

Detección de anticuerpos para BVDV y BoHV-1 en llamas de la región de Tandil - Provincia de Buenos Aires

MORÁN, P.E.¹; DI SANTO, M.I.¹; BECALUBA, H.M.²; GOGORZA, L.M.¹

Resumen

La llama (*Lama glama*) es la especie predominante de camélidos sudamericanos de la República Argentina, con una población aproximada de 200.000 animales. El aumento de la actividad productiva ha incrementado el transporte y la distribución de animales hacia diferentes regiones del país. Como consecuencia, estas especies interactúan con el ganado doméstico posibilitando la diseminación de agentes infecciosos propios y comunes entre especies. Considerando que los camélidos sudamericanos son susceptibles a la infección con pestivirus y herpesvirus, se planteó realizar un relevamiento serológico de anticuerpos neutralizantes para el virus de la diarrea viral bovina (BVDV) y el herpesvirus bovino 1 (BoHV-1). Se analizaron 49 animales de dos rebaños de llamas de la región de Tandil mediante la técnica de seroneutralización sobre cultivos celulares de la línea Madin Darby Bovine Kidney. El 22% (11/49) de los animales expresaron seropositividad a BoHV-1, mientras que el 2% (1/49) fue positivo a BVDV. Estos resultados sugieren circulación viral en la población analizada. Es necesario el monitoreo continuo en las poblaciones de estos rumiantes para identificar factores de riesgo involucrados en la epidemiología de estos agentes virales, considerando los potenciales efectos sobre los programas de control y erradicación.

Palabras clave: (llamas), (BVDV), (BoHV1), (anticuerpos)

¹Departamento de Sanidad Animal y Medicina Preventiva, ²Departamento de Clínica, Facultad de Ciencias Veterinarias. UNCPBA. Campus Universitario, Paraje Arroyo Seco. Tandil. e-mail: pmoran@vet.unicen.edu.ar

Recibido: 18/05/2010 Aceptado:07/02/2011

Summary

Llama (*Lama glama*) is the predominant species of South American camelids in Argentine Republic, with an estimated population of 200.000 animals. The increasing of productive activity raised the animals transport and distribution to different regions of the country. As a result, the direct contact of these species with cattle increase opportunities for spreading own and common infectious agents among species. Considering that American camelids are susceptible to pestivirus and herpesvirus infections, it was proposed to carry out a serological searching of neutralizing antibodies to bovine viral diarrhea (BVDV) and bovine herpesvirus 1 (BoHV-1). Forty nine animals from two llama flocks in the region of Tandil were analyzed by serum neutralization test on Madin Darby Bovine Kidney cell culture; 22% (11/49) of animals showed antibodies titles against BoHV1, and 2% (1/49) were positive to BVDV. These results suggest that viral circulation occurred into the analyzed population. Continuous searching on these ruminant populations would be necessary in order to identify possible risk factors involved in the epidemiology of these viruses, considering the potential effects on control and eradication programs.

Key words: (llamas), (BVDV), (BoHV1), (antibodies).

Introducción

Los camélidos sudamericanos (CS) son animales típicos de la zona andina, actualmente se encuentran distribuidos a lo largo de la cordillera de los Andes en América del Sur, desde Ecuador hasta Tierra del Fuego, siendo su mayor concentración en el altiplano peruano-boliviano, y en el norte de Chile y la Argentina. De las cuatro especies de CS, la llama (*Lama glama*) y la alpaca (*Lama pacos*) son domésticas, y la vicuña (*Vicugna vicugna*) y el guanaco (*Lama guanicoe*) son silvestres. Las llamas y las alpacas constituyen una importante fuente de sustento en distintas regiones de Sudamérica, tanto para el consumo como para la comercialización de los productos obtenidos¹⁶.

La llama es la especie predominante de CS en la República Argentina con una población aproximada de 200.000 animales, lo que representa el 4 % de la población mundial. Jujuy es la provincia con mayor número de ejemplares, con aproximadamente 110.000 cabezas.

Desde su categorización como ganado (Art 2° Ley n° 21.740 decreto 220/96 del Poder Ejecutivo Nacional), se ha registrado un considerable aumento de la actividad productiva y de la comercialización de los productos de esta especie, como fibra, cuero y carne, lo que ha incrementado el transporte de animales y la distribución de los mismos, extendiendo su hábitat a diferentes regiones del país y de otros continentes. En la provincia de Buenos Aires la población de llamas comenzó a aumentar hacia fines de los años 90¹⁶. La interacción con otras especies domésticas, como el ganado bovino y ovino, potencian el riesgo de intercambio y diseminación de agentes infecciosos propios y comunes de cada especie⁵.

El virus de la diarrea viral bovina (BVDV) y el herpesvirus bovino 1 (BoHV-1) son agentes asociados con afecciones reproductivas y respiratorias causantes de importantes pérdidas productivas en los rodeos. Ambos virus son endémicos en la mayoría de los países productores de ganado del mundo y presentan

un amplio rango de signos clínicos desde cuadros inaparentes a fatales^{4,17}.

El BVDV está clasificado en el género Pestivirus de la familia Flaviviridae. Los pestivirus no son estrictamente específicos de especie y pueden infectar tanto a animales domésticos como silvestres^{3,10, 20-23}, siendo el BVDV el aislamiento predominante en llamas y alpacas⁸.

La búsqueda de anticuerpos contra pestivirus en rumiantes silvestres, de zoológicos y de establecimientos rurales, detectó seropositividad al BVDV en una amplia variedad de especies silvestres en ausencia de vacunación. En 1983 se detectó respuesta inmune a BVDV en camélidos del viejo y nuevo mundo²³ en animales que compartían pasturas con bovinos. Otros estudios evidenciaron infección y presencia de BVDV en llamas y alpacas en sistemas mixtos de producción^{5, 8} pero no en animales criados bajo un sistema controlado¹.

El BoHV-1 es un herpesvirus que se encuentra ampliamente difundido en el país. En ovinos y en rumiantes silvestres se han detectado herpesvirus relacionados al BoHV-113 como el virus de la fiebre catarral maligna, el herpesvirus caprino (CpHV-1) y el herpesvirus del ciervo (CvHV-1)¹². En un trabajo realizado en llamas de distintas regiones de la República Argentina se detectó un 0.77 % (3/390) de seropositivos para BoHV-1 y 2.0 % (8/390) para BVDV¹⁸.

La información regional sobre diagnóstico específico y resultados de estudios epidemiológicos de estos virus en CS es escasa; por ello la actividad sanitaria en estas especies se basa principalmente en datos de la bibliografía internacional⁹. El objetivo de este trabajo es realizar un relevamiento serológico de anticuerpos neutralizantes para BVDV y BoHV-1, con el propósito de aportar información sobre la circulación de estos agentes virales en dos rebaños de llamas de la provincia de Buenos Aires.

Materiales y métodos

Animales en estudio

Se analizaron 49 animales provenientes de 2 rebaños de llamas. El estudio se realizó sobre la totalidad de los componentes de cada rebaño

con el objetivo de efectuar el relevamiento abarcando las diferentes categorías fisiológicas (edad y género) del grupo.

Historial de los rebaños

Rebaño A. pertenece a un predio experimental de nuestra institución y está compuesto por 22 hembras adultas y 2 crías. Algunos de los animales provienen de un criadero de la provincia de San Luis, y otros de un establecimiento de la provincia de Buenos Aires. Las dos crías nacieron en el establecimiento actual. Este rodeo, que comparte lotes y corrales con bovinos y ovinos, presenta antecedentes de alta mortalidad perinatal (particularmente en los animales provenientes del establecimiento de la provincia de Buenos Aires) y problemas sanitarios relacionados a parasitosis internas.

Rebaño B. es un rebaño ornamental proveniente de un establecimiento rural de la localidad de Azul (provincia de Buenos Aires). Este grupo está compuesto por 11 hembras y 12 machos adultos y 2 crías de 7 meses de edad. Todos los animales, descendientes de reproductores originarios de Perú y Bolivia, nacieron en el establecimiento.

El rodeo no comparte directamente el terreno con otras especies (bovinos y ovinos), pero pastorea en lotes lindantes. En el establecimiento también hay ciervos en estado silvestre. La anamnesis destaca parámetros normales de preñez y parición, pero índices de mortinatalidad elevados sin causas conocidas. Reciben tratamiento antiparasitario convencional.

Ninguno de los animales de ambos rodeos ha recibido vacunaciones contra BVDV, BoHV-1 u otros agentes virales.

Las muestras de sangre se obtuvieron por punción de la vena yugular. Luego de la formación del coágulo se centrifugaron para la obtención de los sueros, que fueron inactivados a 56 °C durante 30 minutos, fraccionados en crioviales y almacenados a -20 °C hasta su procesamiento.

Virus

Las cepas virales utilizadas fueron BVDV cepa Singer, DICC 50 10-3 y BoHV-1 cepa Los Angeles, DICC 50 10-4.

Los títulos virales se calcularon por el método de Reed y Muench¹⁹.

Técnica

Para la detección de anticuerpos neutralizantes se utilizó la técnica de seroneutralización (SNT) sobre cultivos celulares de la línea MDBK, mantenida a 37 °C en Minimal Essential Medium Eagle (MEM) (Sigma-Aldrich) con la adición de 10 % de suero fetal bovino γ irradiado (Bioser Argentina).

La técnica de SNT se realizó en microplacas de 96 pocillos (Cellstar Greiner bio-one). Los sueros se diluyeron en base doble seriada en cada suspensión viral en MEM. Se analizaron diluciones de 1:8 a 1:64.

Luego de incubar durante 30 minutos a 37 °C, se inocularon 200 μ l de cada dilución por cuatuplicado sobre monocapa de MDBK. En cada placa se efectuaron controles de suero, de virus y de viabilidad celular. La lectura se realizó por observación de efecto citopático, en microscopio óptico invertido. El título de la dilución neutralizante 50% se calculó por el método de Reed y Muench.

Resultados

En el rebaño A, 5 animales (21%) resultaron seropositivos a BoHV-1, mientras que en el rebaño B, se detectaron anticuerpos para BoHV-1 en 6 animales (24%) y en 1 (4%) para BVDV.

Estos valores indican una seroprevalencia de 22% (11/49) para el BoHV1 y 2% (1/49) para el BVDV en este grupo de estudio. (Tabla 1)

Discusión y conclusiones

El objetivo de este trabajo en dos rebaños de llamas de la provincia de Buenos Aires consistió en aportar información sobre la circulación de BVDV y BoHV1 en ésta especie autóctona sobre la que existe escasa información. Se realizó un

relevamiento serológico mediante la técnica de SNT para detectar la presencia de anticuerpos para ambos virus, determinar el título y evaluar la actividad funcional neutralizante de los mismos.

La seroprevalencia del 22% para BoHV-1 en estos rebaños resulta un hallazgo importante, dado que si bien estos resultados contrastan con los obtenidos en trabajos previos, en los cuales la seropositividad a BoHV-1 es menor o nulo^{4,18}, podría inferirse que la convivencia de los rebaños que analizamos con rumiantes domésticos (ovinos y bovinos) en una zona de alta prevalencia de este agente viral⁶ pudiera facilitar la transmisión interespecies.

La vía de transmisión del BoHV-1 es aerógena, con muy pocas posibilidades de sobrevivir en el medio ambiente¹⁷, por ello la convivencia y el contacto entre especies susceptibles cobra importancia en la epidemiología del virus. Resulta de interés proseguir las investigaciones, intentando el aislamiento, por ejemplo a partir de muestras de hisopados nasales, en presentaciones clínicas compatibles con el efecto del BoHV-1 en llamas.

La prevalencia de anticuerpos contra BVDV detectada fue de 1/49 (2%). Según los reportes a nivel mundial los niveles de seroprevalencia en CS son bajos, variando en un rango de 0.9 a 13%^{1,2,11}. Trabajos previos realizados en nuestro país difieren en los resultados de la detección de animales seropositivos a BVDV; un monitoreo realizado en llamas detectó una prevalencia del 2.0% (8/390)¹⁸, mientras que otro estudio en el noroeste del país no mostró reactores positivos¹⁵.

La baja frecuencia y los títulos de anticuerpos contra BVDV hallados en este trabajo coinciden con los obtenidos en otras poblaciones de CS, en condiciones naturales y sin vacunación⁴.

Para el diagnóstico serológico de rutina de estas infecciones virales se emplean diferentes técnicas, tales como inmunofluorescencia y enzimoimmunoensayo, específicas para BVDV y BoHV-1 de animales domésticos. Esto podría ocasionar una subestimación de la prevalencia de anticuerpos o la dificultad de detección

Tabla 1. Títulos de anticuerpos contra BVDV y BoHV1

	Identificación del animal	Sexo y edad	Título de ac BoHV-1 BVDV	
Rodeo A	s/caravana	M – 5 meses	8	neg.
	4	H - adulta	4	neg.
	14	H - adulta	8	neg.
	19	H - adulta	8	neg.
	s/caravana	H - adulta	8	neg.
Rodeo B	149	M - adulto	8	neg.
	937	H - adulta	8	neg.
	945	M - adulto	8	neg.
	966	M - adulto	4	neg.
	979	H - adulta	4	neg.
	s/caravana	M - adulto	32	neg.
	s/caravana	H - adulta	neg.	8

de cepas virales divergentes de las conocidas, cuando se analizan otras especies de rumiantes²¹. En estudios realizados en llamas y alpacas con antecedentes de abortos se registró aislamiento de BVDV, pero la búsqueda de anticuerpos mediante SNT utilizando cepas virales bovinas resultó negativa^{2, 10}.

Los camélidos inoculados con cepas de BVDV responden con niveles de anticuerpos neutralizantes muy variables (1:10 a 1:160), lo cual es considerablemente inferior a los niveles observados en bovinos u ovinos con infección experimental⁷. Estas observaciones dan origen a una serie de interrogantes; las posibles explicaciones son:

- Las llamas y alpacas son resistentes o tendrían una baja susceptibilidad a la infección por estos agentes virales^{14, 23}.
- No se estarían utilizando cepas de pestivirus propias de la especie en las pruebas serológicas, por lo tanto no se detectarían los anticuerpos homólogos, resultando falsos negativos⁸.
- Habría una forma de anergia/tolerancia de las células B luego de la infección que ocasionaría una limitada replicación del virus en los leucocitos de los CS luego de la infección²³.
- También se menciona la posibilidad de que la

coevolución de los pestivirus con sus especies hospedadoras habría originado variantes específicas entre los rumiantes silvestres que circularían independientemente de los virus de los rumiantes domésticos^{8,20}.

La transmisión interespecies se logra fácilmente en forma experimental por lo tanto sería prudente creer que ésta podría ocurrir cuando los rumiantes domésticos y los silvestres toman contacto⁸; es por ello que la presencia de anticuerpos específicos y el aislamiento viral en animales silvestres ha conducido a la especulación que los animales de vida libre que mantienen el BVDV oculto pueden ser considerados un reservorio de virus para la transmisión a bovinos y ovinos, especialmente en pasturas compartidas o sistemas productivos mixtos^{5, 22}.

De todos modos aún queda por dilucidar si la transmisión se produce de las especies silvestres al ganado o si por el contrario, dichas especies se infectan por el contacto con las domésticas²¹⁻²³.

La elección de SNT como método para este trabajo permitió detectar la presencia y la función biológica de anticuerpos contra las cepas virales utilizadas. Los resultados obtenidos sugieren que hubo circulación viral en los dos

grupos en estudio. Si bien no se observaron manifestaciones clínicas, cabe la hipótesis de la diseminación interespecies, lo cual puede tener efectos drásticos sobre los programas de control y erradicación.

Es necesario profundizar estos estudios mediante el monitoreo continuo y ampliado en las poblaciones de CS para la detección de animales seropositivos y el aislamiento e identificación de estos agentes virales en los portadores.

Agradecimientos

Al Dr. Marcelo Aba por el generoso aporte de los animales de su rodeo experimental, y a las Veterinarias Carolina Bianchi y Verónica Cavilla por la valiosa colaboración en el manejo de los animales para la obtención de las muestras.

Bibliografía

- 1- Alvarez, S.; Rivera, H.; Pezo, D.; García, V. Detección de anticuerpos contra pestivirus en rumiantes de una comunidad campesina de la provincia de Canchis, Cusco. *Rev Investig Vet Perú*. 2002; 13 (1):46-51.
- 2- Belknap, E.; Collins, J.; Scott Larsen, R.; Conrad, K. Bovine viral diarrhoea virus in New World camelids. *J Vet Diagn Invest*. 2000; 12 (6):568-70.
- 3- Carman, S.; Carr, N.; DeLay, J.; Mohit, B.; Dirk, D.; Murray, H. Bovine viral diarrhoea virus in alpaca: abortion and persistent infection. *J Vet Diagn Invest*. 2005; 16 (6):589-93.
- 4- Celedón, M.; Sandoval, A.; Droguett, J.; et al. Pesquisa de anticuerpos seroneutralizantes para pestivirus y herpesvirus en ovinos, caprinos y camélidos sudamericanos de Chile. *Arch Med Vet*. 2001; 33 (2):165-72.
- 5- Celedón, M.; Osorio, J.; Pizarro, J. Aislamiento e identificación de pestivirus obtenidos de alpacas (*Lama pacos*) y llamas (*Lama glama*) de la Región Metropolitana, Chile. *Arch. Med. Vet*. 2006; 38 (3):247-52.
- 6- Di Santo, M.; Schettino, D.; Gogorza, L.; et al. Herpes Virus Bovino -1: Dinámica de la infección en dos sistemas productivos de Tandil- Buenos Aires – Argentina. *Vet. Argentina*. 1997; 14 (134): 228-33
- 7- Evermann, J.; Ridpath, J. Clinical and epidemiological observations on BVDV in the northwestern United States. *Vet Microbiol*. 2002; 28:129-39.
- 8- Evermann, J. Pestiviral infection of llamas and alpacas. *Small Rum Res*. 2006; 61 (2):201-6.
- 9- FAO/RLC TCP/RLA/2914. Situación actual de los camélidos sudamericanos en América Latina. Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los Camélidos sudamericanos en la Región Andina. 2005
- 10- Goyal, S.; Bouljihad, M.; Haugerud, S.; Ridpath, J. Isolation of bovine viral diarrhoea virus from an alpaca. *J Vet Diagn Invest*. 2002; 14 (6): 523-5.
- 11- Jarvinen, J. Seroprevalence of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in US alpacas. *IV World Camelids Congress*. 2006, Santa María, Catamarca, Argentina.
- 12- Keuser, V.; Schyns, F.; Detry, B. Improved antigenic methods for differential diagnosis of bovine, caprine and cervine alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1. *J Clin Microbiol*. 2004; 42 (3):1228-35.
- 13- Malacari, D.; Maidana, S.; Cordini, M. Seroprevalencia del herpesvirus en las especies *bubalus bubali* y *lama glama* en las provincias de Buenos Aires, Corrientes y Jujuy. *Rev Argent Microbiol. Resúmenes del IX Congreso Argentino de Virología*, 2008; 40 (1) Buenos Aires, Argentina.
- 14- Marcoppido, G.; Romero, S.; D´Amico, N. Relevamiento serológico en vicuñas (*Vicugna vicugna*) silvestres de la puna argentina. *IV World Camelids Congress*. 2006, Santa María, Catamarca, Argentina.
- 15- Marin, R.; Romero, G.; Brihuega, B.; Auad, G. Seroprevalencia de enfermedades infecciosas en llamas (*Lama glama*) de la provincia de Jujuy, Argentina. *Vº Congreso de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos*. 2007, Mendoza, Argentina.
- 16- Nuevo Freire, C. Sinopsis de historia natural de los camélidos sudamericanos. *Excorta Anatómica Camelidae*. Ed. FUCASUD 1994; 3:9
- 17- Pidone, C.; Galosi, C.; Etcheverrigaray, M. Herpesvirus bovinos 1 y 5. *Analecta Veterinaria*. 1999; 19 (1): 40-50.

- 18- Puntel, M.; Fondevila, N.; Blanco Viera, J.; et al. Serological Survey of Viral Antibodies in Llamas (*Lama glama*) in Argentina. *J Vet Med.* 1999; B46: 157-61.
- 19- Reed, I.; Muench, H. A simple method of estimating fifty per cents endpoints. *Am J of Hygiene.* 1938; 27: 493-7.
- 20-Van Campen, H.; Williams, E. Wildlife and Bovine Viral Diarrhea Virus. International Symposium on Bovine Viral Diarrhea Virus – A 50 Year Review 1996, Ithaca, USA.
- 21-Van Campen, H.; Ridpath, J.; Williams, E.; et al. Isolation of bovine viral diarrhoea virus from a free-ranging mule deer in Wyoming. *J Wildl Dis.* 2001; 37 (2): 306–11.
- 22- Vilcek, S.; Nettleton, P. Pestiviruses in wild animals. *Vet Mic.* 2006; 116: 1-12.
- 23- Wentz, P.; Belknap, E.; Brock, K.; Collins, J.; Pugh, D. Evaluation of bovine viral diarrhoea virus in New World Camelids. *JAVMA.* 2003; 223 (2):223-8.