

# PRIMER AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DEL VIRUS DE LA RINOTRAQUEITIS INFECCIOSA BOVINA EN EL URUGUAY.

GUARINO, H.  
D.M.V.

MAISONNAVE, J.  
D.M.V. M Sc.

CAPANO, F.  
D.M.V.

PEREIRA, J.  
D.M.V.

Técnicos del C.I.VET.  
"Miguel C. Rubino".  
MAP, Casilla de correo 6577,  
Montevideo - Uruguay.

## RESUMEN.

Se aisló el virus de Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (RIB) del prepucio de un bovino, seropositivo, clínicamente sano, luego de la administración de corticosteroides. No se detectó virus en las secreciones oculares ni nasales.

La identificación del aislamiento, como virus del RIB, fue realizada por las pruebas de seroneu-

tralización e inmunofluorescencia directa y por el efecto citopático en cultivo celular.

Se confirmó la posibilidad de provocar reexcreción del virus de RIB a partir de un animal infectado latentemente, suministrándole 0,11 mg/Kg. de peso vivo de dexametasona durante 5 días.

Veterinaria 78: 131 - 134, 1981

## INTRODUCCION.

Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (RIB) es una severa enfermedad viral del ganado bovino, ampliamente difundida en el mundo, pudiendo producir infección subclínica o diversas manifestaciones, principalmente en las vías respiratorias superiores, el tracto genital y conjuntivitis, en animales susceptibles, de todas las edades (1) (7) (15) (18).

Fue descrita por primera vez en 1955 por Miller en Estados Unidos (7). En nuestro país existían pautas de la presencia del virus dadas por la aparición de brotes clínicamente sospechosos de RIB y por la detección de anticuerpos seroneutralizantes. Como la mayoría de los Herpesvirus, el virus de la RIB, al igual que el Herpes simplex humano (16), tiene la particularidad de inducir latencia después de una infección primaria, con subsecuentes episodios de reexcreción intermitente.

El virus latente puede ser reactivado por varios estímulos, como ser "stress" o tratamiento con corticosteroides (2) (3) (4) (5) (9) (10) (14) (15) (16).

La reexcreción del virus puede ocurrir en animales clínicamente sanos con anticuerpos seroneutralizantes (16).

La recrudescencia del virus de RIB por medio de la administración de corticosteroides puede provocarse hasta por un período de 4 años post-infección primaria (4).

El presente trabajo tiene como objetivos demostrar la presencia del virus de RIB por primera vez en nuestro país y comprobar el estado latente en animales sanos, seropositivos, provocando la reexcreción viral a partir de la administración de corticosteroides.



## MATERIALES Y METODOS.

### ANIMAL DE EXPERIMENTACION.

Se empleó para este estudio un novillo Hereford, de 2 años de edad, mantenido en aislamiento durante el transcurso de la experiencia.

El animal presentó, antes de la administración de corticosteroides, un título de anticuerpos seroneutralizantes, naturalmente adquiridos, de 1:8 para virus de la RIB.

### TITULACION DE SUEROS.

El suero bovino hiperinmune, proporcionado por el Dr. C.R. Rossi, de la Universidad de Auburn, Alabama, E.E.U.U., presentó un título de seroneutralización de 1:96 frente a 100 dosis infectante 50<sup>0</sup>/o en cultivo tisular (DICT<sub>50</sub>) de la cepa de referencia del virus de RIB.

Los sueros utilizados fueron titulados por la técnica de seroneutralización en microplaca\* de 96 hoyos y fondo plano (13) y estimados por el método de Reed & Muench (11).

### VIRUS.

Como virus de referencia se utilizó la cepa vaginal V155 del virus de RIB, gentilmente proporcionada por el Dr. T. St. George, CSIRO, Australia, con un título de 10<sup>2.5</sup> DICT<sub>50</sub>/0.025 ml.

### CULTIVOS CELULARES.

Se utilizaron monocapas de cultivos de riñón bovino (RB), pulmón y riñón fetal bovino, (PFB) y (RFB) y como medio de crecimiento, solución salina de Hanks', con 0,5<sup>0</sup>/o de hidrolisado de lactoalbúmina (medio Hanks') más 10<sup>0</sup>/o suero bovino (SB).

Los cultivos celulares fueron preparados de acuerdo a las técnicas corrientes de citocultivo.

### TRATAMIENTO CON CORTICOSTEROIDE.

El animal fue inoculado con dexametasona\*\* a razón de 0,11 mg/kg. de peso vivo por vía intramuscular, diariamente, durante 5 días.

### COLECCION DE MATERIALES.

A partir del cuarto día de iniciada la administración de dexametasona, se colectaron hisopos nasales, oculares y prepuciales durante 5 días consecutivos.

Dichos hisopos fueron mantenidos en solución salina de Hanks' adicionada con 600 UI/ml. de penicilina y 600 µg/ml. de estreptomina, hasta su posterior procesamiento.

### PROCESAMIENTO DE MATERIALES Y AISLAMIENTO VIRAL.

Cinco horas postextracción, los hisopos fueron escurridos y el fluido clarificado por centrifugación a 2400 rpm. durante 20 minutos a 5<sup>0</sup>C.

Los materiales que no fueron procesados el día de su extracción, se conservaron a - 70<sup>0</sup>C.

\* Costar, 205 Broadway, Cambridge, Mass., USA.-  
\*\* Dexadreson - Intervet (Aust.) Pty. Ltd.

El sobrenadante obtenido de cada muestra fue inoculado en 4 tubos de cultivo celular de RB, en un volumen de 1 ml. y los mismos incubados a 37<sup>0</sup>C durante 18 horas. Al cabo de este período, el inóculo fue reemplazado por medio Hanks' más 5<sup>0</sup>/o de suero ovino.

Se realizaron observaciones diarias de los cultivos inoculados a fin de visualizar el efecto citopático (ECP). Los cultivos que no mostraron ECP al cabo de 7 días, se reinocularon en nuevos cultivos celulares.

Los cultivos que mostraron ECP se centrifugaron a 2400 rpm. durante 1 hora y los sobrenadantes obtenidos se filtraron por membrana esterilizante\* de 0,45 µm. Estos sobrenadantes se titularon por la prueba de infectividad en microplaca con células RB y luego fueron colocados en ampollas y conservados a - 70<sup>0</sup>C. Este material quedó registrado como 8/14.

### IDENTIFICACION DEL VIRUS.

La cepa 8/14 fue identificada por las pruebas de inmunofluorescencia directa y de seroneutralización.

#### 1. Inmunofluorescencia directa:

Las cepas 8/14 y de referencia se inocularon en monocapas completas de PFB, en tubos Leighton\*\* con laminillas, con un volumen de 0,5 ml/tubo, dejándose como control 4 tubos. Luego de una hora de incubación a 37<sup>0</sup>C, los inóculos fueron reemplazados por medio Hanks', más 5<sup>0</sup>/o suero fetal bovino (SFB). Los tubos se incubaron a 37<sup>0</sup>C, observándose diariamente a fin de detectar la aparición de ECP. Las laminillas de los tubos que mostraron ECP, sin llegar al desprendimiento total de la monocapa, y las de los controles se fijaron en acetona durante 30 minutos, a temperatura ambiente, y luego se tiñeron con suero anti-RIB conjugado con isotiocianato de fluoresceína, proporcionado por el National Animal Disease Center (NADC), EE.UU.

Las laminillas, una vez teñidas, se lavaron con solución fosfato-buffer salina (PBS), se montaron y se observaron en microscopio de lámpara de luz ultravioleta\*\*\*. Se utilizaron como controles positivo y negativos, laminillas con células de testículo bovino, infectadas con la cepa colorado del virus de RIB y sin inocular, proporcionadas por el NADC.

#### 2. Seroneutralización:

La cepa aislada, 8/14, se enfrentó con suero bovino hiperinmune y con suero negativo a RIB, por la técnica de seroneutralización en microplaca, antes mencionada.

Se utilizaron células de RFB, en una concentración de 4 x 10<sup>5</sup> cél/ml., suspendidas en medio Hanks', suplementado con 5<sup>0</sup>/o SFB.

## RESULTADOS.

### INFECCION RECURRENTE.

El animal presentó corrimiento nasal y depresión del sensorio, como únicos signos de la infección recurrente.

\* Millipore - Corp., Bedford, MA 01730.-

\*\* Bellco Glass, Inc. Vineland, New Jersey 08360.-

\*\*\* Leltz - SM - Lux con Ploemopak 2.3. con lámpara Hg. 50 Vatios.-



## ASLAMIENTO VIRAL.

El virus de la RIB fue aislado de hisopos prepuciales que habfan sido colectados el séptimo y octavo día a partir del comienzo de la administración del corticosteroide.

El ECP se observó, respectivamente, a los 3 y 4 días postinoculación del material en los tubos. El ECP observado fue similar al producido por la cepa de referencia.

Este aislamiento se tituló por la prueba de infectividad en microplaca, dando un título de  $10^{3.48}$  DICT<sub>50</sub>/0,025 ml.

Los cultivos inoculados con material de los hisopos nasales y oculares, después de dos pasajes sin producir ECP, se consideraron negativos.

## IDENTIFICACION VIRAL.

### 1. Seroneutralización:

El suero hiperinmune utilizado neutralizó el ECP de la cepa 8/14 y el de la cepa de referencia, ambas a 1000 DICT<sub>50</sub>/0,025 ml., el suero negativo no neutralizó el ECP de ninguna de las dos cepas.

### 2. Inmunofluorescencia:

Los cultivos inoculados con la cepa 8/14 y de referencia mostraron ECP entre 18 y 24 horas postinoculación.

Los preparados realizados con estos materiales mostraron fluorescencia citoplasmática específica a RIB (6) (12), en un 90% de las células. (ver fotos 1,2,3 y 4).



Foto 1 — Cultivo de células de PFB no infectadas. (Control Negativo) 150 X.

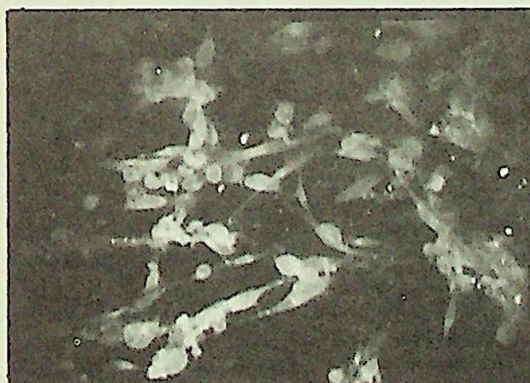


Foto 2 — Cultivo de células de PFB 24 horas post inoculación con el virus de RIB cepa de referencia V 155. (Control Positivo) 150 X.



Foto 3 — Cultivo de células de PFB 24 horas post inoculación con el material 8/14. Se observa fluorescencia específica y efecto citopático característico del virus de RIB. 150 X.

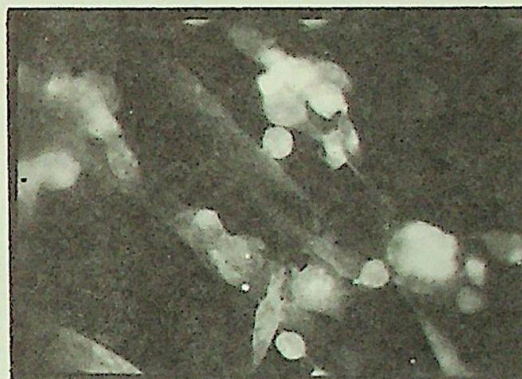


Foto 4 — Cultivo de células de PFB 24 horas post inoculación con material 8/14. 300 X.

## DISCUSION.

El virus de RIB fue aislado de prepucio de un animal clínicamente sano, seropositivo, después de la administración de un corticosteroide; este resultado coincide con numerosos trabajos anteriores (2) (3) (4) (5) (8) (9) (10) (15) (16).

En este caso se obtuvieron resultados solamente a partir de hisopos prepuciales, concordando con lo publicado por Dennett et al. (5).

La ausencia de virus detectable en las secreciones nasales podría deberse a la presencia de anticuerpos neutralizantes locales (3).

La detección del virus de RIB en el prepucio, luego de la administración del corticosteroide, en un animal naturalmente infectado, indicaría que este animal es un portador latente, con el consiguiente riesgo de transmisión de la enfermedad (5).

La excreción intermitente del virus en un animal que no muestra ningún signo clínico de la infección, explicaría el origen de focos de la enfermedad en rodeos sin historia de introducción reciente de ganado (17).

## AGRADECIMIENTOS.

Al Dr. T. St. George, por su valiosa colaboración en la planificación del trabajo. A las Sras. N.C. de Ruiz Díaz y G.G. de Soto, por su ayuda en los trabajos de laboratorio.



## SUMMARY

Infectious Bovine Rhinotracheitis virus was recovered from the prepuce of a clinically healthy bovine carrying naturally acquired neutralizing antibodies to the virus following corticosteroid administrations. Virus was not detected in ocular nor in nasal secretions. The IBR virus isolated was identified by

seroneutralization and direct fluorescent antibody techniques and by the cytopathic effect produced in tissue cultures. The possibility of inducing reactivation of the IBR virus from a latent infected animal after administration of 0,11 mg/kg. of dexamethasone during 5 days was confirmed.

Veterinaria 78: 131 - 134, 1981

## REFERENCIAS

1. ALLAN E.M., PIRIE H.M., MSOLLA P.M., SELMAN J.E., WISEMAN A.: The pathological features of severe cases of Infectious Bovine Rhinotracheitis. *Vet. Rec.* 107: 441 - 442, 1980.-
2. CASTRUCCI G., FRIGERI F., CILLI V., TESEI B., ARUSH A.M., PEDINI B., RANUCCI S., RAMPICHINI L.: Attempts to reactivate Bovid Herpesvirus 2 in experimentally infected calves. *Am J. Vet. Res.* 41: 1890 - 1893, 1980.-
3. DARCEL C.Q., DORWERD W.J.: Recovery of Infectious Bovine Rhinotracheitis virus following corticosteroid treatment of vaccinated animals. *Can. Vet. Jour.* 16: 87 - 88, 1975.-
4. DAVIES D.H., CARMICHAEL L.E.: Role of Cell-Mediated immunity in recovery of cattle from primary and recurrent infections with IBRV. *Infect. Immun.* 8: 510 - 518, 1973.-
5. DENNETT O.P., BARASA J.O., JOHNSON R.H.: IBRV: Studies on the venereal carrier status in range cattle. *Res. Vet. Sci.* 20: 77 - 83, 1976.-
6. JASTY V., CHANQ P.W.: IBRV in bovine kidney cells: sequence of viral production cellular changes, and localization of viral nucleic acid and protein. *Am. J. Vet. Res.* 30: 1325 - 1332, 1969.-
7. KAHNS, R.F.: Infectious Bovine Rhinotracheitis: a review and update. *J. Am. Vet. Med. Ass. (JAVMA)* 171: 1055 - 1064, 1977.-
8. NARITA M., IRMI S., NAMBA K., SCHIMIZU Y.: Neural changes in recurrent infection of IBRV in calves treated with dexamethasone. *Am. J. Vet. Res.* 39: 1399 - 1403, 1978.-
9. PASTORET P.P., AGUILAR-SETIEN A., BURTONBOY G. et al.: Effect of repeated treatment with dexamethasone on the re-excretion pattern of IBRV and humoral immune response. *Vet. Microb.* 4: 149 - 155, 1979.-
10. PASTORET P.P., BABIUK L.A., MISRA V., GRIEBE L.: Reactivation of temperature-sensitive and non-temperature-sensitive IBR vaccine virus with dexamethasone. *Infect. Immun.* 29: 483 - 488, 1980.-
11. REED L.J., MUENCH H.: A simple method of estimating fifty percent end points. *Am. J. Hyg.* 27: 493 - 497, 1938.-
12. REED D.E., BICKNELL E.J., LARSON C.A., KNUDTSON W.U., KIRKBRIDE C.A.: IBR virus-induced abortion: rapid diagnosis by FA technique. *Am. J. Vet. Res.* 32: 1423 - 1426, 1971.-
13. ROSSI C.R., KIESEL G.K.: Microtiter test for detecting antibody in bovine serum to Parainfluenza-3 virus, Infectious Bovine Rhinotracheitis virus and Bovine Virus Diarrhea virus. *Appl. Microb.* 22: 32 - 36, 1971.-
14. SAXEGAARD F.: Problems connected with the diagnosis of subclinical infection with Infectious Pustular Vulvovaginitis virus (IPV virus) in bulls. *Nord. Vet. Med.* 18: 452 - 459, 1966.-
15. SCHULTZ R.D., HALL C.E., SHEFFY B.E., KAHRS R.F., BEAN B.H.: Current status of IBR-IPV virus infections in bulls. *U.S. Anim. Health Assoc.'s 80th. Ann. Meeting.* Miami, FL, 1976.-
16. SHEFFY B.E., DAVIES D.H.: Reactivation of a bovine Herpesvirus after corticosteroid treatment. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 140: 974 - 976, 1972.-
17. SNOWDON W.A.: The IBR-IPV virus: reaction to infection and intermittent recovery of virus from experimentally infected cattle. *Aust. Vet. J.* 41: 135 - 141, 1965.-
18. WISEMAN A., MSOLLA P.M., SELMEN I.E., ALLAN E.M., PIRIE H.M.: Clinical and epidemiological features of 15 incidents of severe Infectious Bovine Rhinotracheitis. *Vet. Rec.* 107: 434 - 441, 1980.-