

DETERMINACION DE LA PREVALENCIA DE LA RINOTRAQUEITIS INFECCIOSA BOVINA - IBR EN RODEOS DE LECHE Y CARNE EN URUGUAY

Saizar, J. (1)

RESUMEN

Se determinó la prevalencia de IBR en rodeos de carne y leche en Uruguay, mediante la técnica de ELISA indirecta para identificación de anticuerpos en suero.

La misma se sitúa en un entorno del 45%/48% para ambos tipos de explotación, con un nivel de confianza del 95%. El alto porcentaje de establecimientos positivos (75%/100%), así como el índice de prevalencia determinado, estarían indicando la amplia distribución de la enfermedad en el país.

Palabras Claves: IBR, Prevalencia, ELISA, Bovinos.

SUMMARY

The prevalence of IBR in dairy and beef cattle in Uruguay was assessed using an indirect ELISA test for the identification of circulating antibodies..

It ranges between 45% and 48% with a confidence level of 95%. The high percentage of positive farms (75%/100%), as well as the prevalence index established, demonstrate that this disease is widely distributed in the country.

Key Words: IBR, Prevalence, ELISA, Bovines

INTRODUCCION

IBR es una enfermedad de amplia distribución mundial, que afecta a los bovinos y caprinos y puede presentarse en forma subclínica o con una variedad de signos clínicos: respiratorios, digestivos, oculares, reproductivos, nerviosos (3,11,12,19). El agente causal, herpes virus bovino-1 (HV-B-1), produce latencia luego de la primo-infección, manteniéndose en los ganglios del sistema nervioso central y pudiendo ser re-excretado sin signos clínicos de la enfermedad, bajo condiciones de estrés o tratamiento con corticoides (3,11,18,19,30). Esta condición no se pierde con la

vacunación, teniendo el animal posibilidades de por vida de re-excretar el virus (13).

El BHV-1 es un miembro de la familia Herpesviridae, subfamilia Alphaherpesvirinae.

Su genoma es una molécula de DNA bicatenario con un peso molecular de 88×10^6 daltons (20), que replica en el núcleo de las células huésped y el virus adquiere su envoltura al brotar de la membrana nuclear. Es sensible al éter, cloroformo, etanol y acetona. Replica bien en líneas celulares y cultivos primarios, produciendo un efecto citopático característico (ECP) en 24-48 horas. El ECP es la

característica principal de la presencia del virus cuando se realizan trabajos de aislamiento y/o titulación viral y estudios serológicos como pruebas de seroneutralización (SN).

La forma de infección es por contacto con animales enfermos o portadores.

La enfermedad puede transmitirse fácilmente cuando grandes cantidades de virus son eliminadas por secreciones respiratorias, oculares o reproductivas. La infección por aerosol es considerada la forma de diseminación de la enfermedad, mientras que la transmisión venérea es el método para la enfermedad genital (3).

Arbitrado-aprobado: 25/5/95

(1) Dirección de Laboratorios Veterinarios «Miguel C. Rubino»

Casilla de Correo 6577, Montevideo, Uruguay

Investigación financiada por proyecto B/1134/2-Int. Foundation for Science/IFS

El virus puede ser excretado en el semen de toros sanos seropositivos. El riesgo de inseminar vacas con semen infectado, representa una pérdida económica, debido a un incremento en el número de abortos y reabsorciones embrionarias.

Actualmente se emplean nuevas técnicas tan sensibles como la SN, pero mucho más rápidas. Entre ellas se encuentra el ELISA para identificación de anticuerpos, así como anticuerpos monoclonales y sondas de DNA para identificación de virus en materiales clínicos (4,14,27,28).

En Uruguay, la presencia de IBR se sospechó por mucho tiempo, del punto de vista clínico y epidemiológico, y la presencia de anticuerpos circulantes fue confirmada en 1980, cuando se puso a punto la técnica de SN. El virus fue aislado por primera vez en 1981, a partir de un toro sano con anticuerpos seroneturalizantes a IBR, luego de la administración de corticoides (9).

Posteriormente fue aislado de un caso clínico de campo con sintomatología nerviosa (6), y de un caso típico de reactivación (21). En el año 1995 se comprobó su presencia mediante la técnica de hibridización de ácidos nucleicos (DOT-BLOT), en un caso con sintomatología nerviosa en animales de 2 años(22).

MATERIALES Y METODOS

Muestras de Suero.

1) Rodeo de carne.

Un total de 399 sueros provenientes de 129 establecimientos de 18 departamentos (excepto Montevideo), fueron procesados por la técnica de ELISA (24). Los sueros fueron obtenidos en el año 1992 para un estudio epidemiológico de fiebre aftosa (8) y se encontraban congelados en el banco de sueros de DILAVE. Se tomaron 3 ó 4 sueros por establecimiento. El marco estadístico del muestreo provino de DI.CO.SE para los departamentos de Artigas y Rivera

y de la Dirección General de los Servicios Ganaderos (DGSG) para el resto de los departamentos. Los establecimientos en el marco de la DGSG fueron determinados al azar, en forma proporcional a su población ganadera y los de Artigas y Rivera de acuerdo al tamaño de los mismos. En ambos marcos, la muestra se obtuvo al azar en dos etapas. Primeramente se eligieron los establecimientos y en una segunda etapa se determinó el número de animales por establecimiento.

El número de la muestra se obtuvo con un programa en dBase IV (1) y de una tabla de números al azar (26). El nivel de confianza fue del 95%.

2) Rodeos de Leche.

2.a. De la cooperativa lechera del sur se procesaron 1.269 sueros provenientes de 105 tambos ubicados en los Departamentos de San José, Florida, Canelones y Colonia. Estos sueros fueron obtenidos al azar en el año 1987 para un muestreo serológico de Leucosis Bovina (LB)(30), y se encontraban congelados en el banco de sueros de DILAVE. El marco estadístico del muestreo provino de DICOSE. El nivel de confianza fue del 95%. El marco estadístico de la muestra provino de DI.CO.SE.(11).

2.b. De la cooperativa lechera del norte, en formación, se procesaron 280 sueros procedentes de 12 tambos también en formación, de los Departamentos de Tacuarembó, Rivera y Cerro Largo. Dichos tambos participaban en un proyecto con DILAVE, de predios libres de LB. Como los mismos estaban en formación, sólo se adquirían animales sero-negativos a LB por la técnica de gel difusión. Al momento del presente estudio, de procesó la totalidad de los sueros existentes en el laboratorio, que a marzo de 1993 ascendían a 280. Virus de IBR y preparación del antígeno de ELISA

La cepa Cooper del virus de IBR fue proporcionada por el Dr R. Jacobson de la Universidad de Cornell, USA. La preparación del

antígeno fue la siguiente: Monocapas confluentes de células Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) fueron infectadas con el virus de IBR a una multiplicidad de infección de 1000 unidades infectantes por 0.05ml. Las células fueron cosechadas cuando mostraban 80% ECP (aproximadamente 48 horas post infección). La cosecha fue centrifugada a 2500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se mezcló con polyethylene glycol (PEG), PM 7000-9000, a una concentración final de 8% p/v). Se le agregó NaCl para lograr una molaridad de 0.5M Se agitó la mezcla toda la noche (T/N) a 4°C y luego se centrifugó a 3000 rpm por 30 minutos. El pellet se disolvió en 25 ml de buffer TGNT pH8.9 (Tris 0.005M, Glicina 0.01M, NaCl 0.15M, 1% Triton X-100) y se agitó T/N a 4°C. El pellet obtenido mediante centrifugación de la cosecha de virus fue resuspendido en 25 ml de buffer TGNT, agitado nuevamente a 4°C y centrifugado a 2500 rpm. El pellet se descartó y el sobrenadante se almacenó.

Los extractos celulares y de PEG se mezclaron y centrifugaron a 30.000 rpm por 90 minutos (rotor SW AH-629 Sorval Combi-OTD). El sobrenadante se guardó en pequeñas alícuotas a -70°C(24).

Procedimiento de ELISA

La técnica de ELISA y la evaluación de los resultados fueron descriptos previamente (12,23).

Se colocaron 100µl de antígeno de IBR diluido 1:1500 en buffer carbonato de sodio pH9.6, en cada una de las columnas impares de la placa de microtitulación (Dynatech, USA), y el antígeno negativo (sobrenadante celular sin virus) a la misma dilución en las columnas pares. Las placas fueron incubadas en cámara húmeda a 4°C T/N. El contenido se volcó y sin lavar se le agregó buffer fosfato salino (PBS) con 3% de suero equino (100 ul/hoyo) y las placas se incubaron durante 1 hora a 37°C, para cubrir los sitios activos restantes en la superficie de

poliestireno de los hoyos. Luego de cada etapa de incubación en el procedimiento de ELISA, el material no adherido se eliminaba mediante tres lavados con PBS conteniendo 0.05% Tween-20 (PBS-T).

Las muestras de suero fueron diluídas 1:100 en PBS-T 3% suero equino y en volúmenes de 100ul, se sembraron en duplicado. Se incluyeron controles de suero positivo y negativo en cada placa. Los dos primeros hoyos (A1 y A2) de la placa se utilizaron como blanco. Luego de la incubación a 4°C en cámara húmera T/N, se agregaron 100ul de suero de conejo anti IgG bovina conjugados con peroxidasa de rábano silvestre (KPL, USA, a una dilución de 1:25.000. Luego de una incubación adicional de 1 hora a 37°C, se agregó en cada hoyo 100ul de sustrato (0.5mg/ml de orthophenylenediamine disuelto en 0.1M buffer fosfato cítrico, pH 5 conteniendo 0.5ul/ml de H2O2 30%.

Luego de 10 minutos a 37°C, se detuvo la reacción con 50ul de H2SO4 2.5M.

La densidad óptica se midió a 492 nm en un lector de placas Titertek Multiskan ELISA Reader. Las muestras de suero se consideraron positivas si el valor de su densidad óptica era dos veces más alto que el valor del control de suero negativo.

Esta técnica correlaciona muy bien con la SN (25), pero su especificidad y sensibilidad no fueron especialmente determinadas.

RESULTADOS

1) Rodeos de carne

Del análisis de 399 sueros, 180 resultaron positivos y 219 negativos, indicando una prevalencia cruda del 45% (Tabla 1).

De los 129 establecimientos involucrados en el muestreo, 95 tenían animales serológicamente positivos y solamente 34 resultaron negativos. Ello indicó que el 75% de los establecimientos tenían animales con anticuerpos contra IBR (Tabla 2).

TABLA 1 - PREVALENCIA DE IBR EN RODEOS DE CARNE Y LECHE

	Número de animales			Prevalencia %
	Positivos	Negativos	Total	
Rodeo carne	180	219	399	45
Rodeo sur leche	561	708	1269	44
Rodeo norte leche	134	146	280	48

2) Rodeos de leche

2.a) Cooperativa del sur.

El estudio de 1269 sueros permitió determinar una prevalencia cruda del 44 % (561 animales positivos y 708 negativos). (Tabla 1).

A nivel de tambos, el 92% de los mismos estaban infectados. Del total de 105 establecimientos, 97 registraron

Esta buena correlación de técnicas y el alto índice de prevalencia determinado permiten inferir que los resultados no se verían afectados por ello.

El alto porcentaje de establecimientos de carne y leche positivos, indica la amplia distribución de la enfermedad, que concuerda con la literatura científica (3,11,12,19). Sin

TABLA 2 - PREVALENCIA DE IBR NIVEL DE ESTABLECIMIENTOS

	Número de establecimientos			Prevalencia %
	Positivos	Negativos	Total	
Establ. carne	95	34	129	74
Establ. sur leche	97	8	105	92
Establ. norte leche	12	-	12	100

animales positivos y sólo 8 fueron negativos. (Tabla 2).

2.b) Cooperativa del norte.

La prevalencia cruda registrada en el estudio de 280 sueros fue del 48% (134 sueros positivos y 146 negativos). (Tabla 1).

Los doce establecimientos involucrados en el estudio tenían animales positivos (100%), (Tabla 2).

El nivel de confianza en los tres muestreos fue del 95%.

DISCUSIÓN

Se determinó la prevalencia cruda de IBR mediante la investigación de establecimientos de carne y leche cuyos sueros se encontraban congelados en el banco de sueros de DILAVE, habiéndose obtenido para otros estudios epidemiológicos, con un nivel de confianza del 95%.

Estudios previos (25) demostraron la buena correlación existente entre esta técnica y la SN, no habiéndose establecido su especificidad/sensibilidad.

embargo, ello no se corresponde con la presencia de IBR como una enfermedad clínica. Es posible que la cepa de campo predominante sea HVB-1.2 (virus de la vulvovaginitis / balanopostitis pustulosa) (VVP/BPP).

(Dr. Otto Straub, comunicación personal). Esta cepa HVB-1.2 es conocida por su baja virulencia (3,11,12,19).

Los dos casos clínicos con sintomatología nerviosa (6,21) permiten suponer que también estarían actuando las cepas HBV-1.1 y/o la HVB-5. La cepa tipo 1.1 es la más patogénica y comunmente está asociada a la enfermedad respiratoria, aunque puede dar sintomatología nerviosa y también se la vincula a casos de aborto (23). La cepa HVB-5 (antes HVB-1.3) ha sido aislada de casos de meningoencefalitis en terneros (5,7), siendo su diseminación por el sistema nervioso central rápida, eficiente y causante de patologías nerviosas severas (23). Se plantea la posibilidad de que ambas cepas estén actuando, dado que no ha sido posible caracterizar las cepas aisladas.

La vacunación contra IBR fue autorizada en Uruguay con vacunas inactivadas en agosto de 1996. Se tiene conocimiento de que algunos productores vacunaban sus rodeos con vacunas provenientes del exterior, con anterioridad a esta fecha. Como hoy no existen kits de diagnóstico que permitan diferenciar los anticuerpos de animales vacunados de animales con primo-infección, el hecho de que hubiera habido vacunación extra-oficial podría desvirtuar los resultados obtenidos en el presente estudio. Sin embargo, los sueros utilizados en el mismo provienen de muestreos realizados en los años 1987, 1992 y 1993, y se considera muy probable que no se vacunara entonces, por la escasa sintomatología clínica observada y el desconocimiento de la prevalencia de la enfermedad.

El alto porcentaje de establecimientos positivos a la enfermedad y la elevada presencia de animales seropositivos, en contraste con la ausencia casi de casos clínicos, permiten suponer que posiblemente esta enfermedad no sea un problema real para el rodeo nacional. Antes de encarar cualquier programa de vacunación, ya sean vacunas con antígeno entero o con sub-unidades virales, con diferentes adyuvantes (oleoso, ISCOMS, hidróxido de aluminio), solas o combinadas (2,15,16,17,19), resulta fundamental determinar, en cada caso particular, si el problema que afecta al rodeo es realmente IBR, dado que por las características de esta enfermedad, de presentarse generalmente en forma subclínica, la sola presencia de anticuerpos no estaría indicando un problema.

Es importante estudiar el rodeo, su manejo, determinar los períodos interparto, los retornos al servicio, posibles abortos, trastornos nerviosos, y descartar otras enfermedades con la misma sintomatología, antes de embarcarse en un programa de vacunación, que no siempre dará mejores resultados y que puede resultar muy costoso para el productor.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece muy especialmente a los Dres. Richard Jacobson, Alberto Nieto y Andrés Gil por asesoramiento técnico; al Dr. Berndt Klingeborn por sugerencias interesantes en la redacción del trabajo; a la Dra. Mabel Ferrer por la producción de los cultivos celulares y a la Sra. Gladys Gonzalez por su colaboración en la producción del antígeno crudo.

NOTA: El presente trabajo no compromete en absoluto a la Dirección General de Servicios Ganaderos ni a DILAVE, por tratarse de un trabajo personal realizado bajo los auspicios de un organismo internacional de financiamiento.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ashton-Tate. 1990. *dBase IV. Version 1.1*. Ashton-Tate, P.O.Box 2833, Torrance, Ca.90509-2833.
2. Babiuk, L.A., Zamb, T., Lawman, M. J. P., Hughes, G., Gifford, G.A., L'Ita Iien, J., van Drunen Littel-van den Hurk, S. (1987). Protection of Cattle from BHV-1 Infection by immunization with individual viral glycoproteins. *Virology* 159: 5766.
3. Blood, D.C. and Rodostits, O.M. *Veterinary Medicine* Ed. Bailliere Tindall, London, (1989) 7th Edition 899-906.
4. Bolton, D., Chu, H.J., Ardans, A.A., Kelly, B., Zee, N.Y. (1981) Evaluation of the critical parameters of a sensitive ELISA test using purified virus antigens. *Vet. Microbiol.* 6, 265-279.
5. Carrillo, B.J., Abroggi, A., Schudel, A., Vazquez, M., Dahme, E., Pospichil, A. (1983). Meningoencephalitis caused by IBR virus in Calves in Argentina. *J. Vet. Med.*, 30:p.327-332.
6. Diaz, L. E. Maisonnave, J., Guarino, H., Paullier, C., Perdomo, E., Figares, A., Izaguirre, R. (1982). IBR, descripción de un caso clínico de terneros de tambo. Congreso Nacional de Medicina Veterinaria 1982 pag.521-530.
7. Eugster, A.K., Angulo, A.B., Jones, L.P. (1974). Herpesvirus encephalitis in range cattle. *Abstracts. 17th Annual Meeting of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians*, Virginia, p.267-281.
8. Gil, A., 1993. *Epidemiological Study of Foot-and-mouth Disease (FMD)*, in Uruguay. Tesis de Doctorado presentada en la Escuela de Graduados de la Universidad de Minnesota, USA.
9. Guarino, H., Maisonnave, J., Capano, F., Pereira, J. (1981) Primer aislamiento e identificación del virus de la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina en Uruguay. *Revista Veterinaria, Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay (SMVU)* N° 78. 131-134.
10. Guarino, H., Capano, F., Gil, A. (1991) Leucosis Bovina Enzootica: Relevamiento serológico en establecimientos lecheros del sur del país. *Segundas Jornadas Técnicas de la Fac. de*

Veterinaria, 14/16 nov.1991, pág.40.

11. Hagan & Bruner's *Infectious Diseases of Domestic Animals* Ed. Cornell Univ. Press, New York (1981) 7th Edition. 551-560.
12. Kuhrs, R.F. (1987). *Infectious Bovine Rhinotracheitis: A Review and Update*, *Journal of Am. Vet. Association* 171, 1055-1064.
13. Lemaire, P., Pastoret, P., Thiry, E. (1994) *Le controle de l'infection par le virus de la rhinotracheite infectieuse bovine*. *Ann. Méd. Vet.*, 138: 167-180.
14. Lombard, M., Piroid, R., Titration of FMD antibodies in cattle sera: Comparative study of two methods: SN on cells and ELISA. *IFFA Merieux*.
15. Lupton, H.W., Reed, D.E. (1980) Evaluation of Experimental Subunit Vaccines for IBR. *Amer. J. Vet. Res.* 41, 383-389.
16. Merza, M., Belak, S., Morein, B. (1988) Characterization of an ISCOM prepared with Envelope Glycoproteins of BHV-1. *J. Vet. Med.*, B.35: 695-703.
17. Merza, M., Tibor, S., Kuscer, L., Bognar, G., Morein, B. (1991). ISCOM of BHV-1 envelope glycoproteins protected calves against both disease and infection. *J. Vet. Med.*, 38(4):305-314.
18. Miller, J. (1991) The Effects of IBR infection on the reproductive function in cattle. *Vet. Med.* 95-98.
19. Pastoret, P. O., Thiry, E., Brocher, B., Derboven, G. (1982). Bovid Herpesvirus 1 Infection of Cattle: Pathogenesis, Latency, Consequences of Latency. *Ann. Rech. Vét.*, 13:221-235.
20. Pastoret, P. O., Burtonboy, G., Aguilar Setien, A., Godart, M., Lamy, M.E., Shoeners, F. (1980). Comparison Between Strains of IBR (BHV-1), from respiratory and genital origins, using polyacrylamide gel electrophoresis of structural proteins. *Vet. Microbiol.*, 187-194.
21. Rivero, R., Feola, R., Guarino, H., Saizar, J. et al. (1987) Granuloma Nasal Bovino. *Revista Veterinaria (SMVU)*, N°98, pág.5/11.
22. Rivero, R., del Campo, R., Saizar, J., Gill, J., Giannechini, E., Mendaro, A., Wettstein, R. 1996. Meningoencefalitis por Herpes Virus en bovinos y su comprobación mediante el procedimiento de hibridación de ácidos nucleicos (DOT-BLOT). En prensa (SMVU).
23. Roizman, R., Desrosiers, R.C., Fleckenstein, B., Lopez, C., Minson, A.C. and Studdert, M.J. (1992). The family Herpesviridae: an update. *Arch. Virol.* 123:425-440.
24. Saizar, J., Guarino, H., Capano, F. (1988). Puesta a punto de la técnica Inmunoenzimática de ELISA para el diagnóstico de IBR. *Proceedings II International Conference on the impact of Viral Diseases in Latin America and the Caribbean, Argentina, 1988*, page 41. XVI Jornadas de Buatría, Paysandú, Uruguay, 1988.
25. Saizar, J., Guarino, H., Capano, F. (1988). Comparación de las técnicas de ELISA y SN en el diagnóstico de IBR. XI Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias, Lima, Perú. Pág.75.
26. Snedecor G.W., Cochran, W.G., 1989. *Statistical Methods*. Eighth Edition. Iowa State Univ. Press. 503pg.
27. Solsona, M.: Recherche des anticorps contre le virus de la Rhinotracheitis Bovine Infectieuse par la méthode ELISA. *Bulletin de l'Académie*. 215-225.
28. Soula, A. (1982). ELISA IBR. Expression d'un titre ELISA. *Develop. Biol. Standard* 52: 147-157.
29. Trudel, M., Boulay, G., Seguin, C., Nadon, F., Lussier, G. (1988) Control of IBR in calves with a BHV-1 subunit-ISCOM vaccine. *Vaccine* 6, 525-529.
30. Van Donkersgoed, J., Babiuk, L. (1991). Diagnosing and managing the respiratory form of IBR. *Vet. Medicine*. 86-94.