

## REPRODUCCION EXPERIMENTAL DE RINOTRAQUEITIS INFECCIOSA BOVINA. II. RESPUESTA HEMATOLOGICA Y DE PROTEINAS PLASMATICAS

Livio Zurita A. (MV, MS), Wilhelm Rudolph R. (MV, MS, Ph.D),  
Eduardo Sotomayor M. (MV), Luis Moraga B. (MV, MS),  
Patricio Berríos E. (MV, MS, Ph.D), Iván Palavicino H. (MV, MS)

### EXPERIMENTAL INFECTION WITH INFECTIOUS BOVINE RHINOTRACHEITIS VIRUS. II. HEMATOLOGICAL AND SERUM PROTEINS RESPONSE

*Twelve calves less than one year old and negatives to infectious bovine rhinotracheitis virus, divided in three groups of four were inoculated with three different strains of bovine herpes virus type 1 (BHV-1) isolated in Chile. Blood cells and serum proteins were analyzed at different times, using classical methods.*

*The results showed a decrease in total leukocyte and lymphocyte count with the three virus strains used. In two of them there was an increase in the monocyte number between the third and fifth days post inoculation. The total serum protein concentration and its fractions did not show variations during the assay.*

En las infecciones virales, generalmente la respuesta hematológica característica es una leucopenia, la cual se atribuye a la acción directa del agente infeccioso sobre los leucocitos (Schalm y Cols., 1975), consecuencia de una disminución de los neutrófilos (Archer y Jeffcot, 1977).

Los antecedentes sobre cambios hemáticos provocados por el virus herpes bovino tipo 1 (VHB-1) son escasos y las publicaciones no entregan datos coincidentes. Rosner (1968) señala que en un estudio se observó leucopenia; en otras experiencias se ha comprobado solamente una disminución de neutrófilos. Este mismo autor da a conocer que en una infección en terneras, el rango de leucocitos varió de 20.000 a 30.000 por  $\mu$ l. Dellers (1975)\* reporta leucopenia como resultado de la infección con virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina (RIB).

Frank y Cols. (1977), en una infección experimental, observaron leucopenia en siete animales de un total de ocho. También se ha reportado neutrofilia en un caso de infección natural de RIB (Wiseman y Cols., 1978). Dudnik (1978),

en un estudio de infección experimental, determinó que no existen cambios en las concentraciones de eritrocitos y leucocitos; describiendo además un aumento de la capacidad fagocitaria e índice de lizosima de los neutrófilos. Este autor señala una tendencia a la disminución de los leucocitos.

Schudel y Cols. (1981), trabajando en infección experimental en bovinos, comprobaron cambios significativos en la concentración de leucocitos, linfocitos y neutrófilos, cuadro que se inició a las 24 horas posterior a la inoculación. A los 4 días posterior a la infección observaron neutropenia marcada y linfocitosis. Estas últimas células se caracterizaron por presentar vacuolización citoplasmática y yuxtannuclear con granulaciones tóxicas azurófilas en el citoplasma.

En este trabajo se estudian las variaciones producidas por el virus herpes bovino tipo 1 aisladas en el país, en algunos componentes hemáticos y de proteínas séricas, como un aporte más a la evaluación clínica y diagnóstico de la enfermedad causada por este virus.

### MATERIAL Y METODOS

**Virus.** Se utilizaron tres cepas del VHB-1 aisladas en el país: la cepa Puente Alto (PA-1977), obtenida desde secreción nasal de bovino con alteración respiratoria (Berríos y Cols., 1979); la cepa Frutillar (FAF-1982), aislada desde un neona-

Departamento de Ciencias Clínicas, Patología Animal y Medicina Preventiva Animal.  
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias.  
Universidad de Chile. Casilla 2, Correo 15. Santiago, Chile.  
Trabajo financiado por Proyecto A-2031-8622, DTI.  
Universidad de Chile.

\* Citado por Kahrs (1977).

to proveniente de un predio con antecedentes de aborto (Berríos y Cols., 1985) y la cepa virus mucosa lingual de bovino (VMLB-1979) aislada desde lesiones bucales de terneros (Berríos, 1982).

**Animales.** Se utilizaron 12 bovinos menores de un año y que fueron negativos a la presencia de anticuerpos neutralizantes al VHB-1. Se dividieron en tres grupos de cuatro animales cada uno, correspondientes a cada una de las cepas estudiadas. Un animal de cada grupo fue utilizado para efectuar un pasaje de las cepas virales mantenidas en el laboratorio. La metodología empleada en la inoculación experimental fue la descrita por Mora y Cols. (1987).

**Determinaciones hemáticas.** Las muestras de sangre para los exámenes correspondientes se obtuvieron, en las mañanas, mediante punción yugular. Estas consistieron en tres muestras, cada 7 días, en el período previo a la infección los días 1, 3, 5, 7, 9, 12 y 15 y posteriores a la inoculación. La sangre extraída se depositó en tubos de vidrio con y sin anticoagulante (EDTA)\*.

En las muestras de sangre con EDTA se determinó: hemoglobina g/dl, por el método de la cianometahemoglobina. Volumen globular aglomerado % (VGA), por el método de microhematocrito. Fibrinógeno plasmático mg/dl, el cual se midió por el método de precipitación por calor a 56°C durante 3 minutos (Schalm y Cols., 1975). Número de leucocitos/ $\mu$ l, determinados por el método del hemocitómetro. Recuento diferencial de leucocitos, en un extendido de sangre en cubreobjeto teñido por solución Giemsa.

A partir del suero sanguíneo se realizaron las siguientes determinaciones:

- Proteína sérica g/dl, evaluada mediante el método de Biuret. (Schalm y Cols., 1975).
- Fraccionamiento de las proteínas séricas mediante electroforesis. Para ello se utilizaron tiras de acetato de celulosa (Thomas PK 5Q), "buffer" tris barbital (pH 8,0) y una corriente eléctrica de 350 volt durante 20 minutos. Para visualizar las fracciones proteicas, éstas se tiñeron con solución rojo ponceau y luego fueron leídas en un densitómetro Beckman.

Los resultados se analizaron estadísticamente mediante análisis de varianza y prueba de "t".

## RESULTADOS

La determinación de hemoglobina, volumen globular aglomerado y fibrinógeno no presentaron cambios significativos en ninguna de las experiencias efectuadas (figuras 1 y 2).

La determinación de leucocitos/ $\mu$ l (figura 3), en

\* EDTA: Etilendiaminotetrácico, sal sódica, Merck.

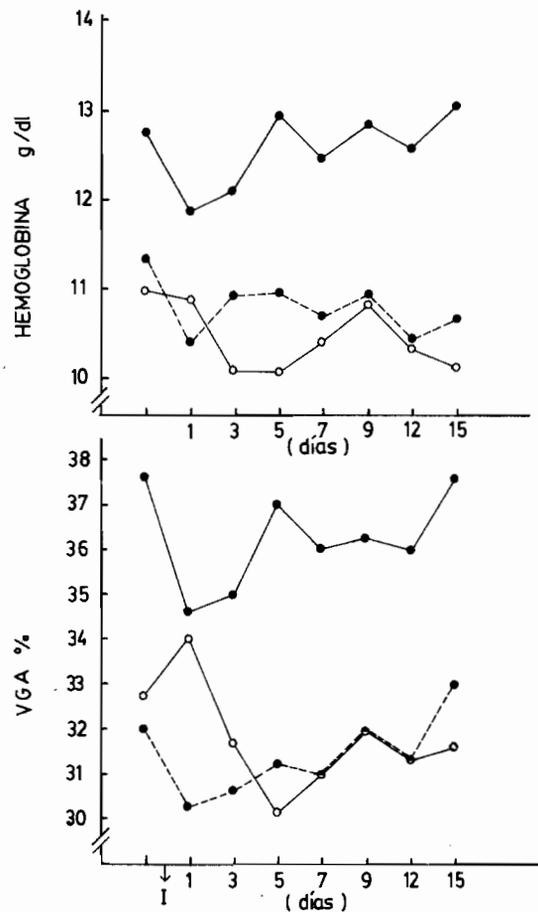


Figura 1. Variaciones de la hemoglobina y VGA en bovinos inoculados experimentalmente con VHB-1, cepas Puente Alto (○—○), Frutillar (●—●) y VMLB 1979 (●—●). Puntos corresponden al promedio de tres animales. I = infección.

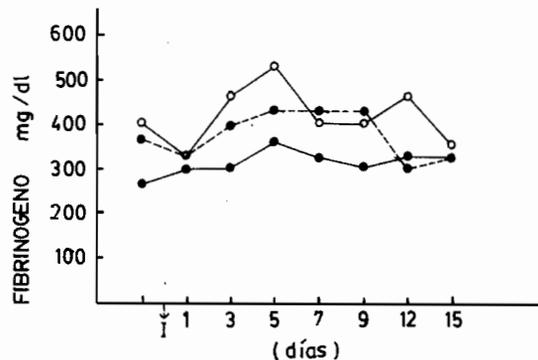


Figura 2: Variaciones del fibrinógeno promedio de tres bovinos inoculados experimentalmente con VHB-1 cepas Puente Alto (○—○), Frutillar (●—●), VMLB-1979 (●—●), durante el período preinfección hasta 15 días posterior a la infección. I = infección.

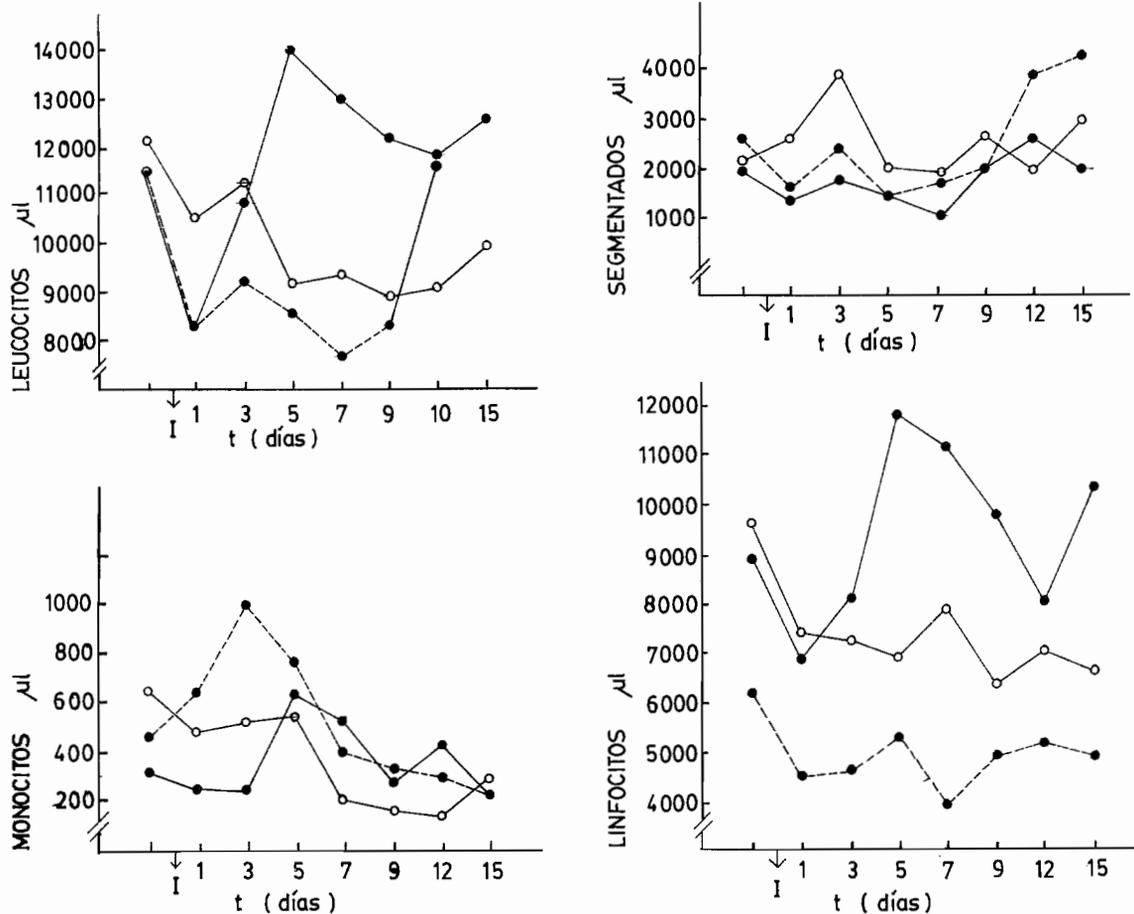


Figura 3: Variaciones de células sanguíneas en bovinos inoculados con VHB-1, cepa Puente Alto (○—○), Frutillar (●—●) y VMLB 1979 (●—●). Cada punto corresponde al promedio de tres animales. I = infección.

los animales inoculados con la cepa Puente Alto, dio como resultado una disminución en el día 9, la cual es estadísticamente significativa ( $P \leq 0,05$ ) presentando una disminución de un 23% del nivel inicial (promedio de determinaciones preinfección). En los animales inoculados con la cepa Frutillar, se observó una clara tendencia a la disminución de los leucocitos, que fue manifiesta desde el día 1 al día 9 postinoculación. Esta disminución fue significativa por análisis de varianza y por prueba de "t", en los días 1, 3, 5, 7 y 9, y aparece también en todos los animales de este grupo. Los leucocitos/ $\mu\text{l}$  en el grupo de animales inoculados con la cepa VMLB 1979 presentaron una disminución manifiesta y significativa en el día 1, siendo ésta de un 27% menor que el nivel inicial. En el día 5 se produjo un aumento, que significó un 27% más que el nivel basal; este aumento fue significativo e incluyó a todos los animales, siendo más manifiesto en un animal, que presentó leucocitosis (19.900 leucocitos/ $\mu\text{l}$ ).

Referente a los neutrófilos segmentados/ $\mu\text{l}$ , los animales inoculados con la cepa Puente Alto y VMLB-1979, no presentaron cambios estadísticamente significativos (figura 3). En los animales inoculados con cepa Frutillar se observó una leve disminución de segmentados en el día uno, nivel que se recuperó en el siguiente control. En los días 12 y 15 se observó un aumento significativo de estas células.

La cepa Puente Alto produjo en los días 1, 3, 5, y 9 una disminución significativa de los linfocitos/ $\mu\text{l}$ , siendo más notoria esta disminución en el día 9, en el que estas células disminuyeron en un 31% del nivel basal. Los animales inoculados con la cepa Frutillar tuvieron una disminución estadísticamente significativa de los linfocitos ( $P \leq 0,05$ ), siendo mayor en los días 1, 3 y 7, en este último fue 24% menor que el nivel de la preinfección. En los animales inoculados con la cepa VMLB-1979, se comprobó una disminución significativa de los linfocitos ( $P \leq 0,05$ ) en el día 1 postinfección, el

que se recuperó el día 3. Luego en los días 5 y 7 hubo una elevación significativa, detectándose en un animal 16.000 linfocitos/ $\mu$ l.

La determinación de monocitos/ $\mu$ l en los animales inoculados con la cepa Puente Alto, solamente presentó una leve disminución, la cual no tuvo significación estadística ( $P > 0,01$ ). Los animales inoculados con la cepa Frutillar mostraron ya en el día 1 un aumento de los monocitos, el cual se hizo significativo ( $P \leq 0,05$ ) en el día 3, cuando los monocitos aumentaron un 60% sobre los niveles basales. Este aumento superó los rangos normales, correspondiendo a una monocitosis, fundamentalmente dada por dos animales, que presentaron 1.023 y 1.034 monocitos el día 5. En el grupo de animales inoculados con la cepa VMLB-1979 se observó un aumento significativo ( $P \leq 0,05$ ) de los monocitos el día 5, dado fundamentalmente por dos animales, que presentaron 865 y 815 monocitos/ $\mu$ l, respectivamente. En el día 7, un tercer animal mostró monocitosis (1.025 monocitos/ $\mu$ l).

Los eosinófilos no mostraron variaciones en los animales inoculados con las cepas Puente Alto y Frutillar. En las determinaciones de la cepa VMLB-1979, se observó una tendencia a la disminución de los eosinófilos/ $\mu$ l, estadísticamente no significativo ( $P > 0,01$ ). Un comportamiento similar presentaron los basófilos, sin manifestar variaciones significativas.

La determinación de constituyentes plasmáticos y séricos tales como fibrinógeno, proteína total, albúmina y globulinas no presentaron variaciones significativas ( $P > 0,01$ ) durante la experiencia con ninguna de las cepas inoculadas. Solamente la fracción de las globulinas de los animales inoculados con la cepa Frutillar mostró un aumento estadísticamente significativo en el día 5 ( $P < 0,05$ ) (figura 4).

## DISCUSION

La respuesta hemática descrita en la literatura en una infección con VHB-1 y la observada en este trabajo se refiere principalmente a cambios en los leucocitos totales y sus componentes.

En el presente estudio se determinó una disminución significativa de los leucocitos, con respecto a los valores basales, en la inoculación de las tres cepas, sin llegar a leucopenia, y si los comparamos con los valores normales para la especie (Schalm y Cols., 1975), lo que es semejante a lo observado por Dudnik (1978). Sin embargo, otros autores comprobaron una disminución mayor de leucocitos, llegando a ser leucopenia (Deller, 1975\*,

\* Citado por Kahrs (1977).

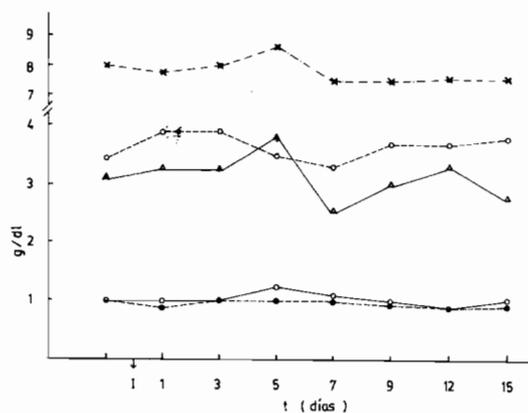


Figura 4: Variaciones de proteína total (x—x), albúmina (o—o) y globulinas séricas ( $\alpha$ : o—o;  $\beta$ : ●—●;  $\gamma$ :  $\Delta$ — $\Delta$ ) en bovinos inoculados con el VHB-1, cepa Frutillar. Cada punto corresponde al promedio de tres animales.

I = infección.

Frank y Cols., 1977; Schudel y Cols., 1981). Por otra parte, sólo un animal, correspondiente al grupo inoculado con la cepa VMLB-1979, presentó leucocitosis el día 5 posterior a la infección, hecho que también observó Rosner (1968).

Los neutrófilos segmentados disminuyeron en el día 1 y aumentaron en los días 12 y 15 en los animales inoculados con la cepa Frutillar (figura 3), sin embargo, con el resto de las cepas no presentaron variaciones. Otros autores han observado variaciones en los neutrófilos, describiéndose neutrofilia (Wiseman y Cols., 1978) o neutropenia (Schudel y Cols., 1981).

En cuanto a los linfocitos, éstos disminuyeron en los animales inoculados con todas las cepas. En los días 5 y 7 los animales inoculados con la cepa VMLB-1979 presentaron linfocitosis (figura 3), hecho también observado por Schudel y Cols., (1981).

Con respecto a los animales inoculados con la cepa Frutillar, ellos presentaron monocitosis en el día 3 postinfección, y en los animales inoculados con la cepa VMLB-1979, en el día 5 se detectó un aumento de los monocitos y un animal de este grupo presentó monocitosis, lo cual no ha sido descrito en la literatura.

En todos los animales inoculados hubo seroconversión, la cual se determinó por pruebas de seroneutralización (Moraga y Cols., 1987; Montero, 1987).

Los antecedentes clínicos y virológicos indican que la totalidad de los animales inoculados con las tres cepas VHB-1 se infectaron y cursaron con un cuadro clínico moderado que afectó las vías respiratorias altas (Moraga y Cols., 1987; Montero,

1987); sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio, en cuanto a la presentación y persistencia de la variación de la serie blanca, no permiten concluir que estas determinaciones sean de utilidad práctica para el diagnóstico, lo cual concuerda con los antecedentes bibliográficos sobre la variación encontrada en estudios referentes a la infección con VHB-1. Además es preciso hacer notar que, aunque se encontraron algunas diferencias estadísticamente significativas, al comparar la respuesta leucocitaria pre y postinfección, los valores obtenidos generalmente se encontraron dentro de los rangos normales para la especie.

## RESUMEN

Con el objeto de conocer la respuesta hematológica y de proteínas séricas frente a cepas del VHB-1 aislados en el país, fueron inoculados 12 bovinos menores de un año de edad y serológicamente negativos al virus.

Los resultados obtenidos mostraron una disminución de los leucocitos totales y linfocitos en los animales inoculados. Además en dos aumentó el número de monocitos entre el tercer y quinto día postinoculación. En relación a las proteínas séricas analizadas, éstas no sufrieron cambios significativos en los animales inoculados.

## REFERENCIAS

- ARCHER, R.K.; L.B. JEFFCOT. Comparative clinical haematology. Oxford. Blackwell Scientific Publications. 1977.
- BERRIOS, P.; M. JARPA, S. HERRERA. Aislamiento y tipificación del virus de la rinotraqueítis infecciosa de bovinos con sintomatología respiratoria. Arch. Med. Vet. (Suplem.) 1: 140-141, 1979.
- BERRIOS, P. Rinotraqueítis infecciosa bovina. Monografías de Medicina Veterinaria, 4: 60-83, 1982.
- BERRIOS, P.; M.O. CELEDON, F. CORTES, M. LUENGO. Aislamiento del virus de la rinotraqueítis infecciosa

- sa bovina en un brote de aborto en la zona sur de Chile. Arch. Med. Vet. 12: 49-52, 1985.
- DUDNIK, O.D. Change in blood values in calves experimentally infected with IBR-IPV virus. Veterinariya, Kiev. 48: 41-46, 1978.
- FRANK, G.H.; R.G. MARSHALL, P.C. SMITH. Clinical and immunological responses of cattle to infectious bovine rhinotracheitis virus after infections by viral aerosol or intranasal inoculation. Am. J. Vet. Res. 30: 1497-1502, 1977.
- KAHRS, R.F. Infectious bovine rhinotracheitis: A review and update. J. Am. Vet. Med. Ass. 171: 1055-1064, 1977.
- MONTERO, J.E. Inoculación experimental en terneros con una cepa de virus herpes bovino tipo 1 aisladas en el país y estudio del fenómeno de reactivación viral mediante el uso de Betametasona. Tesis. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile. 85 p. 1987.
- MORAGA, L.; E. RUIDIAZ, L. ZURITA, M.O. CELEDON, P. BERRIOS. Reproducción experimental de rinotraqueítis infecciosa bovina. I. Inoculación de dos cepas del virus herpes bovino tipo 1 aisladas en Chile. Avances en Ciencias Veterinarias, 2: 26-32, 1987.
- ROSNER, S.F. Infectious bovine rhinotracheitis: Clinical review, immunity and control. J. Am. Vet. Med. Ass. 153: 1631-1638, 1968.
- SCHALM, O.W.; N.C. JAIN, E.S. CAROLL. Veterinary hematology. 3rd, ed. Philadelphia. Lea-Febiger, 1975.
- SCHUDEL, A.L.; I.A. LAGER, N. FONDEVILA, A.M. SADIR, F. FERNANDEZ, J. MIQUET, F.J. BLANCO VIERA, S.J. DUFFI, C.N. CORBELLINI, B.J. CARRILLO. Rinotraqueítis infecciosa bovina (HVB-1) - IV: Patogenicidad experimental en la cepa L-114. Rev. Med. Vet. (Bs. As.) 62: 464-472, 1981.
- WISEMAN, A.; P.M. MSOLLA, I.E. SELMAN, E.M. ALLAN, H.J.C. CORNWELL, H.M. PIRIE, W.S. IMRAY. An acute severe outbreak of infectious bovine rhinotracheitis: Clinical, epidemiological, microbiological and pathological aspects. Vet. Rec. 103: 391-397, 1978.

Recibido en noviembre de 1987, aprobado en marzo de 1988.