

ZOONOSIS POR PARAPOXVIRUS: DIAGNÓSTICO E IDENTIFICACIÓN DE PSEUDOCOWPOX (PCPV)

Andrea Peralta¹, Miguel Buffarini², Ariel Trojaola³, Andrea Bruni⁴, Marcelo Formica⁴

¹Instituto de Biotecnología IABIMO (INTA-CONICET); ²INTA Gral. Villegas; ³Médico generalista, actividad privada; ⁴Médica Patóloga, actividad privada; ⁵Médico veterinario, asesor privado

peralta.andrea@inta.gob.ar

PALABRAS CLAVE:

zoonosis, parapoxvirus, pseudocowpox.

INTRODUCCIÓN

Las zoonosis son enfermedades infecciosas que han pasado de un animal a humanos y representan un gran porcentaje de todas las enfermedades infecciosas recientemente identificadas, así como de muchas de las ya existentes. Los patógenos zoonóticos pueden ser bacterias, virus, parásitos o agentes no convencionales que se contagian a los humanos por contacto directo o a través de los alimentos, el agua o el medio ambiente. Representan un importante problema de salud pública en todo el mundo debido a nuestra estrecha relación con los animales en el medio agrícola, la vida cotidiana (animales de compañía) o el entorno natural. La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), se han comprometido a fortalecer la coordinación multisectorial y los esfuerzos para combatir las amenazas para la salud pública derivadas de las interacciones entre humanos, animales y medio ambiente. Algunas de estas enfermedades son subdiagnosticadas porque no se emplean diagnósticos confirmatorios y pueden ser confundidas sobre todo en los grandes centros urbanos (Steinhart, 2005). Las enfermedades producidas por poxvirus se encuentran entre este grupo de posibles diagnósticos indefinidos y aunque no son graves, merecen ser tenidas en cuenta por los centros de salud de las regiones ganaderas. Los retrasos en la confirmación de infecciones humanas pueden resultar en un tratamiento inadecuado o una recuperación prolongada. El reconocimiento temprano de las infecciones asociadas al poxvirus y la aplicación de medidas preventivas adecuadas pueden reducir la propagación del virus entre los animales y sus dueños (Tack & Reynolds, 2011). El objetivo del artículo es describir el diagnóstico de una enfermedad zoonótica producida por un Parapoxvirus incluido dentro de la familia Poxviridae mediante la intervención interdisciplinaria de la medicina humana, la animal y el diagnóstico especializado.

MATERIALES Y MÉTODOS

En el mes de junio de 2021, un productor ganadero del partido de General Villegas realizó una consulta médica por una serie de lesiones que aparecieron en una de sus manos. El paciente relató al médico y al médico veterinario de su establecimiento que diez días antes había realizado un tratamiento de rehidratación con sonda gástrica a dos terneros en mal estado recientemente ingresados por compra. En el procedimiento, recordó que recibió lesiones dentarias. Considerando este historial y por el aspecto clínico de las lesiones, el médico y el veterinario intervinientes sospecharon de una posible infección por Parapoxvirus. Con intervención de un cirujano se extrajeron dos muestras de piel de una de las lesiones, de las cuales una se envió a un laboratorio local para su análisis histopatológico y la otra, al laboratorio de Epidemiología Molecular de Virus del Instituto de Biotecnología de INTA Castelar (IABIMO-INTA) para el diagnóstico molecular.

El diagnóstico histopatológico se realizó de la siguiente manera. Luego de un estudio macroscópico, la pieza ingresó en una cápsula al procesador automático, en donde pasó por diferentes alcoholes, xilol y parafinas. Luego de la inclusión en parafina se hicieron cortes seriados en micrótopo. Los cortes se pegaron en portaobjetos en la estufa de

cultivo y luego se colorearon con Hematoxilina y Eosina.

Para realizar el diagnóstico molecular, la muestra de tejido epitelial, de 0.6 x 0.3 cm, fue congelada y enviada refrigerada desde Gral. Villegas hasta el laboratorio IABIMO-INTA. La extracción del ADN se realizó mediante el kit comercial "QIAamp DNA mini kit" de QIAGEN. El ADN extraído se cuantificó en un espectrofotómetro Nanodrop 1000, obteniéndose un rendimiento de 23 ng/ul. La muestra recibe el nombre interno: "G.V.21".

En cuanto al análisis por PCR, en primer lugar, se descartó la presencia de inhibidores de la reacción de PCR en el ADN obtenido, mediante una PCR control que amplifica un gen endógeno de mamífero. A continuación, se realizaron dos PCR diagnósticas, una para detectar genoma de virus pertenecientes al género Orthopoxvirus y la otra para detectar genoma de virus pertenecientes al género Parapoxvirus (Inoshima et al; 2000)

Para realizar la secuenciación, el producto amplificado en la PCR diagnóstica fue purificado y enviado al servicio de secuenciación del IABIMO. La secuencia obtenida fue analizada mediante el programa BioEdit. Se realizó un alineamiento múltiple con secuencias de Parapoxvirus disponibles y mediante el software Mega X, empleando el algoritmo de Neighbor-Joining y el método evolutivo de Kimura 2P. Se obtuvo un árbol filogenético que permitió la identificación de la muestra.

RESULTADOS

Los cortes histológicos mostraron la epidermis con intensa espongiosis la cual generó múltiples microvesículas intraespinosas y la formación

PCR: Orthopoxvirus PCR: Parapoxvirus

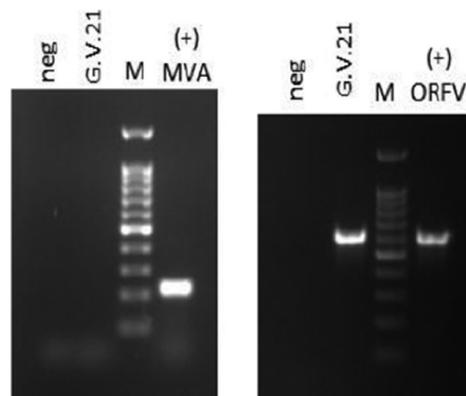


Foto 1. Resultado de las PCR diagnósticas. En la imagen de la izquierda se observa la electroforesis de las amplificaciones obtenidas en la PCR diagnóstica de Orthopoxvirus. En la imagen de la derecha, se observa la electroforesis de las amplificaciones obtenidas en la PCR diagnóstica de Parapoxvirus. Neg: ADN de tejido epitelial sano, GV21: muestra en estudio, M: marcador de peso molecular de 100pb; (+)MVA: ADN Orthopoxvirus positivo; (+)ORFV: ADN Parapoxvirus positivo.

Tabla 1. Infecciones por poxvirus en humanos. Adaptado de Bohelay & Duong (2017).

Género	Virus	Distribución	Reservorio	Transmisión interhumana	Frecuencia	Grupo de riesgo
Ortopoxvirus	Vacuna	-	Desconocido	posible	-	vacunados
	Viruela	-		sí	erradicada	
	Cowpox	R. Unido Europa Rusia	Pequeños roedores, gatos	sí	raro	Propietarios de ratas o gatos domésticos
	Monkeypox	Algunos países de África	Ardillas / roedores	sí	raro	Niños
	Buffalopox	India	Búfalo de agua	sí	raro	Ganaderos
	Cantagalo y Aracatuba	Brasil	Bovinos, roedores	-	raro	Ganaderos
Parapoxvirus	Orf	Mundial	Ovejas, cabras	raro	raro	Productores ovinos y caprinos
	Pseudocowpox	Mundial	Bovinos	raro	frecuente	Tamberos veterinarios
	Estomatitis Papular Bovina	Mundial	Bovinos	raro	frecuente	Tamberos veterinarios
	Deerpox	Colonias de ciervos	Ciervos	No	raro	cazadores
	Sealpox	Colonias de focas	Foca	No	raro	Adiestradores cuidadores

de una gran ampolla su epidérmica que la separó de la dermis papilar. La ampolla contenía material fibrinohemático y leucocitario. El estrato

corneo se encontró preservado y de aspecto ortoqueratósico. La dermis mostró moderado infiltrado inflamatorio linfocitario perivascular asociado a escasos eosinófilos. Con las técnicas utilizadas no se identificaron microorganismos, ni efectos citopáticos virales. Los hallazgos histológicos correspondieron a una ampolla subepidérmica por una dermatitis espongíotica aguda/subaguda. Aunque esta lesión no es confirmatoria, es compatible con lesiones producidas por Paramixovirus. En cuanto al análisis por PCR, sólo se obtuvo amplificación específica en la PCR diagnóstica de Parapoxvirus (Foto 1), confirmando así el diagnóstico clínico.

El producto de amplificación de 590pb fue purificado y enviado a secuenciación para la identificación del agente causal. Con la secuencia obtenida se realizó un alineamiento múltiple con secuencias disponibles de distintos Parapoxvirus. Se realizó una matriz de distancia para determinar el grado de identidad nucleotídica. Para la muestra GV21 analizada se obtuvo una identidad de 84-85% con secuencias de Estomatitis Papular Bovina (BPSV), de 93-94% con secuencias de Virus Orf o Ectima Contagioso (ORFV) y de 98,5-99% con secuencias de Pseudocowpox (PCPV).

En el árbol filogenético (Foto 2) se puede observar que la muestra analizada agrupa con las demás secuencias de PCPV. De esta manera, se confirmó que el agente causal de la lesión epitelial observada en el paciente, fue el virus PCPV.

DISCUSIÓN

Las infecciones por poxvirus son frecuentemente responsables de manifestaciones cutáneas, algunas son muy frecuentes y benignas (molusco contagioso), mientras que otras son excepcionales, pero potencialmente graves, tales como las causadas por virus Cowpox (VCPX). Si bien sólo el virus de la viruela y el del molusco contagioso tienen un reservorio humano y una transmisión interhumana, la mayoría de las infecciones por poxvirus son zoonosis con un reservorio animal distinto (Tabla 1)

Los virus ORFV, PCPV y BPSV integran el género Parapoxvirus, familia Poxviridae; son virus epiteliotrópicos que infectan rumiantes domésticos y silvestres, aunque ocasionalmente pueden afectar al hombre (Fleming & Mercer, 2007). La PCPV y BPSV que integran el género Parapoxvirus son los más asociados a bovinos aunque también hay

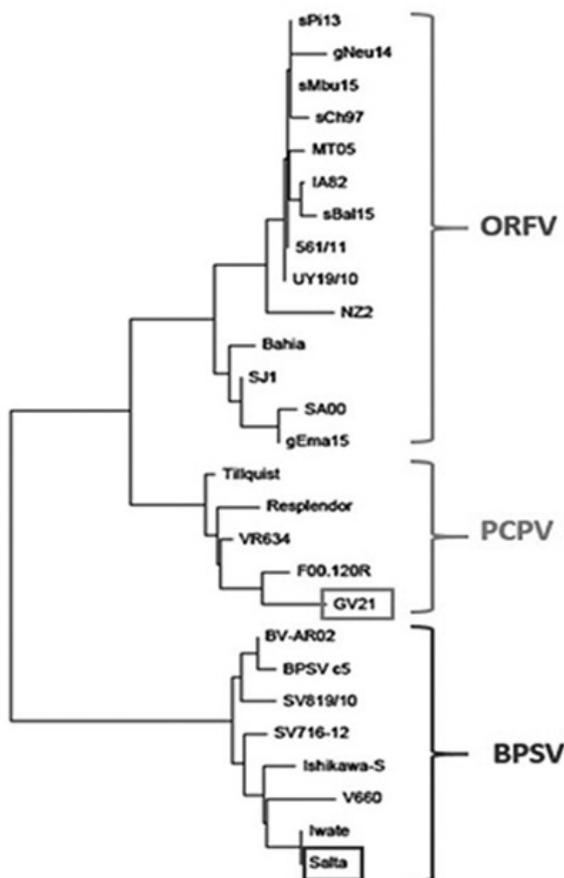


Foto 2. Análisis filogenético entre la muestra del paciente (GV21) y otros Parapoxvirus (PPV). Árbol filogenético obtenido con el método de Neighbor-Joining y basado en el amplicón de 590pb de la PCR diagnóstica para PPV. Las secuencias de los otros PPV usados en este análisis, fueron obtenidas del banco de datos público GeneBank. Se remarca en color verde la muestra GV21 y remarcado en color violeta se indica un aislamiento argentino de Estomatitis Papular Bovina (BPSV). Virus Orf o Ectima Contagioso (ORFV). Pseudocowpox (PCPV).

reportes en otras especies como bisonte americano (Shivanna et al 2020), renos (Hautaniemi, 2010) y dromedarios (Gelaye, E., et al 2016).

Conocida como Paravaccinia, Pseudo Viruela o Nódulo del ordeñador, la PCPV es una enfermedad ocupacional de los tamberos, operarios ganaderos y veterinarios, pero también afecta a las personas que manipulan carne fresca (Groves et al 1961). Es endémica entre el ganado bovino, causando lesiones en la ubre, tronco, patas y cavidad bucal como una estomatitis papular bovina (Barraviera et al, 1997; Barraviera, 2001)

La infección humana es accidental y ocurre por contacto directo o través de fómites contaminados. La transmisión entre persona aún no se ha descrito. El período de incubación varía entre 5 y 15 días (Barraviera et al 1997; Arranz et al 2000)

Clínicamente, la lesión se manifiesta en pápulas eritematosas aplanadas (Foto 3) que, al cabo de unos días, se transforman en nódulos eritematosos violáceos firmes (Foto 4). La piel se vuelve opaca y grisácea con pequeñas costras y depresión central (Foto 5). Generalmente, hay eritema alrededor de los nódulos. En la mayoría de los casos existen de dos a cinco nódulos que pueden ser solitarios o numerosos, localizados con mayor frecuencia en las manos, particularmente en los dedos, y ocasionalmente en la cara (Barraviera et al 1997; Arranz et al 2000). El paciente de este escaso tuvo curaciones y control ambulatorio y recibió el alta seis semanas después.



Foto 3. Mano del paciente con las lesiones a los 5 días de iniciados los síntomas

El diagnóstico de la enfermedad en general se basa en el historial del paciente, los signos clínicos, la histopatología y la microscopía electrónica, aunque para el diagnóstico definitivo y preciso es necesario un análisis molecular. La histopatología, técnica de diagnóstico más utilizada, muestra hiperqueratosis, paraqueratosis y acantosis de la epidermis, que generalmente presenta vesículas multiloculares,



Foto 4. Evolución de las lesiones después de 8 días del inicio de los síntomas



Foto 5. Evolución de las lesiones después de 35 días del inicio de los síntomas

degeneración reticular y células en forma de globo. Los cuerpos de inclusión eosinofílicos en el citoplasma de las células epidérmicas vacuoladas son característicos, pero no se observan en todas las etapas de la enfermedad. La dermis presenta infiltrado inflamatorio, predominantemente mononuclear y gran cantidad de eosinófilos. Incluso en ausencia de inclusiones como lo observado en este caso, se puede demostrar la presencia del virus mediante microscopía electrónica, donde aparece en forma cilíndrica. Está formado esencialmente por ADN, envuelto por una cápsula menos densa y mide 140x310nm; generalmente, las partículas virales maduras se localizan en la capa corneal (Arranz, et al 2000, Groves, et al 1961).

Las lesiones producidas por Parapoxvirus en humanos suelen ser benignas, aunque dolorosas, autolimitantes y remitir en 4-8 semanas (Arranz, et al 2000, Barraviera, et al 1997). Esta zoonosis ocupacional muy pocas veces es diagnosticada de forma correcta. Esto puede deberse a diversos factores como, las infecciones por Parapoxvirus en el ganado no son de declaración obligatoria, por lo tanto, no quedan registros de estos eventos. Otro factor importante es que el personal médico (especialmente de grandes centros urbanos) no está familiarizado con la enfermedad para su reconocimiento.

En Argentina, al igual que en el resto del mundo, esta zoonosis está subdiagnosticada. Existe un reporte en la revista de Dermatología Argentina de 2018 (Panizzardi, et al 2018) donde se presentan tres casos en humanos en los cuales el diagnóstico de la infección por Parapoxvirus se hace por la información clínica, patológica y la anamnesis. En estos casos no se realizó una microscopía electrónica para visualizar la estructura característica de estos virus, así como tampoco se realizó un análisis molecular para identificar la especie viral responsable de la infección.

En el presente diagnóstico, la sospecha del médico clínico y los veterinarios fueron apoyados por el análisis molecular, que no sólo descartó la posibilidad de otros poxvirus, sino que logró además la identificación de la especie de Parapoxvirus que causó la infección. Hasta donde sabemos, se trata del primer registro e identificación molecular de PCPV en nuestro país.

CONCLUSIÓN

En este trabajo, se muestra cómo el trabajo interdisciplinario, entre el médico clínico, médicos veterinarios que asesoraron y coordinaron y el personal de laboratorio de diagnóstico molecular, condujo al diagnóstico correcto de una infección por Parapoxvirus, identificando al agente causal como PCPV.

BIBLIOGRAFÍA

- Arranz, F.R.; Arias, C.A.; Rubio, J.F.P. 2000. Infección por virus orf. *Piel*. 15, 367-371
- Barraviera, S.R.C. S. 2005. Diseases caused by poxvirus - orf and milker's nodules – a review. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* V.11, n.2, p.102-108
- Barraviera, S.R.C.S.; Marques, S.A.; Stolf, H.O.; Silveiras, M.R.C.; Marques, M.E.A. 1997. Nódulos dos ordenhadores: relato de dez casos. *An bras. Dermatol.*, 72, 477-80.
- Bohelay, G.; Duong, T. 2017. Infecciones por poxvirus en humanos, EMC - Dermatología. EMC - Dermatología, Volume 51, Issue 3, Pages 1-9
- Fleming, FB; Mercer AA. 2007. Genus Parapoxvirus. En *Poxviruses*, ed. Mercer A.A.; Schmidt A; Weber O, 1st ed., pp. 127–165. Birkhauser Verlag, Berlin, Germany.
- Gelaye, E.; Achenbach, J. E.; Ayelet, G.; Jenberie, S.; Yami, M.; Grabherr, R.; Loitsch, A.; Diallo, A., & Lamien, C. E. 2016. Genetic characterization of poxviruses in *Camelus dromedarius* in Ethiopia, 2011-2014. *Antiviral research*, 134, 17–25.
- Groves, R.W.; Wilson-Jones, E.; Mac Donald, D.M. 1961. Human orf and milker's nodule: a clinicopathologic study. *J. Am. Acad. Dermatol.* 25, 2813-8

- Hautaniemi M.; Ueda N.; Tuimala, J.; Mercer, A. A.; Lahdenperä, J.; McInnes, C J. 2010. The genome of Pseudocowpoxvirus: comparison of a reindeer isolate and a reference strain. *Journal of General Virology*, 91, 1560–1576
- Inoshima, Y.; Morooka A.; Sentsui, H. 2000. Detection and diagnostic of Parapoxvirus by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 84:201-208
- Leavell, U.W.; Phillips, J.A. Milker's nodules. 1975. Pathogenesis, tissue culture electron microscopy and calf inoculation. *Arch. Dermatol.* 111, 1307-11.
- Panizzardi, A.; Luna P.; Abad, M. E.; Vargas, A.; Plumet, J.; Casas J.; Larralde, M. 2018. Poxvirus infection: orf and milker's nodule. *Dermatología Argentina*, 24: 141-144
- Shivanna, V.; Cino-Ozuna, A. G.; Heskett, C.; Marthaler, D. G.; Ganta, C. 2020. Pseudocowpox virus infection in an American bison (Bison bison). *BMC veterinary research*, 16(1), 241.
- Steinhart, B. 2005. Orf in humans: dramatic but benign. *CJEM*, 7(6), 417–419.
- Tack, D. M.; Reynolds, M. G. 2011. Zoonotic poxviruses Associated with Companion Animals. *Animals: an open access journal from MDPI*, 1(4), 377–395.