UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Diagnóstico de la Enfermedad de Rinotraqueitis Infecciosa Bovina por los Métodos de Inmunodifusión y Aglutinación Capilar.

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

ERNESTO DE LUCAS PALACIOS

GUADALAJARA, JALISCO, 1975

Pagina

INTRODUCCION	1
MATERIAL Y METODOS	7
RESULTADOS	12
DISCUSION	18
CONCLUSIONES	22
SUMARIO	24
BIBLIOGRAFIA	26

I N T R O D U C C I O N

INTRODUCCION

Hasta hace 5 años la enfermedad de Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR), no estaba reconocida oficialmente por el Departamento de Sanidad Animal dependiente de la Secretaria de Agricultura y Ganaderia, esta enfermedad fué oficialmente diagnosticada según datos de la Red Nacional de Laboratorios de Diagnostico, en el Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias de Palo Alto D.F.; en el año de 1970. (13)

La enfermedad se ha establecido en el estado de Chihuahua y en segundo lugar en Veracruz; pero por los informes obtenidos en la Red Nacional de Laboratorios de Diagnostico, se ha podido demostrar en un 15% de la Republica Mexicana. (13)

En la mayor parte de los casos, estos pasan desapercibidos por falta de metodos, pues la mayoria de los diagnosticos se basan en datos de hallazgos clinico-patologicos.

De esto se desprende la importancia del diagnostico de la enfermedad de Rinotraqueitis Infecciosa Bovina por metodos como la inmunodifusión y la aglutinación capilar.

DESCRIPCION DE LA ENFERMEDAD

ANTECEDENTES:

El síndrome respiratorio de Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR), fué el primero en reconocerse; observado y reportado en 1950 por Hester en el estado de Colorado USA.

La enfermedad se ha diagnosticado en todo el mundo, y en el Hemisferio Occidental, se diagnostico en un descripción clinica en 4 hatos lecheros del Noroeste de Nevada, USA, en

el año de 1955. (11)

En Austria, Alemania y Belgica, la enfermedad de Blaschenaschlag (exantema vesicular coital). Se comparo con cepas de vulvovaginitis pustular infecciosa (IPV), demostrandose que el virus fue el mismo. (8)

Aunque el ganado más afectado es el adulto se han presentado casos en becerros hasta de una semana de edad. (3)

También ocurre en ganado en pastoreo intensivo o en condiciones de agostadero. (4) (7) (9)

Las experiencias clinicas demuestran que la enfermedad se transmite rapidamente entre el ganado despues de que un nuevo lote es recibido.

Tomandose en cuenta que en el año de 1968 se usaron veinte millones de dosis en Estados Unidos de Norteamerica (12), se puede comprender la importancia economica de esta enfermedad.

SINTOMATOLOGIA:

Raramente ocurre que en un solo brote se encuentren los tres signos clinicos de la enfermedad, pero pueden suceder sobre todo en ganado lechero; como sigue: Rinotraqueitis, Vulvovaginitis, Conjuntivitis. De ahí que se describan separadamente.

1.- Forma Respiratoria:

Tos, descarga nasal seromucosa, fiebre y anorexia, son los signos primarios de este cuadro.

En casos mas severos puede ocurrir un edema laringeo

causado por la irritación dificultando la respiración. En casos agudos la muerte puede ocurrir de veinticuatro a treintaiseis horas despues de los primeros síntomas.

Algunas veces existe una inflamación de los ollares afectando toda la membrana mucosa, donde pueden observarse costras que al caerse dan una coloración rojiza al area afectada por lo que también se conoce a la enfermedad con el nombre popular de RED NOSE o NARIZ ROJA.

Hay autores que admiten la diarrea como signo de Rinotraqueitis pero esto debe estudiarse mas a fondo para no confundirse con diarrea viral. (12)

La forma respiratoria es la manifestación economica mas importante, pues la morbilidad puede ser de un noventa por ciento.

Complicada con infecciones bacterianas origina frecuentes bronconeumonias.

II.- FORMA CONJUNTIVAL

La conjuntivitis ha sido signo importante de Rinotraqueitis, ocurriendo con los signos respiratorios comunes, o como el unico signo prominente de la infección: es importante diferenciarla de KERATOCONJUNTIVITIS INFECCIOSA por MORAXELLA BOVIS (pink eye), en donde existe una ulceración corneal, en el principio de la enfermedad y opacamiento de la misma. (1)

A esto hay que agregar un enrojecimiento de la cojuntiva palpebral, lagrimeo exsecivo (purulento), y una membrana nictitante nodular.

III.- FORMA GENITAL:

Conocida como Vulvovaginitis Pustular Infecciosa (IPV) -- denominado en Europa como Exantema Vesicular Coital.

Se caracteriza por una hiperemia de las membranas mucosas descargas y formación de pustulas en vulva y vagina, y ocacionalmente en el macho por lesiones similares en la piel del pene y prepucio.

La transmición venerea es el metodo corriente de propagarse, por esponjas contaminadas, especulos vaginales y cualquier equipo puesto en contacto con los organos genitales.

En muchos casos no se ha podido inducir manifestaciones - respiratorias a animales inoculados con virus aislados del - tracto vaginal de vacas infectadas con IPV. (6)

El virus puede invadir la placenta y el feto, vía la co-- rriente sanguinea materna causando aborto, (10) o que el crío- nazca muerto, generalmente las lesiones al feto y la subsecuente manifestación de aborto, raramente se produce antes de los- veintiún días y muy tarde a los dos meses de la infección.

Los fetos abortados presentan necrosis focal en el higado y baso, y algunas veces edema cutaneo generalizado. Se ha notificado también una correlación entre la viremia y el aborto.

Vaquillas vacunadas antes de la concepción fueron revacunadas durante la preñez temprana sin que hubiese aborto, y tambien se encontro que no existia un estado virémico. (7)

El aborto puede deberse al uso de las vacunas de Rino. en vacas cargadas, por lo cual debe evitarse el efectuarlo bajo - estas condiciones aunque en experimentos con vacas de una -

gestación de menos de cinco meses a más de ocho meses al tiempo de vacunación no abortaron, (7). Por otra parte mucho ganado recuperado de IPV, permanecen como diseminadores del vírus por periodos variables.

IV.- FORMA ENCEFALITICA:

Está bién aclarado que la enfermedad de Rinotraqueitis puede causar una MENINGOENCEFALITIS, y fue reportada en Australia, (5) y posteriormente en los Estados Unidos de Norteamerica, (2) esta forma esta caracterizada por atrofia, depreción excitación y convulciones.

Hay que aclarar que el mayor numero de casos ocurridos es en terneros jovenes.

MATERIAL Y METODOS

Material.-

Cristaleria: 30 frascos de 10ml.
11 cajas de petri
1 matraz erlen-meyer 500ml.
1 matraz erlen-meyer 250ml.
25 pipetas de 1ml.
20 tubos de ensaye
250 tubos capilares
jeringas de 2.5cm. y 20cm.
agujas 19-20
mechero
autoclave
portacaja de petri
perforador manual
plastilina
papel
tijeras

Reactivos: Solución buffer pH 6.4 (a)
(a) Acido borico 6.7gms.
agar-agar (bacto-agar, difco).
todo en 1000ml. de agua destilada.

Material biológico: Vacuna de IBR
1 conejo
30 sueros de bovino
5 sueros de cerdo
2 sueros de conejo

M A T E R I A L Y M E T O D O S

cajas.

Todo el procedimiento se realiza en campo esteril por lo cual se trabaja con un mechero a una distancia aproximada de 15cm.

Una vez que el gel ha soloidificado se procede a horadar con el perforador manual seis cavidades; una central y cinco periféricas, procurando que exista simetría en cada una de las perforaciones.

Se utilizaron 11 cajas de petri, en la cavidad central de cada caja se colocaron algunas gotas del antigeno conocido (vacuna IBR), hasta que saturaron la perforación; el mismo procedimiento se utiliza en las demas cavidades pero con sueros problemas, marcandose cada cavidad con la referencia y el numero de suero para lo cual se utilizo un lapíz graso.

Una vez hecho lo anterior se colocan las cajas dentro de un portacajas, colocando entre una y otra piezas de papel recortadas al diametro de las mismas, humedeciendolas para lograr una humedad de incubación adecuada; dejandose reposar el portacajas a temperatura ambiente.

Las lecturas se efectuan a las 24, 48 y 72 horas, en cuarto obscuro y mediante lúz indirecta para observar claramente la auscencia o formación de las bandas caracteristicas.

AGLUTINACION CAPILAR:

Para este metodo se utilizaron 6 diluciónes de cada suero problema en este orden: 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, lo cual se consigue de la forma siguiente: Se utiliza un tubo de ensaye esteril para cada dilución, en el primer

tubo se colocan 9ml. de una solución salina fisiologica esteril, y en los cinco tubos restantes solamente 5ml. de la misma.

Despues se coloca 1ml. del suero problema en el primer tubo de este se toman 5ml. y se pasan al segundo y así suscesivamente se pasan 5ml. de cada tubo hasta el sexto de donde los ultimos 5ml. se deshechan.

De este forma se consiguen las diluciónes anteriormente mencionadas, cada uno de los sueros se trabajan de igual forma.

De cada dilución se toma una muestra en un tubo capilar procurando que solo 1/3 del tubo contenga suero diluido y el otro tercio sea de antigeno (vacuna IBR), los tubos se colocan en placas de plastilina, asegurandose que el antígeno quede en la parte superior de cada tubo capilar, de esta forma habra un tubo capilar por cada dilución mezclado con el antígeno.

Las lecturas se efectuan a las 24 horas de verificada la prueba.

R E S U L T A D O S

RESULTADOS

AGLUTINACION CAPILAR

Controles:	1T	2T	3T	1Z	2Z	3Z	4Z	5Z
1:10	+	-	-	-	-	-	-	-
1:20	+	-	-	-	-	-	-	-
1:40	+	-	-	-	-	-	-	-
1:80	+	-	-	-	-	-	-	-
1:160	+	-	-	-	-	-	-	-
1:320	+	-	-	-	-	-	-	-

(1T)= Suero de conejo inmunizado

(2T y 3T)= Sueros de conejo normal

(1Z al 5Z)= Sueros de cerdos

DILUSION-SUERUS:	1A	2A	3A	4A	1B	2B	4B	1C	2C	4C
1:10	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
1:20	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-
1:40	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-
1:80	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-
1:160	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-
1:320	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-

	1D	2D	3D	4D	1E	2E	3E	1H	2H	3H
1:10	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
1:20	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+
1:40	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+
1:80	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+
1:160	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
1:320	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

	4H	1G	2G	3G	4G	5G	1ᵀ	2ᵀ	1J
1:10	+	+	+	+	+	+	-	+	+
1:20	+	+	+	+	+	+	-	+	+
1:40	+	+	+	+	+	+	-	+	+
1:80	+	+	+	+	+	+	-	-	+
1:160	+	+	+	+	+	+	-	-	+
1:320	+	+	+	+	+	+	-	-	+

INMUNODIFUSION

CONTROLES:

Caja	A	2T	3T			
		-	-			
Caja	B	1Z	2Z	3Z	4Z	5Z
		-	-	-	-	-
Caja	1	1A	2A	3A	4A	1T
		-	-	+	+	+
Caja	2	1B	2B	1T	4B	
		+	+	+	-	
Caja	3	1C	2C	1T	4C	
		-	-	+	-	
Caja	4	1D	2D	3D	4D	1T
		-	-	-	-	+
Caja	5	1E	2E	3E	1T	
		-	-	-	+	
Caja	6	1H	2H	3H	4H	1T
		-	+	+	+	+
Caja	7	1G	2G	3G	4G	5G
		+	+	+	+	+
Caja	8	1F	2F	1T		
		-	-	+		
Caja	9	1J				
		+				

RESUMEN DE RESULTADOS

AGLUTINACION CAPILAR:

1:40 = 13 casos negativos	44.71%
1:80 = 16 casos positivos	55.00%
	91.71%

INMUNODIFUSION:

NO. CASOS	%	COMPARACION DE LOS RESULTADOS CON A.C.
13 casos negativos	44.71	100 % (1:40)
11 casos positivos	37.80	68.7 % (1:80)
5 casos no concuerdan	17.20	
	99.71%	

FRECUENCIA DE LA ENFERMEDAD EN CUANTO A EDAD Y PESO DEL GANADO

KGS.	AGLUTINACION CAPILAR	INMUNODIFUSION
450	50%	40%
350	40%	30%
250	77%	77%

D I S C U S I O N

DISCUSION

Tanto en el método de inmunodifusión, como en el de aglutinación capilar, se utilizaron controles positivos y negativos. El control positivo para ambas pruebas fué el suero del conejo inmunizado con las vacunas de IBR, y el resultado se confirma en el cuadro primero; los controles negativos fueron confirmados en las dos pruebas.

Se tuvo que usar suero de conejos normales y de cerdos, puesto que no estaba al alcance el trabajar con sueros de bovinos SPF o novióticos, y el utilizar simples sueros bovinos no tendría valor puesto que no se sabría si estos animales hubieran tenido contacto con la enfermedad anteriormente; y el ser así las interpretaciones podrían ser erroneas.

Zyambo et al, demostraron que tanto la prueba de Hemato-aglutinación pasiva (HAT), como la de Suero-neutralización (SNT) para detectar anticuerpos virales a IBR-IPV da los mismos resultados cualitativamente.

Los sueros problemas de bovinos se tomaron al azar de lotes con diferentes pesos vivo, dentro de un corral de engorda comercial, ubicado en la periferia de la ciudad de Guadalajara dentro del Municipio del Salto, Jalisco.

Todo el ganado tenia de dos a tres semanas de reposo en el corral de engorda, y los lotes estaban compuestos por animales de diferente procedencia.

Cabe aclarar que en dichos corrales de engorda existe el antecedente de la enfermedad, pero el tiempo transcurrido

entre el brote de Rinotraqueitis y la de toma de las muestras fue de seis meses aproximadamente, ninguno de los animales muestreados tuvo contacto con animales o con el corral donde se presento el problema.

En la prueba de aglutinación capilar el 44.71% de los sueros fueron negativos, y el 55% positivos, considerandolos así del titulo 1:80, en adelante.

Por otro lado en el metodo de inmunodifusión se encontraron un 57.8% de positivos y un 44.71% de negativos.

Abraham et al encontraron que de 1016 sueros de bovinos trabajados en Israel durante 1972-73, 38 tenían anticuerpos contra la enfermedad de Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (3.4%), en algunos casos se demostro que la infección estaba asociada con ganado recién llegado.

El procedimiento de Micro-test fué encontrado seguro para la prueba de neutralización de anticuerpos a IBR por Darcel y Col; también detecto una mayor significación en ganado vacunado (25 cabezas) con dosis de Tcid50, que los factores (100 cabezas) vacunados con dosis Tcid100.

Cuando se evaluaron 2 tipos de vacunas contra IBR (atenuada, inactivada) de 63.9% de los becerros con título de anticuerpos demostrables el titulo más elevado fue 1:8 en el 8.3% de los animales. (14)

En 1972 Marsolais et al demostrarón que el 32.26% de sueros provenientes de bovinos sospechosos de Quebec, poseían títulos de anticuerpos superiores a 1:8 contra IBR.

En la prueba de inmunodifusión se encontró que 5 sueros no concordaban con los resultados de aglutinación capilar.

Asimismo al utilizar en sus pruebas de Suero-neutralización y mezclar 0.5ml. de una solución del virus de IBR de 10^{-1} a 10^{-8} con suero bovino de 6 animales, 5 no tenían títulos de anticuerpos homologos.

Las investigaciones demostraron que el título de anticuerpos puede ser mayor en infecciones del tipo respiratorio que en los de tipo genital.

C O N C L U S I O N E S

CONCLUSIONES

1. El 44.71% de los sueros bovinos trabajados en aglutinación capilar fueron negativos.

2. En este método el 55% de los casos fueron positivos.

3. En el método de inmunodifusión se encontro el mismo porcentaje 44.71% de sueros bovinos negativos.

4. El 37.8% de los sueros bovinos se encontraron positivos en inmunodifusión.

S U M A R I O

SUMARIO

De un corral de engorda comercial, situado en la periferia de la ciudad de Guadalajara, se muestrearon 30 bovinos, obteniendose sangre de los mismos.

Una vez retraido el coagulo, se procedio a extravasar el suero de las muestras; refrigerandolas hasta su uso.

Un conejo macho fué inmunizado por via intramuscular (0.05ml.) con un antígeno conocido (vacuna de IBR), este animal fué sangrado por punción cardiaca, y el suero obtenido se refrigero por 48hs., tambien se obtuvo suero de un conejo normal y de cinco cerdos, como controles negativos.

Se utilizaron 2 metodos de diagnostico, inmunodifusión y aglutinación capilar.

En el primer metodo se utilizaron 11 cajas de petri esteriles, y una vez solidificado el medio se horadaron 6 cavidades: una central y cinco perifericas; en el pocillo central de cada caja se coloco el antígeno (vacuna IBR) y en las perifericas sueros problemas.

El 37.8% de los sueros fueron positivos, y el 44.71% resultaron negativos.

En la aglutinación capilar se utilizaron 6 diluciones de 1:10 a 1:320, de los sueros bovinos; de cada dilución se tomo una muestra mezclandolo con el antígeno en un tubo capilar; por este método el 44.71% de los sueros resultaron negativos y el 55% positivos.

El suero del conejo inmunizado fue positivo en ambas pruebas, y los sueros controles negativos.

B I B L I O G R A F I A

BIBLIOGRAFIA

(1).- Adivianti and Plumer: Aislamiento de IBR de ganado - afectado con conjuntivitis. A.J.V.R. 22 (Jun. 1961- 13-17.

(2).- Spreefees et al: Aislamiento de IBR de terneros con - meningoencefalitis. J.A.V.M.A. 143 (Oct. 1963) 725 728.

(3).- Chow: IBR, aspectos clínicos, patológicos y virales. Canad. Vet. J. 7 (Agust. 1966) 161-168.

(4).- Chow, T.L.: Rinotraqueitis Infecciosa Bovina en ganado de campo, en Colorado USA. J.A.V.M.A. 138 (Jan. - 1961) 59-60.

(5).- Frenen et al: Relación entre el vírus de Rinotraqueitis Bovina y un vírus aislado de terneros con encefalitis. Austra, Vet. J. 38 (1962) 555-556.

(6).- Gillespies, J.H. et al: Comparación de IPV-IBR Cornel Vet. 49 (1959) 298.

(7).- Kennedy and Richards: Patologia del aborto, causado - por el vírus de IBR. Path. Vet. J. (1964) 7-17.

(8).- Mc Kercher D.G.: Estudio de los agentes etiológicos - de Rinotraqueitis Infecciosa Bovina, y de Blaschenauschalg (exantema vesicular coital). A.J.V.R. 24 (May- 1963) 501-509.

(9).- Mc Kercher D.G.: Aislamiento del virus de IBR de ganado en agostadero. J.A.V.M.A. 137 (Dec. 1966) 661 - 664.

(10).- Mc Kercher D.G.: El virus de IBR como causa de aborto en el ganado. J.A.V.M.A. 149 (Jan. 1969) 136-142.

(11).- Miller, N.J.: Rinotraqueitis necrotica infecciosa del ganado. J.A.V.M.A. 126 (June 1955) 463-467.

(12).- Progress in cattle and sheep practis.: Infections and infestations (part one) El. A.V.P. (1968) 15.

(13).- Renaldi. (Datos obtenidos en la ciudad de Mexico D.F.

(14).- Schipper I.A. and C.L. Kelling: Evaluation of inactivated infectious bovines Rhinotracheitis vaccines. - Can. J. comp. Med. 39 (Oct. 1975) 402-405.