

Neumonía enzoótica asociado al virus respiratorio sincitial bovino (BRSV) en terneros en Uruguay

Enzootic pneumonia associated to bovine respiratory syncytial virus (BRSV) in calves in Uruguay

Rivero R*, Sallis ESV², Callero JL³, Luzardo S³,
Giannechini R¹, Matto C¹, Adrien ML⁴, Schild AL³

Recibido: 25/02/2013

Aprobado: 15/05/2013

RESUMEN

Se describe un foco de neumonía asociado al virus respiratorio sincitial bovino (BRSV) ocurrido en Julio de 2012 en un establecimiento dedicado a cría de terneros, en el Departamento de Flores. La morbilidad fue de 6,71% y la mortalidad 6,57%. Los principales síntomas clínicos fueron tos, disnea, taquipnea, descarga nasal y ocular y fiebre. Se realizó la necropsia de dos animales que murieron por insuficiencia respiratoria. En ambos se destacaba pulmones con consolidación anteroventral, enfisema y edema caudo-dorsal. En la histopatología en pulmón se observó neumonía broncointersticial, bronquiolitis necrotizante y alveolitis exudativa con presencia de sincitios epiteliales. Cortes de

SUMMARY

An outbreak of pneumonia associated with bovine respiratory syncytial virus occurred in July 2012 in a calf-rearing farm in Flores County is described. Morbidity and mortality were 6.71% and 6.57% respectively. Main clinical symptoms were cough, dyspnea, tachypnea, nasal and ocular discharge and fever. Necropsy was performed in two animals which died from respiratory failure. Gross findings in both were antero-ventral consolidation of lungs with caudo-dorsal emphysema and edema. Histopathological study showed bronchointerstitial pneumonia, necrotizing bronchiolitis and exudative alveolitis with syncytial cells in lungs. Lung sections, fixed in formalin, were analyzed by immunohistochemistry.

1 Laboratorio Regional Noroeste DILAVE "Miguel C. Rubino", MGAP, CC 57037, CP 60000, Paysandú, Uruguay.

2 Laboratorio Regional de Diagnóstico, Facultad de Veterinaria, Universidad Federal de Pelotas, Brasil.

3 Médico Veterinario, Ejercicio Liberal, Uruguay.

4 Departamento de Salud en los Sistemas Pecuarios. Facultad de Veterinaria, UdelaR, Paysandú.

*Autor de correspondencia: rrivero@mgap.gub.uy

pulmón fijados en formol fueron analizados por la técnica de inmunohistoquímica. Se comprobó que hubo marcación positiva con el anticuerpo anti-BRSV en las células epiteliales bronquiolares y las células sincitiales de los dos terneros necropsiados, confirmando la presencia del virus en el cuadro de neumonía.

PALABRAS CLAVE:

Virus respiratorio sincitial bovino, complejo respiratorio bovino, confinamiento.

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, principalmente en la etapa de cría y recría así como en la terminación de bovinos para producción de carne. Concomitantemente, 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 País¹.

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 psitaci*. El virus respiratorio sincitial bovino

Using this technique it was found positive labeling with anti-BRSV in bronchiolar epithelial cells and syncytial cells, confirming the presence of virus-associated pneumonia lesions. .

KEYWORDS:

Bovine respiratory syncytial virus, bovine respiratory complex, feedlot.

(BRSV) es el agente más importante, seguido del virus parainfluenza-3 (PI-3), herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-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).

Según Valarcher y Taylor (2007) en rodeos lecheros este virus puede ser responsable por más del 60% de las enfermedades respiratorias epizoóticas y hasta un 70% en rodeos de carne. La morbilidad es alta, de 60% a 80%, mientras que la mortalidad puede alcanzar el 20% (Valarcher y Taylor, 2007). La enfermedad se diagnostica más comúnmente en otoño e invierno, aunque puede ocurrir en verano

(Stott y col., 1980). 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 BRSV se distribuye a nivel mundial. En Brasil el virus fue detectado por primera vez en 1988 (Gonçalves y col., 1993), mientras que el cuadro clínico-patológico se describió en 1997 (Driemeier y col., 1997). En Uruguay, si bien la enfermedad no ha sido confirmada, mediante un estudio serológico utilizando la técnica de ELISA, Costa y col. (2000) obtuvieron un 95% de seroprevalencia positiva al BRSV en una población de 100 bovinos.

Los Laboratorios Regionales Este y Noroeste, el Departamento de Patobiología del Laboratorio central de la División de Laboratorios Veterinarios “Miguel C. Rubino”, tienen en sus registros sospechas de brotes de BRSV en base a diagnósticos histopatológicos y presencia de células gigantes sincitiales, sin la comprobación de la presencia del agente viral. -

El objetivo del presente trabajo es describir un cuadro de neumonía en terneros asociado a la presencia del BRSV basado en la epidemiología, hallazgos anatomo-patológicos y confirmación por la técnica de inmunohistoquímica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de datos epidemiológicos y toma de muestras

El brote ocurrió en el mes de julio de 2012, en una propiedad donde se realizaba la suplementación alimenticia en corral, con una población de 730 terneros de entre 6 y 11 meses de edad, ubicada en la 6° Seccional Policial del Departamento de Flores. En dos visitas al predio se recabó información sobre las características del sistema productivo, de la alimentación, del manejo sanitario, así como información sobre el número de animales en riesgo, enfermos y muertos, como consecuencia de la enfermedad.

Patología

Se realizaron dos necropsias y fragmentos de los órganos fueron fijados en formol bufferado al 10%, embebidas en parafina, cortadas en secciones de 5 micras de espesor y teñidas con Hematoxilina y Eosina (HE).

Aislamiento bacteriano

Con el objetivo de detectar posibles agentes bacterianos involucrados con la afección de los animales, se sembraron muestras de los pulmones de ambos animales en medios Agar Sangre (Oxoid, UK) y Agar Mac Conkey (Oxoid, UK), las mismas se incubaron a 37°C durante 72 horas en aerobiosis (Quinn y col., 1994).

1 Comunicación Personal. Dr. Rodolfo Rivero, Laboratorio Regional Noroeste, DILAVE, Paysandú.

Inmunohistoquímica para la detección de antígenos virales

Se realizó la técnica de inmunohistoquímica para la detección de antígenos del BRSV en cortes de pulmón que estaban incluidos en parafina, de ambos terneros. Los cortes histológicos de pulmón de 5 µm de espesor, fueron desparafinados en xilol, luego en alcohol y por último fueron lavados con agua destilada. Seguidamente, se bloqueó la peroxidasa endógena con una solución de peróxido de hidrógeno, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó la recuperación antigénica con citrato (pH 6,0) en horno microondas de uso doméstico por 10 minutos en la potencia máxima (1300 Watt). El bloqueo se realizó con caseína y suero fetal bovino al 5% durante 15 minutos, cada uno. Las muestras fueron incubadas durante 2 horas a 37°C con un anticuerpo primario policlonal anti-BRSV (VMRD, Pullman, WA, USA) en una dilución de 1:50. Posteriormente, los cortes fueron incubados con el anticuerpo secundario con avidina-biotina, usando un kit comercial (ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA), durante 35 minutos a temperatura ambiente. Como cromógeno fue utilizado 3-3-diaminobencidina (DAB, Sigma-Aldrich, MO, USA). Los tejidos fueron coloreados con hematoxilina. Como control negativo fueron sometidos a la misma técnica cortes de pulmón de un animal sano.

RESULTADOS

Datos epidemiológicos

Los animales de raza cruce carnicera, se encontraban en un potrero de campo natural de 20 ha de superficie, con muy poca disponibilidad de materia seca y con acceso al agua a través de bebederos. La dieta era a base de concentrados y estaba compuesta en base materia seca por: 56% ensilaje de planta entera de sorgo, 34% ensilaje grano húmedo de sorgo y 10% núcleo vitamínico-mineral. La misma era administrada en comederos colectivos, de cemento, a razón de un 3% del peso vivo, equivalente a 4,5 kg/animal, dos veces por día. Los animales tenían diversos orígenes y al ingreso eran desparasitados con antihelmínticos. Posteriormente eran vacunados con doble dosis separadas por 21 días, con vacunas contra clostridiosis (*Clostridium chauvoei*, *septicum*, *perfringens* tipo D y C, *sordelli*, *novyi* tipo B y C y *haemolyticum*) y enfermedades respiratorias (*Pasteurella multocida*, *Manhemia haemolytica*, *Salmonella dublin* y *Escherichia coli K99*).

En total enfermaron 49 animales y murieron 48, en un período de 28 días (morbilidad 6,71% y mortalidad 6,57%). Los signos clínicos observados fueron: fiebre, tos, disnea, posición ortopneica, descarga nasal, lagrimeo, taquipnea y algunos presentaban seria dificultad respiratoria, con respiración con boca abierta (Figura 1), viéndose afectados los terneros de menor edad.



Figura 1. Ternero afectado por BRSV. El animal se encuentra en decúbito esternal, con cuello estirado, respiración a boca abierta (severa disnea) y sialorrea.

Patología

En las necropsias realizadas se observó que las mucosas ocular, bucal y peneana estaban cianóticas. Los principales hallazgos macroscópicos estaban restringidos al sistema respiratorio. En la tráquea se observó abundante espuma en el interior y la mucosa congestiva. Los lóbulos cráneo-ventrales del pulmón estaban consolidados, de color rojo intenso y textura gomosa. Las áreas caudo-dorsales no colapsaban, presentaban edema y áreas de enfisema intersticial. No había lesiones de significado patológico en el resto de los órganos. Los alteraciones histopatológicas más

significativas se restringían a los pulmones, donde se observó bronquiolitis, necrosis del epitelio bronquiolar con formación de sincitios epiteliales, alveolitis exudativa caracterizada por abundante presencia de neutrófilos, macrófagos y células sincitiales con obliteración total de la luz alveolar, severa infiltración del septo alveolar por células mononucleares, granulocitarias y macrófagos alveolares (Figura 2A y 2B). También se encontraron áreas extensas de atelectasia, con áreas de enfisema. En los bronquios y bronquiolos se observó aplanamiento del epitelio respiratorio, con presencia de células necróticas. En el intersticio había severo edema y congestión.

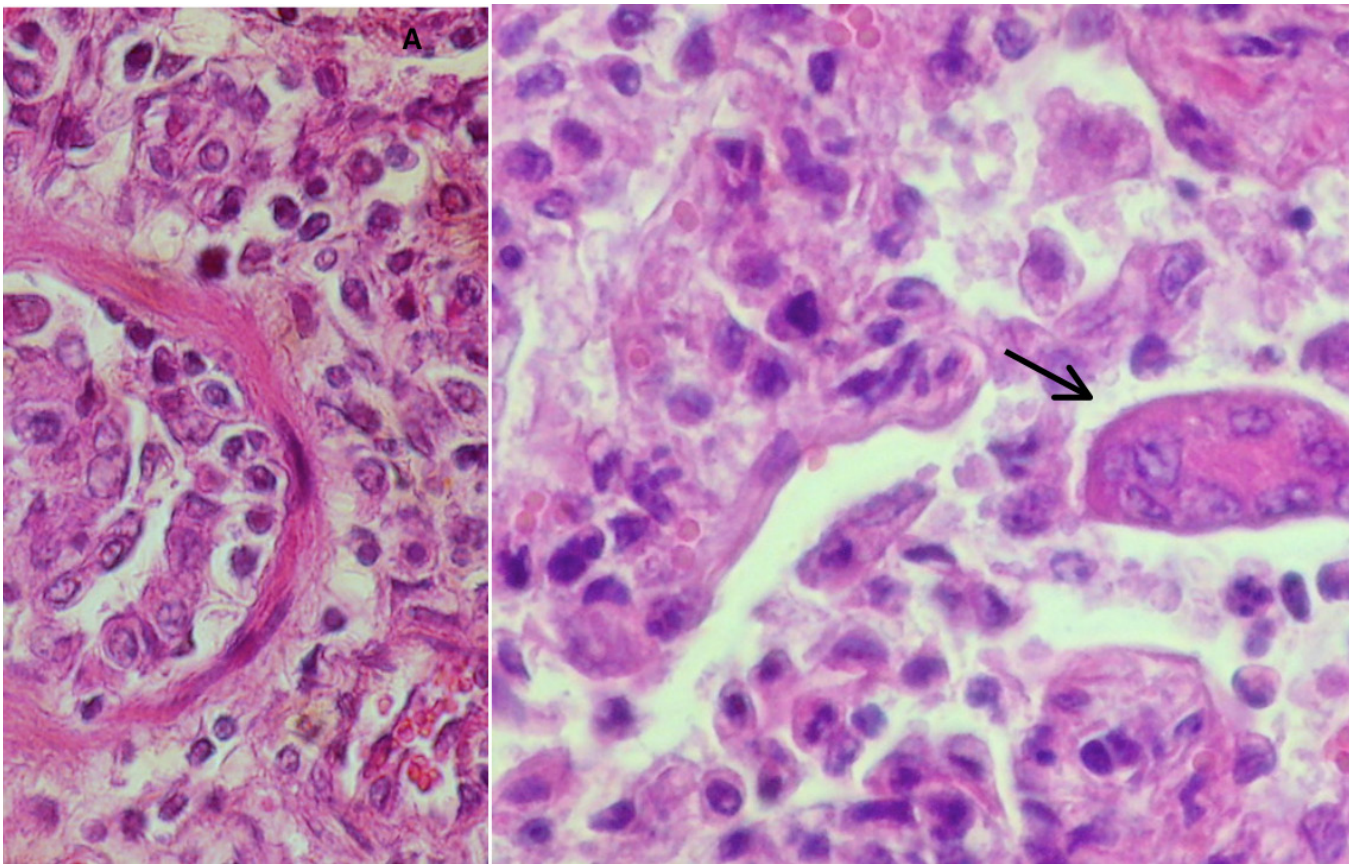


Figura 2. A: Pulmón bovino: Bronquiolitis necrotizante, aplanamiento y metaplasia del epitelio respiratorio con formación de sincitio epitelial (Flecha) HE, 600X. B: Pulmón bovino: Infiltración del septo alveolar por células mononucleares, alveolos con neutrófilos y macrófagos, presencia de sincitio epitelial (Flecha) HE, 600X.

Bacteriología

En las muestras de ambos pulmones no hubo aislamiento de colonias bacterianas de significación patógena.

Inmunohistoquímica

Los pulmones de los dos terneros analizados presentaron marcación positiva para el BRSV que fue observada en las células epiteliales de los bronquiolos y en células gigantes multinucleadas (sincitios) de ambos terneros (Figura 3A y 3B).

DISCUSIÓN

En base a los signos clínicos, hallazgos patológicos y resultados de la inmunohistoquímica se confirma la presencia del BRSV en un cuadro de neumonía enzoótica. Si bien, este es el primer trabajo que detecta la presencia de este virus en cuadros de neumonía, en Uruguay ya fue demostrada la presencia de anticuerpos para el BRSV, determinándose una alta seroprevalencia (95%) en los bovinos (Costa y col. 2000). En otros países, tales como Italia (69%), México (52%) y Ecuador (80%) se ha demostrado, también, una alta prevalencia de animales infectados

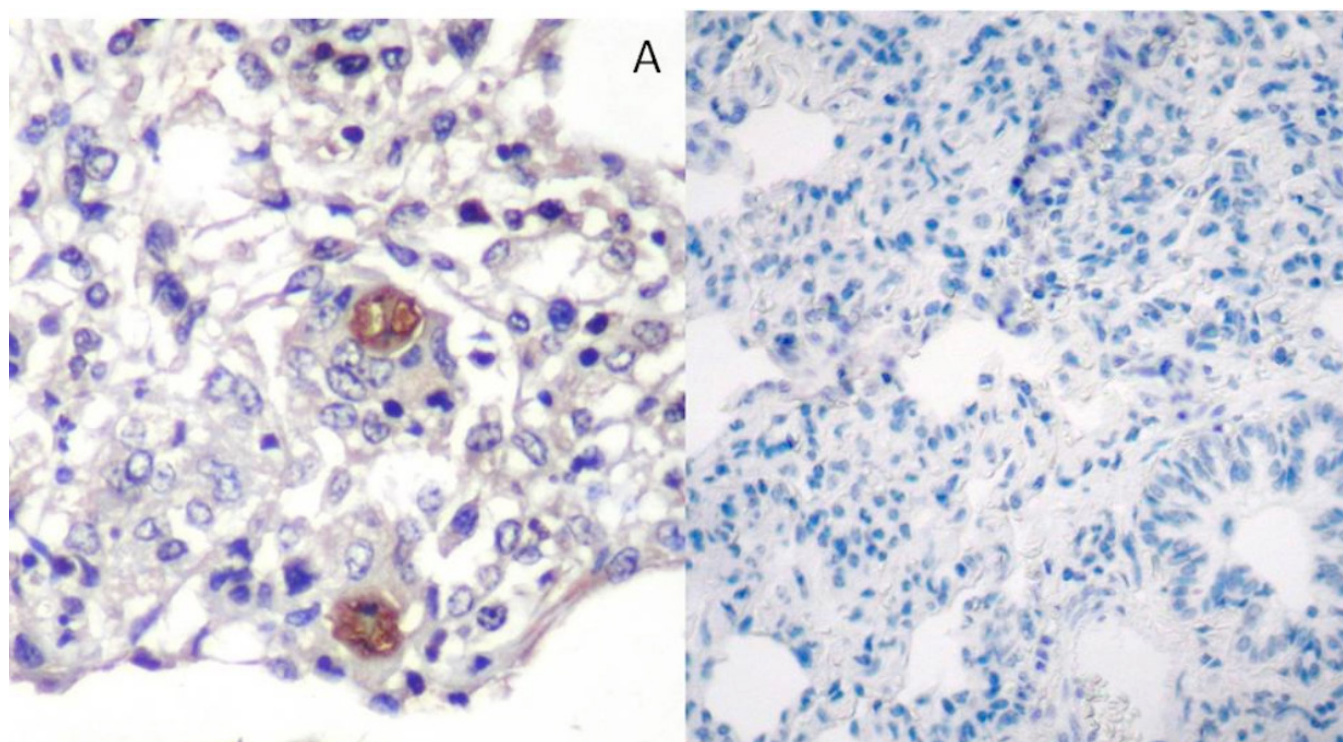


Figura 3. A. Pulmón. Inmunohistoquímica. Nótese la marcación positiva para el anticuerpo anti-BRSV en el citoplasma de células gigantes multinucleadas en la luz de alvéolos (Flechas). 400X. B. Pulmón. Inmunohistoquímica. Control negativo. 200X.

con BRSV (Luzzago y col., 2010, Figueroa-Chávez y col., 2012, Saa y col., 2012).

En este trabajo no fueron aisladas bacterias patógenas que pudieran estar asociados al cuadro de neumonía, probablemente debido a que los animales fueron tratados previamente con antimicrobianos. Es sabido que el BRSV predispone a neumonías bacterianas en animales en corrales de engorde al disminuir los mecanismos de defensa del pulmón (Caswell y Williams. 2007).

El contacto entre los animales de diferentes orígenes probablemente facilitó la transmisión del virus entre los terneros. Si bien, el potrero donde los animales estaban tenía un área de 20 ha, el número de animales era elevado lo que representó una alta carga animal

instantánea (36,5 terneros/ha) que favoreció el contacto entre los mismos. La densidad animal es uno de los factores de riesgo más importantes reportados para la presentación de la enfermedad (Valacher y Taylor. 2010, Luzzago y col., 2010, Figueroa-Chávez y col., 2012). El transporte de animales también fue mencionado como factor de riesgo (Figueroa-Chávez y col., 2012) y probablemente también haya sido de relevancia en estos casos, debido a que los terneros eran transportados desde otras propiedades para hacer la recría en ese lugar.

Factores ambientales que causan estrés y que pueden afectar el estatus inmunológico pueden favorecer la presentación de la enfermedad. Los casos se presentaron durante el invierno, lo que ha

sido reportado como una de las épocas de mayor incidencia, junto con los meses de otoño (Stott y col., 1980, Van der Poel y col., 1993, Radostits y col., 2007, Valarcher y Taylor. 2007, Van Donkersgoed y col., 1993). Otros factores han sido asociados con la enfermedad tales como condiciones higiénicas desfavorables, humedad excesiva, frío, falta de ingestión de calostro en las primeras horas de vida, errores de alimentación, ventilación insuficiente, enfermedades intercurrentes (principalmente diarreas) y otras causas de estrés (Driemeier y Moojen. 2007, Radostits y col., 2007).

La infección por el BRSV puede ser subclínica, leve o altamente fatal (Radostits y col., 2007). Los signos clínicos que presentaron los terneros fueron típicos de la enfermedad y característicos de una enfermedad respiratoria obstructiva (Radostits y col., 2007). Los terneros son los que manifiestan en general estos signos clínicos más severos, pero pueden también observarse en animales adultos (Valacher y Taylor. 2007). También se reporta que solo un porcentaje bajo de la población de terneros manifiesta signos clínicos severos de la enfermedad y los otros se infectan sin manifestarlos (Van der Poel y col., 1993).

En el brote reportado la tasa de morbilidad y mortalidad fue del 6,71% y 6,57%, respectivamente. Valacher y Taylor (2007), establecieron que la morbilidad puede variar de 60% a 80%, mientras que la mortalidad puede alcanzar el 20%. En cambio,

Larsen y col. (2001), reportaron tasas de mortalidad en terneros de 4 a 7 meses de 1,6% y 8%, en dos propiedades que vacunaban contra la enfermedad.

La mayoría de los trabajos reportan datos de relevamientos serológicos a nivel de rodeo (Luzzago y col., 2010, Figueroa-Chávez y col., 2012, Van Donkersgoed y col., 1993), o estudian la incidencia del BRSV como una causa más de neumonía en animales criados en sistemas de confinamiento (feedlot) (Gagea y col., 2006, Fulton y col., 2009), y otros trabajos se basan en la detección del virus en lavados de pulmón de animales enfermos (Uttenthal y col. 1996), pero pocos establecen datos de morbilidad y mortalidad. Gagea y col. (2006) reportaron que el BRSV representó el 9% de las enfermedades virales asociadas a cuadros de neumonía y Fulton y col. (2009) establecieron que en el 4,6% de las neumonías fatales de animales de feedlot se determinó la presencia de BRSV mediante la técnica de PCR.

Para el diagnóstico de la enfermedad, si bien la presencia de sincitios epiteliales a nivel bronquiolar y alveolar en el estudio histológico, es altamente sugestivo de infección por BRSV, no es determinante, 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). En este trabajo se demostró la presencia del virus en las propias células sincitiales

a través de la técnica de inmunohistoquímica. No fueron observados corpúsculos de inclusión eosinofílicos intracitoplasmáticos en las células sincitiales, ni en epitelio bronquiolar y alveolar como ha sido reportado por otros autores (Caswell y Williams, 2007). El tipo de marcación obtenida mediante la técnica de inmunohistoquímica fue demostrada en trabajos previos (Haines y col., 1989, Peixoto y col., 2000).

El control del BRSV se realiza a través de un manejo ambiental adecuado y la administración de calostro a los terneros en cantidad y calidad. Existe insuficiente 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 deberían de ser preferencialmente tenidas en cuenta en sistemas intensivos de confinamiento y alta dotación (Radostits y col. 2007).

guay. *Vet Res* 31: 241-246.

3. Driemeier D, Pereira-Gomes MJ, Moojen V, Weiss Arns C, Vogt G, Kessler L, Maciel da Costa U. (1997). Manifestação clínico-patológica de infecção natural pelo vírus respiratório sincitial bovino (BRSV) em bovinos de criação extensiva no Rio Grande Do Sul, Brasil. *Pesq Vet Bras* 17:77-81.
4. 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, Vol 1 pp. 490-496.
5. Figueroa-Chávez D, Segura-Correa JC, García-Márquez LJ, Pescador-Rubio A, Valdivia-Flores AG. (2012). Detection of antibodies and risk factors for infection with bovine respiratory syncytial virus and parainfluenza virus 3 in dual-purpose farms in Colima, Mexico. *Trop Anim Health Prod.* 44:1417-1421.
6. Fulton RW, Blood KS, Panciera RJ, Payton ME, Ridpath JF, Confer AW, Saliki JT, Burge LT, Welsh RD, Johnson BJ, Reck A. (2009). Lung pathology and infectious agents in fatal feedlot pneumonias and relationship with mortality, disease onset, and treatments. *Vet Diagn Invest.* 21:464-477.

BIBLIOGRAFÍA

1. 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.
2. Costa M, García L, Yunus AS, Rockemann DD, Samal SK, Cristina J. (2000). Bovine respiratory syncytial virus: first serological evidence in Uru-

7. Gagea MI, Bateman KG, van Dreumel T, McEwen BJ, Carman S, Archambault M, Shanahan RA, Caswell JL. (2006). Diseases and pathogens associated with mortality in Ontario beef feedlots. *J Vet Diagn Invest.* 18:18-28.
8. Gonçalves IPD, Simanke AT, Jost HC, Hötzel I, Dal Soglio A, Moojen V. (1993). Detection of bovine respiratory syncytial virus in calves of Rio Grande do Sul, Brazil. *Ciência Rural* 23:389-390.
9. Haines DM, Clark EG, Chelack BJ. (1989). The detection of Bovine Respiratory Syncytial Virus in formalin fixed bovine lung with commercially available monoclonal antibodies and avidin biotin complex immunohistochemistry. *Can J Vet Res* 53:366-368.
10. 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.
11. Larsen LE, Tegtmeier C, Pedersen E. (2001). Bovine respiratory syncytial virus (BRSV) pneumonia in beef calf herds despite vaccination. *Acta Vet Scand* 42:113-121.
12. Luzzago C, Bronzo V, Salvetti S, Frigerio M, Ferrari N. (2010). Bovine respiratory syncytial virus seroprevalence and risk factors in endemic dairy cattle herds. *Vet Res Commun.* 34:19-24.
13. Peixoto PV, Mota RA, Brito MF, Corbellini LG, Driemeier D, Souza MI. (2000). Infecção natural pelo Vírus Sincicial Respiratório Bovino (BRSV) no Estado de Alagoas. *Pesq Vet Bras* 20:171-175.
14. Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR. (1994). *Clinical Veterinary Microbiology.* Mosby-Year Book Europe Limited. Linton House 7-12 Tavistock Square, London WC1H 9 LB, England.
15. Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD. (2007). *Veterinary Medicine.* 10ma. ed., Ed. Elsevier 2156 pp.
16. Saa LR, Perea A, Jara DV, Arenas AJ, Garcia-Bocanegra I, Borge C, Carbonero A. (2012). Prevalence of and risk factors for bovine respiratory syncytial virus (BRSV) infection in non-vaccinated dairy and dual-purpose cattle herds in Ecuador. *Trop Anim Health Prod* 44:1423-1427.
17. Stott EJ, Thomas LH, Collins AP, Crouch S, Jebbett J, Smith GS, Luther PD, Caswell, R. (1980). A survey of virus infections of the respiratory tract of cattle and their association with disease. *J Hyg Camb* 85:257-270.

18. Uttenthal A, NPB Jensen, Blom JY. (1996). Viral aetiology of enzootic pneumonia in Danish dairy herds: diagnostic tools and epidemiology. *Vet Rec* 139:114-117.
19. Valarcher JF, Taylor G. (2007). Bovine respiratory syncytial virus infection. *Vet Res* 38:153-180.
20. Van der Poel WHM, Kramps JA, Middei WG, Van Oirschot, JT, Brand A. (1993). Dynamics of bovine respiratory syncytial virus infections: a longitudinal epidemiological study in dairy herds. *Arch Virol.* 133:309-321.
21. Van Donkersgoed J, Ribble CS, Boyer LG, Townsend HGG. (1993). Epidemiological study of Enzootic Pneumonia in dairy calves in Saskatchewan. *Can J Vet Res* 57: 247-254.