

CARACTERIZACION ELECTROFORETICA E INMUNOLOGICA DE UNA CEPA DE CAMPO DEL VIRUS DE LA RINOTRAQUEITIS INFECCIOSA BOVINA Y SU COMPARACION CON CEPAS DE REFERENCIA*

*Damaris Molano**
José Luis Rodríguez**
Gloria C. Ramírez**
Luis Carlos Villamil***

RESUMEN

En este trabajo se realizó la purificación de tres cepas de HVB-1 (Colorado, Iowa, y una cepa de campo aislada en el PSPA UN.) cosechadas en células MDBK y empleando el método de ultracentrifugación en colchones de Tartrato de Potasio, con el fin de evaluar y comparar sus patrones electroforéticos y su comportamiento antigénico en pruebas inmunológicas. Para esto se empleó la técnica de electroforesis en gels de Poliacrilamida (SDS-PAGE) y pruebas de Inmunodot.

Las cepas estudiadas mostraron patrones electroforéticos idénticos y no se detectaron diferencias antigénicas en la prueba de Western Blott.

INTRODUCCION

La RIB es causada por un virus de la familia Herpesviridae, subfamilia Alpha herpesvirinae cuya partícula viral se caracteriza por tener simetría cúbica, cubierta lipoprotéica y nucleocápside icosaédrica y su ácido nucleico es una cadena doble de DNA lineal (Hernández y col. 1993, Honda y col. 1989, Misra y col. 1981, Mohanty y col. 1983).

Las glicoproteínas son los mayores componentes estructurales de la envoltura viral y son importantes en la relación virus-célula huésped, ya que están involucradas en el reconocimiento, adhesión y penetración a las células susceptibles. Además han sido

relacionadas con la neutralización viral y la destrucción de las células infectadas por el sistema inmune (Marshall y col 1986, Van Druenen Littel-van den Hurk 1984, Hernández 1991).

La Rinotraqueitis infecciosa bovina (RIB) es una enfermedad altamente contagiosa presente en todo el país, la cual ocasiona grandes pérdidas económicas debido a las bajas en la producción y a las alteraciones reproductivas.

En general ha sido difícil el manejo de esta entidad ya que las vacunas disponibles presentan aspectos indeseables tales como baja protección o efectos colaterales como la presentación de abortos o síntomas de la enfermedad. Por otra parte la capacidad del virus para producir latencia, permaneciendo viable en el animal y a salvo de la respuesta inmunológica complican aún más su control.

Es por ello que se hace necesario un mayor conocimiento de la fisiología del Herpes Virus Bovino 1 (HVB-1) y de sus componentes antigénicos; ampliándose así las perspectivas para el manejo de la entidad. Por otra parte el HVB-1 puede ser considerado como un prototipo de estudio para el grupo de los Herpesvirus.

El presente trabajo pretende establecer la interrelación entre los componentes antigénicos de tres cepas virales del agente causante de la RIB, una de las cuales corresponde a una cepa de campo aislada en el Posgrado de Salud y Producción Animal (PSPA) de la

Universidad Nacional a partir de un toro persistentemente infectado (Góngora y col., 1993). Para esto se realizó la caracterización electroforética de las principales proteínas virales y se evaluó su respuesta antigénica a través de pruebas como el Western Blot.

MATERIALES Y METODOS

Cultivos celulares y Virus

Para este trabajo se emplearon células MDBK (Madin Darby Bovine Kidney) usando medio de cultivo MEM (Lab. Sigma) con 0.85 mg/ml de NaHCO₃, 100 U/ml Penicilina, 100Ug/ml estreptomomicina, 2.5mg/ml de Anfotericina B, 4mMde L-Glutamina y 10% de Suero Fetal Bovino. Este cultivo resulto ser positivo a Diarrea Viral Bovina por la prueba de Inmunoperoxidasa.

Se trabajó con tres cepas del virus de la RIB, una de las cuales corresponde a la cepa de campo aislada en el Posgrado de salud y producción animal de la Universidad Nacional, y las otras dos a las cepas de referencia Iowa y Colorado.

Replicación y Purificación Viral

El virus fue inoculado sobre monocapas de células MDBK en fase replicativa y cosechado a las 36-48 hrs al presentar efecto citopático en un 90-100% de la monocapa. Las cepas fueron tituladas determinando la dosis infecciosa Tejido Celular 50 (DITC 50) (Mohanty y col. 1983).

La purificación de los tres virus se realizó usando la técnica descrita por Misra y col. (1981) y Hernández y col. (1991) a partir de cosechas iniciales de 500 ml de sobrenadante de células MDBK infectadas. Estos sobrenadantes, al igual que un control negativo de células sin infectar fueron clarificados por centrifugación a 4000xg por 20 min a 4°C y sometidos a precipitación con Polietilenglicol 6000 al 7% en presencia de NaCl al 2.3% en agitación constante durante toda la noche. Esta suspensión fue centrifugada a 10000xg durante una hora y el precipitado suspendido en 1/10 del volumen original de Buffer TEN (Tris 0.12%, EDTA 0.037%, NaCl 0.58%) y ultrafiltrado por Membrana de 100.000 daltons. Posteriormente esta suspensión fue ultracentrifugada a 100.000xg sobre un colchón de Tartrato de Potasio al 25% durante 2 horas a 4°C en un rotor SW-TH614; el sedimento fue recogido y ultracentrifugado a 140.000xg por 2 horas para lavar el tartrato de potasio. El sedimento fue reconstituido en 1/100 del volumen original de Buffer TEN.

Sueros Hiperinmunes

Con el objeto de determinar la calidad y especificidad de los preparados virales, y comparar la respuesta inmune a las diferentes proteínas del virus tanto en infecciones experimentales como en infecciones naturales se produjeron sueros hiperinmunes en conejos contra las tres cepas virales y sobrenadante de células sin infec-

Proyecto "limitantes en salud y producción de bovinos". Financiado por COLCIENCIAS. Respectivamente: MV.; MV.; MV.; MSc.; DMV., MSc., PhD. Postgrado de Salud y Producción Animal Universidad Nacional de Colombia.

tar (control negativo), los cuales fueron empleados junto con sueros de campo de bovinos positivos y negativos a RIB en las pruebas inmunológicas.

Caracterización Electroforética de Proteínas

El método empleado fue la Electroforesis en geles de Poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) en geles discontinuos descrita por Laemly en 1970. Se trabajaron concentraciones de Acrilamida del 10, 8 y 7.5% en equipo de minielectroforesis (SE 250-mighty Small II Slab Gel Electrophoresis Unit HOEFER) para las tres cepas virales y el control de células sin infectar sometidos al proceso de purificación.

Prueba Inmunológica

Las cepas y el control fueron enfrentadas por la técnica de Western-blot a los sueros de los conejos inoculados con estas, a sueros de bovinos de campo positivos a RIB por la prueba de Seroneutralización viral y a un suero de campo positivo a Diarrea Viral Bovina.

RESULTADOS Y DISCUSION

Replicación y Purificación Viral

Empleando la técnica de purificación antes descrita fue posible observar, tras la ultracentrifugación sobre el colchón de Tartrato de Potasio (TK), la formación de un precipitado correspondiente al virus de la RIB, que no fue observado en la muestra control de sobrenadante de células sin infectar sometidas al mismo tratamiento. Además se detectó una banda en la interfase entre el colchón y la muestra que corresponde a proteínas celulares y muy probablemente al virus de la diarrea viral bovina, contaminante de la línea celular empleada en este estudio.

Caracterización Electroforética de Proteínas

Se obtuvieron los mejores resultados al emplear concentraciones de Poliacrilamida del 7.5 y 8%. En los geles teñidos con azul brillante de Coomassie se observaron 13 bandas proteicas pertenecientes al virus; mientras que en los geles sometidos a tinción de plata se observaron 20 bandas de proteína viral debido a la mayor sensibilidad de la técnica. En todos los geles corridos se presentó el

mismo patrón de migración para las tres cepas estudiadas.

En los geles estudiados fue posible reconocer las principales glicoproteínas virales, que a pesar de presentar variaciones normales en los valores de sus pesos moleculares, debido a los métodos y porcentajes de acrilamida empleados, coinciden con los reportados en la literatura para las 6 proteínas mayores del HVB-1 observadas en este estudio. Se detectaron las bandas que corresponden a la glicoproteína gI, importante en el proceso de replicación viral y fusión celular (Honda y col. 1989, Marshall y col. 1986), con pesos moleculares de 125k, 74k y 52,7k.

La banda correspondiente a la gIII, involucrada en el proceso de unión del virus a receptores celulares, se detectó en este estudio como 96k y la gIV, que es el mayor constituyente de la envoltura viral y juega un papel importante en los procesos de adsorción y penetración del virus a las células (Marshall y col. 1986, Babiuk y col. 1987) presentó bandas correspondientes a los pesos moleculares 77k y su dímero 146k. Figura 1.

Las tres cepas presentaron patrones electroforéticos idénticos. El control de células sin infectar presentó dos bandas leves en los geles coloreados con tinción de plata que no interfirieron en la prueba inmunológica.

Prueba Inmunológica

En la prueba de Western Blot fue posible observar que el suero del conejo inoculado con la cepa Iowa así como la IgG del suero preparado contra la cepa de campo reaccionaron reconociendo las principales proteínas de las diferentes cepas. El suero de campo positivo a RIB reconoció nueve proteínas (entre las que están las seis proteínas de interés para este trabajo) tanto en la cepa Iowa como de Campo y coinciden con las visualizadas en la infección experimental.

Ni el suero de Campo positivo a DVB, negativo a RIB ni el suero del conejo inoculado con sobrenadante de células sin infectar presentaron reacción frente a ninguno de los antígenos purificados, ratificando con esto la ausencia de contaminación con virus de DVB o con proteínas de origen celular.

Con base en lo anterior se comprobó que las principales pro-

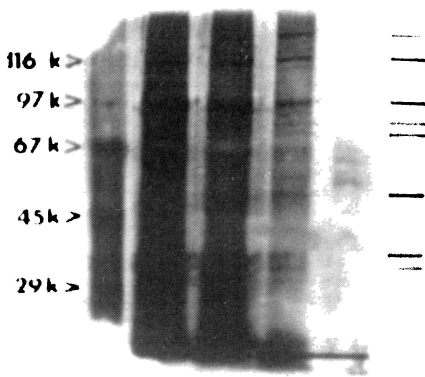


FIGURA 1. Patrón electroforético de las cepas de RIB (IOWA, Colorado y de campo) en SDS. PAGE.

teínas (145K, 125K, 97K, 77K, 74K, 52K) visualizadas en los geles corresponden a componentes virales antígenicamente importantes, ya que en todos los casos, a pesar de haber diferencias, se reconocieron los mayores componentes antígenicos descritos para el HVB-1. Las diferencias observadas podrían atribuirse a factores inherentes a los individuos o a las técnicas empleadas. Figura 2.

CONCLUSIONES

En este estudio se demostró que la cepa de campo trabajada presenta características antígenicas y un patrón electroforético de proteínas compatibles con la reportada para el HVB-1, siendo estas similares a las obtenidas con las dos cepas de referencia empleadas.

Se logró la detección de las tres principales proteínas del HVB-1 empleando la prueba de Western-blot y se demostró el reconocimiento inmunológico de éstas, por antisueños específicos y suero bovino de campo positivo a RIB, contribuyendo este hecho en la ratificación de la cepa de Campo como HVB-1.

Empleando la metodología de colchones de tartrato de Potasio al 25% después de ultrafiltración y precipitación con PEG 6,000, fue posible purificar tanto la cepa

de campo como las dos cepas de referencia de RIB de la contaminación con proteínas celulares y virus de DVB. Este procedimiento aunque es algo dispendioso y requiere de grandes volúmenes iniciales, es de gran utilidad para la obtención de antígeno puro necesario para muchos procedimientos y estudios (inmunológicos, bioquímicos, etc.) en los que se requiera evitar factores y componentes ajenos al virus, mejorándose así la exactitud y confiabilidad de los experimentos.

El HVB-1 ha sido considerado como modelo en el estudio de los herpesvirus, por lo que este trabajo podría aportar bases a futuros trabajos relacionados con este u otros herpesvirus.

Es importante conocer más sobre las características de los virus de la RIB, tanto a nivel de laboratorio como de campo, para establecer los patrones de comportamiento para las cepas que están interactuando en nuestro medio, por lo que se recomienda continuar con estudios que aporten conocimientos más detallados sobre los aspectos bioquímicos e inmunológicos del HVB-1, de forma que se puedan llegar a diseñar inmunógenos cada vez mejores y paneles de monoclonales específicos que puedan ser de ayuda en el diagnóstico y manejo de la enfermedad.

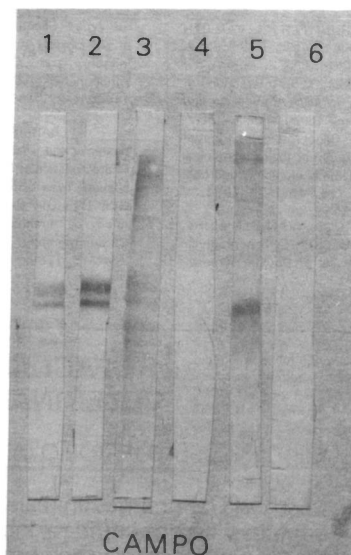
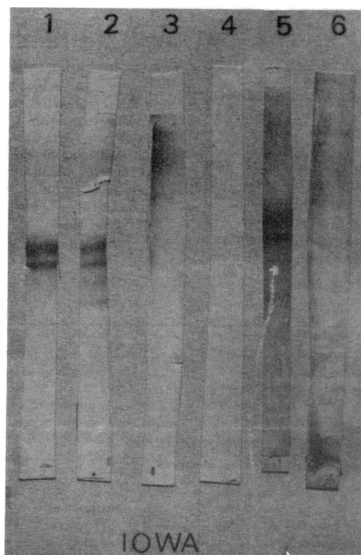


FIGURA 2. Prueba de Western-blot para las cepas IOWA y de CAMPO enfrentadas a los sueros: 1: Hiperimmune contra la cepa IOWA, 2: Suero Hiperimmune contra la cepa colorado; 3: IgG anti-cepa de campo 4: Suero control (contra células si infectar) 5: Suero bovino positivo a RIB (1:256) 6: Suero bovino positivo a D.V.B. (1:1024).

BIBLIOGRAFIA

- ALAYON, F.; GOMEZ, I. Producción y estandarización de un conjugado del virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina-Vulvovaginitis Pustular Infecciosa (RIB-VPI) para su diagnóstico mediante la prueba de Inmunofluorescencia directa. Tesis MV. Bogotá U.N. 1992.
- BABIUK, L.; L'ITALIEN, J. L.; VAN DRUNEN LITTEL- VAN DEN HURK; S. ZAMB, T.; LAWMAN M. J.; HUGHES, G.; GIFFORD, G. A. Protection of cattle from Bovine Herpesvirus Type 1 (BHV-1) Infection by Immunization with Individual Viral Glycoproteins. *Virol.* 159: 57-66, 1987.
- FITZPATRICK, D.; BABIUK, L.; ZAMB, T. 1989. Nucleotide sequence of Bovine Herpesvirus Type 1 Glycoprotein gIII, a Structural Mediator for g III as a new Member of the Immunoglobulin Superfamily, and Implications for the Homologous Glycoproteins of Other Herpesviruses. *Virol.* 173: 46-57, 1986.
- GONGORA, A. Diagnóstico de las principales enfermedades reproductivas en toros de la Sabana de Bogotá. Énfasis en RIB. Tesis MSc Reproducción animal U.N. 1993.
- HERNANDEZ, A. L. Caracterización de las Proteínas Antigénicas del virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR) y su aplicación en Inmunoensayos. Tesis M. Sc. Universidad Nacional de Colombia. 1991.
- HONDA, E.; KATSU, Y.; FUJII, C.; OKASAKI, K.; KUMAGAI, T. A Comparison of Polypeptides and Restriction Endonuclease Sites of BHV-1 Isolates and Identification of IPV Virus in Japan. *Jpn. J. Vet. Sc.* 51 (6): 1143-1149. 1989.
- JASTY, V.; CHANG, P. Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus in Bovine Kidney Cells: Sequence of Viral Production, Cellular Changes, and Localization of Viral Nucleic Acid and Protein. *Am. J. Vet. Res.* 30 (8): 1325-1332, 1969.
- MARSHALL, R.; RODRIGUEZ, L.; LETCHWORTH, G. Characterization of Envelope Proteins of Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus (Bovine Herpesvirus 1) by Biochemical and Immunological Methods. *J. of Vir.* 57 (3): 745-753, 1986.
- MISRA, V.; BLUMENTHAL, R.; BABIUK, L. Proteins Specified by Bovine Herpesvirus 1 (Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus) *J. of Vir.* 40: 367-378. 1981.
- MOHANTY, S.; DUTA, S. *Virología veterinaria*. Nueva Editorial Interamericana. México: 35-39, 1983.
- SEAL, B. S.; IRVING, J. WHETTONE, C. Transcriptional analysis of the BHV-1 Cooper Isolate, Temporal Analysis and Characterization of Immediate-early, early and late RNA. *Arch. of Vir.* 121: 55-73. 1991.
- SIMARD, C.; NADON, F.; SEGUIN, C.; LA BOISSIERE, S.; TRUDEL, M. Gene Mapping of Infectious Bovine Rhinotracheitis Viral DNA Genome. *Arch. Virol.* 110: 63-75, 1990.
- SKLYANSKAYA, E. I.; ITKIN, Z. B.; GOFMAN, Y. P.; KAVERIN, N.V. Structural Proteins of Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus. *Acta Virol.* 21: 273-279, 1977.
- TALENS, L.; ZEE, Y. C. Purification and Bouyant Density of Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus. *Proc. of Soc. for Exp. Biol. and Med.* 151: 132. 1976.

VAN DRUNEN LITTEL- VAN DEN HURK, S.; VAN DEN HURK, J. GILCHRIST, J. E.; MISRA, V.; BABIUK, L. A. Interactions of Monoclonal Antibodies and Bovine Herpesvirus-1. (BHV-1) Glycoproteins. Characterization of their Biochemical and Immunological Properties. *Vir.* 135 466-479. 1984.

_____, VAN DEN HURK, J.; BABIUK, L. Topographical Analysis of Bovine Herpesvi-

rus Type 1 Glycoproteins: Use of Monoclonal Antibodies to Identify and Characterize Functional Epitopes. *Virology.* 144: 216-227.1985.

_____, BABIUK, L. A. Antigenic and Immunogenic Characteristics of Bovine Herpesvirus Type 1 Glycoproteins GVP 3/9 y GVP 6/11a/16 Purified by Immunoabsorbent Chromatography. *Vir.* 144: 204-215, 1985.

_____, GIFFORD, G. A.; BABIUK, L. A. Epitope Specificity of the Protective Immune Response Induced by Individual Bovine Herpesvirus-1 Glycoproteins. *Vaccine.* 8 358-368. 1990.

XIAOPING, L.; BABIUK, L.; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S.; FITZPATRICK, D.; ZAMB, T. Bovine Herpesvirus 1 Attachment to Permissive Cells Is Mediated by Its Major

Glycoproteins gI, gIII, and gV. *J. of Vir.* 65 (3):1124-1132, 1991.

_____. An In Vivo Study of a Glycoprotein gIII Negative Bovine Herpesvirus 1 Mutant Expressing Beta-Galactosidase: Evaluation of the Role of gIII in Virus Infectivity and its Use as a Vector of Mucosal Immunization. *Virol.* 189: 629-639. 1992.

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y DE ZOOTECNIA

LABORATORIO DE PATOLOGIA - GUIA DE SERVICIOS

Necropsia de grandes animales (bovinos, equinos y cerdos grandes), incluye el diagnóstico macro y microscópico con base en láminas coloreadas como hematoxilina eosina, con un máximo de 5	\$ 20.000.00
Necropsia de caninos, felinos, cerdos medianos, ovinos, caprinos y bovinos jóvenes. Incluye diagnóstico macro y microscópico hasta cinco láminas coloreadas con hematoxilina eosina	\$ 12.600.00
Necropsia de aves, conejos o similares. Incluye el diagnóstico macroscópico hasta de cinco animales que correspondan al mismo caso	\$10.200.00
Exámenes histopatológicos de biopsias o tejidos (1) por la técnica de hematoxilina eosina	\$9.200.00
Examen histopatológico de biopsias o tejidos por coloraciones especiales (por lámina)	12.600.00
Lámina hematoxilina-eosina (colecciones)	\$13.400.00
Eutanasia animales grandes	\$ 10.500.00
Eutanasia animales pequeños	\$ 6.500.00

INFORMES

Tel: 2699111 Ext. 385