

EVALUACIÓN SEROLÓGICA DEL VIRUS RESPIRATORIO SINCICIAL EN REBAÑOS BOVINOS DE VENEZUELA

Serological Evaluation of Bovine Respiratory Sincitial Virus in Cattle Herds of Venezuela

César Obando, Mayra Hidalgo, Josefa Rodríguez y Alix Montoya

Laboratorio de Virología, Instituto de Investigaciones Veterinarias, CENIAP-INIA. Maracay. estado Aragua, Venezuela.

RESUMEN

A fin de determinar el grado de difusión del Virus Respiratorio Sincicial Bovino (VRSB) en Venezuela, fueron seleccionados 1389 sueros sanguíneos de bovinos de diferentes edades y sexos, no vacunados contra este agente viral, recolectados durante el periodo 1984-2000, en los dieciséis estados de importancia ganadera del país. Fue detectada la presencia de anticuerpos específicos contra VRSB en 791 de los 1389 sueros, utilizando la técnica de ELISA, lo que sugiere una prevalencia del 56,9%, menor a la esperada, lo cual podría ser debido al amplio periodo de muestreo. Las diferencias de seropositividad entre los estados incluidos en el muestreo fueron significativas ($X=175,8$ $P<0,05$), resultado que sugiere que la actividad del VRSB no está distribuida en forma uniforme en el país. La distribución de los sueros basándose en la concentración de anticuerpos mostró una correlación negativa, lo que indica que la mayoría de los animales presentaron infecciones no recientes. De acuerdo a estos resultados se puede inferir que el VRSB está presente en los rebaños de los estados de importancia ganadera, por lo cual se hace necesario conocer su grado de participación en la problemática respiratoria de los becerros jóvenes, así como evaluar y establecer las medidas adecuadas para su control.

Palabras clave: Pneumovirus, VRSB, evaluación serológica.

ABSTRACT

In order to determine the spread of bovine respiratory sincitial virus (BRSV) in Venezuela, 1389 sera from cattle of different ages and sex, which had not been vaccinated against this virus, were chosen and tested for BRSV antibodies with the ELISA test. The serum samples had been collected during the period 1984 to 2000 and saved frozen at the Institute de Vet-

erinary Research (Instituto de Investigaciones Veterinarias). Specific antibodies to BRSV were detected in 791 out of 1389 sera, which suggests a serological prevalence of 56,9 %. This result is lower than it was expected probably due to the span over which samples were collected in this survey. Comparison of sera-positive samples in the States covered by the study showed significant difference ($X = 178,8$ $P<0,05$), which suggests that BRSV activity has not been similar across the country. Distribution of serum samples based on antibody levels against BRSV showed a negative correlation, which might indicate that most animals were not recently infected with this virus. These findings indicate that BRSV is present in the most important cattle-raising States of Venezuela. Studies to evaluate how the BRSV is involved in calves respiratory diseases and to determine control measures should be made.

Key words: Pneumovirus, BRSV, serological evaluation.

INTRODUCCIÓN

El Virus Respiratorio Sincicial de los Bovinos (VRSB), está clasificado dentro del género Pneumovirus, subfamilia Pneumovirinae, familia Paramyxoviridae Rima *et al.* [22]. Es un virus compuesto por ocho proteínas estructurales y dos no estructurales. La proteína G es la responsable de la unión de los viriones a las células huésped Levine *et al.* [10] y la proteína F de la fusión entre la envoltura vírica y la membrana celular McIntosh y Chanock [12]. Las proteínas del VRSB, en general, tienen homología antigénica con las del virus respiratorio sincicial de los humanos (VRSH), considerable en el caso de las proteínas F, mientras que las proteínas G de ambos virus son distintas desde el punto de vista antigénico Lerch *et al.* [9]; Örvell *et al.* [17]. Baker y col. [3], sugieren dividir las cepas del VRSB en dos subgrupos (A y B), basándose en la reactividad antigénica utilizando paneles de anticuerpos monoclonales contra los subgrupos A y B del VRSH.

El VRSB, fue aislado por primera vez en bovinos con enfermedad respiratoria en Suiza Paccaud y Jackier, [18] y han

sido reportadas en muchos países epizootias de enfermedad respiratoria aguda asociada a este virus Kimman y Westenberg, [8]; Sharma y Woldehiwet [25]. Es aceptado que el VRSB, en conjunto con los virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina (RIB), diarrea viral bovina (DVB) y parainfluenza 3 (PI-3), constituyen los principales agentes virales responsables del complejo respiratorio de los bovinos Potgieter *et al.* [20] Richer *et al.* [21]; Ellis [5], y Scott [23], una de las causas de pérdidas económicas más significantes en la industria ganadera Shuman *et al.* [24]. Las infecciones simultáneas con dos o más de estos virus son comúnmente reportadas Richer *et al.* [21] y Straub [27]. En la actualidad, el VRSB está reportado como uno de los virus más frecuentemente aislados de terneros menores de seis meses, con enfermedad respiratoria Ames, [2]; Kimman *et al.* [7]; Stott *et al.* [23]; Verhoeff y Van Nieuwsdat [29]. La infección por este virus en bovinos adultos, por lo general, es subclínica o de signos moderados, aunque pueden presentarse brotes en bovinos de todas las edades en poblaciones inmunológicamente susceptibles Elvander [4]; Harrison y Pursell [6].

El VRSB, ha sido aislado de bovinos asintomáticos e incluso de bovinos hasta siete meses después de haber estado infectados clínicamente, por lo que se ha sospechado de infección persistente Stott *et al.* [23]; Ames [2]. Sin embargo, ensayos realizados en animales inmunosuprimidos, recuperados de la infección, no han podido demostrar la persistencia del virus, ni siquiera mediante la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), indicando que la persistencia es poco probable Van der Poel *et al.* [28]. La morbilidad es alta en la mayoría de los rebaños infectados, mientras que la mortalidad varía entre 5 y 20%.

A pesar de que en Venezuela las enfermedades respiratorias constituyen una de las principales causas de mortalidad en los terneros, hasta el presente no ha sido investigado el grado de diseminación del VRSB, a excepción de un estudio de prevalencia serológica realizado en el estado Apure, que resultó en $85 \pm 3\%$ Obando *et al.* [16]. En consecuencia, el propósito de este trabajo fue determinar la frecuencia de anticuerpos contra el VRSB en una muestra de rebaños bovinos de Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de muestras para estudio

Este trabajo se fundamentó en la detección de anticuerpos contra el VRSB, en una muestra de la población bovina nacional. Con este objetivo se seleccionaron muestras de bovinos de diferentes edades y sexos no vacunados contra este virus, conservadas en los bancos de sueros del Laboratorio de Virología General, del Instituto de Investigaciones Veterinarias, durante el período 1984-2000, con la premisa de incluir el mayor número de fincas posibles, de acuerdo a la disponibilidad.

El tamaño de la muestra se determinó mediante la fórmula para muestreo infinito, tomando en consideración los siguientes criterios: expectativa de seropositividad 80%, basándose en los resultados de una encuesta serológica realizada en el estado Apure Obando *et al.* [16]. Nivel de significancia de 0,05% y un error tolerable de 2%. En total se seleccionaron 1389 sueros de bovinos, procedentes de 149 fincas ubicadas en los dieciséis Estados de mayor importancia ganadera del país. Esta muestra, de tamaño superior al estimado, fue dividida en proporción a la población de bovinos existentes en cada uno de los estados, según los datos del Servicio Autónomo de Sanidad Agropecuaria (SASA), para el año 1996. Los sueros dentro de cada finca se seleccionaron al azar. El estado Apure, a pesar de ser uno de los de mayor población de bovinos, no fue incluido, en razón a la existencia de un reporte reciente de la prevalencia de anticuerpos contra este virus Obando *et al.* [16].

Detección de anticuerpos en los sueros

Para la detección de anticuerpos (Ac) específicos contra el VRSB, se utilizó un kit de ELISA comercial (BioX BRSV ELISA kit), siguiendo las especificaciones del fabricante. En resumen, volúmenes de 100 µL de suero positivo de referencia y de las muestras de suero problema diluidas 1/100 en buffer de dilución, fueron agregados por duplicado en pocillos pre-adsorbidos con antígeno de VRSB (columnas impares) y en los pocillos correspondientes a los controles de antígeno (columnas pares), en placas de microtécnica de 96 pozos. Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente por 1 hora y lavadas 3 veces con buffer de lavado. Se agregó el conjugado (anticuerpo monoclonal anti IgG1 bovina marcado con peroxidasa) a razón de 100 µL por pozo y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Se lavaron de nuevo según lo descrito anteriormente y se añadieron 100 µL por pozo de la solución sustrato (peróxido de hidrógeno + tetrametilbenzidina) y se incubaron a temperatura ambiente por 10 minutos, protegidas de la luz. Transcurrido dicho tiempo se añadieron 50 µL de la solución de frenado (ácido fosfórico 1 M) por cada pozo, procediéndose a la lectura de la prueba en un espectrofotómetro Elx 800 (Biotek Instruments, Inc), utilizando un filtro de 450 nm.

Interpretación de los resultados

Para la interpretación de los resultados a los valores de densidad óptica (DO) de cada suero se les sustrajeron los valores correspondientes de los controles de antígeno. Cada residuo fue dividido entre la DO del suero positivo de referencia y multiplicado por el coeficiente del kit. A objeto de facilitar los cálculos se utilizó el Programa Excell de Window 95.

La TABLA I muestra el patrón que establece el fabricante para determinar el grado de positividad de los sueros probados, en base a los valores de densidades ópticas que se obtengan, una vez procesados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se muestra en la TABLA II, en la encuesta realizada fueron detectados anticuerpos contra el VRSB en 791 de los 1389 sueros probados, lo cual pudiera sugerir que la prevalencia nacional esté alrededor del 56,9%, inferior a la expectativa del 80%, en razón a la prevalencia reportada para el estado Apure Obando *et al.* [16]. La seropositividad obtenida en esta encuesta podría estar por debajo del valor real, si tomamos en consideración que el muestreo correspondió a un período bastante amplio (diecisiete años), incluyendo muestras de animales recolectadas desde el año 1984, además, de que el diseño utilizado para ello no permitió trabajar con una muestra aleatoria y representativa de la población bovina nacional actual, necesaria para estimar la verdadera prevalencia serológica del VRSB en Venezuela. Además, es aceptado que después que ocurre la infección inicial en algunos animales, el virus es difundido rápidamente en todo el rebaño, probablemente por aerosoles, en particular en rebaños sin exposición previa al virus, incrementando la seropositividad Ames [2]. Las proporciones de animales seropositivos en los dieciséis estados encuestados variaron desde 1,6% para Bolívar, hasta 89,7% para Trujillo. Las diferencias de seropositividad observada en los estados, a excepción de Aragua, Carabobo y Cojedes, que se excluyeron del análisis por el reducido tamaño de sus muestras, fueron significativas ($X = 175,8$ $P \leq 0,05$).

Este resultado podría sugerir que la actividad del VRSB no ha estado uniformemente distribuida en el país, aunque podría no ser cierto por las razones antes señaladas. Cabe destacar la situación particular del estado Bolívar, donde sólo 1 de 61 (1,6%) de las muestras resultó con anticuerpos contra el VRSB, a pesar de que las mismas fueron recolectadas durante el año 1997. Este resultado no es de extrañar ya que en dicho Estado existen condiciones geográficas que mantienen a los rebaños bovinos en bajo riesgo de ser infectados por agentes exóticos, como lo es la barrera natural del río Orinoco que lo separa por el noreste de los estados Apure, Guárico, Monagas y Territorio Federal Delta Amacuro, así como sus límites por el sur y el oeste con territorios selváticos. Estas condiciones, su-

TABLA I
VALORES DE SEROPOSITIVIDAD

Valor Calculado	Positividad
Val < 0,2	0
0,2 < Val < 0,4	+
0,4 < Val < 0,6	++
0,6 < Val < 0,8	+++
0,8 < Val < 1,0	++++
1,0 < Val	+++++

Fuente: Valores tomados del Protocolo del Kit de ELISA comercial (Bio X BRSV ELISA kit)

TABLA II
DISTRIBUCIÓN DE BOVINOS SEROPOSITIVOS AL VIRUS RESPIRATORIO SINCICIAL DE LOS BOVINOS POR ESTADO Y GRADO DE REACTIVIDAD A LA PRUEBA ELISA. VENEZUELA (AÑO 2000)

Estado	Seropositividad					
	0	+	++	+++	++++	+++++
Anzoátegui	42	12	18	5		
Aragua	7	5	3			
Barinas	112	81	55	12		
Bolívar	61		1			
Carabobo	4	6	5			
Cojedes	10	4	1			
Falcón	30	42	18			
Guárico	129	26	10	4		
Lara	38	29	7	2		
Mérida	16	18	12			
Monagas	26	16	4			
Portuguesa	17	13	14	2		
Táchira	18	25	18	1		
Trujillo	4	11	13	9	2	
Yaracuy	5	8	9	7	2	
Zulia	79	141	97	20	3	
Total	598	437	285	62	7	

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen a la División de Salud Animal de Pfizer S.A. en Venezuela, por la colaboración en el suministro de los kits de ELISA que se requirieron para el trabajo, así como por el valioso aporte que hicieron al Laboratorio de Virología del Instituto de Investigaciones (IIV), materializado en la donación de un lector de ELISA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALLEN, J.W.; VIEL, L.; BATEMAN, K.G.; ROSENSAL, S.; SHEWEN, P.E.; PHYSICK-SHEARD, P. The microbial flora of the respiratory tract in feedlot calves: Association between nasopharyngeal and bronchoalveolar lavage culture. **Can. J. Vet. Res.** 55: 341- 346. 1991.
- [2] AMES, T.R. The epidemiology of BRSV infection. **Vet. Med.** 88: 881- 884. 1993.
- [3] BAKER, J.C.; WILSON, E.G.; MCKAY, G.L.; STANEK, R.J.; UNDERWOOD, W.J.; VELCIER, L.F.; MUFSON, M.A. Identification of subgroups of bovine respiratory syncytial virus. **J. Clin. Microbiol.** 30: 1120 -1126. 1992.
- [4] ELVANDER, M. Severe respiratory disease in dairy cows caused by infection with bovine respiratory syncytial virus. **Veterinary Record.** 138: 101-105. 1996.
- [5] ELLIS, J.A. The forgotten viruses: cause for clinical concern. **The bovine proceeding.** 30: 5 - 7. 1997.
- [6] HARRISON, L.R.; PURSELL, A.R. An epizootic of respiratory syncytial virus infection in a dairy herd. **JAVMA.** 187: 716 -720. 1985.
- [7] KIMMAN, T.G.; ZIMMER, G.M.; WESTENBRINK, F.; MARS J.; VAN LEEUWEN, E. Epidemiological study of bovine respiratory syncytial virus infection in calves: influence of maternal antibodies on the outcome of disease. **Vet. Rec.** 124: 104 -109. 1988.
- [8] KIMMAN, T.G.; WESTENBRINK, F. Immunity to human and bovine respiratory syncytial virus. **Arch. Virol.** 112: 1- 25. 1990.
- [9] LERCH, R.A.; STOTT, E.J.; WERTZ, G.W. Characterization of Bovine Respiratory Syncytial virus proteins and mRNAs and generation of cDNA clones to the viral mRNAs. **J. Vir.** 63: 833 - 840. 1989.
- [10] LEVINE, S.; KLAIBER-FRANCO, R.; PARADISO, P.R. Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus. **J. Gen. Virol.** 68: 2521-2524. 1987.
- [11] MARTIN, S.W.; BATEMAN, K.G.; SHEWEN, S.; BOHAC, J.E. The frequency, distribution and effect of antibodies to seven putative respiratory pathogens on respiratory disease and weight gain in feedlot calves on Ontario. **Can. J. Vet. Res.** 53 (3): 355 -362. 1989.

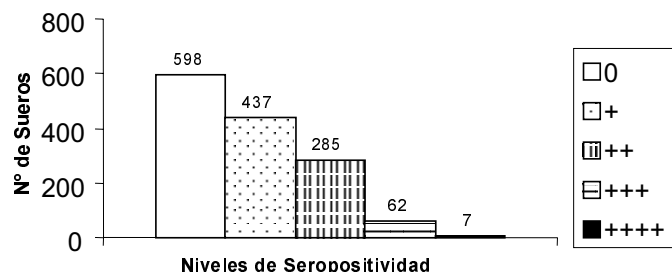


FIGURA 1. DISTRIBUCIÓN DE SUEROS POR NIVELES DE ANTICUERPOS CONTRA EL VRSB.

madras a la existencia de una ganadería netamente extractiva dificultan la entrada de agentes infecciosos. En este mismo Estado se presenta una situación similar con los virus de la Fiebre Aftosa, los cuales a pesar de ser altamente infecciosos, no se ha registrado actividad de ellos en los últimos cinco años, a excepción de un brote ocurrido en el municipio Roscio durante el año 1998, producto de una movilización de animales no controlada Novell [14].

La distribución de los sueros, basándose en la concentración de anticuerpos (FIG. 1), muestra una correlación negativa entre el nivel de positividad y el número de sueros, sugiriendo que la mayoría de ellos corresponden a bovinos con infecciones no recientes. No obstante, este resultado difiere del obtenido en el estado Apure por Obando *et al.* [16], donde la distribución de los sueros en base a los niveles de anticuerpos siguió una distribución normal, probablemente en respuesta a reinfecciones frecuentes, como consecuencia de las variaciones antigénicas de los subgrupos de VRSB, que pudieran afectar tanto la virulencia como la inmunogenicidad de las cepas Elvander, [4]. De cualquier manera, la detección inequívoca de anticuerpos específicos contra el VRSB, resultante de este trabajo, indica que el VRSB está presente en rebaños de los dieciséis estados de mayor importancia ganadera, es decir, que se encuentra ampliamente distribuido, a pesar que se desconoce su prevalencia nacional. Esta realidad, sumada al hallazgo de que la seroconversión al VRSB resultó ser más frecuente que la de los virus de DVB e IBR, en becerros de Venezuela con enfermedad respiratoria Obando *et al.* [16], son evidencias de la necesidad de determinar la prevalencia nacional del VRSB en el país, su grado de participación en la problemática respiratoria de los becerros jóvenes, así como las medidas adecuadas para su control. Resultados de investigaciones realizadas en otros países coinciden en que la seroconversión al VRSB es más frecuente que la registrada para los virus de la DVB e IBR en becerros con enfermedad respiratoria Martin *et al.* [11]; Allen *et al.* [1], lo cual dice mucho de la participación de este virus en las enfermedades respiratorias de los becerros, una de las principales causas de la mortalidad de ellos en el país Pedrique *et al.* [19]; Obando [15].

- [12] McINTOSH, K.; CHANOCK, R.M. In: **Virology**. Second Edition, edited by BN Fields *et al.* Raven Press Ltd, New York. 1045-1072 p. 1990.
- [13] MINISTERIO DE AGRICULTURA Y CRÍA. Anuario Estadístico Agropecuario, Dirección General Sectorial de la Oficina de Planificación del Sector Agropecuario, MAC. 1996.
- [14] NOVELL, M. Registros del Laboratorio de Enfermedades Vesiculares del Instituto de Investigaciones Veterinarias. 2001.
- [15] OBANDO C. Problemas respiratorios, entéricos y reproductivos en ganado bovino, ocasionados por virus. **Fo. naiap Divulga**. 45: 15-20. 1994.
- [16] OBANDO, R.C.; HIDALGO, M.; MERZA, M.; MONTOYA, A.; KLINGEBORN, B.; MORENO-LÓPEZ, J. Seroprevalence to bovine viral diarrhea virus and other viruses of the bovine respiratory complex in Venezuela (Apure State). **Prev. Vet. Med.** 41: 271-278. 1999.
- [17] ÖRVELL, C.; NORRBY, E.; MUFSON, A. Preparation and characterization of monoclonal antibodies directed against five structural components of human respiratory subgroup B. J. **Gen. Virol.** 68: 3125-3135. 1987.
- [18] PACCAUD, M.F.; JACKIER, C. A respiratory syncytial virus of bovine origin. **Arch. Ges. Virusforsch.** 30: 327-332. 1970.
- [19] PEDRIQUE, C.; MORA, E.; ARTIGAS, D. Factores involucrados en la sobrevivencia de becerros nacidos de vacas importadas en el Estado Portuguesa, Venezuela. **VI Congreso de Ciencia Animal**. San Cristobal, Venezuela: p S-I 15. 1990.
- [20] POTGIETER, L.N.D.; MCCRACKER, M.D.; HOPKINS, F.M.; WALTER, R.D. Effect of bovine viral diarrhea virus infection on the distribution of infectious bovine rhinotracheitis virus in calves. **Am. J. Vet. Res.** 45: 687-690. 1984.
- [21] RICHER, L.; MARIOS, P.; LAMONTANGE, L. Association of bovine viral diarrhea virus with multiple viral infections in bovine respiratory disease outbreaks. **Can. Vet. J.** 28 (9): 713-717. 1988.
- [22] RIMA, B.; ALEXANDER, D.J.; BILLETER, M.A; COLLINS, P.L.; KINGSBURY, D.W.; LIPKIND, M.A.; NAGAI, Y.; ORVELL, C.; PRINGLE, C.R.; MEULEN, V. Family paramixoviridae. In: **Virus taxonomy**, 6th report of the International Committee on Taxonomy of viruses. 268-277 p. 1995.
- [23] SCOTT, P.R. Epidemiology and treatment of bovine respiratory disease in beef cattle. **Cattle Practice**. 5, part 4: 283-288. 1997.
- [24] SHUMAN, F.J.; JANZEN, E.D.; MCKLINNON, J.J. Prophylactic tilmicosin medication of feedlot calves at arrival. **Can. Vet. J.** 31: 285-288. 1990.
- [25] SHARMA, R.; WOLDEHIWET, Z. Pathogenesis of bovine respiratory syncytial virus in experimentally infected lambs. **Vet. Microbiol.** 23: 267-272. 1990.
- [26] STOTT, E.J.; THOMAS, L.H.; COLLINS, A.P.; CROUCH, S.; JEBBETT, J.; SMITH, G.S.; LUTHER, P.D.; CASWELL, R. A survey of virus infections of the respiratory tract of cattle and their association with disease. **J. Hyg.** 85: 257-270. 1980.
- [27] STRAUB, O.B. Viral respiratory infection of cattle. **Proceeding of the XVIII World Buiatrics Congress**. Bologna, Italy: 79-94. 1994.
- [28] VAN DER POEL, W.H.M.; LANGEDIJK, J.P.M.; KRAMPS, J.A.; MIDDEL, W.G.J.; BRAND, A.; VAN OIRSCHOT, J.T. Serological indication for persistence of bovine respiratory syncytial virus in cattle and attempts to detect the virus. **Arch. Virol.** 142: 1681-1696. 1997.
- [29] VERHOEFF, J.; VAN NIEUWSDAT, A.P.K.M.I. Bovine respiratory syncytial virus infections in young dairy cattle: Clinical and haematological findings. **Vet. Rec.** 114: 288-293. 1984.