

DIARRREA VIRAL BOVINA: ESTUDIOS VIROLOGICOS DE UN TERNERO CON MALFORMACIONES

GOLLAN, A. E.¹; RODRIGUEZ, R.²; NOGUES, M. E.³ & OCCHI, H.¹

RESUMEN

El Virus de la Diarrea Viral Bovina es agente causal de cuadros clínicos desde inaparentes hasta graves patologías que incluyen abortos, malformaciones y nacimientos prematuros. En ellos se encuentran involucradas las Cepas citopatogénicas (CP) y las NO citopatogénicas (NCP). Se describen los estudios virológicos realizados a un ternero nacido con malformaciones (síndrome de idiocia, desarrollo anormal, hipoplasia tímica).

Se procesaron muestras del buffy coat por aislamiento, el suero por el test MPVIT y seroneutralización. Los resultados obtenidos indican el aislamiento del virus tanto de glóbulos blancos como de suero, a la vez que la serología para anticuerpos resultó negativa.

El aislamiento de una cepa CP de un animal con malformaciones, induce a pensar que la cepa NCP infectante in útero podría haber mutado por efecto de recombinaciones celulares. Tales eventos son objeto de próximos estudios.

Palabras clave: diarrea viral bovina, malformación congénita, persistentemente infectado.

SUMMARY

Bovine Viral Diarrhoea: Virological studies in a calf with malformations.

The bovine viral diarrhoea is the responsible agent of clinical descriptions from non-apparent to serious pathologies including abortion, malformations and premature births. They are related to the cytopathogenic (CP) and noncytopathogenic (NCP) strains. Virologic studies performed on a calf born with malformations (idiocy, abnormal development, timic hypoplasia) are described.

The buffy coat samples were processed by isolation and the sera by the MPVIT test and seroneutralization. The results obtained show the virus isolation from both: white blood cells and the serum, and that the serology for antibodies was negative.

The isolation of a CP strain from an animal with malformations makes us think that a mutation in the original NCP uterine strain could have been caused by cellular recombinations. Such studies are to be developed in the future.

Key words: Bovine viral diarrhoea, congenital malformation, persistently infected.

1.- Cátedra de Virología e Inmunología. Facultad de Ciencias Veterinarias, UNL. Kreder 2805. 3080, Esperanza, provincia de Santa Fe

2.- Cátedra de Clínica de grandes animales. Facultad de Ciencias Veterinarias, UNL.

3.- Pasante: estudiante de Medicina Veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias, UNL.

Manuscrito recibido el 21 de agosto de 2002 y aceptado para su publicación el 2 de abril de 2003.

INTRODUCCIÓN

El virus de la Diarrea Viral Bovina (V DVB) es agente causante de pérdidas en el ganado bovino debido a los abortos, muertes perinatales, nacimientos prematuros y al amplio rango de malformaciones que produce. (Duffel *et al.*, 1986).

Los animales persistentemente infectados (P.I.) e inmunotolerantes al virus son de gran relevancia epidemiológica y los responsables de la perpetuación del virus en la población bovina (Bolin 1992; Edwards *et al.*, 1991).

Las prevalencias generales de animales virémicos -persistentemente infectados- (P.I.) alcanzan al 1 %, pero rodeos estudiados individualmente exhiben hasta un 17 % (Moening *et al.*, 1993).

Un control efectivo, ya propuesto por diferentes autores, debe ser la eliminación de las fuentes de infección, siendo uno de los métodos de elección para la identificación de los animales P.I. (Bolin *et al.*, 1993; Lee & Gillespie 1994).

La demostración directa del virus mediante aislamiento a partir de las células del buffy coat (capa de glóbulos blancos de la sangre) está descrita por Brown *et al.*, 1993 y Liess *et al.*, 1989. El cultivo de las mismas para recuperar virus, requiere períodos prolongados sobre sustratos celulares susceptibles. En general tales procedimientos son extensos en el tiempo que insumen y muy laboriosos, por lo que resultan inadecuados para pruebas tamíz en estudios poblacionales, pero muy relevantes en casos individuales como el que se presenta en este trabajo (Ko-brak & Weber 1996).

El objetivo del mismo ha sido intentar recuperar antígenos virales del VDVB (Virus de la Diarrea Viral Bovina) en leucocitos de sangre periférica de un ternero arribado al Hospital de la Facultad de Ciencias Vete-

rinarias de Esperanza con malformaciones compatibles con las producidas por infección intrauterina con éste virus (Done *et al.*, 1980).

CASO CLINICO

El animal estudiado fue seleccionado a partir de un grupo de 13 partos eutócicos ocurridos al mismo tiempo en un rodeo de 120 vacas y vaquillas, que habían sido recientemente adquiridas en el establecimiento en cuestión poco antes de los nacimientos.

De los 13 terneros, 12 murieron en forma perinatal en el transcurso de 1 semana y el sobreviviente tenía escaso desarrollo alcanzando apenas 15 kilogramos de peso. Al cabo de 4 meses llegó a los 60 kilogramos, pero con escaso desarrollo corporal y predominio de la región torácica sobre la abdominal. Presentó un cuadro de marcada constipación, síndrome de depresión cortical constante, deformación bilateral del tórax con compromiso de las 5 primeras costillas, notándose una concavidad manifiesta por debajo de la cintura escapular (Foto 1).

Se advirtió un síndrome de idiocia consistente en hipopsiquismo, hipomotricidad e hipoestesia. No se registraron manifestaciones de epífora, disnea, lagrimeo, tos, hipertermia, sialorrea, ni ataxia.

Los estudios hematológicos practicados (hemogramas) resultaron normales para la edad del animal en estudio.

Éste fue sacrificado cuando tenía aproximadamente 6 meses y a la necropsia se observó como hecho destacado la hipoplasia tímica (Foto 2) y lesiones de caquexia generalizada crónica.

En cambio, si presentó mioatrofia y anemia, ambas lesiones compatibles con el síndrome caquético.

Se observó además una marcada degeneración nutricional de las grasas; lesiones degenerativas en hígado y riñón.



Foto 1: Aspecto general del animal.

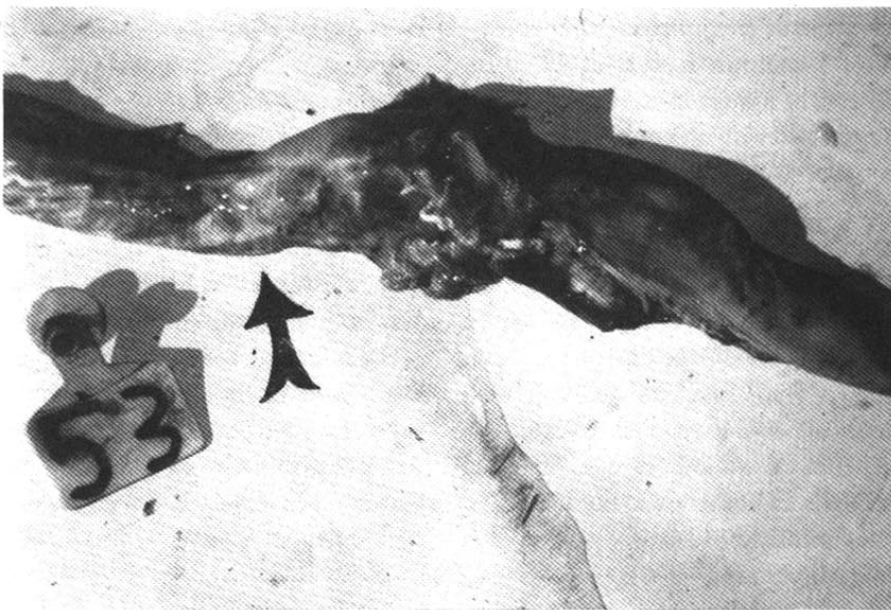


Foto 2: Hipoplasia tímica.

MATERIALES Y METODOS

MUESTRAS DE SANGRE Y SUERO

Las muestras de sangre para obtención del buffy coat, fueron colectadas en tubos estériles con anticoagulante ácido etilendiaminotetracético (EDTA) aproximadamente a los 150 días posteriores al nacimiento del animal. Se obtuvieron en condiciones de asepsia y por punción yugular. Al mismo tiempo se obtuvo sangre entera estéril para extracción de suero y una segunda muestra se obtuvo 15 días después.

CELULAS Y VIRUS

Se trabajó con distintos pasajes de la línea celular establecida Madin Derby Bovine Kidney (M D B K) -P 131 a 144 - susceptible para el aislamiento-, de riñón de bovino y certificada como libre del virus de la Diarrea Viral Bovina (V DVB).

La misma se mantuvo en cultivos sucesivos con medio de crecimiento (M C) constituido por Minimun Essential Medium (MEM) con el agregado de 8 % de Suero Fetal Bovino (certificado como libre de virus y anticuerpos anti V BVD, más 1 % de antibióticos).

Las monocapas se inocularon cuando tuvieron un 100 % de confluencia o bien las células fueron usadas en suspensión, en concentración de 4×10^5 células por «ml» en la siembra. Como Cepa Viral de Referencia se utilizó la Cepa -C P- (citopatogénica) Sin-ger mantenida y titulada en cultivos de la línea MDBK. El título de uso fue 100 DICT 50 % (dosis infecciosa cultivo de tejidos 50%) en la dilución $10^{6.3}$.

METODOS

A) Procesamiento de la sangre con anticoagulante.

1- Se dejó sedimentar la sangre por 45

a 60 minutos. Diferenciado el paquete de hematíes y sobre éste el de leucocitos, se descartaron los glóbulos rojos por escurecido.

2- Se rescató el buffy coat y el plasma sobrenadante -rico en leucocitos- y se centrifugó en centrífuga ROLCO- CM 36-R , por 15 minutos a 2.000 r.p.m. (revoluciones por minuto). Se limpió nuevamente de glóbulos rojos aún remanentes y se homogeneizaron plasma y leucocitos.

3- Se centrifugó plasma y leucocitos por 15 minutos a 2.000 r.p.m. para obtención del paquete celular.

4- Se separó el plasma que fue congelado en Nitrógeno líquido.

5- Se lavaron los leucocitos por 3 veces consecutivas resuspendiéndolos en MEM y centrifugándolos luego por 15 minutos a 2.000 r.p.m., descartando el sobrenadante de medio a fin de limpiar los glóbulos blancos de las sustancias contenidas en el plasma.

6- El paquete leucocitario (con un conteo de 2 a 4×10^6 células por «ml») fue adicionado con el 10 % de dimetilsulfoxido (DMSO) como protector y congelado hasta su utilización como inóculo.

7- Se infectaron células de Riñón de Bovino (Línea MDBK pasajes entre 131 y 144) en las 2 variantes: monocapa completa con 100% de confluencia y células en suspensión, cultivadas en MEM más suero fetal bovino y antibióticos.

La infección se repitió en dos pasajes sucesivos del material (P 1 y P 2) manteniéndose el cultivo por espacio de siete días cada vez y realizándose en 2 réplicas para cada forma de inoculación del material proveniente del buffy coat.

B) Test de aislamiento de virus en microplacas (Micro plate virus isolation test -MPVIT).

Este test, especialmente desarrollado

para estudios de búsqueda de P.I. en rodeos, también fue utilizado con pequeñas cantidades de suero y plasma que se inocularon en las celdas de microplacas de titulación, por duplicado, sobre células de riñón bovino (MDBK). Se mezclaron 5 microlitros de suero o plasma con 100 microlitros de suspensión de células susceptibles conteniendo 4×10^6 células por "ml", usando el plasma y suero del P.I. en concentraciones desde sin diluir hasta la dilución 1/80 hechas en MEM (Dubovi 1998)

C) Serología

Obtenido el suero en las 2 ocasiones en condiciones de asepsia a fin de asegurar la esterilidad y separados luego libres de hemólisis, se inactivaron por 30 minutos a 56 grados centígrados en baño termostático.

Se efectuaron pruebas clásicas de microseroneutralización en policubetas, enfrentando diluciones séricas desde 1/5 a 1/320 con 100 DICT 50% de la Cepa Singer en un título de $10^{6.3}$ DICT 50% y células (línea MDBK) susceptibles, a razón de 3×10^5 células por mililitro.

Se valoró la neutralización viral en base a la aparición o no del clásico efecto citopatógeno (ECP) propio de la cepa C P utilizada.

D) Identificación y confirmación del aislamiento por pruebas de neutralización (NT)

Los líquidos sobrenadantes de los cultivos infectados que evidenciaron ECP fueron centrifugados por 20 minutos a 5.000 r.p.m. a fin de decantar los detritos celulares y se enfrentaron en una prueba clásica de neutralización viral (NT) con un antisuero policlonal anti V DVB, utilizando la Cepa CP Singer.

Este fue previamente elaborado y

titulado por nuestro grupo de trabajo luego de producirlo en un bovino libre del virus en cuestión y de anticuerpos contra el mismo. (El chequeo de esta condición del animal, fue hecha en el Laboratorio del Centro de Virología Animal- Bs. As.: aislamiento y detección de anticuerpos por Inmunofluorescencia (I.F.)

El mismo posee un título seroneutralizante de 1/160.

La mencionada prueba (NT) se llevó a cabo en policubetas con células de bovino de la línea certificada (MDBK) probándose el líquido producto del aislamiento en concentraciones variables desde sin diluir hasta 10^5 . Esta prueba se repitió 2 veces con intervalo de 15 días para corroborar su repetibilidad.

RESULTADOS

El intento de aislamiento del virus partiendo tanto del buffy coat como del suero, se evidenció como positivo en todos los pasajes efectuados (MPVIT e IFD).

La producción de efecto citopatógeno traducido en alteración y lisis celular se observó, pero en forma tardía. Luego de 5 a 6 días posteriores a la infección de cultivos se detectaron lesiones celulares de características leves, no agresivas como suele presentarse el ECP característico de Cepas de referencia.

El contenido de estos líquidos, posibles Cepas virales, fueron neutralizados siempre cuando se enfrentaron al antisuero rico en anticuerpos policlonales anti V DVB, de lo cual se infiere la presencia del agente.

La serología (SNT) de ambos sueros obtenidos resultó sistemáticamente NEGATIVA para las 2 muestras

estudiadas y en todas las diluciones ensayadas, no evidenciándose así la existencia

de anticuerpos anti virus de la Diarrea Viral Bovina.

DISCUSION - CONCLUSIONES

Es un tema ya conocido que anteriores trabajos de otros autores y de nuestro grupo explicitan, la existencia de 2 Biotipos de Cepas del V DVB, el citopatogénico -CP- y el NO citopatogénico -NCP- (Bolin *et al.*, 1997; Liess *et al.*, 1993; Meyers *et al.*, 1991; Moenning *et al.*, 1993).

Mientras el primero induce vacuolización y muerte celular in vitro, el NCP no causa efecto sobre los cultivos, siendo necesario para su detección el auxilio de otros métodos (por ejemplo la Inmunofluorescencia, IF).

No obstante hay datos de que el biotipo NCP podría presentarse con escaso y tardío efecto sobre las células en cultivo (Bolin *et al.*, 1997).

Si bien es sabido el hecho de que in útero, la infección se lleva a cabo por causa de las cepas NCP del V DVB y previo al desarrollo por parte del ternero en gestación de la inmunotolerancia, creemos que nuestro hallazgo de efecto citopatogénico a partir del buffy coat puede coincide con lo propuesto por distintos autores , en cuanto a que en animales persistentemente infectados por una cepa NCP del V DVB, ésta sería susceptible de mutar al biotipo CP mediante la incorporación de secuencias celulares en eventos de recombinación (Brown *et al.*, 1993)

También podría tratarse de una cepa NCP que produce escaso efecto sobre los cultivos in vitro, o bien de una cepa CP que se hallaba coexistiendo con su par NCP (Corapi *et al.*, 1988; Meyers *et al.*, 1991).

Hemos de puntualizar que el biotipo CP es encontrado casi con exclusividad en

los casos clínicos y que es posible además aislarlo de animales en perfecto estado de salud (McClurkin *et al.*, 1994).

Este biotipo es el responsable de enfermedad severa al superinfectar a los persistentes virémicos y el causante de alta mortalidad , siendo el biotipo CP originado como una mutación del NCP, una forma individual en un animal infectado (Brownlie 1994).

No obstante a haber observado efecto citopatogénico in vitro, no se registraron en el animal signos clínicos, ya sea por superinfección o bien pensando en la posible mutación desde el biotipo NCP al CP in vivo o in vitro.

Los hallazgos y el seguimiento clínico en cuanto a las malformaciones y en especial aquellos de tipo neurológico, coinciden con lo descrito por varios investigadores (Brownlie, 1994) y en observaciones realizadas por nosotros, sobre el amplio rango de lesiones que el virus produce en las células en las que replica con preferencia por aquellas mitóticamente activas, pero también en las del sistema nervioso central (SNC)y los tejidos linfoides. Ciertamente el virus causa significativos retardos de crecimiento intrauterinos en varios tejidos del feto y el efecto citolítico se sugiere para la hipoplasia en la capa germinal del cerebelo y otros tejidos (Fernández *et al.*, 1989). La hipomielinización del SNC se asocia a hipo-plasia tímica y ha sido observada también por parte de algunos autores (Cay *et al.*, 1989).

El agente viral recuperado de este caso se encuentra siendo objeto de estudios más profundos tales como la caracterización antigénica de esta Cepa por estudios con anticuerpos monoclonales y también de estudios de secuenciación de su ácido nucleico por las técnicas moleculares actualmente disponibles, los que serán oportunamen- te

comunicados.

BIBLIOGRAFIA

- BOLIN, S.** 1992. BVD: What's the latest. National Animal Disease Center. IOWA, U.S., XVII Congreso Mundial de Buiatría, Minesota.
- BOLIN, S.** 1993. Immunogens of bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Microbiology* -37-263-271
- BOLIN, S., SACKS, J. ; CROWDER, S.** 1997. Frequency of association of noncytotoxic bovine viral diarrhoea virus with mononuclear leukocyte from persistently infected cattle. *Am. J. Vet. Res.* 48-1441-1445.
- BROWN, T.; DE LAHUNTA, A.; SCOTT, F.; KAHR, R.; McENTEE, K.** 1993. Virus induced congenital anomalies of the bovine fetus. II Histopathology of cerebellar degeneration (hypoplasia) induced by the virus of the bovine viral diarrhoea-mucosal disease. *Cornell Vet.* -63, 561-578.
- BROWN, T.; SCHULTZ, A.; DUNCAN, J.; BISTNER, S.** 1979. Serological response of the bovine fetus to bovine viral diarrhoea virus. *Infect. Immunology* -25-93-97-
- BROWNLIE, J.** 1994. The pathogenesis of bovine virus diarrhoea infection. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. EPIZOOTIES* -9-1- 43-59
- CAY, B.; CHAPPUIS, G., COULIBALY, C.; DINTER, Z et al.** 1989. Comparative analysis of monoclonal antibodies against pestiviruses: report of an international workshop. *Vet. Microbiology.* 20-123-129-
- CORAPI, W.; DONIS, R.; DUBOVI, E.** 1988. Monoclonal antibody analysis of cytotoxic and noncytotoxic viruses from fatal bovine viral diarrhoea virus infections. *J. Virology* 62-2823-2827.
- DONE, J.; TERLECKI, S.; RICHARDSON, C.; HARKNESS, J.; SANDS, J.** 1980. Bovine virus diarrhoea-mucosal disease virus: pathogenicity for the fetal calf following maternal infection. *Vet. Rec.* 106, 473-479-
- DUBOVI, E.** 1998. Bovine Viral Diarrhoea Virus. Encontro Internacional sobre Herpes-virus Bovino (tipo 1-5) e Virus da Diarreia Viral Bovina (BVD V) Santa Maria, R.S., Brasil.
- DUFFEL, S.; SHARP, M.; BATES, D.** 1986. Financial loss resulting from BVD-MD virus infection in a dairy herd. *Vet. Rec.* 118-38-39
- EDWARDS, S.; WOOD, L.; BROCKMAN, S.; IBATA, G.** 1991. "Clinical and virological observations of mucosal disease outbreak with persistently infected seropositive survivors" *Arch. Virology* -2-125-132-
- FERNANDEZ, A.; HEWICKER, M.; TRAUTWEIN, G.; PHOLENZ, J.; LIESS, B.** 1989. Viral antigen distribution in the central nervous system of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Path,* 26, 26-32.
- KOBRAK, L.; WEBER, L.** 1996. Diarreia Viral Bovina: Una actualización. *Rev. Arg. de Microbiología.* -28-47-61-
- LEE, K.; GILLESPIE, J.** 1994. Propagation of virus diarrhoea virus of cattle in tissue cultures. *Am. J. Vet. Research* -18-952-955.
- LIESS, B.; ORBAN, S.; FREY, H.; TRAUTWEIN, G.; WIEFEL, A.; BINDOW, H.** 1989. Studies on transplacental transmissibility of bovine virus diarrhoea (bvd v) vaccine in cattle. *ZBL.Vet. Medicine-* 31- 669-681.
- LIESS, B.; REINECKE, S.; SANDERS, G. et al.** 1993. An immunoplaque assay distinguishing between cytopathogenic and noncytopathogenic Biotypes of Bovine Viral Diarrhoea Virus. *J. Vet. Medicine* 40-89-60-
- McCLURKIN, A.; LITLEDIKE, R.; CUTLIP, G. et al.** 1994. Production of cattle immunotolerant to bovine viral diarrhoea virus. *Can J. Comp. Medicine.* 48-156-161.
- MEYERS, G.; TANTZ, N.; DUBOVI, E.; THIEL, J.** 1991. Viral cytopathogenicity correlated with integration of ubiquitin coding sequences. *Virology* 180-602-616.
- MOENNING, V.; FREY, E.; LIEBER, E.;**