XXIII JORNADAS URUGUAYAS DE BUIATRIA
Paysandú, R.O.U., 15 - 17 de junio de 1995

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 Uruguay, mediante la técnica de ELISA indirecta para identificación de anticuerpos en suero. Las muestras fueron obtenidas al azar y el tamaño del muestreo fue estimado con una confianza del 95% ± 5%. Para el estudio de rodeos de carne, las muestras provenían de todo el país (18 departamentos), pertenecientes a 129 establecimientos. Se determinó una prevalencia de 45.11% en un total de 399 animales de carne. Para el estudio de rodeos de leche, se seleccionaron dos cooperativas lecheras. La más grande e importante, ubicada en el sur del país (105 tambos) y una recientemente formada en el norte del país (12 tambos). Las prevalencias respectivas en ambas cooperativas fueron: 44,2% en 1.269 animales en el sur y 47,8% en 280 animales en el norte. En resumen, se puede inferir que la prevalencia de IBR en Uruguay se sitúa en un entorno del 45% al 48%.

INTRODUCCION

IBR es una enfermedad de amplia distribución mundial, que afecta a los bovinos y caprinos y puede presentar una variedad de signos clínicos: respiratorios, digestivos, oculares, reproductivos, nerviosos, o la infección puede ser muy leve y asintomática (subclínica; 1,2,3,4). El agente causal, herpes virus bovino-1 (BHV-1) puede causar infección latente, en los ganglios del sistema nervioso central y puede ser re-excretado sin signos clínicos de la enfermedad, bajo condiciones de stress o tratamiento con corticoides (2,3,4,5,6,).

El BHV-1 es un mienbro de la familia Herpesviridae, subfamilia Alphaherpesvirinae. Su genoma es una molécula de DNA bicatenario con un peso molecular de 88 x 10E6 daltons (7), que replica en el núcleo de las células huesped 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 (CPE) en 24-48 horas.

[1] Dirección de Laboratorios Veterinarios "Miguel C. Rubino"
C.C.2.1

El CPE es la característica principal del virus cuando realizando 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 eliminados por secreciones respiratorias oculares o reproductivas. La infección por aerosol es considerada la forma de diseminación de la forma respiratoria de la enfermedad, mientras que la transmisión venérea es el método para la enfermedad genital (4).

El virus puede ser excretado en el semen de toros sanos. 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 ella se encuentra el ELISA para identificación de anticuerpos, así, como anticuerpos monoclonales y sondas de DNA para identificación del virus de IBR en materiales clínicos (9,10,11,12).

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 seroneutralizantes a IBR, luego de la administración de corticoides (8).

La técnica de ELISA indirecta a sido empleada en este estudio para determinar la prevalencia de IBR en rodeos de carne y leche. Los sueros fueron obtenidos al azar con un nivel de confianza del 95% ± 5%, de rodeos de carne de todo el país y de rodeos lecheros pertenecientes a dos cooperativas lecheras ubicadas en el norte y sur del país respectivamente.

MATERIALES Y METODOS

Muestras de suero

Rodeo de carne. Un total de 399 sueros provenientes de 129 establecimientos y obtenidos al azar en todo el país (18 departamentos de 19), con un nivel de confianza de 95%±5%, fueron procesados por la técnica de ELISA.

Rodeo de leche. De la cooperativa del sur, se muestrearon al azar un total de 1.269 sueros provenientes de 105 tambos ubicados en los departamentos de San José, Florida, Canelones y Colonia. Estos sueros fueron obtenidos al azar por un muestreo serológico de Leucosis Bovina.

De la cooperativa del norte se procesaron 280 sueros obtenidos al azar de 12 tambos de los departamentos de Tacuarembó, Rivera y Cerro Largo.

VIRUS DE IBR Y PREPARACION DEL ANTIGENO DE ELISA

La cepa Cooper del virus de IBR fue proporcionada gentilmente por el Dr. R. Jacobson de la Universidad de Cornell, USA. Brevemente, la preparación del antígeno fue la siguiente: Monocapas confluentes de células 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% CPE (aproximadamente 48 horas post infección). La cosecha fue

centrifugada 2500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se mezcló con polyethylene glycol (PEG), MW 7000-9000, a una concentración final de 8% (p/v). Se le agregó NaCI para lograr una molaridad de 0.5M. Se agitó la mezcla toda la noche (O/N) a 4°C y luego se centrifugó a 3000 rpm por 30 minutos. El pellet se disolvió en 25 ml buffer TGNT pH 8.9 (Tris 0.005M, Glicina 0.01M, NaCI 0.15M, Triton X-100) y se agitó O/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 centrifugados a 30.000 rpm por 90 minutos (rotor SW AH-629 Sorval Combi-OTD). El sobrenadante se guardó en pequeñas alícuotas a -70°C.

PROCEDIMIENTO DE ELISA

La técnica de ELISA y la evaluación de los resultados fueron descriptos previamente (19).

En breve, se colocaron 100ul de antígeno de IBR diluído 1:1.500 en buffer carbonato de sodio pH 9.6, en cada una de las columnas impares de la placa de microtitulación (Dynatech, USA), y antígeno negativo (sobrenadante celular sin virus) a la misma dilución en las columnas pares. Las placas fueron incubadas en cámara húmeda a 4°C O/N. El contenido se volcó y sin lavar, se le agregó 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 polyestireno 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 (PBS-TSE) y en volúmenes de 100 ul, 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 húmeda O/N, se agregaron 1000 ul de suero de conejo anti IgG bovina conjugados con peroxidas 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 a cada hoyo 100 ul de sustrato (0,5mg/ml de orthophnylenediamine disuelto en 0,1M buffer fosfato cítrico, pH 5 conteniendo 0,5ul/ml de H^2O^2 30%.

Luego de 10 minutos a 37°C, se detuvo la reacción con 50 ul de 2,5M H^2SO^4. 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.

RESULTADOS

<u>Prevalencia de IBR en rodeos de carne</u>

Del análisis de 399 suéros animales, 180 sueros resultados positivos y 219 negativos, indicando una prevalencia de 45,11% (Tabla 1).

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

Prevalencia de IBR en rodeos de leche

Rodeos del sur. El estudio de 1.269 muestras arrojó una prevalencia de 44,2% (561 positivos y 708 negativos). (Tabla 1).

A nivel de tambos, 92% de los mismos estaban infectados. De los 105 tambos, 97 tenían animales positivos y sólo 8 fueron negativos. (Tabla 2).

Rodeos del norte. Se estudiaron un total de 280 sueros, de los cuales 134 fueron positivos y 146 negativos, indicando una prevalencia de 47,85% (Tabla 1).

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

DISCUSION

Se determinó la prevalencia de IBR mediante la investigación de establecimientos de carne y leche elegidos al azar. El resultado era esperado, en base a resultados de casos de campo existentes en el Laboratorio (no publicados), provenientes de sospechas por las que los veterinarios de campo remitieron muestras para identificación de anticuerpos. El alto porcentaje de establecimientos de carne y leche positivos indica la amplia distribución de esta enfermedad. Sin embargo, el alto porcentaje de sueros positivos no se corresponde con la presencia de IBR como una enfermedad clínica. Es posible que la cepa de campo predominante sea BHV-2 (virus de la vulvovaginitis pustulosa/balanopostitis pustulosa IPV/IPB). Esta cepa BHV-1.2 es conocida por su baja virulencia (1,2,3,4).

La vacunación contra IBR no ha sido autorizada en Uruguay. Antes de que se adopte una decisión sobre este aspecto, se deberían realizar más estudios, como por ejemplo: aislamiento y caracterización de cepas de campo, investigación de la incidencia de IBR en los trastornos reproductivos y realizar un análisis costo/beneficio de una campaña de erradicación y/o vacunación. De acuerdo con la literatura científica, y dependiendo de la prevalencia del rodeo, se recomienda la vacunación y particularmente utilizando vacunas a sub-unidades (2,5,13,14,15,16).

AGRADECIMIENTOS

La autora agradece muy especialmente a los Drs. Richard Jacobson y Aberto Nieto 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 González por la producción del antígeno crudo.

SUMMARY

The prevalence of IBN was assessed in Uruguay using an indirect ELISA test for testing antibodies in serum. Samples were collected

randomly and the size of the sampling was estimated with a 95% confidence ± 5%. For beef cattle the samples were collected throughout the country (18 out of 19 states), involving 129 beef farms. A prevalence of 45.11% was detected in a total of 399 beef animals. For dairy cattle, two dairy cooperatives were screened. The largest and most important one, situated in the south (105 farms) and a newly established one in the north (12 farms). The prevalences were established in the southern and northern cooperatives; 44.2% in 1.269 dairy animals in the southern cooperative and 47.8% in 280 dairy animals in the northern cooperative. As a whole, it can be stated that the prevalence of IBR in Uruguay ranges from 45% to 48%.

BIBLIOGRAFIA

KARHS, R.F. (1987). Infectious Bovine Rhinotracheitis: A Review and Update, J.A.V.M.A. 171,1055-1064

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.

HAGAN & BRUNER'S Infectious Diseasses of Domestic Animals Ed. Cornell Univ. Press, New York (1981) 7th Edition. 551-560.

BLOOD, D. C. and RADOSTITS, O M. Veterinary Medicine Ed. Bailliere Tindall, London, (1989) 7th Edition 899-906.

VAN DONKERSGOED, J., BABIUK,L. (1991)Diagnosing and managing the respiratory form of IBR Vet. Medicine 86-94.

MILLER, J. (1991) The Effec of IBR infection on reproductive function in cattle. Vet. Med. 95-98.

PASTO RET, P.O., BURTONBBOY. G., AGUILAR-SETIEN. A., GODART.M., LAMY, M.,E., SCHOENAERS, 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.

GUARINO, H., MAISONNAVE., J., CAPANO, F,. PEREIRA. J,. (1982) Primer aislamiento e identificación del virus de la Rinotraquitis Infecciosa Bovina en Uruguay. Revista Veterinaria:83: 131-134.

BOLTON, D., CHU, H.J., ARDANS, A.A., KELLY, B,. ZEE, Y.C. (1981) Evaluation of the critical parameters of a sensitive ELISA test using purified IBR virus antigens. Vet. Microbiol. 6, 265-279.

LOMBARD, M., PIROID, R. Titration of FMD antibodies in cattle sera: Comparative study of two methods: SN on cells and ELISA, IFFA Merieux.

SOLSONA, M. Recherche des anticorps contre le virus Rhinotraqueitie Bovine Infectieuse para la méthode ELISA, Bulletin de l'Academie. 215-225.

SOULA, A. (1982) ELISA IBR. Expression d'un titre ELISA. Develop. Biol. Standard. 52: 147-157.

LUPTON, H.W., REED, D.E. (1980) Evaluation of Experimental Subunit Vaccines for IBR Amer. J. Vet. Res. 41,383-389.

BABIUK, L.A., ZAMB, T., LAWMAN, M.J.P., HUGHES. G., GIFFORD, G.A., L'ITALIEN, J., VAN DRUVEN LITTEL-VAN DEN HURK, S (1987). Protection of Cattle from BHV-1 Infection by immunization with individual viral glycoproteins. Virology 159: 57-66.

TRUDEL. M., BOULAY, G. SEGUIN, C. NADON, F. LUSSIER, G. (1988) Control of IBR in calves with BHV-1 subunit-ISCOM vaccine. Vaccine 6.525-529.

MERZA, M. BELAK, S. MOREIN, B. (1988) Characterization of an ISCOMM Prepared with Envelope Glycoproteins of BHV-1 J. Vet. Med. B. 35:695-703.

HOGLUND, S. DALSGAARD, K. LOVGREN, K. SUNDQUIST, B. OSTERHAUS, A. MOREIN, B. (1989).

MERZA , M. TIBOR, S. L. BOGNAR, G. MOREIN, B. (1991) ISCOM of BHV-1 envelope glycoproteins protected calves aganist both disease and infection J. Vet. Med. 38 (4): 305-314.

SAIZAR, J. GUARINO, H. CAPANO, F. (1988). Puesta a punto de la técnica Inmunoenzimática de ELISA para el diagnóstico de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina, Proccedings II International Conference on the impact of viral Diseases in Latin America and the Caribbean, Argentina, 1988, page 41. Buiatrics Congress, Paysandú, Uruguay, 1988.

TABLA 1

PREVALENCIA DE IBR EN RODEOS DE CARNE Y LECHE				
	Número de animales			
	POSITIVOS	NEGATIVOS	TOTAL	PREVAL %
Rodeo de carne	180	219	399	45.11
Rodeo sur de leche	561	708	1269	44.2
Rodeo norte de leche	134	146	280	47.85

TABLA 2

PREVALENCIA DE IBR EN RODEOS DE CARNE Y LECHE				
	Número de establecimientos			
	POSITIVOS	NEGATIVOS	TOTAL	PREVAL %
Estab. de carne	95	34	129	74.0
Estab. sur de leche	97	8	105	92.4
Estab. norte de leche	12		12	100.0