



Relevamiento de la presencia del virus de la Leucosis bovina (BLV) y del *Gammaherpesvirus* bovino 4 (BoHV-4) en trabajadores rurales de la provincia de Buenos Aires

Levantamento da presença do vírus da Leucose bovina (BLV) e *Gammaherpesvirus* 4 (BoHV-4) em trabalhadores rurais da província de Buenos Aires

DOI: 10.54020/seasv3n3-012

Recebimento dos originais: 05/05/2022
Aceitação para publicação: 01/07/2022

Julieta Spina

Bioquímica

Institución: Universidad de Buenos Aires

Dirección: Av. Domingo Faustino Sarmiento 2669, B7400, Olavarría

Correo electrónico: julieta_spina19@hotmail.com

Laura Guillermina Dolcini

Doctorado en Ciencia Animal, Docteur en Microbiologie

Institución: Universidad Nacional del Centro de la Pcia - Buenos Aires, Université Paris XI

Dirección: FCV-UNCPBA, 7000, Tandil, Argentina

Correo electrónico: gdolcini@vet.unicen.edu.ar

Edgardo Pedro Moran

Doctorado en Ciencia Animal

Institución: Universidad Nacional del Centro de la Pcia - Buenos Aires

Dirección: FCV-UNCPBA, 7000, Tandil, Argentina

Correo electrónico: pmoran@vet.unicen.edu.ar

Carolina María Ceriani

Doctorado por la Universidad de Buenos Aires

Institución: Universidad de Buenos Aires

Dirección: FCV-UNCPBA, 7000, Tandil, Argentina

Correo electrónico: cceriani@vet.unicen.edu.ar

RESUMEN

El virus de la leucosis bovina (BLV) y el gammaherpesvirus bovino 4 (BoHV-4), virus cuyo hospedador natural es el bovino, han sido estudiados ampliamente por nuestra Institución dada su alta incidencia en la zona. Se planteó la hipótesis que las personas que desarrollan actividades ganaderas, en estrecho contacto con bovinos que puedan estar infectados con BLV y/o BoHV-4, o con productos orgánicos derivados de los mismos, podrían estar en riesgo de ser infectados con algunos de estos agentes virales. La bibliografía relacionada con el tema es abundante, aunque es un tema de discusión a nivel mundial y genera gran



controversia. Considerando la importancia e implicancia de dicha infección en Salud Pública y desde el punto de vista epidemiológico, se realizó un estudio en sangre de trabajadores rurales de la Provincia de Buenos Aires, con el fin de detectar mediante PCR convencional fragmentos del genoma de ambos virus.

Palabras claves: virus de la Leucosis bovina, *Gammaherpesvirus* bovino, infección zoonótica.

RESUMO

O vírus da leucose bovina (BLV) e o gammaherpesvirus bovino 4 (BoHV-4), um vírus cujo hospedeiro natural é o bovino, foram amplamente estudados por nossa Instituição devido a sua alta incidência na área. Foi feita a hipótese de que pessoas envolvidas em atividades pecuárias, em contato próximo com gado que possa estar infectado com BLV e/ou BoHV-4, ou com produtos orgânicos derivados deles, poderiam estar em risco de serem infectadas com alguns desses agentes virais. A literatura relacionada é abundante, embora seja um tema de discussão mundial e gere muita controvérsia. Considerando a importância e implicações desta infecção na Saúde Pública e do ponto de vista epidemiológico, foi realizado um estudo no sangue de trabalhadores rurais da Província de Buenos Aires, a fim de detectar fragmentos do genoma de ambos os vírus por PCR convencional.

Palavras-chave: vírus da Leucose bovina, *Gammaherpesvirus* bovino, infecção zoonótica.

1 INTRODUCCIÓN

El virus de la leucosis bovina (BLV) y el *gammaherpesvirus bovino 4* (BoHV-4) son virus de importancia bovina distribuidos ampliamente a nivel mundial, y de alta incidencia en nuestra zona.

El BLV es un virus patógeno bovino perteneciente al género *δ-retrovirus* de la familia *Retroviridae*. La infección en bovinos produce una enfermedad de tipo linfoproliferativa que puede culminar con la muerte del animal (AIDA et al., 2013). Su principal célula diana son los linfocitos B CD5+; su genoma se integra al genoma del hospedador permaneciendo integrado a lo largo de toda su vida. Sólo un pequeño grupo progresa a la fase tumoral y desarrolla linfosarcoma (RODRÍGUEZ et al., 2011).

El BoHV-4 pertenece a la familia *Herpesviridae*; ha sido aislado en diferentes casos clínicos, en bovinos con infecciones respiratorias, vulvovaginitis, mastitis, endometritis, abortos, como así también en animales aparentemente sanos en diferentes partes del mundo (BILGE-DAGALP et al., 2010; BILGE



DAĞALP et al., 2012; IZUMI et al., 2006).

Debido a los resultados preliminares de este grupo de investigación y de los datos aportados por la literatura internacional con respecto a las posibilidades de transmisión de BLV y BoHV-4 a los seres humanos, se puede hipotetizar que las personas que desarrollan actividades en estrecho contacto con bovinos que puedan estar infectados con BLV y/o BoHV-4, o con productos orgánicos derivados de los mismos, podrían estar en riesgo de ser infectados con algunos de estos agentes virales.

El objetivo de este proyecto fue evaluar si existe evidencia de la presencia viral en población humana, en un área geográfica de prevalencia de estos virus, que permita demostrar la posibilidad de riesgo para la salud pública.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA

La población de estudio fueron pacientes adultos (mayores de 18 años) de ambos sexos que concurrieron al Laboratorio de Análisis Clínicos y Microbiológicos del Hospital Municipal “Dr. Héctor M. Cura” de Olavarría (Provincia de Buenos Aires) de manera ambulatoria, Con el aval del Comité de Bioética del Hospital se realizó un Consentimiento Informado, con una hoja de información que fue provista a todos los participantes del estudio.

Para la identificación de las muestras se utilizó numeración correlativa, incluyendo solamente género y edad del donante. Se respetó la privacidad y confidencialidad de los datos de acuerdo a lo normado por la Ley N°25326 de Protección de datos.

Se tomaron 54 muestras de sangre obtenidas por punción venosa y por punción capilar con lancetas indistintamente.

Se colocaron 25 uL de sangre en Papel Nucleico (Biodynamics - Cat # B161-5). Las muestras se conservaron a temperatura ambiente hasta su procesamiento.

La extracción del ADN viral se realizó de acuerdo con las indicaciones especificadas por el laboratorio (Biodynamics – boletín técnico # 161. <https://studylib.es/doc/4593356/papel-nucleico---biodynamics-srl>). Brevemente, se tomó una sección de 2mm de diámetro del papel, se sumergió en 500ul de



agua libre de nucleasas. Se agitó en vortex 5 seg, luego el papel se transfirió a un nuevo microtubo con 100ul de agua y se calentó 10 min a 95°C. Se guardó en heladera hasta su uso. La concentración de ADN se determinó por espectrofotometría en un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific - USA).

2.2 DETECCIÓN DE GENOMAS VIRALES

Los *primers* utilizados para este trabajo fueron sintetizados por IDT (Integrated DNA Technologies, Iowa USA) y los reactivos utilizados fueron adquiridos a la empresa PB-L (Productos Biológicos, Buenos Aires, Argentina). Todas las amplificaciones se realizaron en un Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystem - USA). Los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, al que se le adicionó SYBR® Safe para ADN en gel (Thermofisher, Argentina) y se visualizaron con transiluminador de luz naranja.

2.3 CONTROL DE LA CALIDAD DE ADN EN LA MUESTRA

La confirmación de la calidad e integridad de la muestra se realizó mediante una PCR convencional para amplificar una secuencia de 237 pares de bases (pb) correspondientes al gen endógeno humano GADPH. Las amplificaciones se realizaron en 15 µl de la mezcla de reacción, compuesta por 500ng de ADN molde, 0.3mM de desoxirribonucleótidos (dNTP), 1,6 pmoles de cada primer, 1.5mM MgCl₂, 1U de Taq polimerasa, buffer apropiado para la enzima y 1,5 µg de BSA.

Se utilizó el siguiente par de *primers*:

hGADPH Rev 5´TTGATTTTGGAGGGATCTCG3´

hGADPH Forw 5´GAGTCAACGGATTTGGTCGT3´

El programa de amplificación utilizado fue el siguiente:

1ra. Ronda: 95 °C 2 minutos; 1 ciclo

2da. Ronda: [95 °C 30 s; 50 °C 30 s; 72 °C 22 s] 10 ciclos.

34a. Ronda: [95 °C 30 s; 55 °C 30 s] 25 ciclos.

2.4 DETECCIÓN DE ADN PROVIRAL DEL BLV PARA EL GEN POL

La búsqueda del genoma viral del BLV se realizó mediante una PCR que



amplifica un fragmento de 184 pb del gen *pol*.

Las amplificaciones se realizaron en 15 µl de la mezcla de reacción, compuesta por 0.25mM de desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP), 0.4Mm *primers*, 1.5mM MgCl₂, 3.5U de Taq polimerasa, buffer apropiado para la enzima, y 1.5 ug de BSA. Se adicionaron 0.3µg de ADN como templado.

Se utilizó el siguiente par de *primers*:

G07 5´CCC TAC AAC CCC ACA AGT TCG G3´

G08 5´ATG GTG TAG CTC CCA TCT GGT CTT3´

El programa de amplificación utilizado fue el siguiente:

1ra. Ronda: 94 °C 1 minuto; 1 ciclo

2da. Ronda: [94 °C 1 minuto; 55 °C 1 minuto; 72 °C 1 minuto] 8 ciclos.

3ra. Ronda: [94 °C 1 minuto; 62 °C 1 minuto; 72 °C 1 minuto] 25 ciclos.

4ta. Ronda: 72 °C 10 minutos; 1 ciclo

Como control positivo se utilizó ADN de células FLK infectadas con el BLV.

En cada PCR se incluyó un control de reacción sin ADN.

2.5 DETECCIÓN DE ADN PROVIRAL DE BLV MEDIANTE NESTED PCR PARA EL GEN ENV

Para la detección de un fragmento de 444 pb del gen *env*, se utilizó una PCR anidada o *nested* PCR puesta a punto por Fechner et al (1997) , y optimizada en nuestro laboratorio (JULIARENA et al., 2013).

El primer ciclado se llevó a cabo en 20 ul de reacción, con 0.5mM dNTP, 2mM MgCl₂, 2,5uM de cada *primer* (*env* 5032 y *env* 5608), 1.5U Taq polimerasa, 2,5ug BSA, buffer apropiado, y 500 ng de ADN molde, mientras que para el segundo ciclado las condiciones fueron las mismas, pero se utilizaron los *primers* *env* 5099 y *env* 5521, y 3 ul del producto del primer ciclado como ADN templado.

env 5032 5´-TCTGTGCCAAGTCTCCCAGATA3´,

env 5099 5´CCCACAAGGGCGGCGCCGTTT3´

env 5521 5´GCGAGGCCGGGTCCAGAGCTGG3´

env 5608 5´AACAACAACCTCTGGGAGGGT3

Para el primer ciclo de amplificación el programa utilizado fue:

1ra. Ronda: 94 °C 5 minutos; 1 ciclo

2da. Ronda: [94 °C 30 seg; 57 °C 30 seg; 72 °C 30 seg] 30 ciclos.



3ta. Ronda: 72 °C 5 minutos; 1 ciclo, mientras que el segundo ciclo fue exactamente igual, pero la temperatura de annealing se aumentó a 68°C.

Como control positivo se utilizó ADN de células FLK infectadas con el BLV. En cada PCR se incluyó un control de reacción sin ADN.

2.6 BÚSQUEDA DEL ADN VIRAL DEL BOHV-4 MEDIANTE NESTED PCR PARA EL ORF25

Para la detección del genoma viral del BoHV-4, se modificó y optimizó una *nested* PCR, descrita por Fábían y Egyed (2004) (MORÁN et al., 2019) para amplificar un fragmento de 271 pb del ORF25. Este ORF que codifica la proteína mayor de la cápside se ubica entre el nucleótido 35099 y el 39220 de la LUR (PALMEIRA et al., 2011).

Las amplificaciones se realizaron en 25 µl de la mezcla de reacción, compuesta por 0.2 mM de desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP) (Promega, Madison, USA), *primers* a una concentración de 2.4µM, 2.5 mM MgCl₂, y 1,25U Taq polimerasa, 1X buffer (PB-L, Argentina). Se adicionaron 0.3µg de ADN como templado.

En la primera ronda de amplificación se utilizaron los siguientes *primers*:

1ra. ronda BoG3 5'GACTATGAGGAATGGCACAAG 3'

BoGe 5'TACTCGTAGGCTGGGTCTGG 3'

Para la segunda ronda de amplificación se utilizaron 2 µl del producto obtenido en la primera ronda y el siguiente par de *primers*:

2da. ronda B4up 5'GGTTGGAAGTGAGCGTATGAT 3'

B4low 5'GTAGGCGGGGTCTGGAAT 3'

Los productos de PCR fueron de 737 pb y 271 pb para la primera y segunda ronda, respectivamente. Las amplificaciones se realizaron de acuerdo al siguiente protocolo:

1ra. Ronda: 94 °C 15 minutos; [94 °C 45 s; 56 °C 45 s; 72 °C 90 s] 25 ciclos.

2da. Ronda: [94 °C 45 s; 56 °C 45 s; 72 °C 60 s] 30 ciclos

3ra. Ronda: 72 °C 10 minutos; 1 ciclo

Como control negativo se utilizó ADN de células no infectadas, y como control positivo se utilizó ADN de la cepa 07/435 de BoHV-4 (gentilmente cedida por la Dra. A Verna del Servicio de Diagnóstico Veterinario Especializado (SDVE)



de INTA Balcarce). En cada PCR se incluyó un control de reacción sin ADN.

2.7 BÚSQUEDA DEL ADN VIRAL DEL BOHV-4 MEDIANTE PCR PARA EL GEN B

Para la detección del gen B del BoHV-4, se utilizó una PCR, descrita por Wellenberg et al. (2001), que amplifica un fragmento de 615 pb del gen que codifica la glucoproteína B (gB). Las amplificaciones se realizaron en 25 µl de la mezcla de reacción, compuesta por 0.2 mM de desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP), *primers* a una concentración de 0.6 pmol, 2.5 mM MgCl₂, 1.25U µl de Taq polimerasa, 1X buffer apropiado para la enzima. Se adicionaron 0.3µg de ADN. Como control negativo se utilizó ADN de células no infectadas, y como control positivo se utilizó ADN de la cepa 07/435 de BoHV-4. En cada PCR se incluyó un control de reacción sin ADN.

Se utilizó el siguiente par de primers:

gB-F 5´CCCTTCTTTACCACCACCTACA3´

gB-R 5´TGCCATAGCAGAGAAACAATGA3´

y el siguiente programa:

1ra. Ronda: 95 °C 5 minutos; 1 ciclo

2da. Ronda: [94 °C 45 s; 55 °C 1 minuto; 72 °C 1:30 minutos] 30 ciclos

3ra. Ronda: 72 °C 5 minutos; 1 ciclo.

3 RESULTADOS

Las 54 muestras analizadas resultaron positivas para el gen endógeno GADPH, confirmando la calidad e integridad de todas las muestras. La búsqueda del genoma viral del BLV mediante la amplificación del gen *pol* y/o del gen *env* por PCR resultó negativa para todas las muestras. Se utilizaron diferentes protocolos, para detectar distintas regiones virales: una PCR simple, y una PCR anidada o *nested* PCR, ambas altamente específicas y sensibles. En cuanto a la detección del genoma viral del BoHV-4, 50 muestras resultaron negativas para la amplificación del fragmento del gen ORF25, y 4 muestras resultaron dudosas, obteniendo el mismo resultado al repetir el procedimiento. Para detección del gen B, estas 4 muestras resultaron negativas. Dichas muestras con resultados dudosos, se enviaron para su secuenciación a la



Unidad de Genómica de INTA Castelar (Buenos Aires), arrojando resultados negativos para BoHV-4.

4 DISCUSIÓN

El BLV es un virus que está presente en la mayoría de los países del mundo, con altas prevalencias en Estados Unidos, Canadá y Latinoamérica. Ciertos países de Europa, al igual que Australia, han logrado erradicar la enfermedad aplicando distintas políticas de control y eliminación de animales infectados. (Annual Report of European Union on Bovine and swine disease 2012).

Según estudios realizados por Trono y colaboradores en 2001 (TRONO et al., 2001) la prevalencia del BLV en tambos de Argentina era cercana al 80% ; sin nuevos datos publicados se estima que la prevalencia ha aumentado en la actualidad.

La PCR utilizada para detectar un fragmento del gen pol, de la polimerasa viral, tiene una sensibilidad de entre 10 y 50 copias / ug de DNA de linfocitos infectados, mientras que la PCR anidada también es altamente sensible, además de estar diseñada para detectar una de las regiones más variables dentro del genoma viral.

Con respecto al BoHV-4, este virus fue aislado y caracterizado molecularmente en 2007 por Verna et. al.; hasta ese momento este agente viral era prácticamente desconocido en Argentina (Verna et al., 2008). En los siguientes años se realizaron diversos estudios y se lograron más de 40 aislamientos (MORÁN et al., 2015).

La prevalencia en los países donde se ha estudiado es baja, se detecta una mayor frecuencia de seropositivos en animales de mayor edad, y en hembras mayor que en machos. Se han informado prevalencias mayores a 50% en bovinos con problemas reproductivos (MORÁN et al., 2015).

Los resultados obtenidos en este estudio nos indican que no se detectó genoma viral de los virus en la sangre de los trabajadores rurales seleccionados. Sin embargo estos resultados no reflejan lo expuesto en la literatura, donde en estudios realizados se ha detectado la presencia de fragmentos de genoma viral del BLV en linfocitos de sangre en humanos (BUEHRING et al., 2019), aunque



otros grupos de investigación han realizado estudios de búsqueda de BLV en sangre o en tejido tumoral mamario humano también con resultados negativos (YAMANAKA et al., 2022; ZHANG et al., 2016). Respecto al BoHV4, está demostrado que este agente viral, a diferencia de otros gammaherpesvirus, puede infectar líneas celulares y cultivos celulares primarios de un amplio rango de especies, incluido humanos (EGYED, 1998; GILLET et al., 2004, 2005; MORÁN et al., 2019). Según estudios preliminares realizados por este grupo de trabajo se demostró que líneas celulares humanas pueden ser infectadas con ambos virus. En trabajos realizados por Martínez Cuesta et al.; se determinó, por inmunocitoquímica, la expresión de antígenos en cultivos celulares infectados con BLV, así como la presencia del genoma del virus integrado en la célula huésped mediante PCR y la detección de partículas virales por microscopía electrónica además de diferentes aspectos fisiológicos de las células en cultivo (MARTINEZ CUESTA et al., 2018). Morán et. al, demostraron que diferentes cepas de BoHV4 infectaron productivamente las líneas celulares HeLa y Hep2 de origen humano (MORÁN et al., 2019).

Aún hay muchos interrogantes con respecto al potencial zoonótico de estos virus y la posible circulación del virus en la población, a pesar que estos resultados no concuerdan con prueban la hipótesis de la transmisión de los virus estudiados a humanos, sería importante continuar realizando estudios para lograr dilucidar esta problemática, modificando variables, como puede ser el estudio en una población más amplia y específica donde la prevalencia de la infección viral sea muy alta, como por ejemplo trabajadores de tambos.



REFERENCIAS

AIDA, Y. et al. Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. NOV, 2013.

Annual Report of European Union on Bovine and swine disease, 2012

BILGE-DAGALP, S. et al. The investigation of the presence of bovine herpesvirus type 4 (BoHV-4) in cows with metritis in a dairy herd. **Ankara Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi**, v. 57, n. 2, 2010.

BILGE DAĞALP, S. et al. The investigation of the herpesviruses (BoHV-1 and BoHV-4) on the occurrence of the reproductive disorders in dairy cattle herds, Turkey. **Revue de Medecine Veterinaire**, v. 163, n. 4, 2012.

BUEHRING, G. C. et al. Bovine leukemia virus discovered in human blood. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, 2019.

EGYED, L. Replication of bovine herpesvirus type 4 in human cells in vitro. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 7, 1998.

FÁBIÁN, K.; EGYED, L. Detection of bovine gammaherpesviruses by a nested duplex PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 115, n. 1, 2004.

FECHNER, H. et al. Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle. **Virology**, v. 237, n. 2, 1997.

GILLET, L. et al. Investigation of the Susceptibility of Human Cell Lines to Bovine Herpesvirus 4 Infection: Demonstration that Human Cells Can Support a Nonpermissive Persistent Infection Which Protects Them against Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Apoptosis. **Journal of Virology**, v. 78, n. 5, 2004.

GILLET, L. et al. Bovine herpesvirus 4 induces apoptosis of human carcinoma cell lines in vitro and in vivo. **Cancer Research**, v. 65, n. 20, 2005.

IZUMI, Y. et al. Characterization of bovine herpesvirus type 4 isolated from cattle with mastitis and subclinical infection by the virus among cattle. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 68, n. 2, 2006.

JULIARENA, M. A. et al. Partial molecular characterization of different proviral strains of bovine leukemia virus. **Archives of Virology**, v. 158, n. 1, 2013.

MARTINEZ CUESTA, L. et al. Stable infection of a bovine mammary epithelial cell line (MAC-T) with bovine leukemia virus (BLV). **Virus Research**, v. 256, 2018.

MORÁN, P. et al. Comparative analysis of replicative properties of phylogenetically divergent, Argentinean BoHV-4 strains in cell lines from different origins. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 63, 2019.

MORÁN, P. E. et al. Bovine herpesvirus 4 (BoHV-4): General aspects of the



biology and status in argentina. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 47, n. 2, 2015.

PALMEIRA, L. et al. Sequencing of bovine herpesvirus 4 v.test strain reveals important genome features. **Virology Journal**, v. 8, 2011.

RODRÍGUEZ, S. M. et al. **Preventive and therapeutic strategies for bovine leukemia virus: Lessons for HTLVViruses**, 2011.

TRONO, K. G. et al. Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitivity and specificity of different detection methods. **Veterinary Microbiology**, v. 83, n. 3, p. 235–248, 26 nov. 2001.

VERNA, A, et al. Primera evidencia virológica de herpesvirus bovino tipo 4 (BoHV-4) en Argentina. IX Congreso Argentino de Virología. Resumen 82-23128. **Revista Argentina de Microbiología**. v. 40 Supl 1:54---5 , 2008

WELLENBERG, G. J. et al. Detection of bovine herpesvirus 4 glycoprotein B and thymidine kinase DNA by PCR assays in bovine milk. **Journal of Virological Methods**, v. 97, n. 1–2, 2001.

YAMANAKA, M. P. et al. No evidence of bovine leukemia virus proviral DNA and antibodies in human specimens from Japan. **Retrovirology**, 2022.

ZHANG, R. et al. **Lack of association between bovine leukemia virus and breast cancer in Chinese patients****Breast Cancer Research**, 2016.