



**CENTRO
MEDICO
VETERINARIO
DE COLONIA**

inia

**LA ESTANZUELA
INSTITUTO
NACIONAL DE
INVESTIGACION
AGROPECUARIA**



**COLAVECO
COOPERATIVA
LABORATORIO
VETERINARIO
DE COLONIA**

**LE
612.6
JORp
1997**



**INTENDENCIA
DE COLONIA**

LMC

SECRETARIA DE EXTENSION Y DESARROLLO

JORNADAS DE PATOLOGIA REPRODUCTIVA EN BOVINOS



**25-26 JULIO 1997
HOTEL NIRVANA
COLONIA SUIZA**

HERPES VIRUS BOVINO-1 : ALGUNAS CONSIDERACIONES GENERALES Y SU SITUACIÓN EN EL URUGUAY.

Helena Guarino, DVM,MS.²

Introducción

La presente comunicación no constituye una revisión sobre el tema , sino que se considerarán algunos aspectos relevantes de la infección por el Herpesvirus bovino-1. Ellos incluyen principalmente factores epidemiológicos, de diagnóstico e interpretación de los resultados, mecanismos de control, así como la situación actual en nuestro país.

La Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (**IBR**) es una enfermedad viral causada por el herpesvirus bovino tipo 1 (**HVB-1**) perteneciente a la familia Herpesviridae, subfamilia Alphaherpesvirinae.

El virus es de distribución mundial y solamente Dinamarca y Suiza han podido erradicarla de sus rodeos luego de un estricto y costoso plan de control.

La enfermedad recibe su nombre por la sintomatología respiratoria que produce, aunque el virus puede manifestar diversas formas clínicas como la vulvovaginitis pustular infecciosa en hembras (**VPI**) y balanopostitis pustular infecciosa en machos (**BPI**). En terneros jóvenes puede causar encefalitis, aunque el agente causal de esta enfermedad está actualmente clasificado como Herpesvirus bovino-5.

La forma respiratoria se caracteriza por obstrucción de las vías aéreas superiores, con descarga nasal mucosa a mucopurulenta y conjuntivitis. Generalmente esta forma es acompañada por signos generales de fiebre, depresión, inapetencia, aborto y reducción de la producción de leche. Las infecciones genitales son caracterizadas por lesiones necróticas leves a severas de la mucosa vaginal o prepucial con formación de pústulas redondeadas que evolucionan favorablemente en la mayoría de los casos, en 10 a 15 días.

El virus puede provocar una endometritis necrotizante en vaquillonas después de una exposición intrauterina y necrosis del tejido del ovario, especialmente en el cuerpo luteo, luego de una infección sistémica . La inseminación con semen contaminado con el virus reduce los índices de concepción, y puede causar endometritis, aborto, e infertilidad .

La principal vía de transmisión es el contacto directo entre animales a través de secreciones nasales, oculares o genitales de un bovino infectado y por el semen de toros infectados.

Aislamientos virales de animales afectados por IBR o VPI son, desde el punto de vista serológico, idénticos. Algunos autores, sin embargo, han comunicado diferencias después del análisis del DNA genómico por endonucleasas de restricción. Comparando las distintas porciones de DNA se distinguen tres subtipos: subtipo 1.1, subtipo 1.2a, y subtipo 1.2b que estarían implicados en las distintas formas clínicas que se presentan. **Error! Bookmark not defined.** Actualmente se le atribuye al subtipo 1.1 ó 1.2a la sintomatología respiratoria, y al subtipo 1.2 b solamente la forma genital..

Aislamientos a partir de fetos abortados fueron tipificados como subtipos 1.1 o 1.2a , mientras que el subtipo 1.2b no ha sido relacionado con abortos.

Una de las particularidades mas importantes de los Herpesvirus es su capacidad de mantenerse en el organismo en estado latente, aún en presencia de altos títulos de anticuerpos. Por lo tanto, un animal infectado por el **HVB-1** permanece infectado de por vida pudiendo diseminar la infección a animales susceptibles, si el virus es reactivado y excretado. Lo mismo sucede si el animal es vacunado con vacunas a virus vivo modificado. Factores inmunodepresores, como el stress (transporte, manejo, parto, etc), al igual que el tratamiento con glucocorticoides como la dexametasona, pueden llegar a reactivar el virus de su sitio latente y producir la re-excreción del mismo. En el caso de toros portadores, la reactivación puede

² Prof. Agr. de Virología. Facultad de Veterinaria. Universidad de la Republica.
Jefe del Depto. de Virología. DILAVE "Miguel C. Rubino"

producirse en el momento de la monta, considerándose un factor muy importante en la transmisión de la infección en el rodeo.

La mortalidad por **IBR** es baja y la mayoría de las infecciones cursan en forma subclínica. Los animales infectados se recuperan en general entre los 10 a 15 días. Sin embargo, la infección bacteriana secundaria, por ejemplo con *Pasteurella spp.* puede agravar el cuadro clínico respiratorio llevando a enfermedades respiratorias más severas e incluso a la muerte del animal. En animales neonatos la enfermedad es más grave produciéndose una enfermedad sistémica, generalmente fatal.

Patogenia

El virus penetra en el animal por vía nasal donde replica en la mucosa del tracto respiratorio superior y en amígdalas. Subsecuentemente se disemina a la conjuntiva y por vía axónica neuronal alcanza al nervio trigémino. Luego de una infección genital primaria el **HVB-1** replica en la membrana mucosa de la vagina o prepucio, y permanece latente en el ganglio sacro. El DNA viral permanece en las neuronas de los ganglios probablemente de por vida, pudiendo ser reactivado y eventualmente eliminado. Por lo tanto el animal se convierte en un portador latente asintomático y diseminador del virus en el rodeo. La viremia es de títulos muy bajos y de corta duración.

Diagnóstico

La infección por el virus de **HVB-1** puede ser sospechada como causa de la enfermedad en base a los signos clínicos, epidemiológicos y patológicos, pero para llegar a un diagnóstico definitivo es necesario la confirmación del laboratorio. Los estudios a nivel del laboratorio tienen como objetivo la detección del virus causal o sus componentes y los anticuerpos específicos que éste produce.

1) Aislamiento viral

Para el aislamiento viral se pueden utilizar varios tipos de cultivos celulares. Cultivos primarios o secundarios de riñón bovino, pulmón o testículo así como líneas celulares establecidas derivadas de riñón fetal bovino o traquea han demostrado ser sensibles al **HVB-1**. El virus produce en las células inoculadas un efecto citopático (ECP) característico, con células redondeadas en forma de racimo de uva llevando al posterior desprendimiento de toda la monocapa. Para la identificación viral el sobrenadante celular debe ser neutralizado con antisuero específico o monoclonales anti-HVB-1. Un método alternativo es la identificación de las células con ECP por medio de la inmunofluorescencia o inmunoperoxidasa con antisueros conjugados específicos.

Las muestras seleccionadas para el aislamiento viral deben ser recogidas en el periodo febril, cuando el animal comienza con los signos clínicos. El tipo de muestras a enviar dependerá de la forma en que se presente la enfermedad. Hisopos nasales, oculares, vaginales, o prepuciales, son materiales de elección en el animal vivo, así como tejidos de diversos órganos, principalmente del sistema retículoendotelial, luego del examen postmortem. En casos de aborto, los órganos fetales como hígado, pulmón o riñón, al igual que la placenta, principalmente los cotiledones, son recomendados para el aislamiento viral e histopatología.

2) Detección del antígeno viral

Como método directo de detección del virus se pueden utilizar improntas a partir de hisopos nasales, oculares o genitales así como de tejidos colectados post-mortem. Los mismos serán luego teñidos con conjugados específicos para inmunofluorescencia o inmunohistoquímica. Esta técnica es una alternativa para el diagnóstico a partir de fetos abortados debido al efecto citotóxico que puede dificultar el aislamiento en cultivo celulares cuando el grado de autólisis es elevado.

La técnica de Elisa para detección de antígeno utiliza anticuerpos monoclonales o policlonales siendo una técnica de detección rápida y sensible.

3) Detección de ácidos nucleicos.

En los últimos años las técnicas de biología molecular de detección del genoma viral han revolucionado el diagnóstico de varias enfermedades. Una de las técnicas de mayor desarrollo es la amplificación de un segmento del DNA viral por medio de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR). Experimentalmente esta técnica ha demostrado ser mas sensible y rápida que el aislamiento viral en cultivos celulares, pudiendo detectar muy pequeñas cantidades de partículas virales. En un estudio sobre comparación de las técnicas de PCR, hibridización molecular y aislamiento de virus en semen experimentalmente infectado por **HVB-1**, fue posible detectar 1 dosis infectante en tejido celular (DICT50) en 100 µl de muestra, siendo esa cantidad 100 veces menor utilizando la amplificación del DNA conjuntamente con la hibridización específica. La técnica de PCR ha demostrado ser particularmente útil para el aislamiento viral en muestras de semen, evitando así el empleo de cultivos celulares.

4) Pruebas serológicas

La técnica de virus neutralización y el Test de Elisa indirecto para detección de anticuerpos son las técnicas serológicas más comunmente usadas para la detección de la respuesta inmune frente al virus. Como la latencia viral es una secuela de la infección por **HVB-1**, la identificación de animales seropositivos es indicativo de infección. Cualquier animal seropositivo es considerado un portador latente y por lo tanto un posible diseminador del virus en el rodeo.

La interpretación del resultado serológico es fundamental ya que, por lo expuesto anteriormente, una sola muestra de suero positiva solo indica que el animal estuvo alguna vez en contacto con el virus o es un animal vacunado, pero no confirma que la sintomatología observada sea debida a la acción de ese virus. Para ello será necesario estudiar la cinética de anticuerpos en dos muestras pareadas, una al comienzo de las lesiones o síntomas y otra en la etapa de convalecencia o recuperación, generalmente a los 15-22 días de la primer muestra. De existir un alza en el título de anticuerpos en la segunda muestra, con respecto a la primera, o de seroconversión frente a una primera muestra negativa, estaría indicando una infección reciente.

En los casos de aborto, el diagnóstico serológico se hace mas difícil ya que el lapso entre la infección y el aborto, puede ser largo y las muestras de suero obtenidas luego del aborto pueden evidenciar anticuerpos producidos en meses anteriores, no siendo posible detectar un aumento de título entre dos muestras pareadas. En estos casos se recurrirá al aislamiento viral a partir de tejidos u órganos fetales y/o placenta, como prueba confirmatoria.

Control

El desarrollo de infecciones latentes en animales que se recuperan de la enfermedad, con excreción de virus en forma intermitente, ha contribuido a la dificultad de prevenir la introducción del virus en rodeos libres. La latencia permite la persistencia de la infección, aún en rodeos cerrados. El aislamiento de animales enfermos durante un brote puede limitar la diseminación del virus y la severidad de la enfermedad en el los demás animales del rodeo.

Como método de control se emplea actualmente la vacunación, con la aplicación de diversos planes, tipos de vacunas, y vía de administración, dependiendo de los países afectados y sus planes de control.

Las vacunas existentes previenen los signos clínicos de la enfermedad pero no pueden prevenir la infección, el establecimiento de la latencia y la reactivación viral y por lo tanto evitar la diseminación del virus en la

población. Además no permiten distinguir entre un animal vacunado de un animal infectado por cepas de campo.

Las vacunas actualmente disponibles a nivel mundial, contra el IBR o la infección por el HVB-1 pueden ser inactivadas, o a virus vivo modificado. Estas últimas se aplican por vía nasal o parenteral, confiriendo una inmunidad más prolongada que las vacunas inactivadas. Una desventaja en el uso de estas vacunas es que no se deben aplicar a hembras preñadas por la posibilidad de causar lesiones fetales y aborto, pudiendo producir la latencia en el animal vacunado. En algunos países se están empleando vacunas marcadas, que pueden ser inactivadas o modificadas y se basan en la utilización de un mutante del virus o subunidades del virión. El empleo de estas vacunas haría posible la diferenciación entre animal vacunado del naturalmente infectado, pudiendo implementarse programas de erradicación.

Los anticuerpos colostrales pueden persistir por 5 meses e interferir con la eficacia de la vacuna.

La necesidad de vacunar dependerá de la prevalencia de la enfermedad en el establecimiento, y en los movimientos fuera y dentro del mismo, pero antes que nada se deberá tener certeza que el problema existente es debido a la acción del HVB-1.

Los toros usados para inseminación artificial deberán ser libres de la enfermedad .

Situación en nuestro país.

El Herpesvirus bovino -1 fue aislado e identificado por primera vez en el Uruguay, en el año 1981 (Guarino y col.) a partir de un animal seropositivo tratado con dexametasona con el fin de inducir la reactivación y excreción viral latente. En el mismo año se aisló de un cuadro clínico de encefalitis en terneros (De Izaguirre y col.) y posteriormente, en el año 1985, como agente secundario en un caso de granuloma nasal bovino (Rivero y col.). A partir de esa fecha, y hasta el momento, no se ha obtenido ningún resultado positivo a aislamiento viral a pesar de procesarse diversos materiales con sospecha de la enfermedad. Esto se explicaría, en parte, por las condiciones, no siempre óptimas, de la extracción y envío de las muestras, aunque queda una gran incógnita en cuanto a la imposibilidad de aislar el virus y confirmar los diagnósticos presuntivos. Con respecto al diagnóstico serológico, del total de muestras recibidas en DILAVE para estudios serológicos de HVB-1 en los últimos 6 años (1991-1996), el 21.6% resultó positivo a anticuerpos anti - HVB-1 por la técnica de ELISA . Es de destacar que no están discriminadas las muestras provenientes de casos clínicos sospechosos de la enfermedad, de las demás muestras que llegan al laboratorio por diversas exigencias sanitarias, pudiendo estar subevaluado dicho porcentaje.

De acuerdo a un estudio de prevalencia serológica llevado a cabo en determinadas zonas del país (Saizar, 1995), la infección, en rodeos de carne y leche, estaría presente en el 74% y 93.2% respectivamente, con una prevalencia a nivel de animales del 45,1% en ganado de carne y del 44.8% en ganado de leche. Hasta el momento no se han realizado muestreos representativos a nivel nacional que confirmen la tendencia **observada en estos estudios**, aunque se estima que la infección se encuentra diseminada por todo el país, **con un alto porcentaje** de animales seropositivos dentro del establecimiento infectado.

Desde el punto de vista del control de la enfermedad, se dispone actualmente de varios tipos de vacunas , tanto **monovalentes** como polivalentes (Cuadro 1).

Por el momento solo están autorizadas las vacunas a virus inactivado no estando permitido el uso de vacunas a virus vivo modificado.

CUADRO 1. VACUNAS REGISTRADAS DE IBR Y COMBINADAS* 1997

NOMBRE COMERCIAL	LABORATORIO	CEPAS
BIO IBR	SINTYAL	IBR
BIOABORTEGEN H	SINTYAL	IBR BVD Leptospira Int. pomona Campylob. Fetus Venerealisis
BIOQUERATOGEN OLEO	SINTYAL	IBR Moraxella Bovis
BIOVAX IBR	FATRO FEDAGRO	IBR
HIPRABOVIS-IBR	CONS. AGROPECUARIA	IBR
IBEPUR	INTERIFA	IBR
IBR OLEOSA	SANTA ELENA	IBR
IBR CULTIVAC	ROSENBUSCH	IBR Cepa propia
IBR-BVD-VAC	GRAPPIOLO	IBR - BVD
LEPTOVIBRIO IBR	SANTA ELENA	IBR Lepto. inter, pomona, wolffi, tar. ictero. cannis grip. Campylob. fetus, Venerealisis
NEUMOVAC IBR	SANTA ELENA	IBR Pasteurella mult. hem. Salmonella Dublin E. Coli
QUERATOPILI IBR	SANTA ELENA	IBR Moraxella Bovis
VACUNA QUERATOCONJUNTIVITIS	ROSENBUSCH	IBR Moraxella bovis
VACUNA SAN JORGE IBR- BVD	LABORATORIO URUGUAY	IBR Cepa LA y 663, BVD Cepa Singer y C24V

(*)División Contralor Especificos Zooterápicos
DILAVE M.C.Rubino.

Debido al uso reciente de la vacunación aprobada en forma oficial, la información relativa al resultado de la misma en condiciones de campo y frente a problemas concretos de la enfermedad, tanto respiratorios, de abortos o problemas reproductivos, es escasa.

De cualquier manera, el uso indiscriminado de vacunas sin tener una confirmación de la presencia de la infección asociada al problema, enmascararía los resultados de la eficacia de las mismas, así como el valor de las pruebas serológicas al no poder diferenciar entre anticuerpos vacinales y de infección.

Como es de suponer, cuando un nuevo producto entra al mercado, la presión comercial hace que determinados agentes etiológicos, a los cuales ese producto se dirige, quizás hasta el momento no tomados en cuenta o de importancia menor, pasen a ocupar un lugar preponderante en el diagnóstico presuntivo de varias enfermedades. Así sucede actualmente con el virus de **IBR** el cual es acusado de ser el causante de la mayoría de los trastornos reproductivos, abortos, infertilidad, etc.

Sin irnos a los extremos, se deberá tener cautela en llegar al diagnóstico por **HVB-1**, ya sea por serología o por la sintomatología observada, y establecer así planes de vacunación apropiados para cada situación epidemiológica.

La acción integrada entre los veterinarios de campo y quienes realizamos tareas de laboratorio, representa el mecanismo más adecuado para enfrentar aquellos problemas que por su complejidad, requieren de un esfuerzo conjunto para su solución.

Sin irnos a los extremos, se deberá tener cautela en llegar al diagnóstico por **HVB-1**, ya sea por serología o por la sintomatología observada, y establecer así planes de vacunación apropiados para cada situación epidemiológica.

La acción integrada entre los veterinarios de campo y quienes realizamos tareas de laboratorio, representa el mecanismo más adecuado para enfrentar aquellos problemas que por su complejidad, requieren de un esfuerzo conjunto para su solución.

Referencias Bibliográficas

1. Guarino, H.; Maisonnave, J.; Capano, F.; Pereira, J. 1981. Primer aislamiento e identificación del virus de la Rintotraqueítis Bovina Infecciosa en el Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)* 78: 131-134
2. Miller, J.M.; Van Der Maaten M.J., 1984 Reproductive tract lesions in heifers after intrauterine inoculation with infectious bovine rhinotraqueitis virus., 45: 790-794.
3. Miller, J.M.; Van Der Maaten M.J, Whetstone C.A., 1988 Effects of a bovine herpesvirus -1 isolate on reproductive function in heifers : Classification as a type-2 (infectious pustular vulvovaginitis) virus by restriction endonuclease analysis of viral DNA. *Am.J.Vet.Res.* 49: 10, 1653-1656.
4. Miller, J.M.; Van Der Maaten M.J., 1985 Effect of primary and recurrent infectious bovine rhinotracheitis virus infection on the bovine ovary. *Am.J.Vet.Res.* 46: 7, 1434-1436.
5. Miller, J.M.; Van Der Maaten M.J., 1987 Early embryonic death in heifers after inoculation with bovine herpesvirus-1 and reactivation of latent virus in reproductive tissues. *Am.J.Vet.Res* 48: 11, 1555-1558.
6. Saizar, J.; Guarino, H.; Capano, F., 1988 Puesta a punto de la técnica inmunoenzimática (ELISA) para el diagnóstico de la Rintotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR) y su comparación con la seroneutralización. XVI Jornadas Uruguayas de Buiatría. cc.7.1-7.8
7. Van Engelenburg, F.A.C, Maes, R.K., Van Oirschot, J.T y Rusewijk, A.M., 1993. Development of a rapid and sensitive polymerase chain reaction assay for detection of
8. Bovine Herpesvirus type 1 in bovine semen. *J. Clin Micr.* Vol 31, No.12 , p3129-3135.
9. Van Oirschot, J.T. 1995. Bovine Herpesvirus 1 in semen of bulls and the risk of transmission: a brief review. *Veterinary Quarterly*, 17: 29-33
10. Vilček S., 1993. Detection of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) genome by PCR. *J.Virol.Meth*, 41 245-248.