

# XXI REUNIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA

“DR. BERNARDO JORGE CARRILLO”

## ASOCIACION ARGENTINA DE VETERINARIOS DE LABORATORIO DE DIAGNOSTICO

Fundada el 21 de noviembre de 1984

Personería Jurídica 439/96

Afiliada a la World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians (WAVLD)



6, 7 y 8 de OCTUBRE de 2016  
SAN SALVADOR DE JUJUY

XXI Reunión científico-técnica Dr. Bernardo Jorge Carrillo : Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico / Raúl Eduardo Marin ... [et al.] ; compilado por Raúl Eduardo Marin ... [et al.]. - 1a ed . - San Salvador de Jujuy : Universidad Nacional de Jujuy, 2016.

182 p. ; 29 x 21 cm.

ISBN 978-987-3926-15-0

1. Diagnóstico. 2. Veterinaria. 3. Bacteriología. I. Marin, Raúl Eduardo II. Marin, Raúl Eduardo, comp.

CDD 636.089

**ISBN 978-987-3926-15-0**



## V9- COMPORTAMIENTO DE CEPAS ARGENTINAS DEL HERPESVIRUS BOVINO 4 (BoHV-4) GENETICAMENTE DIVERGENTES EN UNA INFECCIÓN EXPERIMENTAL DE TERNEROS

P. Morán<sup>1</sup>, S. Pérez<sup>1,2</sup>, A. Odeón<sup>3</sup>, A. Verna<sup>2,3</sup>.

1 Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA, Tandil, Buenos Aires. 2 Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires. 3 Laboratorio de Virología, Departamento de Producción Animal, INTA, Balcarce, Buenos Aires. p Moran@vet.unicen.edu.ar

### Introducción:

El Herpesvirus bovino 4 (BoHV-4), miembro de la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Gammaherpesvirinae*, género *Rhadinovirus*, ha sido aislado en diferentes partes del mundo en bovinos con una amplia variedad de casos clínicos, y de animales aparentemente sanos. Si bien no se lo ha establecido como agente causal de una entidad patológica específica se lo asocia mayormente con infecciones del tracto reproductivo de los bovinos, particularmente durante el período pos parto. En nuestro país este agente viral era prácticamente desconocido hasta su detección e identificación en el año 2007, por el Servicio de Diagnóstico Veterinario del INTA Balcarce, a partir de muestras provenientes de vacas que abortaron. Hasta la fecha se han obtenido más de 50 aislamientos conjuntamente con la aparición de variantes virales que difieren filogenéticamente de las cepas prototipos americana (DN599) y europea (Movar). Estas cepas fueron caracterizadas y clasificadas en tres grupos filogenéticos diferentes, designados como genotipos 1 (europeo), 2 (americano) y 3 (nuevo grupo genotípico). En trabajos realizados *in vitro*, se observaron diferencias significativas en la dinámica de replicación entre algunas cepas. El objetivo de este trabajo fue determinar si cepas argentinas de BoHV-4, genéticamente divergentes, presentan distinto comportamiento *in vivo*.

### Materiales y Métodos:

Se inocularon 4 terneros, intranasalmente, con 20 ml (10 ml en cada orificio nasal), de las cepas de BoHV-4 de los diferentes grupos filogenéticos, seleccionadas en función de su actividad biológica *in vitro*. Las cepas fueron previamente amplificadas en cultivos celulares (Madin-Darby bovine kidney, MDBK) con un título de  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml. Los animales se inocularon de acuerdo a la siguiente distribución: ternero 1 (t1) cepa 09/508 (tipo europeo), ternero 2 (t2) cepa 08/330 (tipo americano), ternero 3 (t3) cepa 07/435 (variante correspondiente al nuevo grupo) y ternero 4 (t4) control sin infectar. Se recolectaron muestras de leucocitos de sangre periférica, secreciones (nasales y oculares) y de suero a los días 0, 7, 14 y 21 pos infección (pi) y muestras de órganos para aislamiento y detección de genoma viral luego de la eutanasia al día 21 pi. Las muestras para aislamiento se inocularon sobre monocapa de MDBK, realizándose 4 pasajes cada 72 h. Para la detección del genoma se adaptó una nested PCR para el ORF 25 (gen que codifica una de las principales proteínas de la cápside) (Fabián y Egyed 2004). La determinación de anticuerpos seroneutralizantes se realizó mediante la técnica de seroneutralización viral (SNV), desafiando los sueros de los tres animales con las cepas homólogas y heterólogas.

### Resultados:

No se observaron manifestaciones clínicas en ninguno de los animales. Las cepas 08/330 y 07/435 se aislaron de los hisopados nasales a los días 7 y 14 pi, y la cepa 09/508 solamente al día 14 pi. Sólo la cepa 08/330 se aisló en hisopado ocular al día 7 pi. en el cuarto pasaje. El aislamiento viral a partir de las muestras de órganos y leucocitos de los animales infectados fue negativo. El genoma viral fue detectado en bazo, médula, nódulo trigeminal, tráquea y cerebro del t1 (cepa 09/508), en tráquea, bazo, riñón, linfonódulo retrofaringeo y cerebro del t2

(cepa 08/330) y en linfonódulo pulmonar y cerebro del t3 (cepa 07/435). También se detectó el genoma en leucocitos de los animales infectados con las cepas 08/330 (días 14 y 21 pi) y 09/508 (día 21 pi). No se detectó la presencia del genoma viral y no se aisló BoHV-4 en las muestras del ternero control. Se observó seroconversión solamente en el ternero 1 (contra la cepa homóloga), aunque con bajos títulos de anticuerpos (Ac). Todos los animales, incluido el control, presentaron títulos de Ac. contra la cepa 08/330. No se detectaron Ac. contra BoHV-1.

### Discusión:

En el presente trabajo se demostró que las cepas de BoHV4 utilizadas fueron capaces de replicar en un modelo *in vivo*. Es importante destacar la detección del genoma de las tres cepas en el sistema nervioso central. Si bien el aislamiento viral en cultivos celulares es el método gold standard, en algunas circunstancias se ve dificultado por la variabilidad en la velocidad de replicación y en la presentación de efecto citopático (ECP) de las diferentes cepas virales. Dada la complejidad del aislamiento viral se requiere la utilización de técnicas de alta sensibilidad, como nested PCR, para la detección de la presencia del virus.

La técnica de seroneutralización viral (SNV) es uno de los aspectos controvertidos en el diagnóstico del BoHV-4. La respuesta inmune humoral no resulta eficiente en los bovinos infectados; esta situación parece estar asociada a una deficiente exposición de los epítopos involucrados en el mecanismo de neutralización viral por anticuerpos, debido a la presencia de una barrera de glicanos. Para el diagnóstico serológico, el método más utilizado es el test de ELISA. Considerando que la técnica de seroneutralización puede dar como resultado la detección de acción neutralizante inespecífica para algunas cepas, como se observó con la cepa 08/330, sería aconsejable utilizar otras técnicas serológicas alternativas para el diagnóstico de laboratorio como herramienta para relevamiento en los rodeos.

La amplia variedad de cepas existentes en todo el mundo revela la capacidad de variabilidad que posee este virus y su complejidad tanto biológica como epidemiológica, lo cual constituye un factor para considerar al momento del diagnóstico.

### Bibliografía

- Egyed L. y cols. Studies of *in vivo* distribution of bovine herpesvirus type 4 in the natural host. *J Clin Microbiol.* 1996;34:1091-5.
- Fabián K, Egyed L. Detection of bovine gammaherpesviruses by a nested duplex PCR. *J Virol Meth.* 2004;115:93-8.
- Machiels B. y cols. Antibody evasion by Gammaherpesvirus O-glycan shield. *PLoS Pathog.* 2011; doi:10.1371/journal.ppat.1002387.
- Verna A, y cols.. Genomic analysis of bovine herpesvirus type 4 (BoHV-4) from Argentina: High genetic variability and novel phylogenetic groups. *Vet Microbiol.* 2012; doi:org/10.1016/j.vetmic.2012.04.039.
- Verna A. y cols. Comparative study on the *in vitro* replication and genomic variability of Argentinean field isolates of bovine herpesvirus type 4 (BoHV-4). *Virus Genes.* 2016; doi: 10.1007/s11262-016-1312-3