

DETECCION DEL VIRUS
DE LA DIARREA VIRAL BOVINA EN
URUGUAY

Deborah César¹

RESUMEN

El complejo Diarrea Viral Bovina Enfermedad de las mucosas es producido por un virus ARN de la Familia Flaviviridae, miembro del género Pestivirus y se manifiesta con un amplio rango de síndromes clínicos.

En 10 casos que por su clínica, epidemiología y/o cuadro patológico podrían corresponder a un cuadro producido por el virus de BVD, se desarrolla la técnica inmunohistoquímica de streptavidina-biotina peroxidasa para la detección de dicho virus, encontrándose 4 casos positivos, los cuales correspondieron a Enfermedad de las Mucosas. La inmunopositividad se visualizo en lengua, esófago, intestino y ganglio mesentérico, observándose como granulaciones intracitoplasmáticas de color marrón.

Se concluye que el virus de Diarrea Viral Bovina esta presente en el país.

INTRODUCCION

El complejo Diarrea Viral Bovina - Enfermedad de las mucosas es producido por un virus ARN de la Familia Flaviviridae, miembro del género Pestivirus y se manifiesta con un amplio rango de síndromes clínicos. (2,3)

¹ DMV.FRVC.S.Técnico de la División de Patología de la Dirección de Laboratorios Veterinarios "Miguel C. Rubino". CC6577, Montevideo, Uruguay. Asistente del Departamento de Patología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República.

Estas manifestaciones incluyen infecciones subclínicas, diarrea, inmunosupresión, repetición de celo, aborto y momificación, defectos congénitos, inmunotolerancia con infección persistente y enfermedad de las mucosas. (2,3)

Recientemente 2 grupos de virus de la Diarrea Viral Bovina fueron reconocidos en base a su genotipo y han sido designados como Tipo I y Tipo II. A su vez dentro de cada uno de estos grupos existen cepas citopatogénicas y no citopatogénicas según produzcan o no efecto citopático a nivel de cultivos celulares. (15,16)

Los estudios realizados indican que el Grupo I contiene los virus que son usados en la producción de vacunas, test diagnósticos y estudios de investigación, mientras que en el Grupo II están aquellos encontrados en el suero fetal bovino, en animales persistentemente infectados y animales que mueren de la forma aguda denominada síndrome hemorrágico. (5,15,16)

Los distintos síndromes asociados a la infección con el virus de Diarrea Viral Bovina ha llevado a confusión en el diagnóstico y solo ha sido en los últimos años que esto se ha clarificado. (8,9)
Por las características de la enfermedad ,probablemente la mayoría de los casos de Diarrea Viral pasen desapercibidos o erróneamente diagnosticados.

En Uruguay han habido varias sospechas de infección con el virus de Diarrea Viral Bovina y los cuadros patológicos observados, en la mayoría de los casos corresponden a Enfermedad de las Mucosas. También en aquellos casos de abortos e infertilidad en los cuales se han descartado las etiologías mas comunes (Campylobacteriosis, Leptospirosis, Trichomoniasis) se ha sospechado que pudiera estar actuando la infección por el virus de Diarrea Viral Bovina.

El diagnóstico de los distintos síndromes asociados al virus de Diarrea Viral Bovina esta basado en la demostración de la presencia del virus en sangre y/o los distintos tejidos de los animales afectados. (8,9)

La técnica de elección es el aislamiento viral en cultivos celulares. Dicha técnica tiene la desventaja de ser laboriosa, necesitar varios días o aun semanas para la detección del mismo y además es necesario contar con una infraestructura importante para mantener dichos cultivos celulares libres del virus de diarrea viral, ya que se encuentra fácilmente en el suero fetal bovino utilizado como medio de enriquecimiento para los cultivos celulares. (6,8,9)

La detección del antígeno de Diarrea Viral Bovina en cortes por congelación por medio de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa han sido descritos por varios autores. Sin embargo con estas técnicas no es posible mantener una buena arquitectura celular y es necesario contar con material fresco para su realización. (4,6,17)

Las técnicas inmunohistoquímicas que utilizan el sistema streptavidina-biotina marcada permiten la detección de distintos antígenos celulares en materiales parafinados, permitiendo al mismo tiempo el mantenimiento de la arquitectura y detalle celular así como realizar estudios retrospectivos.(7,10,11,)

Este trabajo describe la presencia del virus de Diarrea Viral Bovina en Uruguay a través de su detección por medio de la técnica inmunohistoquímica de streptavidina-biotina marcada.

MATERIALES Y METODOS

El material trabajado proviene de casos mantenidos en el archivo de Patología del DI.LA.V.E. Miguel C. Rubino. Se estudiaron 10 casos que por su clínica, su epidemiología, y/o su cuadro patológico podían corresponder a un cuadro producido por el Virus de Diarrea Viral Bovina .

La mayoría de los casos (8) provenían de animales con probable enfermedad de las mucosas con síntomas de diarrea, deshidratación, hipertermia y lesiones erosivas en mucosa bucal, esófago y enteritis. Los otros casos (2) correspondían a fetos abortados de aproximadamente 6 meses de gestación (Cuadro 1)

Distintas vísceras fueron colectadas o remitidas, las que fueron fijadas en formol bufferado al 10 % (Cuadro 2). Se realiza la inclusión en parafina , se cortan los bloques a 5 micras de espesor, coloreándose con Hematoxilina-Eosina. (14)

Para los estudios inmunohistoquímicos se utiliza el sistema semiautomático Microprobe, con slides Probe On, tratados con una solución al 10% de Poli - L - Lisina, y un Kit de Streptavidina-biotina marcada Histostain-Bulktm .

Los cortes son desparafinados en Xilol y se lleva cabo la rehidratación a través de pasajes de alcohol 100, alcohol 95 y alcohol 70.

Se realiza la inactivación de la peroxidasa endógena en una solución de 0.5% de Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂), en metanol por 10 minutos a temperatura ambiente y luego se realizan 4 lavados con PBS con 0.4% Brij 35, (PBS-Brij)

Para recuperación antigénica se utiliza una solución de 0.1 % de Tripsina, durante 1 hora a 37°C en cámara húmeda.

CUADRO No. 1 . Casos Estudiados

No.	CATEGORIA	DEPARTAMENTO	No ANIMALES	PRESENTACION
1	Novillo	Paysandú	3	EM
2	Ternero	Tacuarembó	1	EM
3	Ternero	Soriano	2	EM
4	Feto	Tacuarembó	1	Aborto
5	Feto	Tacuarembó	1	Aborto
6	Ternero	Tacuarembó	1	EM
7	Novillo	Durazno	1	EM
8	Vaca	Tacuarembó	3	EM
9	Novillo	Paysandú	1	EM
10	Vaca	Tacuarembó	2	EM

Luego de realizados 6 lavados con PBS-Brij, se bloquean las uniones inespecíficas incubándose los materiales con suero normal de cabra al 10 % por 10 minutos a temperatura ambiente y en cámara húmeda.

Seguidamente se utiliza como anticuerpo primario un anticuerpo monoclonal anti-virus de Diarrea Viral Bovina (15C5₄) diluido en PBS a una concentración de 1:3000 y se incuba durante 2 horas a 37 °C en cámara húmeda.

CUADRO No. 2. Materiales Trabajados

No.	TEJIDOS TRABAJADOS
1	Intestino
2	Paladar, Lengua, Esófago, Intestino, Ganglio mesentérico, Bazo
3	Lengua, Esófago, Rumen, Abomaso, Intestino, Ganglio mesentérico, Amígdala, Timo, Hígado, Riñón
4	Riñón, Hígado
5	Pulmón, Adrenal
6	Intestino, Ganglio mesentérico, Bazo
7	Lengua
8	Esófago, Intestino
9	Intestino
10	Rumen, Intestino, Ganglio mesentérico, Bazo

Después de realizarse 6 lavados con PBS-Brij se coloca el anticuerpo secundario biotinilado, incubándose por 10 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda.

Nuevamente se realizan lavados con PBS-Brij y se incuban los cortes con el conjugado de Streptavidina-peroxidasa, durante 10 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda.

Posteriormente se retiran las laminas del slide holder colocándose en PBS. La solución reveladora utilizada es una solución de 0.05% de 3,3 Diaminobencidina (DAB), en 0.1M de Tris/HCl pH 7.6, por aproximadamente 10 minutos, controlando la reacción bajo microscopio.

Luego se corta la reacción colocando las laminas en agua destilada, se realiza coloración de fondo con Hematoxilina de Harris (14), y se monta con Permount.

Se utilizaron controles positivos y negativos. Para controles negativos se utilizaron los mismos materiales a los se le coloca un suero normal de ratón, en lugar del anticuerpo primario monoclonal contra el virus de Diarrea Viral Bovina.

Como control positivo se utilizan cortes positivos de casos con aislamiento viral del archivo de Patología de la Universidad de Cornell, USA.

RESULTADOS

De los 10 casos estudiados 4 resultaron positivos a la detección del virus de Diarrea Viral Bovina por la técnica de Streptavidina-biotina marcada. (Cuadro No. 3)

Todos los casos positivos correspondieron a los cuadros que clínica y patológicamente correspondían a Enfermedad de las mucosas.

La positividad se visualizó como graulaciones marrones intracelulares distribuidas de manera difusa por todo el citoplasma.

En todos ellos se observo positividad en intestino encontrándose esta tanto a nivel de las células epiteliales de la mucosa así como en células inflamatorias mononucleares a nivel de submucosa.

Tanto en lengua como mucosa bucal y en esófago, la positividad fue mas marcada a nivel del epitelio estratificado en el cual se dio de manera multifocal no asociándose siempre a las areas de erosión.

También se visualizó una positividad franca en las células mononucleares de submucosa.

En ganglio linfático las células que mostraron mayor positividad fueron las células paracorticales pero se observaron también células positivas difusas por toda la estructura del ganglio.

CUADRO No. 3

No.	RESULTADO
1	POSITIVO
2	POSITIVO
3	NEGATIVO
4	NEGATIVO
5	NEGATIVO
6	NEGATIVO
7	POSITIVO
8	NEGATIVO
9	POSITIVO
10	NEGATIVO

DISCUSION

Las técnicas inmunohistoquímicas al combinar técnicas anatómicas, inmunológicas y bioquímica, permiten localizar diferentes tipos de antígenos mediante el empleo de anticuerpos específicos y moléculas marcadoras convirtiéndose así en una excelente herramienta complementaria en patología diagnóstica. (7,10,11)

Estas técnicas dependen de la unión antígeno-anticuerpo; en consecuencia deben considerarse algunos factores críticos como son la especificidad de los anticuerpos y la preservación de los antígenos.

La mayoría de las veces la falta de reproducibilidad de resultados en estas técnicas es causada predominantemente por defectos en el procesamiento del material, particularmente la fijación. (7, 10, 11,12)

Este método de identificación del antígeno del virus de Diarrea Viral Bovina en tejidos fijados, puede ser usado como confirmación positiva de laboratorio de infección con el virus de Diarrea Viral Bovina, sin necesidad de aislamiento viral y es muy útil en la investigación de síndromes como la enfermedad entérica, respiratoria, reproductiva y de animales perisistentemente infectados. (1,4,8,9,13,18)

En muchos casos la primera indicación de infección con virus de Diarrea Viral Bovina se realiza mediante la identificación del mismo en materiales provenientes de necropsia.

En casos de abortos y enfermedad respiratoria cuando el virus de Diarrea Viral Bovina es detectado, a menudo puede no ser claro si el virus de Diarrea Viral Bovina debe ser considerado como un patógeno primario o no.

Sin embargo la identificación de infección siempre tiene significado y nunca debe ser ignorado cuando se considera la sanidad del rodeo. (8,9)

Trabajos recientes con el anticuerpo monoclonal 15C5 utilizado por nosotros, el cual reacciona con la proteína E0, ha mostrado una amplia reacción con la mayoría de las cepas del virus de Diarrea Viral Bovina y puede ser usado para detectar dicho antígeno en materiales parafinados y fijados en formol. (9,12)

El epitopo reconocido de la proteína E0 esta ampliamente conservado entre los distintos aislamientos del virus de Diarrea Viral Bovina y la habilidad para reaccionar no esta afectada por la variación antigénica. (9,12)

De los casos estudiados solo en 4 de ellos se detectó la presencia del antígeno de Diarrea Viral Bovina.

Esto puede ser debido primariamente a que no todos los casos fueron producidos por dicho agente y/o que los materiales no hayan sido fijado apropiadamente, condición fundamental para la preservación de los antígenos. (7,10,11)

Por todo esto se hace necesario un conocimiento y entendimiento de la complejidad de la patogénesis de las infecciones agudas y persistentes, para determinar cuales son las muestras apropiadas para remitir al laboratorio y la interpretación posterior de los resultados. (8,9)

CONCLUSION

El presente trabajo demuestra la presencia del Virus de Diarrea Viral Bovina en el Uruguay.

Se destaca que una vez que un diagnóstico de laboratorio positivo es realizado, una investigación epidemiológica completa debe ser realizada.

Sin embargo se considera que es necesario el aislamiento y caracterización de las diferentes cepas actuantes en nuestro medio, no solo con fines diagnósticos sino para poder implementar un sistema de control y prevención.

SUMMARY

The Bovine Viral Diarrhea - Mucosal Disease Complex is due to an ARN virus of the Flaviviridae Family, member of Genus Pestivirus which has a wide range of clinical syndromes.

In 10 cases that for the clinic, epidemiology and/or pathological picture could correspond to BVD infection, it is developed the immunohistochemical technique of Streptoavidin-biotin peroxidase. It was found 4 positives cases all of them corresponding to Mucosal Disease.

The immunoreactivity was observed in tongue, oesophagus, intestine and mesenteric lymphonodule like brown intracitoplasmic granulation.

It is concluded the presence of Bovine Viral Diarrhea Virus in Uruguay.
Mayo 1996

BIBLIOGRAFIA

- Allan G.M.; McNulty M.S.; Bryson D.; Mackie D.; Platten M. 1989. Demostration of bovine virus diarrhoea virus antigen in formalin fixed, paraffin embedded tissue using a streptavidin/biotin technique. Research in Veterinary Science 46 416-418.
- Baker J.C. 1987. Bovine Viral Diarrhea: A review. J. Am. Vet. Med. Assoc. (190) 1448 - 1499.
- Baker J.C. 1995. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. Veterinary Clinics of North America (11) 3 425-445.
- Belak, K; Gimeno, E.J.; Belak, S. 1989. Demostration of Bovine Viral Diarrhoea Virus antigen in cell culture and in Paraffin-embedded Tissue Sections by the Peroxidase-antiperoxidase (PAP) Technique usinf monoclonal antibodies. Acta Vet. Scand. (30) 231-233.
- Bielefeldt-Ohmann H. 1995. The pathologies of bovine virus diarrhoea virus infection. A window on the pathogenesis. Veterinary Clinics of North America (11) 3 447-476.

- Bolin, S.R.; Matthews, P.J.; Ridpath, J.F. 1991. Methods for detection and frequency of contamination of fetal calf serum with bovine viral diarrhoea virus and antibodies against bovine viral diarrhoea virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* (3) 199-203.
- Bourne, J.A. 1983. *Handbook of Immunoperoxidase Staining Methods*. Ed. Dako Co., Santa Barbara, CA.
- Brock K.V. 1995. Diagnosis of bovine viral diarrhoea infection. *Veterinary Clinics of North America* (11) 3 549-476.
- Dubovi, E.J. 1990. The diagnosis of bovine viral diarrhoea infections. A laboratory view. *Vet. Med.* (85) 1133-1139.
- Gimeno E.J. 1995. Fundamentos de Inmunohistoquímica aplicada a Patología Veterinaria. Proceeding del 7º. Encontro Nacional de Patología Veterinaria. Colegio Brasileiro de Patología Animal. Belo Horizonte MG.
- Haines, D.M.; Chelack, B.J. 1991. Technical consideration for developing enzyme immunohistochemical staining procedures on formalin-fixed embedded tissue for diagnostic pathology. *J. Vet. Diagn. Invest.* 3 101-112.
- Haines D.M.; Clark E.G.; Dubovi E.J. 1992. Monoclonal Antibody-based Immunohistochemical detection of bovine viral diarrhoea virus in Formalin-fixed, Paraffin-embedded tissues. *Vet Pathol.* 29 21-32.
- Hewicker M.; Wohrmann T.; Fernandez A.; Trautwein G.; Liess B.; Moennig V. 1990. Immunohistochemical detection of bovine viral diarrhoea virus antigen in the central nervous system of persistently infected cattle using monoclonal antibodies. *Veterinary Microbiology* 23 203-210.
- Luna G.I. 1968. *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. Third Edition. McGraw - Hill, New York.
- Pellerin, C.; Van Den Burk, J.; Lecomte, J.; Tijssen, P. 1994. Identification of a New Group of bovine viral diarrhoea strains Associated with severe outbreak and high mortalities. (203) 260-268.
- Ridpath J.F.; Bolin S.R.; Dubovi E.J. 1994. Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. *Virology* 205 66-74.
- Saino, H.; Watanabe, H.; Ikehata, T. 1994. Immunoperoxidase Procedures for rapid detection of Bovine Viral Diarrhoea-Mucosal Disease virus antigen. *J. Vet. Med. Sci.* 56 (4) 805-807.
- Wilhelmsen C.L.; Bolin S.R.; Ridpath J.F.; Cheville N.F.; Kluge J.P. 1991. Lesions and localization of viral antigen in tissue of cattle with experimentally induced or naturally acquired mucosal disease, or with naturally acquired chronic bovine viral diarrhoea. *Am. J. Vet. Res.* 52 2 269-275.

Origen de los Reactivos

- a Fisher Scientific, Springfield, NJ
- b Sigma Diagnostics, St. Louis, MO
- c Zymed Laboratories Inc, South San Francisco, CA
- d Diagnostic Laboratory, Cornell University, Ithaca, NY
- e Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc, Gaithersburg, MA