

Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (RIB). Caracterización Molecular de una cepa Colombiana de Herpesvirus Bovino tipo 1

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

Grupo de Inmunoviriligía - Biogenesis, Facultad de Medicina Universidad de Antioquia
A.A 1226. Medellín-Colombia*

(Recibido: 11 septiembre, 2000; aceptado: 15 noviembre, 2000)

Resumen

El Herpesvirus Bovino 1 (HVB-1) produce, en el ganado, enfermedades respiratorias, genitales y otros síntomas clínicos que ocasionan pérdidas económicas importantes. Los estudios de prevalencia en Colombia indican que este agente está ampliamente distribuido, pero las evidencias clínicas y virológicas son escasas. Por esta razón se ha propuesto que las cepas de HVB-1 que circulan en Colombia son diferentes a las que circulan en aquellos países donde la RIB constituye un serio problema de salud animal. A pesar de los intensos y extensos esfuerzos para tratar de aislar el virus, hechos desde 1993 (2416 muestras probadas en nuestro laboratorio), además del esfuerzo de otros grupos en el país, no se han logrado aislamientos. En este estudio se informa sobre la caracterización molecular de uno de los aislamientos hecho en Colombia en los últimos 20 años. El perfil polipeptídico y los RFLPs indican que se trata de una cepa de HVB-1 subtipo 2b (tipo VPI). Los virus pertenecientes a este subtipo se han asociado principalmente a VPI y BPI. Este hallazgo, junto con la carencia de aislamientos, concuerda con la hipótesis de que las cepas virales que circulan en el país son de baja virulencia y que la infección no es un problema de gran impacto económico.

Palabras clave: *Aislamiento, patrón de restricción, perfil proteico.*

Introducción

La infección por el HVB-1, se ha asociado con diferentes presentaciones clínicas; la principal es un síndrome respiratorio conocido como RIB, el cual se asocia a “tormentas de abortos”, nombre que se le da a la inducción de abortos en masa cuando se presenta la infección por primera vez en animales gestantes (15). Existen también formas genitales conocidas como VPI y BPI asociadas a infertilidad temporal en vacas. Además, este agente puede producir conjuntivitis, metritis, mastitis y formas diseminadas en terneros, y hasta hace poco se describían formas encefalíticas; sin embargo, el uso de tecnologías más finas para la

clasificación viral han identificado el agente causal de este último cuadro clínico como un herpes diferente al que se le ha dado el nombre de HVB-5 (14).

El HVB-1 responsable de grandes pérdidas económicas debido a la disminución en la producción de leche y carne, por los gastos generados en el cuidado, diagnóstico, tratamiento de los animales infectados, y por los costos de los planes nacionales de control (14). Aunque existen varios tipos de vacunas comerciales, estas sólo reducen la severidad de la enfermedad (7). En el laboratorio no se pueden diferenciar los animales vacunados de los infectados de manera natural (2), por lo que los trabajos sero-epidemiológicos son de valor

* Dirección para solicitar reimpresos

limitado en aquellos sitios donde la distribución y aplicación de la vacuna no se controla.

En Colombia, al contrario de lo que ocurre en otros lugares del mundo donde la enfermedad está bien caracterizada (14), se encuentran tasas de seroprevalencia relativamente altas (que han alcanzando hasta 67%) sin ninguna o muy poca evidencia clínica o virológica (sólo se han realizado 16 aislamientos desde 1972) (1). Varios proyectos realizados, recientemente en Colombia, tendientes a aislar el virus, han resultado infructuosos (1,4,12). En los últimos 20 años sólo se ha reportado un aislamiento y esto mediante la aplicación de corticoides para estimular la reactivación viral. Este aislamiento, realizado por Góngora y colaboradores en 1995, se hizo a partir de muestras tomadas de un toro seropositivo de la sabana de Bogotá (3). Esta cepa fue comparada con dos cepas de referencia (cepas Colorado y Iowa) y no se hallaron diferencias en el perfil proteico ni diferencias inmunológicas mediante la prueba de Western blot (10). La Cepa fue donada a nuestro laboratorio por el posgrado de la facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional, y su caracterización molecular es objeto de la presente comunicación. En 1999, este mismo grupo, realizó otro aislamiento utilizando el mismo método (comunicación personal)

Análisis genómicos utilizando RFLPs y la electroforesis de proteínas virales en geles de SDS-PAGE, de manera independiente, han permitido establecer un sistema clasificación del HVB-1 en 5 subtipos: 1.1 semejantes a RIB, 1.2a y 1.2b semejantes a VPI/BPI y 1.3a y 1.3b que producen encefalitis y son actualmente clasificadas como Herpesvirus Bovino 5 (8,11). En algunos países se ha reportado la emergencia de nuevas cepas, que se caracterizan por presentar un patrón de restricción diferente y también con diferentes grados de virulencia (13). No se ha encontrado correlación directa entre el perfil de patrones de restricción y el grado de virulencia en el HVB-1. Aunque se sugiere que las cepas respiratorias o tipo Cooper (subtipos 1.1) producen brotes más severos que las cepas genitales llamadas también tipo K22 (subtipos 2a y 2b) (8,9).

El objetivo de este trabajo fue caracterizar los tipos de cepas que circulan en Colombia con el fin de poner a prueba la hipótesis de que estas son diferentes a las

cepas que se encuentran en países donde la RIB tiene gran impacto clínico.

Materiales y Métodos

Toma, transporte y procesamiento de muestras para Aislamiento

Se tomaron hisopos de fosas nasales, de vagina o de prepucio de 1013 animales (1344 muestras) para el aislamiento viral. Luego los hisopos se sumergieron en 2 ml de medio de transporte Hank's al 2% de suero bovino fetal (SBF), 1% de penicilina y 1% de anfotericina para ser transportado a 4°C al laboratorio. Posteriormente se centrifugó a 2500 RPM durante 10 min a 4°C, se descartó el sedimento y al sobrenadante se le agregó penicilina al 1% y se congeló a -70 hasta su inoculación.

Se sembraron platos de 24 pozos con 150.000 células MDBK por pozo con medio MEM al 10% SBF y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Luego se descartó el medio de cultivo se lavó con PBS y se inocularon 200 ul de la muestra, se incubó a 37°C durante 1 hora con agitación cada 15 minutos. Se eliminó el exceso de muestra, se le agregó 1 ml de medio MEM al 2% de SBF, se incubó a 37°C y se le hizo seguimiento durante 7 días para determinar la presencia del efecto citopático característico.

También se tomaron muestras de tracto respiratorio y genital de 5 animales seropositivos tratados con una dosis de 40 mg/kg de peso de dexametazona intramuscular por 5 días. El muestreo y el seguimiento se hizo durante 10 días, tiempo durante el cual se midió la temperatura corporal y se buscó la aparición de algún síntoma de reactivación.

Caracterización de una cepa viral

Cepas virales. La cepa utilizada como referencia fue la cepa Colorado-1, Cooper 1 (Coop). Ref: ATCC VR-864, aislada de tracto respiratorio y la cual pertenece al subtipo 1 según la clasificación de Metzler y colaboradores, donada por la Universidad de Wisconsin y la cepa Bogotá (Bog) caracterizada fue la aislada por Góngora, en 1995, donada por el posgrado de salud y producción animal de la Universidad Nacional, sede Bogotá.

Titulación. La titulación viral se realizó por el sistema de Unidades Formadoras de Placa (UFP) como se describe a continuación. Se sembraron platos

de 24 pozos con 150.000 células MDBK por pozo con medio MEM al 10% SBF y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Luego se descartó el medio de cultivo se lavó con PBS y se inocularon 200 ul de diluciones decimales de ambas cepas virales (Bogotá 95 y Cooper). Se les agregó 800 ul de MEM al 2% de SBF y 1.5% de carboximetil celulosa. Se incubaron durante 72 horas al cabo de los cuales se colorearon con cristal violeta para evaluar las placas.

Perfiles Proteicos en SDS-PAGE. Monocapas de células MDBK de 24 horas, se inocularon con un índice de multiplicidad de Infección (MOI) de 10 con las cepa de referencia tipo Cooper y con la cepa Bogotá. Luego de la infección se incubó durante 1 h a 37°C y se agregó MEM que contenía 1/10 de la concentración usual de metionina y 2% de SBF. A las 8, 12 y 15 h posinfección se le agregó 20 uci de ³⁵S-metionina a las células infectadas y al control de células no infectadas. A las 24 horas se recolectaron los sobrenadantes y las células para posteriores análisis en SDS-PAGE.

Las células fueron lisadas por congelación y descongelación. Se transfirieron a tubos y se resuspendieron en 1 ml de buffer de solubilización (50 mM Tris-Hcl pH 6.8 que contenía 3% de SDS, 5% de 2-mercaptoetanol, 3% de glicerol y azul de bromofenol), se calentó a 100°C por 3 min y se guardaron a -70°C hasta su análisis.

El virus se purificó a partir de lisados celulares de la siguiente manera: Los lisados de células infectadas se centrifugaron a 10.000 x g 30 min a 4°C, se descartó el sedimento y el sobrenadante se ultracentrifugó a 100.000 x g durante 7 h. Posteriormente se resuspendió el sedimento en buffer de solubilización, se calentó para desnaturalizar las proteínas y se almacenó a -70°C. Las proteínas vírales se resolvieron por electroforesis en SDS-PAGE a diferentes concentraciones según el método de LAEMMLI (5).

Para determinar el peso molecular de las proteínas virales se usaron dos sistemas de marcadores de peso molecular: un estándar de proteínas de colores no radio-marcado (caleidoscopio de Amersham) y otro de proteínas marcadas con ¹⁴C (¹⁴C - Proteínas metiladas de Amersham). Se transfirieron a papel Watman y se expusieron 72 horas en películas Hyperfil-Bmax de Amersham. Por último se hizo el

revelado. La determinación de los pesos moleculares de las proteínas se obtuvieron mediante una curva estándar de Log PM vs RF de las proteínas marcadoras estándar, utilizando para ello el programa PRISMA.

Patrones de restricción. Las cepas de virus Bogotá 95 (Bog) y Cooper (Coop) fueron multiplicadas en monocapas de células MDBK usando frascos de 25 cm². Cuando los cultivos presentaron el 90% del efecto citopático, se congelaron y descongelaron las células 3 veces. Posteriormente se sometieron estos lisados a centrifugación a 10.000 x g durante 30 min, se tomó el sobrenadante y se ultracentrifugó (ultracentrífuga Beckman rotor SW 40) a 100.000 x g durante 7 horas a 4°C en un colchón de sacarosa al 20%. El sedimento se resuspendió en 1 ml de PBS y se guardó a -70 para la extracción del DNA viral. También se tomaron lisados completos células infectadas se congelaron y se descongelaron para extracción de DNA viral.

Extracción de DNA. Para la obtención del DNA viral se utilizaron diferentes métodos. En un principio se purificó el virus por ultracentrifugación, sin embargo, el rendimiento fue muy bajo, por lo tanto, se uso DNA extraído de lisados de células infectadas y se separó en geles de bajo punto de fusión, luego se corto la banda que correspondía a un tamaño aproximado de 145 Kb y se hizo extracción con fenol:cloroformo. Con esta técnica tampoco se lograron los resultados deseados, debido a que no se pudo separar el DNA del gel, así que, se cambio de estrategia y aprovechando la propiedad del HVB-1 de inducir apoptosis en las células infectadas y por consiguiente la degradación del DNA celular (6), se realizó extracción de lisados de células infectadas con un efecto citopático mayor del 90%. Con este procedimiento se obtuvieron buenos resultados que son los que se presentan en la figura 2.

El DNA del virus purificado o los lisados, se incubó con 0.2 mg/ml de proteinasa K y 1% de SDS durante 1 h a 56 C. Para inactivar la enzima se calentó a 95 C por 10 min. Se centrifugó 10 min a 3500 RPM y se descartó el sobrenadante.

La extracción del DNA, se hizo por el método Fenol:Cloroformo, con el siguiente protocolo: A 15 ml del virus purificado se le agregó 1 volumen de fenol, se centrifugó a 3.500 RPM durante 10 min. Se tomó

la fase acuosa y se le agregó 1 volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico en una proporción 25:24:1, se mezcló suavemente se centrifugó a 3.500 RPM por 10 min a 4°C. Se tomó la fase acuosa y se le agregó 2,5 volúmenes de etanol puro y 0.1 volumen de acetato de sodio para precipitar el DNA. Se dejó 24 horas en refrigeración, se centrifugó a 3.500 RPM a 4°C durante 10 min, se descartó el sobrenadante, se adicionó etanol al 70%, se centrifugó nuevamente a 3.500 RPM a 4°C durante 10 min, se descartó el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió el DNA en 50 ul de buffer TE.

Digestión de DNA con la enzima de restricción Hind III. La digestión se realizó de acuerdo con las especificaciones de los proveedores de las enzimas. Se tomaron 2 ug aproximados de DNA y se digirieron con 2 ul de la enzima HindIII, en una concentración de 20 u/ul. Se incubó a 37°C durante toda la noche. Los productos de la digestión se resolvieron por medio de electroforesis en agarosa al 0.4%, luego se revelaron con bromuro de etidio.

El tamaño de los fragmentos de restricción se obtuvo mediante una curva de calibración del Log tamaño en pares de bases vs movilidad de un marcador de peso (fago lambda digerido con Hind III) utilizando el programa PRISMA.

Resultados

Aislamiento

En este trabajo se realizaron 1344 intentos de aislamiento del HBV-1, con el fin de determinar que tan ampliamente circula el virus en Colombia y para hacer la comparación molecular y patogénica de las cepas autóctonas con cepas de referencia. Se probaron 1001 hisopos vaginales, 346 nasales, 66 prepuciales, 21 oculares y 6 biopsias, procedentes de 5 regiones del país (Antioquia, Cordoba, Atlántico, Huila, Cundinamarca). El total de animales probados fue de 1013. De estos intentos no se obtuvo ningún aislamiento. Vale la pena anotar que dentro de estos animales, están los 5 que fueron inmunosuprimidos y en ellos no se observó evidencia clínica, ni virológica de reactivación.

Titulación

En todos los ensayos realizados el título de la cepa Bog siempre fue mayor que el obtenido con la cepa Coop, 1.3×10^6 en Bog y 6.8×10^4 en Coop. Los tamaños

de las placas en ambas cepas fueron heterogéneos; la única diferencia encontrada fue un título mayor en la cepa Bog.

Perfiles Proteicos en SDS-PAGE de la cepa Bogotá (Bog) y de la cepa de referencia (Coop).

En el primer ensayo se compararon los perfiles proteicos de lisados de células infectadas con ambas cepas virales. En estos, se identificaron 20 proteínas en la cepa Bog y 19 en la cepa Coop (datos no mostrados). Las proteínas detectadas aquí no permitieron clasificar la cepa Bog. Algunas bandas en Bog y en Coop se detectaron en los controles celulares, sin embargo, en las células infectadas su intensidad fue mayor. Esto podría sugerir que son proteínas virales que presentan el mismo peso molecular que las celulares o que el virus modula la expresión de algunas proteínas celulares.

La comparación de las proteínas obtenidas de virus purificados, por ultracentrifugación a través de un colchón de sacarosa, permitió la identificación de 25 proteínas del virus Bog y 11 del virus Coop. Los pesos moleculares de estas proteínas en la cepa Bog oscilaron entre 132.6 kDa y 14.3 kDa; en la cepa Coop presentaron pesos entre 165 kDa y 14.3 kDa. Con esta metodología se logro obtener buena resolución y sin interferencia de proteínas celulares. A pesar de ello, la concentración de virus no fue suficiente para permitir la clasificación de la cepa problema; sin embargo algunas proteínas como 2 (118.4 kDa), 12 (57.3 kDa), 13 (52.6 kDa) y 15 (50.7 kDa) son compatibles con un patrón de subtipo 2.

En el segundo ensayo se utilizó un gel de poliacrilamida en gradiente de 5 a 20% para alcanzar una resolución mayor de cada proteína. Al comparar los extractos de células infectadas y no infectadas se detectaron 27 proteínas del virus Bog y 16 del virus Coop. Los pesos moleculares de las proteínas en la cepa Bog oscilaron entre 197 kDa y 16.7 kDa; en la cepa Coop mostraron pesos entre 162.1 kDa y 16.3 kDa (véase Figura 1). En ningún caso se detectaron diferencias en cuanto al número de proteínas virales con respecto a los tres tiempos pi, pero si se observaron diferencias en la intensidad de las bandas, en forma directamente proporcional al tiempo.

Es de resaltar que, ninguno de los dos virus logró inhibir completamente la síntesis de macromoléculas por parte de la célula, puesto que aun en extractos con

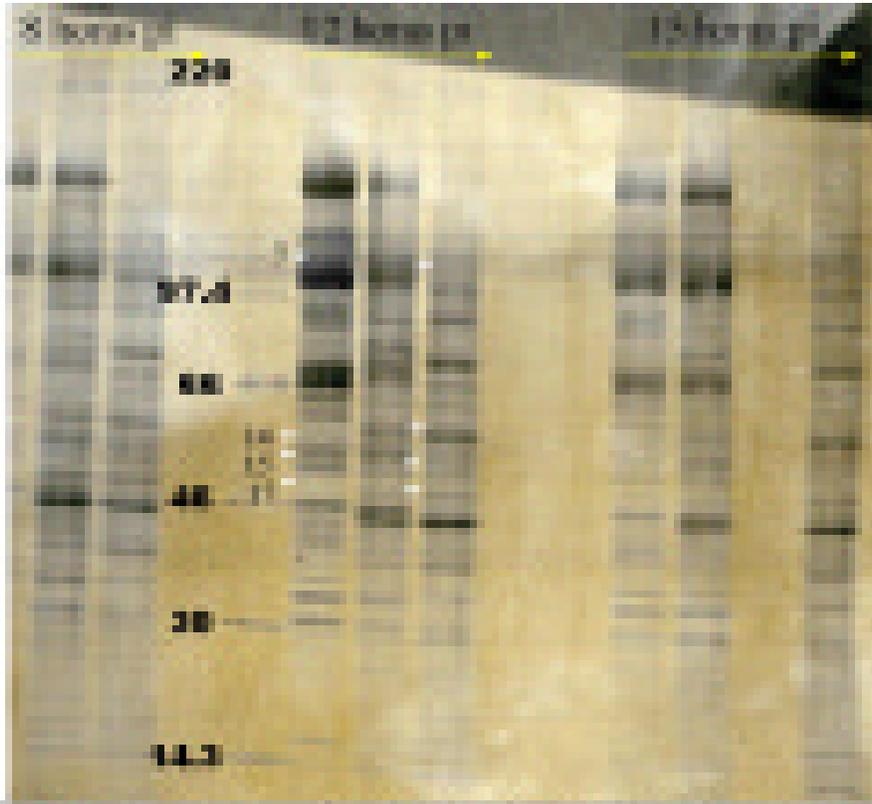


Figura 1. Autoradiografía de un gel SDS-PAGE en gradiente de 5 a 20%. La descripción de los carriles en el gel es la siguiente: 3, 8 y 14 controles celulares no infectados; 1, 6 y 11 lisado de células infectadas con Bog; 2, 7 y 12 lisado de células infectadas con Coop; 4 y 13 sobrenadante de células infectadas con Bog y 9 sobrenadante de células infectadas con Coop; 10 marcadores de peso en frío; 5 marcadores de peso molecular de 220 kDa, 97 kDa, 66 kDa, 46 kDa, 30 kDa y 14.3 kDa. Del 2 al 5 muestras de células recolectadas a las 8 horas pi, del 7 al 10 a las 12 horas y del 12 al 15 a las 15 horas pi.

(*) Bandas que permiten clasificar este aislamiento como subtipo 2b.

15 horas pi, se pueden detectar proteínas celulares, encontrándose menor cantidad en la cepa Bog, lo cual significa que esta cepa es más eficiente en la inhibición de la síntesis de proteínas celulares y en la producción de las propias, como lo demuestra la presencia de un número mayor de proteínas virales en cada uno de los tiempos pi.

En este ensayo, también se evidenció que algunas bandas en Bog y en Coop se detectaron en los controles celulares, sin embargo, en las células infectadas su intensidad fue mayor.

La resolución obtenida en el gradiente de poliacrilamida, permitió clasificar el virus Bog, mediante las bandas 7 (119 kDa), 14 (59.6 kDa), 15 (53.9 kDa) y 17 (50.7 kDa), como subtipo 2b (11).

Patrones de restricción

Se observó que, al igual que en los perfiles polipeptídicos, hay una mayor intensidad de las bandas correspondientes al DNA genómico del virus Bog, lo que estaría a favor de una mayor eficiencia en la replicación de esta cepa con respecto a la cepa Coop.

En la figura 2 se muestra un perfil electroforético del DNA de las cepas Coop y Bog de digerido con las enzimas Eco RI, Bam HI y Hind III. Los carriles están distribuidos de la siguiente forma: 1 DNA sin digerir de la cepa Bog, 5 DNA no digerido de la cepa Coop de virus purificado. 2 DNA Coop digerido con EcoRI (Coop + Eco RI), 3 Bog + EcoRI, 4 Coop + EcoRI, 6 Bog + Bam HI, 7 Coop purificado + Bam HI, 8 Bog purificado + Hind III y 9 Bog + H, 10 Coop + Hind, 12 Coop no digerido.

En el corte con la enzima Hind III, se observan 12 bandas en la cepa Bog y 9 en la cepa Coop. Los tamaños de las bandas estuvieron entre 19.5 Kb y 2.2 Kb en Bog y entre 20.8 Kb y 8.3 Kb en la cepa Coop. Se observan diferencias en el patrón de migración así: en la cepa Coop se observa un patrón de migración característico de las cepas subtipo 1 determinado 10⁶ principalmente por la migración de las bandas K y L identificadas en este trabajo como las bandas 8 (8.8 Kb) y 9 (8.3 Kb). En la cepa Bog las bandas K y L identificadas como 8 (9.1 Kb) y 9 (7.6 Kb) permiten incluir esta cepa en el subtipo 2 y la banda I identificada como 7 (9.7 Kb) indican que esta cepa pertenece al subtipo molecular 2b (véase Figura 2) (11).

Discusión

Este informe hace parte de un proyecto de investigación dirigido a la caracterización molecular

de cepas de HVB-1 en Colombia, justificado por la necesidad de resolver las aparentes incongruencias que existen entre la relativamente alta prevalencia serológica y la muy escasa evidencia virológica y clínica. Ante la imposibilidad de obtener aislamientos en la feria de ganado de Medellín, que reúne animales de prácticamente todas las regiones del país, se decidió ampliar el área de interés a nivel nacional. A pesar de esto no se ha obtenido ningún aislamiento entre más de 2400 muestras que se han probado desde 1993. Igual suerte han corrido los investigadores de la Universidad Nacional, sede Bogotá, quienes en un momento dado recurrieron a inmunosuprimir a un animal seropositivo y obtuvieron la reactivación de un virus que donaron amablemente a nuestro grupo y que fue el objeto del presente estudio.

Se encontró que la cepa Bog tiene mayor capacidad de replicarse en células MDBK en comparación con

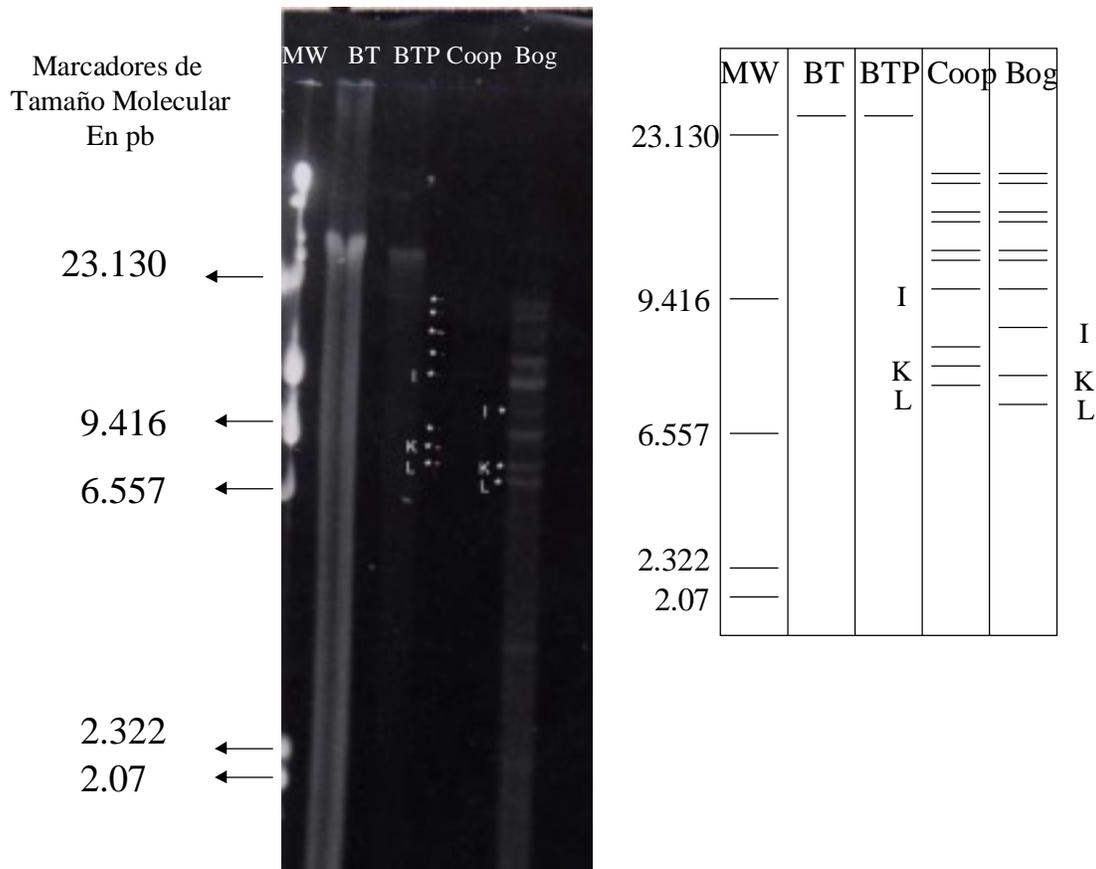


Figura 2. Comparación de los Perfiles de Restricción, entre las cepas Coop y Bog, obtenidos con la enzima Hind III. A la derecha se observa un gel de agarosa al 8%, en vista de que en esta foto no se observan bien las bandas, al lado derecho aparece un esquema del gel; MW, corresponde la marcados de tamaño molecular; BT, al DNA del virus Bogotá sin digerir, obtenido de células infectadas; BT, DNA del virus Bogotá purificado; Coop, patrón de restricción de la cepa de referencia; Bog patrón de restricción de la cepa Bogotá. Las Bandas I, K y L permiten la subtipificación molecular.

la cepa Coop; el título viral fue siempre mayor (1.3 x UFP en Bog comparado con 6.8 10⁴ UFP/ml en Coop) lo cual, en principio, podría explicarse por la adaptación de la referencia a estas células. Del virus Bog se detectaron un mayor número de proteínas y aparentemente una mayor cantidad de las mismas, dada la mayor intensidad de las bandas en comparación con la cepa Coop (véase Figura 1).

El primer intento de caracterización por el perfil proteico, utilizando virus purificado y SDS-PAGE al 10%, no permitió la clasificación de los virus principalmente por la escasa cantidad de proteína viral y la baja resolución del gel (datos no mostrados); se procedió entonces a la utilización de lisados de células infectadas y a un gradiente de SDS-PAGE (5-20%) y de esta manera se pudo determinar que, acorde con la propuesta de clasificación de Metzler y colaboradores y en comparación con la cepa Coop que pertenece al subtipo 1, el virus Bog pertenece al subtipo 2b (véase Figura 1).

En cuanto a la caracterización por enzimas de restricción se observó, en primer lugar, que la cepa Bog fue más eficiente para la producción de DNA, lo cual es compatible con su aparente mayor virulencia "in vitro". Al digerir con Hind III y resolver los fragmentos en agarosa, se corroboró el resultado del perfil proteico, tanto para la cepa Coop como para cepa Bog. Específicamente las bandas K, L é I, presentes en la cepa Bog definen su naturaleza de subtipo 2b (véase Figura 2) (8).

El problema que se quiso resolver con el proyecto sigue vigente, ante la carencia de virus para caracterizar; sin embargo, los resultados concuerdan con la idea de que la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina, en Colombia, no representa un gran impacto económico. La mayor conclusión de este estudio, que podemos derivar de la ausencia de aislamientos virales, es que el virus no circula ampliamente. También se puede formular la presunción de que los altos porcentajes de seroprevalencia, obtenidos en estudios previos, fueron el resultado del uso de ilegal de vacunas, pero se debe considerar la posibilidad de circulen cepas

de baja virulencia que sean las responsables de los títulos de anticuerpos hallados en trabajos previos.

La caracterización del virus Bog como cepa 2b, si bien este resultado no deja de ser anecdótico, si es congruente con la hipótesis anterior, que sigue sin contrastación, así pues cepas que circulan en Colombia no son de una alta virulencia, ni se asocian con alta prevalencia de abortos.

Esta línea de investigación sobre herpesvirus de bovinos, en la actualidad, cobra una importancia adicional: La presión de las compañías multinacionales, con el estímulo de la apertura económica y con el aval de las autoridades nacionales, han logrado la legalización de la vacuna en el país. No son claras las razones de orden técnico que hayan mediado para tomar esta decisión; además se legalizó el uso de la vacuna pero no se estableció un plan de vacunación. Podríamos decir que este es un ejemplo claro de como puede, en un momento dado, funcionar la apertura económica, abriendo las fronteras a productos eventualmente innecesarios y de paso cerrándolas a la eventual salida de los productos nacionales.

Los investigadores del país nos estábamos preparando para otras alternativas como la erradicación de la infección, en la medida en que los recursos para la investigación y desarrollo tecnológico lo venían haciendo posible. En nuestro laboratorio, en particular, se estandarizaron las técnicas más sensibles y económicas, para la detección de virus y de anticuerpos como base para la evaluación del impacto económico real y para asistir un eventual programa de erradicación. Pero llegó primero la decisión política!

Ahora el país tendrá que invertir, en principio, *ad infinitum*, parte de sus divisas en la importación de vacunas y hemos perdido, de paso, la oportunidad de ofrecer un producto de exportación con el valor agregado de ser libre de RIB, pero más allá de las lamentaciones, aunque justas, nuestra vocación, de científicos, nos exige seguir contribuyendo en la caracterización de la RIB hasta sus últimas consecuencias, asumiendo ahora el "problema" adicional de la vacuna.

Agradecimientos

A colciencias proyecto 1115-07-018-95. A los ganaderos que proporcionaron los animales y las muestras. Al posgrado de salud animal de la Universidad Nacional, sede Bogotá y a la Universidad de Wisconsin, por las cepas virales analizadas.

Summary

Infectious Bovine Rinotracheitis (IBR). Molecular Characterization of a Colombian strain of Bovine herpesvirus type 1

Bovine Herpesvirus 1 (BHV-1) affects cattle and is associated with respiratory disease (IBR), reproductive tract disorders (IPV and IPB) and other symptoms which may cause significant economic losses. Serologic studies of prevalence in Colombia indicate that this agent is distributed in relatively wide manner, but the clinic and virological evidence is scarce. It has been proposed therefore that the of BHV-1 strains that exist in this country are different from those circulating in other regions of the world where the virus is tightly associated with disease and economic losses. Several groups have tried to isolate the virus since 1993 ; particularly in our laboratory we have tested 2416 samples, but all these efforts have been unsuccessful. This report is about molecular characterization of only one isolate in the last 20 years, which was obtained by means of corticosteroid treatment of a seropositive bull. The polypeptide and RFLPs profiles indicated that this isolate corresponds to BHV-1 subtype 2b ; which is associated with reproductive symptoms but not with abortion. Altogether, this result is in agreement with the hypothesis that the BHV-1 does not circulate widely in Colombia and are only mildly associated with disease ; therefore, at this point in time this does not seem to be a problem of economic importance in our country.

Keywords: *Isolation, protein profile, restriction patterns.*

Referencias

- Arboleda J, Bedoya D, Rodas J, Acebedo L y Ossa JE. Estudio Viroológico y Epidemiológico de la RIB en un hato Lechero en Antioquia. *ACOVEZ*. 1993; 34-35
- Collins J, Butcher A and Riegel C. Immune response to bovine herpesvirus type 1 infections: virus specific antibodies in sera from infected animals. *J Clin Microbiol*. 1985 ;21 :546-552
- Góngora A, Villamil L, Vera V, Parra J, Ramírez G y López G. Aislamiento de un Herpes Virus Bovino tipo 1 de secreción Nasal y Esmegma Preputial en un Toro Reproductor. *Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia*. 1996 ;43 :43-46
- Góngora A, Villamil L, Vera V, Ramírez G y Parra J. Diagnóstico de las Principales Enfermedades Reproductivas en Toros de la Sabana de Bogotá. Énfasis en RIB. *Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia*. 1995 ;43 :37-41
- Laemmli. *Current Protocols*. Unit 8.4. 1991.
- Laxminarayana R and Clinton J Activation of caspases and p53 by bovine herpesvirus 1 infection results in programmed cell death and efficient virus release. *J of Virol*. 1999 ;73 :3778-3788
- Lemaire M, Pastoret P and Thiry E. Le contrôle de l'infection par le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine. *Annales de Médecine Vétérinaire*. 1994 ;183 :167-180
- Metzler A, Matile H, Gassman U and et al. European isolates of bovine herpesvirus 1: A comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides, and reactivity with monoclonal antibodies. *Archives of Virology*. 1985 ;85 :57-69
- Misra V, Babiuk LA, Darcel C. Analysis of bovine herpesvirus type 1 isolates by restriction endonuclease fingerprinting. *Arch Virol*. 1983 ;76 :341-354
- Molano D, Rodríguez J, Ramírez G y Villamil L. Caracterización electroforética e inmunológica de una cepa de campo del virus de la Rinotracheitis Infecciosa Bovina y su comparación con cepas de referencia. *Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia*. 1996 ;43 :35-38
- Pastoret P, Burtonboy E, vander Maaten M and et al. Comparison between strains of infectious rinotracheitis virus (Bovine herpesvirus 1 from respiratory and genital origins, using polyacrylamide gel electrophoresis of structural proteins. *Vet Microbiol*. 1980 ;5 :187-194
- Restrepo M, Rodas J, Mogollón Milady, Zuluaga F y Ossa J. Aislamiento del virus de la RIB de animales para el sacrificio en el área metropolitana de Medellín. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 1996 ;1 :59-63
- Smith G, Young P and Reed K. Emergence of a new bovine herpesvirus 1 strain in Australian feedlots. *Arch Virol*. 1995 ;140 :599-603
- Straub O C. *Virus Infectious of Ruminants*. Ed: Dinter 2 and Morein B. Elsevier Publisher. 1990 ;3 :71-108
- Webster RG, Granoff A. *Encyclopedia of Virology*. 1994 ;1 :155