

1 **NEUMONÍA POR EL VIRUS RESPIRATORIO SINCICIAL BOVINO (BRSV) EN**
2 **BOVINOS LECHEROS DE COLONIA, URUGUAY**

3
4 Ricardo A. Costa^{1*}, Rubén D. Caffarena ¹, Santiago Mirazo ², Santiago Diab ³, María L. Casaux ¹,
5 Leticia Maya ⁴, Juan Arbiza ², Franklin Riet-Correa ¹, Federico Giannitti ^{1,5}.

6
7 ¹Plataforma de Investigación en Salud Animal, INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay. ²Facultad de
8 Ciencias, UDELAR, Montevideo, Uruguay. ³California Animal Health and Food Safety Laboratory,
9 University of California, Davis, California, Estados Unidos. ⁴Laboratorio de Virología Molecular,
10 UDELAR, Centro Universitario Salto- CENUR Litoral Norte, UDELAR. ⁵Veterinary Population
11 Medicine Department, University of Minnesota, Saint Paul, Minnesota, Estados Unidos.
12
13

14 **RESUMEN**

15 Se describe un brote de enfermedad respiratoria y neumonía por el virus respiratorio
16 sincicial bovino en un tambo del departamento de Colonia, Uruguay. Seis de 10
17 vaquillonas Normando de 5-6 meses de edad manifestaron disnea y tos (morbilidad=
18 60%) y 2 animales afectados murieron naturalmente (mortalidad= 20%). La
19 necropsia de una vaquillona y el estudio histológico asociado revelaron neumonía
20 broncointersticial bilateral, craneoventral, extensiva, severa, aguda, con bronquiolitis
21 necrotizante, alveolitis neutrofílica e histiocítica y edema alveolar, y células sincitiales
22 alveolares y bronquiolares, afectando aproximadamente 40% de los pulmones. El
23 genoma de BRSV fue detectado por PCR en pulmón, y abundante antígeno de
24 BRSV fue detectado intralesionalmente en el pulmón por inmunohistoquímica. Se
25 descartaron infecciones por el virus de la diarrea viral bovina y virus parainfluenza
26 bovino tipo 3 por PCR, herpesvirus bovino tipo 1 por inmunohistoquímica e
27 infecciones bacterianas por cultivos aerobios y anaerobios. Los resultados
28 permitieron realizar una confirmación etiológica de neumonía por BRSV, sin
29 involucramiento de otros patógenos respiratorios primarios.
30

31 **SUMMARY**

32 This work describes an outbreak of respiratory disease and pneumonia caused by
33 bovine respiratory syncytial virus in a dairy herd in Colonia County, Uruguay. Six of
34 10, 5- to 6-month-old, Normande heifers showed dyspnea and coughing (morbidity=
35 60%) and 2 affected animals died spontaneously (mortality= 20%). Necropsy and
36 histological examination of one of the deceased animals revealed extensive, severe,
37 acute, bilateral, cranioventral bronchointerstitial pneumonia, with necrotizing
38 bronchiolitis, neutrophilic and histiocytic alveolitis, alveolar edema, and bronchiolar
39 and alveolar syncytial cells, affecting approximately 40% of the pulmonary
40 parenchyma. BRSV genome was detected by PCR in the lung, and abundant BRSV
41 antigen was detected intralesionally by immunohistochemistry. Bovine viral diarrhea
42 virus and bovine parainfluenza virus type 3 PCR, and bovine herpesvirus type 1
43 immunohistochemistry were negative, and no bacteria were isolated on aerobic and
44 anaerobic cultures. The results allowed for etiologic confirmation of BRSV-induced
45 pneumonia, without involvement of other primary respiratory pathogens.

46

47

INTRODUCCIÓN

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

MATERIALES Y MÉTODOS

68

69

70

71

72

73

74

75

76

77

78

79

80

81

82

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

83

84

85

86

87

88

89

El virus respiratorio sincitial bovino (BRSV), perteneciente al género *Pneumovirus* de la familia *Paramyxoviridae*, es responsable de brotes de enfermedad respiratoria y pérdidas económicas para la industria ganadera mundialmente (Caswell & Williams, 2016). El complejo respiratorio bovino (CRB), es una enfermedad multifactorial causada por uno o varios agentes infecciosos virales y bacterianos, tales como el BRSV, el virus de la parainfluenza 3 (PI3), el herpesvirus bovino tipo 1 (BHV-1), el virus de la diarrea viral bovina (BVDV), *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni* y *Mycoplasma bovis* (Caswell & Williams, 2016; Griffin et al., 2010; Sacco et al., 2013), entre otros. De los agentes virales, el BRSV es el de mayor importancia en el CRB, ya que tiene amplia distribución y elevada patogenicidad (Caswell & Williams, 2016).

Los signos clínicos del CRB incluyen disnea, taquipnea, tos, anorexia e hipertermia, pudiendo culminar en la muerte (Sacco et al., 2013). En Uruguay, la presencia de anticuerpos séricos contra el BRSV fue detectada con alta frecuencia relativa en bovinos de varias regiones geográficas (Costa et al. 2000), sin embargo encontramos sólo dos comunicaciones escritas de enfermedad respiratoria y neumonía asociadas a esta infección viral en el país (Dutra, 2016; Rivero et al., 2013). El objetivo de este trabajo es describir un brote espontáneo de neumonía por BRSV en un rodeo comercial lechero del departamento de Colonia, Uruguay.

Se registró un brote de enfermedad respiratoria aguda en vaquillonas de un rodeo lechero del departamento de Colonia, Uruguay. Se visitó el establecimiento, se recolectó información clínica y epidemiológica, y se realizó la necropsia de una vaquillona que había muerto naturalmente. Se colectaron muestras de tejidos, que fueron fijadas en formol tamponado al 10%, deshidratados, embebidos en parafina, seccionados en cortes de 4 μm y teñidos con hematoxilina-eosina para examen histológico. Secciones de pulmón formoladas y parafinadas fueron procesadas por inmunohistoquímica (IHQ) para detección de antígenos de BRSV (Bryson et al, 1988) y BHV-1 (Smith et al, 1989). Se realizó PCR para identificación de BRSV (Vilcek et al. 1994) y PI3 (Horwood et al. 2008) a partir de muestras congeladas de pulmón, y PCR para detección de BVDV a partir de un pool de órganos congelados (Maya et al. 2016). Además, se realizaron cultivos bacterianos en condiciones de incubación aeróbicas y anaeróbicas a partir de muestras frescas de pulmón e hígado, y cultivo selectivo para *Salmonella* spp. a partir de contenido cecal.

El brote ocurrió en un lote de 10 vaquillonas raza Normando de aproximadamente 5-6 meses de edad. Los signos clínicos comenzaron el 19/11/2016, y al momento de la visita al establecimiento, el 21/11, se encontraron 6 animales con signos de disnea y tos de varios grados de severidad (60% de morbilidad). Dos animales afectados murieron naturalmente (20% de mortalidad y 33% de letalidad); la primera muerte se registró 2 días luego de iniciado el brote. Las vaquillonas se encontraban pastoreando una pradera de raigrás y trébol, y recibían

90 suplementación con alimento balanceado en un comedero de autoconsumo. Los
91 animales no habían sido vacunados contra enfermedad respiratoria y no habían
92 recibido tratamiento con antibióticos recientemente. Las vaquillonas habían nacido
93 en el establecimiento y no había historia reciente de ingreso de bovinos de otros
94 predios.

95 En la necropsia, las lesiones se restringían a los pulmones. Bilateralmente,
96 los lóbulos pulmonares craneales, accesorio/medio, y la porción craneoventral de los
97 lóbulos caudales (aproximadamente 40% del parénquima pulmonar) se encontraban
98 de color rojo oscuro homogéneo, y de consistencia firme (consolidación pulmonar).
99 La tráquea, en su porción torácica, contenía moderada cantidad de espuma estable
100 de color rosa mezclada con mucus, y extensas petequias y púrpuras en la mucosa.

101 Microscópicamente los bronquiolos contenían exudado intraluminal
102 neutrofílico con fibrina y detritus celulares necróticos, que frecuentemente ocluían
103 completamente su luz. Las células epiteliales bronquiolares se encontraban
104 necróticas y ocasionalmente atenuadas. En las luces alveolares había un material
105 eosinofílico homogéneo amorfo (edema) e infiltrado neutrofílico e histiocítico
106 multifocal moderado, con ocasionales e infrecuentes células sincitiales
107 multinucleadas. Algunos septos alveolares estaban tapizados por neumocitos de tipo
108 II. Basado en estos hallazgos, se realizó un diagnóstico morfológico de neumonía
109 broncointersticial bilateral craneoventral, extensiva, severa, aguda, con bronquiolitis
110 necrotizante y células sincitiales, compatible con infección por BRSV. No se
111 identificaron cuerpos de inclusión viral ni bacterias intralesionales en el examen
112 histológico del pulmón.

113 El genoma de BRSV fue detectado por PCR en pulmón, y abundante
114 antígeno de BRSV fue detectado intralesionalmente por IHQ en el exudado bronquial
115 y alveolar, el citoplasma de las células epiteliales bronquiolares, los neumocitos,
116 macrófagos alveolares y las células sincitiales. No se detectaron PI3 ni BVDV por
117 PCR, ni BHV-1 por IHQ. Los cultivos bacterianos fueron todos negativos.

118 Los signos clínicos, los hallazgos de necropsia e histología en este caso
119 fueron similares a los descritos por otros autores (Caswell & Williams, 2016; Dutra
120 2016; Rivero et al., 2013; Sacco et al., 2014). Mediante detección del genoma viral y
121 la localización de antígeno de BRSV intralesionalmente mediante IHQ, se estableció
122 el diagnóstico etiológico de neumonía por BRSV. En casos de enfermedad
123 respiratoria, las lesiones histológicas de neumonía broncointersticial con bronquiolitis
124 necrotizante y células sincitiales son altamente sugestivas de la acción de BRSV.
125 Sin embargo, éstas no son suficientes para establecer un diagnóstico etiológico,
126 particularmente si no se observan cuerpos de inclusión eosinofílicos
127 intracitoplasmáticos típicos de BRSV, como en este caso. Hay que considerar,
128 además, que el PI3 también puede inducir la formación de células sincitiales y
129 cuerpos de inclusión similares a los de BRSV, por lo que es necesario descartar este
130 agente en presencia de estas lesiones. Además, en bronconeumonías fibrinosas de
131 causa bacteriana, suelen observarse macrófagos o células gigantes multinucleadas
132 de origen histiocítico, que tienen un aspecto similar al de las células sincitiales
133 epiteliales, a pesar de que su génesis no está asociada al efecto de la infección viral.

134 Para el diagnóstico etiológico de esta condición, es necesario asociar los hallazgos
135 patológicos con la detección viral, mediante técnicas tales como PCR y/o IHQ
136 (Caswell & Williams, 2016), además de descartar otros agentes infecciosos causales
137 de CRB, como fue realizado en este caso.

138 En Uruguay se desconoce la distribución, frecuencia e importancia económica
139 para la ganadería bovina del CRB en general, y del BRSV en particular. Un estudio
140 serológico realizado sobre 100 bovinos de los departamentos de Canelones,
141 Colonia, Lavalleja, Rivera y Treinta y Tres, indicó que 95% de los animales
142 analizados tenía anticuerpos anti-BRSV detectables por ELISA, y la presencia de
143 una alta frecuencia de animales seropositivos en todas las áreas geográficas
144 estudiadas (Costa et al., 2000). Esto sugiere que la frecuencia de exposición a
145 antígeno de BRSV, ya sea por infección con cepas naturales o exposición a
146 antígenos de BRSV contenidos en vacunas comerciales, es alta. Sin embargo,
147 desconocemos si esta alta frecuencia de anticuerpos se debe principalmente a
148 infección natural o a vacunación. La enfermedad respiratoria y neumonía por BRSV
149 ha sido documentada recientemente en bovinos cruce de razas cárnicas en el
150 departamento de Flores (Rivero et al., 2013) y raza Holstein del departamento de
151 Treinta y Tres (Dutra, 2016). Esos diagnósticos se basaron en estudios patológicos
152 macro y microscópicos, con detección intralesional de antígeno viral en pulmón por
153 IHQ (Rivero et al. 2013) o por inmunocromatografía en un hisopado nasal (Dutra,
154 2016). En el caso expuesto en este resumen, la detección del genoma viral por PCR
155 representa un resultado distintivo.

156 CONCLUSIÓN

157 Las manifestaciones clínicas y las lesiones respiratorias severas y agudas
158 asociadas a BRSV, sin el involucramiento de infecciones pulmonares bacterianas,
159 demuestran que el BRSV es un agente de alta patogenicidad y que este virus puede
160 tener importancia económica en crías semi-intensivas en sistemas de producción
161 de leche en Uruguay. Estudios más extensos son necesarios para determinar el
162 impacto económico del CRB para la industria ganadera en Uruguay, y la distribución
163 y frecuencia de los distintos agentes infecciosos involucrados en este síndrome en el
164 país.

165 REFERENCIAS

- 166 1. Bryson DG, Cush PF, McNulty MS, Platten M, Allan GM. 1988. An immunoperoxidase method of
167 detecting respiratory syncytial virus antigens in paraffin sections of pneumonic bovine lungs. *Am J*
168 *Vet Res* 49(7):1121-1126.
- 169 2. Caswell JL, Williams KJ. Respiratory System. In: Maxie MG, ed. *Jubb, Kennedy and Palmer's*
170 *Pathology of Domestic Animals*. 6th edition, Elsevier, 2016, vol. 2, pp: 539-541.
- 171 3. Dutra F. Bronconeumonía sincitial en terneros (BRSV). *Archivo Veterinario del Este*. Boletín N°
172 18, febrero 2016, pp. 6-7.
- 173 4. Costa M, García L, Yunus AS, Rockermann DD, Saml SK, Cristina J. Bovine respiratory syncytial
174 virus: first serological evidence in Uruguay. *Vet Res* 2000. 31:241-246.
- 175 5. Griffin D, Chengappa MM, Kuskak J, McVey DS. Bacterial pathogens of the bovine respiratory
176 disease complex. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2010. 26(2):381-394.
- 177 6. Horwood PF, Gravel JL, Mahony TJ. 2008. Identification of two distinct bovine parainfluenza virus
178 type 3 genotypes. *J Gen Virol* 89:1643-1648.
- 179 7. Maya L, Puentes R, Reolón E, Acuña P, Riet F, Rivero R, Cristina J, Colina R. 2016. Molecular
180 diversity of bovine viral diarrhoea virus in Uruguay. *Arch Virol* 161(3):529-535.

- 181 8. Rivero R, Sallis ESV, Callero JL, Luzardo S, Giannechini R, Matto C, Adrien ML, Schild AL.
182 Neumonía enzoótica asociado al virus respiratorio sincitial bovino (BRSV) en terneros en
183 Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*. 2013. vol. 49, pp: 29-39.
- 184 9. Sacco RE, McGill JL, Pillatzki AE, Palmer MV, Ackermann MR. Respiratory syncytial virus
185 infection in cattle. *Vet Pathol* 2014. 51(2):427-436.
- 186 10. Smith GH, Collins JK, Carman J. 1989. Use of an immunoperoxidase test for the detection of
187 bovine herpesvirus-1 in aborted fetal tissues. *J Vet Diagn Invest* 1:39-44.
- 188 11. Vilcek S, Elvander M, Ballagi-Pordány A, Belák S. 1994. Development of nested PCR assays for
189 detection of bovine respiratory syncytial virus in clinical samples. *J Clin Microbiol* 32(9):2225-2231.