

**CARACTERIZACION INMUNOQUIMICA DEL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA(V DVB) EN CELULAS INFECTADAS CON MATERIALES DE CASOS CLINICOS.**

Gollan, A; Silvano, D; Occhi, H; Reutemann, S; Pinotti, M; Rodríguez, R.; Passeggi, C; Lucca E.

Facultad de Ciencias Veterinarias-Universidad Nacional del Litoral- P. Kreder 2805
3080 ESPERANZA - Santa Fe - ARGENTINA.

RESUMEN

Se describe la detección inmunoquímica del virus de la Diarrea Viral Bovina (V DVB) en cepas recuperadas de casos clínicos del Hospital de Salud Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral- Santa Fe- Argentina.

Las mismas aisladas e identificadas por inmunofluorescencia directa (IFD) se estudiaron por técnicas inmunoquímicas (IQ-IP) para confirmarlas y establecer una diferenciación de las mismas en genotipos 1 y 2. Sobre 54 muestras estudiadas, 43 fueron Positivas en IFD, IQ-IP y 7 fueron recuperadas por esta última técnica, habiendo sido Negativas en las otras. Todas correspondieron al genotipo 1 y ninguna al 2.

SUMMARY

This study describe the immunochemistry detection of the bovine viral diarrhea virus (BVDV) recovered from clinic cases of the Faculty of Veterinary Sciences Hospital of the National Littoral University-Santa Fe-ARGENTINA. The strains recovered by habitual systems and identified by direct immunofluorescence (DIF) were studied and compared its performance with immunochemistry techniques to ensure the confidence of them and to make a distinction between genotypes 1 & 2. About 54 samples studied 43 were Positive in IF IQ-IP and 7 were recognized by this method and not by the traditional one. All the strains belong to type 1 and none to type 2.

INTRODUCCIÓN

El virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB) es un ARN de simple cadena perteneciente a la Familia Flaviviridae, responsable de enfermedad entérica y fallos reproductivos en bovinos, el que pasando de madre a feto puede causar abortos, terneros malformados e individuos que nacen persistentemente infectados (PI) que eliminan continuamente grandes cantidades de virus durante su vida, a través de secreciones nasales, lágrimas, orina, materia fecal, semen y leche (6). Presenta 2 genotipos :1 - que comprende cepas clásicas y virus utilizados en vacunas y 2 las que causan trombocitopenia y enfermedad aguda (3). Así la identificación de los P.I. y especialmente la de aquellas cepas que no presentan efecto citopatogénico (NCP) se ha hecho por diferentes

métodos que incluyen la inmunofluorescencia (IF), inmunoperoxidasa (IP) , enzimoimmunoensayo (ELISA) reacción en cadena de la polimerasa (PCR)(4 -1). El uso de Anticuerpos monoclonales con epitopes conservados en las pruebas de IP logra un alto nivel de sensibilidad diagnóstica (2).

OBJETIVO

El objetivo ha estado aplicado a establecer comparaciones entre técnicas, implementar una alternativa diagnóstica y tipificar aislamientos.

MATERIALES Y METODOS

En nuestro Laboratorio fueron estudiados 54 materiales, provenientes de casos clínicos del Hospital de la Facultad, habiendo aislado previamente 43 cepas del VDVB desde fetos y animales de diferentes edades, en nuestro Laboratorio entre los años 2000-2004 en cultivos celulares susceptibles (riñón, pulmón y testículo de feto bovino y Línea celular establecida MDBK certificada libre del virus y cultivada para su crecimiento con suero equino)(1).Las mismas fueron identificadas por IF, tituladas por el método de Reed y Muench (8) a fin de establecer la DICT 50%, usando controles de referencia internacional (NADL-Singer, DS 1).Los restantes materiales (11-once) correspondieron a casos Negativos para aislamiento luego de 3 pases consecutivos en células y de la tinción por duplicado para IFD de cada pasaje.

Inmunofluorescencia directa: se detectó la acción viral por IFD sobre las células infectadas con reactivos comerciales (VMRD-Cat. 210-61 BVD) por el método de Coons y col.(7) consistente en la confección de improntas de células infectadas, oreadas y fijadas por 10' con acetona fría, luego de lo cual fueron teñidas con el conjugado, incubándose las por 45' a 37° C, para finalmente luego de varios lavados , observarlas en microscopio de epifluorescencia.

I-Técnicas Inmunoquímicas sobre células:

Se procedió al estudio los materiales siguiendo las técnicas de IP-IQ cedidas por el Dres. Donis, R y Dubovi, E.J.(5) del Dpt. Of Veterinary and Biomedical Sciences, University of Nebraska- Lincoln- USA- consistentes en:

-Preparación de cultivos celulares susceptibles, primarios de pulmón, riñón y testículo fetal de bovino y Línea celular establecida MDBK, que se inocularon con las cepas virales. Conjuntamente se trabajó con las Cepas de Referencia mencionadas.

Se fijaron con acetona fría por 15' y se lavaron 4 veces con Buffer de Lavado. Luego se adicionó antisuero policlonal comercial (VMRD BDVB-Cat. 210-70) diluido en Buffer de lavado y se incubaron por 90' a 37°C. Luego de 3 lavados se incubaron nuevamente con HRP -rec-



Protein G(Zymed-Cat 10/1223) por 45 ' a 37°C.

Luego de reiterados lavados, finalmente se adicionó el sustrato AEC y se esperó la revelación mediante aparición de color, valorando la tinción sobre las células, ensayándose conjuntamente controles cada vez.

II-Ensayo con Anticuerpos monoclonales:

-Microtécnica- para detección de tipo 1 y tipo 2 del VDVB(2):

Se utilizaron Anticuerpos monoclonales Isotype Ig2a-Type 1 -cell line 157 y Type 2 para proteína E (gp53) cell line BA 29 -(VMRD con sus respectivos slides controles Positivo y Negativo para cada tipo).

Los microcultivos se inocularon a partir de las células mencionadas en suspensión, con las cepas aisladas y de referencia incubándose por 5 días. Se fijaron las capas con acetona 70%, se dejaron secar y se les adicionó a cada celda el anticuerpo monoclonal correspondiente a cada tipo. Luego de incubación por 1 hora a 37°C y 4 lavados se agregó HRPO- rec- protein G-Peroxidase Conjugate- Zymed (cat.10-1223), incubándose nuevamente por 45'. Seguidamente se agregó sustrato AEC por 25 ' y finalizada la incubación final y el lavado, las capas se escurrieron y observaron a ojo desnudo y en microscopio invertido, indicando la coloración roja la positividad. Conjuntamente se procesaron Cepas de referencia que obraron como controles positivos y células sin infectar como controles negativos.

RESULTADOS

* Sobre 54 materiales estudiados por todas las técnicas (aislamiento, IFD, IP-IQ) 43 de ellos resultaron Positivos para el virus de la Diarrea Viral Bovina en Aislamiento, IFD y IQ-IP.

** 7 materiales fueron Positivos en IQ-IP habiendo sido Negativos en las otras técnicas.

*** 4 Materiales fueron Negativos en todas las técnicas.

**** Todos los materiales estudiados (50 materiales originales) correspondieron al genotipo 1 y ninguno al genotipo 2.

CONCLUSIONES

Las técnicas inmunoquímicas constituyen un método rápido, reproducible, confiable y de realización sencilla en cortos tiempos y costos accesibles, lo que permite incluirlas en programas de control.

Algunos materiales resultaron Negativos en técnicas de uso corriente y sensible como el aislamiento y la IF, lo

que proyecta el uso de la IQ como una alternativa disponible.

Ofrece la ventaja de que las células teñidas pueden evaluarse rápidamente por microscopía de inversión, no haciéndose necesarios equipos más costosos.

La preparación simultánea de gran número de inoculaciones de materiales problema permite trabajos seriados, con el consiguiente ahorro de tiempo y celeridad en la emisión de resultados.

La coincidencia de las técnicas de rutina (Aislamiento-IFD) y la nueva implementada (IQ) fue del 80%.

El uso de anticuerpos monoclonales aventaja por su alta especificidad en la coloración por hacer fácilmente distinguibles aún pocas células infectadas y pueden reconocer epitopes conservados en distintas cepas, hecho que se ve realizado aún más cuando se trata de distinguir el Tipo 1 del Tipo 2.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Castro, M.; Stoffregen, W.-1997-»A method to detect bovine viral diarrhea virus contamination in cell cultures using immunoperoxidase staining»-J.Vet.D.Invest. 9:427-431.
- 2) Corapi, W.; Donis, R.; Dubovi, E.-1990-»Characterization of a panel of monoclonal antibodies and their use in the study of the antigenic diversity of bovine viral diarrhea virus»-Am.J.Vet.Res. 51:1388-1394.
- 3) Deregt, D.; Lowen, K.-1995-»Bovine viral diarrhea virus, biotypes and disease- Can.Vet. J. 36:371-377.
- 4) Deregt, D.; Prins, S.-1998- «A monoclonal antibody-based immunoperoxidase monolayer assay for detection of Type 1 and Type 2 bovine viral diarrhea virus»-Can.J.Vet.Res. 62:152-155.
- 5) Dubovi, E.J.-1996-»Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections»Vet. Med. 91: 867-872.
- 6) Lértora, W.J.-2003- «Diarrea Viral Bovina: Actualización.» Rev. Vet.14:1-42-52.
- 7) Manual de técnicas de Diagnóstico Viroológico- Inmunofluorescencia: Procedimiento directo de Coons y col.- Red de Cooperación Técnica - Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la alimentación- Oficina para Latinoamérica y el Caribe- CICV- (Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias) Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria- INTA- Argentina-
- 8) Reed, L.J.; Muench, H.- 1937- «A simple method of estimating fifty percent end points» -Am. J. Hyg. 27:493-497.