

ENFERMEDAD DE LAS MUCOSAS CAUSADA POR EL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA-1a (BVDV-1a) EN UNA VAQUILLONA ABERDEEN ANGUS DE COLONIA, URUGUAY

Caroline da Silva Silveira¹, Leticia Maya², Laura Casaux¹, Carlos Schild¹, Santiago Diab³, Rodney Colina², Jorge Slavica⁴, Martín Fraga¹, Franklin Riet¹, Federico Giannitti⁴.

¹Plataforma de Investigación en Salud Animal, INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay. ²Laboratorio de Virología Molecular, UDELAR, Salto, Uruguay. ³California Animal Health and Food Safety Laboratory, University of California, Davis, California, Estados Unidos. ⁴Veterinario de Actividad Liberal, Colonia, Uruguay.

*Autor para correspondencia: fgjannitti@inia.org.uy.

RESUMEN

Se describe un caso de enfermedad de las mucosas (EM) en un rodeo Aberdeen Angus de Colonia, Uruguay, compuesto por 340 vaquillonas. Entre septiembre y noviembre de 2016 murieron 12 animales por causa indeterminada (mortalidad=3,5%). Se revisó clínicamente una vaquillona de 18 meses de edad, que manifestó taquipnea, taquicardia, diarrea fétida, deshidratación y pérdida de peso, y murió luego de un curso de 96 hr. El cadáver fue sometido a examen patológico macro y microscópico. Las principales lesiones fueron esofagitis erosiva/ulcerativa multifocal moderada, enterotiflocolitis necro-hemorrágica, difusa, severa, con criptitis necrotizante y microtrombosis, y rumino-reticulitis superficial con degeneración y apoptosis/necrosis individual de queratinocitos y trans migración epitelial de neutrófilos. Se detectó marcada inmunomarcación citoplasmática intralesional de antígeno de *Pestivirus* por inmunohistoquímica (IHQ) en células epiteliales e inflamatorias del esófago, intestino y colon. Además, en una muestra de suero se detectó el virus de la diarrea viral bovina (BVDV) por PCR, y la secuenciación permitió subtipificarlo como BVDV-1a. El cultivo selectivo para *Salmonella* spp. de contenido intestinal fue negativo, así como la IHQ para detección de coronavirus bovino en colon. Los hallazgos clínicos, patológicos, inmunohistoquímicos y moleculares permitieron confirmar el diagnóstico de EM por BVDV-1a. Estudios clínico-epidemiológicos, patológicos y virológicos más extensos son necesarios para estimar el impacto del BVDV para la ganadería nacional.

SUMMARY

This work describes a case of mucosal disease (MD) in a herd of 340 Aberdeen Angus heifers in Colonia department, Uruguay. In September and November of 2016, 12 heifers died of undetermined cause/s (mortality=3.5%). Clinical examination of an 18-month-old heifer revealed tachypnea, tachycardia, fetid diarrhea, and weight loss. The heifer died after a clinical course of 96 h. The carcass was subjected to gross and microscopic pathologic examination, which revealed multifocal moderate erosive/ulcerative esophagitis, severe diffuse necro-hemorrhagic enterotiflocolitis with necrotizing cryptitis and microthrombosis, and superficial rumino-reticulitis with keratinocyte hydropic degeneration, apoptosis/individual cell necrosis, and neutrophilic transmigration in the epithelium. Immunohistochemistry (IHC) for BVDV antigen detection revealed strong intralesional immunoreactivity in the cytoplasm of epithelial and inflammatory cells in the esophagus, small intestine and colon. BVDV genome was detected by PCR in a serum sample, and the strain was further subtyped as BVDV-1a by sequencing. *Salmonella* spp. culture and bovine coronavirus IHC were negative in intestinal content and colon, respectively. The clinical, pathological and molecular findings allowed for diagnostic confirmation of MD caused by BVDV-1a. Further clinicoepidemiological, pathological and virologic studies are needed to estimate BVDV impact on the Uruguayan livestock industry.

INTRODUCCIÓN

El virus de la diarrea viral bovina (BVDV), del género *Pestivirus*, tiene amplia distribución mundial y produce importantes pérdidas económicas para la ganadería. Hay dos especies de BVDV reconocidas, BVDV-1 y 2, siendo el 1 el más diverso genéticamente, con aproximadamente 20 subtipos (BVDV-1a a 1t). Recientemente, el *Pestivirus* tipo HoBi, ha sido propuesto como una nueva especie (BVDV-3), basado en similitudes antigénicas y genéticas (Maya et al. 2016).

Los síndromes asociados a BVDV incluyen: a- la forma clásica de diarrea viral bovina, con alta morbilidad y baja mortalidad, generalmente asociada a cepas virales no citopáticas (NC). b- la forma severa aguda, caracterizada por morbilidad y mortalidad altas, causada mayormente por BVDV-2. c- la enfermedad de las mucosas (EM), caracterizada por baja morbilidad y muy alta letalidad. d- trombocitopenia. e- dermatitis; y g- infecciones fetales que pueden resultar en muerte embrionaria, momificación, aborto, anomalías congénitas, o, si el feto sobrevive, el nacimiento de terneros persistentemente infectados (PI), cuando los fetos son infectados por cepas NC antes de los 4 meses de gestación (Uzal et al. 2016). Este trabajo describe un caso de EM asociado a BVDV-1a, en una vaquillona de Colonia, Uruguay.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se registró un brote de enfermedad en vaquillonas Aberdeen Angus de un rodeo de cría del departamento de Colonia. Se visitó el establecimiento y se recolectó información epidemiológica. Una vaquillona afectada fue revisada clínicamente, y se tomó una muestra de suero. La vaquillona murió espontáneamente el 30/11/2016. Se realizó la necropsia y se colectaron muestras de tejidos, que fueron fijadas en formol y procesadas para histología. Secciones de esófago, intestino y colon fueron procesadas por inmunohistoquímica (IHQ) para la detección de antígeno de *Pestivirus*, y una sección de colon fue procesada por IHQ para detección de coronavirus bovino (BCoV). Se realizó PCR en tiempo real para detección de BVDV usando métodos previamente descritos (Maya et al. 2016), que permiten la detección de BVDV-

1, BVDV-2 y *Pestivirus* de tipo HoBi, seguido de secuenciación para la subtipificación viral. Además, se realizó un cultivo bacteriano selectivo para *Salmonella* spp. en contenido intestinal.

RESULTADOS

El foco ocurrió en un lote de 340 vaquillonas Aberdeen Angus en pastoreo rotativo, en el que murieron 12 vaquillonas en el transcurso de sep-nov de 2016 (mortalidad=3,5%). El 28/11/2016 una vaquillona de 18 meses fue examinada clínicamente, presentando taquipnea, taquicardia, normotermia, atonía ruminal, diarrea de olor fétido, deshidratación, y pérdida de peso. El animal murió espontáneamente luego de 96 h. La necropsia reveló múltiples erosiones y úlceras no perforantes, irregulares, bien delimitadas, de hasta 0.5 cm, en la mucosa de la región torácica del esófago, petequias y equimosis en la serosa yeyunal, con contenido intestinal fluido, amarillado, sanguinolento y de olor fétido en el yeyuno, ciego y colon. Difusamente la mucosa del colon se presentaba marcadamente enrojecida, con material mucoso/viscoso adherido a la superficie (colitis hemorrágica). Microscópicamente, se constató esofagitis ulcerativa necrotizante multifocal con microtrombosis en la submucosa y necrosis individual/apoptosis de queratinocitos, reticulorumenitis multifocal superficial multifocal leve con hinchazón y degeneración hidrópica individual de queratinocitos y transmigración de neutrófilos en el epitelio, y enterotiflocolitis necrotizante extensiva severa con edema en la submucosa, microtrombosis en la lámina propia, y criptitis cística neutrofílica. La IHQ para BVDV reveló abundante y fuerte inmunomarcación intralesional homogénea en el citoplasma de las células epiteliales e inflamatorias en el esófago, intestino delgado y colon. El genoma de BVDV fue detectado por PCR, y la secuenciación permitió clasificarlo como el subtipo 1a. El cultivo de *Salmonella* spp. y la IHC para BCoV fueron negativos.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los signos clínicos y los hallazgos patológicos en la vaquillona examinada fueron los típicamente descritos en casos de EM (Uzal et al. 2016). Mediante detección del genoma

viral y la localización de antígeno de BVDV intralesionalmente mediante IHQ, se estableció el diagnóstico etiológico, a la vez que se descartaron otras causas de colitis necrotizante en esta especie (Uzal et al. 2016). Dado que en este estudio sólo examinamos 1/12 animales muertos en el transcurso de 2 meses, la causa de muerte en los otros 11 animales permaneció incierta. Sin embargo, es posible que varias de esas pérdidas hayan sido debidas a BVDV.

La ocurrencia de EM requiere de la presencia de animales PI, congénitamente infectados, que son la principal fuente de infección en el rodeo. Los terneros PI son inmunotolerantes a la cepa NC con la que están infectados, debido a una incapacidad del sistema inmune de reconocer a los antígenos virales como foráneos. La EM ocurre en los animales PI cuando la cepa NC de BVDV se convierte al biotipo citopático por mutación, recombinación y/o rearrreglos genómicos, generalmente en la proteasa viral NS23. Esto resulta en una infección devastadora, con destrucción de las células del huésped, a la cual el sistema inmune es incapaz de responder (Uzal et al. 2016). Los terneros PI pueden ser clínicamente normales, sin embargo, la mayoría de ellos muere de EM antes de los 2 años de edad (Uzal et al. 2016), rango de edad en la que se encontraba la vaquillona de este caso. En Uruguay, las primeras evidencias de circulación de BVDV datan de 1996 (Saizar 1998), y un estudio serológico realizado en ganado de carne en 2000-2001, indicó que 69% de 6358 animales eran seropositivos, y que el 100% de 230 rodeos tenían al menos un animal seropositivo (Guarino et al. 2008), indicando una alta exposición al agente en la población de bovinos de carne del país. Recientemente, se exploró la infección activa por BVDV en bovinos de Uruguay, en un estudio en el que se analizaron 390 muestras de suero de 14 rodeos en búsqueda de antígeno viral por ELISA y genoma viral por PCR. Se encontró que 4.1% (16) de los animales fueron positivos por ambas técnicas (Maya et al. 2016), lo que sugiere, ya sea que se trataba de animales PI, que eran animales sufriendo infecciones

transitorias adquiridas en la etapa postnatal, o ambas. Interesantemente, la tasa de mortalidad en el rodeo que nosotros estudiamos, fue del 3.5%, lo que sugiere, hipotéticamente, que podría haber habido un 3.5% de animales PI en este lote, un valor cercano al encontrado por Maya et al. 2016. Si bien la prevalencia de animales PI en un rodeo es generalmente <2%, ésta puede ser tan alta como 25-30% en rodeos en los que grandes cantidades de vacas han sido expuestas a cepas NC durante la gestación temprana (Uzal et al. 2016).

En el único estudio publicado en el que se exploró la diversidad genética de BVDV en Uruguay, el principal subtipo encontrado fue BVDV-1a (Maya et al. 2016), el mismo subtipo encontrado en el caso de EM descrito en este reporte, lo cual indica que, además de ser el más frecuente en el país, está asociado con enfermedad severa y muerte en ganado de carne. Estudios más extensos y sistemáticos son necesarios para determinar el impacto económico del BVDV para la ganadería en Uruguay, y la distribución y frecuencia de los distintos subtipos involucrados en cuadros clínicos en el país.

BIBLIOGRAFÍA

- Guarino H, Núñez A, Repiso MV, Gil A, Dargatz DA. 2008. Prevalence of serum antibodies to bovine herpesvirus-1 and bovine viral diarrhoea virus in beef cattle in Uruguay. *Prev Vet Med* 85:34-40.
- Maya L, Puentes R, Reolón E, Acuña P, Riet F, Rivero R, Cristina J, Colina R. 2016. Molecular diversity of bovine viral diarrhoea virus in Uruguay. *Arch Virol* 161(3):529-535.
- Saizar J. 1998. Estudio serológico de la diarrhoea viral bovina del Uruguay. *Veterinaria* 34:9-14.
- Uzal FA, Plattner BL, Hostetter JM. *Alimentary System*. In: Maxie MG, ed. *Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals*. 6th edition, Elsevier, 2016, vol. 2, pp: 122-128.