisis de las tres proteínas agrupa PrV, EHV-1 y HVB-1 (6 y 8).

Los futuros trabajos deben estar encaminados a aclarar el origen de la divergencia que condujo a la aparición de las especies de los Herpesvirus de rumiantes que circulan en la actualidad. Debido a que aún existen contradicciones cuando se hacen comparaciones de genes diferentes, es necesario hacer comparaciones utilizando mayor números de marcadores, incluyendo secuencias directas de DNA, puesto que si se conoce la historia natural del HVB-1 se puede medir la potencialidad de atravesar las barreras interespecie.

Variabilidad y patogénesis del HVB-1

Varios trabajos han demostrado susceptibilidad de diferentes especies en el laboratorio a la infección por HVB-1, entre ellas: Hurones, zorrillos, hamster, conejos, estos últimos, en especial, han servido como modelo experimental para el estudio de la infección latente (5).

En cabras, se desarrolla una sintomatología media y puede darse la transmisión natural entre ellas. En ovejas, se han encontrado anticuerpos y se ha demostrado que estos animales pueden transmitir la infección a otras ovejas y a terneros durante el periodo inicial de la infección. Sin embargo, en uno de los trabajos realizados no se pudo recuperar el virus latente por inmunosupresion, y además, no transmitieron el virus a pesar del tratamiento con dexametazona (9).

De acuerdo a los análisis del genoma viral y a los patrones polipeptídicos, las cepas de HVB-1 se pueden clasificar en los siguientes subtipos moleculares, de la siguiente manera: 1, 2a y 2b. Se han realizado varios estudios tendientes a aclarar la relación existente entre estos subtipos y el patrón de la enfermedad, de lo cual se ha hallado correlación parcial. El subtipo 1 se asocia a la forma respiratoria (RIB) y los subtipos contienen las cepas asociadas a las formas genitales (VPI/BPI) (10).

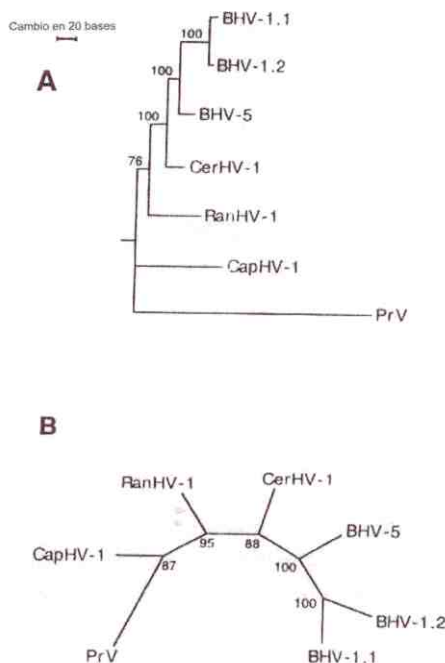


Figura 3. Árboles filogenéticos de alfa herpes virus de rumiantes, basados en la secuencia nucleotídica de los genes que codifican para gB y gD. El árbol A fue obtenido por el método de neighbor-joining y el árbol B por el método de Parsimonia. Tomado del artículo de Carlos ros (6)

En análisis de southern blot e hibridación con sondas de DNA del HVB-1 dirigidas contra una cepa de HVB-1 respiratoria, una genital y una encefalítica (HVB-5) mediante digestión con la enzima *PstI*, se pudo determinar que existen regiones hipervariables en las cepas de HVB-1. Los cambios se presentan después de un pase en el animal, cuando el virus se reactiva de la fase latente o cuando se presenta una superinfección con otra cepa de HBV-1, pero no hay cambios cuando se hacen pases *in vitro*. Las regiones hipervariables están localizadas en los genes reguladores inmediatos tempranos. Estas variaciones podrían deberse a cambios en la secuencia de nucleótidos en estos genes o a secuencias repetidas en tandem, similares a las halladas en el virus de la varicela-zoster (11).

Por otro lado, aunque no existe correlación total entre el subtipo molecular y el sitio donde se presentan las lesiones, en algunos trabajos se ha asociado el aumento en la frecuencia y la severidad de la enfermedad con la aparición de variantes virales, por ejemplo, en Inglaterra la incidencia de enfermedad clínica antes de 1977 era baja, a pesar de que existía una alta seroprevalencia (alrededor del 30%). Después de 1977, se comenzó a observar un incremento alarmante en la incidencia y la severidad de los brotes de RIB. Con la hipótesis de que podría ser un nuevo genotipo el causante de estos brotes, se realizaron dos estudios retrospectivos. Estos estudios revelaron que los aislamientos hechos antes de 1977 pertenecían al subtipo molecular 2b y los aislamientos posteriores al año 1977 pertenecían al subtipo molecular 1. Los investigadores concluyeron que la causa más probable de la presen-

cia del nuevo tipo, fue la introducción de animales Holstein, importados de Norte América.

Tres estudios realizados en Inglaterra, han comparado la patogenicidad de dos aislamientos, el HVB-1.1 y el HVB-1.2b. Entre los parámetros medidos estaban la duración y el nivel de excreción del virus. Las cepas HVB-1.1 tuvieron los niveles más altos excreción y por más largo tiempo. Además, los HVB-1.2b se asociaron con una virulencia mucho menor (12).

En Australia, donde los índices de seroprevalencia estaban alrededor del 30% (relativamente alta) y la presentación clínica de la enfermedad era baja, se presentó un aumento súbito en la severidad de los casos respiratorios entre los años 1989 y 1993. Tal aumento se asoció con la aparición de un nuevo genotipo de HVB-1 diferente al que había circulado durante varios años (cepas VPI subtipo HVB-1.2b). Aunque la nueva cepa se clasificó como HVB-1.2b al digerir con Hind III, se observaron diferencias con las cepas anteriores en el patrón de digestión con BamHI (12). Sin embargo, no se realizaron ensayos *in vivo* que demostraran una virulencia mayor de la nueva variante viral aislada.

Una situación similar podría estar ocurriendo en nuestro país, donde las evidencias clínicas y virológicas son muy escasas, a pesar de la alta seroprevalencia de infección. Por lo tanto, es factible pensar en la posibilidad de que circulen cepas con baja virulencia, que permanecen latentes por más tiempo o se replican de manera menos eficiente que las cepas ya caracterizadas. Esta posibilidad ha sido planteada por nuestro grupo desde hace varios años.

Summary

Although the complete sequence of the HVB-1 (prototype of study of the Alfaherpesviruses of ruminants) is available, the relationship among the Alfaherpesvirus has been poorly characterized. This becomes an obstacle for the differential diagnosis of this viruses and for the filogenetic analysis among them. In this review, we want to present some of the information which has been published recently on genomic, clinic and serological comparisons among the agents of this viral group, with special emphasis on BHV-1. The data presented are compatible with our hypothesis that IBR strains circulating in Colombia may be less virulent.

Agradecimientos

Agradecemos a COLCIENCIAS sus aportes al proyecto 1115-07-018-95.

Referencias

1. Fields B. *Virology Third edition*. New York. Raven Press. Pag: 224. 1996.
2. Engels M and Akcermann M. Pathogenesis of Ruminant Herpesvirus Infections. *Veterinary Microbiology*. Vol:53. Pag: 3-15. 1996.
3. Tikoo SK, Campos M y Babiuk LA. Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): Biology, Pathogenesis and Control. *Advances in Virus Research*. Vol:45. Pag:191-223. 1995.
4. Vanderplasschen A, Bublot M, Pastoret PP y Thiry. Restriction map of DNA of cervid herpesvirus 1 and cervid herpesvirus 2, two viruses related to bovine herpesvirus 1. *Archives of Virology*. Vol :128. Pag:379-388. 1993.
5. Straub OC. Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus. *Virus Infectious of Ruminants*. Pag:71-108.
6. Ros C and Belák S. Studies of genetic relationships between Bovine, Caprine, Cervine and Rangiferine Alphaherpesvirus and improved molecular methods for virus detection and identification. *Journal of Clinical Microbiology*. Pag: 1247-1253. 1999.
7. Meyer G, Vlcek C, Paces V, O'hara MK, Pastoret PP, Thiry E and Schwyzer M. Sequence analysis of the bovine herpesvirus type 1 genes homologous to the DNA polymerase (UL30), the major DNA-binding protein (UL29) and ICP18.5 assembly protein (UL28) genes of herpes simplex virus. *Archives of Virology*. Vol:142. Pag:89-102. 1997.
8. McGeoch D y S. Cook. Molecular Phylogeny of the Alphaherpesvirinae Subfamily and a Proposed Evolutionary Timescale. *Journal of Molecular Biology*. Vol: 238. Pag:9-22. 1994
9. Hage JJ, Vellema P, Barkema HW y cols. Experimental Infection in Sheep. *Symposium on IBR and other ruminant herpesvirus infections*. July 1995.
10. Pastoret PP, Burtonbuy G, Aguilar-Setien E, Godart M, Lamy ME, Schoenaers F. Comparison between strains of infectious bovine rhinotracheitis virus (Bovine herpesvirus 1) from respiratory and genital origins, using polyacrylamide gel electrophoresis of structural proteins. *Veterinary Microbiology*. Vol:5. Pag: 187-194. 1980.
11. Whetstone CA, Seal BS and Miller JM. Variability occurs in the inverted repeat region of genomic DNA from bovine herpesvirus 1 respiratory, genital and bovine herpesvirus 5 encephalitic isolates. *Veterinary Microbiology*. Vol :38. Pag: 181-189. 1993.
12. Smith GA, Young PL and Reed KC. Emergence of a new bovine herpesvirus 1 strain Australian feedlots. *Archives of Virology*. Vol : 140. Pag: 599-603. 1995.