



NEUMONIA ENZOÓTICA POR EL VIRUS RESPIRATORIO SINCITAL BOVINO (BRSV) EN TERNEROS EN URUGUAY

Rivero, R.^{1*}; Frabasile, S.²; Sallis, E.S.V.³; Callero, J.L.⁴; Luzardo, S.⁴; Gianneechini, R.¹; Hanusz, N.²; Rodríguez, A.⁵; Matto, C.¹; Adrien, M.L.³; Schild, A.L.³; Arbiza, J.²

¹ Laboratorio Regional Noroeste DILAVE "Miguel C. Rubino", MGAP., Paysandú, Uruguay. Laboratorio de Virología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay. ³ Laboratorio Regional de Diagnóstico, Facultad de Veterinaria, Universidad Federal de Pelotas, Brasil. ⁴ Médico Veterinario, Ejercicio Liberal, Uruguay. ⁵ Dpto. Extensión Sta. Elena. * Autor de correspondencia: rrivero@mgap.gub.uy

Resumen

Se describe un foco de neumonía por virus respiratorio sincital bovino (BRSV) ocurrido en Julio de 2012 en una cría de terneros en el Departamento de Flores. La morbilidad fue de 6,71% y la mortalidad 6,57%. Los principales síntomas clínicos presentados fueron tos, disnea, taquipnea, descarga nasal y ocular, y fiebre. Los principales hallazgos de necropsia fueron pulmones con consolidación anteroventral, enfisema y edema caudo-dorsal. En la histopatología se observó neumonía broncointersticial, bronquiolitis necrotizante y alveolitis exudativa con presencia de sincitios epiteliales. Hubo marcación positiva para el BRSV por la técnica de inmunohistoquímica en las células epiteliales bronquiolares y las células sincitiales. Hisopados nasales de 10 animales con síntomas respiratorios se utilizaron para detección de genes virales por RT-PCR en tiempo real. El análisis de la secuencia fue compatible con las secuencias de referencia para BRSV.

Summary

An outbreak of pneumonia by bovine respiratory syncytial virus, occurred in July 2012 on a calf-rearing in Flores is described. Morbidity and mortality were 6.71% and 6.57% respectively. The main clinical symptoms were cough, dyspnea, tachypnea, nasal and ocular discharge and fever. Principal gross findings were antero-ventral consolidation of lungs with caudo-dorsal emphysema and edema. Also bronchointerstitial pneumonia, necrotizing bronchiolitis and exudative alveolitis with syncytial cells in lungs were seen. In lung sections, bronchiolar epithelial cells and syncytial cells were stained positively with anti-BRSV by immunohistochemistry. Ten nasal swabs of animals with respiratory symptoms were taken and analyzed by real time RT-PCR to detect viral genes. The analysis of the sequence from the fragment obtained was in accordance with the reference sequences of BRSV.

Introducción

En Uruguay el crecimiento de la agricultura y la intensificación de la producción ganadera y lechera han provocado un incremento en el número de animales en confinamiento. Conjuntamente, se ha registrado en los últimos años, un aumento en el diagnóstico de enfermedades respiratorias, siendo una de las patologías más comunes en el Litoral oeste y Este de nuestro País (Matto 2013, datos sin publicar).

En las enfermedades respiratorias de los terneros, también denominado complejo respiratorio bovino o "neumonía enzoótica", participan varios agentes virales en asociación con bacterias y *Chlamydia psittaci*. El virus respiratorio sincital bovino (BRSV) es el agente más importante, seguido del virus parainfluenza-3 (PI-3), herpesvirus bovino tipo 1 (BHV-1), virus de la diarrea viral bovina (BVDV) y adenovirus tipo 3. Los agentes bacterianos más importantes que causan neumonía secundaria son: *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus pneumoniae* y *Mycoplasma bovis* (Driemeier y Moojen, 2007). El BRSV es un virus ARN, envuelto, no segmentado, de sentido negativo, que pertenece al género Pneumovirus de la familia Paramyxoviridae (Lamb y Parks 2007). El virus se transmite por contacto directo o aerosoles y el periodo de incubación es entre 2 a 5 días (Valarcher y Taylor, 2007).

El objetivo del presente trabajo fue describir un foco de neumonía causada por el BRSV en terneros, basado en la epidemiología, hallazgos anatómo-patológicos, inmunohistoquímica, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación nucleotídica viral.

Materiales y métodos

Los datos epidemiológicos, clínicos y patológicos fueron obtenidos en las visitas realizadas al establecimiento. Se realizaron dos necropsias y los órganos fueron procesados en el Laboratorio Regional Noroeste de la DILAVE "Miguel C. Rubino", donde fueron fijados en formol bufferado al 10%, embebidos en parafina, cortados en secciones de 5 micras de espesor y teñidos con Hematoxilina y Eosina. Se sembraron muestras de pulmones en medios Agar Sangre y Agar Mac Conkey. Se realizó la técnica de inmunohistoquímica en cortes de pulmón de dos terneros, en el Laboratorio Regional de Diagnóstico de la Facultad de Veterinaria, de la Universidad Federal de Pelotas de Brasil. El anticuerpo primario utilizado fue el policlonal anti-BRSV (VMRD, Pullman, WA, USA) y posteriormente se utilizó un kit comercial de anticuerpo secundario con avidina-biotina (ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Para el diagnóstico virológico se obtuvieron 10 aspirados nasales de terneros con síntomas clínicos compatibles con afectación respiratoria en la propiedad afectada. Las muestras fueron analizadas en el laboratorio de la Sección Virología de la Facultad de Ciencias, UdelaR. Se realizó la extracción de ARN usando el método de Trizol® en 5 muestras y en las restantes se usó un kit comercial de extracción de ácidos nucleicos (QIamp Viral

RNA Quiagen Kit[®]. A partir del ARN extraído se realizó una reacción de retro-transcripción a fin de producir una copia de ADN. También se realizó una real time RT-PCR usando el método Syber Green. Los fragmentos amplificados en la real time RT-PCR fueron purificados y secuenciados con los primers N1ter y N2ter por el servicio de secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo.

Resultados

El foco se registró en Julio de 2012, en un predio ganadero de la 6^ª seccional policial de Flores, donde se realizaba un encierro de 730 terneros de 6 a 11 meses de edad, algunos de origen en el establecimiento y otros adquiridos. La alimentación que era a base de concentrados, era administrada en comederos colectivos a razón de un 3% del peso vivo, dos veces por día. Del total, enfermaron 49 animales y murieron 48, en un periodo de 28 días (morbilidad 6,71%; mortalidad 6,57%). Los signos clínicos presentados fueron: fiebre, tos, disnea, posición ortopneica, descarga nasal, lagrimeo, taquipnea y algunos presentaban respiración con boca abierta. En las necropsias se observó: mucosas ocular, bucal y peneana cianóticas, tráquea con abundante espuma en el interior y mucosa congestiva. Los pulmones presentaban los lóbulos craneal y medio consolidados, de color rojo intenso y textura gomosa, y las áreas caudodorsales de los lóbulos medio y diafragmático no colapsaban, presentaban edema y áreas de enfisema intersticial. En el estudio histológico se observó bronquiolitis, necrosis del epitelio bronquiolar con formación de sincitios epiteliales, alveolitis exudativa caracterizada por abundante presencia de neutrófilos, macrófagos y células sincitiales, severa infiltración del septo alveolar por células mononucleares, granulocitarios y macrófagos alveolares (Fig. 1A y 1B). Había también áreas extensas de atelectasia con áreas de enfisema. En los bronquios y bronquiolos se observó aplastamiento del epitelio respiratorio con presencia de células necróticas. En el intersticio se observó severo edema y congestión. No hubo crecimiento bacteriano en las muestras de pulmón. Hubo marcación positiva para el BRSV en las células epiteliales de los bronquiolos y en células sincitiales de ambos terneros (Fig. 1C). Usando la técnica de PCR en tiempo real se obtuvieron resultados

positivos en 7 muestras analizadas. La secuencia analizada mostró gran homología de secuencias con VRS.

Discusión y conclusiones

En base a los signos clínicos, hallazgos patológicos, resultados de la inmunohistoquímica, amplificación por PCR y secuenciación molecular se confirma el diagnóstico de neumonía por el BRSV. Si bien este es el primer reporte confirmado por detección del agente viral la presencia del virus en Uruguay ya fue demostrada por Costa y col. (2000).

El BRSV es causa de enfermedad respiratoria aguda y del complejo respiratorio bovino o "neumonía enzootica" en terneros de 2 semanas a 5 meses de edad, con un pico de incidencia entre el primer y tercer mes de vida.

El virus predispone a neumonías bacterianas en animales en corrales de engorde al disminuir los mecanismos de defensa del pulmón (Caswell y Williams, 2007). El virus se transmite a través de aerosoles y por contacto directo, por lo que estos aspectos son de mayor importancia en situaciones donde existe confinamiento de los animales (Radostits y col., 2007). Factores ambientales o sanitarios que causan estrés en los animales favorecen también la presentación de la enfermedad tales como: confinamiento de terneros de distintas edades y condiciones higiénicas desfavorables, hurnedad excesiva, frío, falta de ingestión de calostro, errores de alimentación, ventilación insuficiente, enfermedades intercurrentes (principalmente diarreas) y otras causas de estrés (Driemeier y Moojen, 2007; Radostits y col., 2007).

Los terneros son la categoría que enferma más frecuentemente, sin embargo, en un rodeo que nunca estuvo en contacto con el virus, todas las categorías pueden presentar sintomatología (Valarcher y Taylor, 2007).

La presencia de células sincitiales a nivel bronquiolar y alveolar es sugestivo de BRSV pero no es confirmatorio, ya que las infecciones por virus parainfluenza 3 o cuadros de bronconeumonía fibrinosa también pueden inducir la formación de sincitios a nivel alveolar (Caswell y Williams, 2007; Driemeier y Moojen, 2007).

El control del BRSV se realiza a través de un manejo ambiental adecuado, administración de calostro a los terneros en cantidad y calidad. Existe insuficiente

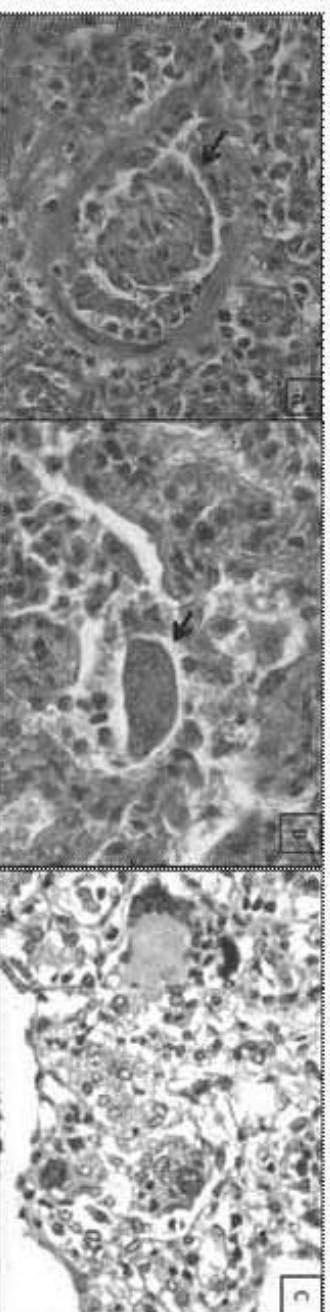


Figura 1. A. Bronquiolitis necrotizante, aplastamiento y metaplasia del epitelio respiratorio con formación de sincitio epitelial (Flecha) HE, 800X. B. Pulmón bovino: Infiltración del septo alveolar por células mononucleares, alveolos con neutrófilos y macrófagos, presencia de sincitio epitelial (Flecha) HE, 800X. C. Pulmón. Nótese la marcación positiva para el antígeno anti-BRSV en el citoplasma de células gigantes multinucleadas en la luz de alvéolos (Flechas), 400X.



información disponible a nivel experimental para la recomendación del uso de vacunas para el control de la neumonía enzoótica en terneros (Radostits y col., 2007). Las vacunas deben ser preferencialmente tenidas en cuenta en sistemas intensivos, de confinamiento y alta dotación (Radostits y col., 2007).

Referencias bibliográficas

Lamb RA, Parks GD. (2007). Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In *Fields Virology*, Fifth Edition, Philadelphia, USA. Eds. David M. Knipe, Peter M. Howley pp. 1449-1496.

Valarcher JF, Taylor G. (2007). Bovine respiratory

syncytial virus infection. *Vet Res* 38: 153-180.

Costa M et al. (2000). Bovine respiratory syncytial virus: first serological evidence in Uruguay. *Vet Res* 31: 241-246.

Caswell JL, Williams KJ. (2007). *Respiratory System*. En: Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer NC. *Pathology of Domestic Animals*. 5a. ed., Philadelphia, Ed. Elsevier, pp. 523-653, Vol 2.

Radostits et al. (2007). *Veterinary Medicine*. 10 ma. ed., Ed. Elsevier 2156 p.

Driemeier D, Moojen V. (2007). *Complexo respiratório bovino*. En: Riet-Correa F, Schild AL, Lemos RA, Borges JR. *Doenças de ruminantes e eqüídeos*, 3a. ed., Santa María, Ed. Palotti, pp. 490-496, Vol 1.